



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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Derivados sintéticos do ácido 4-clorocinâmico e atividade antimicrobiana

RAYANNE HELLEN DO NASCIMENTO SILVA

João Pessoa

UFPB-2018



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Derivados sintéticos do ácido 4-clorocinâmico e atividade antimicrobiana

RAYANNE HELLEN DO NASCIMENTO SILVA

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

S586d Silva, Rayanne Hellen do Nascimento.

Derivados sintéticos do ácido 4-clorocinâmico e
atividade antimicrobiana / Rayanne Hellen do Nascimento
Silva. - João Pessoa, 2018.

155 f. : il.

Orientação: Damião Pergentino de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Ésteres derivados - ácido
4-clorocinâmico. 3. Ésteres derivados - 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
Caroline Helena M. de M. Manguieira
SIAPE C 1775369
Assistente em Administração

Ata da 386ª (trecentésima octogésima sexta) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Rayanne Hellen do Nascimento Silva**, candidata ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às quatorze horas (14h00) do dia seis de março do ano de dois mil e dezoito (06.03.2018), 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 **Rayanne Hellen do Nascimento Silva**, candidata ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os doutores Luis Cezar Rodrigues, Ph.D em Química Orgânica, Marcus Tullius Scotti, Ph.D em Química Orgânica e Damião Pergentino de Sousa, Ph.D em Ciências. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca, professor Damião Pergentino de Sousa, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Rayanne Hellen do Nascimento Silva**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Derivados sintéticos do ácido 4-clorocinâmico e atividade antimicrobiana". 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 **Rayanne Hellen do Nascimento Silva** 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, Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguieira, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguieira (Secretária) *Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguieira*

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

Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti (Examinador) *Marcus Tullius Scotti*

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

Rayanne Hellen do Nascimento Silva (Discente) *Rayanne Hellen do Nascimento Silva*



Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, pois sei que tudo é obra dele. Todas as vitórias em minha vida são por Ele e para Ele. E a minha mãe que me apoiou desde o início, enquanto eu ainda sonhava ela já acreditava nesta realização, toda luta e glória dedico a Deus e a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por sempre me dar força para prosseguir em busca dos meus sonhos, que nunca me deixa nem pensar em desistir. É ele que me faz forte quando estou fraquejando, ele que me sustenta e me guia, se hoje estou realizando mais um sonho é porque já estava tudo nos planos dEle. Agradeço a Deus pelo seu grandioso amor.

Agradeço a minha mãe por todo apoio, por sempre me incentivar, ser meu porto seguro, por ter mais fé em mim do que eu, por todo colo a cada momento difícil que eu passava, por enxugar minhas lágrimas, por chorar e sorrir comigo. Enfim, sou eternamente grata por tudo que ela já fez, e ainda faz por mim. Aos meus irmãos, Leonardo e Rayssa, e aos meus cinco sobrinhos por todo apoio e amor, tento ser melhor a cada dia por cada um deles.

Agradeço ao meu namorado Tiburtino Neto, por sempre está comigo, por me apoiar em tudo que faço, pela paciência de sempre, por ter o dom de me acalmar nos momentos difíceis, por me fazer tão feliz e por todo amor. Gratidão a Deus por ter ele em minha vida e por fazer parte da dele, principalmente nesse momento de luta para nós dois, vamos vencer juntos se Deus quiser.

Agradeço a minha sogra Nelizete Pires por todo apoio e torcida, por ser uma pessoa maravilhosa comigo, grata a Deus por ter sua amizade.

A todos meus familiares, principalmente minhas tias e tios, por toda torcida para que eu chegasse até aqui. Em especial meus padrinhos, Tia Mônica e Tio Carlos, que cuidam de mim como uma filha. Tia Luiza, Tia Cé e Tia Jô por todo apoio e amor. Tia Vera pelas aulas de química e matemática quando eu ainda nem sonhava em fazer graduação em Farmácia, ela como a boa química que é já estava a me preparar para o futuro. Aos meus primos e primas que estão sempre comigo, seja nos momentos felizes ou tristes, amo cada um deles.

As minhas amigas irmãs da graduação que estarão sempre no meu coração por toda minha vida, Ana Júlia e Bárbara Cavalcanti. Aos da graduação Talita Gomes, Ricardo Aurélio, Emmanuel Melquiades, e vários outros sinto muita saudade de todos, são presentes de Deus em minha vida. Como também a todos os professores que me ensinaram e ajudaram ao decorrer da minha vida acadêmica, sendo eles: Bagnólia, Adalberto, Vianney, Damião, etc.

Agradeço ao meu orientador Professor Damião Pergentino por ter me dado à oportunidade de fazer Iniciação científica em seu laboratório, aceitou me orientar no TCC e hoje estamos finalizando o mestrado, sou grata por todos os ensinamentos e incentivo na pesquisa.

No meu caminho Deus sempre me envia anjos para me ajudar a ultrapassar os obstáculos, e hoje eu agradeço aos meus anjos: Carolina Manguiera, Professor Azamor Cirne, Prof. Dr. Damião Pergentino, Edmilson, Tiburtino Neto, entre outros.

A todos os amigos do Laboratório de Química Farmacêutica: Marianna, Flávio, Lázaro, Ricardo, Anne, Carol, Mayara, Ana Júlia, Alana, Susianne, Anna, Alex, Carlos e Joice obrigada por toda contribuição, apoio, torcida e amizade.

As minhas companheiras de mestrado, Alana e Ana Júliaa, que lutaram junto comigo, todas em busca de um só objetivo, uma ajudando a outra, que bom ter elas para dividir as lágrimas e os sorrisos de 2017 e 2018, amo as duas.

As minhas amigas de longa data Marielle, Ana Karen, Mayara, e a todos os amigos do meu terceirão, que até hoje mantém contato e fazem parte de minha vida. As minhas amigas e irmãs em cristo Jacqueline, Mercia, Gerlane e Wanessa Gois.

E por fim, mas não menos importante agradeço aqueles que já partiram em especial meu pai, Vovô Luiz, Vovó Luiza, Tia Leonice e Vovó Edite, eles estão sempre comigo, em meu coração.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro e por me proporcionar a realização de um grande sonho através do seu investimento.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com meu mestrado e para realização desse grande sonho, muito obrigada. Sou muito grata por tudo.

RESUMO

SILVA, Rayanne Hellen do Nascimento. **Derivados sintéticos do ácido 4-clorocinâmico e atividade antimicrobiana.** 155p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – 2018.

Atualmente a resistência microbiana dos fungos e bactérias é considerada um grande problema de saúde pública. O termo candidíase é utilizado para infecções oportunistas superficiais ou sistêmicas causadas por diferentes espécies do gênero *Candida*. Indivíduos com HIV, doenças crônicas como câncer, diabetes e transplantados, por serem pacientes imunocomprometidos, como também idosos e recém-nascidos são os grupos com maior predisposição a estas infecções. Algumas das espécies deste gênero apresentaram resistência a uma ampla quantidade de fármacos antifúngicos, aumentando a gravidade destas infecções e a complexidade do seu tratamento. Os ésteres derivados do ácido cinâmico possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas, dentre elas, a atividade antimicrobiana. É relatado que ésteres cinâmicos clorados são potencialmente bioativos frente a microrganismos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi preparar uma coleção de ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico estruturalmente relacionados, avaliar a atividade antimicrobiana dos mesmos e estabelecer uma relação entre a estrutura e atividade biológica destes compostos. Para a preparação dos ésteres foram utilizadas as reações de esterificação de Fischer, esterificação utilizando haletos de alquila e arila, reação de Mitsunobu e reação de Steglich. Na caracterização dos produtos utilizaram-se métodos espectroscópicos de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , incluindo a espectrometria de massas de alta resolução para os ésteres inéditos. Todos os ésteres foram submetidos a testes antimicrobianos frente cepas das espécies *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, realizados pelo método de microdiluição em caldo, tendo como controle antimicrobiano o cloranfenicol e a nistatina. Obteve-se doze ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico, com rendimentos que variaram de 26,3% - 97,6%, sendo três inéditos. Um éster apresentou atividade antibacteriana na maior concentração testada, no entanto, na atividade antifúngica todos os compostos foram bioativos. Na atividade antifúngica os ésteres que se destacaram RH-06 e RH-11 apresentaram CIM 0,13 e 0,024 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente. Estes resultados mostram que os substituintes de cadeias alquílicas curtas, com presença de heteroátomo como o oxigênio ou com subestrutura terpênica do tipo perílca apresentam melhor perfil antifúngico.

Palavras-chaves: ésteres clorados, derivados cinâmicos, antimicrobianos.

ABSTRACT

SILVA, Rayanne Hellen do Nascimento. Synthetic derivatives of 4-chlorocinnamic acid and antimicrobial activity. 155p. Dissertation (Graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive) – Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2018.

Currently the microbial resistance of fungi and bacteria is considered a major public health problem. The term candidiasis is used for superficial or systemic opportunistic infections caused by different species of the genus *Candida*. Individuals with HIV, chronic diseases such as cancer, diabetes and transplanted patients, because they are immunocompromised patients, as well as the elderly and newborns are the groups with the greatest predisposition to these infections. Some of the species of this genus have shown resistance to a wide range of antifungal drugs, increasing the severity of these infections and the complexity of their treatment. Esters derived from cinnamic acid have a broad spectrum of pharmacological activities, including antimicrobial activity. It is reported that chlorinated cinnamic esters are potentially bioactive against microorganisms. Thus, the objective of this work was to prepare a collection of structurally related 4-chlorocinnamic acid esters, to evaluate the antimicrobial activity of the same, and to establish a relationship between the structure and biological activity of these compounds. For ester preparation, Fischer esterification reactions, esterification using alkyl and aryl halides, Mitsunobu reaction and Steglich reaction were used. Spectroscopic infrared (IR) and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance methods, including high resolution mass spectrometry for the unpublished ester, were used in the characterization of the products. All the esters were submitted to antimicrobial tests against strains of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, using the microdilution method in broth, having as antimicrobial control chloramphenicol and nystatin. There were obtained twelve esters derived from 4-chlorocinnamic acid, whose yields ranged from 26.3% - 97.6%, three of which were unpublished. An ester presented antibacterial activity in the highest concentration tested, however, in the antifungal activity all the compounds were bioactive. In the antifungal activity esters that stood out RH-06 and RH-11 presented MIC 0.13 and 0.024 $\mu\text{mol/mL}$, respectively. These results show that the substituents of short alkyl chains, with presence of heteroatom like oxygen or with terpenic substructure of the perilic type, present better antifungal profile.

Keywords: chlorinated esters, cinnamic derivatives, antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de drogas comercializadas que possuem função éster.....	38
Figura 2. Mecanismo da reação de Esterificação de Fischer.....	41
Figura 3. Mecanismo da reação de esterificação utilizando haleto de alquila.....	42
Figura 4. Mecanismo da reação da Esterificação de Mitsunobu.....	44
Figura 5. Mecanismo da esterificação da Reação de Steglich.....	46
Figura 6. Ácido <i>p</i> -clorocinâmico (Ácido 4-clorocinâmico).....	49
Figura 7. Reagentes utilizados para preparação dos derivados do ácido 4-clorocinâmico.....	83
Figura 8: Ésteres alquílicos derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 –RH- 08, RH-11 e RH-12) obtidos no presente trabalho.....	84
Figura 9: Ésteres arílicos derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-09 e RH-10) obtidos no presente trabalho.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das reações de esterificação e propriedades físico-químicas dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico.....	54
Tabela 2: Assinalamento do infravermelho dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 – RH-12).....	56
Tabela 3. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 – RH-03).....	59
Tabela 4. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-04 – RH-06).....	60
Tabela 5. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-07 – RH-09).....	61
Tabela 6. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-10 – RH-12).....	62
Tabela 7. Assinalamentos de RMN de ^{13}C dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 – RH-12).....	63
Tabela 8. Resultados da Avaliação da Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) de doze substâncias sobre leveduras do gênero <i>Candida</i> – Técnica da Microdiluição.....	71
Tabela 9: Valores de CFM ($\mu\text{mol/mL}$) e relação CFM/CIM para cada um dos compostos.....	75
Tabela 10: Resultados da Avaliação da Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) de doze substâncias sobre bactérias – Técnica da Microdiluição.....	77

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Métodos utilizados na síntese de ésteres.....	37
Esquema 2: Reações de esterificação. (I) Esterificação de Fischer, (II) substituição nucleofílica S_N2 com haletos, (III) reação de Mitsunobu, (IV) reação de Steglich.....	39
Esquema 3. Planejamento de estudo.....	48
Esquema 4. Esquema geral da esterificação de Fischer utilizando como material de partida o ácido 4-clorocinâmico e álcoois alifáticos.....	50
Esquema 5. Esquema geral da esterificação utilizando o ácido 4-clorocinâmico e haletos de alquílico ou arílico com acetona sob refluxo.....	51
Esquema 6. Esquema da esterificação através do método de Mitsunobu utilizando como material de partida o ácido 4-clorocinâmico.....	52
Esquema 7. Esquema da esterificação de Steglich utilizando como material de partida o ácido 4-clorocinâmico.....	53
Esquema 8. Esquema geral dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico.....	57

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de metila (RH-01).....	93
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de metila (RH-01), (CDCl_3 , 200 MHz).....	94
Espectro 3. Expansão Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de metila (RH-01), (CDCl_3 , 50 MHz).....	94
Espectro 4. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de etila (RH-02).....	95
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de metila (RH-02), (CDCl_3 , 400 MHz).....	96
Espectro 6. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de metila (RH-02), (CDCl_3 , 400 MHz).....	96
Espectro 7. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de etila (RH-02), (CDCl_3 , 400 MHz).....	97
Espectro 8. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de etila (RH-02), (CDCl_3 , 400 MHz).....	97
Espectro 9. Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de etila (RH-02), (CDCl_3 , 100 MHz).....	98
Espectro 10. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de etila (RH-02), (CDCl_3 , 100 MHz).....	98
Espectro 11. Espectro de infravermelho (KBr cm^{-1}) de 4-clorocinamato de propila (RH-03).....	99
Espectro 12. Espectro de Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de propila (RH-03) (CDCl_3 , 200 MHz).....	100
Espectro 13. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de propila (RH-03) (CDCl_3 , 200 MHz).....	100
Espectro 14. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-cloro-cinamato de propila (RH-03) (CDCl_3 , 200 MHz).....	101
Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de propila (RH-03), (CDCl_3 , 50 MHz).....	101
Espectro 16. Espectro Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de propila (RH-03), (CDCl_3 , 50 MHz).....	102

Espectro 17. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de isopropila (RH-04).....	103
Espectro 18. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de isopropila (RH-04) (CDCl_3 , 200 MHz).....	103
Espectro 19. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de isopropila (RH-04) (CDCl_3 , 200 MHz).....	104
Espectro 20. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-cloro-cinamato de isopropila (RH-04), (CDCl_3 , 50 MHz).....	104
Espectro 21. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de isopropila (RH-04), (CDCl_3 , 50 MHz).....	105
Espectro 22. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de butila (RH-05).....	106
Espectro 23. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de butila (RH-05) (CDCl_3 , 200 MHz).....	106
Espectro 24. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de butila (RH-05) (CDCl_3 , 200 MHz).....	107
Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de butila (RH-05), (CDCl_3 , 50 MHz).....	107
Espectro 26. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de metoxietila (RH-06).....	108
Espectro 27. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de metoxietila (RH-06) (CDCl_3 , 400 MHz).....	109
Espectro 28. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de metoxietila (RH-06) (CDCl_3 , 400 MHz).....	109
Espectro 29. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de metoxietila (RH-06), (CDCl_3 , 100 MHz).....	110
Espectro 30. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de metoxietila (RH-06), (CDCl_3 , 100 MHz).....	110
Espectro 31. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de 4-clorocinamato de metoxietila (RH-06).....	111
Espectro 32. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de pentila (RH-07).....	113
Espectro 33. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de pentila (RH-07) (CDCl_3 , 400 MHz).....	113

Espectro 34. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de pentila (RH-07) (CDCl_3 , 400 MHz).....	114
Espectro 35. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de pentila (RH-07), (CDCl_3 , 100 MHz).....	114
Espectro 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de pentila (RH-07), (CDCl_3 , 100 MHz).	115
Espectro 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de pentila (RH-07), (CDCl_3 , 100 MHz).	115
Espectro 38. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 4-clorocinamato de decila (RH08).....	116
Espectro 39. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de decila (RH-08) (CDCl_3 , 400 MHz).....	117
Espectro 40. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de decila (RH-08) (CDCl_3 , 400 MHz).....	117
Espectro 41. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de decila (RH-08), (CDCl_3 , 100 MHz).....	118
Espectro 42. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-cloro-cinamato de decila (RH-08), (CDCl_3 , 100 MHz).....	118
Espectro 43. Espectro Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 4-clorocinamato de 4'-cloro- benzila (RH-09)	119
Espectro 44. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09) (CDCl_3 , 500 MHz).....	120
Espectro 45. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 4-clorobenzila (RH-09), (CDCl_3 , 125 MHz).	120
Espectro 46. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09), (CDCl_3 , 125 MHz)	121
Espectro 47. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09).....	121
Espectro 48. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila (RH-10).....	122
Espectro 49. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila (RH-10) (CDCl_3 , 500 MHz).....	123

Espectro 50. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila (RH-10), (CDCl_3 , 125 MHz).....	123
Espectro 51. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila (RH-10), (CDCl_3 , 125 MHz).	124
Espectro 52. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 4-clorocinamato de perila (RH-11).....	126
Espectro 53. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de perila (RH-11) (CDCl_3 , 400 MHz).....	126
Espectro 54. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de perila (RH-11) (CDCl_3 , 400 MHz).....	127
Espectro 55. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de perila (RH-11), (CDCl_3 , 100 MHz).....	127
Espectro 56. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de perila (RH-11), (CDCl_3 , 100 MHz).....	128
Espectro 57. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de 4-clorocinamato de perila (RH-11).....	128
Espectro 58. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 4-clorocinamato de dodecila (RH-12).....	131
Espectro 59. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de dodecila (RH-12) (CDCl_3 , 400 MHz).	131
Espectro 60. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de dodecila (RH-12) (CDCl_3 , 400 MHz).....	132
Espectro 61. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de dodecila (RH-12), (CDCl_3 , 100 MHz).	132
Espectro 62. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de dodecila (RH-12), (CDCl_3 , 100 MHz).	133

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt: acetato de etila

APT: *Attached Proton Test*

CC: Cromatografia em coluna

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CIM: Concentração inibitória mínima

Cl: cloro

DCC: dicitcloexilcarbodiimida

DCU: dicitcloexiluréia

DEAD: Azodicarboxilato de diisopropila

Et₃N: trietilamina

FDA: Food And Drug Administration

H₂SO₄: ácido sulfúrico

Hx: hexano

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

Me: Metila

MHz: Megahertz

mL: mililitro

K₂CO₃: carbonato de potássio

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

Na₂SO₄: sulfato de sódio

OMe: Metoxila

P.F.: Ponto de fusão

PKa: log da constante ácida

ppm: Partes por milhão

QSAR: Relação quantitativa estrutura-atividade

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

sp: subníveis de energia eletrônica s e p

THF: tetrahidrofurano

TPP: Trifenilfosfina

UV: Ultravioleta

µg: Micrograma

µmol: Micromol

δ: Deslocamento químico em ppm

s: Singleto

sl: Singleto largo

d: Dubleto

dd: Duplo dubleto

t: Tripleto

q: Quarteto

quint: Quinteto

sex: Sexteto

sept: Septeto

m: Multiplete

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ESQUEMAS	XII
LISTA DE ESPECTROS	XIII
1. INTRODUÇÃO	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. Considerações gerais sobre bactérias patogênicas	23
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.1.2. Tratamento de infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> e resistência aos antibióticos disponíveis.....	25
2.2. Considerações gerais sobre fungos patogênicos	26
2.2.1. O gênero <i>Candida</i>	27
2.1.2. Infecções fúngicas causadas por <i>Candida</i> spp.	29
2.1.3.Tratamento de infecções por <i>Candida</i> spp. e resistência aos antifúngicos disponíveis.....	31
2.2. Considerações gerais sobre os compostos cinâmicos.....	33
2.2.1. Ácido cinâmico	33
2.2.2. Derivados cinâmicos relacionados a atividade antimicrobiana.....	34
2.2.3. Cinamatos clorados com atividade antimicrobiana.....	35
2.3. Química dos ésteres	35
2.3.1. Mecanismos de esterificações	39
3. OBJETIVOS:	47
3.1. Geral.....	47
3.2. Específicos	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Planejamento do estudo realizado	48
4.2. Etapa Química	49
4.2.1. Obtenção e preparação dos ésteres	49
4.3. Análise espectroscópica dos ésteres derivados do ácido 4-cloro-cinâmico	55
4.3.1. Interpretação dos espectros de infravermelho dos compostos RH-01 a RH-12	55
4.3.2. Interpretação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos RH-01 a RH-12	56
4.4. Atividade antimicrobiana dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico	64
4.4.1. Relação estrutura-atividade dos ésteres derivados do ácido 4-cloro-cinâmico no estudo antifúngico	64

4.4.2. Relação estrutura-atividade dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico no estudo antibacteriano.....	76
5. CONCLUSÃO	81
6. PERSPECTIVAS	81
7. PARTE EXPERIMENTAL.....	83
7.1. Preparação, purificação e caracterização estrutural de uma coleção de 12 ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico	83
7.2. Métodos Cromatográfico	85
7.3. Ponto de Fusão.....	85
7.4. Métodos Espectroscópicos	85
7.4.1 Infravermelho	85
7.4.2. Ressonância Magnética Nuclear	86
7.4.3. Espectrometria de Massas de Alta Resolução	86
7.5. Testes de avaliação da atividade antimicrobiana.....	87
7.5.1. Ensaio antifúngico	87
7.5.2. Ensaio antibacteriano	90
8. PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO 4-CLOROCINÂMICO	92
8.1. Preparação da primeira coleção de ésteres - (RH-01- RH-06).....	92
8.1.1. Dados espectroscópicos dos ésteres RH-01 - RH-06.....	93
8.2. Preparação dos ésteres RH-07 – RH-10	111
8.2.1. Dados espectroscópicos dos ésteres RH-07- RH-10.....	112
8.3. Preparação do éster 4-clorocinamato de perila (RH-11).....	124
8.3.1 Dados espectroscópicos do éster (RH-11).....	125
8.4. Preparação do éster 4-clorocinamato de dodecila (RH-12).....	129
8.4.1 Dados espectroscópicos do éster (RH-12).....	130
9. REFERÊNCIAS	134

1. INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas causadas por microrganismos como bactérias e fungos são ainda um grande problema de saúde global proeminente, em especial nos países em desenvolvimento de baixa renda (BYGBJERG, 2012; COKER et al., 2011). As bactérias atualmente estão se tornando altamente resistentes aos fármacos tradicionais criando assim um problema crescente na área médica. De fato, é conhecido que infecções causadas por diversos tipos de bactérias resistentes são mais difíceis de tratar aumentando a morbidade e a mortalidade, causando elevados custos nos cuidados a saúde (NAKAJIMA et al. 2003). Enquanto as infecções fúngicas têm aumentado de forma significativa, no tocante a incidência e mortalidade, ou seja, essas patogenias estão se tornando mais graves, o que torna alguns tipos de fungos como importantes agentes infecciosos principalmente em pacientes imunocomprometidos (DE ALMEIDA et al., 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2016).

Entre as infecções fúngicas mais comuns está a candidíase tendo como agente etiológico mais freqüente a *C. albicans*. Porém, outras espécies do gênero *Candida* também podem estar inseridas na etiologia dessa doença, sendo estas: *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. Tropicalis* (YANG, 2003). Geralmente, as manifestações clínicas das infecções fúngicas que tem como agente etiológico alguma espécie do gênero *Candida*, ocorrem desde infecções localizadas nas mucosas até a disseminação, que pode envolver múltiplos órgãos (SILVA, 2010).

A maior parte dos fármacos utilizados no tratamento de infecções fúngicas é obtida através de síntese orgânica. Os antissépticos como tintura de iodo, violeta genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas, antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina) foram, e vários destes ainda são, utilizados na terapia antifúngica. Além desses, outros medicamentos são utilizados no tratamento de infecções fúngicas como os derivados azólicos (cetoconazol, econozal, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol) que são os mais usados, e as alilaminas (naftina, terbinafina, hidroxipiridona, morfolina, compostos de selenium e anfotericina B lipossômica), e as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). O uso desses fármacos com frequência tornou o tratamento dessas

infecções mais complexo, isso se dar pelo fato de que alguns agentes etiológicos já adquiriram resistência frente ação de alguns desses antifúngicos (ARAÚJO et al, 2004; SENA et al., 2009; COLOMBO, 2013). Diante deste problema estão inseridos os produtos naturais e sintéticos que estão envolvidos diretamente com o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Os derivados fenilpropanóicos, em especial os derivados do ácido cinâmico, formam um grupo de substâncias com diferentes propriedades farmacológicas e biológicas. Alguns são encontrados na natureza em várias formas, tais como ácidos, ésteres e amidas. Muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de métodos de preparação destes compostos, devido à sua grande variedade de atividades biológicas (IOSET et al., 2000).

Em um estudo realizado por Nascimento (2017) no Laboratório de Química Farmacêutica foi observado que ésteres cinâmicos halogenados possuem propriedade antimicrobiana, como também na literatura é descrito que em alguns trabalhos ésteres cinâmico clorados apresentaram grande potencial bioativo frente a microrganismo, como por exemplo, algumas espécies de bactérias e espécies de fungos pertencentes ao gênero *Candida*.

Dessa forma, o presente trabalho teve como finalidade preparar uma coleção de doze ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico e avaliar seu potencial antimicrobiano frente a cepas dos microrganismos: *Candida albicans* ATCC 90028; *Candida glabrata* ATCC 90030; *Candida krusei* ATCC 34125, *Candida guilliermondii* 207, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *Pseudomonas aeruginosa* 102, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 e *Staphylococcus aureus* 47 e traçar uma relação estrutura-atividade dos compostos preparados, para obter um produto sintético com melhor perfil antimicrobiano.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações gerais sobre bactérias patogênicas

No corpo principalmente na pele existem bactérias residentes, que vivem como comensais e transitórias que, eventualmente, possuem a capacidade de colonizar a pele. Os organismos da microbiota normal contribuem para a resistência contra a colonização por bactérias patogênicas (*Staphylococcus* e *Streptococcus*), isso porque efetuam hidrólise de lipídeos e produzem ácidos graxos livres que são tóxicos para muitas bactérias. Estas sendo provenientes do ambiente apresentam patogenicidade, geralmente na presença de um distúrbio de integridade da pele (CASTRO; RAMOS-E-SILVA, 2009).

Em relação a estes microrganismos, o potencial infeccioso é relacionado com a patogenicidade e o grau de virulência que eles possuem, em especial, o potencial invasivo é determinado pela presença de um maquinário antifagocitários na superfície da bactéria, e da capacidade desta de produzir toxinas (PEREIRA et al., 2011).

As infecções bacterianas primárias da pele acometem cerca de 7% da população, mas sua ocorrência pode variar de acordo com diversos fatores. Geralmente essas infecções estão relacionadas com à etiopatogenia, sendo assim causadas preferencialmente por bactérias piogênicas dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (SAMPAIO; RIVITTI, 2007; PEREIRA, 2012).

Outras infecções que são bastante comuns e perigosas são as infecções hospitalares que contribui para o aumento de vários problemas relacionados a saúde, como aumento da morbidade, da letalidade, do tempo de internação, dos custos, além da ameaça constante da disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Entre os agentes etiológicos mais comuns por causarem este tipo de infecção estão as *Pseudomonas aeruginosa* sendo este um tipo de bacilo Gram negativo não fermentador, e está entre as bactérias multirresistentes (MEDEIROS; ROSENTHA, 2010; BORDIGNON; LIMA, 2017; GOMES et al., 2017)

2.1.1. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, observada em forma de cocos, considerada oportunista que causa várias doenças em humanos principalmente em épocas de vulnerabilidade, associadas a circunstâncias de desequilíbrio da microbiota no organismo, e assim comprometem o funcionamento do sistema imunológico. Sob essas condições ele é capaz de provocar infecções em praticamente todas as regiões anatômicas, como por exemplo: pele, mucosa e nas fossas nasais, sendo este um fator que reflete o grande número de genes de virulência que possibilitam o estabelecimento, a reprodução, a sobrevivência e a disseminação dessa espécie em diversos tipos de tecido. Este patógeno pode causar de infecções mais comuns que também são consideradas mais simples como: acnes, furúnculos e abscessos, a formas mais graves como: pneumonia, meningite, endocardite, septicemia, entre outros. (LINDSAY; HOLDEN, 2004; MASSEY, 2006; DAS et al., 2016)

Geralmente 25-30% da população saudável apresentam colonização ocasionalmente por *S. aureus*. A defesa mais notável contra os estafilococos é a fagocitose, atividade realizada pelos neutrófilos (MINELLI et al., 2003; VERONESI, 2005; RAZERA et al., 2009).

A capacidade desta espécie em infectar os seres humanos ocorre por meio de uma variedade de fatores de virulência. Fatores estes que consistem em um grupo de substâncias produzidas, secretadas e ou expostas na superfície da bactéria, onde cada uma tem sua determinada e específica função. A proteína estafilocócica A (SpA) e a proteína ligadas a fibronectina A e B (FnbpA e FnbpB), são do tipo adesinas e invasinas respectivamente, possuem capacidade de promover a entrada em vários tecidos. Já as nucleases são responsáveis por clivar moléculas de DNA por meio de reconhecimento de sequências de nucleotídeos específicos; proteína estafilocócica inibidora de complemento, que bloqueia todas as vias do sistema complemento. Enquanto que as enzimas coagulase, catalase, hialuronidase, fibrinolisinase, lipase, nuclease, penicilinase, asseguram o desenvolvimento e manutenção do microrganismo ao hospedeiro, promovendo também a invasão e destruição de outros tecidos (ROOIJAKKERS; VAN KESSEL; VAN STRIJP, 2005; DOS SANTOS et al, 2007; LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008; BLOM; HALLSTRÖM; RIESBECK, 2009; FOSTER, 2009; BERENDS et al.,

2010; THAMMAVONGSA; MISSIAKAS; SCHNEEWIND, 2013; POWERS; WARDENBURG, 2014; THAMMAVONGSA et al., 2015).

Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* em especial para as sistêmicas podem causar aos pacientes acometidos: aumento do tempo de permanência no hospital, choque séptico, infecções recorrentes e até mesmo a morte (CHANG et al., 2003; COSGROVE et al., 2003; LAM et al., 2012).

Os grupos de risco para infecções por *Staphylococcus aureus* são: recém nascidos, idosos, pacientes com HIV, diabéticos, fumantes, pacientes que fazem hemodiálise, indivíduos com disfunção de neutrófilos, pacientes com sobrecarga de ferro, como também pacientes que realizam tratamento frequentemente com vancomicina, nestes há o risco maior de infecção por *S. aureus* recidiva (TONG, 2015).

2.1.2. Tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* e resistência aos antibióticos disponíveis

O tratamento mais adequado para as infecções por *S. aureus* são os β -lactâmicos, onde estes atuam impedindo a formação da camada de peptidoglicano da parede celular e assim induz a morte do microrganismo, como ocorre com o tratamento com cefazolina ou uma penicilina antistafilocócica (nafcillina ou oxacilina). Porém, para as amostras resistentes a essa classe de antibióticos, como é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), a síntese da parede celular ocorre normalmente, visto que não responde a ação dos β -lactâmicos (GELATTI et al., 2009; LIU et al., 2011).

Nestes casos o medicamento geralmente utilizado para antibioticoterapia de pacientes suspeitos de ter infecções sistêmicas causadas por bactérias Gram-positivas como *S. aureus*, é a vancomicina, sendo este um antibiótico glicopéptidico que apresenta eficácia contra cepas resistentes a metilina como também as sensíveis a metilina, porém, este medicamento era utilizado como último recurso para tratar essas infecções caso fossem consideradas graves, visto que esse tratamento possui vários efeitos colaterais como nefro e ototoxicidade (HIRAMATSU et al., 2001; GARDETE; TOMASZ, 2014).

Estudos já mostram que cepas MRSA de infecções sistêmicas já adquiriram resistência a vancomicina, o que resulta em infecções recorrentes pelo tratamento

ser inadequado, podendo assim causar até a morte do paciente (CHANG et al., 2003; SHWEIZER et al., 2011; KIM et al., 2008; STRYJEWSKI, 2007).

Em geral o mecanismo bioquímico de ação da vancomicina fundamenta-se na alta afinidade deste antibiótico pelo resíduo D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala), um componente universal do Lipídio II, que é precursor da parede celular bacteriana. Enquanto que o mecanismo de resistência identificado na resistência a antibióticos baseada na transposição Tn 1546 mostrou que causa uma alteração deste resíduo de dipeptídeo de D-ala-D-ala em D -alanil- D- lactate (D-ala-D-lac), um dipéptido com afinidade substancialmente inferior para o antibiótico, o que resulta na baixa eficácia do medicamento e consequentemente a origem de cepas resistentes a esse medicamento (OKANO, ISLEY;BOGER, 2017).

2.2. Considerações gerais sobre fungos patogênicos

Os fungos são seres eucarióticos, filamentosos ou leveduriformes; Adaptam-se facilmente a condições diversas, estão presentes em diversos habitats dispersos no solo, plantas, água, ar, alimentos, animais e humanos (MARTINS et al., 2007). Em humanos, os fungos podem fazer parte da microbiota anfibiônica, transitóriamente, como também podem estar agindo como patógenos verdadeiros e oportunistas. Em sua maioria os agentes fúngicos é de origem ambiental, infectando os seres humanos e animais por inalação, ingestão ou inoculação direta.Com o aumento da incidência e prevalência nas últimas décadas, atualmente as infecções fúngicas são consideradas um problema de saúde pública (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009;POLO; GRAZZIOTIN, 2011; NAKAMURA; CADEIRA; AVILA, 2013; CAPOTE et al., 2016).

Nos ecossistemas são de grande importância por degradarem a matéria orgânica, atuando como organismos saprófitos, podem ainda viver em simbiose com outros seres vivos, como também há espécies que se nutrem a partir do parasitismo de humanos e animais, causando as infecções fúngicas também conhecidas por micoses (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009).

.As micoses superficiais são infecções que tem como característica ser localizada nas camadas superficiais da pele, sendo geralmente causadas por fungos dermatófitos e leveduriformes, como por exemplo, *Candida* spp. e *Malassezia* spp.

Geralmente estas doenças não são diagnosticadas adequadamente e a terapêutica é baseada apenas nas evidências clínicas (BRILHANTE et al., 2000; LACAZ et al., 2002; MORAIS; MARIA; MARIA, 2010).

O diagnóstico clínico adequado deve fundamentar-se na identificação dos fungos por meio do exame micológico direto, cultura em meios seletivos, microcultivo em lâminas ou metabólitos por testes químicos. Enquanto que a biologia molecular pela ampliação do DNA por reação da cadeia de polimerase (PCR) revela diagnósticos com mais precisão podendo assim identificar o verdadeiro agente etiológico causador da infecção (CAPOTE et al., 2016).

2.2.1. O gênero *Candida*

As espécies que compõem o gênero *Candida*, de acordo com a taxonomia, fazem parte do Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Filo *Ascomycetes*, Classe *Blastomycetes*, Ordem *Cryptococcales*, Família *Cryptococcaceae*, Gênero *Candida* (GIOLO E SVIDZINSKI, 2010; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

As espécies deste gênero são classificadas como fungos oportunistas e em sua maioria afetam pacientes submetidos a transplantes de órgãos ou transplante de medula óssea, com AIDS, em tratamento com medicamentos imunossupressores, pacientes em tratamento de câncer, aqueles que tenham sido submetidos a grandes cirurgias, idosos e recém-nascidos (WISPLINGHOFF et al., 2004). Ainda podem afetar pessoas que sofrem de estresse crônico, indivíduos com doenças metabólicas como diabetes, desnutridos, e aqueles que fazem tratamento com antibióticos de amplo espectro (RODEN et al., 2005). Estes microrganismos vivem em equilíbrio dinâmico (comensais) com o hospedeiro. No entanto, quando essa harmonia é rompida, podem causar patogenias que pode variar de uma manifestação inflamatória local até micoses sistêmicas, podendo assim causar até o óbito do indivíduo. Dessa forma, causando infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes, e infecções sistêmicas em imunodeprimidos (CROCCO et al., 2004; MOURA, 2005; OLIVEIRA, 2009; DONGARI-BAGTZOGLOU et al., 2009).

Este tipo de infecção é em geral causada por espécies como a *C. albicans* e a *C. glabrata*. Tendo como taxa de prevalência para a *C. albicans* aproximadamente

70% (KOLACZKOWSKI et al. 2010). Já infecções causadas por *Candida* (CNA) espécies não-*albicans*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondi* estão se tornando cada vez mais comuns (GALVAN; MARISCAL, 2006).

Em estudo realizado por Demito e colaboradores (2012) foi observado que em alguns casos, as infecções de espécies CNA são predominantes, esse estudo foi realizado no Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) no ano de 2010, com obtenção de 91 isolados e destes 41,8% pertenceram à espécie *C. albicans* (38 casos) e 58,2% a espécies de *C. não albicans*, sendo 23 de *C. tropicalis* (25,3%), 16 de *C. glabrata* (17,6%), 10 de *C. parapsilosis* (10,9%) e quatro de *C. krusei* (4,4%) (PFALLER; DIEKEMA 2007, KOTHAVADE et al. 2010). Em um segundo estudo de autoria de Lima e colaboradores (2017) realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (MS), no período de maio de 2011 a abril de 2012, em um total de 106 isolados de pacientes com candidúria, destes 42 (39,6%) eram de *C. albicans* e 64 (60,4%) eram de *Candida* não *albicans* (CNA), sendo 33 de *C. tropicalis*, 18 de *C. glabrata*, 5 de *C. krusei*, 4 de *C. parapsilosis*, 2 de *C. kefyr*, 1 de *C. lusitaniae* e 1 de *C. guilliermondii* foram identificados, assim mostrando que as espécies *C. não albicans* estão se tornando cada vez mais predominantes.

Os fatores de virulência dessas espécies são o que as tornam grandes agentes infecciosos, sendo estes fatores: produção de enzimas, sendo elas proteinase e fosfolipase, que atuam na invasão dos tecidos, causando uma disfunção ou até mesmo rompimento das membranas celulares, e um grau mais alto de adesão e colonização (MENEZES et al., 2006). Existem algumas espécies que ainda possuem outros fatores de virulência, como é o caso da *C. albicans* que além de produzir estas enzimas, ainda possuem: dimorfismo, adesinas, capacidade de crescer a 37° C e adaptar-se a variações de temperatura e pH, variações fenotípicas (*switching*), formação de biofilmes, moléculas com receptor homólogo à integrina CR3 humana, as quais favorecem a adesão às células epiteliais e capacidade de sobrevivência dentro dos fagócitos, entre outros. Mas para que o processo infeccioso ocorra é necessária uma relação multifatorial, que ocorre combinada pela interação entre os fatores de virulência do microrganismo como também os fatores predisponentes, associados ao hospedeiro (CANNON; CHAFFIN, 1999; PENHA

etal., 2000; MENEZES *et al.*, 2005; AVRELLA; GOULART, 2008; GOMPERTZ *et al.*, 2008; PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2009; BARBEDO; SGARBI, 2010; DE ROSSI *et al.*, 2011).

2.1.2. Infecções fúngicas causadas por *Candida* spp.

A infecção mais comum causada por *Candida* spp. é a candidíase, e esta pode ser aguda ou crônica, apresentar-se por lesões superficiais ou profundas, assintomática, oligossintomática ou com sintomas graves, nos casos de indivíduos imunossuprimidos (CHAVEZ *et al.*, 2003; PEMÁN *et al.*, 2011). É uma infecção que ocorre em geral de maneira endógena, isso porque se trata de espécies que vivem como comensais em algumas mucosas do organismo e ao encontrarem condições apropriadas (desequilíbrio da microbiota, defesas imunológicas debilitadas) estas multiplicam-se e assim invadem os tecidos causando as manifestações típicas. A candidíase varia de acordo com o estado do indivíduo, em pacientes saudáveis esta apresenta-se apenas como uma infecção de pele ou mucosas, já nos que se enquadram nos grupos de risco a doença frequentemente tem maior gravidade podendo evoluir para quadros sistêmicos e assim acometer diversos órgãos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Há três tipos de manifestações clínicas já conhecidas, sendo estas: mucocutânea, cutânea e sistêmica. A candidíase mucocutânea costuma acometer a cavidade oral e o canal vaginal, popularmente conhecida como “sapinho”, que é muito comum em humanos. Os fatores predisponentes para esta infecção são as alterações na microbiota anfiótica após administração de antibióticos de uso prolongado, pH baixo das secreções salivares, hipertrofia das papilas da língua, glossite crônica e o uso de próteses dentárias (MENEZES *et al.*, 2004; NETO *et al.*, 2005; GUSMÃO, 2007; KONEMAN, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

A candidíase cutânea geralmente se concentra mais nas áreas úmidas do corpo, sendo as mais acometidas: os espaços interdigitais, a região das mamas, axilas e virilhas, debaixo de unhas, ou no caso de erupções na pele causadas por fatores externos pode ocorrer manifestações de *Candida* cutânea (MENEZES *et al.*, 2004; KONEMAN, 2008).

Já a candidíase disseminada é rara, e ocorre principalmente em casos de pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplasias, doenças

imunossupressivas e em transplantados (GROSSI, 2009). Quando se trata da forma disseminada a infecção atinge diferentes órgãos e tecidos, como exemplo: pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, coração e olhos (ARAÚJO et al 2006; KONEMAN, 2008; KAUFFMAN et al., 2011). Quando o coração é acometido isso dá pelo fato que o paciente tem valvopatia e está fazendo uso de cateteres, causando assim episódios de septicemia (FARIDI et al., 2007). Porém, essas infecções são consideradas esporádicas e secundárias, e a disseminação da candidíase pode ocorrer a partir de locais da infecção nos tratos gastrointestinal, respiratório, valvas cardíacas e assim causar uma infecção de maior gravidade (LARBCHAROENSUB et al., 2010; ROILIDES, 2011).

Além desta infecção já citada também existe a candidúria e a candidemia, ambas são causadas por *Candida* spp. O termo candidúria, nem sempre envolve sinais e/ou sintomas de infecção urinária, se define como crescimento de *Candida* spp. na urina do indivíduo infectado, e esses microrganismos podem ser observados em culturas de urina coletadas seguindo técnicas apropriadas. É uma patogenia que acomete com frequência os pacientes expostos a fatores de risco, e cerca de 20% de pacientes hospitalizados podem apresentar candidúria ao decorrer de sua internação, em especial pacientes de unidade de terapia intensiva, como no estudo citado anteriormente (LIMA et al., 2017). Os maiores riscos nestes pacientes são: idade avançada, sexo feminino, antibioticoterapia de amplo espectro, o uso de corticosteróides e imunossupressores, presença de anormalidades do trato urinário, diabetes, uso de sonda vesical de demora, pós-operatório de cirurgias de grande porte e doenças malignas (COLOMBO et al., 2007).

Já a candidemia tem como definição a presença de *Candida* spp. na corrente sanguínea, é considerada a infecção fúngica mais comum em pacientes hospitalizados, sendo aproximadamente de 15 a 20% do total das infecções de sangue em hospitais nos países desenvolvidos, o que causa uma hospitalização prolongada para o paciente, aumento dos custos hospitalares como também aumento da taxa de mortalidade. Nas últimas décadas ocorreram alterações com relação às espécies causadoras desta infecção, com uma diminuição na frequência de *C. albicans* e aumento das espécies não-albicans, tais como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (VILLALOBOS et al, 2016). Como também da *C. guilliermondii* que está entre as espécies que ocasionalmente evoca infecções

invasivas em seres humanos, sendo este um patógeno emergente (SAVINI et al., 2011).

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

Inicialmente para se realizar o tratamento adequado de infecções fúngicas é necessário se pensar nos fatores predisponentes para que estes sejam removidos primeiramente se possível, e assim dar início ao tratamento (PANIZO et al., 2009). Há uma grande variedade de antifúngicos disponíveis no comércio, e estes estão sendo indicados para o tratamento de candidíase, porém, na literatura já se tem registros de que há ocorrência de cepas com sensibilidade diminuída e outras com resistência *in vivo* e *in vitro* a determinados medicamentos desta classe. A inclusão dos antifúngicos azólicos é considerada um grande avanço no tratamento dessas infecções fúngicas, mas sua ampla administração como profilaxia para indivíduos imunocomprometidos, no tratamento de fungos do gênero *Candida*, favoreceu a origem de cepas resistentes a essa classe de medicamentos em especial das espécies *C. não albicans*. Esta sensibilidade dos microrganismos varia em diferentes populações ou comunidades, o que se faz necessário a realização de estudo do agente etiológico causador da patologia antes de se iniciar o tratamento empírico, além disso, um antifungograma deve ser realizado em determinados indivíduos para assim se conhecer e monitorar a resistência a esses fármacos na população estudada (DALAZEN et al, 2011).

Em leveduras essa resistência é comum a qualquer outro microrganismo, sendo denominada como intrínseca, natural ou adquirida. A resistência intrínseca é o termo utilizado quando todos os membros da espécie são resistentes a certa substância ou classe de agentes antifúngicos antes da ocorrência de exposição ao fármaco, devido à expressão genética dessa condição. Já a resistência natural, é assim caracterizada quando algumas cepas de determinada espécie apresentam resistência. E a resistência secundária ou adquirida é desenvolvida em resposta à exposição prévia a uma droga (DALAZEN et al, 2011).

Os fármacos que habitualmente utilizados no tratamento de infecções fúngicas são eles: antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina), derivados azólicos (cetoconazol, econozal, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol), as alilaminas

(naftina, terbinafina, hidroxipiridona, morfolina, compostos de selenium e anfotericina B lipossômica), entre outros (SENA et al., 2009).

Alguns desses medicamentos já citados anteriormente possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se analisa seus efeitos colaterais como a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, um exemplo é a anfotericina B que é utilizada como a primeira opção de escolha para o tratamento da fungemia em pacientes críticos, especialmente quando se trata de candidemia, devido ao seu amplo espectro de ação, porém, seu uso deve ser cuidadosamente monitorado, isso porque este medicamento possui várias reações adversas, que são elas: náusea, vômitos, febre, hipertensão ou hipotensão, hipóxia e eventos mais graves como a lesão renal aguda, causando assim nefrotoxicidade frequentemente (SCHLOTTFELDT et al., 2015).

A terapia antimicótica teve um grande avanço com a descoberta dos azóis, pois estes possuem menor toxicidade comparados com a anfotericina B, ainda possuem baixo custo, apresentam largo espectro de atividade e alguns podem ser administrados por via oral, exercendo ação sistêmica (ANDRADE, 2006).

A resistência ocorre por meio de seleção natural. As infecções por *Candida* que tem maior predisposição as drogas já utilizada estão sendo substituídas por infecções causadas por cepas que já são resistentes. Uma das espécies mais susceptíveis aos antifúngicos é a *C. albicans*, já as *C. não albicans* são menos susceptíveis, em especial a *C. glabrata* e *C. krusei*, isso porque estas espécies já adquiriram resistência a alguns antifúngicos, porém, a *C. albicans* continua sendo a mais virulenta (CASTRO et al., 2006; GANDHI; PATEL, 2017).

Em estudo realizado no Hospital Universitário Regional de Maringá em 2010, por Demitto e colaboradores (2012), dentre os antifúngicos testados contra as cepas de *Candida* espécies: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, os derivados azólicos apresentaram menor susceptibilidade, principalmente o fluconazol, onde a maioria das espécies foram resistentes, especialmente a *C. glabrata* e a *C. krusei* que apresentaram baixa sensibilidade intrínseca a este medicamento. Segundo este estudo os antifúngicos que demonstraram maior eficácia foram a anfotericina B e a anidulafungina, o primeiro que é de uso restrito como já foi citado anteriormente e o segundo que é pertencente à classe das equinocandinas, uma classe de antifúngicos mais recente, que age atuando na

inibição da síntese da (1,3)- β -D-glucana, polissacarídeo presente em grande parte da estrutura da parede celular do fungo.

Esta classe é bastante empregada para tratamento de candidíase invasiva, e tem seu uso propagado, foi concedido o fato de muitas infecções estarem sendo causadas por espécies naturalmente com menor susceptibilidade a estes antifúngicos ou que já desenvolveram mecanismos de resistência a estes, como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* respectivamente. Já há relatos que isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. kefyr* desenvolveram mecanismos que levam a uma menor suscetibilidade às equinocandinas, o que demonstra que a resistência de *Candida* spp. à este grupo de antifúngicos está surgindo (ARENDRUP; PERLIN, 2014; MAUBON et al., 2014).

2.2. Considerações gerais sobre os compostos cinâmicos

2.2.1. Ácido cinâmico

A classe fenilpropanóide e os seus derivados podem ser encontrados em muitos óleos essenciais bioativos. Frequentemente se apresentam na forma oxidada, podem conter grupos hidroxílicos em sua cadeia alifática ou no anel aromático. Possuem uma variedade de atividades farmacológicas, e estas têm sido atribuídas aos derivados de ácidos fenilpropanóicos (DE SOUSA, 2012).

Dentro desta classe está inserido o ácido cinâmico também pode ser nomeado por 3-fenil-2-propenóico, é um grupo de ácidos carboxílicos aromáticos (C6-C3). Estes são formados na rota bioquímica que origina a lignina, o conteúdo polimérico que provê suporte mecânico para a parede celular da planta (XU et al., 2009). Estes ácidos estão presentes em todas as plantas verdes (LICHTENTHALER e SCHWEIGER, 1998), embora em pouca quantidade ligada covalentemente às paredes celulares (KROON E WILLIAMSON, 1999), como também podem estar presentes nos órgãos reprodutivos de plantas com flores (MARTIN-TANGUY et al., 1978).

O ácido cinâmico sendo este um ácido fenólico amplamente distribuído no reino vegetal. Apresenta uma ampla variedade de potenciais efeitos terapêuticos com atividade nos tratamentos de câncer, diabetes, doenças pulmonares e

cardiovasculares, bem como em doenças hepáticas, neurológicas, e efeitos fotoprotetores, e ainda atividades antimicrobianas e antiinflamatórias. O principal potencial farmacológico do ácido cinâmico está atribuído à sua capacidade de eliminar os radicais livres. Dessa forma, possuindo também atividade antioxidante (EL-SEEDI et al., 2017).

Confirmando as atividades já citadas acima, os análogos do ácido cinâmico principalmente aqueles com função éster, em especial o cinamato de metila, apresenta várias atividades farmacológicas, sendo elas: hipoglicemiante (SHARMA, 2011); inibidor da síntese de lipídeos, participa no tratamento das patologias de dislipidemias (CHEN et al., 2012); antioxidante; ação antimicrobiana frente a bactérias e fungos (PRAKASH et al., 2012)

2.2.2. Derivados cinâmicos relacionados a atividade antimicrobiana

Ésteres fenilpropânicos podem ser encontrados em algumas plantas como, por exemplo, *Alpinia malaccensis* var. *nobilis*, do óleo essencial extraído desta a substância mais abundante foi o (*E*)-metil cinamato com 88%. De acordo com a literatura dentre os ésteres cinâmicos, é conhecido que o cinamato de metila tem atividade antifúngica considerada ótima contra cepas aflatoxigênicas de *Aspergillus flavus* (LHP-10)(PRAKASH et al. 2012).

Já é relatado também que os ácidos cinâmicos agem inibindo o crescimento de fungos, por interagir com o benzoato de 4-hidroxilase, enzima que tem papel na desintoxicação aromática (KOROŠEC et al., 2014). No entanto, em pesquisa realizada por Bisogno e colaboradores (2007), foi observado que o ácido cinâmico apresentou atividade antifúngica com valores de CIM de 1,7 mM contra *Aspergillus terreus* e *Aspergillus flavus*, foi observado melhor atividade contra *Aspergillus niger* com um valor de CIM de 844 µM. Enquanto que contra *Candida albicans*, foi observado um valor de CIM de 405µM (SCHMIDT et al., 2010). Já em um segundo estudo, foi observado que uma coleção de dez ésteres análogos do ácido cinâmico apresentou atividade antifúngica potente contra *A. niger* e *C. albicans*, em especial, o cinamato de isobutila obteve valores de CIM de 12 e 14 µM, respectivamente (NARASIMHAN et al., 2004).

2.2.3. Cinamatos clorados com atividade antimicrobiana

O ácido cinâmico e seus derivados, sendo estes amidas ou ésteres já foram identificados anteriormente como potentes agentes antimicrobianos. Contendo uma vasta gama de estudos que relatam suas atividades antibacterianas, antifúngicas e antimicobacterianas (GUZMAN, 2014).

Para os derivados cinâmicos halogenados já foi relatado que estes compostos possuem melhores propriedades antimicrobianas, como é o caso do ácido 4-cloro-cinâmico, a presença de um átomo de cloro na posição *para* do anel lhe conferiu boa atividade bacteriana frente a cepas de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, comparado com outros grupos substituintes (TONARI; MITSUI. YONEMOTO, 2002).

Em estudo realizado por Nascimento (2017) foi notado que um éster cinâmico halogenado, com presença de um átomo de cloro também na posição *para* apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. Atividade esta que pode ser considerada de moderada a ótima, tendo CIM desse composto variando de 1024 a 124 µg/mL.

Outro estudo realizado por Araújo (2017) também foi notado que a presença de um átomo de cloro na posição *para* de um éster cinâmico confere a molécula melhor bioatividade, neste estudo o éster cinâmico clorado obteve CIM de 256 µg/mL frente a todas as cepas de *Candida* spp. testadas, permitindo assim dizer que este composto possui potente atividade antifúngica.

Foi observado em pesquisa de Lima e colaboradores (2017) que o éster 4-cloro cinamato de metila derivado do ácido 4-cloro-cinâmico possui potente atividade antifúngica apresentando CIM de 256 µg/mL para três cepas de *C. albicans*, dessa forma mostrando ser um interessante material de estudo para síntese de novos antifúngicos.

2.3. Química dos ésteres

Entre os produtos naturais, os ésteres estão entre os mais comuns. Estes compostos comumente estão relacionados ao odor agradável exalado por flores e frutos (Costa et al., 2004).

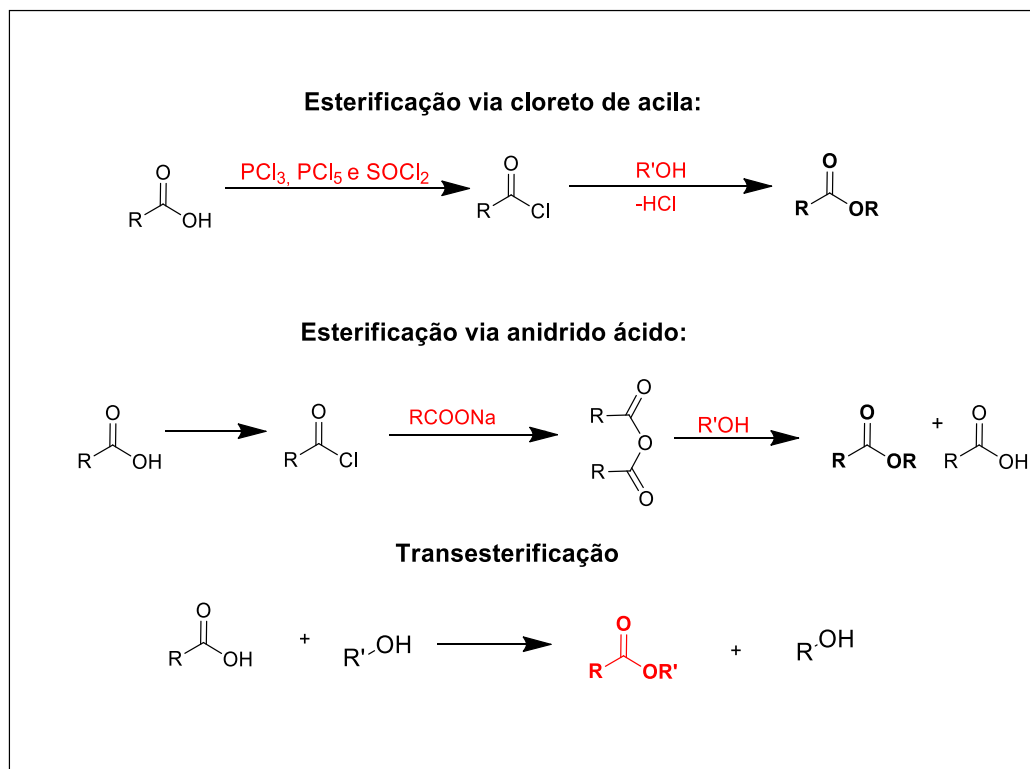
Os ésteres são derivados dos ácidos carboxílicos e podem ser preparados por meio da reação de álcoois com ácidos, cloretos de ácido ou anidridos na presença de catalisador. A reação entre ácidos com álcoois ocorre em equilíbrio. Se ocorrer no sentido direto conduz à formação de ésteres e no sentido inverso leva à hidrólise dos mesmos. Para deslocar a reação no sentido da formação do éster pode utilizar-se um excesso de um dos reagentes ou remover um dos produtos à medida que a reação decorre (CAVALCANTE et al., 2015)

A estrutura de cada éster possui um grupo acilato, assim, sua nomenclatura compreende dois nomes que refletem sua origem, e, de acordo com a IUPAC, primeiramente identifica o nome do radical ácido antes da carbonila, substituindo a terminação-ico por ato, em seguida, acrescenta o radical álcool que está ligado ao oxigênio com terminação-a (FRAVE; POWELL, 2013).

A reatividade dos compostos varia, de acordo com o radical que possuem, sendo considerados ésteres ativados, os que contêm em seu radical o anel aromático, pois estes são mais susceptíveis a reagir com nucleófilos, além disso, em ésteres alquílicos existe maior facilidade de hidrólise (VALEUR; BRADLEY 2009).

Ainda são compostos de polaridade reduzida e com ponto de ebulição mais baixo do que os ácidos carboxílicos de peso molecular semelhante. Podem ser sintetizados através de reação entre um ânion carboxilato e um haleto de alquila ou ainda pela reação de esterificação de Fischer, à qual tem obtido maior destaque devido à viabilidade de aplicação industrial para síntese de flavorizantes (COSTA et al., 2004). Além disso, os ésteres são compostos conhecidos por apresentarem diversas atividades antimicrobianas, sendo uma delas a ação antifúngica (GERSHON et al., 1971; TEBBETS et al., 2012).

A obtenção dos ésteres ocorre através de reações de esterificação com ácido carboxílico, esterificação via cloreto de acila e anidrido de ácido. Como pode ser observada no **esquema 1** (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).



Fonte: Adaptado do SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 795, 797, 799.

Esquema 1: Métodos utilizados na síntese de ésteres.

Em relação a reação de esterificação via cloreto de acila, o éster é primeiramente preparado com utilização do ácido correspondente. Geralmente é utilizado o tricloreto de fósforo (PCl_3), pentacloreto de fósforo (PCl_5) ou até cloreto de tionila (SOCl_2). Neste processo não é necessário a presença de um catalisador e é necessário a adição de piridina ao meio reacional para reagir com o HCl que é liberado, evitando reações indesejadas (**esquema 1**). Os anidridos de ácidos carboxílicos também podem realizar reação com álcoois tendo como produto os ésteres. Estes anidridos são obtidos através da reação do cloreto de acila com o sal sódico do ácido, entre outras formas (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A transesterificação é o método utilizado para formação de biodiesel partindo de óleos vegetais ou gorduras animais (DIAS et al., 2013). Por ocorrer com elevada atividade reacional e baixo custo, o biodiesel é hoje produzido por catálise ácida, H_2SO_4 , ou catálise alcalina, NaOH (MA et al., 2016). O processo laboratorial ocorre a partir de ésteres de baixo ponto de ebulição com aquecimento e refluxo no meio reacional junto como álcool, na presença de um catalisador, assim causando a troca do grupo éster com elevado ponto de ebulição. A troca de éster ou transesterificação

ocorre sob condições semelhantes à esterificação de Fischer, só que de maneira inversa, e na presença de um grande excesso de álcool o ponto de equilíbrio é deslocado para formação de um novo éster (CHRISTIE, 1993).

Existem várias drogas que já são comercializadas que possuem a função éster em sua estrutura química, como por exemplo, a aspirina, clopidogrel e a cefalotina, as estruturas destes podem ser observadas na **figura 1**.

O ácido acetilsalicílico, mais conhecido como aspirina tem ação analgésica e também dependendo da dosagem pode atuar como antiagregante plaquetária. Esta segunda ação também serve para o clopidogrel que é um agente antiplaquetário oral da classe de tienopiridina, que inibe seletiva e irreversivelmente o receptor de ADP de plaquetas (MEHTA et al., 2001)

Como também a cefalotina que é antibiótico da classe das cefalosporinas possuindo mecanismo de ação análogo aos β -lactâmicos. Tendo atividade bactericida, e este medicamento atua através da inibição da síntese da parede celular bacteriana. É utilizada em infecções do trato respiratório, infecções da pele e tecidos moles, infecções do trato genitourinário, sepse, infecções gastrointestinais, meningite e infecções ósseas e articulares (TERRA; FULARNETO; FULARNETO-MAIA, 2017).

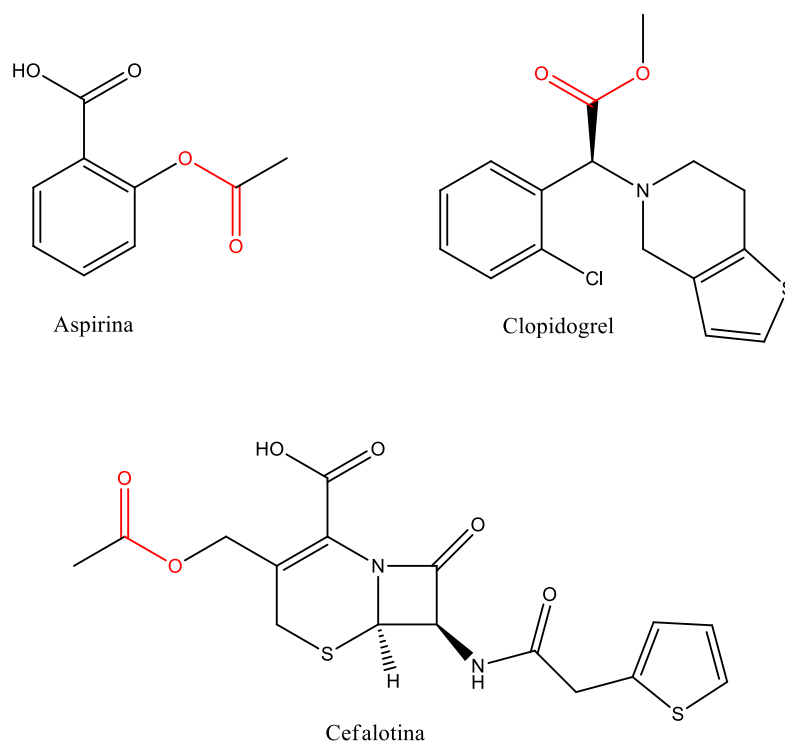
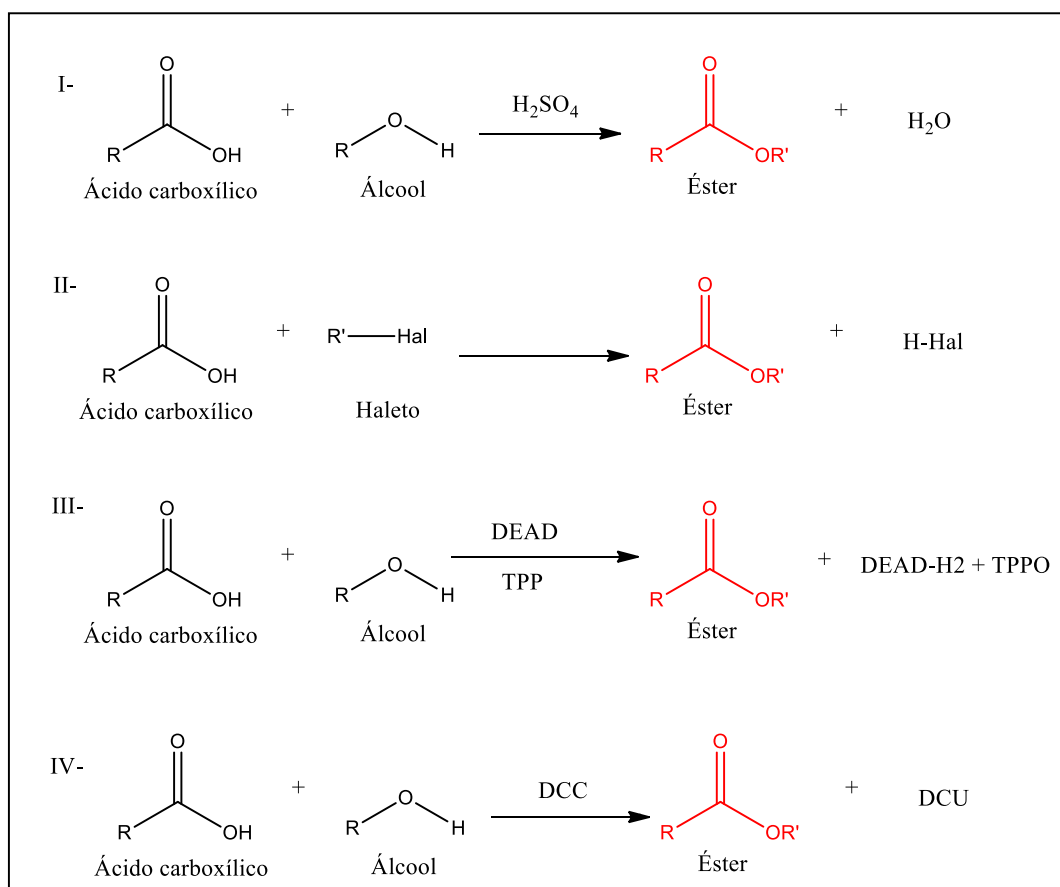


Figura 1: Exemplo de drogas comercializadas que possuem função éster.

2.3.1. Mecanismos de esterificações

Os ésteres foram preparados utilizando quatro diferentes metodologias sendo estas reações denominadas: a esterificação de Fischer, a substituição nucleofílica bimolecular com haletos alquílicos e arílicos, a reação de Mitsunobu e a reação Steglich, o esquema de cada uma delas é demonstrado no **esquema 2** abaixo.



Fonte: Elaborado pela autora.

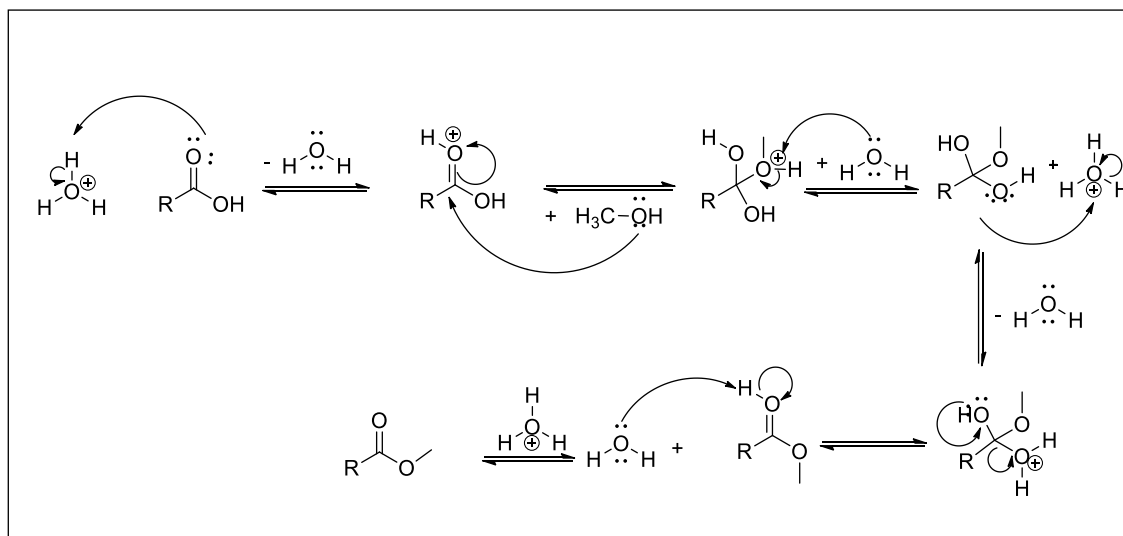
Esquema 2: Reações de esterificação. (I) Esterificação de Fischer, (II) substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$ com haletos, (III) reação de mitsunobu, (IV) Reação de Steglich.

Existem vários tipos de reações de esterificações, porém, a metodologia mais utilizada no meio industrial como também em laboratório é a Esterificação de Fischer **(I)**, provavelmente por ocorrer em um curto intervalo de tempo, e também seu baixo custo (LI; ELI; LI, 2008; OLIVEIRA et al., 2014). Em 1895, Fischer e Speier concluíram que era possível a obtenção de ésteres através do aquecimento de um

ácido carboxílico e um álcool na presença de catalisador ácido (OLIVEIRA et al., 2014).

A esterificação catalisada por ácido, também denominada esterificação de Fischer, ocorre a partir da utilização de um ácido carboxílico e um álcool em excesso. É uma reação reversível e ocorre lentamente, mas com o uso de um refluxo e a adição de um ácido forte, como catalisador, por exemplo, o ácido sulfúrico, consegue-se atingir o equilíbrio em poucas horas. Para obter-se um melhor rendimento com base no reagente limitante desloca-se o equilíbrio para a formação dos produtos, dessa forma se acrescenta o álcool em excesso, visto que se trata de uma reação reversível, no sentido direto conduz à formação de ésteres e no sentido inverso leva à hidrólise dos mesmos. O rendimento pode ainda ser maior se a água formada na reação for retirada (SOLOMONS; FRYHLE, 2012; CAVALCANTE et al., 2015).

O mecanismo de reação se inicia pelo ácido, este por ser um eletrófilo, o seu par de elétrons do oxigênio da carbonila será protonado pelo próton do catalisador, o que resulta no oxigênio com três ligações, ativando a carbonila, e tornando-o mais reativo em relação aos nucleófilos. Na sequência, o oxigênio da hidroxila do álcool ataca o carbono da carbonila do ácido protonado, o que origina um intermediário tetraédrico, e o par de elétrons da ligação *pi* se desloca para o oxigênio, para estabilizar o grupo hidroxila. No terceiro passo, o composto tem possibilidade de formar um grupo abandonador através do próton, assim não importa qual hidroxila será protonada, pois ambas são equivalentes (HERNÁNDEZ-MONTELONGO; GARCÍA-SANDOVAL; AGUILARGARNICA, 2015); por fim a reação resulta na saída de água, regeneração do próton do catalisador e formação do éster, ilustrado na **Figura 2**.



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

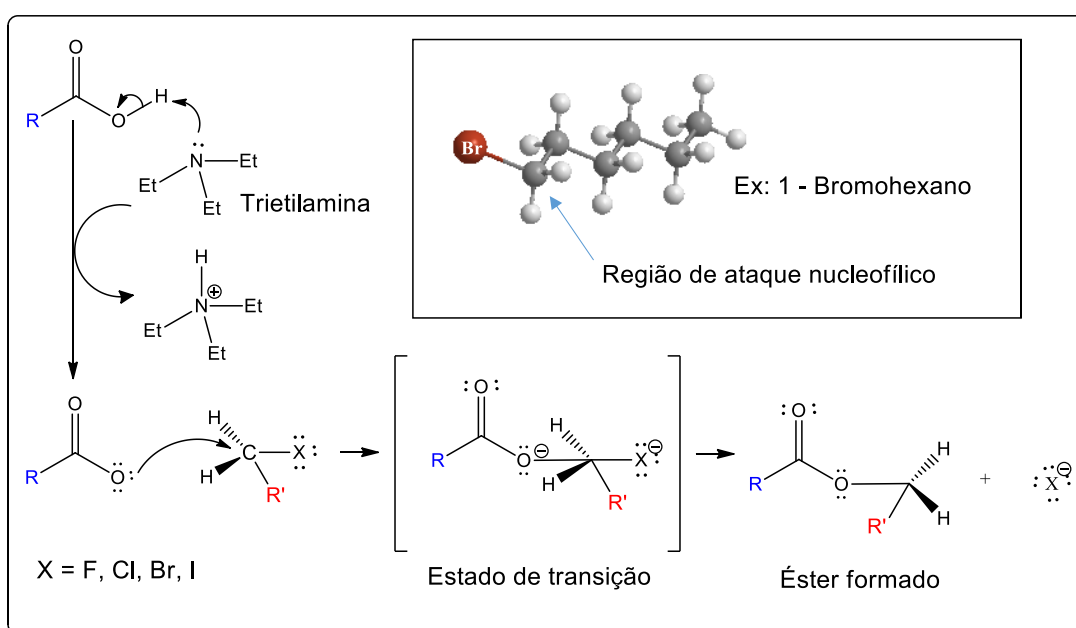
Figura 2: Mecanismo da reação de Esterificação de Fischer

As reações de substituição são processos orgânicos envolvendo um par de elétrons do doador, denominado então de nucleófilo, e um par de elétrons do receptor, o eletrófilo, que implica em transferência de elétrons (ROSSI; PIERINI; PEÑÉÑORY, 2003). Esse tipo de reação ocorre em organismos vivos em determinados processos bioquímicos como, por exemplo, na etapa de alquilação de uma cadeia de DNA no desenvolvimento do câncer (SORRELL, 2006; MCKEE; MCKEE, 2009; VOLLHARDT; SCHORE, 2010). As substituições nucleofílicas se dividem em dois tipos: mononuclear ou primeira ordem, que decorre em duas etapas através da formação de um carbocátion estável seguido do ataque pelo nucleófilo; bimolecular ou segunda ordem ocorre de maneira inversamente a da anterior, nesta a reação ocorre em uma única etapa, sem formação de carbocátion e o ataque do nucleófilo é posterior a saída do grupo abandonador.

A segunda reação de formação de éster utilizada neste projeto é a substituição nucleofílica S_N2 com haletos (II), reação que é bimolecular, que ocorreu nas reações do ácido 4-clorocinâmico juntamente com os haletos alquílicos e arílicos. A reação ocorre em uma única etapa com o ataque do par de elétrons do nucleófilo ao carbono na posição de 180° do eletrófilo, nessa reação ocorre gasto de energia por causar rompimento da primeira ligação, e essa energia é utilizada para formação da nova ligação (MCLENNAN, 1976), desencadeando assim uma mudança de configuração intermediária bipiramidal trigonal, para então saída do

grupo abandonador e formação da ligação como nucleófilo (MATSUBARA; ITO, 2016).

Essa metodologia é evidenciada na reação de esterificação com haletos usando como solvente a acetona ou carbonato de potássio, o mecanismo tem início com a desprotonação do ácido carboxílico, o que o torna mais reativo, e dessa forma favorece a substituição nucleofílica com o haleto e a formação do éster, é preferencial utilizar a acetona por esta ser um solvente aprótico. O mecanismo está elucidado na **Figura 3**.



Fonte: adaptado do MUSKAWAR et al., 2014 p. 218.

Figura 3: Mecanismo da reação de esterificação utilizando haleto de alquila.

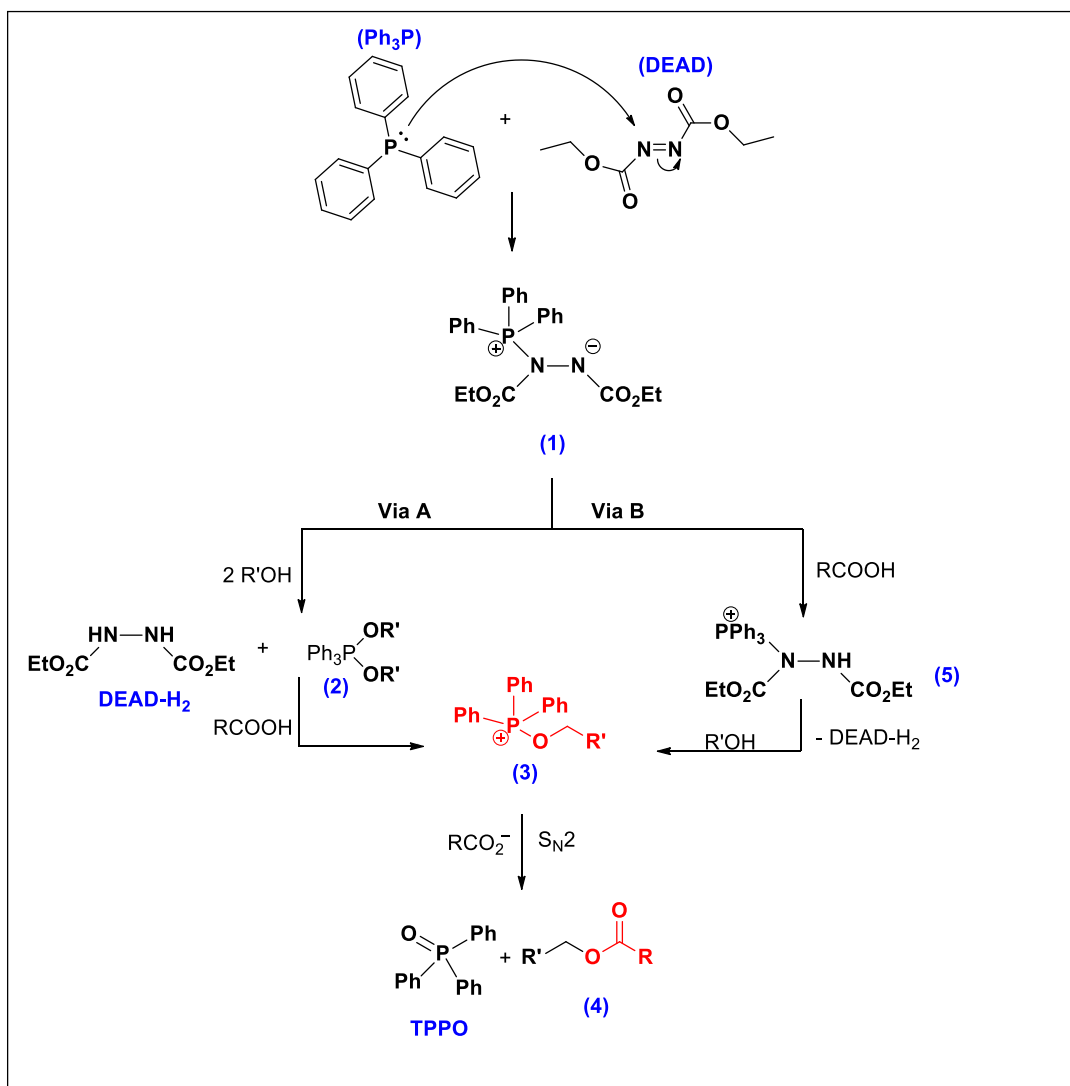
A terceira metodologia utilizada no presente trabalho foi a Reação de Mitsunobu (**III**), esta reação foi descrita pelo professor Oyo Mitsunobu pela primeira vez em 1967, a primeira reação relatada foi a do ácido n-valérico com fosfito de alilo dietilo e DEAD resultando assim no valerato de alilo e hidrazodicarboxilato de (dietil) fosforilo. Esta reação consiste no acoplamento retirando próton, é utilizado álcool e também um ácido na presença de agentes oxido-redutores, como por exemplo, o agente oxidante Azodicarboxilato de diisopropila (DEAD) e o agente redutor, a Trifenilfosfina (TPP). Este modelo de reação envolve inversão da configuração estereoquímica (BUT; TOY, 2007). Os produtos reacionais são o éster desejado, e

também há a formação de subprodutos como a hidrazina dietil azodicarboxilato e o óxido de trifenilfosfina, mostrados na **Figura 4**.

O mecanismo de reação tem início com o ataque nucleofílico da Trifenilfosfina ao DEAD, que resulta em um intermediário (1), a betaína. O intermediário (1) pode seguir por vias: na via A a betaína reagindo com duas moléculas de álcool, originando assim um derivado alcoxifosfônio (2) e o DEADH₂ (hidrazina dicarboxilato de dietila) (3). Já na via B o ácido carboxílico sofre desprotonação pelo intermediário gerando assim DEAD-H₂, 2 e 3. O Deslocamento nucleofílico de TPPO que ocorre de 2 para 3 finaliza a reação para formar o produto acoplado 4 que sofre inversão da estereoquímica em relação a inicial do álcool material de partida, **figura 4** (BUT; TOY, 2007; FLETCHER, 2012; CAMP, 2015; HANDIQUE, 2013).

A reação de Mitsunobu tem início com a adição nucleofílica de TPP a DEAD para formar a betaína Morrison-Brunn-Huisgen (1). Este intermediário reativo pode então reagir com duas moléculas do álcool para produzir eventualmente DEAD-H₂, espécies de alcoxifosfônio 2 e o carboxilato nucleófilo 3 (via a), ou pode desprotonar o ácido pronucleófilo para eventualmente se formar, novamente, DEAD-H₂, 2 e 3 (via b). A S_N2 de TPPO de 2 por 3 completa a reação para formar o produto acoplado 4 que inverte a estereoquímica em relação a inicial apresentada pelo álcool.

Esta reação ocorre com produção de um sal alcoxifosfônio que é dependente da estereoquímica do álcool em reação, se este não for estericamente impedido, o sal de alcoxifosfônio é favorecido, o que resulta em uma S_N2 de TPPO pelo carboxilato e a formação do éster com inversão de configuração, sendo este o produto desejado. Porém, se o grupo for estericamente impedido, ocorre a formação do éster com retenção da configuração (AHN; CORREIA; DESHONG, 2002).

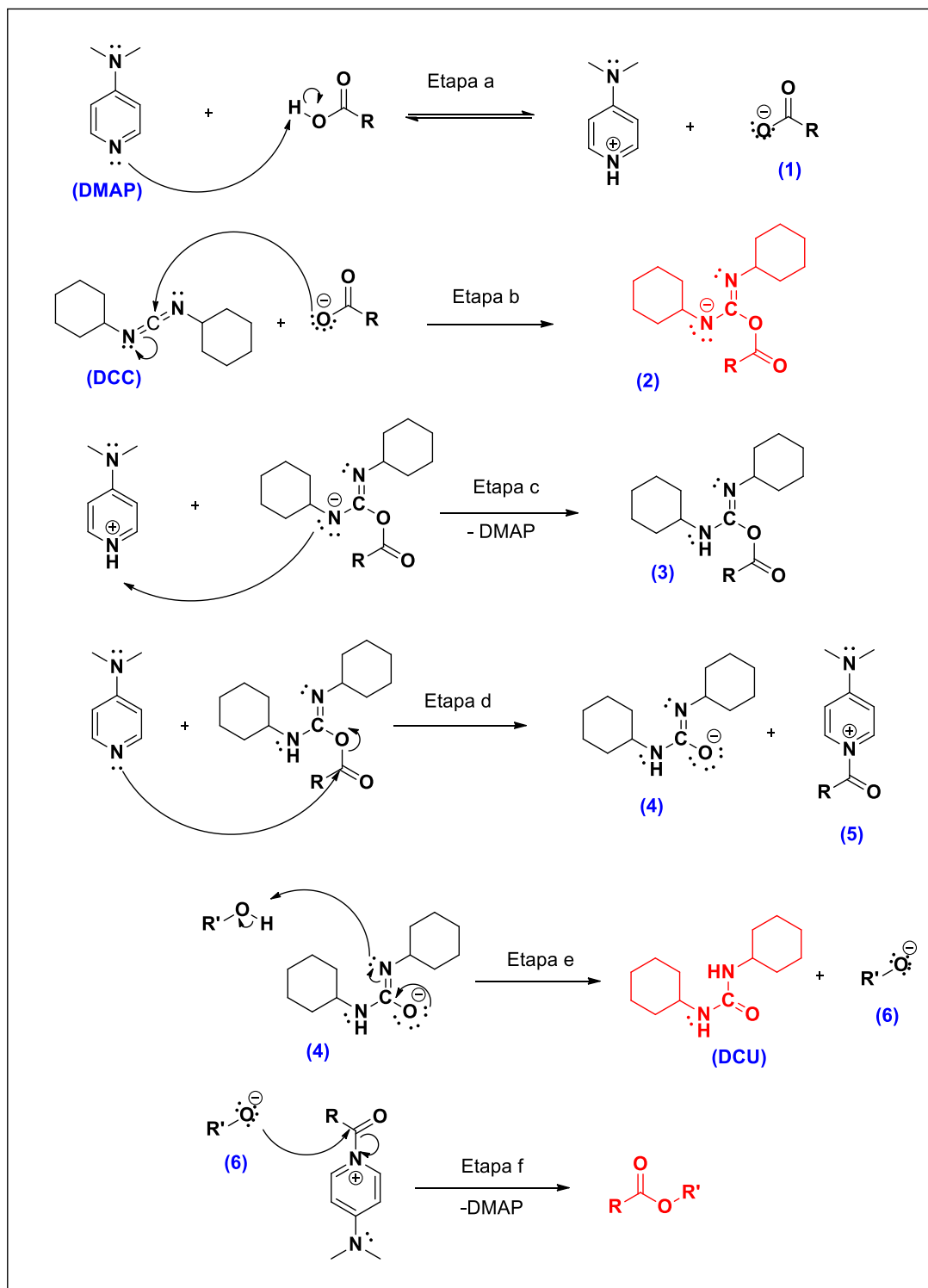


Fonte: Adaptado de BUT e TOY, 2007.

Figura 4: Mecanismo da reação da Esterificação de Mitsunobu.

Por fim, foi utilizada uma quarta metodologia a Reação de Steglich (IV), esta reação foi descrita pela primeira vez pelo Prof. Dr. Wolfgang Steglich. Este tipo de esterificação é realizada em condições brandas, em temperatura ambiente, através dessa reação podem ser obtidos ésteres que são inacessíveis através de outros métodos, como por exemplo, esterificação de Fischer e esterificação utilizando haleto alquílicos ou arílicos. A reação consiste em utilizar o DCC (diciclohexilcarbodiimida) como reagente de acoplamento, tornando o grupo hidroxila da função ácido carboxílico um grupo abandonador, favorecendo assim sua substituição posteriormente, e o DMAP age como catalisador. Inicialmente, na Etapa A ocorre desprotonação do ácido carboxílico por um dos nitrogênios do DMAP para

formação do carboxilato que posteriormente na Etapa B ataca o carbono eletrofílico do DCC que está com nitrogênio carregado positivamente dando origem ao composto o-acil-isouréia (2). Em sequência na Etapa C ocorre uma nova protonação deste intermediário. O DMAP na Etapa D vai agir tanto como catalisador como também para diminuir a reação paralela que é a formação do N-acil-isouréia como demonstrado na Etapa E que é formado a partir de um rearranjo do intermediário o-acil-isouréia, dessa forma o N-acil-isouréia é subproduto formado minoritariamente ao decorrer da reação, este não realiza reação com o álcool, ou seja, sua formação compromete o rendimento da reação. Como o DMAP diminui esta reação paralela, por converter o grupo o-acil-isouréia em grupo abandonador formando a nova Espécie acilante, esta espécie que não é passível de rearranjo será posteriormente atacada pelo álcool, assim conduzindo ao produto molecular final. Na Etapa F o álcool atacará o carbono da carbonila ocorrendo posteriormente a perda de um próton e formação da ligação éster (ALMEIDA, 2014). O mecanismo de reação está exposto na **Figura 5** abaixo.



Fonte: Adaptado de STEGLICH, 1978; GILLES, 2015; ALMEIDA 2014.

Figura 5: Mecanismo da esterificação da Reação de Steglich.

3. OBJETIVOS:

3.1. Geral

Preparar uma coleção de ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico estruturalmente relacionados e avaliar a atividade antimicrobiana, estabelecendo uma relação estrutura-atividade dos compostos avaliados.

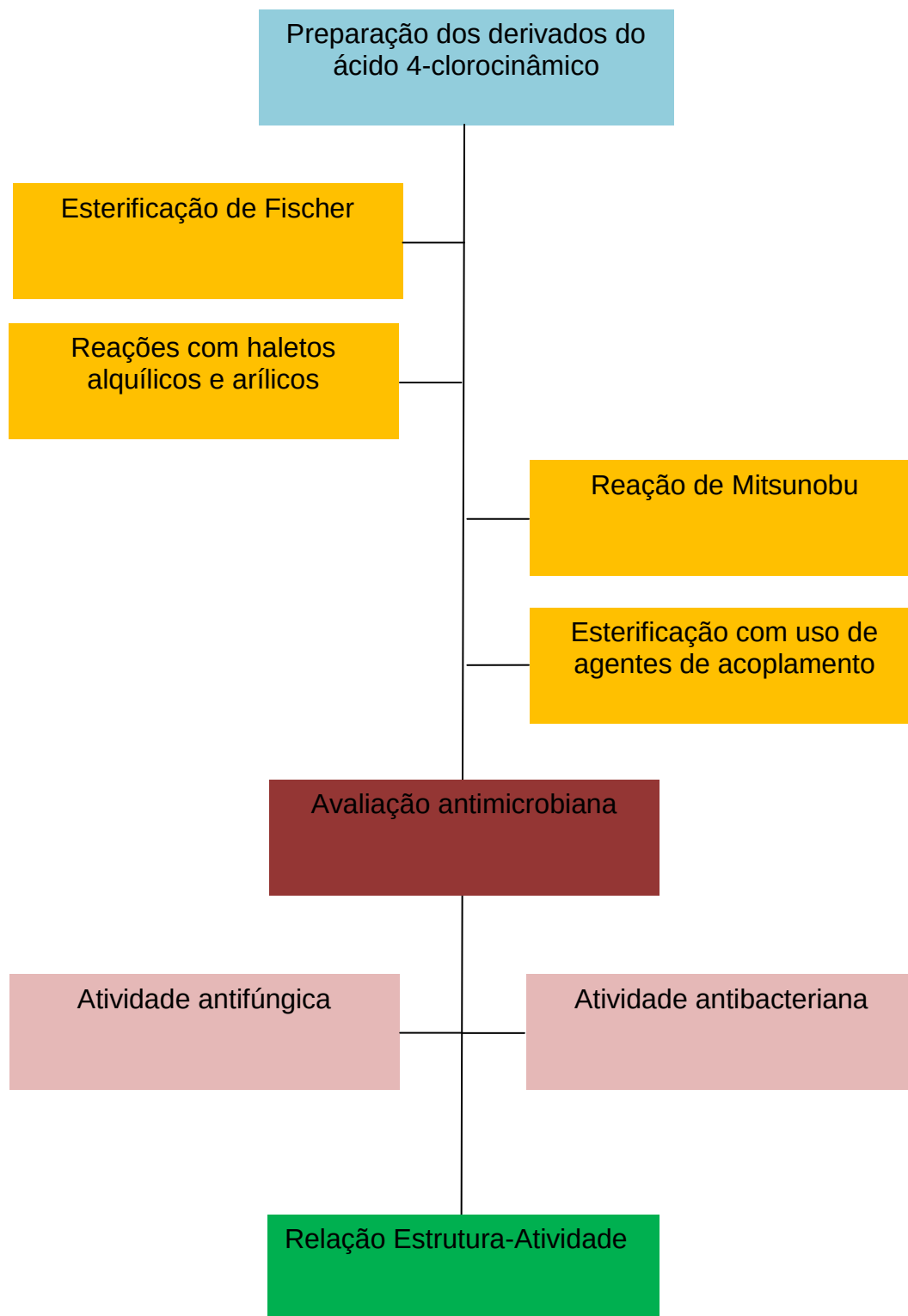
3.2. Específicos

- Preparar doze ésteres utilizando o ácido 4-clorocinâmico como material de partida;
- Avaliar a atividade antifúngica das substâncias obtidas frente cepas de *Candida* spp;
- Avaliar a atividade antibacteriana das substâncias obtidas frente cepas de bactérias;
- Traçar uma relação entre a estrutura e a atividade biológica, estabelecendo características químicas dos compostos obtidos para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos antimicrobianos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Planejamento do estudo realizado

As atividades realizadas no presente estudo foram apresentadas no **Esquema 3**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Esquema 3. Planejamento de estudo.

4.2. Etapa Química

4.2.1. Obtenção e preparação dos ésteres

O ácido 4-clorocinâmico (**Figura 6**) foi utilizado como material de partida para preparação de uma coleção de 12 ésteres, e posteriormente testar sua atividade antimicrobiana.

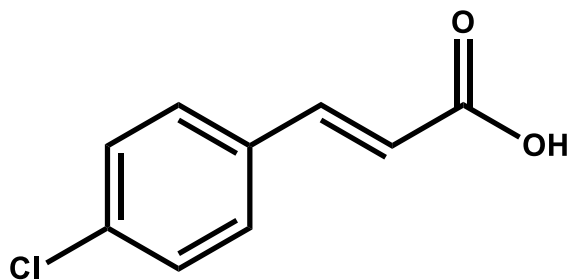
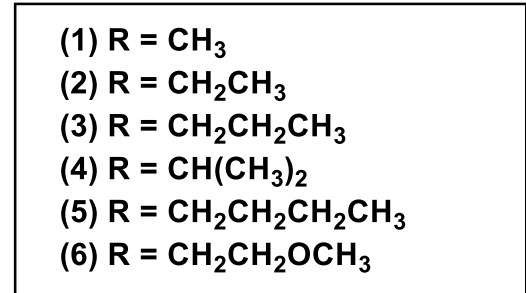


Figura 6: Ácido *p*-clorocinâmico (Ácido 4-clorocinâmico)

A obtenção dos ésteres ocorreu a partir de quatro diferentes tipos de reações: esterificação de Fischer, esterificação utilizando haletos de alquila e arila, reação de Mitsunobu e reação de Steglich. Destas a primeira reação utilizada foi a Esterificação de Fischer com a produção de seis compostos (**RH-01** a **RH-06**), os quais foram obtidos a partir da reação entre o ácido 4-cloro-cinâmico, com álcool em excesso, utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador sob refluxo, monitorando todo o procedimento reacional por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), de acordo com a metodologia de SANDERSON e colaboradores (2013). Os álcoois utilizados nas reações foram: metanol, etanol, *n*-propanol, álcool isopropílico, *n*-butanol e o 2-metoxietanol, como mostrado no **Esquema 4**. De acordo com a **Tabela 1**, as reações ocorreram entre 3-24 horas, e com rendimentos entre 36,0 - 97,6%, sendo o éster **RH-01** com maior rendimento.

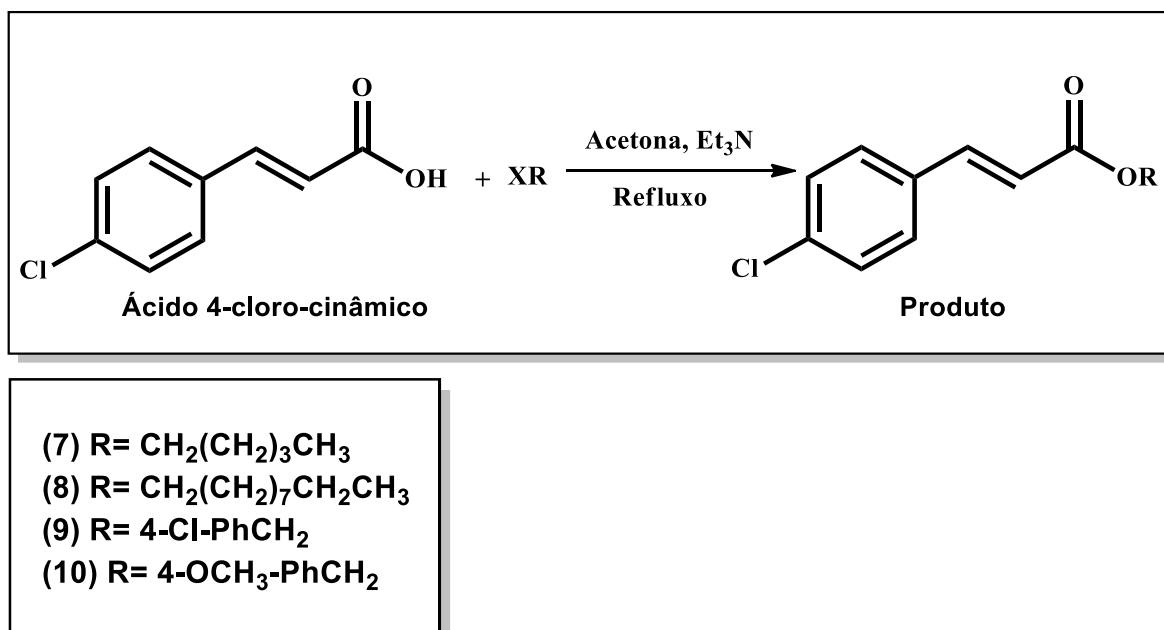


Esquema 4. Esquema geral da esterificação de Fischer utilizando como material de partida o ácido 4-clorocinâmico e álcoois alifáticos.

A esterificação de Fischer tem vantagens, tais como relativa facilidade de realização, baixo custo, o tempo de reação é curto, além disso, o álcool utilizado pode ser recuperado. Porém, esta reação geralmente só ocorre com facilidade ao se utilizar alcoóis de cadeia carbônica curta, e por ser uma reação reversível deve-se ter cautela para que o produto não seja degradado e retornar a formação do material de partida.

A segunda coleção de ésteres foi realizada através da reação utilizando haletos alquílicos e arílicos. E por esta reação foram obtidos os ésteres **RH-07**, **RH-08**, **RH-09** e **RH-10**, a preparação destes compostos utilizando o ácido 4-clorocinâmico, em acetona anidra na presença de trietilamina (Et_3N), haletos de alquila e arila como reagente, sob refluxo monitorado por CCDA, como descrito na metodologia de BOECK e colaboradores (2005). Os quatro haletos utilizados nas reações foram: 1-bromopentano, 1-bromo-decano, cloreto de 4-clorobenzila e cloreto de 4-metoxibenzila, como mostrado no **Esquema 5**. Nesta substituição nucleofílica ($\text{S}_{\text{N}}2$), a base, trietilamina, ioniza o ácido que fica com carga negativa e ataca o haleto em posição posterior em relação ao grupo abandonador.

Como apresentado na **Tabela 1**, as reações ocorreram durante 24-48 horas, com rendimentos entre 30,6 - 61,6%, sendo o éster **RH-09** com maior rendimento (61,6%) e o éster **RH-08** com menor rendimento (30,6%).



Fonte: Elaborado pela autora

Esquema 5. Esquema geral da esterificação utilizando o ácido 4-clorocinâmico e haletos de alquílico ou arílico com acetona sob refluxo.

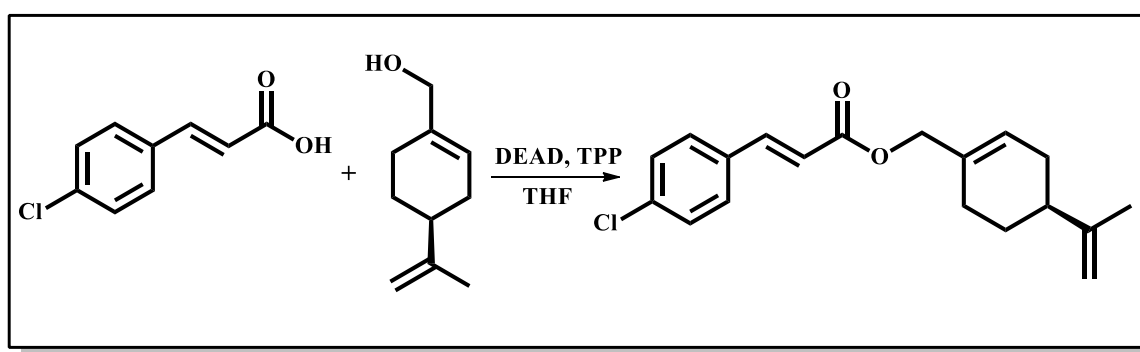
Foram preparados quatro ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico, onde dois são alifáticos e dois aromáticos, identificados por métodos espectroscópicos de Infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C . As reações ocorreram com relativa facilidade, porém, a purificação foi de difícil realização, visto que os RF's do haleto e dos

produtos são muito próximos. Sendo o éster **RH-09**, inédito na literatura, para este foi realizada a análise em espectroscopia de massas.

A reação utilizando haletos de alquila e arila é de fácil execução e forma os produtos com bons rendimentos. O longo tempo de reação é um aspecto desfavorável a sua utilização na síntese de ésteres.

Para a obtenção do **RH-11** foi realizada a reação de Mitsunobu em que o ácido 4-clorocinâmico e o álcool aromático foram dissolvidos com tetrahidrofurano (THF) a 0° C. Em seguida, trifenilfosfina (TPP) e o azodicarboxilato de diisopropila (DEAD) foram adicionados a temperatura ambiente, monitorados por CCDA, segundo a metodologia de HANDIQUE e colaboradores (2013). O álcool utilizado na reação foi o álcool perílico como apresentado no **Esquema 6**. Neste tipo de reação, ocorre o acoplamento do álcool com um ácido desidratante/pronucleófilo, por meio da utilização de uma combinação de um reagente de oxidação azo, o azodicarboxilato de dietila (DEAD), e de um agente redutor, como por exemplo, uma fosfina, geralmente a trifenilfosfina (TPP), usada em condições de reações suaves e neutras.

De acordo com a **Tabela 1**, a reação ocorreu em 72 horas, tendo-se obtido o rendimento de 30,7%.



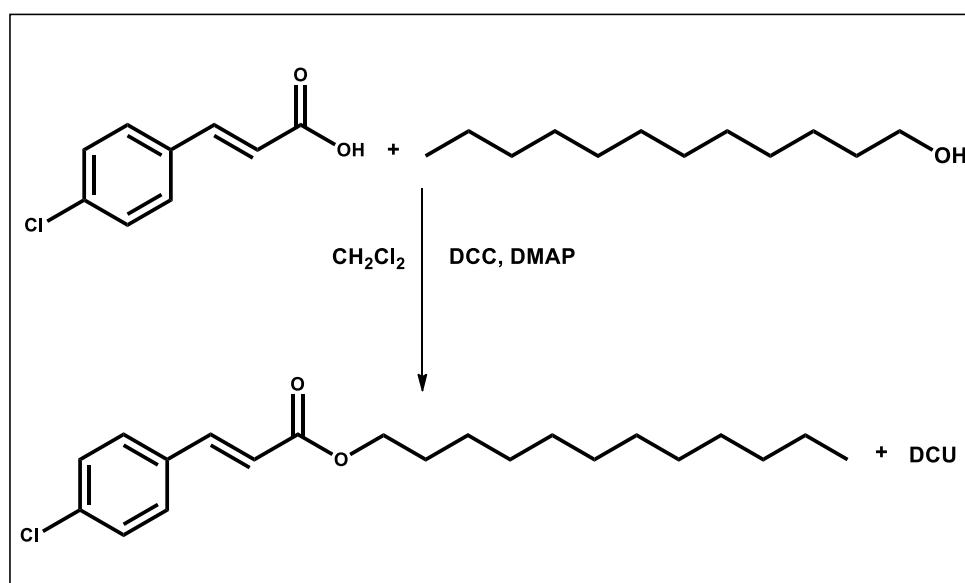
Fonte: Elaborada pela autora

Esquema 6. Esquema da esterificação através do método de Mitsunobu utilizando como material de partida o ácido 4-clorocinâmico

O éster cíclico obtido a partir do ácido 4-clorocinâmico **RH-11** foi identificado e caracterizado por métodos espectroscópicos de infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , e também espectroscopia de massas sendo este composto inédito na literatura.

A reação de Mitsunobu tem um custo mais elevado e o tempo de reação também é comum ser maior quando comparada com as duas reações anteriores. Porém, o produto puro tem relativa facilidade de ser isolado, e a maior vantagem desta reação é que se tem o éster desejado se utilizando alcoóis com estruturas químicas mais complexas, geralmente reações que não ocorrem por esterificação de Fischer.

Enquanto o éster **RH-12** foi preparado através da esterificação de Steglich, a partir do ácido 4-clorocinâmico e o álcool laurílico dissolvido em diclorometano (**Esquema 7**). Foi utilizado o DCC (diciclohexilcarbodiimida) como reagente de acoplamento, o que torna a hidroxila do ácido carboxílico um grupo abandonador favorecendo sua substituição posteriormente. O DMAP (4-(dimetilamino)-piridina) atua como catalisador, como citado por ALMEIDA (2014). Como apresentado na **Tabela 1**, a reação ocorreu em 72 horas, com rendimento de 26,3%.

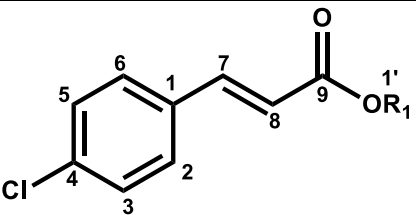


Fonte: Elaborado pela autora

Esquema 7. Esquema da esterificação de Steglich utilizando como material de partida o ácido 4-clorocinâmico.

Entre as quatro metodologias utilizadas, a esterificação de Steglich é a reação de maior complexidade, no tocante a sua execução, devido à formação do precipitado DCU, o que dificulta a purificação do produto, além de se utilizar reagentes de alto custo, e o tempo de reação ser elevado. A vantagem desta reação é ter a formação de ésteres com estrutura química mais complexa.

Tabela 1. Dados das reações de esterificação e propriedades físico-químicas dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico

								
Composto	R ₁	Formula molecular	Massa molar (g/mol)	P.F (°C) ^a	Tempo de reação (h)	Quantidade em massa (mg)	Sistema da coluna (Hex:AcOEt)	Rendimento (%)
RH-01	CH ₃ -	C ₁₀ H ₉ ClO ₂	196,63	71-73	I - 4	I - 105,7	-	97,6
RH-02	CH ₃ CH ₂ -	C ₁₁ H ₁₁ ClO ₂	210,66	-	I - 3	I - 102,7	-	89,0
RH-03	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	C ₁₂ H ₁₃ ClO ₂	224,68	34-36	I - 5	I - 109,0	-	88,5
RH-04	CH ₃ CH ₃ CH-	C ₁₂ H ₁₃ ClO ₂	224,68	41-44	I - 24	I - 112,4	-	91,2
RH-05	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂ -	C ₁₃ H ₁₅ ClO ₂	238,71	30-32	I - 4	I - 115,3	-	87,4
RH-06	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ -	C ₁₂ H ₁₃ ClO ₃	240,68	-	I - 24	I - 47,6	09:01	36,0
RH-07	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₂ -	C ₁₄ H ₁₇ ClO ₂	252,74	38-39	II - 48	II - 77,0	95:05	55,6
RH-08	CH ₃ (CH ₂) ₈ CH ₂ -	C ₁₉ H ₂₇ ClO ₂	322,87	-	II - 24	II - 54,2	95:05	30,6
RH-09	4-Cl-PhCH ₂ -	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ O ₂	307,17	131-133	II - 24	II - 103,5	09:01	61,5
RH-10	4-OCH ₃ -PhCH ₂ -	C ₁₇ H ₁₅ ClO ₃	302,75	80-82	II - 24	II - 65,1	09:01	39,3
RH-11	PHO-	C ₁₉ H ₂₁ ClO ₂	316,82	-	III - 72	III - 53,6	09:01	30,7
RH-12	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ -	C ₂₁ H ₃₁ ClO ₂	350,92	-	IV - 72	IV - 115,2	95:05	26,3

I – Reação de Esterificação de Fischer; II - Reação utilizando haleto de alquila; III – Reação de Mitsunobu; IV – Reação de Steglich.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3. Análise espectroscópica dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico

4.3.1. Interpretação dos espectros de infravermelho dos compostos RH-01 a RH-12

A análise dos espectros de infravermelho dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico foi realizada segundo os dados da literatura de Pavia e colaboradores (2010). Pode-se evidenciar a presença de grupos funcionais, que são importantes para identificação da molécula.

Analisando os espectros dos diferentes análogos, as estruturas moleculares dos compostos **RH-01** a **RH-12** apresentam a mesma subestrutura 4-clorocinâmico e bandas de absorção semelhantes como, acima de 3000 referentes ao estiramento de C-H sp^2 , juntamente com bandas de absorção de estiramento do anel C=C que ocorre aos pares nas regiões de 1600 e 1475 cm^{-1} , e sugerem a presença do anel aromático; bandas de estiramento C=O na faixa de 1750-1735 cm^{-1} características de carbonilas de ésteres, no entanto observamos a diminuição da frequência de absorção da carbonila devido à conjugação da dupla ligação da cadeia lateral α , β insaturado com o grupo carbonila, resultando um caráter de ligação simples para as ligações duplas; estiramento C-O atribuído à ligação C-O no éster aparecem com duas bandas na faixa de 1300 a 1000 cm^{-1} ; como também estiramento de C-Cl na faixa de 1010-1000 (**Tabela 2**).

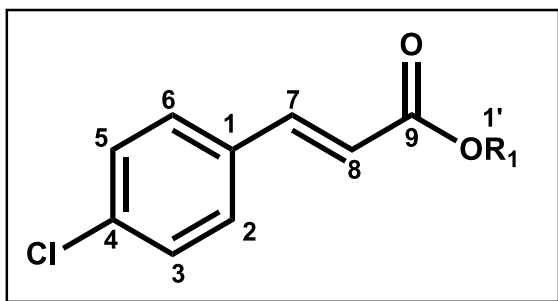
Pode-se observar que os análogos alquílicos apresentam bandas de estiramento C-H de alcano (sp^3) por volta de 3000 cm^{-1} , grupo metilenos com absorção de deformação angular em 1465 cm^{-1} e grupos metila em 1375 cm^{-1} . Enquanto nos derivados arílicos, observou-se uma banda forte de vibração de dobramento para posição *para*, na região entre 800-850 cm^{-1} , com uma absorção característica para seu substituinte na posição *para*.

Tabela 2: Assinalamento do infravermelho dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 – RH-12)

Compostos	ν (C-H _{sp2})	ν (C-H _{sp3})	ν (C=O)	ν (C=C)	ν (C-O)	ν (C-Cl)
RH-01	3035	2949	1705	1631 1431	1273 1166	1004
RH-02	3066	2981	1710	1639 1448	1311 1172	1037
RH-03	3035	2956	1705	1635 1409	1317 1087	1004
RH-04	3049	2980	1710	1639 1462	1309 1109	1008
RH-05	3034	2960	1712	1637 1473	1313 1172	1010
RH-06	3068	2927	1714	1639 1452	1313 1170	1039
RH-07	3035	2958	1703	1635 1492	1311 1172	1083
RH-08	3066	2926	1710	1637 1465	1311 1168	1012
RH-09	3057	2949	1701	1653 1450	1273 1188	1010
RH-10	3035	2960	1712	1610 1442	1261 1159	1014
RH-11	3070	2926	1712	1637 1406	1273 1166	1012
RH-12	3068	2926	1714	1639 1465	1271 1168	1012

Fonte: Elaborado pela autora

4.3.2. Interpretação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos RH-01 a RH-12



- (1) $R = CH_3$
- (2) $R = CH_2CH_3$
- (3) $R = CH_2CH_2CH_3$
- (4) $R = CH(CH_3)_2$
- (5) $R = CH_2CH_2CH_2CH_3$
- (6) $R = CH_2CH_2OCH_3$
- (7) $R = CH_2(CH_2)_3CH_3$
- (8) $R = CH_2(CH_2)_7CH_2CH_3$
- (9) $R = 4\text{-Cl-PhCH}_2$
- (10) $R = 4\text{-OCH}_3\text{-PhCH}_2$
- (11) $R = PhO$
- (12) $R = CH_3CH_2(CH_2)_8CH_2CH_3$

Fonte: Elaborado pela autora.

Esquema 8. Esquema geral dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos provenientes do ácido 4-clorocinâmico, podem ser observados 6 (seis) hidrogênios em comum (**H2**, **H3**, **H5**, **H6**, **H7** e **H8**), onde 4 (quatro) são do anel aromático e 2 (dois) da cadeia lateral ligada na posição 1 (um) do anel aromático; há também 9 (nove) carbonos em comum (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6**, **C7**, **C8**, **C=O**), sendo 6 (seis) do anel aromático e 3 (três) da cadeia lateral com a presença da carbonila do éster, o que confirma que as estruturas dos ésteres preparados são derivados do ácido 4-clorocinâmico.

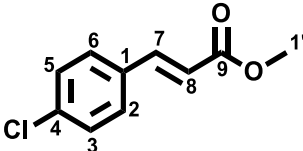
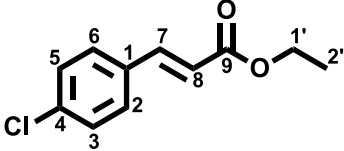
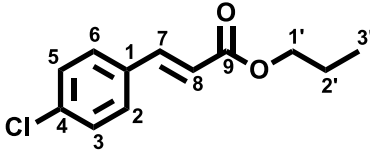
Os dados espectrais de hidrogênio obtidos ($CDCl_3$, 400 MHz, ppm) com maior deslocamento é referente ao éster **RH-06**, foi observado que para hidrogênios olefínicos que são apresentados como dois dubletos em δ 7,67 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H) e 6,47 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), conferido aos hidrogênios **H7** e **H8**, respectivamente, em ambos a constante de acoplamento é igual ($J = 16,0$ Hz) confirmando assim a configuração *trans* da molécula; já para os hidrogênios aromáticos foram observados dois dubletos cada um referente a dois hidrogênios 7,46 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H); 7,36 (d, $J = 9,7$ Hz, 2H), pertencentes aos hidrogênios **H2**, **H6**, **H3** e **H5**, respectivamente, como a constante de acoplamento que confirmam suas posições no anel aromático. Todos os valores da coleção de doze ésteres preparados estão nas **Tabelas 3, 4, 5 e 6** abaixo.

Na **Tabela 7**, estão apresentados os dados de RMN ^{13}C , estes deslocamentos confirmam a estrutura química dos ésteres desejados. Os dados de

RMN¹³C em (CDCl₃, 400MHz, ppm), assinalou-se os deslocamentos 166,8, característico de **C=O** de éster, sinal em 143,8 referente ao **C7** que é desblindado por estar em sistema alfa-beta-insaturado na posição β, 136,3 referente ao **C4**, 133,0 atribuído ao carbono **C1**, dois picos na região de 129,4 e 129,3 onde cada pico corresponde a dois carbonos **C2**, e **C6** para o maior, **C3** e **C5** para o de menor valor. Um pico em 118,5 referente ao **C8**, pico este que comprova blindagem por estar localizado na posição α do sistema alfa-beta-insaturado, região que é mais protegida neste sistema estando assim em campo alto.

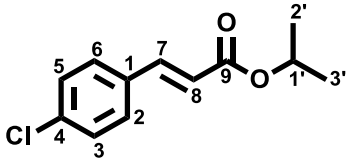
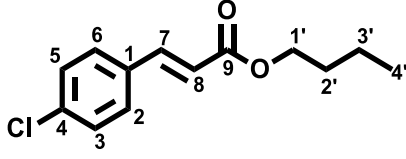
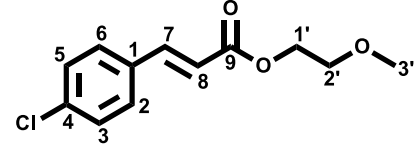
Além dos sinais já elucidados, também estão expostos posteriormente os deslocamentos químicos dos carbonos das cadeias laterais saturadas e aromáticas, confirmando a estrutura de cada composto. A atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios assim como também aos carbonos foi realizada por comparação com dados publicados na literatura para compostos idênticos ou análogos dos aqui apresentados.

Tabela 3. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 – RH-03).

Posição			
	(RH-01) δH	(RH-02) δH	(RH-03) δH
1	-	-	-
2	7,43 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,43 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)	7,44 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)
3	7,33 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)	7,33 (<i>d</i> , $J = 8,6$ Hz, 1H)
4	-	-	-
5	7,33 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)	7,33 (<i>d</i> , $J = 8,6$ Hz, 1H)
6	7,43 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,43 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)	7,44 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)
7	7,61 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	7,61 (<i>d</i> , $J = 15,7$ Hz, 1H,	7,61 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)
8	6,38 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	6,39 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	6,40 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)
C=O	-	-	-
1'	3,79 (<i>s</i> , 3H)	4,25 (<i>q</i> , $J = 7,1$ Hz, 2H)	4,15 (<i>t</i> , $J = 6,7$ Hz, 2H)
2'	-	1,32 (<i>t</i> , $J = 6,9$ Hz, 3H)	1,71 (<i>m</i> , 2H)
3'	-	-	0,97 (<i>t</i> , $J = 7,3$ Hz, 3H)

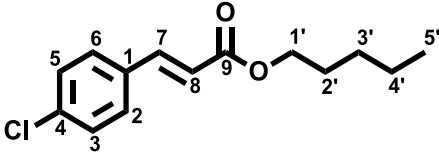
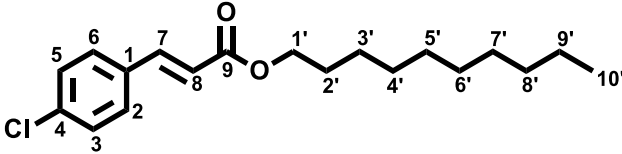
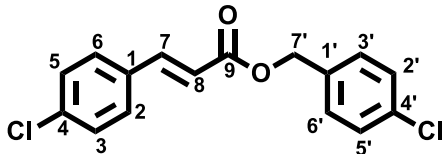
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-04 – RH-06).

Posição			
	(RH-04) δH	(RH-05) δH	(RH-06) δH
1	-	-	-
2	7,36 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,44 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz, 1H)	7,46 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)
3	7,30 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz, 1H)	7,36 (<i>d</i> , $J = 9,7$ Hz, 1H)
4	-	-	-
5	7,30 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz, 1H)	7,36 (<i>d</i> , $J = 9,7$ Hz, 1H)
6	7,36 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	7,44 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz, 1H)	7,46 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz, 1H)
7	7,54 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	7,61 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	7,67 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)
8	6,32 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	6,40 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	6,47 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)
C=O	-	-	-
1'	5,07 (<i>m</i> , 1H)	4,20 (<i>t</i> , $J = 6,2$ Hz, 2H)	4,38 (<i>t</i> , $J = 5,4$, 2H)
2'	1,25 (<i>d</i> , $J = 5,8$ Hz, 3H)	1,69 (<i>quint</i> , $J = 6,7$ Hz, 2H)	3,68 (<i>t</i> , $J = 4,7$, 2H)
3'	1,25 (<i>d</i> , $J = 5,8$ Hz, 3H)	1,42 (<i>sex</i> , $J = 7,1$ Hz, 2H)	3,43 (<i>s</i> , 3H)
4'	-	0,95 (<i>t</i> , $J = 7,0$ Hz, 3H)	-

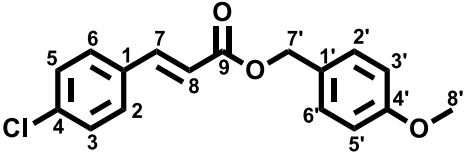
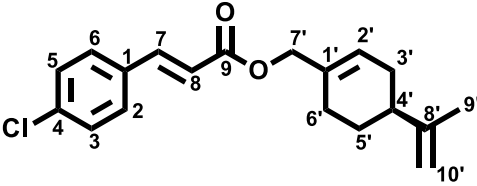
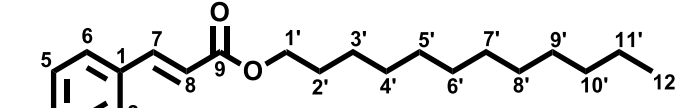
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-07 – RH-09).

Posição			
	(RH-07) δH	(RH-08) δH	(RH-09) δH
1	-	-	-
2	7,44 (d, J = 8,6 Hz, 1H)	7,45 (d, J = 8,4 Hz, 1H)	7,44 (d, J = 8,8 Hz, 1H)
3	7,34 (d, J = 8,5 Hz, 1H)	7,35 (d, J = 8,5 Hz, 1H)	7,36 (d, J = 7,1 Hz, 1H)
4	-	-	-
5	7,34 (d, J = 8,5 Hz, 1H)	7,35 (d, J = 8,5 Hz, 1H)	7,36 (d, J = 7,1 Hz, 1H)
6	7,44 (d, J = 8,6 Hz, 1H)	7,45 (d, J = 8,4 Hz, 1H)	7,44 (d, J = 8,8 Hz, 1H)
7	7,61 (d, J = 16,0 Hz, 1H)	7,62 (d, J = 16,0 Hz, 1H)	7,66 (d, J = 16,0 Hz, 1H)
8	6,40 (d, J = 16,0 Hz, 1H)	6,41 (d, J = 16,0 Hz, 1H)	6,44 (d, J = 16,0 Hz, 1H)
C=O	-	-	-
1'	4,19 (t, J = 6,8 Hz, 2H)	4,19 (t, J = 6,7 Hz, 2H)	5,21 (s, 2H)
2'	1,69 (quint, J = 6,9 Hz, 2H)	1,68 (quint, J = 6,6 Hz, 2H)	-
3'	1,37 (m, 2H)	1,40 – 1,24 (m, 2H)	7,36 (d, J = 7,1 Hz, 1H)
4'	1,37 (m, 2H)	1,40 – 1,24 (m, 2H)	7,36 (d, J = 7,1 Hz, 1H)
5'	0,92 (t, J = 7,0 Hz, 3H)	1,40 – 1,24 (m, 2H)	-
6'	-	1,40 – 1,24 (m, 2H)	7,36 (d, J = 7,1 Hz, 1H)
7'	-	1,40 – 1,24 (m, 2H)	7,36 (d, J = 7,1 Hz, 1H)
8'	-	1,40 – 1,24 (m, 2H)	-
9'	-	1,40 – 1,24 (m, 2H)	-
10'	-	0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H)	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6. Assinalamentos de RMN de ^1H dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-10 – RH-12).

Posição			
	(RH-10) δH	(RH-11) δH	(RH-12) δH
1	-	-	-
2	7,44 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	7,45 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)	7,45 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)
3	7,35 (<i>d</i> , $J = 5,1$ Hz, 1H)	7,35 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	7,35 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)
4	-	-	-
5	7,35 (<i>d</i> , $J = 5,1$ Hz, 1H)	7,35 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	7,35 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)
6	7,44 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	7,45 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)	7,45 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)
7	7,66 (<i>d</i> , $J = 16,5$ Hz, 1H)	7,64 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	7,62 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)
8	6,44 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	6,43 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)	6,41 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 1H)
C=O	-	-	-
1'	-	-	4,20 (<i>t</i> , $J = 6,7$ Hz, 2H)
2'	7,35 (<i>d</i> , $J = 5,1$ Hz, 1H)	5,81 (<i>s</i> , 1H)	1,69 (<i>quint</i> , $J = 6,7$ Hz, 2H)
3'	6,92 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz, 1H)	2,20 (<i>m</i> , 1H); 2,03 – 1,96 (<i>m</i> , 1H)	1,26 (<i>m</i> , 2H)
4'	-	2,16 (<i>m</i> , 1H)	1,26 (<i>m</i> , 2H)
5'	6,92 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz, 1H)	1,90 – 1,84 (<i>m</i> , 1H); 1,56 – 1,46 (<i>m</i> , 1H)	1,26 (<i>m</i> , 2H)
6'	7,35 (<i>d</i> , $J = 5,1$ Hz, 1H)	2,15 – 2,10 (<i>m</i> , 2H)	1,26 (<i>m</i> , 2H)
7'	5,19 (<i>s</i> , 2H)	4,60 (<i>s</i> , 2H)	1,26 (<i>m</i> , 2H)
8'	3,82 (<i>s</i> , 3H)	-	1,26 (<i>m</i> , 2H)
9'	-	1,76 – 1,72 (<i>m</i> , 3H, H-9')	1,26 (<i>m</i> , 2H)
10'	-	4,73 (<i>s</i> , 2H)	1,26 (<i>m</i> , 2H)
11'	-	-	1,26 (<i>m</i> , 2H)
12'	-	-	0,89 (<i>t</i> , $J = 6,7$ Hz, 3H)

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7. Assinalamentos de RMN de ^{13}C dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 – RH-12).

	RH-01	RH-02	RH-03	RH-04	RH-05	RH-06	RH-07	RH-08	RH-09	RH-10	RH-11	RH-12
	δC	δC	δC	δC	δC	δC	δC	δC	δC	δC	δC	δC
1	132,8	133,2	132,8	131,0	132,9	133,0	133,0	133,0	134,2	132,9	132,9	133,0
2	129,3	129,3	129,2	129,2	129,2	129,4	129,2	129,2	129,2	129,2	129,2	129,2
3	129,1	129,2	129,1	129,1	129,1	129,3	129,1	129,1	128,8	129,1	129,1	129,2
4	136,2	136,2	136,1	135,9	136,0	136,3	136,1	136,0	134,5	136,2	136,2	136,1
5	129,1	129,2	129,1	129,1	129,1	129,3	129,1	129,1	128,8	129,1	129,1	129,2
6	129,3	129,3	129,2	129,2	129,2	129,4	129,2	129,2	129,2	129,2	129,2	129,2
7	143,4	143,3	143,1	142,8	143,1	143,8	143,1	143,1	144,0	143,5	143,4	143,1
8	118,2	119,0	118,7	119,3	118,8	118,5	118,9	118,7	118,2	118,6	118,7	118,9
C=O	167,1	166,8	166,8	166,2	166,8	166,8	166,8	166,9	166,3	166,6	166,7	166,9
1'	51,8	60,7	66,2	67,9	64,5	70,64	63,8	64,8	65,6	128,1	132,6	64,9
2'	-	14,4	22,0	22,1	30,7	63,7	28,4	32,0	136,3	130,1	126,0	31,9
3'	-	-	10,3	22,1	19,2	59,1	28,1	29,5	129,6	114,0	30,5	29,7
4'	-	-	-	-	13,7	-	22,4	29,3	129,2	159,7	40,8	29,6
5'	-	-	-	-	-	-	14,0	29,2	132,7	114,0	27,2	29,6
6'	-	-	-	-	-	-	-	28,7	129,2	130,1	26,4	29,5
7'	-	-	-	-	-	-	-	26,0	129,6	66,3	68,7	29,4
8'	-	-	-	-	-	-	-	22,7	-	55,1	149,6	29,3
9'	-	-	-	-	-	-	-	22,7	-	-	20,6	28,7
10'	-	-	-	-	-	-	-	14,0	-	-	108,5	25,9
11'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,7
12'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,2

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4. Atividade antimicrobiana dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico

4.4.1. Relação estrutura-atividade dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico no estudo antifúngico

A avaliação da atividade antifúngica dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo de acordo com o protocolo do CLSI (2008), utilizando quatro cepas de *Candida*: *C. albicans* ATCC 90028; *C. glabrata* ATCC 90030; *C. krusei* ATCC 34135 e *C. guilhermondii* 207. A atividade antifúngica (**Tabela 8**) dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não de acordo com os seguintes parâmetros: 50-100 µg/mL = boa atividade; 100-500 µg/mL = atividade moderada; 500-1000 = fraca atividade; > 1000 µg/mL = produto inativo (HOLETZ et al., 2002).

A análise da relação estrutura-atividade dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico foi baseada nos resultados da concentração inibitória mínima sobre as cepas fúngicas testadas do gênero *Candida*. A preparação desses compostos estruturalmente semelhantes, com mudança no tamanho do grupo alquílico e no tipo de substituintes no anel aromático como doadores ou retiradores de elétrons, podem promover alterações significativas nas propriedades dos compostos, e assim resultar em atividades antifúngicas distintas. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho podem servir de referência para o desenvolvimento de novos protótipos antifúngicos com perfil biológico promissor.

Os resultados obtidos com os ensaios de atividade antifúngica dos ésteres RH-01 a RH-12, seguindo o protocolo de CLEELAND, SQUIRES (1991) e NCCLS/CLSI (2002) e desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular, coordenado pelo prof. Dr. Ricardo Dias de Castro, estão expostos nas **Tabelas: 8 e 9**. Todos os compostos apresentaram atividade, porém alguns não foram bioativos frente a todas as cepas testadas.

Em relação aos ensaios frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 de acordo com os resultados apresentados na **Tabela 8**, os ésteres **RH-01, RH-02, RH-06, RH-08, RH-11 e RH-12** foram bioativos frente a esta cepa, enquanto que os demais foram inativos. Foi observado que o éster 4-clorocinamato de metila (**RH-01**) o éster mais simples entre todos os preparados, possuindo apenas um átomo de carbono em sua cadeia alquílica, este apresentou CIM= 5,09 µmol/mL, apresentando

assim atividade antifúngica na sua maior concentração testada, atividade está citada por Lima e colaboradores (2017). Com o aumento de mais um átomo de carbono na cadeia lateral alquílica ocorreu um ligeiro aumento na atividade antifúngica frente a esta cepa. O éster 4-clorocinamato de etila (**RH-02**) apresentou CIM= 4,75 µmol/mL, sendo esta sua maior concentração testada, porém, a bioatividade deste composto quando comparada com o **RH-01** é ligeiramente maior. Esta atividade foi cessada quando houve um ligeiro aumento na cadeia lateral alquílica nos ésteres **RH-03**, **RH-04** e **RH-05**, pode-se sugerir que o aumento da cadeia alquílica lateral quando formada por três ou quatro átomos de carbono resultou na inatividade destes, ou seja, o aumento na lipofilicidade não conferiu atividade frente a este microrganismo.

O éster 4-clorocinamato de 2-metoxietila (**RH-06**) contém em sua estrutura um heteroátomo e apresentou CIM= 2,08 µmol/mL, comparando este composto com o éster **RH-02** pode-se inferir que a presença de um heteroátomo na cadeia alquílica lateral resulta em uma melhor bioatividade para a molécula. E esta atividade não foi observada para o éster 4-clorocinamato de pentila (**RH-07**) quando houve um aumento na cadeia alquílica lateral, sendo esta formada por cinco átomos de carbono, ou seja, um aumento na lipofilicidade resultou na inatividade da molécula. Já quando a cadeia carbônica foi formada por dez carbonos, o éster 4-cloro cinamato de decila (**RH-08**), causou inibição do crescimento desta cepa na sua maior concentração testada com CIM= 3,10 µmol/mL, sendo esta molécula bioativa pelo aumento da lipofilicidade. Comparando o **RH-08** com o **RH-09** e o **RH-10** que não apresentaram bioatividade, pode-se sugerir que a troca de uma cadeia carbônica de dez carbonos por um anel aromático não resulta em atividade para o composto. O anel aromático é um grupo volumoso e isto pode dificultar a ligação da molécula com seu alvo, o que torna a molécula pouco ativa ou até mesmo inativa conforme os resultados obtidos no presente estudo.

Enquanto que o éster 4-clorocinamato de perila (**RH-11**) sendo uma subestrutura terpênica apresentou CIM= 1,58 µmol/mL, apresentando assim o melhor resultado frente à cepa *C. albicans*, isso deve-se ao fato deste composto ser uma subestrutura terpênica, é relatado na literatura que os terpenos apresentam um bom perfil antifúngico (CASTRO, 2010; SAAD et al., 2010; TEMPONE et al., 2008). Comparando o éster **RH-11** e o 4-clorocinamato de dodecila (**RH-12**) este último tendo apresentado CIM= 2,85 µmol/mL, pode-se sugerir que a troca de um

substituinte alicíclico insaturado por uma cadeia acíclica saturada apresentou uma diminuição da bioatividade do composto.

Dessa forma, os compostos que foram bioativos frente à cepa de *C. albicans* sendo eles: **RH-01**, **RH-02**, **RH-06**, **RH-08**, **RH-11** e **RH-12**, estes compostos possuem capacidade de inibir o crescimento da referida cepa e também apresentam atividade fungicida segundo os resultados da relação CFM/CIM que podem ser observados na **Tabela 9** baseada em Peixoto e colaboradores (2017).

Considerando os resultados frente à cepa de *Candida glabrata* (ATCC 90030) dentre os dozes ésteres testados, os compostos **RH-01**, **RH-02**, **RH-05**, **RH-06**, **RH-07**, **RH-08**, **RH-11** e **RH-12** apresentaram bioatividade frente a esta cepa, enquanto que os demais foram inativos. Partindo do **RH-01** como base, este composto apresentou inibição fúngica em sua maior concentração testada com a CIM= 5,09 $\mu\text{mol/mL}$, já **RH-02** foi bioativo também em sua maior concentração testada tendo CIM= 4,75 $\mu\text{mol/mL}$, quando comparado o **RH-01** e o **RH-02**, pode-se inferir que o aumento de um carbono na cadeia alquílica lateral causou uma ligeira alteração na bioatividade destas substâncias, sendo o **RH-02** mais bioativo frente a cepa de *C. glabrata*. Cadeias laterais contendo três átomos de carbono como nos ésteres **RH-03** e **RH-04**, sendo estes de cadeia linear e cadeia ramificada, respectivamente, ambos não apresentaram bioatividade.

Comparando os ésteres 4-clorocinamato de propila (**RH-03**) que não apresentou atividade, com o 4-clorocinamato de butila (**RH-05**) pode-se inferir que o ligeiro aumento de um carbono na cadeia lateral do composto proporcionou bioatividade para este, sugerindo que o aumento de três para quatro átomos de carbono na cadeia lateral resulta em um aumento na lipofilicidade, ou seja, possivelmente a substância pode ligar-se aos esteróis da membrana celular e assim causar o extravasamento dos constituintes celulares e até morte celular. Porém, esta afirmação aplica-se a comprimentos específicos da cadeia carbônica, dependendo de vários fatores tanto da molécula testada quanto do microrganismo.

Considerando o éster **RH-05** e o comparando com o éster **RH-06** pode-se sugerir que a presença de um heteroátomo, como o oxigênio na cadeia lateral do composto resulta na potencialização da bioatividade para o **RH-06** que apresentou CIM= 2,08 $\mu\text{mol/mL}$, sendo duas vezes mais potente que o **RH-05** que apresentou CIM= 4,19 $\mu\text{mol/mL}$. Atividade esta que diminui quando ocorre a troca de uma

cadeia lateral contendo um heteroátomo por cadeias carbônicas laterais com cinco ou dez carbonos, como é o caso dos compostos **RH-07** e **RH-08**, que apresentaram CIM= 3,96 µmol/mL e 3,10 µmol/mL, respectivamente, o que sugere que a presença de um oxigênio na cadeia lateral do éster torna-o com melhor perfil antifúngico.

Comparando o **RH-08** com o éster 4-clorocinamato de 4-clorobenzila (**RH-09**) e o 4-clorocinamato de 4-metoxibenzila (**RH-10**), sendo estes dois últimos ésteres aromáticos que foram inativos frente a esta cepa de *C. glabrata*. Dessa forma, pode-se inferir que os ésteres arílicos derivados do ácido 4-clorocinâmico não possuem atividade antifúngica quando comparados com os alquílicos, isso por possuírem um grupo volumoso e provavelmente dificultar a interação do composto com seu alvo (ARAÚJO, 2017).

Quando comparamos o **RH-11** que apresenta a melhor bioatividade em relação à cepa *C. glabrata*, obtendo CIM= 1,58 µmol/mL, com o **RH-12** neste ocorre diminuição da atividade, logo, a troca de um substituinte alicíclico insaturado, sendo esta uma subestrutura terpênica por uma acíclica saturada causa uma diminuição da bioatividade para o **RH-12** que apresentou CIM= 2,85 µmol/mL.

Para esta cepa de *C. glabrata*, os compostos que apresentaram bioatividade foram: **RH-01**, **RH-02**, **RH-05**, **RH-06**, **RH-07**, **RH-08**, **RH-11** e **RH-12**, todos possuem capacidade de inibir o crescimento da cepa testada como também apresentam atividade fungicida de acordo com a relação CFM/CIM.

Discutindo os resultados frente à cepa de *Candida krusei* (ATCC 34135) da coleção de doze ésteres testados, os que apresentaram bioatividade foram: **RH-02**, **RH-06**, **RH-08**, **RH-11** e **RH-12**.

Comparando o composto **RH-01** e o **RH-02**, pode-se dizer que neste caso o **RH-01** não apresentou atividade frente a esta cepa, e um ligeiro aumento de apenas um carbono na cadeia lateral como ocorre no **RH-02** conferiu bioatividade na maior concentração para o **RH-02**. Porém quando ocorre aumento novamente na cadeia carbônica como no **RH-03**, **RH-04** e **RH-05** onde possuem cadeia alquílica linear com três átomos de carbono, cadeia alquílica ramificada com três átomos de carbono e cadeia alquílica linear com quatro átomos de carbono, respectivamente, estas substâncias foram inativas frente a esta cepa de *C. krusei*.

Quando foi adicionado um heteroátomo na molécula como ocorre no **RH-06** neste composto foi observada bioatividade na maior concentração testada, CIM =

4,16 $\mu\text{mol/mL}$. Dessa forma, mais uma vez a presença do heteroátomo favorece a atividade antifúngica dos compostos testados. Essa atividade não ocorre quando se troca uma cadeia lateral com presença de um heteroátomo por uma cadeia lateral formada por cinco átomos de carbono, como ocorre no **RH-07**, sendo este composto inativo frente a cepa de *C. krusei*.

Comparando o **RH-07** e o **RH-08** pode-se observar que quando ocorre a conversão de uma cadeia lateral de cinco átomos de carbono por uma de dez átomos de carbono confere a molécula atividade antifúngica na maior concentração testada, sendo assim, CIM= 3,10 $\mu\text{mol/mL}$, pode-se sugerir que isso ocorre devido ao aumento da lipofilicidade, e assim melhor bioatividade.

Em comparação o éster **RH-08** com o **RH-09** e **RH-10** houve perda de bioatividade como ocorreu nas duas cepas anteriores. A troca de uma cadeia lateral alquílica linear por cadeias laterais arílicas resulta na inatividade aos compostos. Relacionando os compostos **RH-10** e **RH-11**, com a troca de uma substituinte arílico por uma cadeia alicíclica insaturada torna **RH-11** compotente atividade antifúngica tendo CIM= 0,78 $\mu\text{mol/mL}$, sendo esta a melhor atividade dentre os ésteres testados frente à cepa de *C. krusei*.

Ao analisar o éster **RH-11** e o **RH-12**, observou-se que quando se tem a conversão da cadeia alicíclica insaturada por uma cadeia acíclica linear saturada a atividade fica mais do que três vezes menor do que a apresentada pelo éster **RH-11**, sugerindo assim que para esta cepa as subestruturas terpênicas devem potencializar a ação antifúngica.

Em relação à cepa *C. krusei* os ésteres que apresentaram atividade, são: **RH-02**, **RH-06**, **RH-08**, **RH-11** e **RH-12**. Todos, além de causar inibição do crescimento fúngico ainda apresentam atividade antifúngica de acordo com a relação CFM/CIM.

A última cepa estudada no presente trabalho foi a *Candida guilhermondii* (207) e esta foi o microrganismo que apresentou maior susceptibilidade, assim todos os ésteres testados foram bioativos. Tendo como base o éster **RH-01** sendo este o éster mais simples dentre os preparados, apresentou assim CIM= 1,27 $\mu\text{mol/mL}$, podendo ser considerado um potente antifúngico. Com um ligeiro aumento na cadeia lateral de apenas um carbono, o que ocorre no **RH-02**, causou uma ligeira alteração na bioatividade o **RH-02** apresentou CIM= 1,19 $\mu\text{mol/mL}$. Comparando o **RH-02** com o **RH-03**, **RH-04** e **RH-05** é observado declínio na atividade, esses três últimos

compostos apresentando CIM= 2,22 $\mu\text{mol/mL}$ para **RH-03** e **RH-04**, e CIM= 2,09 $\mu\text{mol/mL}$ para **RH-05**.

Comparando o **RH-05** com o **RH-06** nota-se que a bioatividade apresenta um aumento muito relevante a CIM baixa para 0,13 $\mu\text{mol/mL}$, sendo este o segundo melhor resultado do estudo. Este resultado permite inferir que a troca de uma cadeia lateral formada por quatro átomos de carbono por uma cadeia lateral formada por três átomos de carbono e tendo presença de um heteroátomo, ou seja, a troca de um carbono por um oxigênio confere a molécula uma melhor e potente bioatividade, sugerindo assim que o oxigênio quando inserido na cadeia carbônica tem uma importante função na potência da atividade biológica da molécula, provavelmente porque há o melhoramento de alguns parâmetros como, por exemplo, melhoramento da afinidade eletrônica que podem ser considerados como principais fatores determinantes na diferença da melhor atividade antimicrobiana (NARASHIMHAN et al., 2004).

Analisando o éster **RH-06** com o **RH-07** e **RH-08** observa-se que a presença de um heteroátomo potencializa a atividade antifúngica mais que a presença de cadeias laterais mais extensas como nestes casos formada por cinco e dez átomos de carbono, respectivamente. Esses compostos tendo apresentado CIM= 1,98 $\mu\text{mol/mL}$ e 1,55 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, o **RH-08** apresentando levemente uma melhor bioatividade, ou seja, o aumento da cadeia carbônica interferiu um pouco nos resultados dos testes frente a cepa de *C. guilhermondii*.

Comparando o **RH-08** com o **RH-09** e **RH-10** é observado que a conversão de uma cadeia alquílica extensa por anel aromático *para* clorado, e um anel aromático *para* metoxilado conferem as moléculas uma melhor bioatividade, apresentando CIM= 0,40 e 0,41 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, sendo em torno de quatro vezes mais potente que o **RH-08**, como foi observado no estudo de Nascimento (2017) e Araújo (2017) onde os compostos desses que são semelhantes aos preparados no presente trabalho apresentaram atividade antifúngica potente frente a cepas do gênero *Candida*.

O éster **RH-11** foi o composto que apresentou melhor bioatividade dentre todos os testados obtendo CIM= 0,024 $\mu\text{mol/mL}$ frente à cepa de *C. guilhermondii*, atividade esta que pode ser proveniente por esta substância ser uma subestrutura terpênica e estas possuem grandes propriedades antifúngicas, o que conferiu a esta

molécula o melhor potencial antifúngico entre todos testados, como é citado na literatura que os terpenos apresentam um bom perfil antifúngico (CASTRO, 2010; SAAD et al., 2010; TEMPONE et al., 2008).

Comparando os resultados do **RH-11** com o **RH-12** este último apresentando CIM= 1,42µmol/mL, nota-se que a presença de uma cadeia lateral alicíclica insaturada como ocorre em **RH-11** torna o composto mais bioativo frente à cepa de *C. guilhermondii* do que quando se tem presença de uma cadeia lateral acíclica saturada.

Portanto, analisando os resultados frente à cepa de *C. guilhermondii* foi observado que todos os doze ésteres preparados no presente estudo apresentaram atividade de inibição de crescimento do microrganismo, porém, os compostos **RH-08** e **RH-12** não apresentaram atividade fungicida. Os demais inibiram o crescimento como também possuem atividade fungicida frente a esta cepa, possuindo assim um bom perfil antifúngico.

Tabela 8. Resultados da Avaliação da Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) de doze substâncias sobre leveduras do gênero *Candida* – Técnica da Microdiluição.

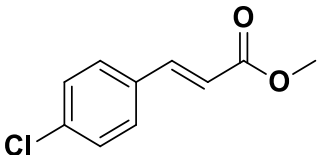
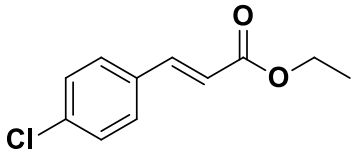
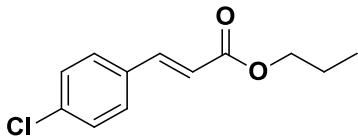
Compostos	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida Krusei</i> (ATCC 34135)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
	CIM($\mu\text{g/mL}$)			
 RH-01	1000 (5,09 $\mu\text{mol/mL}$)	1000 (5,09 $\mu\text{mol/mL}$)	+	250 (1,27 $\mu\text{mol/mL}$)
 RH-02	1000 (4,75 $\mu\text{mol/mL}$)	1000 (4,75 $\mu\text{mol/mL}$)	1000 (4,75 $\mu\text{mol/mL}$)	250 (1,19 $\mu\text{mol/mL}$)
 RH-03	+	+	+	500 (2,22 $\mu\text{mol/mL}$)

Tabela 8. Continuação.

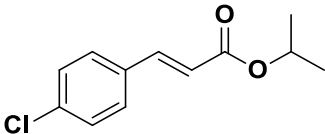
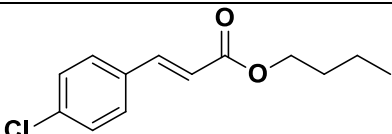
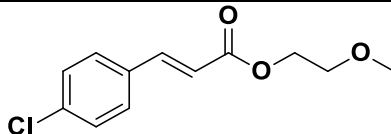
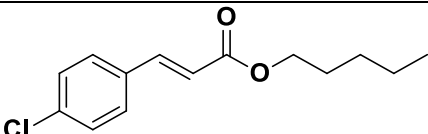
Compostos	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida Krusei</i> (ATCC 34135)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
	CIM($\mu\text{g/mL}$)			
 RH-04	+	+	+	500 (2,22 $\mu\text{mol/mL}$)
 RH-05	+	1000 (4,19 $\mu\text{mol/mL}$)	+	500 (2,09 $\mu\text{mol/mL}$)
 RH-06	500 (2,08 $\mu\text{mol/mL}$)	500 (2,08 $\mu\text{mol/mL}$)	1000 (4,16 $\mu\text{mol/mL}$)	31,25 (0,13 $\mu\text{mol/mL}$)
 RH-07	+	1000 (3,96 $\mu\text{mol/mL}$)	+	500 (1,98 $\mu\text{mol/mL}$)

Tabela 8. Continuação.

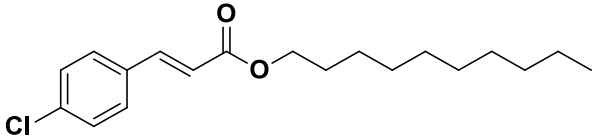
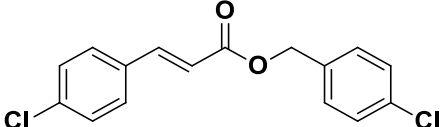
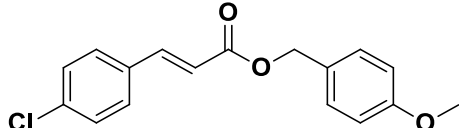
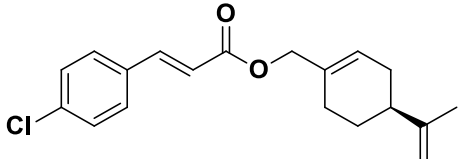
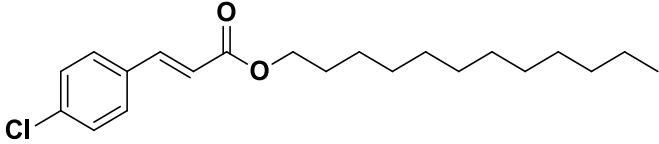
Compostos	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida Krusei</i> (ATCC 34135)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
	CIM(µg/mL)			
 RH-08	1000 (3,10 µmol/mL)	1000 (3,10 µmol/mL)	1000 (3,10 µmol/mL)	500 (1,55 µmol/mL)
 RH-09	+	+	+	125 (0,40 µmol/mL)
 RH-10	+	+	+	125 (0,41 µmol/mL)
 RH-11	500 (1,58 µmol/mL)	500 (1,58 µmol/mL)	250 (0,78 µmol/mL)	7,8 (0,024 µmol/mL)

Tabela 8. Continuação.

Compostos	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida Krusei</i> (ATCC 34135)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
	CIM($\mu\text{g/mL}$)			
 RH-12	1000 (2,85 $\mu\text{mol/mL}$)	1000 (2,85 $\mu\text{mol/mL}$)	1000 (2,85 $\mu\text{mol/mL}$)	500 (1,42 $\mu\text{mol/mL}$)
Controle do meio	-	-	-	-
Nistatina 100UI/mL	0,4 (0,00043 $\mu\text{mol/mL}$)	0,4 (0,00043 $\mu\text{mol/mL}$)	0,4 (0,00043 $\mu\text{mol/mL}$)	0,4 (0,00043 $\mu\text{mol/mL}$)
Controle do microrganismo	+	+	+	+

(+) Indica crescimento do microrganismo; (-) Não crescimento do microrganismo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 9: Valores de CFM ($\mu\text{mol/mL}$) e relação CFM/CIM para cada um dos compostos

Éster	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)		<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)		<i>Candida Krusei</i> (ATCC 34135)		<i>Candida guilliermondii</i> (207)	
	CFM	CFM/CIM	CFM	CFM/CIM	CFM	CFM/CIM	CFM	CFM/CIM
RH-01	10,18	2	5,09	1	+		1,27	1
RH-02	4,75	1	4,75	1	4,75	1	1,19	1
RH-03	+		+		+		2,22	1
RH-04	+				+		2,22	1
RH-05	+		4,19	1	+		2,09	1
RH-06	2,08	1	2,08	1	4,16	1	0,13	1
RH-07	+		3,96	1	+		+	
RH-08	3,10	1	3,10	1	3,10	1	1,55	2
RH-09	+		+		+		0,40	1
RH-10	+		+		+		0,41	1
RH-11	1,58	1	1,58	1	0,78	1	0,024	1
RH-12	2,85	1	2,85	1	2,85	1	+	

(+) A substância não tem CFM

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

*CFM: Concentração fungicida mínima; CIM: Concentração inibitória mínima.

4.4.2. Relação estrutura-atividade dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico no estudo antibacteriano

Os testes de avaliação da atividade antibacteriana dos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo seguindo 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.

Apenas o éster 4-clorocinamato de metila (**RH-01**) foi capaz de inibir o crescimento da linhagem de *S. aureus* ATCC 25925 na maior concentração testada, sendo esta CIM= 15,09 µmol/mL. É relatado na literatura por TONARI e colaboradores (2002) que o ácido 4-clorocinâmico apresenta atividade frente a cepas de bactérias. Dessa forma, a formação do éster metílico resultou na atividade. Porém, comum ligeiro aumento na lipofilicidade da molécula resultou na perda de atividade, a partir do éster **RH-02** a **RH-12** não foi mais observada atividade antibacteriana destes compostos.

Tabela 10. Resultados da Avaliação da Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) de doze substâncias sobre bactérias– Técnica da Microdiluição.

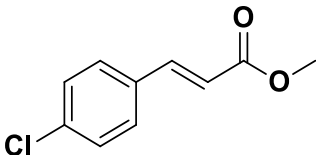
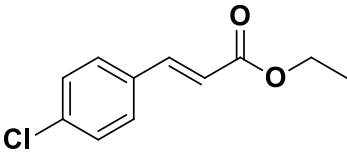
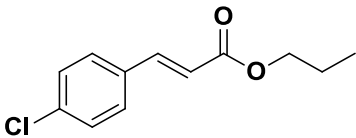
Compostos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 102	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	<i>Staphylococcus aureus</i> 47
	CIM($\mu\text{g/mL}$)			
 RH-01	+	+	1000 (5,09 $\mu\text{mol/mL}$)	+
 RH-02	+	+	+	+
 RH-03	+	+	+	+

Tabela 10. Continuação.

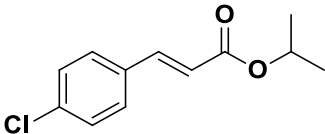
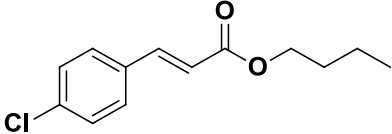
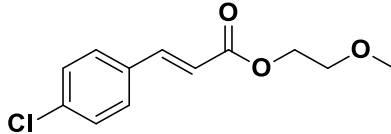
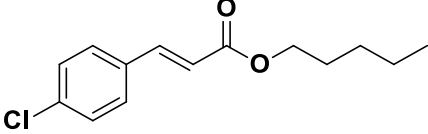
Compostos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 102	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	<i>Staphylococcus aureus</i> 47
	CIM($\mu\text{g/mL}$)			
 RH-04	+	+	+	+
 RH-05	+	+	+	+
 RH-06	+	+	+	+
 RH-07	+	+	+	+

Tabela 10. Continuação.

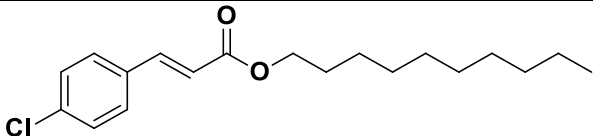
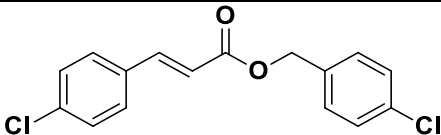
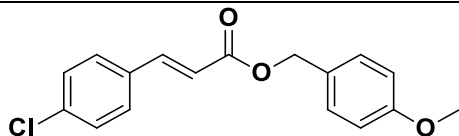
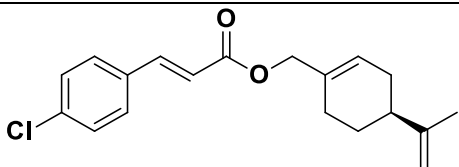
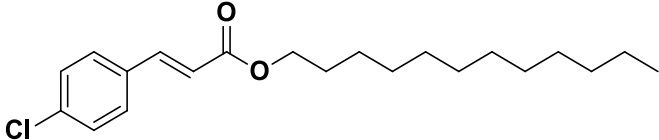
Compostos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 102	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	<i>Staphylococcus aureus</i> 47
	CIM($\mu\text{g/mL}$)			
 RH-08	+	+	+	+
 RH-09	+	+	+	+
 RH-10	+	+	+	+
 RH-11	+	+	+	+

Tabela 10. Continuação.

Compostos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 102	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	<i>Staphylococcus aureus</i> 47
	CIM($\mu\text{g/mL}$)			
 RH-12	+	+	+	+
Controle do meio	-	-	-	-
Clorafenicol 100 UI/mL	100 (0,3095 $\mu\text{mol/mL}$)	100 (0,3095 $\mu\text{mol/mL}$)	100 (0,3095 $\mu\text{mol/mL}$)	100 (0,3095 $\mu\text{mol/mL}$)
Controle do microrganismo	+	+	+	+

(+) Indica crescimento do microrganismo; (-) Não crescimento do microrganismo.

Fonte: Elaborado pela autora

5. CONCLUSÃO

No presente estudo foi preparada uma coleção de doze ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico, os quais foram identificados por meio de técnicas espectroscópicas de IV, RMN ^1H e ^{13}C , e pontos de fusão. Todos os compostos foram preparados através de reações de esterificação de relativa facilidade, apresentando rendimentos de razoáveis a ótimos, variando de 26,3% - 97,6%.

Analizando a relação estrutura-atividade, para a atividade antibacteriana foi observado que apenas o composto estruturalmente mais simples do presente trabalho, o **RH-01**, foi o único capaz de inibir o crescimento da linhagem de *S. aureus* ATCC 25925 na maior concentração. Na atividade antifúngica foi observado que os ésteres que apresentaram maior bioatividade foram aqueles que possuem cadeias alquílicas curtas, cadeia com presença de um heteroátomo, cadeia alicíclica insaturada e cadeias alquílicas longas. Considerando as quatro cepas testadas: *Candida albicans* ATCC 90028; *Candida glabrata* ATCC 90030; *Candida krusei* ATCC 34125 e *Candida guilliermondii* 207. Os compostos que apresentaram boa atividade foi o **RH-06** e o **RH-11**. Estes se destacaram frente todas as cepas testadas, em especial para a cepa *C. guilliermondii* 207. Portanto, a presença de um heteroátomo na cadeia carbônica ou de subestrutura terpênica resulta em ésteres com melhor perfil antifúngico.

Os resultados corroboram para conclusão de que os ésteres preparados a partir do ácido 4-clorocinâmico podem ser empregados em estudos de substâncias antibacterianas e antifúngicas.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados demonstraram a importância de pesquisas para encontrar novos antimicrobianos mais potentes, estudando assim os possíveis radicais do anel nos ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico, que aumentam a sensibilidade ou tornam a molécula resistente, estas são substâncias com pouco referencial teórico e que apresentam grande potencial bioativo.

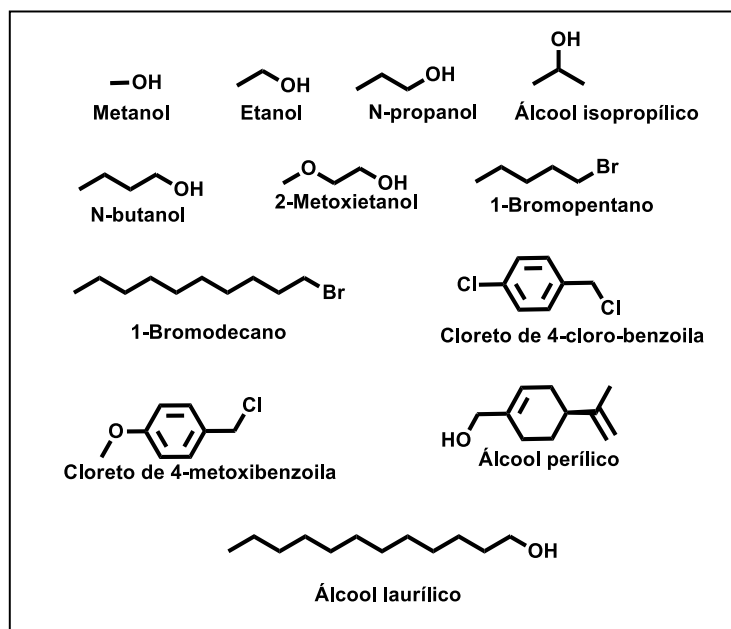
Serão realizados os testes de mecanismo de ação dos ésteres **RH-06** e **RH-11** que foram os compostos que apresentaram melhor bioatividade, para assim ser

explanado por qual mecanismo estas substâncias atuam como inibidores fúngicos e como agem também para ter atividade fungicida. Como também serão realizados estudos mais aprofundados de Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR) dos compostos preparados.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Preparação, purificação e caracterização estrutural de uma coleção de 12 ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico

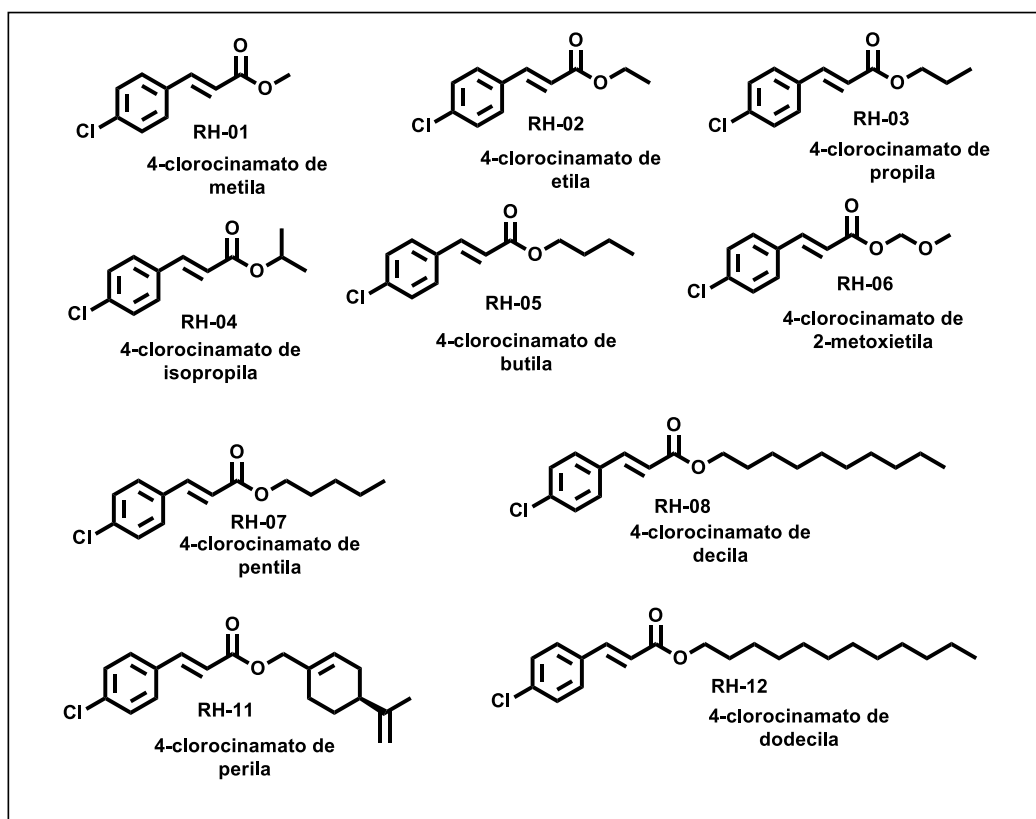
A etapa química foi realizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LQF-DCF/CCS/UFPB). Os reagentes foram obtidos da Sigma Aldrich, Neon, Vetec, Dinâmica, Qhemis e Synth. Para preparação dos ésteres, foram utilizados 8 álcoois e 4 haletos. Na **figura 7** abaixo estão dispostos os álcoois e os haletos de alquila e de arila utilizados para a preparação dos ésteres.



Fonte: Elaborado pela autora.

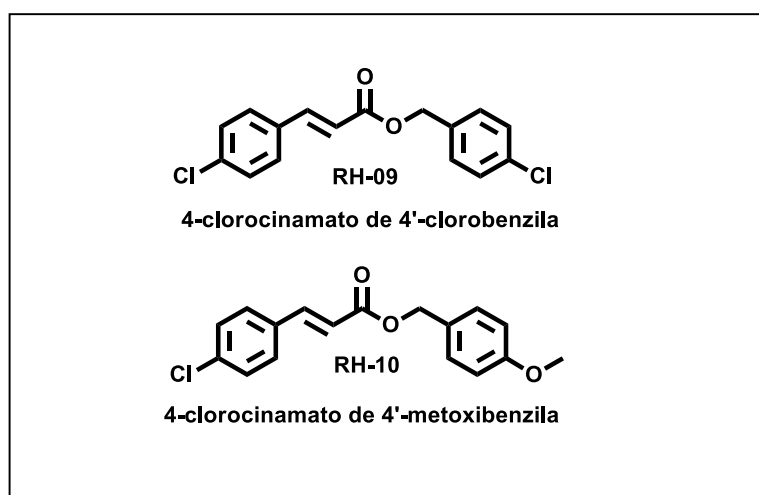
Figura 7: Reagentes utilizados para preparação dos derivados do ácido 4-clorocinâmico

Os ésteres derivados do ácido 4-clorocinâmico preparados neste trabalho estão expostos nas **Figuras 8 e 9**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8: Ésteres alquílicos e cíclico derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-01 – RH-08, RH-11 e RH-12) obtidos no presente trabalho.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9: Ésteres arílicos derivados do ácido 4-clorocinâmico (RH-09 – RH-11) obtidos no presente trabalho.

7.2. Métodos Cromatográficos

A purificação dos compostos através de cromatografia de adsorção em coluna (CC) utilizando como fase estacionária, sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variam de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Na fase móvel utilizou-se os solventes Hexano e Acetato de Etila (AcOEt:Hex), em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade. O monitoramento reacional foi realizado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), em cromato folhas com sílica gel 60 F254 suportada em placa de alumínio MERCK (com revelador para UV e espessura de 0,2 mm). A visualização ocorreu através do revelador químico: Ácido sulfúrico a 5% em álcool etílico, como também pela exposição das placas à lâmpada de irradiação ultravioleta que em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58.

7.3. Ponto de Fusão

O ponto de fusão (PF) de cada amostra foi realizado em placa de aquecimento de aparelho digital da marca GEHAKA, modelo PF 1500, funcionando a 220 V, a temperatura é determinada entre uma faixa que varia de 0-350 °C.

7.4. Métodos Espectroscópicos

7.4.1 Infravermelho

Os compostos foram caracterizados por meio de espectrofotômetro FTIR modelo IRPrestige-21, do fabricante Shimadzu, esses dados espectrais foram obtidos no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba, e foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) e a frequência foi medida em cm^{-1} .

7.4.2. Ressonância Magnética Nuclear

A identificação estrutural dos compostos foi realizada a partir de análises em espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze (RMN de ^{13}C) unidimensional. Obteve-se ambos por meio de espectrômetro MERCURY-VARIAN operando a 200 MHz ^1H e 50 MHz ^{13}C e VARIAN-RMN-SYSTEM operando a 500 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , e ASCEND-BRUKER, operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), os três equipamentos do NUCAL - Núcleo de Caracterização e Análise/UFPB. Para as análises as amostras foram preparadas dissolvendo uma pequena quantidade da mesma em clorofórmio deuterado (CDCl_3) da **MERCK**. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), que é utilizado como padrão interno. Como referência para RMN de ^1H , foram utilizados os picos característicos dos hidrogênios que pertencem às frações não deuteradas do solvente clorofórmio ($\delta\text{H} = 7,24$ ppm). Os mesmos parâmetros foram utilizados para os espectros de RMN de ^{13}C , através dos picos do clorofórmio ($\delta\text{C} = 77,00$ ppm). As multiplicidades das bandas de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *d* (duplete), *dt* (duplete de tripleto), *t* (tripleto), *q* (quadruplete), *quint* (quinteto), *sext* (sexteto), *sept* (septeto), *m* (multiplete).

7.4.3. Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Os espectros de alta resolução foram realizados através do 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 Flex Control 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.

7.5. Testes de avaliação da atividade antimicrobiana

7.5.1. Ensaio antifúngico

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

7.5.1.1. Materiais e métodos

7.5.1.1.1. Compostos testados

Os compostos foram submetidos a ensaios biológicos para realização da análise da atividade antifúngica sobre cepas de fungos leveduriformes. Os mesmos foram solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) e em seguida em água destilada estéril (quantidade suficiente para 1,0 mL) obtendo-se uma solução que a concentração inicial, na primeira linha da placa de microdiluição foi de 1000µg/mL das substâncias testadas. (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014; PEIXOTO et al., 2017).

7.5.1.1.2. Meio de cultura

Foi utilizado na análise da atividade antifúngica o meio de cultura Agar Sabouraus Dextrose (ASD), da Kasvi, este foi preparado de acordo com as normas do fabricante.

7.5.1.1.3. Microrganismos

Para os ensaios de análise da atividade antifúngica foi designado o gênero *Candida*, e deste foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* ATCC 90028; *Candida glabrata* ATCC 90030; *Candida krusei* ATCC 34125 e *Candida guilliermondii* 207. Todos estes microrganismos fazem parte da coleção do Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (CCS/UFPB).

7.5.1.1.4 Ajuste do Inóculo

Para a realização dos ensaios antifúngicos foi necessária a reativação dos microrganismos, estes foram inoculados em meio de cultura estéril, o Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), incubados por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o período de incubação foi realizado o ajuste do inóculo, através da absorbância (lida em espectrofotômetro) do inóculo inicial, detectou-se o volume (em μL) necessário para cada um deles, e este foi submetido à posterior diluição em meio CSD e obtenção de um inóculo ajustado com concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (PEIXOTO et al., 2017).

7.5.1.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos testados

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada substância avaliada foi realizada através da técnica de Microdiluição em placa de 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente foram distribuídos 100 μL do Caldo Sabouraud dextrose (CSD) duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μL da solução dos produtos preparados foram adicionados nas cavidades da primeira linha da placa. Uma diluição seriada a uma razão de dois foi realizada, e através desta pode-se obter concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ até 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, foram adicionados 100 μL do inóculo da cepa fúngica em cada orifício das placas. Concomitantemente foram realizados os controles: controle do meio (CSD), controle dos microrganismos (CSD + inóculo), controle para as substâncias (CSD + 50 μL de cada produto). Para comprovação da viabilidade do meio, do microrganismo e das

susbtâncias. As placas foram fechadas com parafilm e levadas a estufa biológica, onde são submetidas a uma temperatura de 35 ± 2 °C por 24 horas.

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

Estes testes foram realizados em duplicata. A leitura dos ensaios foi realizada através da visualização de coloração vermelha nas cavidades, que é indicador para crescimento do microrganismo. A CIM, para cada composto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico, interpretar-se da seguinte maneira: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

7.5.1.1.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos testados

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) das substâncias foi realizada após leitura dos resultados da CIM. Foram retiradas 3 alíquotas de 30 µL do sobrenadante dos orifícios onde foi observado completa inibição do crescimento fúngico, em seguida semeia-se em placas de petri contendo 15 mL Agar Sabouraud Dextrose (ASD). A incubação foi a 35 ± 2 °C por 24 horas. Ao termino do período de incubação foi realizada a leitura da CFM, que é interpretada da seguinte forma: CFM = CIM não houve crescimento em nenhum dos pontos de aplicação, CFM = CIM X 2 crescimento em uma das aplicações, e sem CFM quando se te crescimento em dois ou nos 3 pontos de aplicação das alíquotas (RASOOLI; ABYANEH, 2004). A relação MFC / MIC foi calculada para determinar se a substância tinha uma atividade fungistática (CFM / CIM > 4) ou fungicida (CFM / CIM < 4) (PEIXOTO et al., 2017).

7.5.2. Ensaio antibacteriano

Os testes para a avaliação da atividade antibacteriana dos ésteres preparados foram realizados no Laboratório de Ensaio Toxicológicos – Labetox, localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos de Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarm/UFPB).

7.5.2.1 Materiais e métodos

7.5.2.1.1 Compostos testados

Para a preparação dos doze ésteres para a realização dos testes antibacterianos foi feita uma solução com 10 mg/mL de cada uma das substâncias utilizando-se DMSO 25% em água destilada estéril.

7.5.2.1.2. Meio de Cultura

As bactérias foram cultivadas em meio constituído por: extrato de levedura (HIMEDIA) 5 g, peptona (MERCK) 10 g, NaCl (MERCK) 5 g, KH_2PO_4 (MERCK) 1,5 g; $\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (MERCK) 9 g solubilizados em 1 L de água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos.

7.5.2.1.3. Microrganismos

Foram utilizadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas proveniente 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.

7.5.2.1.4. 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 ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, contendo $1-5 \times 10^8$ UFC/mL (HADACEK; GREGER, 2000).

7.5.2.1.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

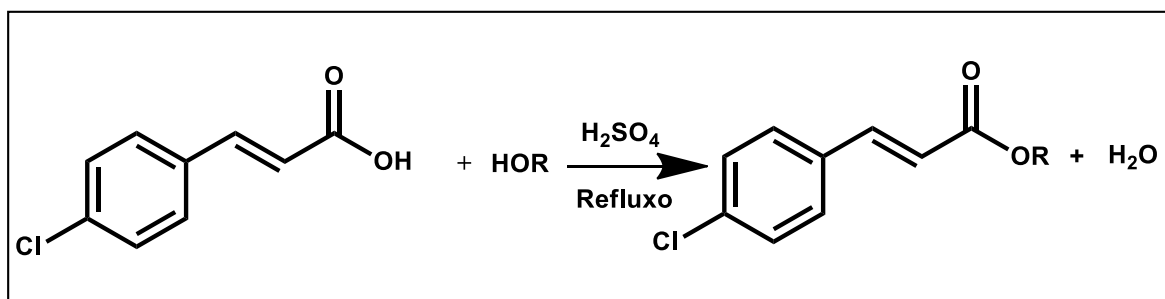
A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando-se placas de 96 poços para cada uma das cepas testadas, conforme descrito por Gerhardt et al. (1994). Para isso, distribuiu-se 100 µL do meio de cultura em todos os poços, exceto os da 1ª e 2ª coluna que receberam 150 µL. Posteriormente, adicionou-se 50 µL da solução a 10 mg/mL de cada uma das substâncias aos poços da 1ª e 2ª coluna. A partir da 2ª 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 incubadas a 37°C por 24 h para posterior leitura, realizada com a adição de 20 µL 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 inibiu completamente o crescimento bacteriano sendo verificado pela manutenção da cor azul da resazurina. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois testes.

8. PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO 4-CLOROCINÂMICO

8.1. Preparação da primeira coleção de ésteres - (RH-01- RH-06)

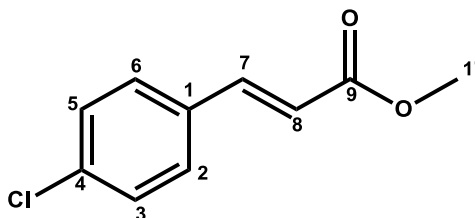


Em um balão de 100 mL, foi adicionado 0,1g (0,547 mmol) do ácido 4-clorocinâmico, o qual foi dissolvido em 20 mL do álcool alifático. À solução foi adicionada lentamente 0,2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de refluxo e colocado em banho de óleo. A mistura reacional foi mantida sob refluxo, com agitação magnética, durante 3-24 horas, e monitorada através de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila. Após a reação, o solvente foi parcialmente evaporado sob pressão reduzida até cerca da metade. A solução obtida foi transferida para um funil de separação, adicionado 15 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas resultantes foram reunidas, neutralizada com (3 x 10 mL) de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 5%, lavadas com 10 mL de água destilada, e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e evaporado o solvente com evaporador rotativo.

Para o éster **6** foi necessário ser realizada a purificação por meio de coluna cromatográfica em sílica gel 60, utilizando como eluentes o hexano e o acetato de etila, em gradiente crescente de polaridade. Este procedimento também foi acompanhado através de CCDA (FARIAS et al., 2016).

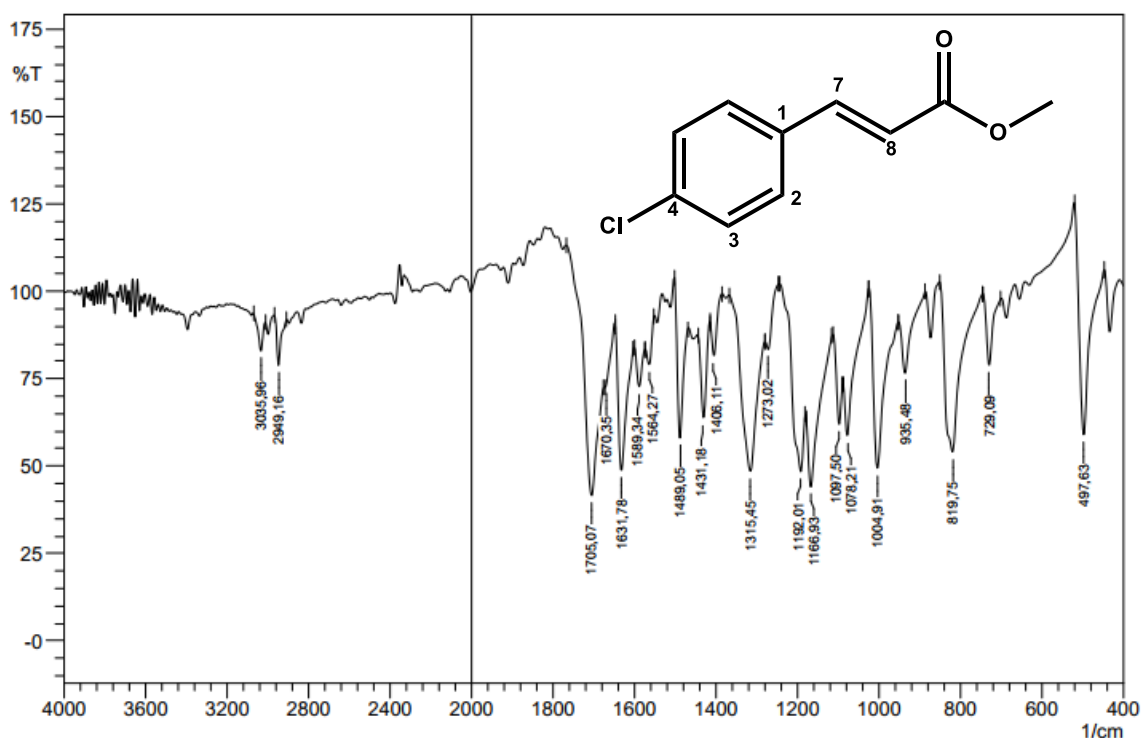
8.1.1. Dados espectroscópicos dos ésteres RH-01 - RH-06

8.1.1.1. RH-01 (4-clorocinamato de metila)

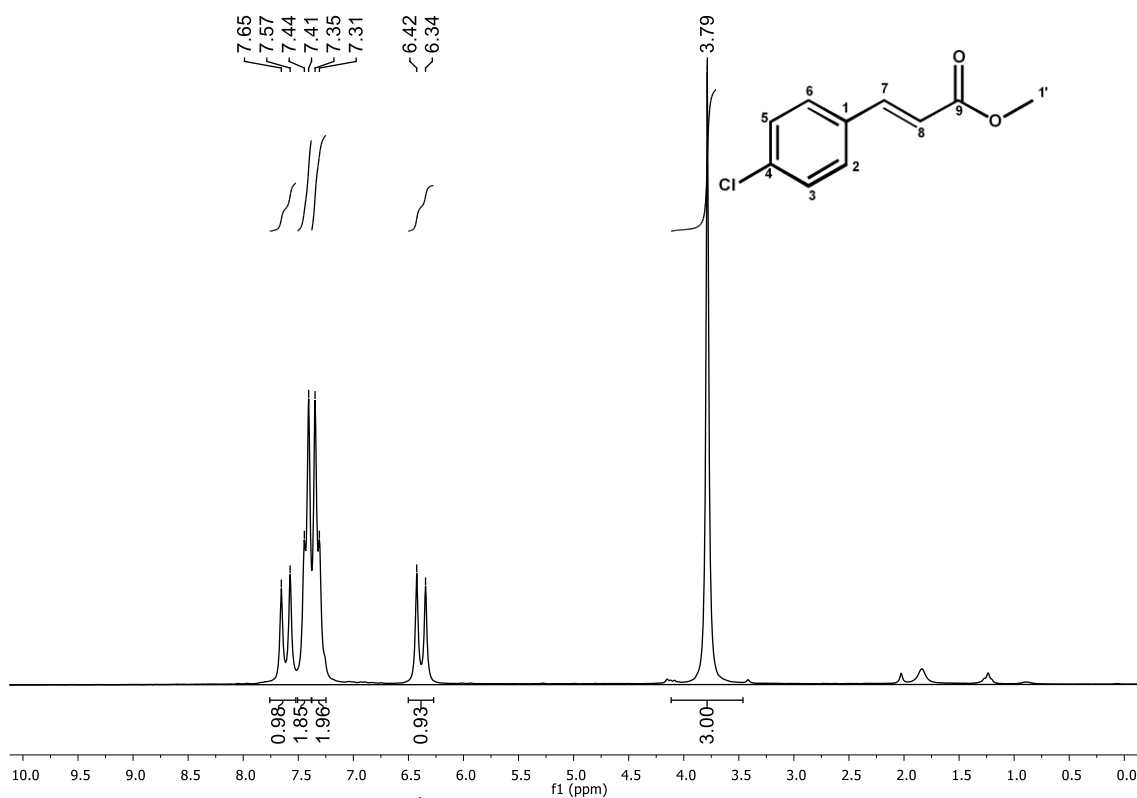


Cristais brancos; rendimento 97,6% (105,7 mg); P.F.: 71 – 72 °C;

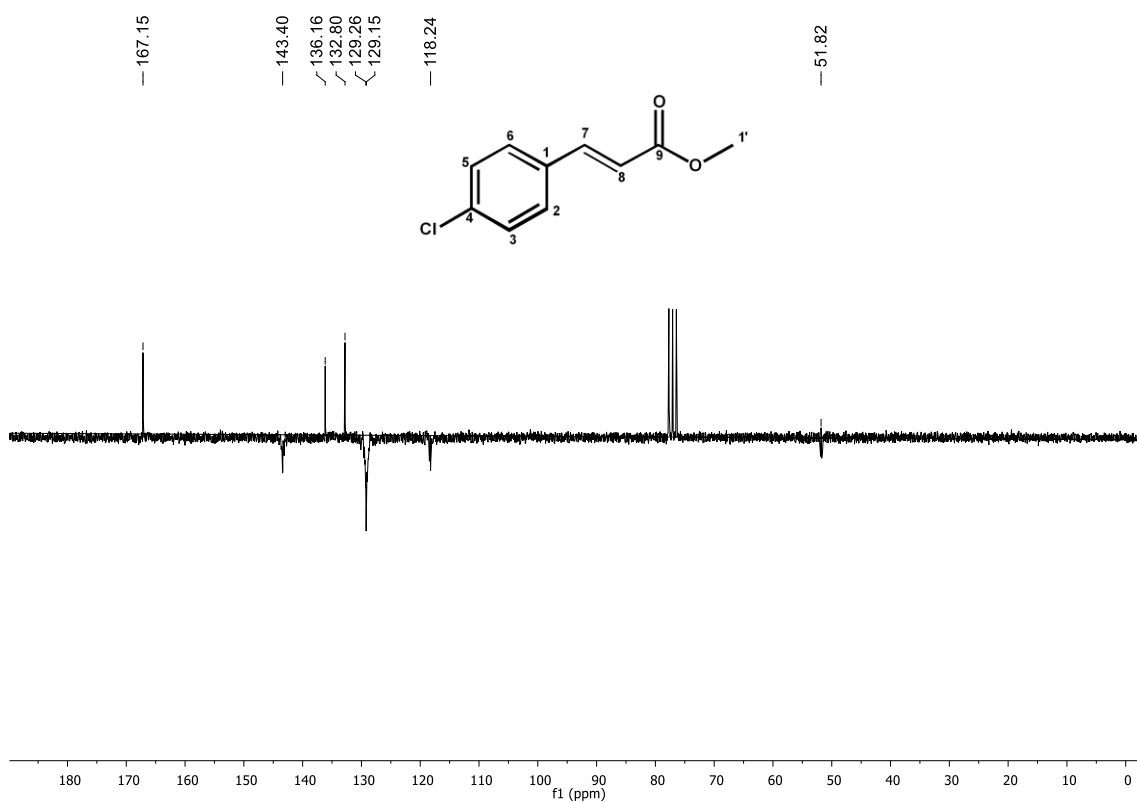
IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3035 (C-H sp^2), 2949 (C-H sp^3), 1705 (C=O), 1631 e 1431 (C=C aromático), 1273 e 1166 (estiramento C-O), 1004; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,61 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,43 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,33 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,38 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 3,79 (s, 3H, H-1'); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 167,1 (C=O); 143,4 (C-7); 136,2 (C-4); 132,8 (C-1); 129,3 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 118,2 (C-8); 51,8 (C-1') (SHIN et al., 2004; LEINO et al., 2016).



Espectro 1. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de metila (RH-01).

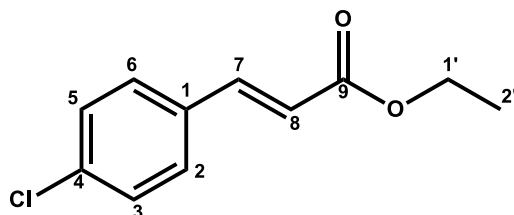


Espectro 2. Espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de metila (**RH-01**), (CDCl₃, 200 MHz).



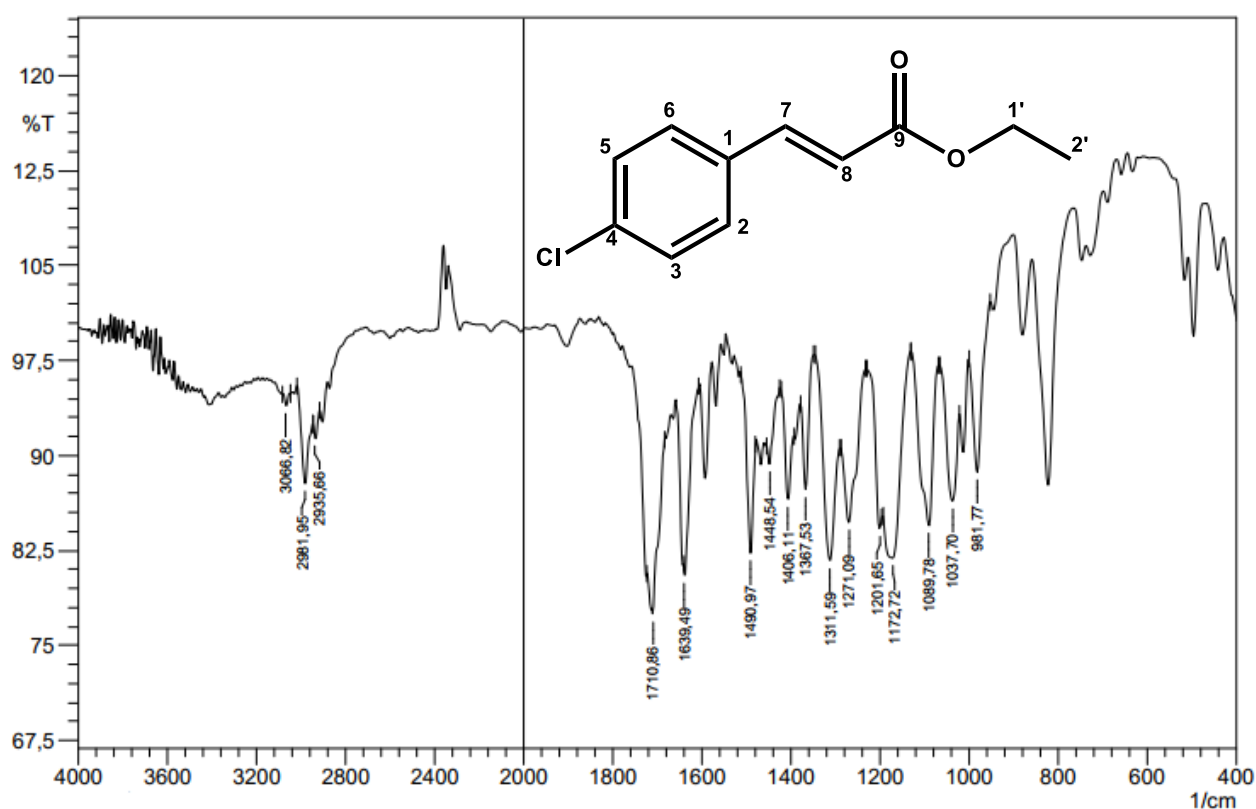
Espectro 3. Espectro de RMN ¹³C-APT de 4-clorocinamato de metila (**RH-01**), (CDCl₃, 50 MHz).

8.1.1.2. RH-02 (4-clorocinamato de etila)

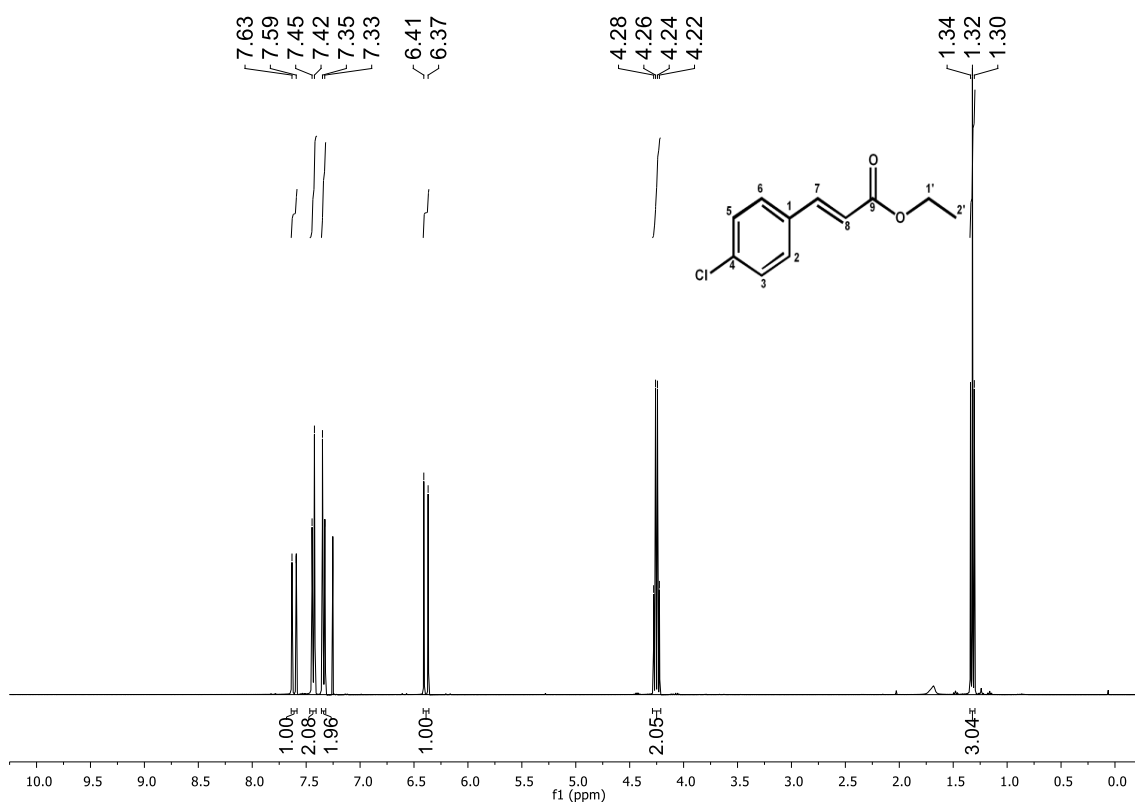


Sólido amorfo amarelo; rendimento 89,0% (102,7 mg);

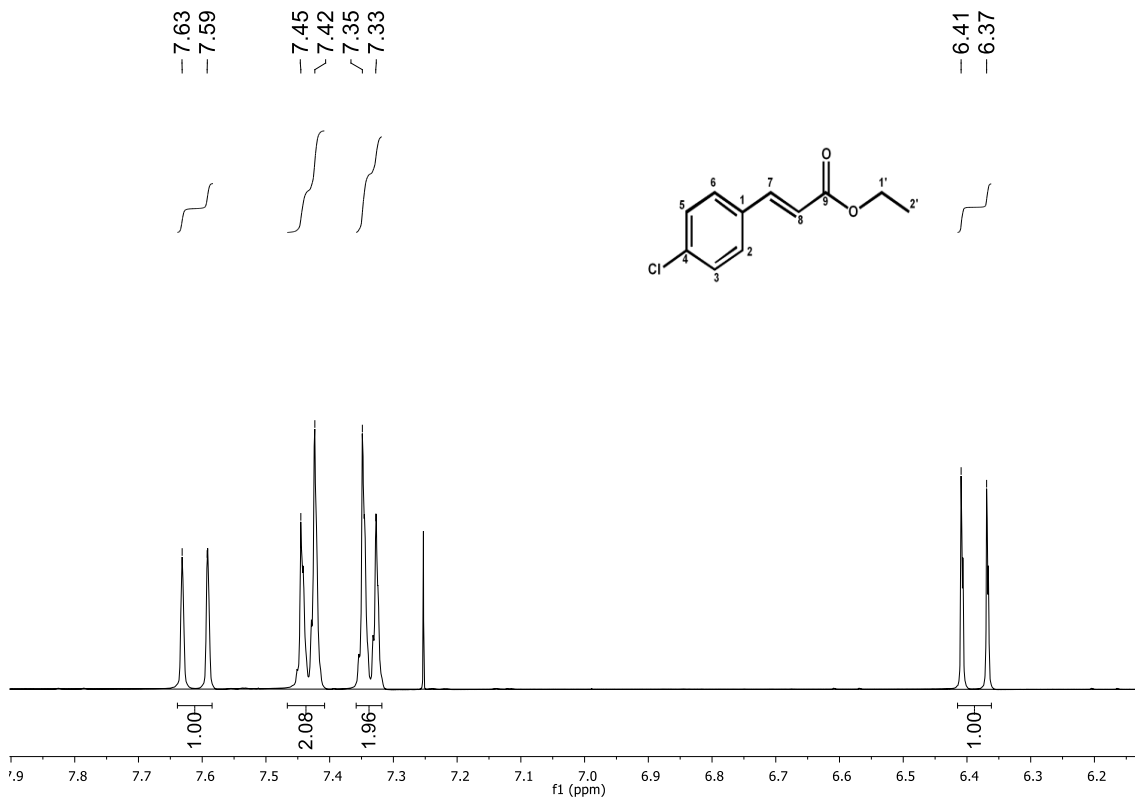
IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3066 (C-H sp^2), 2981 (C-H sp^3), 1710 (C=O), 1639 e 1448 (C=C aromático), 1311 e 1172 (estiramento C-O), 1037; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,61 (*d*, $J = 15,7$ Hz, 1H, H-7); 7,43 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,34 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,39 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 4,25 (*q*, $J = 7,1$ Hz, 2H, H-1'); 1,32 (*t*, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-2'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,8 (C=O); 143,3 (C-7); 136,2 (C-4); 133,2 (C-1); 129,3 (C-2, C-6); 129,2 (C-3, C-5); 119,0 (C-8); 60,7 (C-1'); 14,4 (C-2') (UWAI et al., 2008; LEINO et al., 2016).



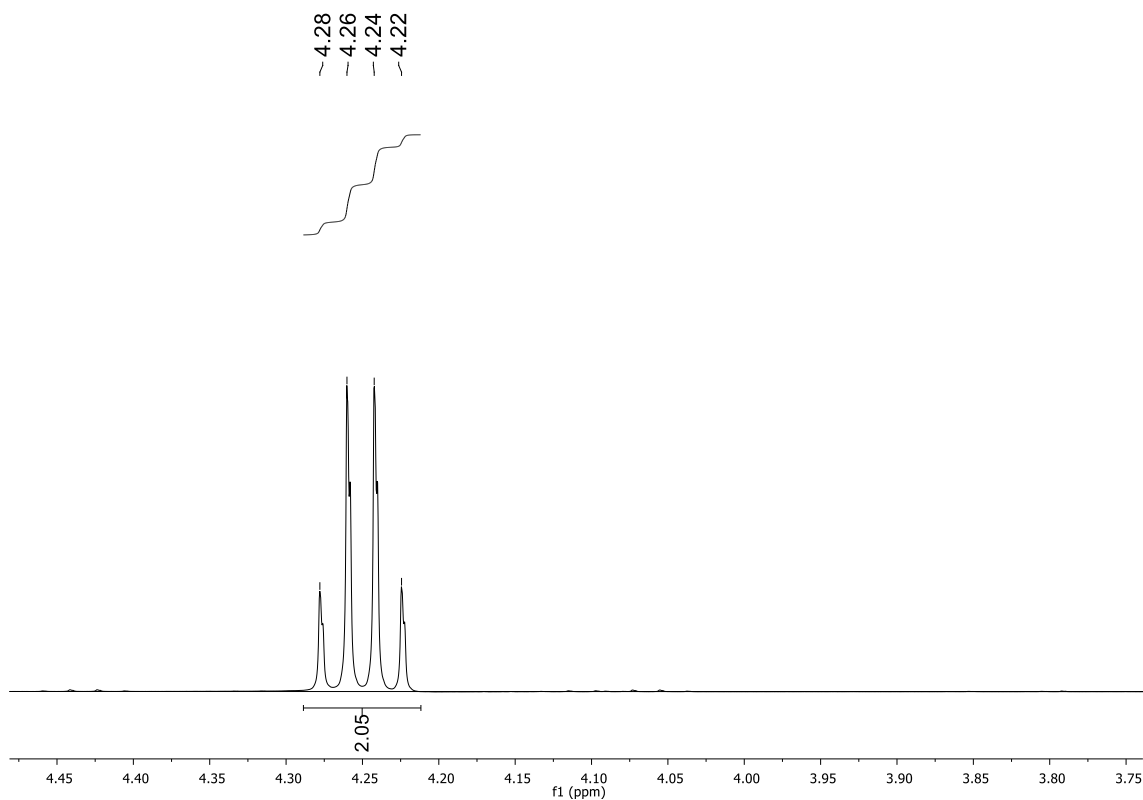
Espectro 4. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de etila (RH-02).



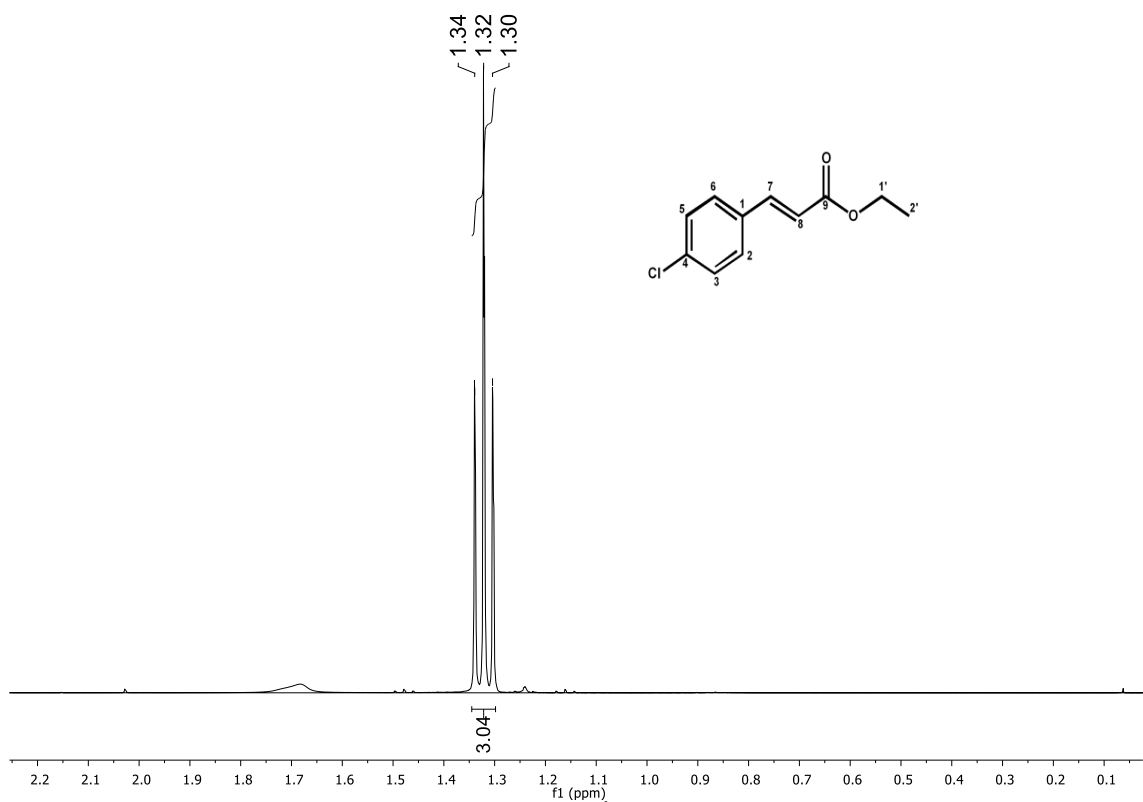
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de etila (**RH-02**), (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 6. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de etila (**RH-02**), (CDCl_3 , 400 MHz).



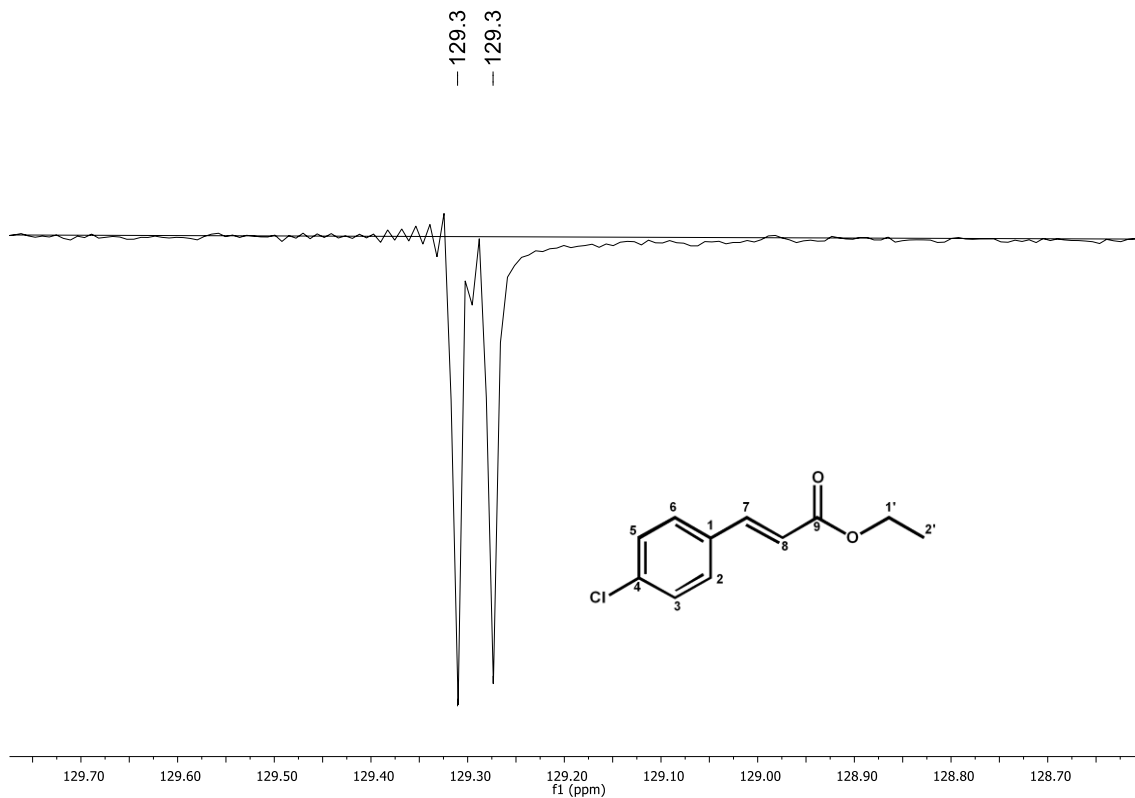
Espectro 7. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de etila (**RH-02**), (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 8. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de etila (**RH-02**), (CDCl_3 , 400 MHz).

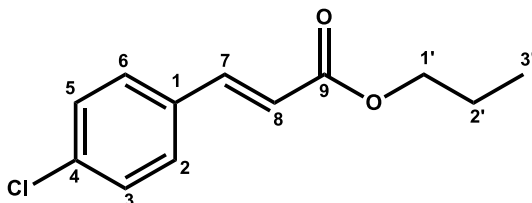


Espectro 9. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de etila (**RH-02**), (CDCl_3 , 100 MHz).

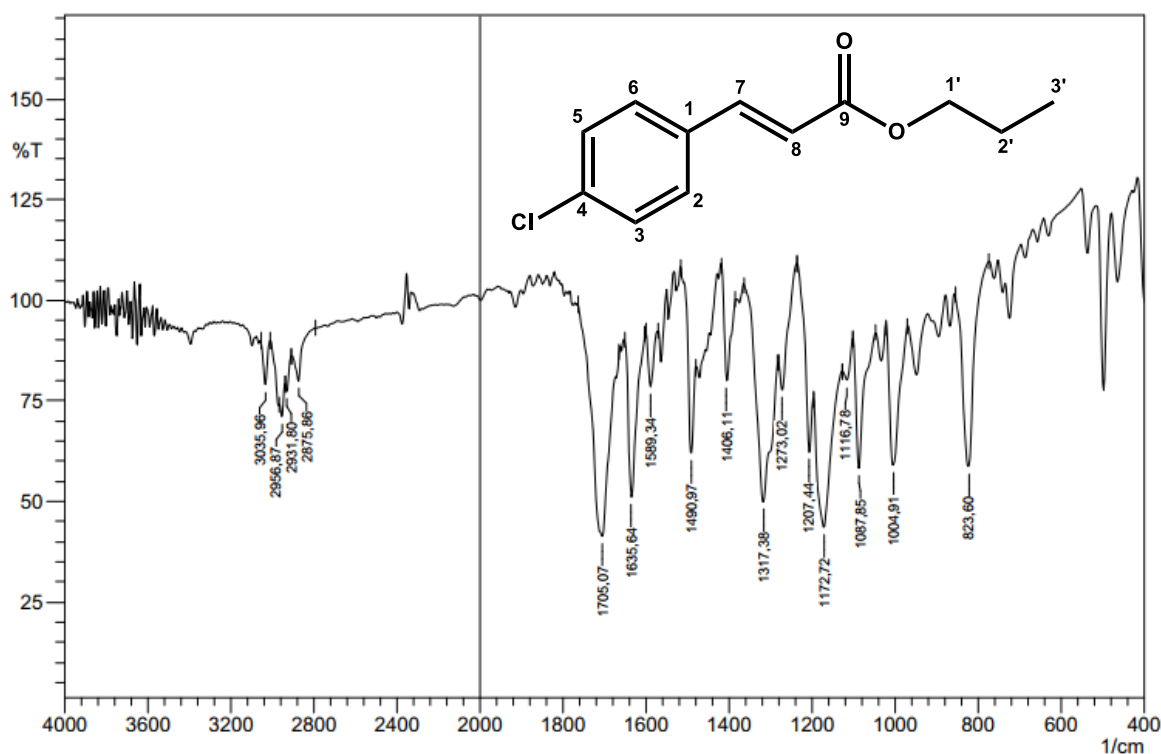


Espectro 10. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de etila (**RH-02**), (CDCl_3 , 100 MHz).

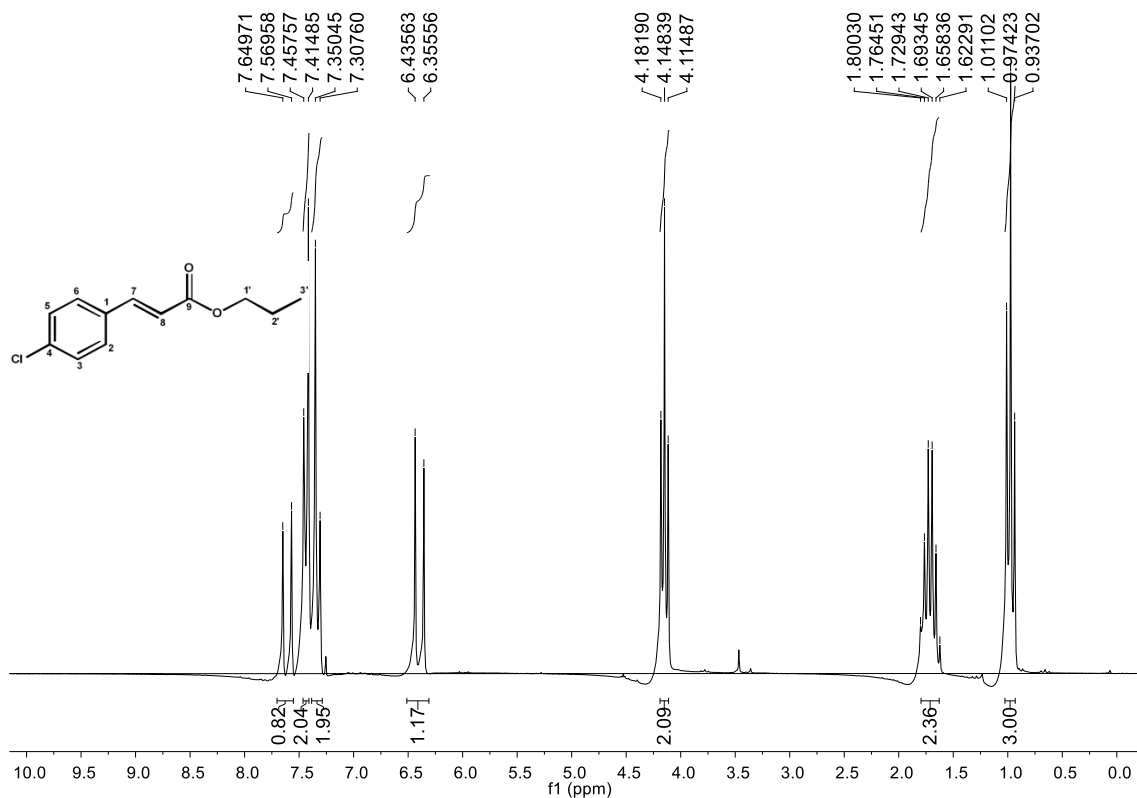
8.1.1.3 RH-03 (4-clorocinamato de propila)



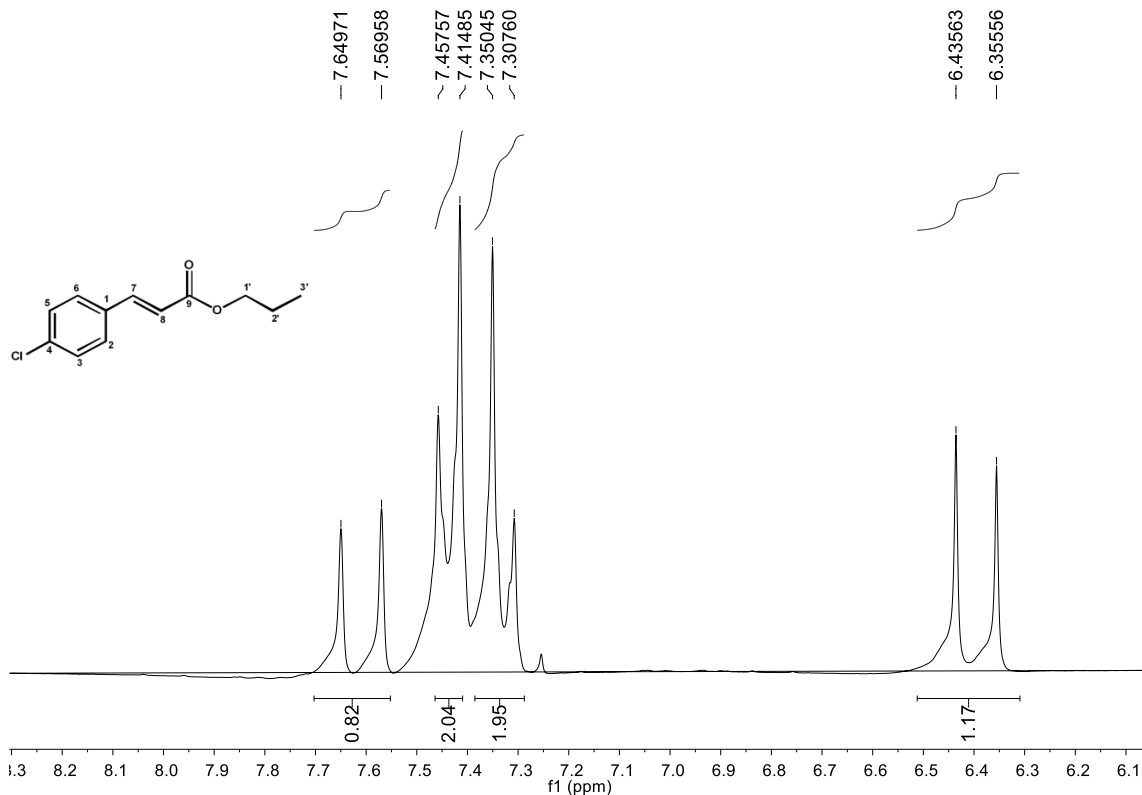
Sólido amorfo amarelo claro; rendimento 88,5% (109 mg)); P.F.: 34 – 36 °C;
 IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3035 (C-H sp^2), 2956 (C-H sp^3), 1705 (C=O), 1635 e 1409 (C=C aromático), 1317 e 1087 (estiramento C-O), 1004; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,61 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,44 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,33 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,40 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 4,15 (*t*, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-1'), 1,71 (*m*, $J = 7,2$ Hz, 2H, H-2'), 0,97 (*t*, $J = 7,3$ Hz, 3H, H-3'); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,8 (C=O); 143,1 (C-7); 136,1 (C-4); 132,8 (C-1); 129,2 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 118,7 (C-8); 66,2 (C-1'); 22,0 (C-2'); 10,3 (C-3') (JAYAPRAKASAM et al., 2006; LEINO et al., 2016).



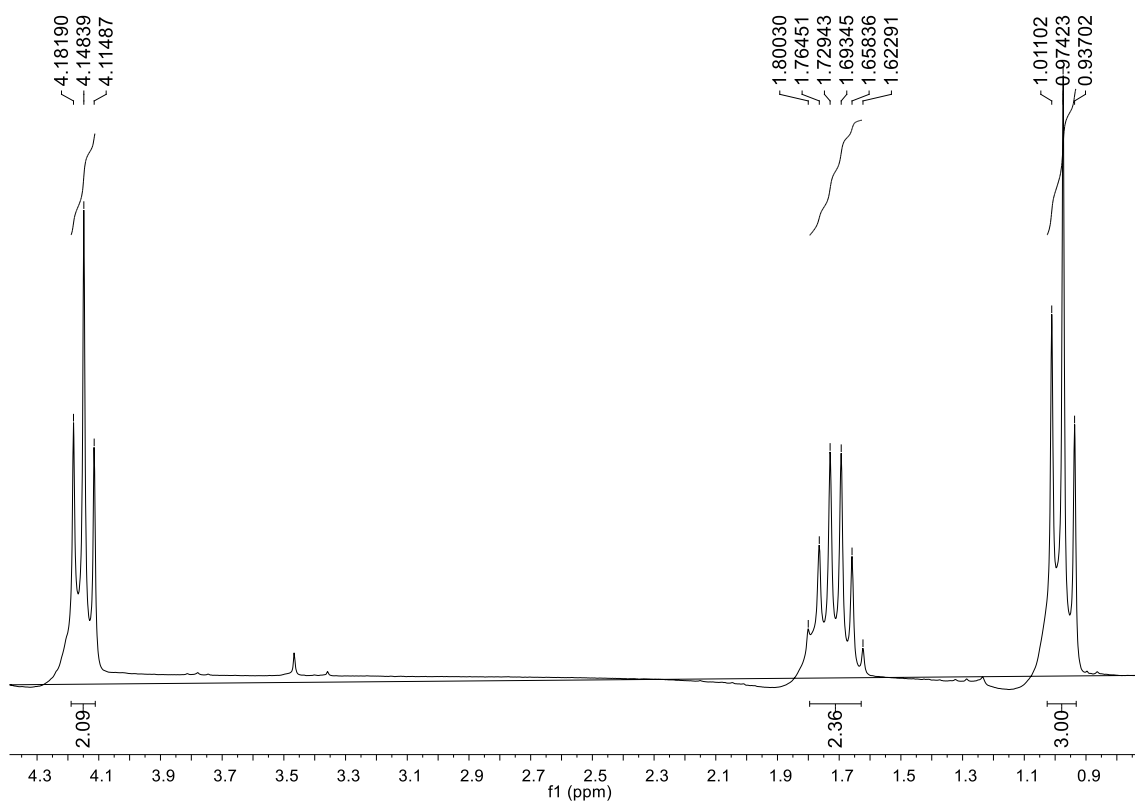
Espectro 11. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de propila (RH-03).



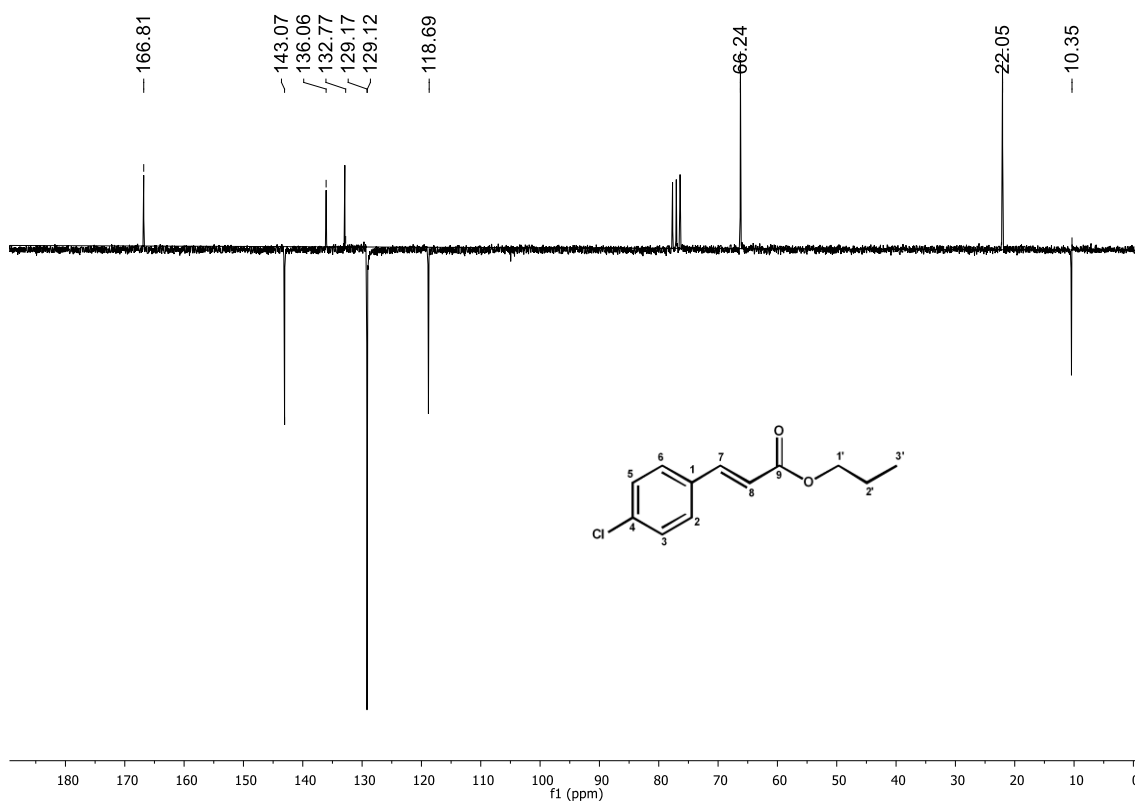
Espectro 12. Espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de propila (RH-03) (CDCl₃, 200 MHz).



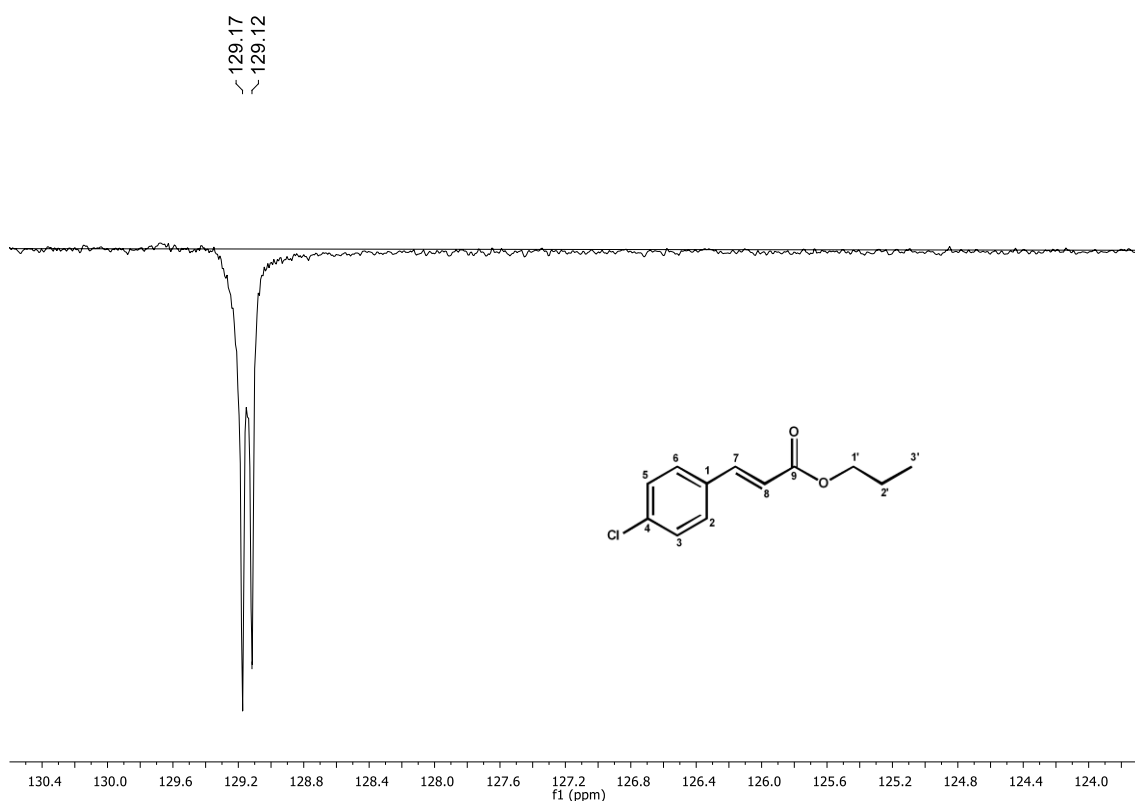
Espectro 13. Expansão do espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de propila (RH-03) (CDCl₃, 200 MHz).



Espectro 14. Expansão do espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de propila (**RH-03**) (CDCl₃, 200 MHz).

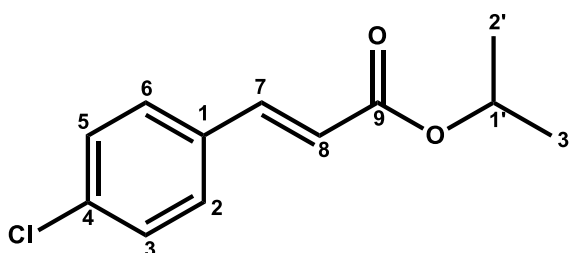


Espectro 15. Espectro de RMN ¹³C-APT de 4-clorocinamato de propila (**RH-03**), (CDCl₃, 50 MHz).



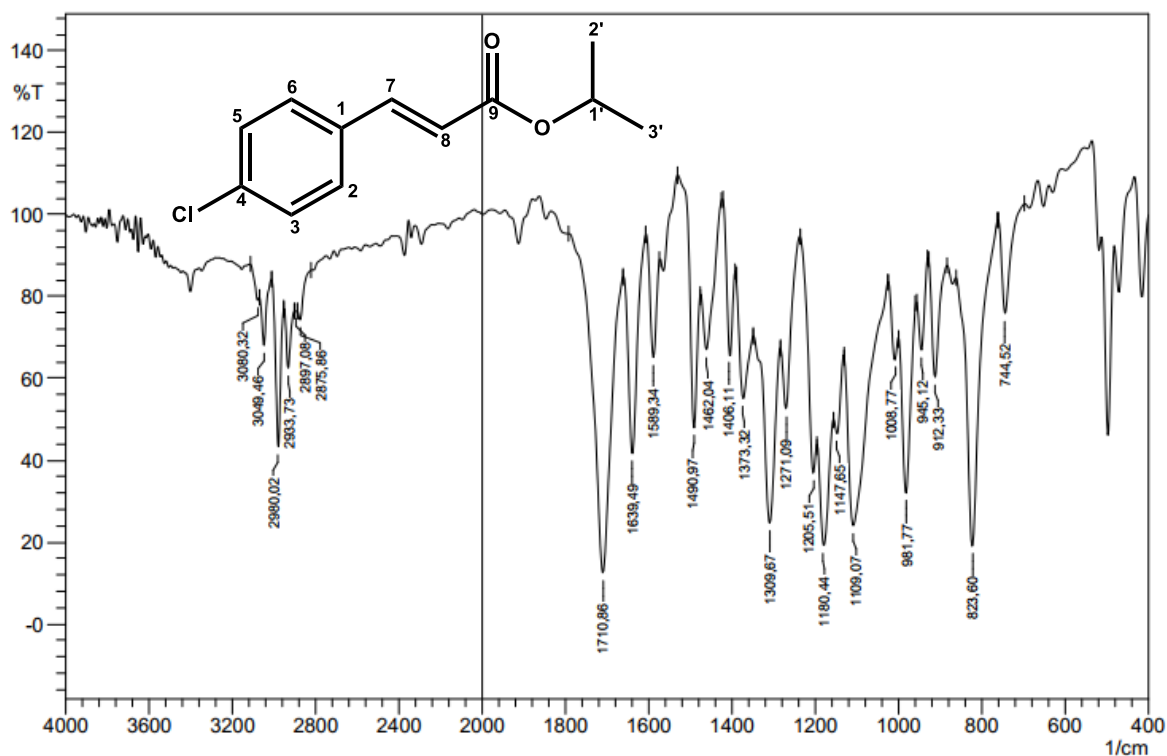
Espectro 16. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de propila (**RH-03**), (CDCl_3 , 50 MHz).

8.1.1.4 RH – 04 (4-clorocinamato de isopropila)

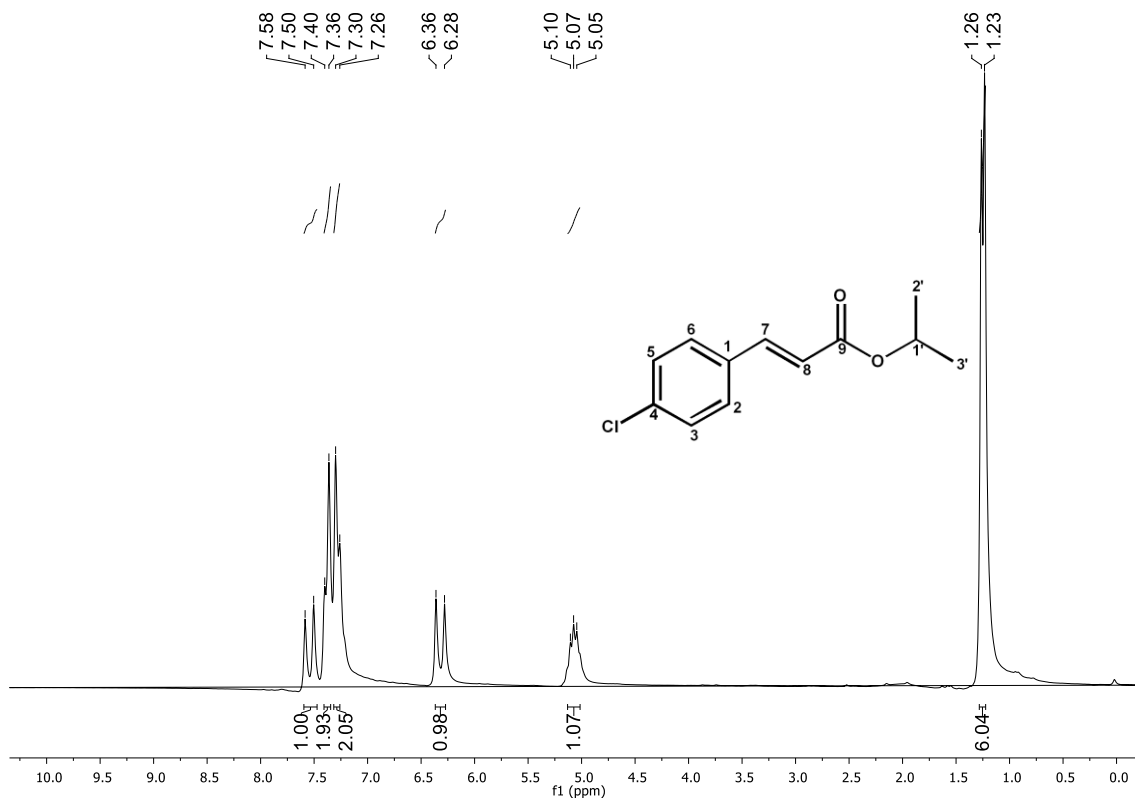


Sólido amarelo; rendimento 91,2% (112,4 mg); P.F.: 34 – 35 °C;

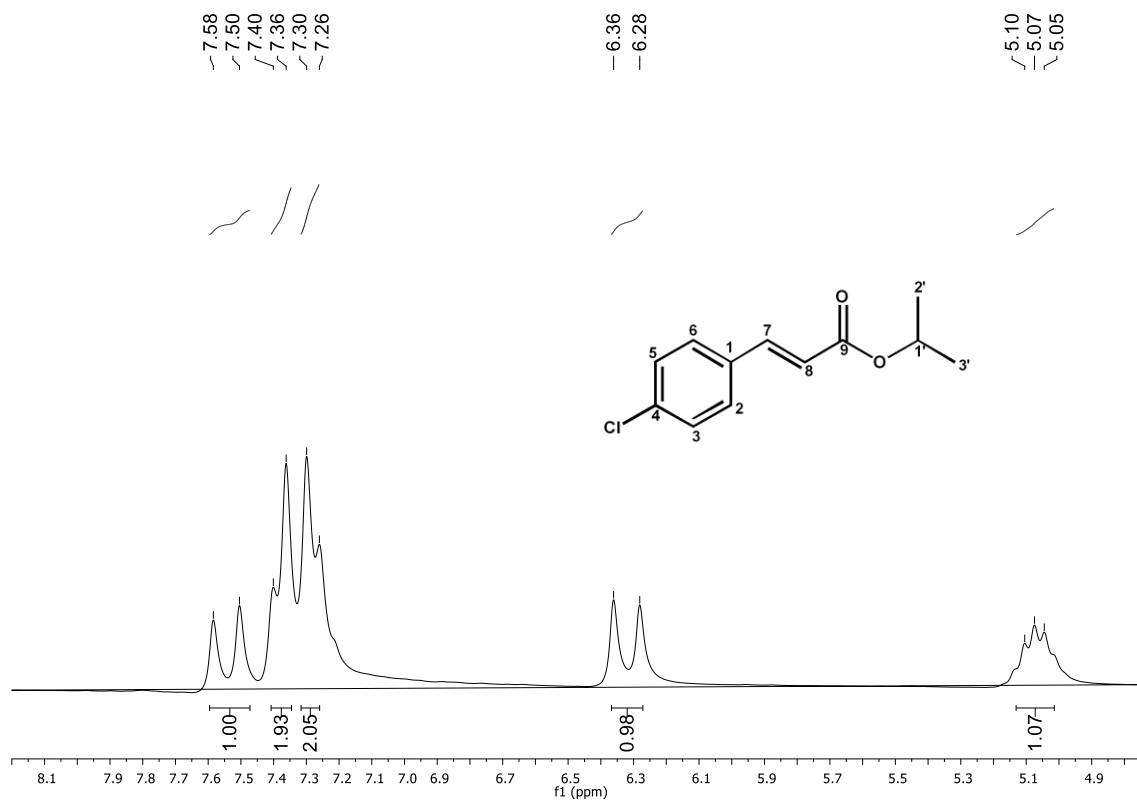
IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3049 (C-H sp^2), 2980 (C-H sp^3), 1710 (C=O), 1639 e 1462 (C=C aromático), 1309 e 1109 (estiramento C-O), 1008; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,54 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,36 (*d*, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,30 (*d*, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-3, H-5), 6,32 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 5,07 (*m*, 1H, H-1'), 1,25 (*d*, $J = 5,8$ Hz, 6H, H-2', H-3'); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,2 (C=O); 142,8 (C-7); 135,9 (C-4); 131,0 (C-1); 129,2 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 119,3 (C-8); 67,9 (C-1'); 22,1 (C-2', C-3') (DEKA E PAUL, 2006; LEINO et al., 2016).



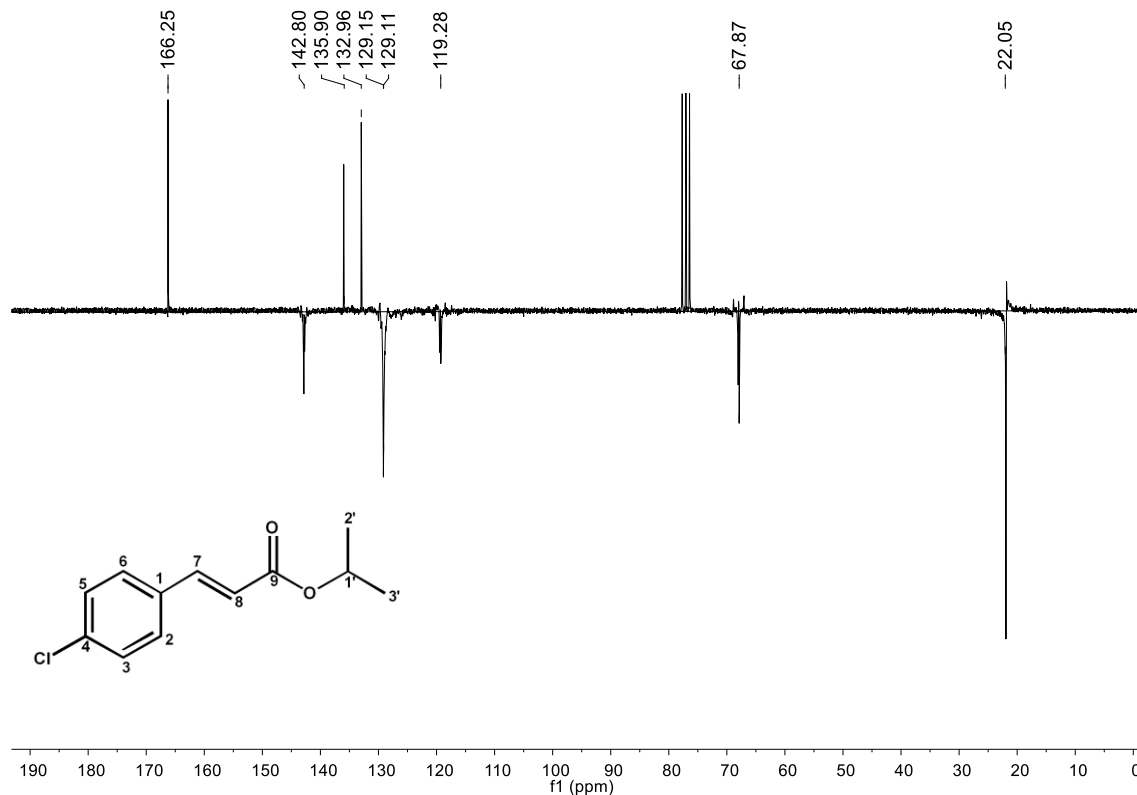
Espectro 17. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de isopropila (**RH-04**).



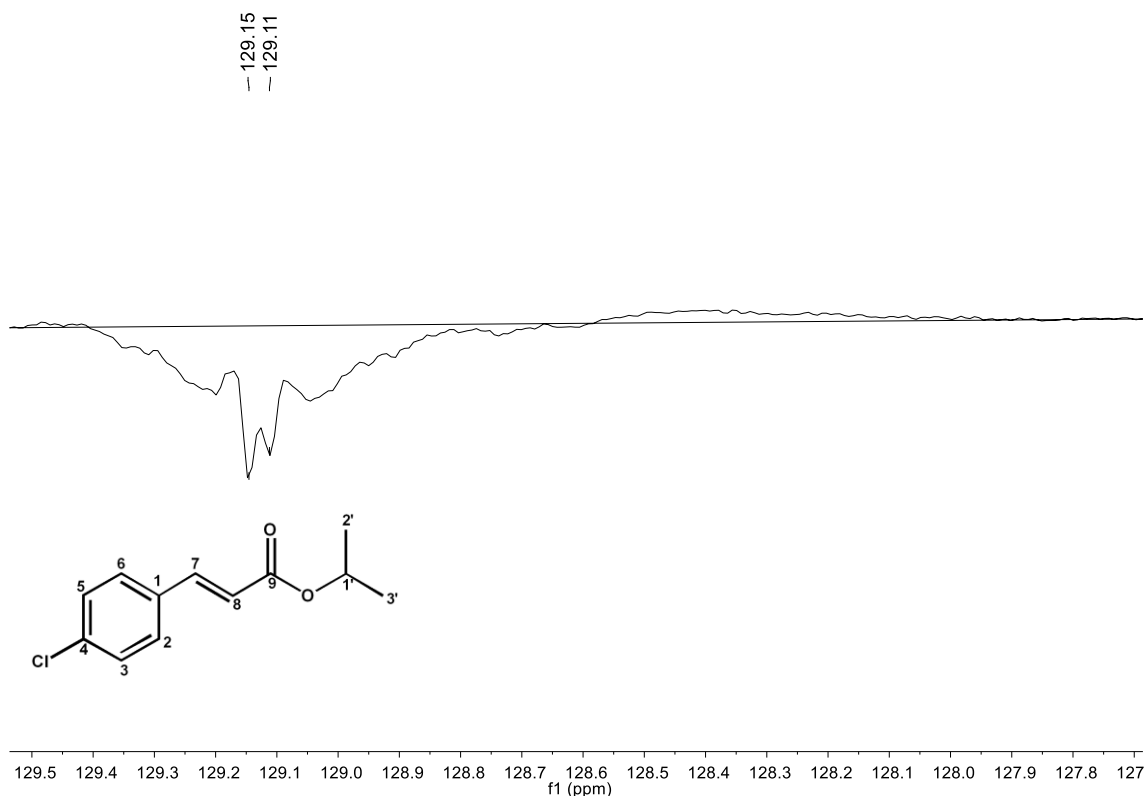
Espectro 18. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de isopropila (**RH-04**) (CDCl_3 , 200 MHz).



Espectro 19. Expansão do espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de isopropila (**RH-04**) (CDCl₃, 200 MHz).

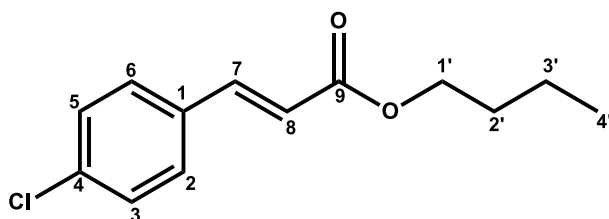


Espectro 20. Espectro de RMN ¹³C-APT de 4-clorocinamato de isopropila (**RH-04**), (CDCl₃, 50 MHz).

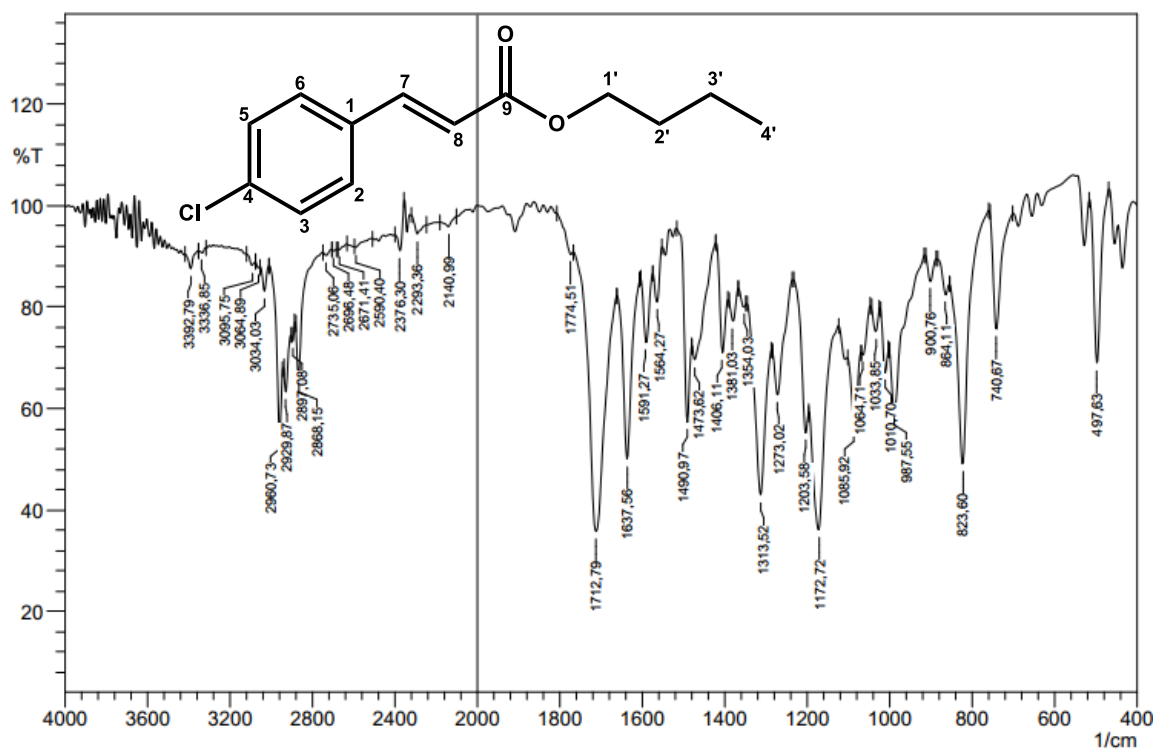


Espectro 21. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de isopropila (**RH-04**), (CDCl_3 , 50 MHz).

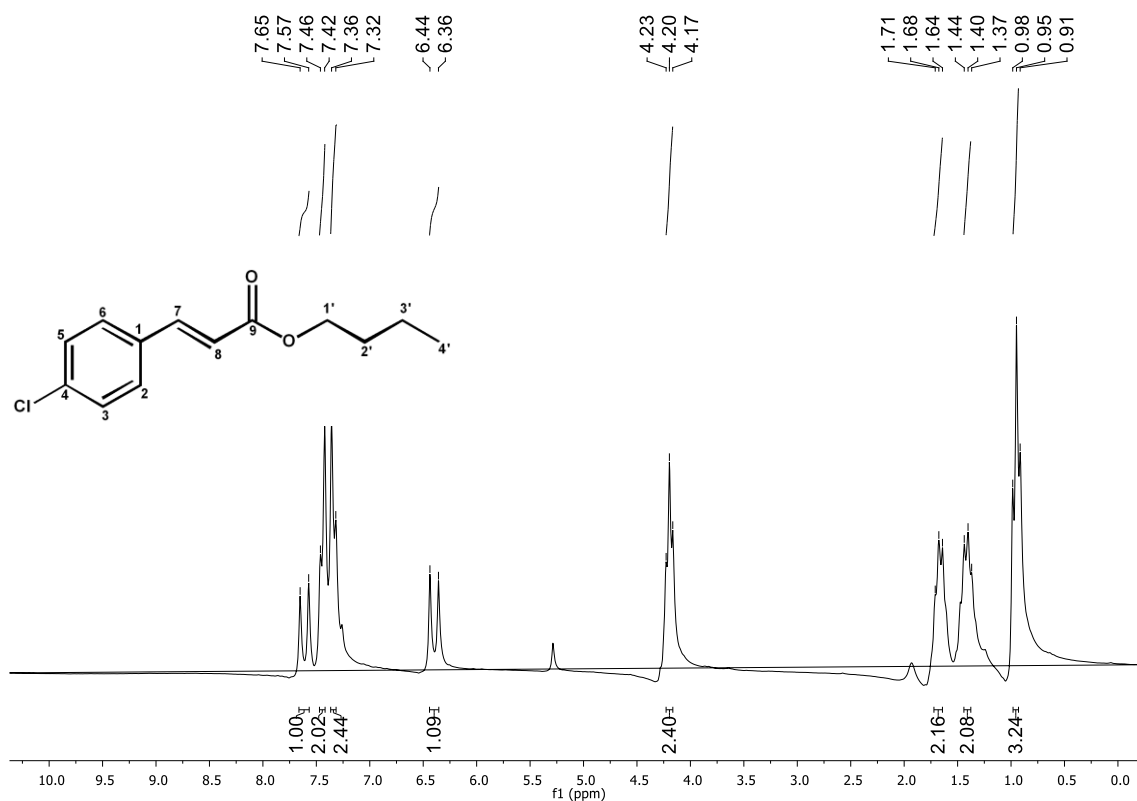
8.1.1.5. RH-05 (4-clorocinamato de butila)



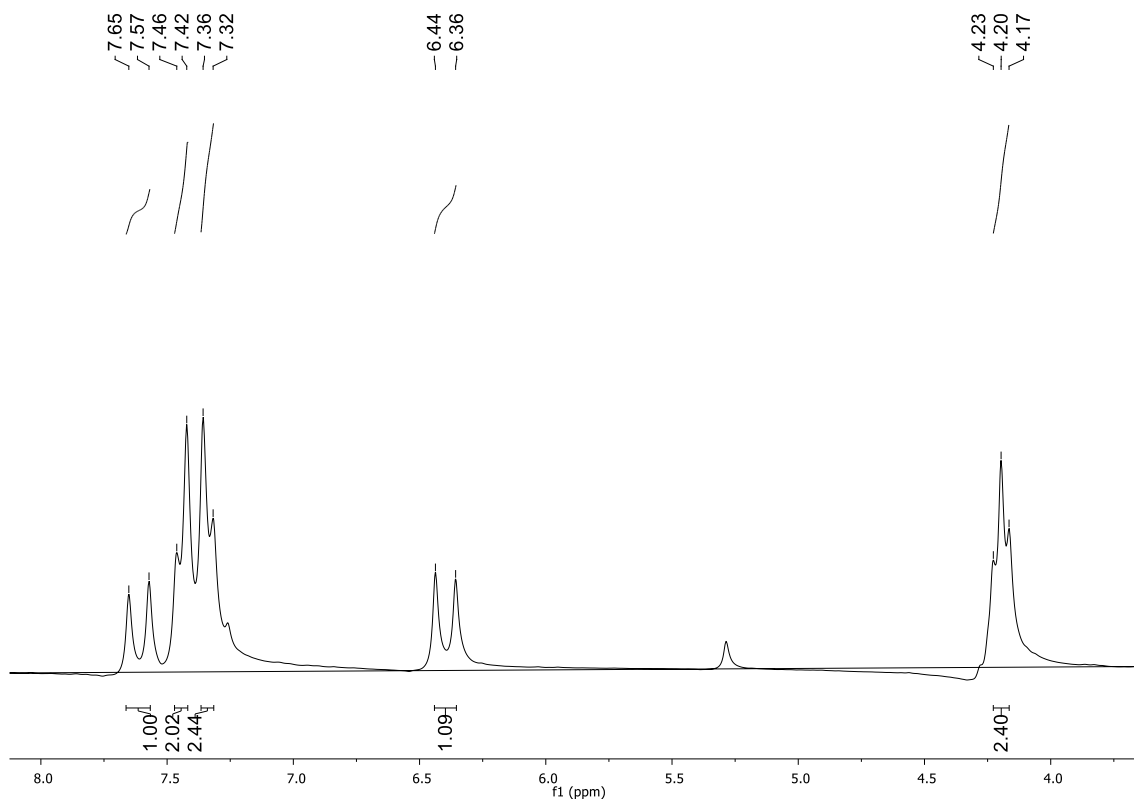
Sólido amorfo marrom; rendimento 87,4% (115,3 mg);); P.F.: 30 - 32 °C;
 IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3034 (C-H sp^2), 2960 (C-H sp^3), 1712 (C=O), 1637 e 1473 (C=C aromático), 1313 e 1172 (estiramento C-O), 1010; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,61 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,44 (*d*, $J = 7,9$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,34 (*d*, $J = 7,9$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,40 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 4,20 (*t*, $J = 6,2$ Hz, 2H, H-1'); 1,69 (*quint*, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-2'); 1,42 (*sex*, $J = 7,1$ Hz, 2H, H-3'); 0,95 (*t*, $J = 7,0$ Hz, 3H, H-4'); RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,8 (C=O); 143,1 (C-7); 136,0 (C-4); 132,9 (C-1); 129,2 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 118,8 (C-8); 64,5 (C-1'); 30,7 (C-2'); 19,2 (C-3'); 13,7 (C-4') (UWAI et al., 2008; LEINO et al., 2016).



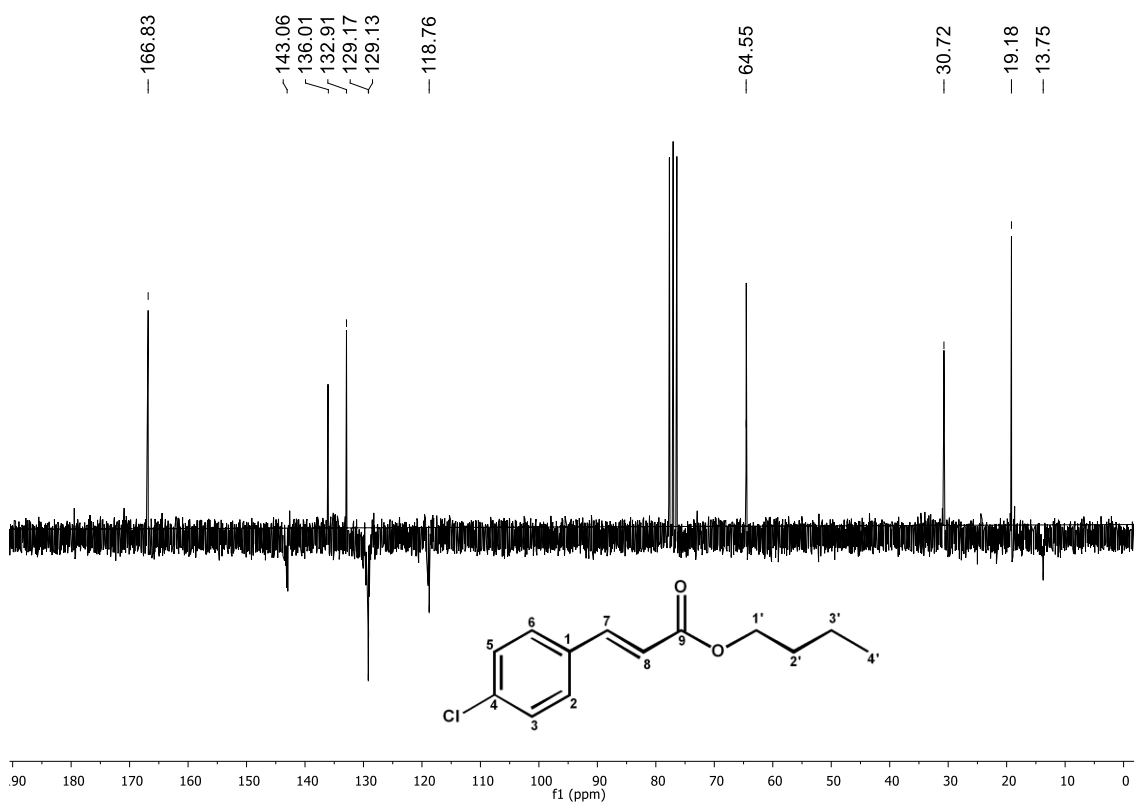
Espectro 22. Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de 4-clorocinamato de butila (RH-05).



Espectro 23. Espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de butila (RH-05) (CDCl₃, 200 MHz).

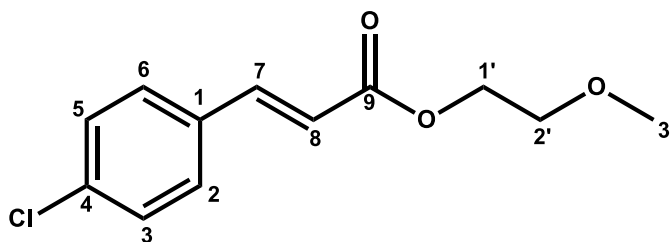


Espectro 24. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de butila (**RH-05**) (CDCl_3 , 200 MHz).



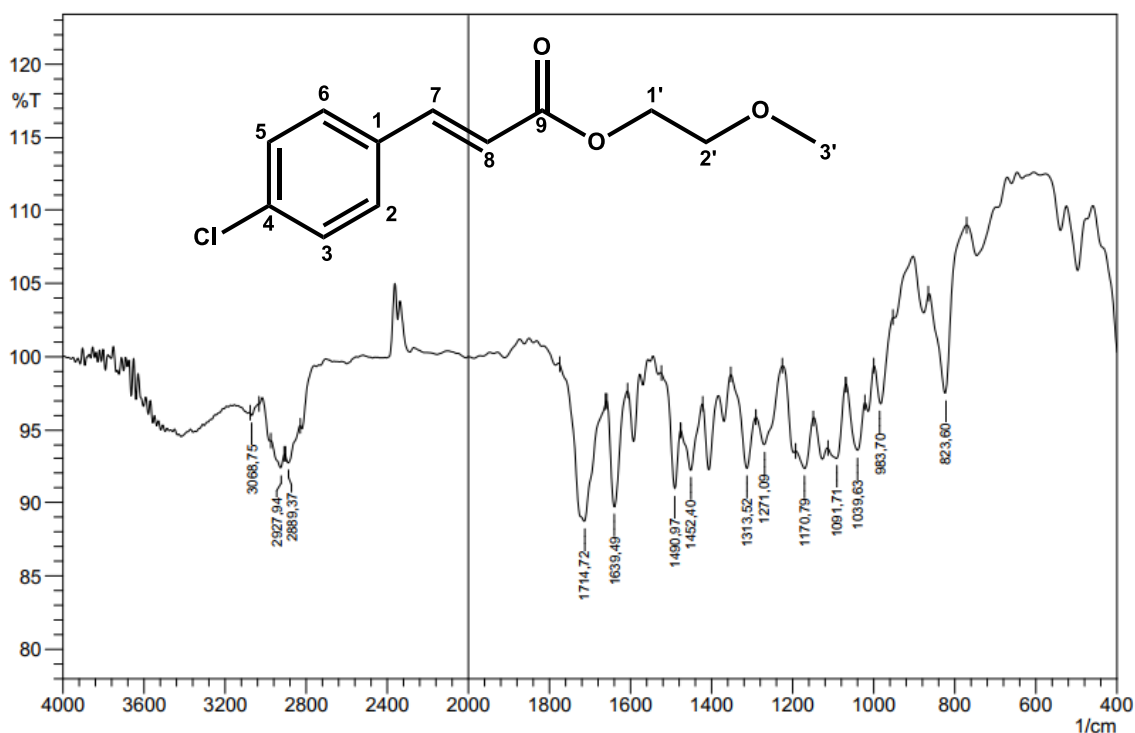
Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de butila (**RH-05**), (CDCl_3 , 50 MHz).

8.1.1.6 RH-06 (4-clorocinamato de 2-metoxietila)

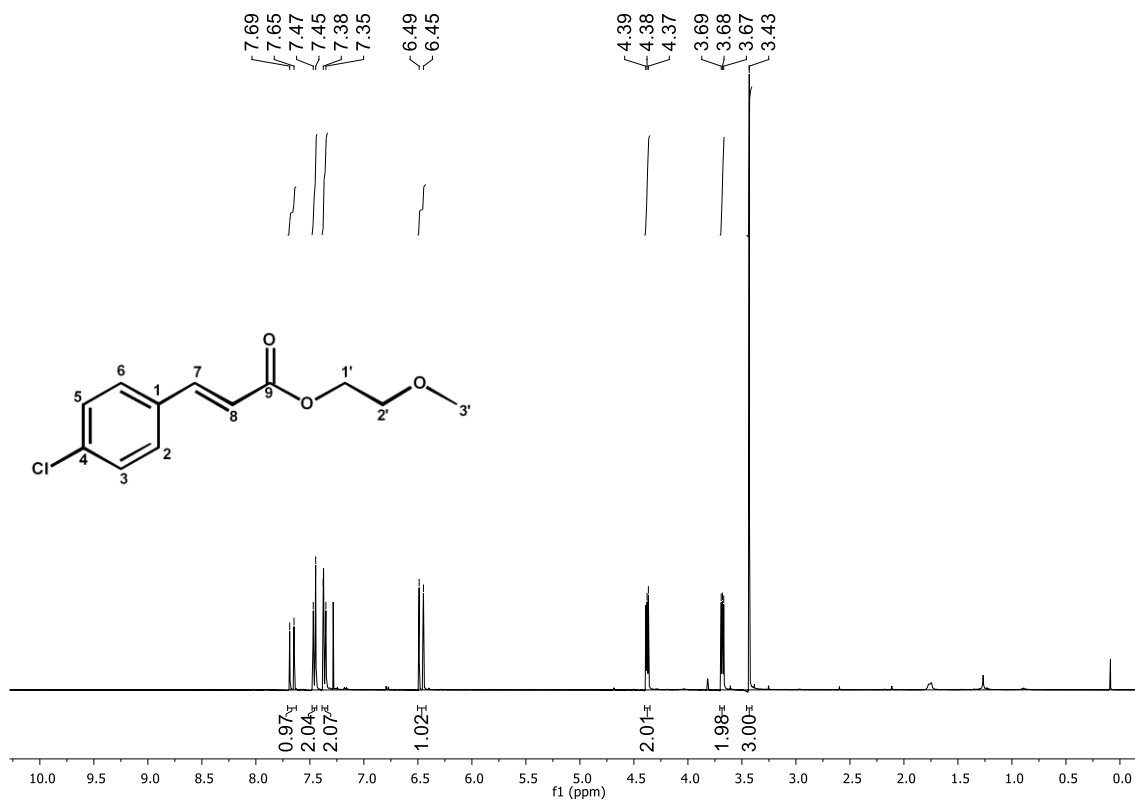


Óleo amarelo; rendimento 36,0% (47,6 mg);

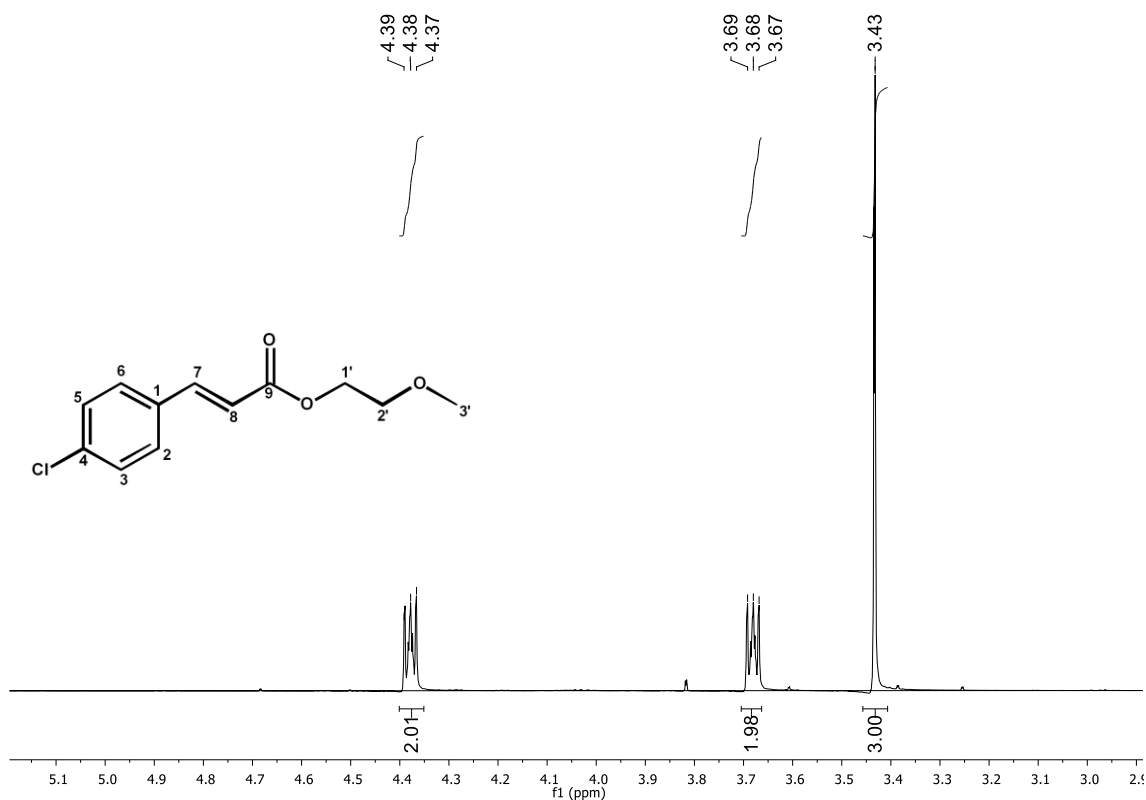
IV_{max} (KBr, cm^{-1}): 3068 (C-H sp^2), 2927 (C-H sp^3), 1714 (C=O), 1639 e 1452 (C=C aromático), 1313 e 1170 (estiramento C-O), 1039; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,67 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,46 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,36 (d, $J = 9,7$ Hz, 2H, H-3, H-5), 6,47 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 4,38 (t, d, $J = 5,4$, 2H, H-1'); 3,68 (t, d, $J = 4,7$, 2H, H-2'); 3,43 (s, 3H, H-3'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,8 (C=O); 143,8 (C-7); 136,3 (C-4); 133,0 (C-1); 129,4 (C-2, C-6); 129,3 (C-3, C-5); 118,5 (C-8); 70,64 (C-1'); 63,7 (C-2'); 59,1 (C-3') (XIAO et al., 2013; LEINO et al., 2016); EMAR (MALDI) calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClO}_3$ [M + Na]: 263,6722; Encontrada: 263,6333.



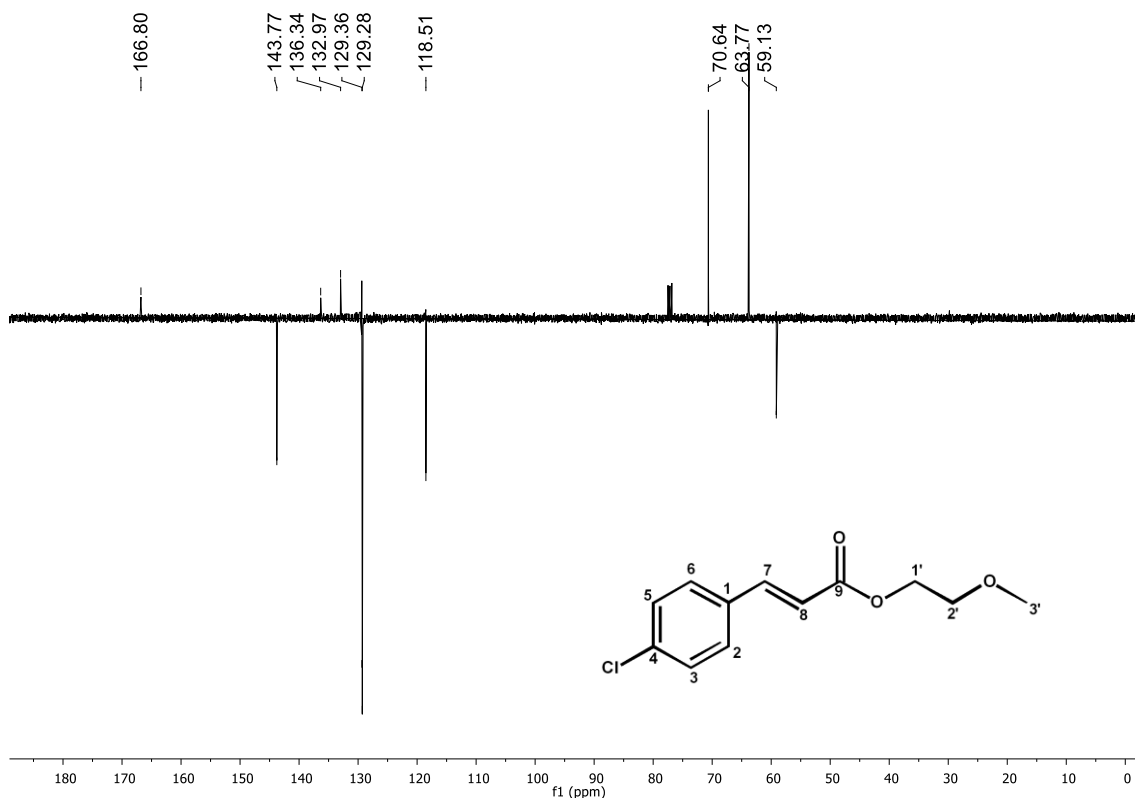
Espectro 26. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de 2-metoxietila (RH-06).



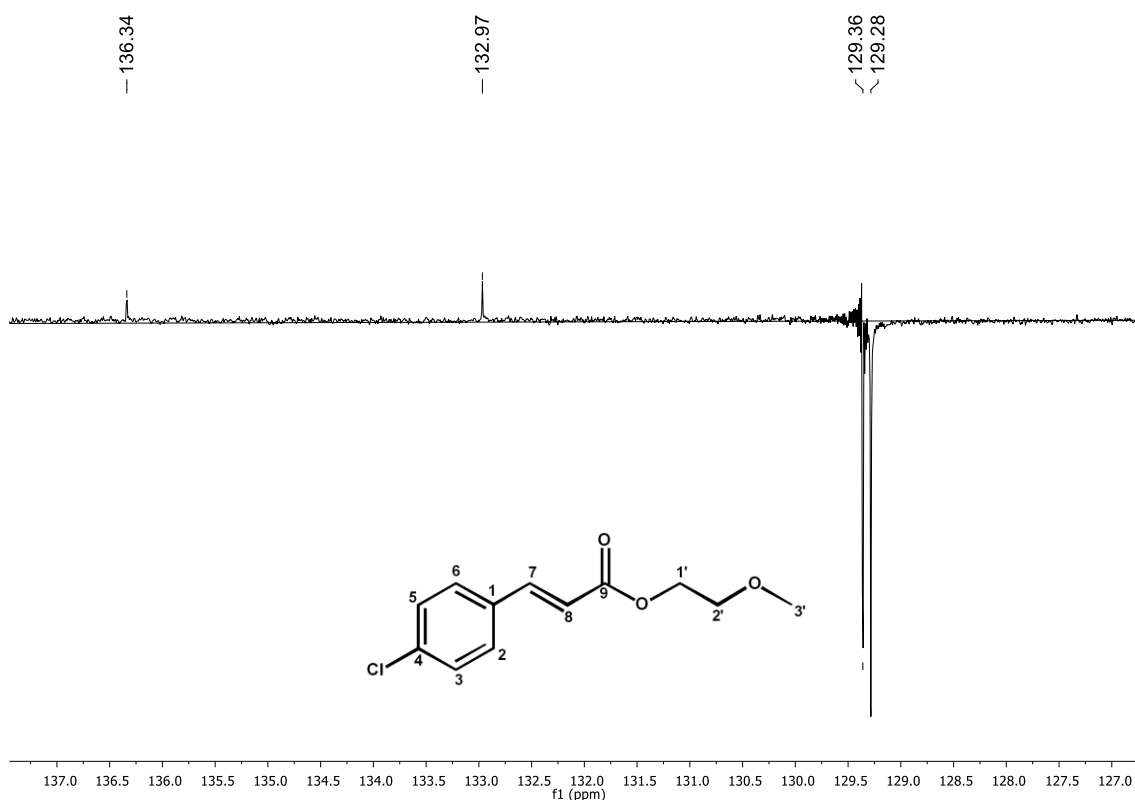
Espectro 27. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de 2-metoxietila (**RH-06**) (CDCl_3 , 400 MHz).



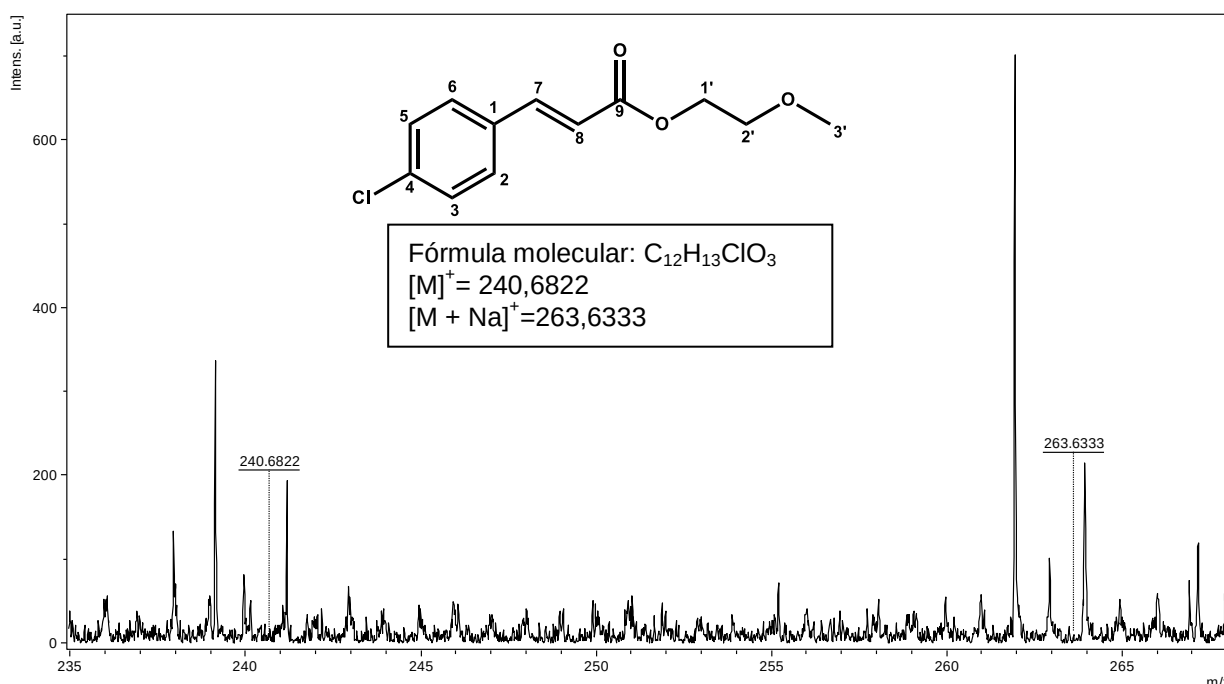
Espectro 28. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de 2-metoxietila (**RH-06**) (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 29. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 2-metoxietila (RH-06), (CDCl_3 , 100 MHz).

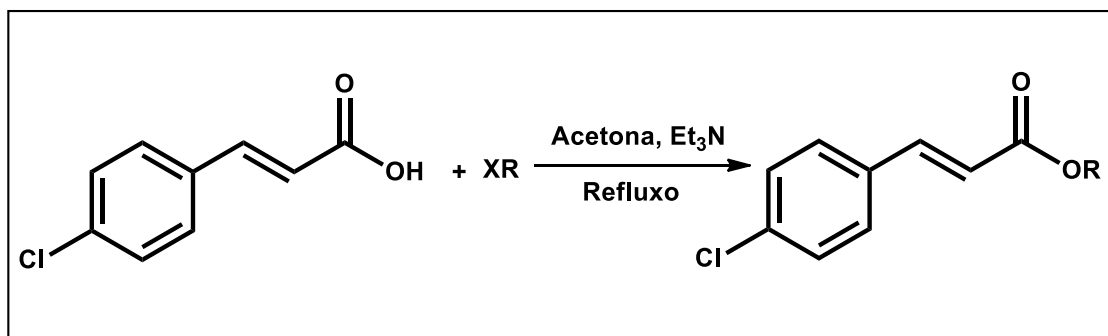


Espectro 30. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 2-metoxietila (RH-06), (CDCl_3 , 100 MHz).



Espectro 31. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de 4-clorocinamato de 2-metoxietila (RH-06).

8.2. Preparação dos ésteres RH-07 – RH-10

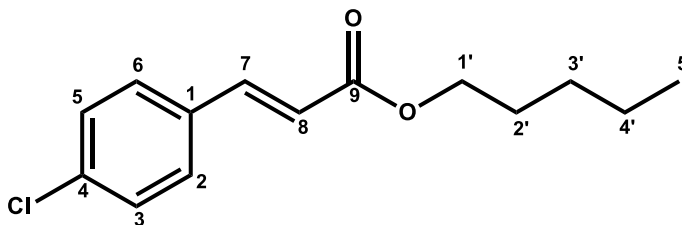


Em um balão de 100 mL, o ácido 4-clorocinâmico (0,1 g; 0,547 mmol), foi dissolvido em 14 mL de acetona anidra. À esta solução foi adicionada 0,3 mL de trietilamina (2,188 mmol) e o haleto (0,563 mmol). Em seguida, o balão foi acoplado a um condensador de refluxo e colocado em banho de óleo. A mistura reacional foi mantida sob refluxo com agitação magnética, durante 24-48 horas, até o consumo do material de partida, e monitorada por CCDA. Após a formação do produto, o solvente foi parcialmente evaporado em rotaevaporador. O produto reacional foi transferido a um funil de separação, e adicionou-se 15 mL de água destilada e seguida da extração com (3 x 10 mL) de diclorometano. As fases orgânicas foram

reunidas, tratadas com 10 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 5%, lavada com 10 mL de água destilada, e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Logo após foi realizada a filtração e evaporado o solvente com auxílio do rotaevaporador. O resíduo foi purificado por meio de coluna cromatográfica em sílica gel 60, utilizando como eluentes o hexano e o acetato de etila, em gradiente crescente de polaridade (BOECK et al., 2005; LI et al., 2012).

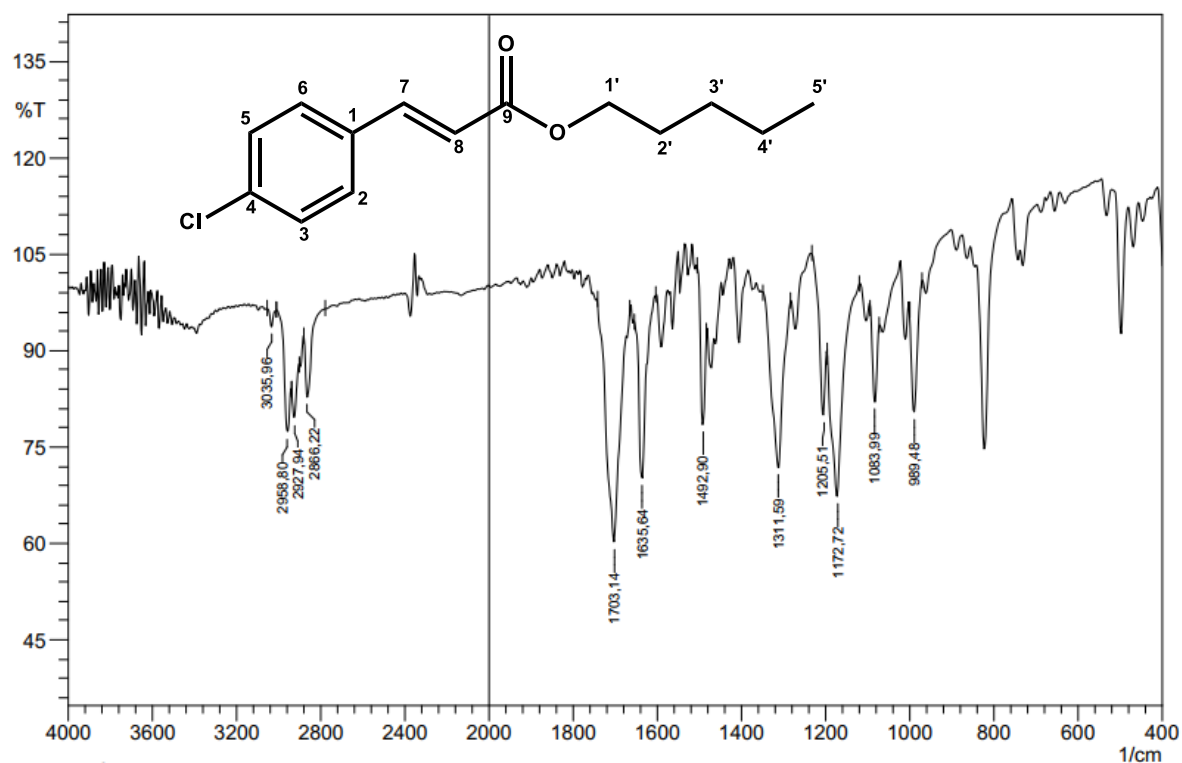
8.2.1. Dados espectroscópicos dos ésteres RH-07- RH-10

8.2.1.1 RH-07 (4-clorocinamato de pentila)

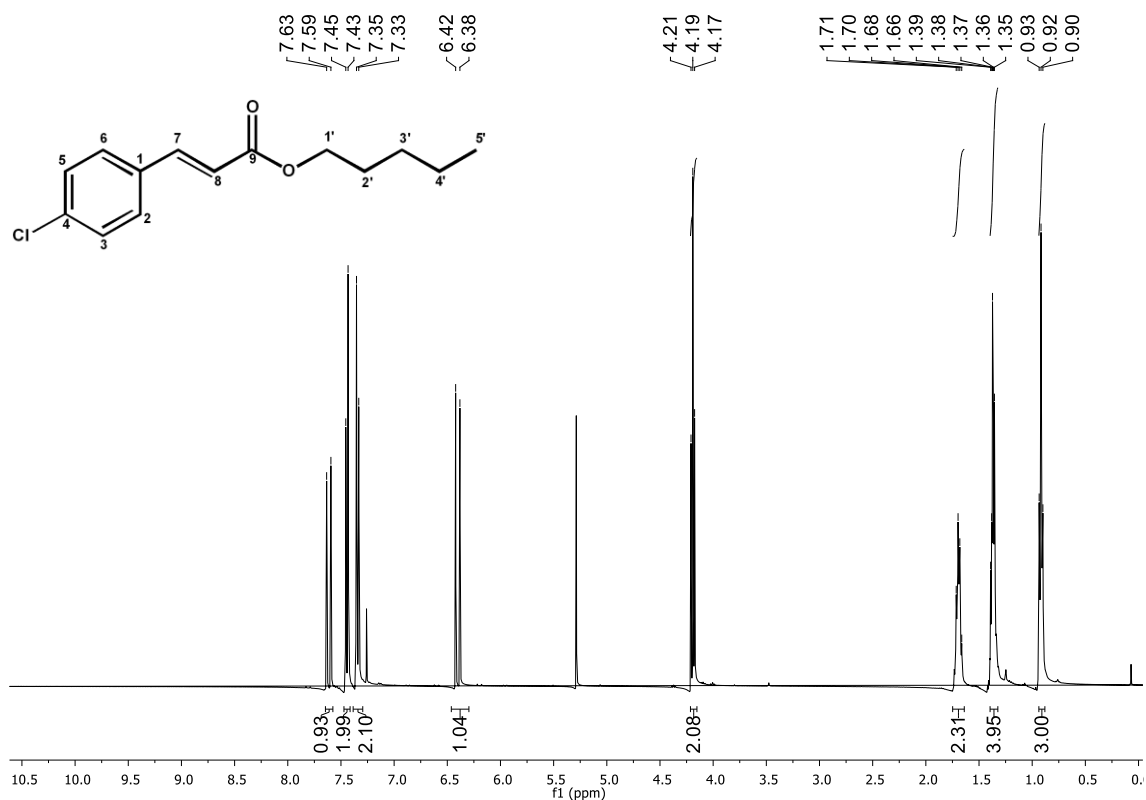


Sólido amorfo branco; rendimento 55,6% (77 mg); P.F.: 38 – 39 °C;

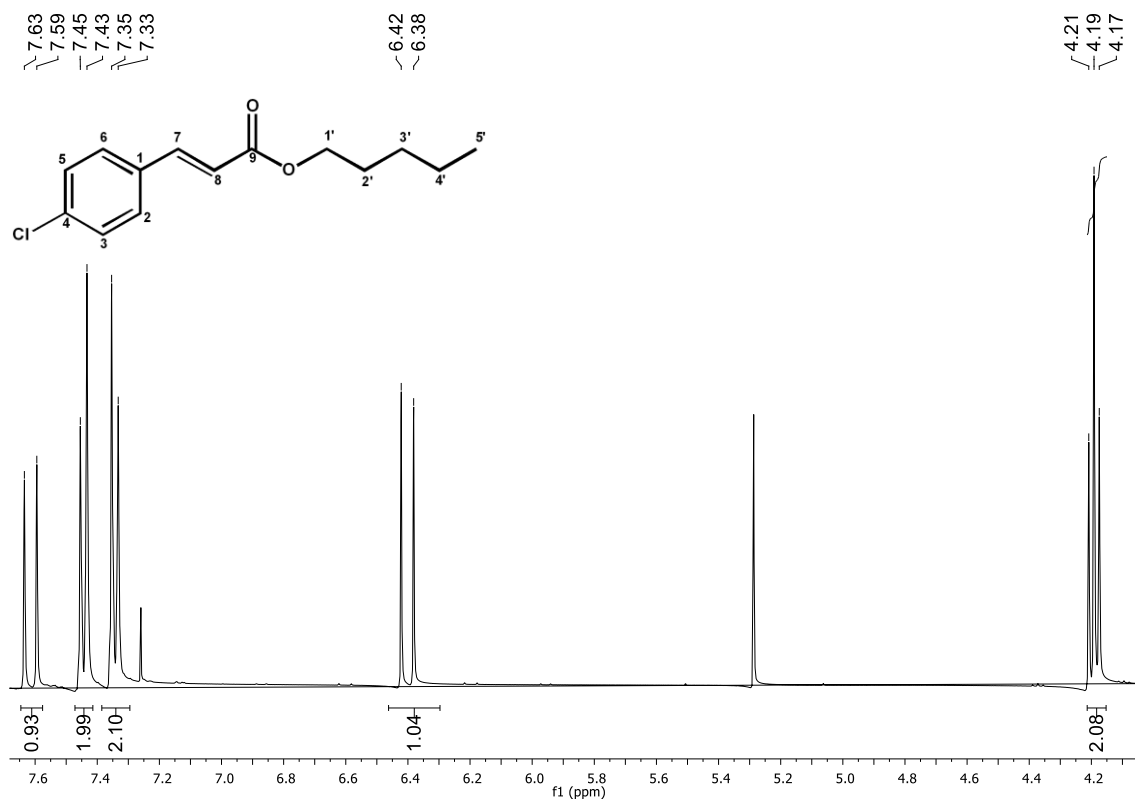
IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3035 (C-H sp^2), 2958 (C-H sp^3), 1703 (C=O), 1635 e 1492 (C=C aromático), 1311 e 1172 (estiramento C-O), 1083; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,61 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,44 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,34 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,40 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 4,19 (*t*, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-1'); 1,69 (*quint*, $J = 6,9$ Hz, 2H, H, 2'); 1,37 (*m*, 4H, H-3', H-4'), 0,92 (*t*, $J = 7,0$ Hz, 3H, H-5'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,8 (C=O); 143,1 (C-7); 136,1 (C-4); 133,0 (C-1); 129,2 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 118,9 (C-8); 63,8 (C-1'); 28,4 (C-2'); 28,1 (C-3'); 22,4 (C-4'); 14,0 (C-5') (UWAI et al., 2008; LEINO et al., 2016).



Espectro 32. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de pentila (RH-07).



Espectro 33. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de pentila (RH-07) (CDCl_3 , 400 MHz).



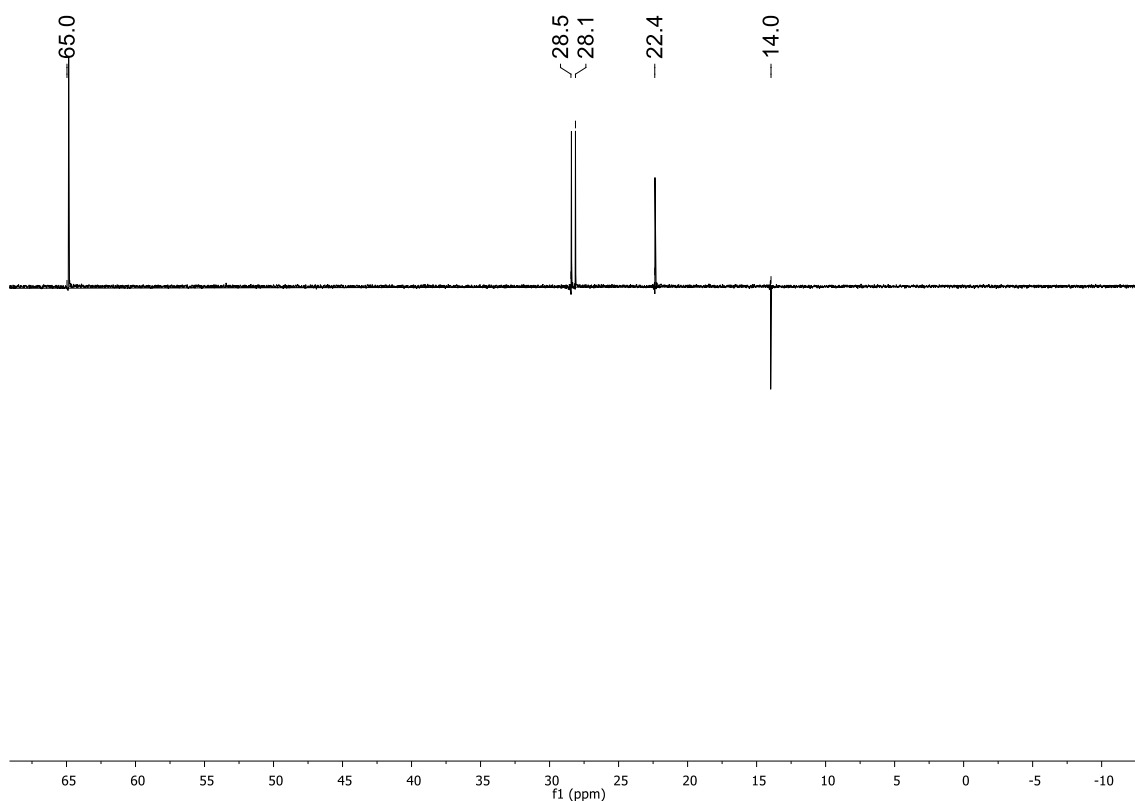
Espectro 34. Expansão do espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de pentila (RH-07) (CDCl₃, 400 MHz).



Espectro 35. Espectro de RMN ¹³C-APT de 4-clorocinamato de pentila (RH-07), (CDCl₃, 100 MHz).

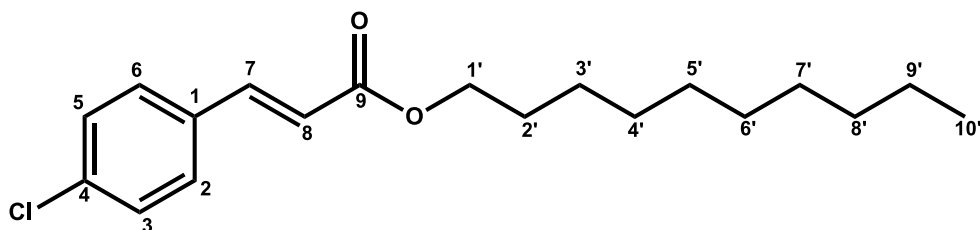


Espectro 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de pentila (RH-07), (CDCl_3 , 100 MHz).



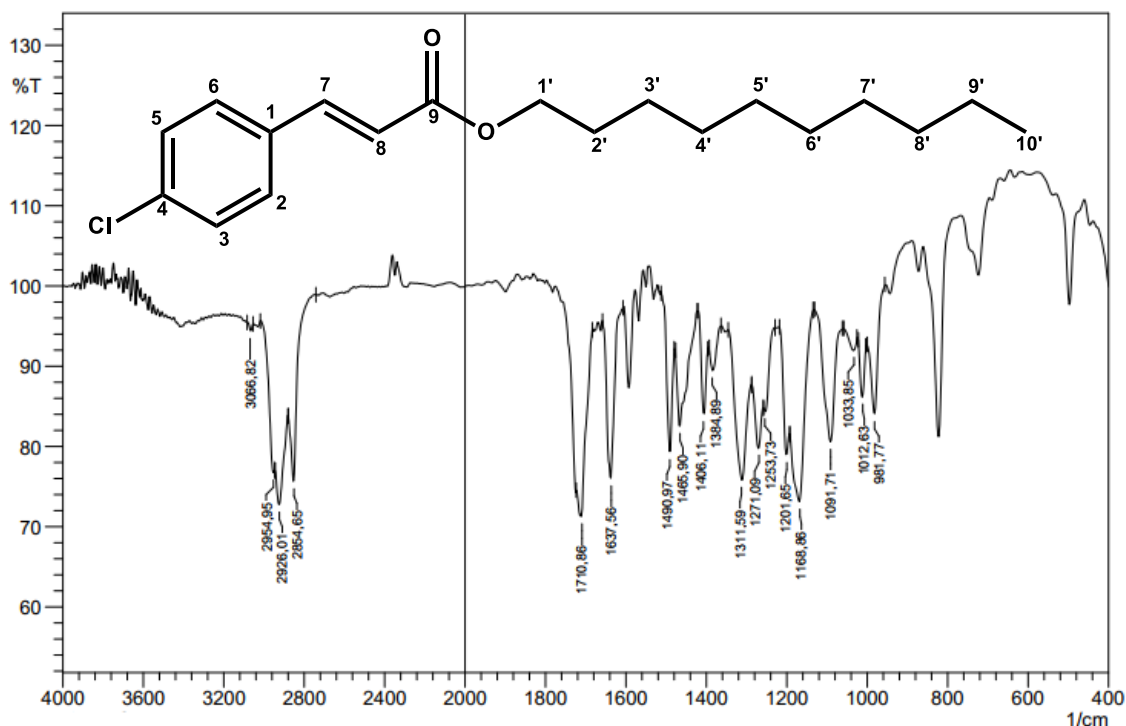
Espectro 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de pentila (RH-07), (CDCl_3 , 100 MHz).

8.2.1.2 RH-08 (4-Clorocinamato de decila)

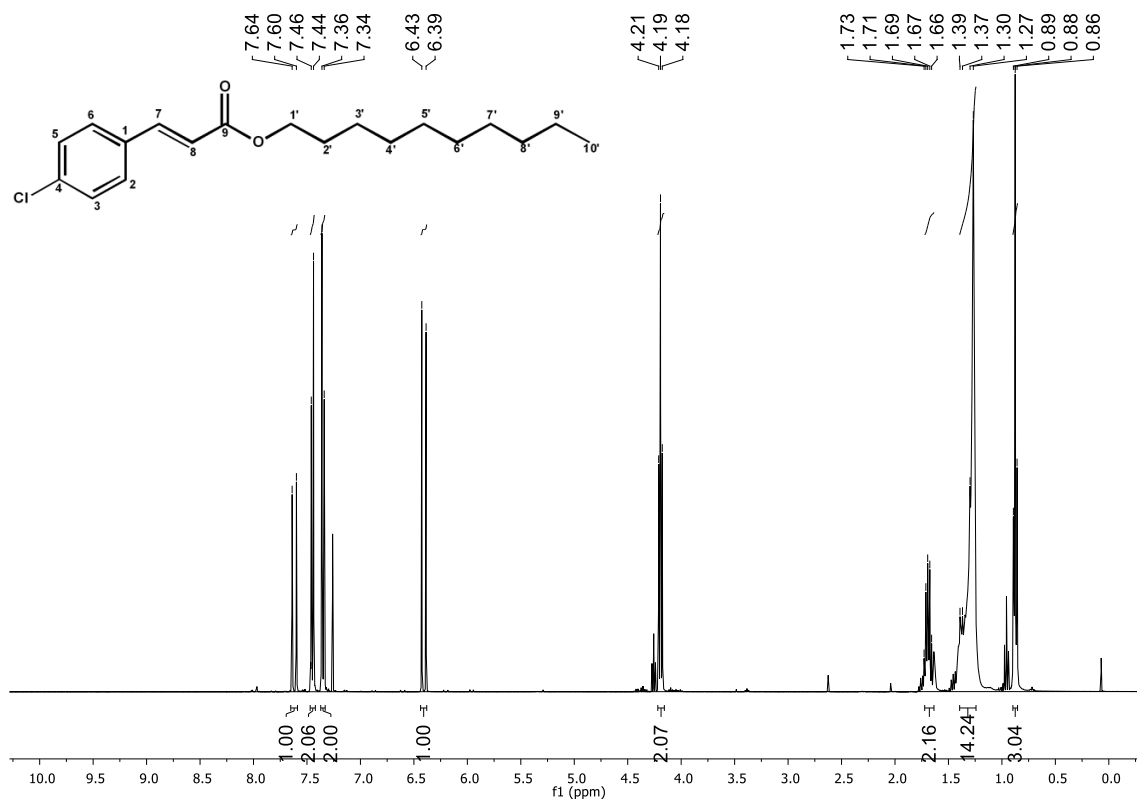


Óleo amarelado; rendimento 30,6% (54,2 mg);

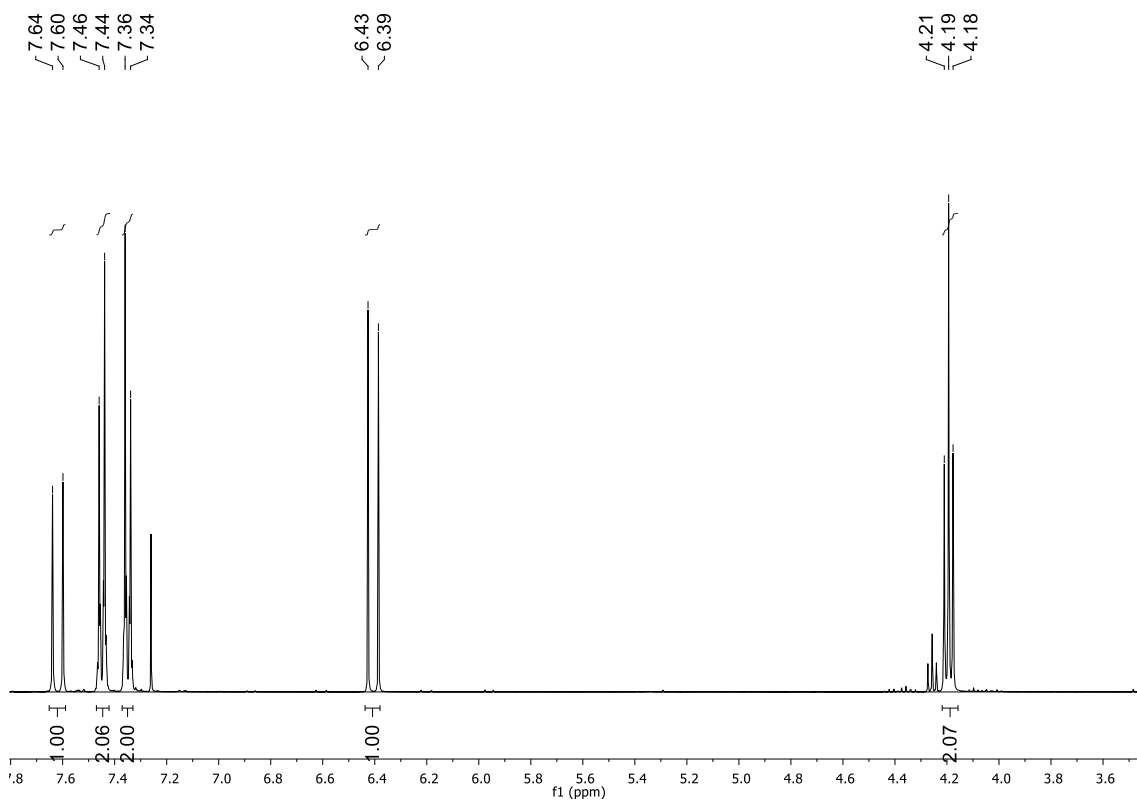
IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3066 (C-H sp^2), 2926 (C-H sp^3), 1710 (C=O), 1637 e 1465 (C=C aromático), 1311 e 1168 (estiramento C-O), 1012; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,62 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,45 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,35 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,41 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 4,19 (*t*, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-1'); 1,68 (*quint*, $J = 6,6$ Hz, 2H, H-2'), 1.40 – 1.24 (*m*, 14H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'); 0,88 (*t*, $J = 6,7$ Hz, 3H, H-10'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,9 (C=O); 143,1 (C-7); 136,0 (C-4); 133,0 (C-1); 129,2 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 118,7 (C-8); 64,8 (C-1'); 32,0 (C-2'); 29,5 (C-3'); 29,3 (C-4'); 29,2 (C-5'); 28,7 (C-6'); 26,0 (C-7'); 22,7 (C-8', C-9'); 14,0 (C-10') (UWAI et al., 2008; LEINO et al., 2016).



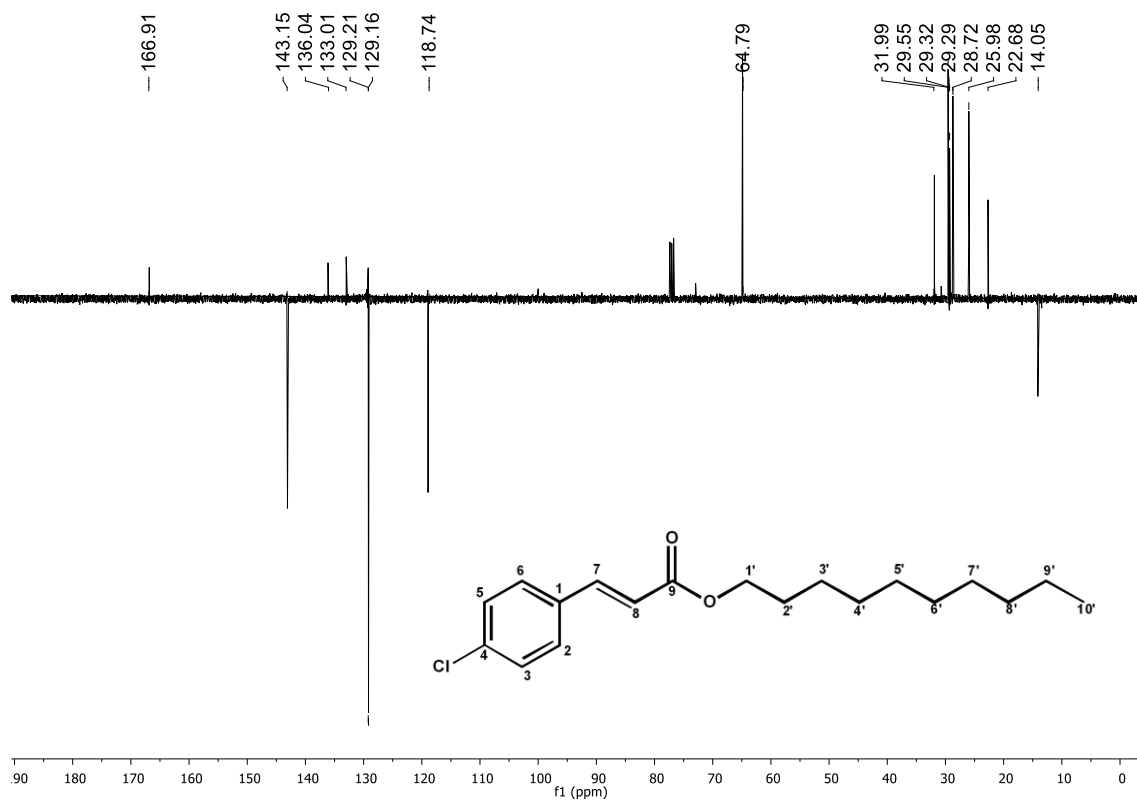
Espectro 38. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-Clorocinamato de decila (RH-08).



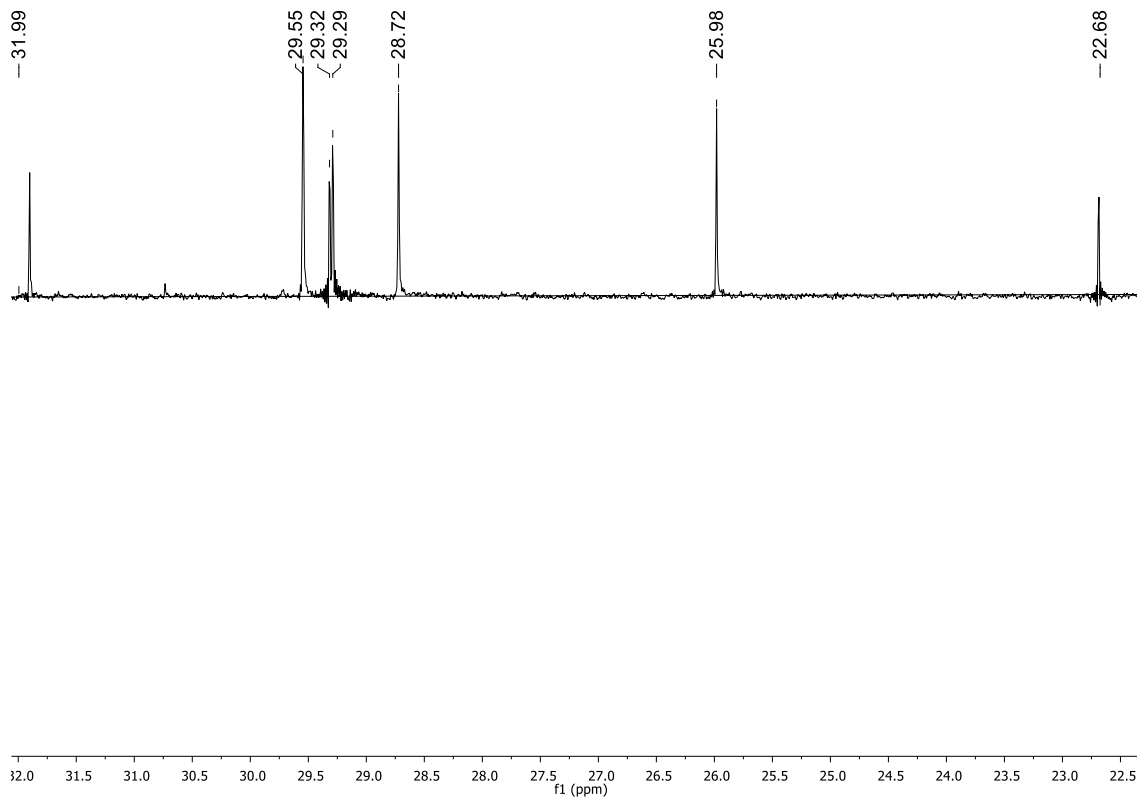
Espectro 39. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de decila (**RH-08**) (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 40. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de decila (**RH-08**) (CDCl_3 , 400 MHz).

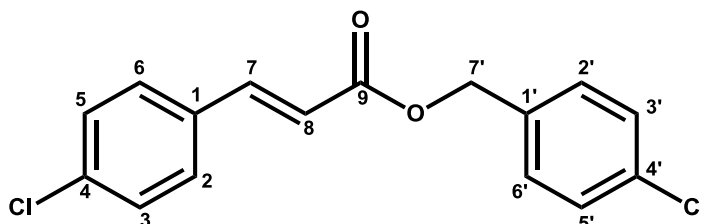


Espectro 41. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de decila (RH-08), (CDCl_3 , 100 MHz).



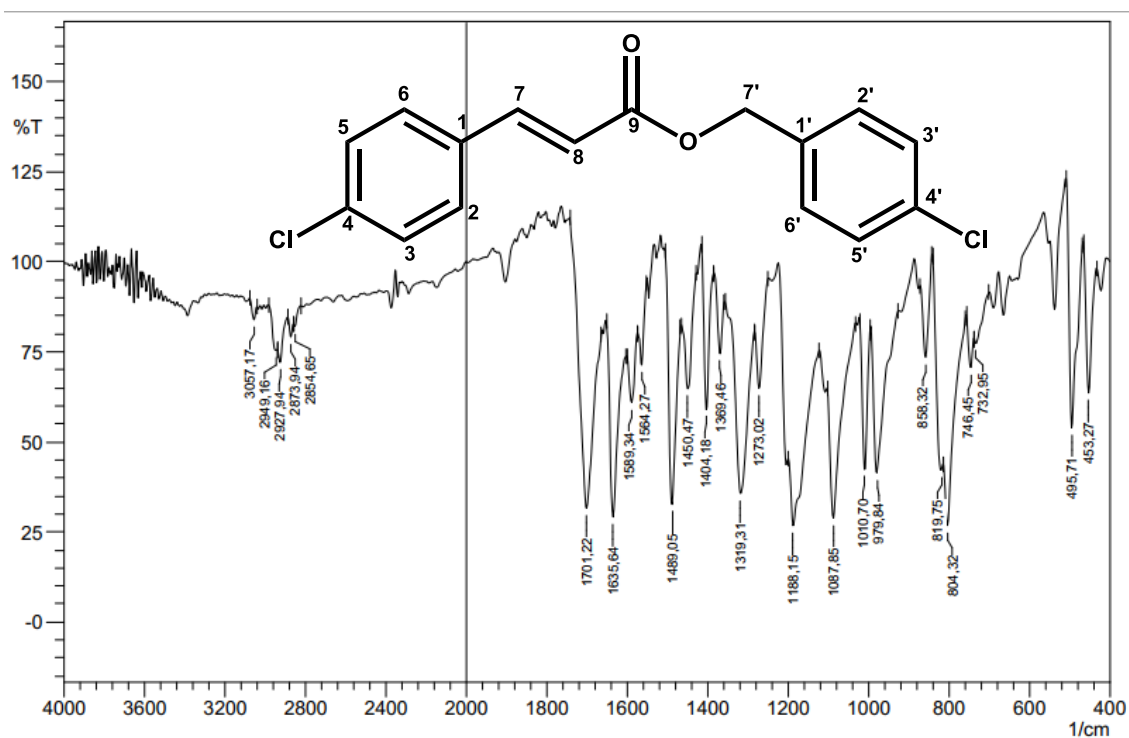
Espectro 42. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de decila (RH-08), (CDCl_3 , 100 MHz).

8.2.1.3 RH-09 (4-clorocinamato de 4'-clorobenzila)

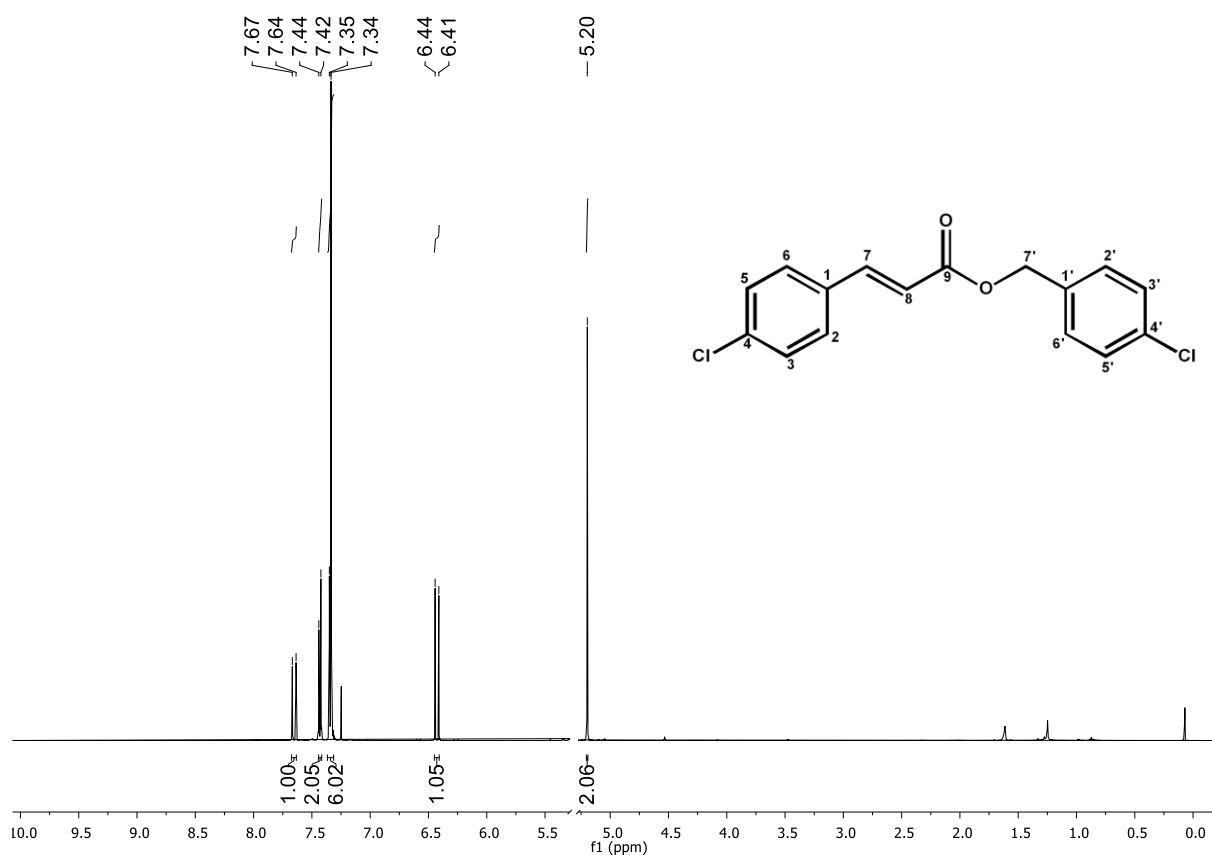


Sólido branco; rendimento 61,6% (103,5 mg); P.F.: 131 – 133 °C;

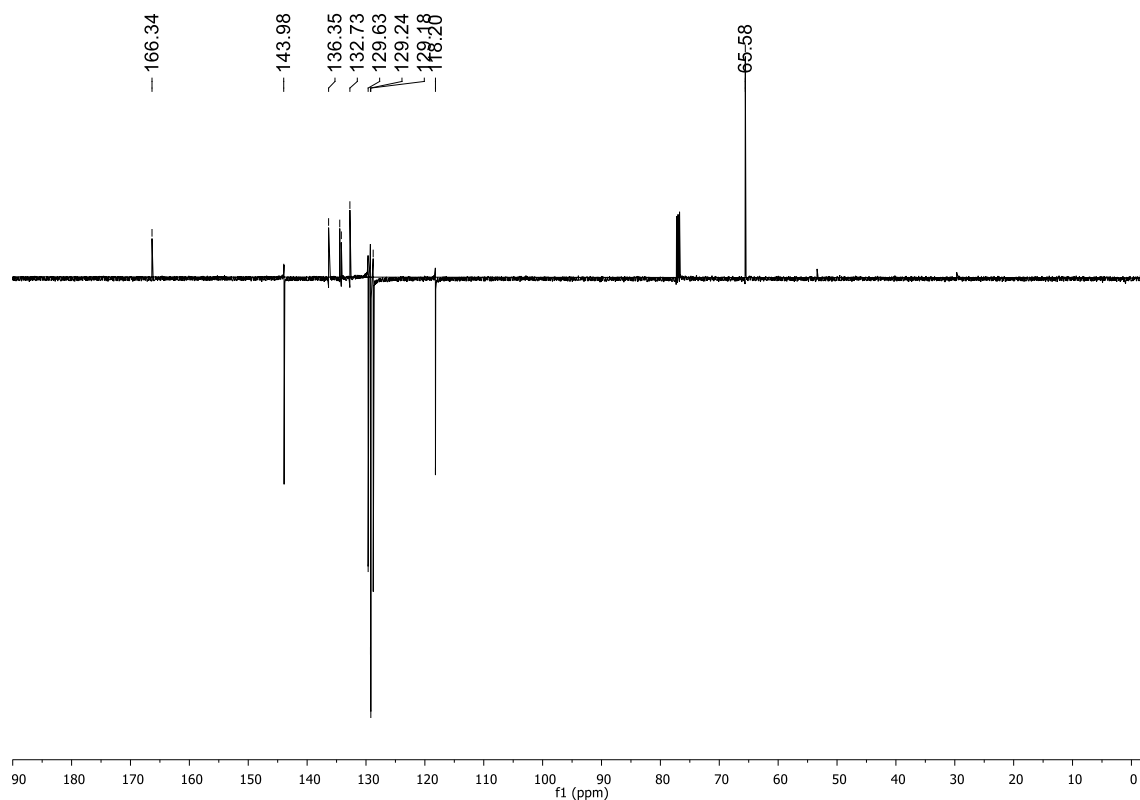
IV_{vmax} (KBr, cm^{-1}): 3057 (C-H sp^2), 2949 (C-H sp^3), 1701 (C=O), 1653 e 1450 (C=C aromático), 1273 e 1188 (estiramento C-O), 1010 (estiramento C-Cl); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,66 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,44 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7,36 (d, $J = 7,1$ Hz, 6H, H-3, H-5, H-3', H-4', H-6', H-7'); 6,44 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 5,21 (s, 2H, H-1'). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,3 (C=O); 144,0 (C-7); 136,3 (C-2'); 134,5 (C-4); 134,2 (C-1); 132,7 (C-5'); 129,6 (C-3', C-7'); 129,2 (C-2, C-6); 129,2 (C-4', C-6'); 128,8 (C-3, C-5); 118,2 (C-8); 65,6 (C-1') (ZHANG et al., 2014; LEINO et al., 2016). EMAR (MALDI) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}_2[\text{M} + \text{Na}]^+$: 330,161; encontrada 330,1609.



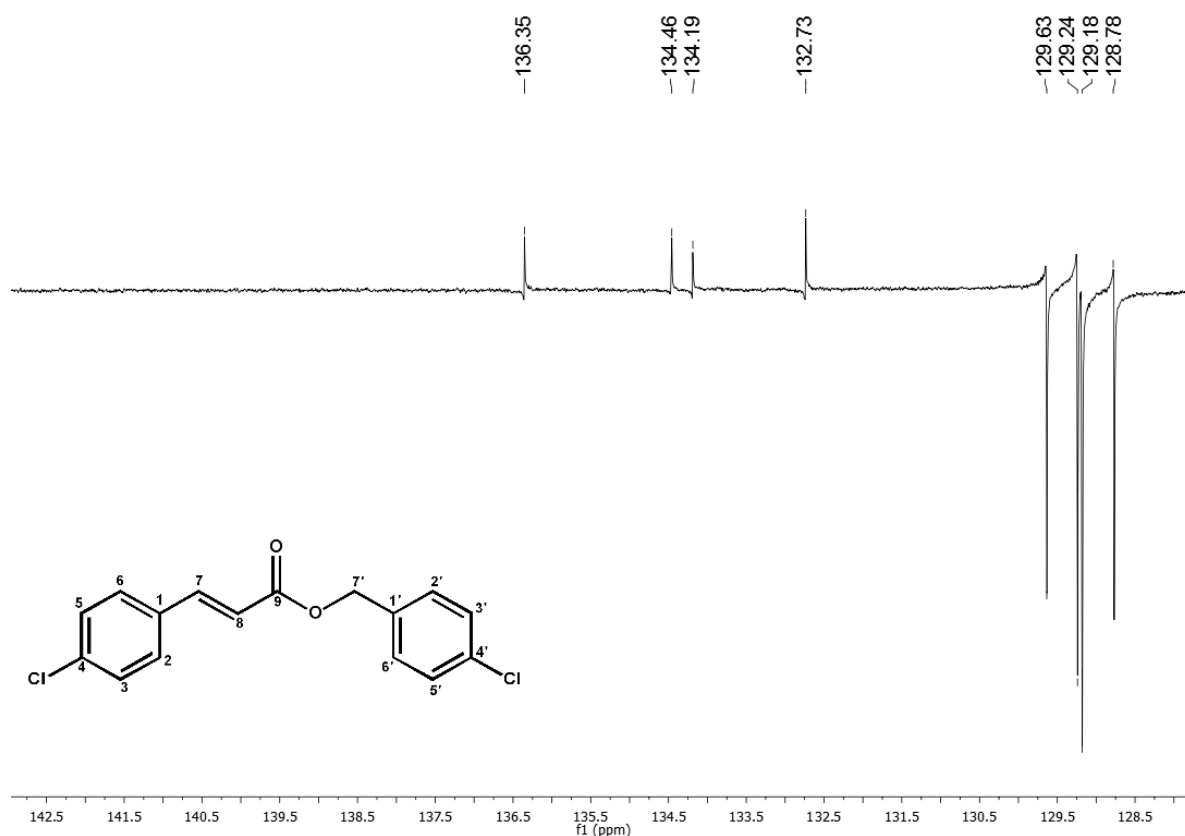
Espectro 43. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09).



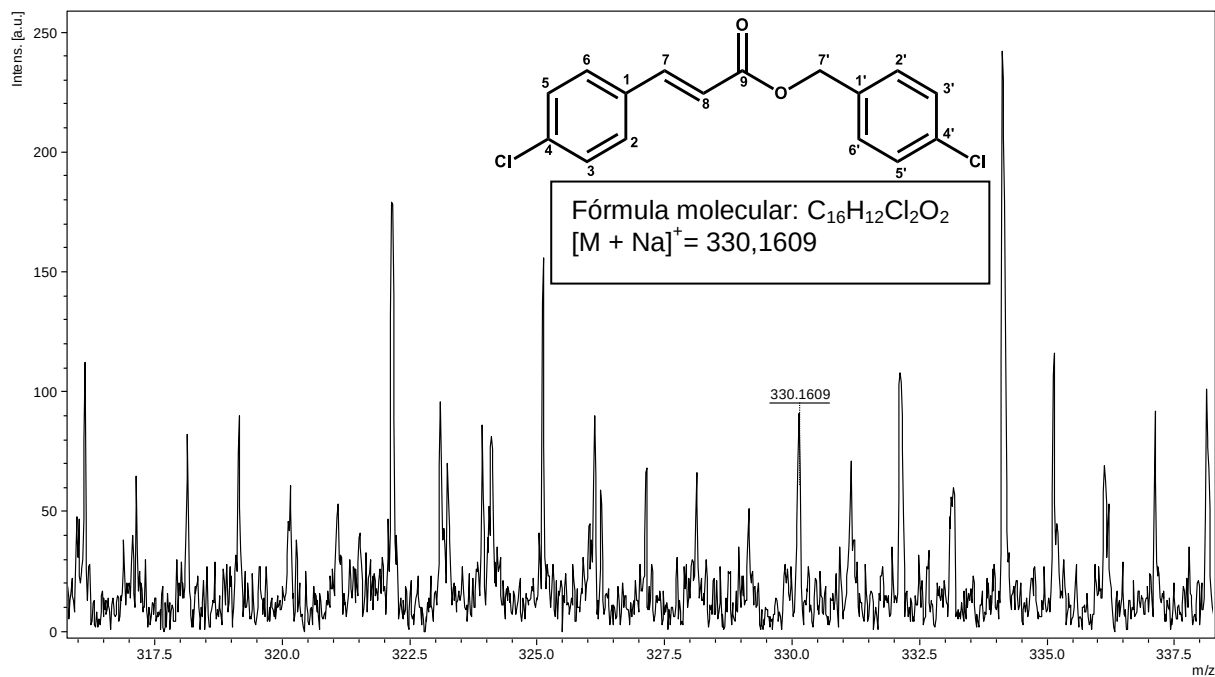
Espectro 44. Espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09) (CDCl₃, 500 MHz).



Espectro 45. Espectro de RMN ¹³C-APT de 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09), (CDCl₃, 125 MHz).

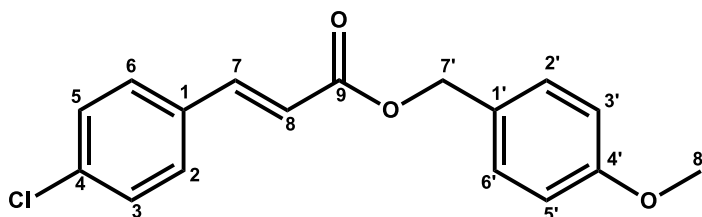


Espectro 46. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09), (CDCl_3 , 125 MHz).



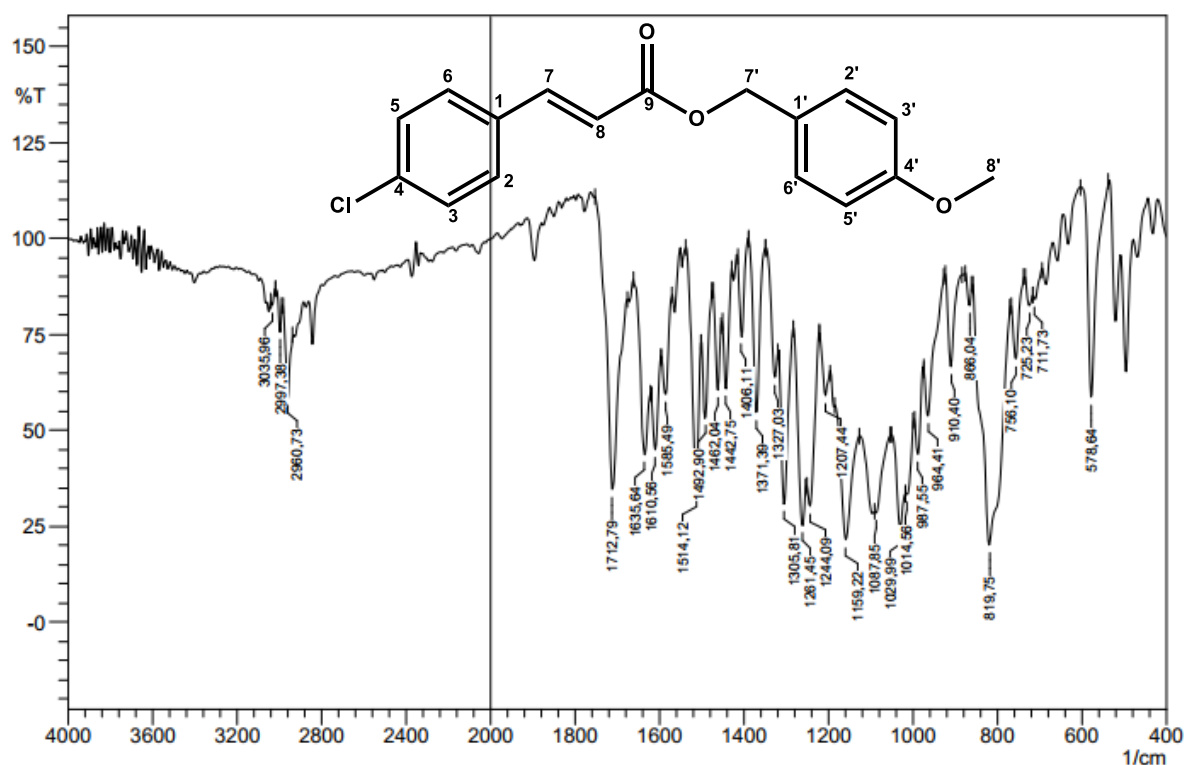
Espectro 47. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI 4-clorocinamato de 4'-clorobenzila (RH-09).

8.2.1.4 RH-10 (4-Clorocinamato de 4'-metoxibenzila)

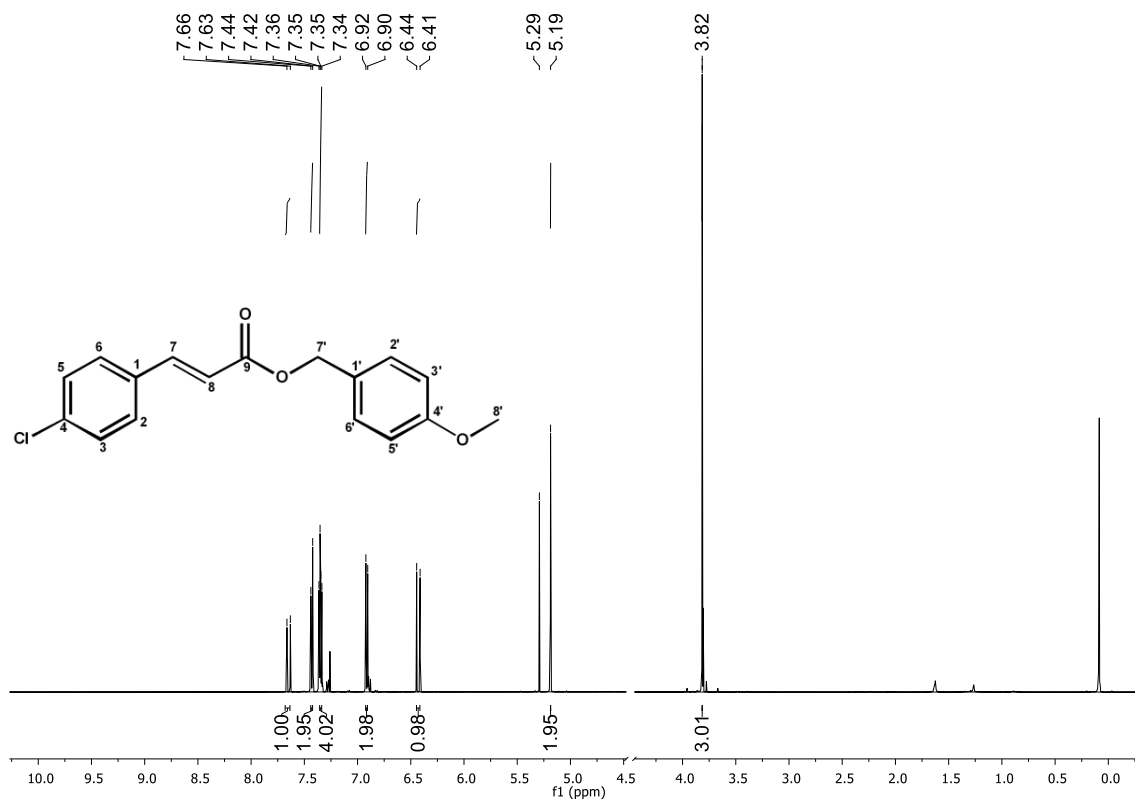


Sólido amorfo branco; rendimento 39,3% (65,1 mg); P.F.: 80 – 83 °C;

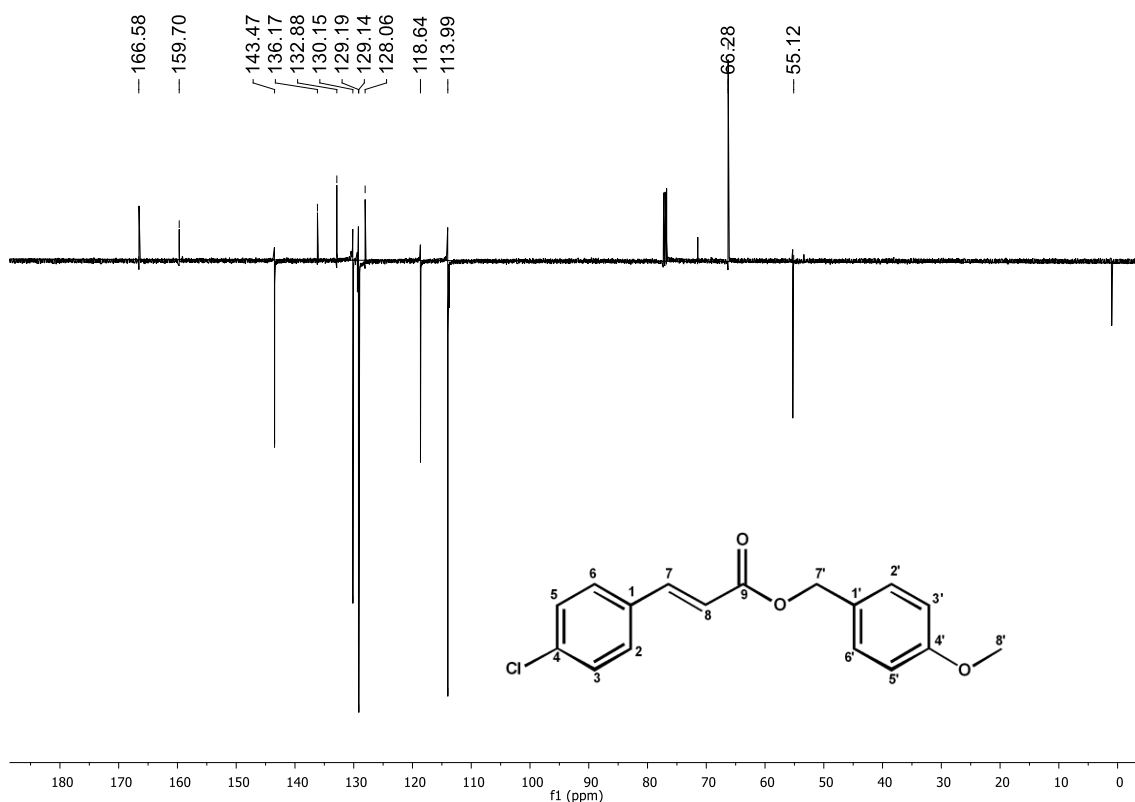
IV_{umax} (KBr, cm^{-1}): 3035 (C-H sp^2), 2960 (C-H sp^3), 1712 (C=O), 1610 e 1442 (C=Caromático), 1261 e 1159 (estiramento C-O), 1014; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,66 (*d*, $J = 16,5$ Hz, 1H, H-7); 7,44 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,35 (*d*, $J = 5,1$ Hz, 4H, H-3, H-5, H-2', H-6'); 6,92 (*d*, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 6,44 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 5,19 (s, 2H, H-7'), 3,82 (s, 3H, H-8'); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,6 (C=O); 159,7 (C-4'); 143,5 (C-7); 136,2 (C-4); 132,9 (C-1); 130,1 (C-2', C-6'); 129,2 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 128,1 (C-1'); 118,6 (C-8); 114,0 (C-3', C-5'); 66,3 (C-7'); 55,1 (C-8') (KIM et al., 2009; LEINO et al., 2016).



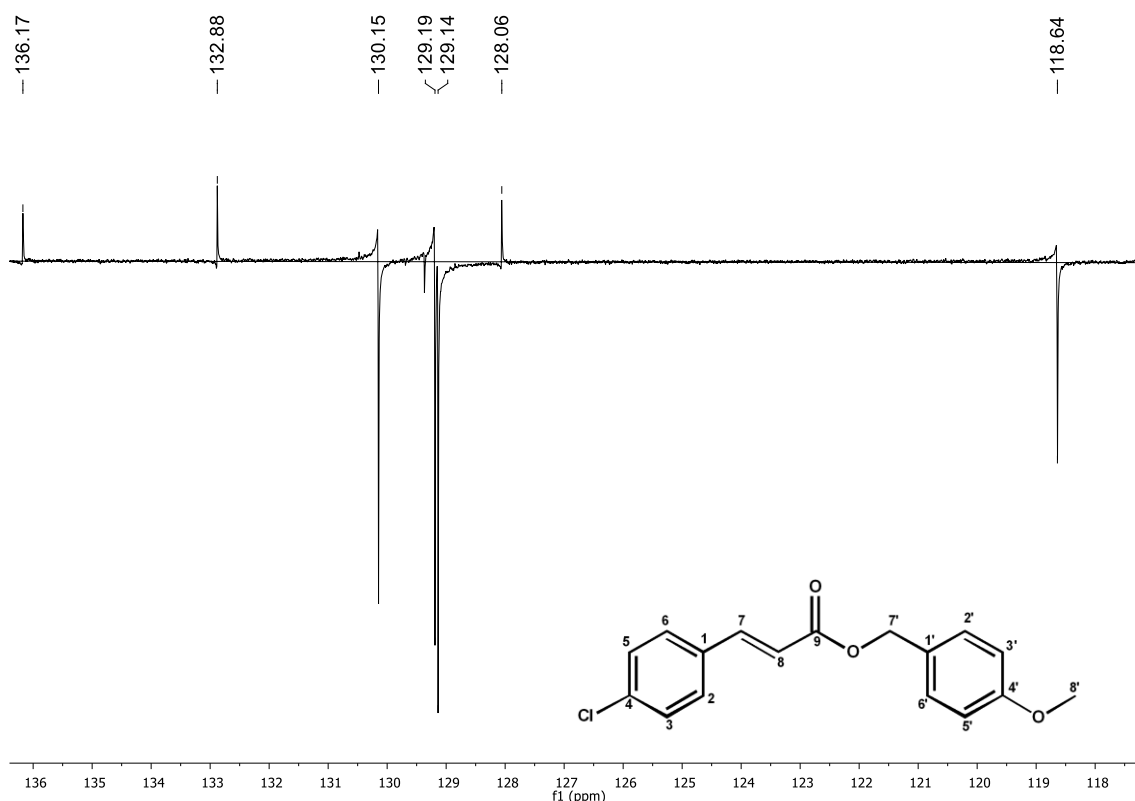
Espectro 48. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila (RH-10).



Espectro 49. Espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila(RH-10) (CDCl₃, 500 MHz).

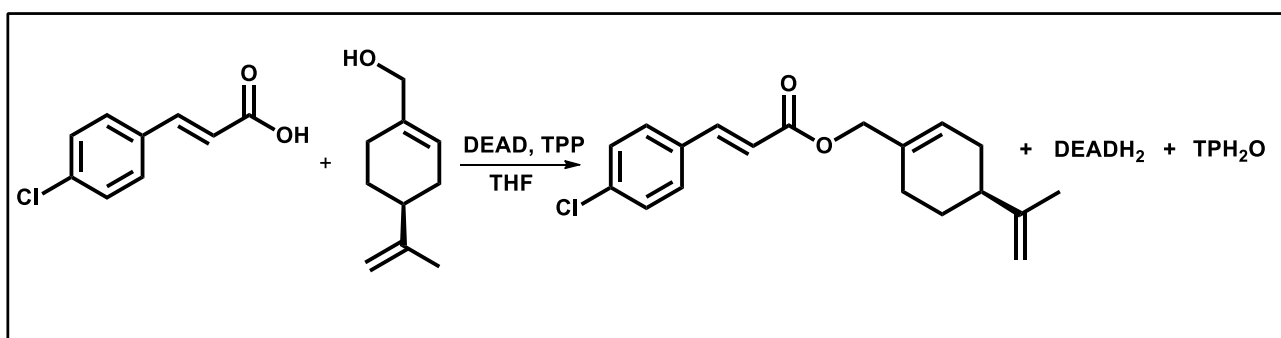


Espectro 50. Espectro de RMN ¹³C-APT de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila (RH-10), (CDCl₃, 125 MHz).



Espectro 51. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de 4'-metoxibenzila (RH-010), (CDCl_3 , 125 MHz).

8.3. Preparação do éster 4-clorocinamato de perila (RH-11)

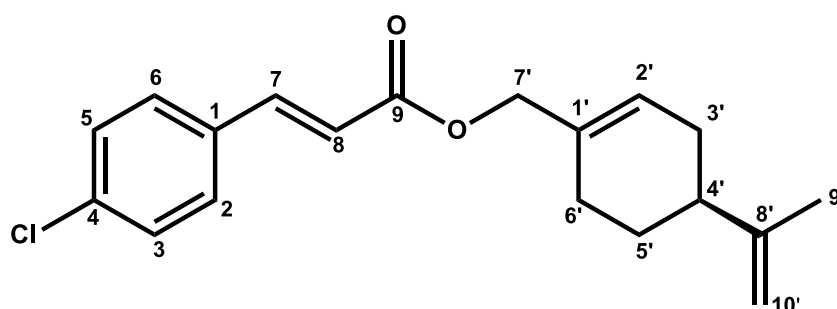


Em um balão de 50 mL foi adicionado o ácido 4-cloro-cinâmico (0,1 g; 0,547 mmol) e o álcool perílico (0,09 mL ; 0,547 mmol), a mistura foi dissolvida em 2 mL de tetrahydrofurano (THF). A mistura reacional ficou sob agitação magnética, à temperatura de 0°C , durante cerca de 30 minutos. Em seguida foram adicionados os agentes de esterificação azodicarboxilato de diisopropila - DEAD (0,12 mL; 0,55 mmol) e trifenilfosfina - TPP (0,144 g; 0,547 mmol), mantendo a agitação, à temperatura ambiente, durante 72 horas, até a formação do produto e consumo do

ácido, monitorados por CCDA. Em seguida, o solvente foi parcialmente evaporado em um rotaevaporador. A solução obtida foi transferida para um funil de separação e adicionou-se 10 mL de água destilada e extraída com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas resultantes foram reunidas, neutralizada com solução de bicarbonato de sódio saturado (3 x 10 mL). Em seguida a mistura reacional foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, e por fim o solvente foi rotaevaporado. O produto foi isolado em coluna cromatográfica em sílica gel 60, utilizando como eluentes hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (HANDIQUE et al., 2013).

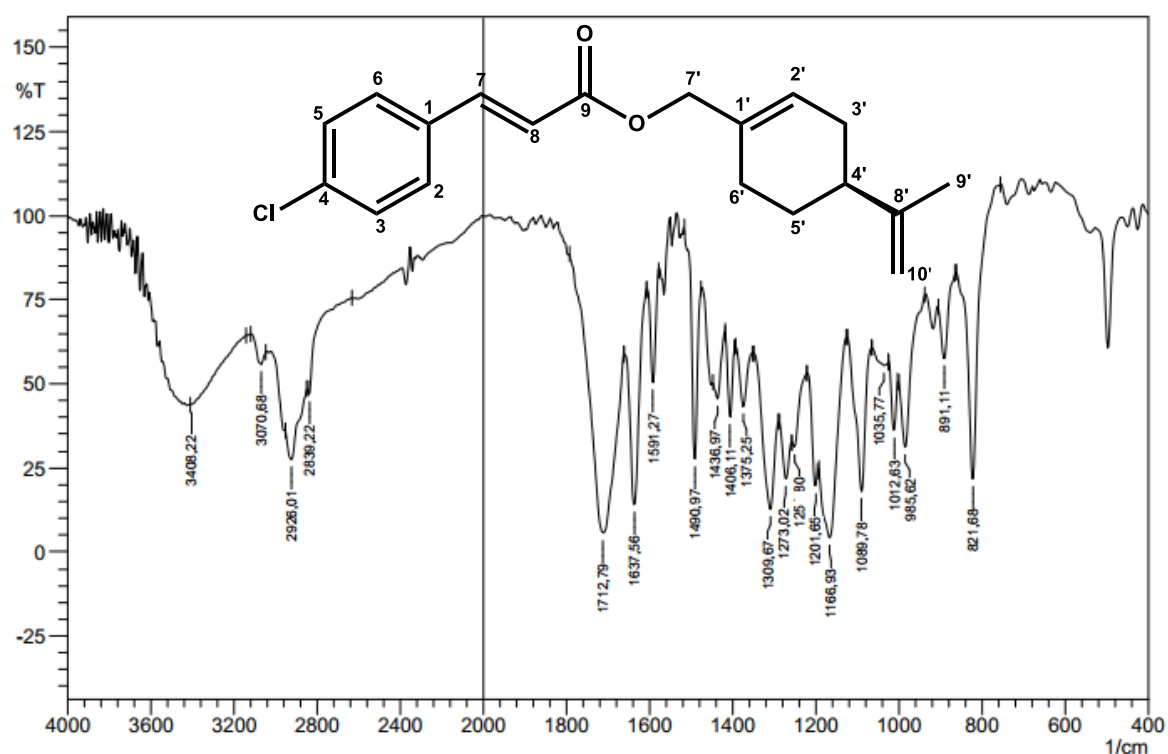
8.3.1 Dados espectroscópicos do éster (RH-11)

8.3.1.1 RH-11 (4-clorocinamato de perila)

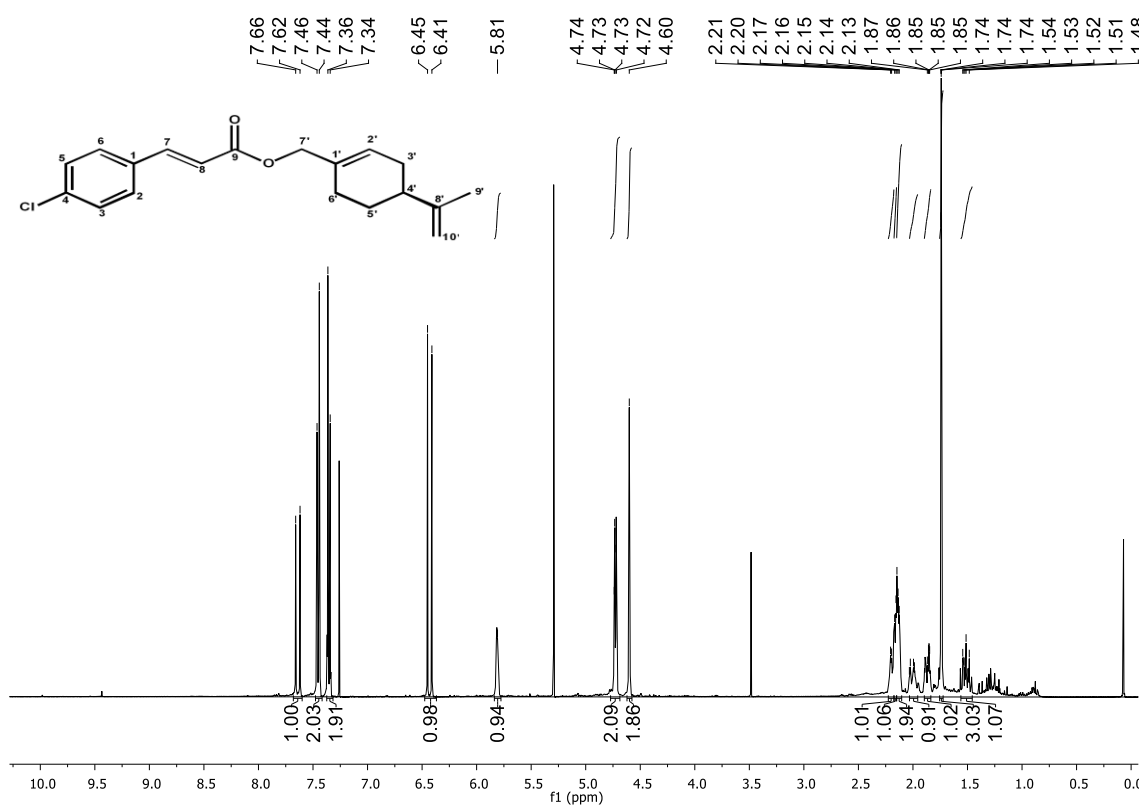


Óleo amarelo claro; rendimento 30,7% (53,6 mg);

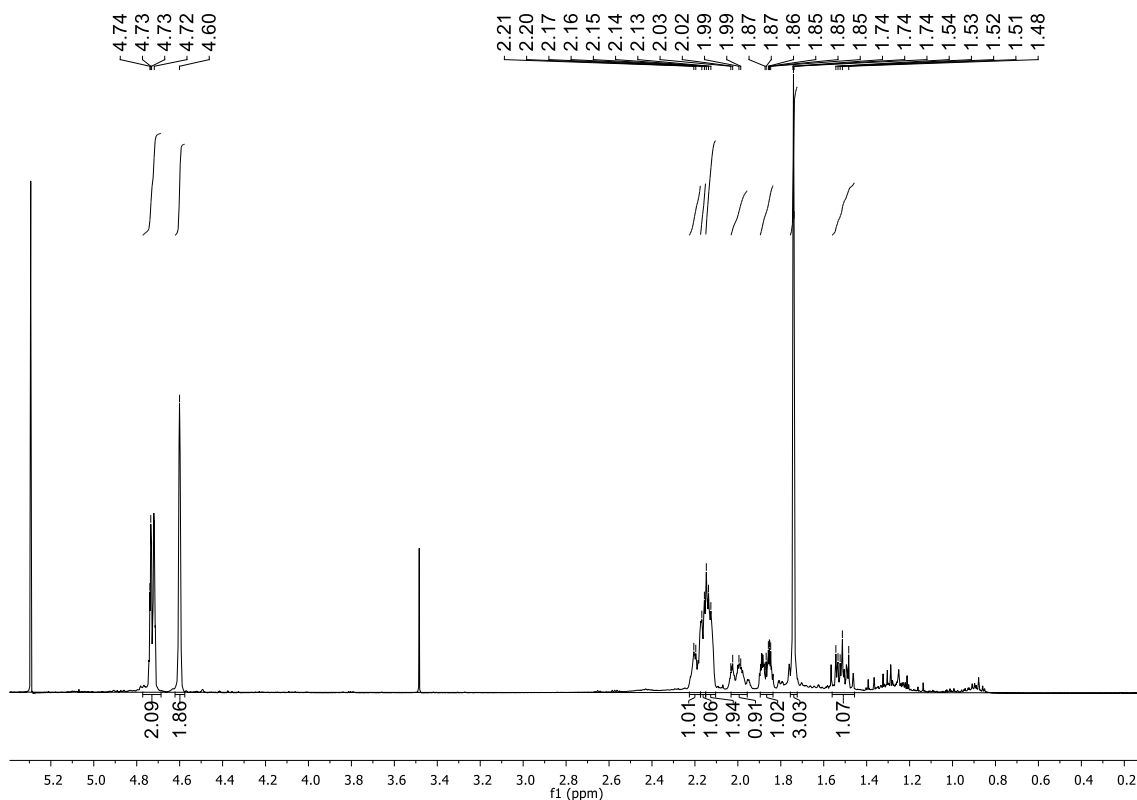
IV_{umax} (KBr, cm^{-1}): 3070 (C-H sp^2), 2926 (C-H sp^3), 1712 (C=O), 1637 e 1406 (C=C aromático), 1273 e 1166 (Estiramento C-O), 1012; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,64 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,45 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,35 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,43 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 5,81 (*s*, 1H, H-2'); 4,73 (*s*, 2H, H-10'), 4,60 (*s*, 2H, H-7'); 2,20 (*m*, 1H, H-3'); 2,16 (*m*, 1H, H-4'); 2,15 – 2,10 (*m*, 2H, H-6'); 2,03 – 1,96 (*m*, 1H, H-3'); 1,90 – 1,84 (*m*, 1H, H-5'); 1,76 – 1,72 (*m*, 3H, H-9'), 1,56 – 1,46 (*m*, 1H, H-5'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,7 (C=O); 149,6 (C-8'); 143,4 (C-7); 136,2 (C-4); 132,9 (C-1); 132,6 (C-1'); 129,2 (C-2, C-6); 129,1 (C-3, C-5); 126,0 (C-2'); 118,7 (C-8); 108,5 (C-10'); 68,7 (C-7'); 40,8 (C-4'); 30,5 (C-3'); 27,2 (C-5'); 26,4 (C-6'); 20,6 (C-9') (GONÇALVES EGUSEVSKAYA, 2004; LEINO et al., 2016). EMAR (MALDI) calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClO}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 339,8121; encontrada 339,8119.



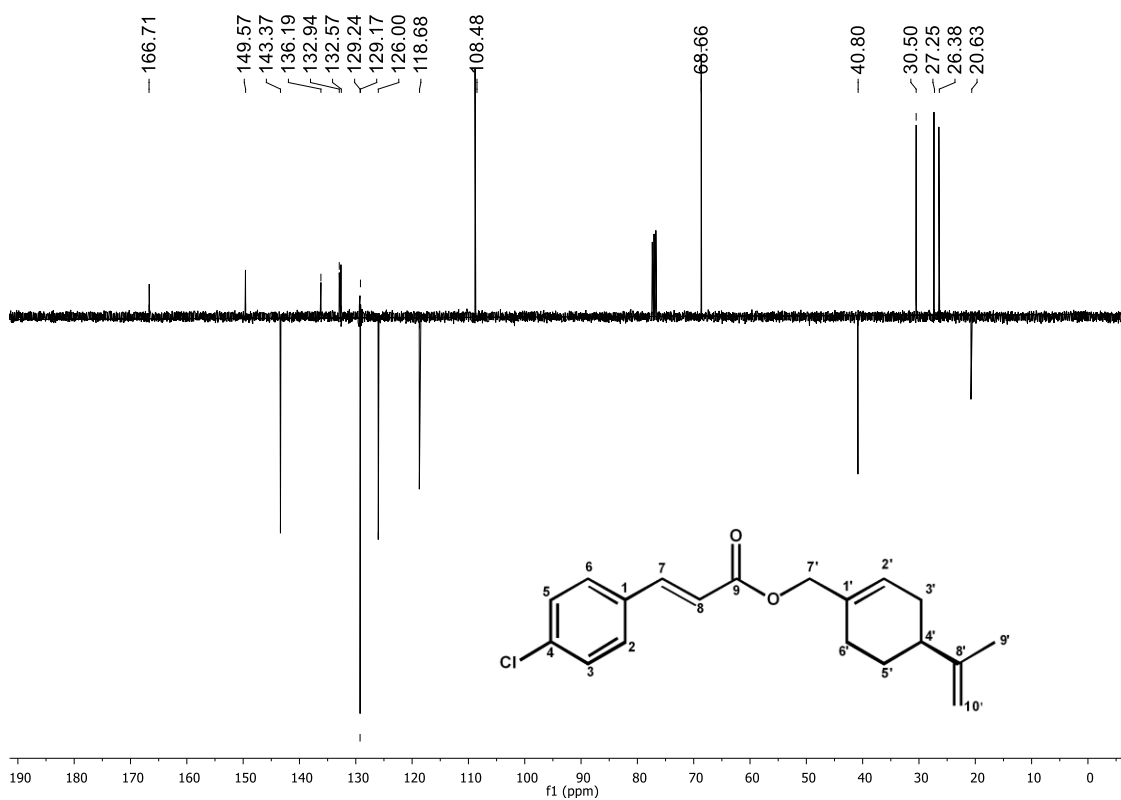
Espectro 52. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-clorocinamato de perila (**RH-11**).



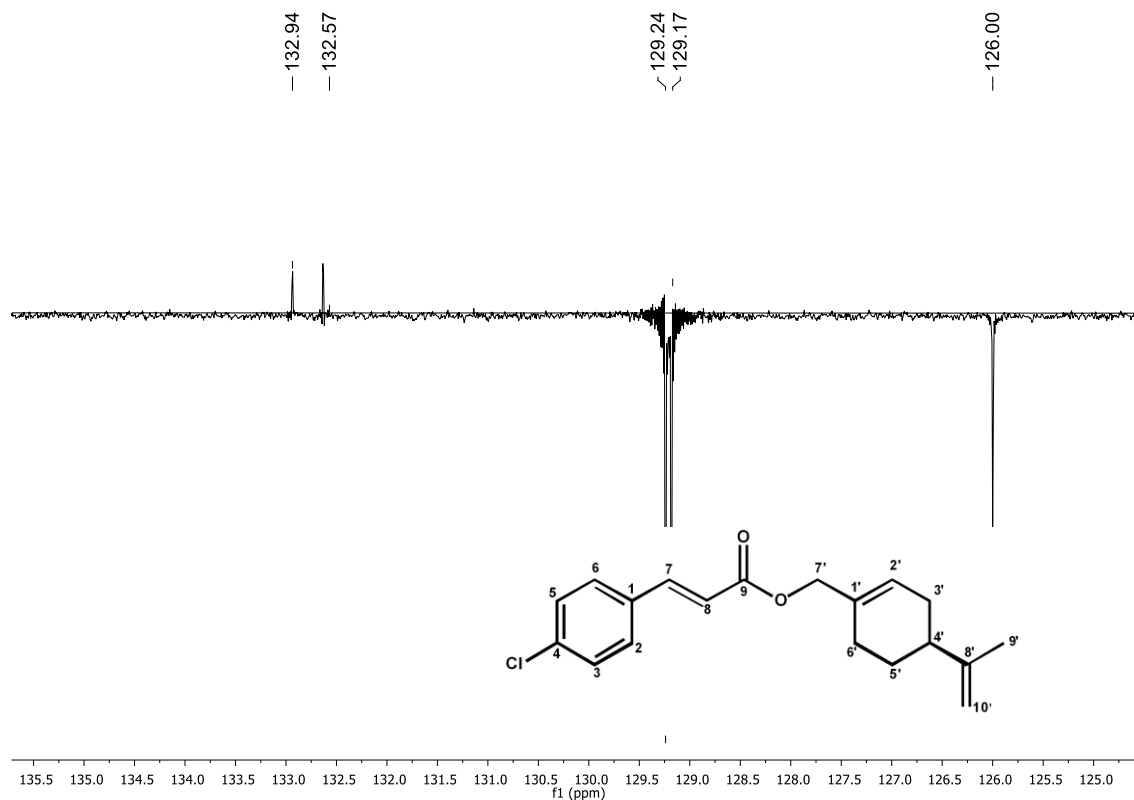
Espectro 53. Espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de perila (**RH-11**) (CDCl_3 , 400 MHz).



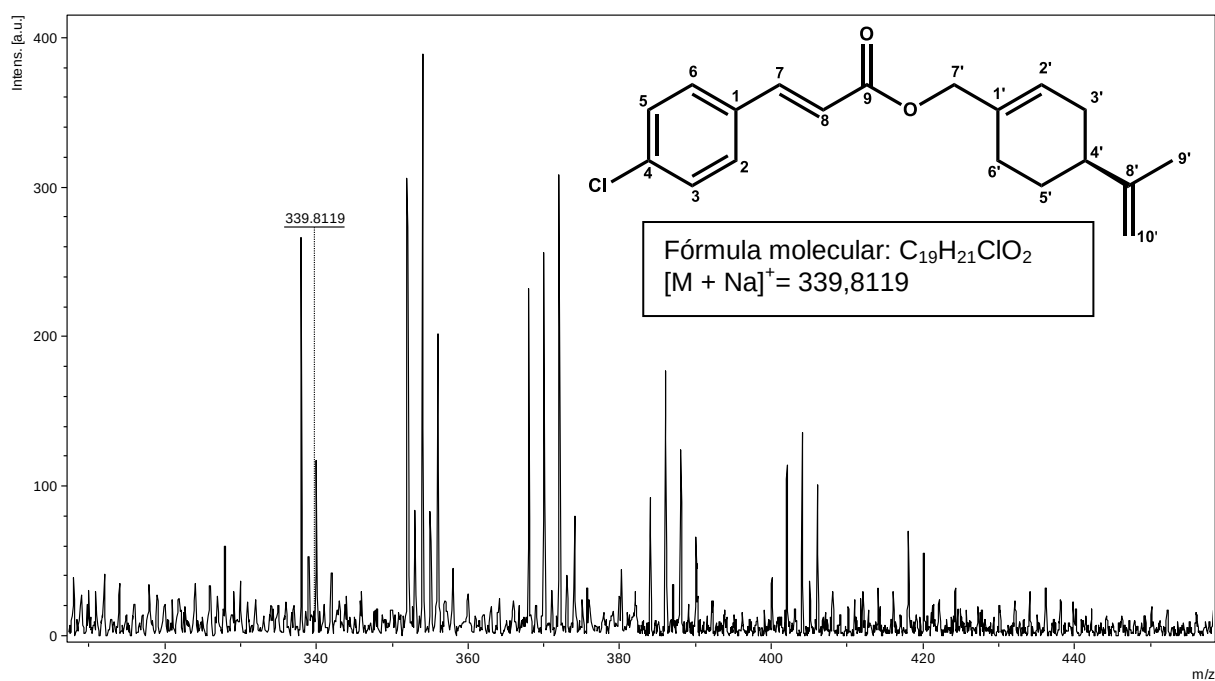
Espectro 54. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de perila (**RH-11**) (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 55. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de perila (**RH-11**), (CDCl_3 , 100 MHz).

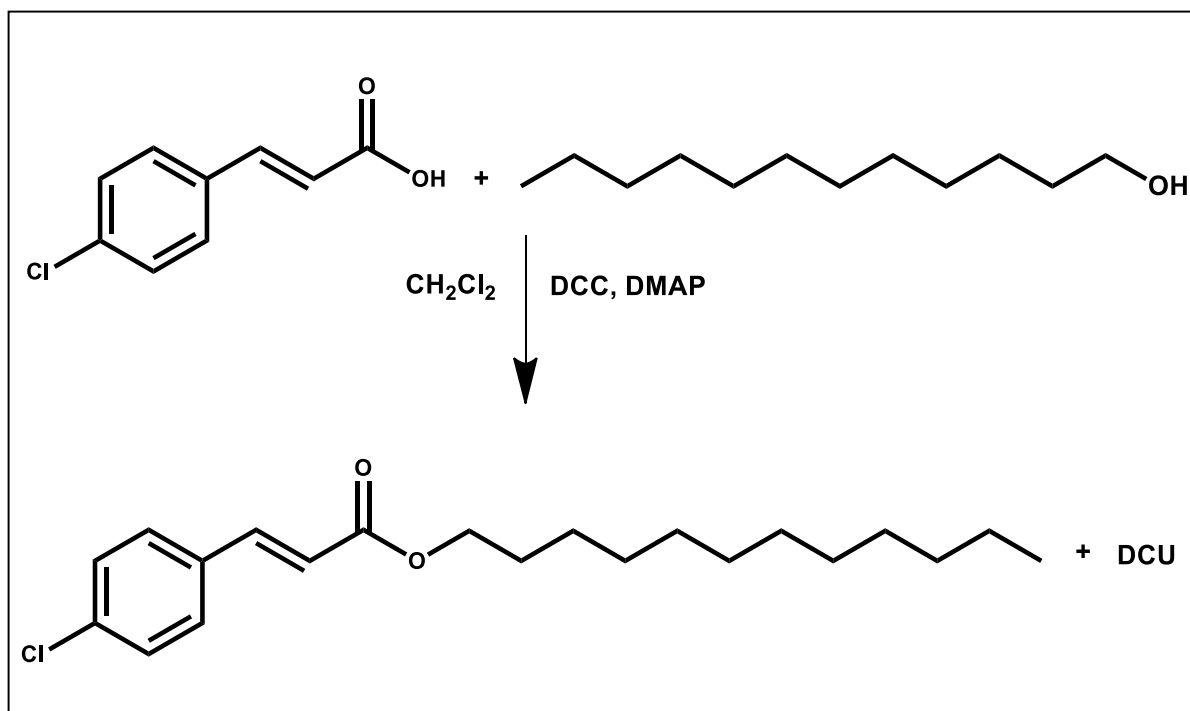


Espectro 56. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de perila (**RH-11**), (CDCl_3 , 100 MHz).



Espectro 57. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de 4-clorocinamato de perila (**RH-11**).

8.4. Preparação do éster 4-clorocinamato de dodecila (RH-12)

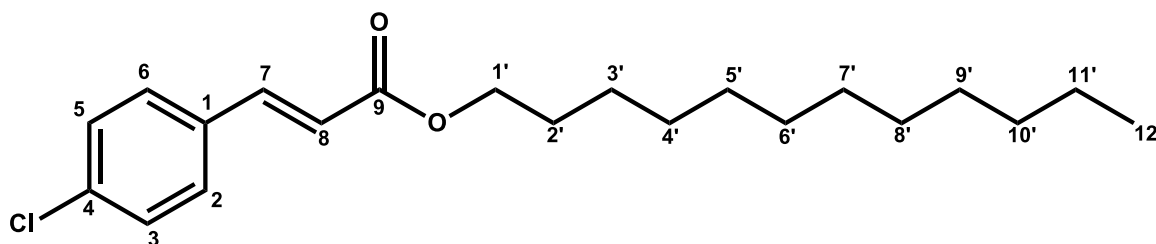


Em um balão de 50 mL equipado com agitador magnético foi adicionado o ácido 4-clorocinâmico (0,1 g; 0,547 mmol), a 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0,00669 g; 0,0547 mmol; 0,2 equiv.), e o álcool laurílico (0,245 mL; 1,095 mmol). Este conteúdo foi dissolvido em diclorometano (4 mL). Em seguida foi adicionado o diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,124 g; 0,602 mmol; 1 equiv.) dissolvido em diclorometano (6 mL), esta solução foi adicionada ao balão lentamente, gota a gota. A reação ocorreu sob agitação magnética em temperatura ambiente, e monitorada por CCDA, com tempo de duração de 72 horas. Foi observada a precipitação de uma grande quantidade de pó branco identificado como dicicloexilureia (DCU), o qual é pouco solúvel em diclorometano. Após filtração foi realizada a extração do produto reacional, vertendo o conteúdo em funil de separação foram adicionados 10 mL de água destilada 10 mL de diclorometano. A fase aquosa ainda foi tratada com diclorometano (2 x 10 mL). A fase orgânica resultante foi tratada com solução de ácido clorídrico à 5% (HCL) (10 mL), logo após foi adicionada uma solução de bicarbonato de sódio a 5% (NaHCO_3) (10 mL), e com 10 mL de água destilada. Foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e rotaevaporada para reduzir o volume de solvente. Por fim foi realizada a purificação do produto através de cromatografia de coluna em sílica gel 60. Utilizou-se hexano puro até a proporção

95:05 em ordem crescente de polaridade, hexano e acetato de etila (NEISES; STEGLICH, 1978).

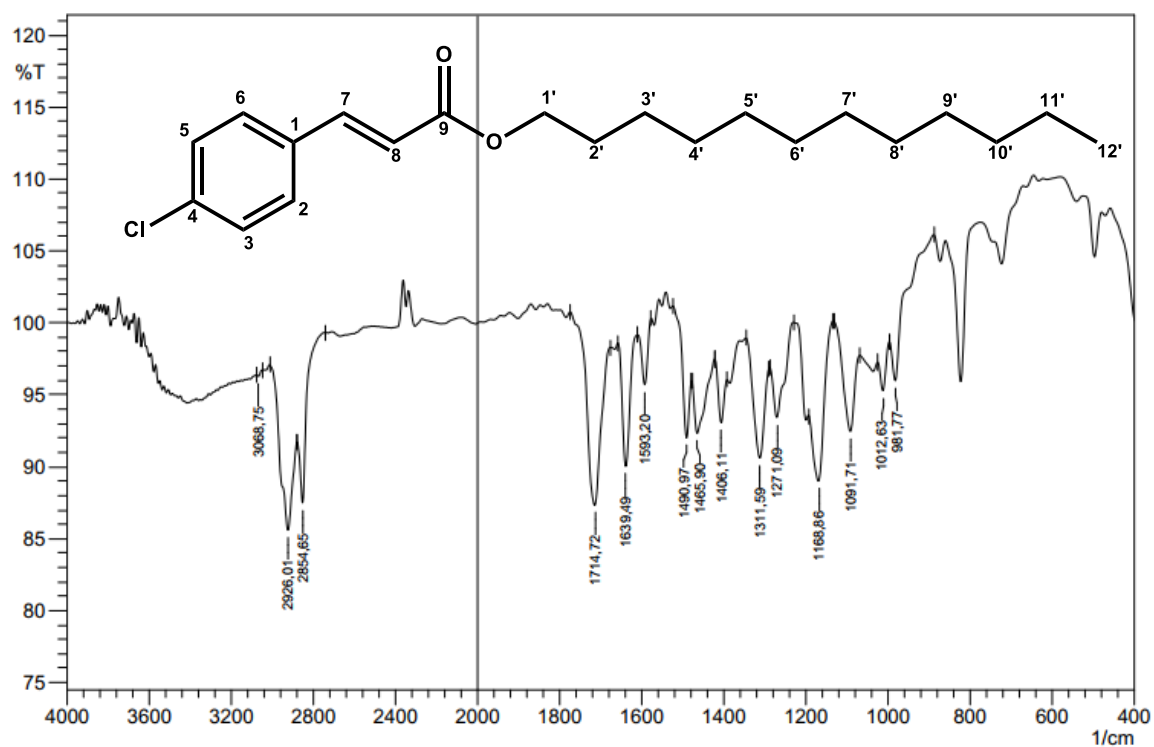
8.4.1 Dados espectroscópicos do éster (RH-12)

8.4.1.1 RH-12 (4-clorocinamato de dodecila)



Óleo incolor; rendimento 26,3% (115,2mg);

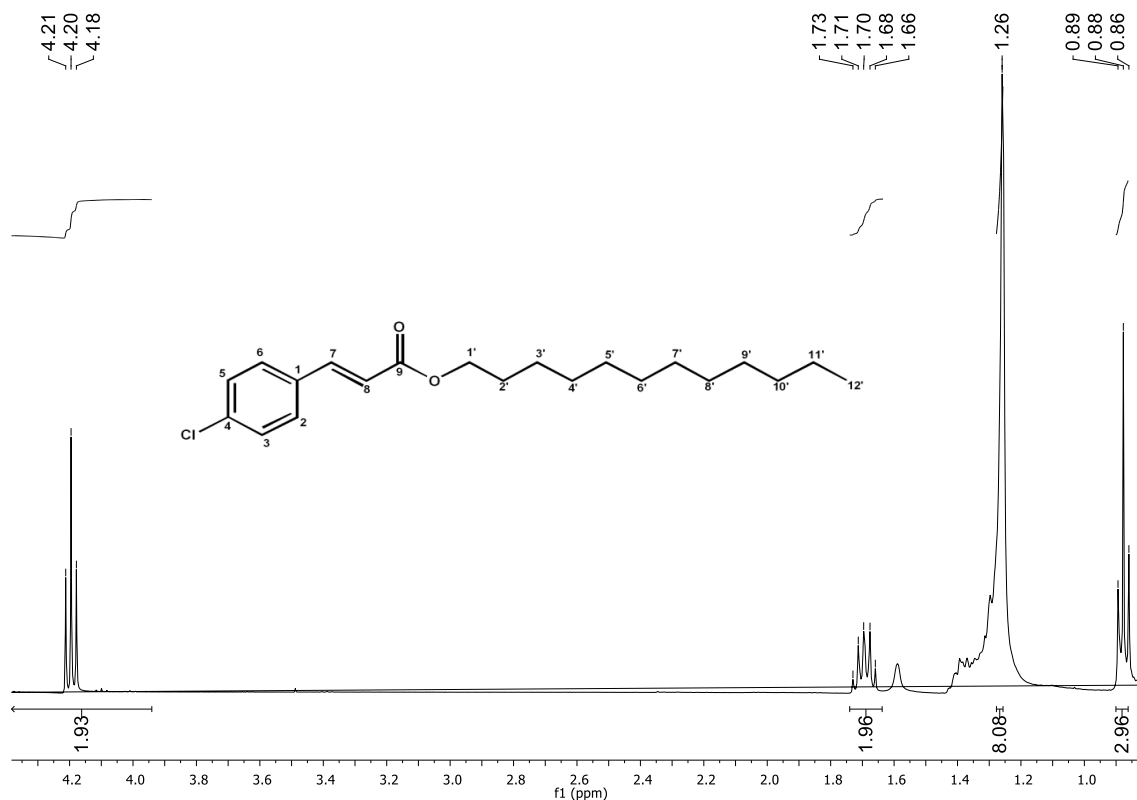
IV_{max} (KBr, cm^{-1}): 3068 (C-H sp^2), 2926 (C-H sp^3), 1714 (C=O), 1639 e 1465 (C=C aromático), 1271 e 1168 (estiramento C-O), 1012; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7,62 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-7); 7,45 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,35 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3, H-5); 6,41 (*d*, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-8); 4,20 (*t*, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-1'); 1,69 (*quint*, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-2'); 1,26 (*m*, 8H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10', H-11'); 0,89 (*t*, $J = 6,7$ Hz, 3H, H-12'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,9 (C=O); 143,1 (C-7); 136,1 (C-4); 133,0 (C-1); 129,2 (C-2, C-6); 129,2 (C-3, C-5); 118,9 (C-8); 64,9 (C-1'); 31,9 (C-2'); 29,7 (C-3'); 29,6 (C-4'); 29,6 (C-5'); 29,5 (C-6'); 29,4 (C-7'); 29,3 (C-8'); 28,7 (C-9'); 25,9 (C-10'); 22,7 (C-11'); 14,2 (C-12') (ESPINDOLA et al., 2006; LEINO et al., 2016).



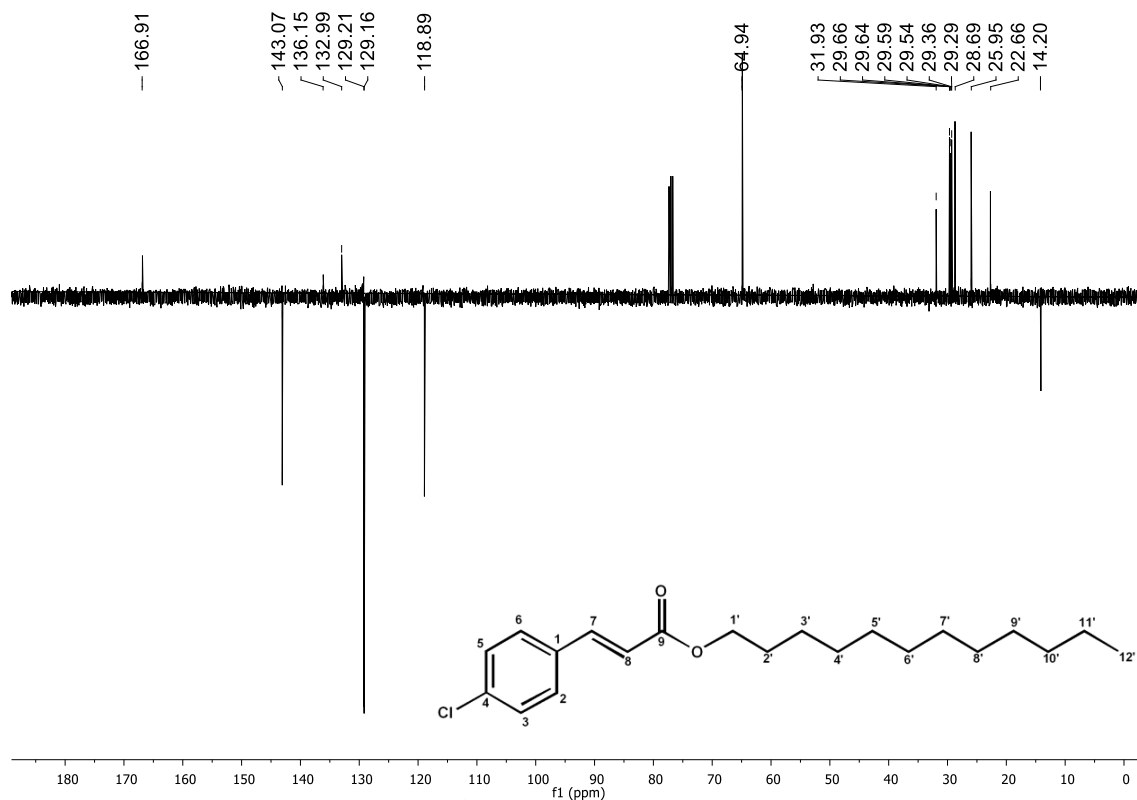
Espectro 58. Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de 4-clorocinamato de dodecila (RH-12).



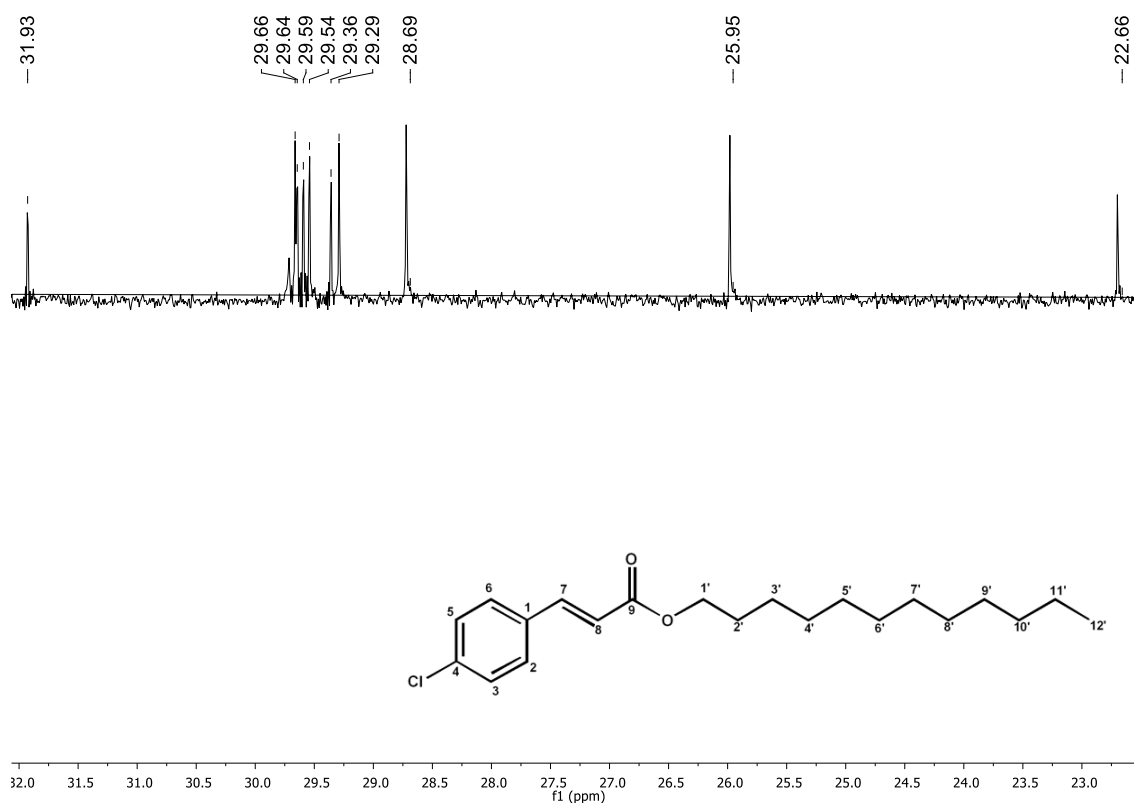
Espectro 59. Espectro de RMN ¹H de 4-clorocinamato dedodecila (RH-12) (CDCl₃, 400 MHz).



Espectro 60. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-clorocinamato de dodecila (**RH-12**) (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 61. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de dodecila (**RH-12**), (CDCl_3 , 100 MHz).



Espectro 62. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-clorocinamato de dodecila (**RH-12**), (CDCl_3 , 100 MHz).

9. REFERÊNCIAS

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.

ARAÚJO, M. O. **Preparação de derivados do ácido caféico e avaliação das suas atividades antimicrobianas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de Concentração Farmacoquímica) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB, 2017.

ARAÚJO, T. SCHARCHNER, L. Erupções vesicopustulosas benignas no neonate Benign vesicopustular eruptions in the neonate. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 4, p. 359-366, 2006.

ARENDROP, Maiken C.; PERLIN, David S. Echinocandin resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484–492, 2014.

AVRELLA, D; GOULART, L.S. Isolamento de *Candidaspp.* da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 3, p. 205-207, 2008.

BARBEDO, L. S; SGARBI, D. B. G; Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 2, n. 1, p. 22-38, 2010.

BERENDS, E. T.; HORSWILL, A. R.; HASTE, N. M.; MONESTIER, M.; NIZET, V.; KOECKRITZ-BLICKWEDE, M V. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6, p. 576–586, 2010.

BISOGNO, F.; MASCOTI, L.; SANCHEZ, C.; GARIBOTTO, F.; GIANNINI, F.; KURINA-SANZ, M.; ENRIZ, R. Structure–antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55: pp. 10635-10640, 2007.

BLOM, A. M.; HALLSTRÖM, T.; RIESBECK, K. Complement evasion strategies of pathogens—Acquisition of inhibitors and beyond. **Molecular Immunology**, v. 46, n.14, p. 2808-2817, 2009

BOECK, P.; SÁ, M. M.; SOUZA, B. S. CERCENA, R.; ESCALANTE, A. M.; ZACHINO, S. A.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. A Simple Synthesis of Kaurenoic Esters and other Derivatives and Evaluation of their Antifungal Activity. **Journal the Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 6B, p. 1360-1366, 2005.

BORDIGNON, J. C.; LIMA, L. R. Etiologia de infecções hospitalares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital do sudoeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 283-288, 2017.

Brilhante RS, Paixão GC, Salvino LK, Diógenes MJ, Bandeira SP, Rocha MF, et al. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: Trichophyton tonsurans as important emerging pathogen of Tinea capitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** , v.33, n. 5, p. 417-425, 2000.

BYGBJERG, I. C. Double burden of noncommunicable and infectious diseases in developing countries. **Science**, v. 337, n. 6101, p. 1499–1501, 2012.

BUT, T. Y.; TOY, P. H. The Mitsunobu reaction: origin, mechanism, improvements, and applications. **Chemistry, an Asian Journal**, v. 2, n. 11, p. 1340-1355, 2007.

CANNON, R. D; CHAFFIN, W. L. Oral Colonization by *Candida albicans*. **Oral Biology & Medicine**. v. 10, n. 3, p. 359-383, 1999.

CAPOTE, A.M.; FERRARA, G.; PANIZO, M. M.; GARCIA, N.; ALARCÓN, V.; REVIKINA, V.; DOLANDE, M. Micosis superficiales: casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela (2001-2014). **Investigación Clínica**, v.57, n. 1, p. 47-48, 2016.

CASTRO, R. D. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. **Tese**. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 169, 2010.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida* spp. a antifúngicos. **Infarma**. v. 18, n. 9/10, p. 30-35, 2006.

CASTRO, M. C.R.; RAMOS-E-SILVA, M. **Fundamentos de dermatologia**. Rio de Janeiro: Atheneu; 2009.

CAVALCANTE, P. M. M.; SILVA, R. L. FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FILHO, J. R. F. Proposal of preparation and characterization of esters: an undergraduate experiment of organic analysis. **Educación Química**. v. 26, n. 4, 2015.

CHANG, F. Y.; PEACOCK, J. J. E.; MUSHER, D. M.; et al. Staphylococcus aureus bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective multicenter study. **Medicine (Baltimore)**, v. 82, p. 333-339, 2003.

CHAVES, G. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeasts strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 197-202, 2003.

CHEN, Y. J.; SHIAO, M. S.; HSU, M. L.; TSAI, T. H.; WANG, S. Y. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5615-5619, 2001.

CHRISTIE, W. W. Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. In **Advances in Lipid Methodology**, Dundee: Oily Press, v. 2, p. 69-111, 1993

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

COKER, R. J.; HUNTER, B. M.; RUDGE, J. W.; LIVERANI, M.; HANVORAVONGCHAI, P. Emerging infectious diseases in southeast Asia: regional challenges to control. **Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 599–609, 2011.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica eterapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332-337, 2007.

COLOMBO, A. L., et al. Brazilianguidelines 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.

COSGROVE, S. E.; SAKOULAS, G.; PERENCEVICH, E. N.; SCHWABER, M. J.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Clinical Infectious Disease**, v. 36, p. 53-59, 2003.

COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C.; MERC, F. Confirmando a Esterificação de Fischer por Meios de Aromas. **Química Nova na Escola**, v. 19, n. 1, p. 36-38, 2004.

CROCCO, E. I.; MÍMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M. S.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade

antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 689-697, 2004.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRÍA, A. M. Comparison of susceptibility profile among clinical isolates of oral and vulvovaginal *Candida* spp. In southern Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

DAS, S.; LINDEMANN, C.; YOUNG, B. C.; MULLER, J.; OESTERREICH, B.; TERNETTE, N.; WINKLER, A. C.; PAPROTKA, K.; REINHARDT, R.; FOERSTNER, K. U.; ALLEN, E.; FLAXMAN, A.; YAMAGUCHI, Y.; ROLLIER, C. S.; VAN DIEMEN, P.; BLAETTNER, S.; REMMELE, C. W.; SELLE, M.; DITTRICH, M.; MÜLLER, T.; VOGEL, J.; OHLSEN, K.; CROOK, D. W.; MASSEY, R.; WILSON, D. J.; RUDEL, T.; WYLLIE, D. H.; FRAUNHOLZ, M. J. Natural mutations in a *Staphylococcus aureus* virulence regulator attenuate cytotoxicity but permit bacteremia and abscess formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 22, p. E3101-E3110, 2016.

DE ALMEIDA, B. M.; BREDÁ, G. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; TUON, F. F. Positive tip culture with *Candida* and negative blood culture: to treat or not to treat? A systematic review with meta-analysis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 854 – 861, 2014.

DE FARIAS, M. O.; LIMA, T. C.; PÉREZ, A. L. A. L.; SILVA, R. H. N.; OLIVEIRA, A. J. M. S.; LIMA, E. O.; DE SOUSA, D. P. Antifungal activity of Ester derivatives from caffeic acid against *Candida* species. **International Journal Of Pharmacy & Pharmaceutical Research**. v. 7, n. 1, p. 151-159, 2016.

DE ROSSI, T.; LOZOVY, M. A. B.; SILVA, R. V.; FERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011

DE SOUSA, D. P. Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects. 1. ed. New York: **Nova Science Publishers**, v. 1: p. 236, 2012.

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.

DIAS, J. M.; ARAÚJO, J. M.; COSTA, J. F.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; ALMEIDA, M. F. Biodiesel production from raw castor oil. **Energy**, v. 53, p. 58-66, 2013.

DOS SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; DE FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

DONGARI-BAGTZOGLOU, A.; KASHLEVA, H.; DWIVEDI, P.; DIAZ P.; VASILAKOS, J. Characterization of Mucosal *Candida albicans* Biofilms. **PLoS ONE**, v. 4, n.11, p. 67-70, 2009.

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

EL-SEEDI, H. R.; TAHER, E. A.; SHEIKH, B. Y.; ANJUM, S.; SAEED, A.; ALAJMI, M. F.; MOUSTAFA, M. S.; AL-MOUSAWI, S. M.; FARAG, M. A.; HEGAZY, M. F.; KHALIFA, S. A. M. Hydroxycinnamic acids: natural sources, biosynthesis, possible biological activities, and roles in islamic medicine. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 269-292, 2017.

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**, n. 71, 1720–1725, 2008.

ESPINDOLA, J. A. A.; CARVALHO, G. J. A.; RODRIGUES, E. P.; CARVALHO, M. G.; LIMA, M. E. F.; SOUZA, S. R. Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 53-60, 2006.

FARIDI, M. M. A.; ARORA, G. L.; DUA, T.; KHALIL, A. Infective endocarditis in a neonate: A case report. **Journal of Neonatology**, v. 21, n. 2, p. 142-143, 2007.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n.5-6, p. 456-470, 2009.

FRAVE, H. A.; POWELL, W. H. **Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Name 2013**. 4th ed, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2013.

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, n. 6, 2004.

GALVAN, B.; MARISCAL, F. Epidemiologia de la candidemia en UCI. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 12, p. 12-5, 2006.

GANDHI, V.; PATEL, M. Prevalence of *Candida* Species and its Antifungal Susceptibility Isolated from Blood Culture at Tertiary Care Hospital, Ahmedabad, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 884-892, 2017.

GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.124, ed. 7, p. 2836-2840, 2014.

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. editor-in-chief; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. Methods for general and molecular bacteriology, Washington. **American Society for Microbiology**, p. 791,1994.

GERSHON, H.; MCNEIL, M. W.; PARMEGIANI, R.; GODEFREY, P.K.; Antifungal Activity of Substituted Nitrobenzenes and Anilines. **Applied Microbiology**, p. 438-440, 1971.

GIOLO, M. P., SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnósticolaboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e MedicinaLaboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-34, 2010.

GOMES, I.; METELLO, J.; FREITAS, B.; DIOGO, J. Urinary tract infections in pregnancy Infecções urinárias na gravidez. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 11, n. 4, p. 248-254, 2017.

GOMPERTZ, O. F. et al. Micoses Oportunísticas e Outras Micoses. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Org.) **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 70, p. 525-530.

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

GROSSI, P. A. Clinical aspects of invasive candidiasis in solid organ transplant recipients. **Drugs Rume**. v. 69, n. 1, p. 15-20, 2009.

GUSMÃO, J. M. R. **Leveduras do gênero *Candida* na saliva de usuários de prótese parcial removível a grampo**. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado em Prótese Dentária) – Universidade de Taubaté, Taubaté, 2007.

GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v.19,p. 19292–349, 2014.

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

HANDIQUE, J. G.; MAHANTA, D.; DEVI, A.; BORUAH, M. P. Synthesis and Electrochemical Behavior of Some Dendritic Polyphenols as Antioxidants. **Letters in Organic Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 53-59, 2013.

HERNÁNDEZ-MONTELONGO, R.; GARCÍA-SANDOVAL, J. P.; AGUILARGARNICA, E. On the non-ideal behavior of the homogeneous esterification reaction: a kinetic model based on activity coefficients. **Reaction Kinetics, Mechanism and Catalysis**, v. 115, n. 2, p. 401-419, 2015.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486-493, 2001.

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**, 2002, v.97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

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

IOSET, J. R., MARSTON, A., GUPTA, M. P., HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 3, p. 424-426, 2000.

KAUFFMAN, D. A.; FISHER, J. F., SOBEL, J. D.; NEWMAN, C. A. Candida Urinary Tract Infections- Diagnosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 6, p. 452-456, 2011.

Kim SH, Kim KH, Kim HB, et al. Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemother**, v. 52, p. 192-197, 2008.

KOLACKOWSKI, M.; KOLACKOWSKI, A.; SRODA, K.; RAMALHETE, C.;MICHALAK, K.; MULHOVO, S.; FERREIRA, M. J. Substrates and modulators of the multidrug transporter CDR1p of *Candida albicans*in antifungal extracts of medicinal plants. **Mycoses Diagnosis Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases**, v. 53, n. 4, p. 305-310, 2010.

KONEMAN, E.; WOODS, G.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; ALLEN, S.; WINN JR, W. C.; JANDA, W. **Diagnósticomicrobiológico**. Ed. 6, ed Guanabara Koogan, p. 1565, 2008.

KOROŠEC, B.; SOVA, M.; TURK, S.; KRAŠEVEC, N.; NOVAK, M.; LAH, L.;STOJAN, J.; PODOBNIK, B.; BERNE, S.; ZUPANEC, N. Antifungal activity ofcinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 116, p. 955-966, 2014.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candidatropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873-880, 2010.

KROON, P. A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79: p. 355-361, 1999.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARRI, E. M.; TAKAHASHI, M. N. **Tratado de Micologia Médica**. Lacaz. 9a. ed. São Paulo: Sarvier. p. 252-340, 2002.

LAMBRIS J. D.; RICKLIN, D; GEISBRECHT B.V. Complement evasion by human pathogens. **Natures Review. Microbiology**. v. 6, n. 2, p.132–142, 2008.

LAM, S. W.; BAUER, S. R.; NEUNER, E. A. Predictors of septic shock in patients with methicillinresistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 453-456, 2012.

LARBSCHARROENSUB, N.; WONGWICHAI, S.; CHONGTRAKOOL, P.;BOONGIRD, A.; NOINANG, A.; WATCHARANANAN, S. P.;TUNLAYADECHANONT, S.; WITOONPANICH, R.; PHUDHICHAREONRAT, S.Cerebral aspergillosis and cerebral candidiasis; a retrospective analysis of clinicopathologic features in Ramathibodi Hospital. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 93, n. 12, p. 1443-1450, 2010.

LI, X.; ELI, W.; LI, G. Solvent-free synthesis of benzoic esters and benzyl esters in novel Bronsted acidic ionic liquids under microwave irradiation. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 13, p. 2264–2268, 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; SCHWEIGER, J. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 152: pp. 272–282, 1998.

LIMA, G. M. E.; NUNES, M. O.; CHANG, M. R.; TSUJISAKI, A. S.; NUNES, J. O.; TAIRA, C. L.; THOMAZ, D. Y.; NEGRO, G. M. B. D.; MENDES, R. P.; PANIAGO, A. M. M. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the urine of patients in a university hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, n. 59, e. 75, p. 1-8, 2017.

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.

LIMA, T. C.; FERREIRA, A. R.; SILVA, D. F.; LIMA, E. O.; DE SOUSA, D. P. Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. **Natural Product Research**, v.32, p. 572-575, 2017.

LIU, C.; BAYER, A.; COSGROVE, S. E.; et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. **Clinical Infectious Disease**, v. 52, p. 18-55, 2011.

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

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178–184, 2010.

MARTIN-TANGUY, J.; CABANNE, F.; PERDRIZET, E.; MARTIN, C. The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. **Phytochemistry**, v. 17: pp. 1927-928, 1978.

MARTINS, E. A.; GUERRER, L. V.; CUNHA, K. C.; SOARES, M. M.; DE ALMEIDA, M. T. Onychomycosis: clinical, epidemiological and mycological study in the municipality of São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 596-568, 2007.

MASSEY, R. C., HORSBURG, M. J., LINA, G., HÖÖK, M.; RECKER, M., The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 953–958, 2006.

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; SANGULAR, D.; CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.

MCKEE, T.; MCKEE, J. R. **Biochemistry: The Molecular Basis of Life**. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2009. 777p.

MEDEIROS, E. A. S.; ROSENTHAL, C. A prática segura e a qualidade na atenção In: O controle da infecção hospitalar no Estado de São Paulo. São Paulo: **Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo**, 2010. [Acesso em 17 fev. 2016] Disponível em: http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/Saude_Publica/infeccao_hospitalar_2010.pdf.

MEHTA, S. R.; YUSUF, S.; PETERS, R. J. G.; BERTRAND, M. E.; LEWIS, B. S.; NATARAJAN, M. K.; MALMBERG, K.; RUPPRECHT, H. J.; ZHAO, F.; CHROLAVICIUS, S.; COPLAND, I.; FOX, K. A. A. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. **The Lancet**, v. 358, p. 527-533, 2001.

MENEZES, E. A.; CAVALCANTE, M. S.; FARIAS R. B.; TEIXEIRA, A. B.; PINHEIRO, F. G.; BEZERRA, B. P.; TORRES, J. C. N.; CUNHA, F. A. Frequência e atividade enzimática da *Candida albicans* isoladas da mucosa oral de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n.1, p. 9-13, 2005.

MENEZES, E. A.; GUERRA, A. C. P.; RODRIGUES, R. C. B.; PEIXOTO, M. M. L. V.; LIMA, L. S.; CUNHA, F. A. Isolamento de *Candida* spp. No mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de

susceptibilidade a antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 299-305, 2004.

MENEZES, E. A.; CAVALCANTE, M. S.; FARIAS R. B.; TEIXEIRA, A. B.; PINHEIRO, F. G.; BEZERRA, B. P.; TORRES, J. C. N.; CUNHA, F. A. Frequência e atividade enzimática da *Candida albicans* isoladas da mucosa oral de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n.1, p. 9-13, 2005.

MENEZES, E. A.; MONTEIRO, M. N. R.; PARENTE, T. M.; CUNHA, F. A.; AUGUSTO, K. L.; FREIRE, C. C. F. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isolado da cavidade oral de pacientes HIV-positivos em Fortaleza, Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 253-256, 2006.

MINELLI, L.; NONINO, A. B.; SALMAZO, J. C.; NEME, L.; MARCONDES, M. Diabetes *mellitus* e afecções cutâneas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 2003 nov-dez;78(6):735-47.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Micologia. In: TEVA, Antônio, et al. **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde**. EPSJV, Cap. 4, p. 399-496, p. 2009.

MORAIS, P. M.; MARIA, G. S. C.; MARIA, Z. M. F. Aspectos clínicos de pacientes com pitíriase versicolor atendidos em um centro de referência em Dermatologia Tropical na cidade de Manaus (AM), Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n.6, p. 797-803, 2010.

MOURA, J. S. **Aderência de *Candida* spp. a resinas acrílicas: método depolimerização e presença ou não de saliva**. 2005. 54f. Tese (Doutorado e Clínica Odontológica – Área de Prótese Dental)- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2005.

NAKAJIMA, Y.; ISHIBASHI, J.; YUKUHIRO, F.; ASAOKA, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1624, 125-130, 2003.

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

NARASIMHAN, B.; BELSARE, D.; PHARANDE, D.; MOURYA, V.; DHAKE, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: Synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 827-834, 2004.

NASCIMENTO, L. G. **Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de ésteres nitrocinâmicos estruturalmente relacionados**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de Concentração Farmacoquímica) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB, 2017.

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

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

NETO, M. M.; DANESI, C.C.; UNFER, D. T. Candidíase Bucal: Revisão da Literatura. **Saúde**, v. 31, n.1- 2, p. 16-26, 2005.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, C. E. ***Candida albicans* e estomatite por dentadura: avaliação da presença do fungo na lesão, na prótese total superior e no sangue**. 2009. 79f.48 Dissertação (Mestrado Odontologia– área de Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de Bauru,Bauru, 2009.

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

OKANO, K.; ISLEY, N. A.; Boger, D. L. Peripheral modifications of [Ψ [CH₂NH]Tpg4] vancomycin with added synergistic mechanisms of action provide durable and potent antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.v.114, n. 26, p. 1 – 10, 2017.

PANIZO, María Mercedes, et al. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **Medical Mycology**, v. 47, n. 2, p. 137–43, 2009.

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 *Laurusnobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179-185, 2017.

PEMÁN, J.; ZARAGOZA, R.; QUINDÓS, G.; ALKORTA, M.; CUÉTARA, M. S.;CAMARENA, J. J.; RAMÍREZ, P.; GIMÉNEZ, M. J.; MARTÍN-MAZUELOS, E.;LINARES-SICILIA, M. J.; PONTÓN, J.; Clinical factors associated with a *Candidaalbicans* Germ Tube Antibody positive test intensive Care Unit patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 60, p. 1-7, 2011.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X.; PAULA, C. R. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans*fromedentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesq. Odont. Bras**, v. 14, n. 2, p. 119-122, 2000.

PEREIRA-CENCI, T. **Avaliação da formação de biofilme de espécies de *Candida* sobre a superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses removíveis**. 2008. 101f. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica – área de Prótese Dentária) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2008.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2014.

PEREIRA, A. L.; LEAL, F.; AZULAY, D. R.; AZULAY, R. D. Infecções bacterianas da pele. **Azulay RD, Azulay DR, Azylay-Abulafia L. Dermatologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 301-321, 2011.

PEREIRA, L. B. Impetigo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 5, p. 804, 2012.

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

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007. Pierce, C. G., Srinivasan, A., Uppuluri, P., Ramasubramanian, A. K., & López-Ribot, J. L. (2013). Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, 13, 726–730.

POLO, A.; GRAZZIOTIN, N. A. Micoses superficiais em idosos residentes em entidade beneficente na Região Norte do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 1, p. 29-33, 2011.

POWERS, M. E.; WARDENBURG, J. B. Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1-4, 2014.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 183-191, 2012.

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.

RAZERA, F.; STEFANI, S.; BONAMIGO, R. R.; OLM, G. S.; DIAS, C. A. G.; NARVAEZ, G. A. CA-MRSA em furunculose: relato de caso do sul do Brasil. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 515-518, 2009.

RODEN, M. M.; ZAOUTIS, T. E.; BUCHANAN, W. L.; KNUDSEN, T. A.; SARKISOVA, T. A.; SCHAUFEL, R. L.; SEIN, M.; SEIN, T.; CHIOU, C. C.; CHU, J. H.; KONTOYIANNIS, D. P.; WALSH, T. J. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 634-653, 2005.

ROILIDES, E. Invasive candidiasis in neonates and children. **Early Human Development**, v. 87, n. 1, p. 75-76, 2011.

ROOIJAKKERS, S. H. M.; VAN KESSEL, K. P. M.; VAN STRIJP, J. A. G. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 596-601, 2005.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUT, N. E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of essential oils of *Thymus maroccanus* and

Thymus broussonetti and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1057-1060, 2010.

SANDERSON, J. T.; CLABAULT, H.; PATTON, C.; LASSALLE-CLAUX, G.; JEAN-FRANÇOIS, J.; PARÉ, A. F.; HÉBERT, M. J.; SURETTE, M. E.; TOUAIBIA, M. Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 7182–7193, 2013.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Dermatoses ocupacionais. In: Sampaio SAP, Rivitti EA, editores. *Dermatologia*. 3. ed. São Paulo: **Artes Médicas**, p. 1367- 75, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHLOTTFELDT, F. S.; FERNANDES, S. M.; MARTINS, D. M.; CORDEIRO, P.; DA FONSECA, C. D.; WATANABE, M.; VATTIMO, M. F. F. Prevention of amphotericin B nephrotoxicity through use of phytotherapeutic medication. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, p. 73-78, 2015.

SCHMIDT, E.; BAIL, S.; FRIEDL, S. M.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; WANNER, J.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; STOYANOVA, A.; GEISLER, M. Antimicrobial activities of single aroma compounds. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1365-1368, 2010.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 403-423, 2011.

SHWEIZER ML, Furuno JP; Harris AD, et al. Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. **BMC Infectious Disease**, v.11, p. 279, 2011.

SENA, M. F.; GONDIM, L. A. M.; SOUZA, G. C. A.; FERREIRA, M. A. F.; LIMA, K. C. Tratamento de candidíase oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**. v. 53, n. 3, p. 241-245, 2009.

SIDRIM, José J. C.; ROCHA, Marcos F. G. Candidíase. In: SIDRIM, José J. C.;ROCHA, Marcos F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004. Caps. 2 (p. 25-26), 5 (p. 41-42) 9 (p. 89), 25 (p. 265-274).

SILVA, R. L. F. Chapter 8 - Fungal infections in immunocompromised patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010.

SILVA, H. F.; MARTINS-FILHO, P.R.S.; PIVA, M. R. Denture-related oral mucosal lesions among farmers in a semi-arid Northeastern Region of Brazil. **Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugía Bucal**, v. 16, n. 6, p. 740-744, 2011.

SOLOMONS, Graham; FRYHLE, Craig. Ácidos Carboxílicos e seus Derivados. Adição-Eliminação Nucleofílica do Carbono Acílico. In: SOLOMONS, Graham; FRYHLE, Craig. **Química Orgânica**. vol. 2, 10° ed: LTC, Cap. 17, p. 795-799, 2012.

SORRELL, T. N. **Organic Chemistry**, 2nd ed. California: University Science Books, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

STRYJEWSKI, M. E.; SZCZECZ, L. A.; BENJAMIN, JR. D. K.; et al. Use of

vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clinical Infectious Disease**, v. 44, p.190-196, 2007.

TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F. O.; CALIXTO, L. A.; LORENZI, H.; MELHEM, M. S. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 443-449, 2008.

TERRA, M. R.; FURLANETO, M. C.; FURLANETO-MAIA, L. Enterococcus multirresistente a antimicrobianos: um importante patógeno nosocomial. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 3, p. 94-102, 2017.

THAMMAVONGSA V.; MISSIAKAS D. M. SCHNEEWIND, O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. **Science**, v. 342, n. 6160, p. 863–866, 2013.

THAMMAVONGSA, V.; KIM, H. K.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, n. 9, p. 529–543, 2015.

TONARI, K.; MITSUI, K.; YONEMOTO, K. Structure and antibacterial activity of cinnamic acid related compounds. **Journal of Oleo Science**, v. 51, n. 4, p. 271-273, 2002.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER JR, V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**.v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

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

VERONESI, R. Infecções estafilocócicas e estreptocóccas. In: Veronesi R, Focaccia R. **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 861-96.

VILLALOBOS, J. M.; CASTRO, J. A.; AVILÉS, A.; PELÁEZ, M. C.; SOMOGYI, T.; SANDOVAL, L. *Candida parapsilosis*: a major cause of bloodstream infection in a tertiary care hospital in Costa Rica. **Revistachilena de infectología**, v. 33, n. 2, 2016.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Organic Chemistry: Structure and Function**. 6th ed. New York: W. H. Freeman, 2010. 1203p.

XU, Z.; ZHANG, D.; HU, J.; ZHOU, X.; YE, X.; REICHEL, K.; STEWART, N.; SYRENNE, R.; YANG, X.; GAO, P. ET AL. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. **BMC Bioinformatics**, v.10: S3, 2009.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B.; Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**. v.39, n. 3, p. 309-317, 2004

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**.v. 36, p. 223-228, 2003.