



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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Amidas cinâmicas sintéticas e investigação da atividade antifúngica frente às
cepas de *Candida* spp.**

JOICE NASCIMENTO BARBOZA

João Pessoa – PB

2020

JOICE NASCIMENTO BARBOZA

Amidas cinâmicas sintéticas e investigação da atividade antifúngica frente às cepas de *Candida* spp.

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

Orientador: Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

João Pessoa – PB

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

B239a Barboza, Joice Nascimento.

Amidas cinâmicas sintéticas e investigação da atividade antifúngica frente às cepas de *Candida* spp. / Joice Nascimento Barboza. - João Pessoa, 2020.
138 f.

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

1. Atividade anti-*Candida*. 2. Antimicrobiana. 3. Ácido cinâmico. 4. Docking molecular. I. Sousa, Damião Pergentino de. II. Título.

UFPB/BC

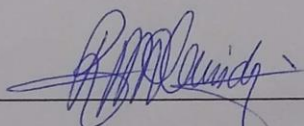
FOLHA DE APROVAÇÃO

Joice Nascimento Barboza

**Amidas cinâmicas sintéticas e investigação da atividade antifúngica
frente às cepas de *Candida* spp.**

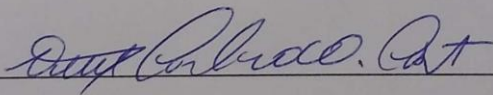
Aprovado em: 04/03/2020

Banca examinadora



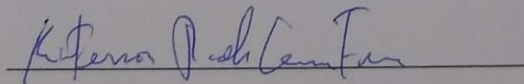
Prof. Dr. Reinaldo Nobrega De Almeida

Presidente da banca



Prof. Dr. Vicente Carlos De Oliveira Costa

Membro interno



Prof. Dr. Kristerson Reinaldo De Luna Freire

Membro externo

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, a Ele é dada toda honra e glória, bem como a todos os familiares, especialmente aos meus pais, irmãos, avós, tio e tias, que sempre estiveram ao meu lado, dando amor, carinho e incentivo. Dedico também ao meu namorado Carlos, que me acompanhou e apoiou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todo amor, bondade e graça. A fé é meu sustento, a Ele toda honra e glória.

A toda minha família, em especial aos meus pais Genilça e Barboza, meus irmãos Eliezio e Hionara, aos meus avôs paternos Antônia e Francisco, aos avôs maternos Antônia e Genésio, minhas tias Eliete e Elizete e meu tio Bonfim. Agradeço por toda dedicação, amor e incentivo, que me levaram a realizar todas as conquistas, bem como me tornaram a pessoa que sou hoje.

Ao meu namorado Carlos, por todo amor, apoio e dedicação durante todos esses anos juntos, que me tornaram uma pessoa melhor e mais feliz. Agradeço também por todo apoio, ajuda e incentivo na vida acadêmica, bem como, por cada dia me levar para mais perto de Deus.

Aos amigos, que fiz durante toda minha vida. Com destaque aos que fiz durante a graduação, Gabriel, Anderson e Catarina. Aos amigos que fiz durante o mestrado, em especial Júnior, Kimberly, Neves, Jociano, Thiago, Severino, Érika e Natan. A Tamara que divide apartamento e sempre me apoiou. Agradeço aos amigos que o Encontro de Jovens com Cristo (EJC) me deu, presentes inesperados que todos os dias me mostram a face de Cristo e me levam até Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, por todas as oportunidades, dedicação, orientação e disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Química Farmacêutica (UFPB): Mayara, Susiany, Rayanne, Marina, Marianna, Severino, Alana, Allana Brunna, Lázaro, Anna e Ana Júlia, por todos os ensinamentos, pela companhia nos dias de trabalho, conversas divertidas e todo apoio durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos técnicos do LMCA, Marcelo e Evandro, por realizar análises de RMN de ^{13}C e ^1H , bem como, a Rayanne do Laboratório Analítico Multiusuário (CCS-UFPB) pelas análises de IV.

Ao Prof. Dr. Ricardo Castro e seus alunos, em especial a aluna de doutorado Danielle, por todo o auxílio na realização dos testes antifúngicos.

A todos os professores que participaram da minha formação acadêmica, em especial os professores do Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e

Sintéticos Bioativos (PPgPNSB). Agradeço especialmente aos professores formadores da banca examinadora de mestrado por todas as contribuições, assim como, ao professor Reinaldo Almeida por todo auxílio e contribuição.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pelo apoio institucional e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

RESUMO

BARBOZA, Joice Nascimento. **Amidas cinâmicas sintéticas e investigação da atividade antifúngica frente às cepas de *Candida* spp.** 138p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2020.

Nas últimas décadas houve um aumento na incidência das doenças fúngicas, mostrando-se como importante causa de morbidade e mortalidade em seres humanos, afetando mais de um bilhão de indivíduos em todo o mundo. As leveduras do gênero *Candida* spp. São fungos patógenos oportunistas, que destacam-se como os mais isolados em amostras clínicas (prevalência de 40-70%). O desenvolvimento de resistência fúngica associado à elevada toxicidade, custo e eficácia dos antifúngicos existentes no mercado, vêm impulsionando à busca por novas alternativas terapêuticas. Os ácidos cinâmicos constituem um grupo de ácidos carboxílicos aromáticos amplamente encontrados em vegetais, que apresentam diversidade estrutural, baixa toxicidade e várias atividades biológicas descritas, com destaque para atividade anti-*Candida*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo preparar uma coleção de treze amidas cinâmicas (**1-13**), estruturalmente relacionadas, e avaliar a atividade antifúngica desses compostos frente a três espécies de *Candida* spp.: *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* e estabelecer a relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas. As amidas foram preparadas utilizando a metodologia de reação de cloreto ácido e os compostos foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e apresentaram rendimentos que variaram de 36 – 85,6%. Dentre as treze substâncias obtidas, duas são inéditas na literatura (**4** e **13**). No teste antifúngico foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) e o ensaio de determinação do mecanismo de ação (sorbitol e ergosterol). Por meio dos resultados de bioatividade pode-se observar que as amidas **1** e **4** demonstraram efeito fungicida frente às cepas de *Candida* spp. O composto **4** apresentou melhor atividade antifúngica com valores de CIM=CFM=0,67 mM, 0,33 mM, 1,34 mM frente à *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, respectivamente. Constatou-se por meio da razão (CFM/CIM<4), que as moléculas exerceram efeito fungicida. No tocante as características estruturais das amidas sobre a bioatividade antifúngica, evidenciou-se a importância das cadeias longas laterais de até oito carbonos. O estudo de docking molecular sugeriu que o possível mecanismo de ação dos compostos bioativos ocorre via multialvos com a inibição do HOS1 como principal alvo biológico. Portanto, pode-se concluir que foi possível estabelecer características químicas que podem servir de referência para o avanço no desenvolvimento de novos protótipos antifúngicos com melhor ação biológica contra espécies de *Candida*.

Palavras-chave: Atividade anti-*Candida*, antimicrobiana, ácido cinâmico, docking molecular.

ABSTRACT

BARBOZA, Joice Nascimento. **Synthetic cinnamic amides and investigation of antifungal activity against *Candida* spp.** 139p. Dissertation (Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products) – Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2020.

In the last decades there has been an increase in the incidence of fungal diseases, showing itself as an important cause of morbidity and mortality in humans, affecting more than one billion individuals worldwide. Yeasts of the genus *Candida* spp. they are opportunistic pathogenic fungi, which stand out as the most isolated in clinical samples (prevalence of 40-70%). The development of fungal resistance associated with the high toxicity, cost and effectiveness of antifungals on the market, has been driving the search for new therapeutic alternatives. Cinnamic acids are a group of aromatic carboxylic acids widely found in vegetables, which have structural diversity, low toxicity and various biological activities described, with emphasis on anti-*Candida* activity. Thus, the present study aimed to prepare a collection of thirteen amides (**1-13**), structurally related, and to evaluate the antifungal activity of these compounds against three species of *Candida* spp.: *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*, as well as to establish the structure-activity relationship of the evaluated substances. The amides were prepared using the acid chloride reaction methodology and the compounds were characterized by infrared and, ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopic techniques and showed yields ranging from 36-85.6%. Among the thirteen substances obtained, two are unprecedented in the literature (**4** and **13**). In the antifungal test, the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), the determination of the minimum fungicidal concentration (CFM) and the test to determine the mechanism of action (sorbitol and ergosterol) were performed. Through the results of bioactivity, it can be observed that amides **1** and **4** demonstrated a fungicidal effect against strains of *Candida* spp. Compound **4** showed better antifungal activity with MIC values=CFM=0.67 mM, 0.33 mM, 1.34 mM against *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*, respectively. It was found through reason (CFM/CIM < 4), that the molecules had a fungicidal effect. The molecular docking study suggested that the possible mechanism of action of bioactive compounds occurs via multi-targets with the inhibition of HOS1 as the main biological target. Therefore, it can be concluded that it was possible to establish chemical characteristics that can serve as a reference for advancing development of new antifungal prototypes with better biological action against *Candida* species.

Key-Words: Anti-*Candida* activity, antimicrobial, cinnamic acid, molecular docking.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Via biossintética dos fenilpropanoides.	32
Esquema 2: Reação de preparação de amidas.	36
Esquema 3: Mecanismo da reação de amidação utilizando cloreto ácido.	37
Esquema 4: Planejamento das etapas do estudo	40
Esquema 5: Esquema geral da reação de cloreto ácido, utilizando como material de partida o cloreto de cinamoíla e diferentes aminas.	42
Esquema 6: Esquema geral da reação de cloreto ácido, utilizando como material de partida o cloreto de cinamoíla e diferentes aminas.	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais classes de antifúngicos disponíveis no mercado.	29
Figura 2: Estrutura química do ácido cinâmico.....	33
Figura 3: Estrutura geral das amidas.....	34
Figura 4: Medicamentos com grupo funcional amida.	35
Figura 5: Exemplos de interações ligante-receptor.	38
Figura 6: Estrutura química do cloreto de cinamoíla.	41
Figura 7: Estrutura química das amidas preparadas (1-13).	41
Figura 8: Estrutura em comum das amidas cinâmicas	49
Figura 9: Os modos de ligação previstos do composto 4 a <i>Candida albicans</i> FOX2 (em cima), MKAR (centro) e HOS1 (em baixo) são mostrados à esquerda. As redes de interações entre o ligante e os receptores ao longo dos instantâneos MD usados para cálculos de MM-PBSA são mostradas à direita. Linhas mais escuras indicam frequências mais altas de interação. Os resíduos são marcados de acordo com a numeração nas sequências listadas na Tabela 10 e apenas os resíduos que interagem com o ligante em mais de 50% dos instantâneos de MD selecionados são marcados. Os receptores são mostrados em cinza e o composto 4 em ciano. O esquema de coloração a seguir é usado para átomos que não sejam de carbono: vermelho para oxigênio, azul para nitrogênio, amarelo para enxofre e laranja para fósforo.	70
Figura 10: Aminas utilizadas como reagentes para preparação das amidas derivadas do cloreto de cinamoíla.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Valores de CIM de 1 , 4 e caspofungina na ausência e presença de sorbitol (0,8M) contra cepas de <i>C. albicans</i> CBS562. Valores expressos em mM (1 e 4) e Caspofungina µM.	61
Quadro 2: Efeito do ergosterol exógeno (1008,44 µM) no 1 e 4 (CIM) contra <i>C. albicans</i> CBS 562 (valores expressos em mM (1 , 4) e µM (nistatina)).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica de <i>Candida</i> spp.	26
Tabela 2: Dados gerais das amidas derivadas do cloreto de cinamoíla.	44
Tabela 3: Espectroscopia de infravermelho – estiramentos (ν) das amidas cinâmicas em cm^{-1}	47
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas 1-4	51
Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas 5-6	52
Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas 7-9	53
Tabela 7: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas 10 – 13	54
Tabela 8: Assinalamentos de RMN de ^{13}C (δ_{C}) das amidas 1-13	56
Tabela 9: Resultados da avaliação para CIM e CFM, bem como a relação (CIM/CFM) das amidas 1, 4 e nistatina e resultados da triagem antifúngica dos compostos 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 contra <i>Candida</i> spp.	58
Tabela 10: Alvos potenciais para o composto 4 identificados pela abordagem de “fishing” do alvo baseada em homologia.	64
Tabela 11: Valores de ancoragem e pontuação de consenso para os 12 alvos investigados.	66
Tabela 12: Energias livres previstas de ligação do composto 4 aos alvos estudados e seus componentes. Os valores de energia são expressos em kcal/mol.	68

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da dietilamida cinâmica (1).	93
Espectro 2: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da dietilamida cinâmica (1).	93
Espectro 3: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da dietilamida cinâmica (1).....	94
Espectro 4: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da dietilamida cinâmica (1).....	94
Espectro 5: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da dietilamida cinâmica (1).....	95
Espectro 6: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da dietilamida cinâmica (1).....	95
Espectro 7: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da isobutilamida cinâmica (2)...	96
Espectro 8: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).....	96
Espectro 9: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).....	97
Espectro 10: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).....	97
Espectro 11: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).....	98
Espectro 12: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).....	98
Espectro 13: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da octilamida cinâmica (3).	99
Espectro 14: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da octilamida cinâmica (3).	99
Espectro 15: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da octilamida cinâmica (3).....	100
Espectro 16: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da octilamida cinâmica (3).....	100
Espectro 17: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) octilamida cinâmica (3).....	101

Espectro 18: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) octilamida cinâmica (3).....	101
Espectro 19: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da dioctilamida cinâmica (4).	102
Espectro 20: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da dioctilamida cinâmica (4).....	102
Espectro 21: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da dioctilamida cinâmica (4).....	103
Espectro 22: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da dioctilamida cinâmica (4).....	103
Espectro 23: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) dioctilamida cinâmica (4).....	104
Espectro 24: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) dioctilamida cinâmica (4).....	104
Espectro 25: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da hexadecilamida cinâmica (5).	105
Espectro 26: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da hexadecilamida cinâmica (5).....	105
Espectro 27: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da hexadecilamida cinâmica (5).....	106
Espectro 28: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da hexadecilamida cinâmica (5).....	106
Espectro 29: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) hexadecilamida cinâmica (5).....	107
Espectro 30: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da oleilamida cinâmica (6). ..	107
Espectro 31: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da oleilamida cinâmica (6).	108
Espectro 32: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da oleilamida cinâmica (6).....	108
Espectro 33: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da oleilamida cinâmica (6).....	109
Espectro 34: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) oleilamida cinâmica (6).....	109
Espectro 35: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da ciclohexilamida cinâmica (7).	110

Espectro 36: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da ciclohexilamida cinâmica (7).....	110
Espectro 37: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da ciclohexilamida cinâmica (7).....	111
Espectro 38: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da ciclohexilamida cinâmica (7).....	111
Espectro 39: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) ciclohexilamida cinâmica (7).....	112
Espectro 40: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da fenilamida cinâmica (8)...112	
Espectro 41: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da fenilamida cinâmica (8).	113
Espectro 42: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da fenilamida cinâmica (8).....	113
Espectro 43: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) fenilamida cinâmica (8).....	114
Espectro 44: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) fenilamida cinâmica (8).....	114
Espectro 45: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 4-clorofenilamida cinâmica (9).....	115
Espectro 46: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, DMSO-d_6) da 4-clorofenilamida cinâmica (9).....	115
Espectro 47: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, DMSO-d_6) da 4-clorofenilamida cinâmica (9).....	116
Espectro 48: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) 4-clorofenilamida cinâmica (9).....	116
Espectro 49: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO-d_6) 4-clorofenilamida cinâmica (09).....	117
Espectro 50: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da benzilamida cinâmica (10).	117
Espectro 51: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da benzilamida cinâmica (10).....	118
Espectro 52: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da benzilamida cinâmica (10).....	118

Espectro 53: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) benzilamida cinâmica (10).....	119
Espectro 54: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) benzilamida cinâmica (10).....	119
Espectro 55: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 4-clorobenzilamida cinâmica (11).....	120
Espectro 56: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4-clorobenzilamida cinâmica (11).....	120
Espectro 57: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4-clorobenzilamida cinâmica (11).....	121
Espectro 58: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) 4-clorobenzilamida cinâmica (11).....	121
Espectro 59: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) 4-clorobenzilamida cinâmica (11).....	122
Espectro 60: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da dibenzilamida cinâmica (12).	122
Espectro 61: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (12).....	123
Espectro 62: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (12).....	123
Espectro 63: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (12).....	124
Espectro 64: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (12).....	124
Espectro 65: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).....	125
Espectro 66: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, DMSO-d_6) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).....	125
Espectro 67: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, DMSO-d_6) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).	126
Espectro 68: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).	126
Espectro 69: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).	127

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FORMÚLAS E SÍMBOLOS

APT – *Attached Proton Test*

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

CBS – Central *Bureau* de Culturas Fúngicas

CC – Cromatografia em Coluna

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CDCl₃ - Clorofórmio deuterado

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Instituto de Padrões para Laboratório Clínico

d – Dubleto

DMSO-*d*₆ - Dimetilsulfóxido deuterado

DNM1 - Dinamina-1

Hex:AcOEt – Mistura de hexano e acetato de etila

HOS1 - Histona desacetilase

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

m – Multiplete

MD - Dinâmica Molecular

NADP - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

ppm– Partes por milhão

REA – Relação estrutura-atividade

R_f – Fator de Retenção

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – singleto

SEA - *Similarity Ensemble Approach*

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNAc - Substituição nucleofílica acílica

t – Tripleto

TCT - Cloreto de trifeniltetrazólio

δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1.	Considerações gerais sobre os fungos	25
2.2.	Gênero <i>Candida</i> e candidíase	26
2.3.	Terapia antifúngica e resistência microbiana	28
2.4.	Produtos Naturais como fonte de novos fármacos	31
2.5.	Considerações gerais sobre o ácido cinâmico e seus derivados	32
2.6.	Considerações sobre as amidas	34
2.6.1.	Reação de obtenção	35
2.7.	Relação entre estrutura química e atividade biológica	37
3.	OBJETIVOS.....	39
3.1.	Objetivo geral	39
3.2.	Objetivos específicos.....	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1.	Planejamento do estudo.....	40
4.2.	Etapa química	42
4.2.1.	Preparação das amidas derivadas do cloreto de cinamoíla.....	42
4.3.	Análise espectroscópica das amidas obtidas	46
4.3.1.	Espectroscopia de infravermelho	46
4.3.2.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	49
4.4.	Etapa Biológica.....	57
4.4.1.	Avaliação da atividade antifúngica das amidas cinâmicas	57
4.4.2.	Mecanismo de ação das amidas cinâmicas com melhor potencial bioativo frente à <i>C. albicans</i> CBS 562.....	60

4.5. Docking molecular	63
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
6. PARTE EXPERIMENTAL - ETAPA QUÍMICA	74
6.1. Substâncias, materiais e métodos utilizados na preparação das amidas cinâmicas	74
6.2. Métodos cromatográficos	75
6.3. Ponto de fusão	75
6.4. Métodos espectroscópicos	75
6.4.1. Infravermelho	75
6.4.2. Ressonância Magnética Nuclear.....	75
6.5. Preparação das amidas 1 a 13	76
6.5. Dados espectroscópicos das amidas 1 – 13	77
6.5.1. Dietilamida cinâmica (1).....	77
6.5.2. Isobutilamida cinâmica (2)	78
6.5.3. Octilamida cinâmica (3).....	78
6.5.4. Dioctilamida cinâmica (4).....	79
6.5.5. Hexadecilamida cinâmica (5)	80
6.5.6. Oleilamida cinâmica (6).....	80
6.5.7. Ciclohexilamida cinâmica (7).....	81
6.5.8. Fenilamida cinâmica (8)	82
6.5.9. 4-Clorofenilamida cinâmica (9).....	83
6.5.10. Benzilamida cinâmica (10)	83
6.5.11. 4-clorobenzilamida cinâmica (11)	84
6.5.12. 4-dibenzilamida cinâmica (12)	85
6.5.13. 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).....	85

7.	PARTE EXPERIMENTAL - ETAPA BIOLÓGICA.....	86
7.1.	Local de trabalho	86
7.2.	Substâncias, materiais e métodos utilizados.....	86
7.3.	Ajuste de inóculo	87
7.4.	Triagem antifúngica	87
7.5.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	87
7.6.	Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	88
7.7.	Determinação do mecanismo de ação	88
7.7.1.	Ensaio de sorbitol.....	88
7.7.2.	Ensaio de ergosterol	89
8.	PARTE EXPERIMENTAL - QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	89
8.1.	Local de trabalho	89
8.2.	Seleção de alvos	89
8.3.	Docking molecular	90
8.4.	Simulações de dinâmica molecular e cálculos de MM-PBSA.....	91
9.	ESPECTROS REFERENTES AOS COMPOSTOS OBTIDOS.....	93
10.	REFERÊNCIAS	128

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um aumento na incidência das doenças fúngicas, mostrando-se como importante causa de morbidade e mortalidade em seres humanos, afetando mais de um bilhão de indivíduos em todo o mundo e causando cerca de 1,5 milhões de mortes por ano (PERFECT, 2017). Tendo em vista que os fungos possuem caráter oportunista, o aumento na incidência das infecções ocorre, principalmente, devido ao crescimento do chamado “grupo de risco”, que é composto por indivíduos em uso prolongado de cateteres, acometidos por doenças como a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) ou em uso de medicamentos (antibióticos, imunossupressores, glicocorticóides e quimioterápicos) (PIANALTO, ALSPAUGH, 2016; LI et al., 2019; ROBBINS et al., 2017).

As leveduras do gênero *Candida* spp. são fungos patógenos oportunistas, que destacam-se como os mais isolados em amostras clínicas (prevalência de 40-70%) e por causar uma ampla variedade de infecções (agudas a crônicas), desde superficiais a sistêmicas (MAGILL et al., 2014; LI et al., 2017). Apesar das opções de antifúngicos existentes no mercado, como os derivados azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e miconazol), poliênicos (nistatina e anfotericina B) e equinocandinas (anidulafungina) (CHANDRASEKAR, 2010), algumas espécies como *C. albicans*, *C. tropicallis* e *C. krusei* já apresentam resistência a esses medicamentos. Dessa forma, tais fatores associados à elevada toxicidade, custo e eficácia dos antifúngicos, e ao fato da maioria destes serem fungistáticos e não fungicidas vem impulsionado à busca por novas alternativas terapêuticas (KHAN et al., 2012; FREIRES et al., 2014).

Os ácidos cinâmicos (C6-C3) constituem-se em um grupo de ácidos carboxílicos aromáticos amplamente encontrados em vegetais, que apresentam diversidade estrutural e baixa toxicidade (SHARMA, 2011). Diversas atividades biológicas de seus derivados foram descritas na literatura, como anti-inflamatória (ANDRADE et al., 2014), antioxidante (SOVA, 2012)

anticancerígena (ANANTHARAJU et al., 2016), hipoglicemiante (ALAM et al., 2016), ações citoprotetoras (SZWAJGIER et al., 2017), antidepressiva (LIU et al., 2010) e atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos (SILVEIRA et al., 2018).

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Química Farmacêutica da UFPB constataram a bioatividade de derivados cinâmicos frente a espécies fúngicas, com destaque para as do gênero *Candida* spp. (NASCIMENTO 2017; FERREIRA, 2018; SILVA, 2018). Tendo em vista a gama de atividades biológicas descritas na literatura referentes ao ácido cinâmico e seus derivados, associado a sua baixa toxicidade, essa classe de substâncias vem se tornando importante alvo de pesquisas (GUZMAN, 2014; TANER et al., 2017).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo preparar uma coleção de treze amidas derivadas do cloreto de cinamoíla, estruturalmente relacionadas, e avaliar a atividade antifúngica desses compostos frente a espécies de *Candida* spp. e estabelecer a relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas com o intuito de obter informações relevantes para o desenvolvimento de agentes anti-*Candida*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações gerais sobre os fungos

Estima-se que há cerca de 8,7 milhões de espécies eucarióticas na terra e o reino Fungi representa o segundo maior grupo, apresentando aproximadamente 611.000 espécies, onde cerca de 600 dessas são patógenos humanos (MORA et., 2011; TEDERSOO et al., 2014; RAJA et., 2017).

Os fungos podem ser leveduriformes ou filamentosos e são microrganismos morfológicamente, filogeneticamente, metabolicamente e ecologicamente diversos, podendo ser encontrados basicamente em todos os ambientes (solo, ar, água, plantas, animais e seres humano) (MARTINS et al., 2007). São importantes degradadores de matéria orgânica, gerando diversas moléculas bioativas e desempenhando papel essencial no equilíbrio ecológico, na agricultura e indústria. Esses microrganismos podem viver em simbiose com outros seres vivos ou parasitar os tecidos humanos causando infecções oportunistas (BROOKS et al., 2013; p. 671-672; RAJA et., 2017).

Nas últimas décadas registrou-se aumento significativo na incidência de doenças fúngicas, com mais de um bilhão de indivíduos afetados em todo o mundo e cerca de 1,5 milhões de mortes por ano, apresentando-se como importante causa de morbidade e mortalidade em seres humanos (BONGOMIN et al., 2017; PERFECT, 2017).

Apesar da ocorrência relativamente baixa das infecções fúngicas em indivíduos saudáveis, o aumento de sua incidência se dá principalmente devido ao crescimento do chamado “grupo de risco”, tendo em vista, o aumento no número de transplantes de órgãos, uso prolongado de cateteres, utilização indiscriminada de antibióticos, imunossupressores, glicocorticóides e quimioterápicos, assim como, surgimento de epidemias de doenças como a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (KRIENGKAUYKIAT et al. 2011; ROBBINS et al., 2017; PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

Entre os principais fungos causadores de infecções oportunistas destacam-se os do gênero *Candida*, apresentando-se como o microrganismo mais isolado em amostras clínicas, com prevalência de 40-70% e como a

quarta principal causa das infecções nasocomiais (PFALLER et al., 2007; MAGILL et al., 2014).

2.2. Gênero *Candida* e candidíase

O gênero *Candida* spp. é composto por mais de 200 espécies diferentes, classificadas taxonomicamente na tabela 1. Apresentando-se na forma de leveduras ovais, que geralmente reproduzem-se de forma assexuada por brotamento, com formação de blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. No entanto, em alguns casos também podem reproduzir-se pela forma sexuada (PAPPAS, 2006; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; WILLIAMS et al., 2013; Yu et al., 2014).

Tabela 1: Classificação taxonômica de *Candida* spp.

Reino	Fungi
Divisão	Eumycota
Subdivisão	Deuteromycotina
Filo	Ascomycota
Classe	Deuteromycetes
Ordem	Cryptococcales
Família	Cryptococcaceae
Gênero	<i>Candida</i>

Fonte: Adaptado de GIOLO; SVIDZINSKI, 2010.

Os fungos pertencentes a esse gênero são encontrados em uma variedade de nichos ecológicos, podendo colonizar a microbiota normal de seres humanos saudáveis, como mucosa oral, gastrointestinal, vaginal e trato geniturinário. São microrganismos oportunistas, que habitam os indivíduos de forma comensal, no entanto, em situações predisponentes, como imunossupressão, podem passar de comensais para patogênicos, resultando na candidíase (WILLIAMS et al., 2013; NEPPELENBROEK et al., 2014).

O termo candidíase é utilizado para denominar as infecções oportunistas causadas por espécies do gênero *Candida*, que podem ser agudas ou crônicas, classificadas em superficiais ou sistêmicas (PEIXOTO et al., 2014).

Cerca de 20 espécies desse gênero foram relatadas como causadoras de candidíase humana, destacando-se como agentes patogênicos mais frequentes: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. Dentre essas, a *C. albicans* é apontada como a mais frequente em amostras clínicas de pacientes acometidos por infecções oportunistas, no entanto, a prevalência de espécies consideradas não-*C.albicans* vem ganhando destaque nos últimos anos, devido ao aumento da resistência aos antifúngicos, principalmente os derivados azóis (SILVA et al., 2012; NG et al., 2015; JEFFERY-SMITH et al., 2018; SADEGHI et al., 2018).

As infecções causadas por *Candida* spp. possuem prevalência endógena, ou seja, resultam de uma modificação na comunidade microbiológica, levando a uma mudança desses microrganismos de comensais para patogênicos. Essas modificações podem ser ocasionadas por deficiências no sistema imunológico, uso de medicamentos, como antibióticos de amplo espectro (ocasiona mudanças na flora bacteriana das mucosas), bem como alterações hormonais, queimaduras, ingestão excessiva de carboidratos, estado nutricional, gravidez e distúrbios metabólicos, como diabetes *mellitus*. Além disso, a candidíase também pode acometer o organismo pela forma exógena, em que o fungo é transmitido de um indivíduo ao outro ou através de locais e objetos contaminados, como por exemplo, com formação de biofilme em materiais médico-hospitalares (RUBY; BARBEAU, 2002; BARBEDO; SGARBI, 2010).

A candidíase pode ser classificada em três tipos: cutânea, mucosa e sistêmica. A infecção cutânea afeta a pele e seus anexos, concentrando-se em regiões mais úmidas do corpo como: mamas, espaços interdigitais, dobras da pele, regiões abaixo das unhas e erupções cutâneas. A candidíase mucosa acomete principalmente as regiões da cavidade oral, gastrointestinal e vaginal, onde normalmente são adquiridas por transmissão sexual, uso de medicamentos e próteses dentárias. Já a sistêmica, também conhecida como candidemia, ocorre quando há disseminação hematogênica ou inoculação do microrganismo em um sítio corporal estéril e pode atingir diversos órgãos. A candidemia é menos frequente que os outros tipos e geralmente acomete

pacientes hospitalizados e imunossuprimidos, no entanto, possui uma taxa de mortalidade de 40%, o que vem despertando alerta nos órgãos de saúde no mundo (SADEGHI et al., 2017; DAVIDSON; NETEA; KULLBERG, 2018; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

A patogenicidade das espécies de *Candida* spp. é atribuída, principalmente, aos fatores de virulência apresentados por esses fungos. Destacando-se a produção de enzimas, como proteinases e lipases (responsáveis pela invasão tecidual), o dimorfismo que é caracterizado pela transição das células da forma de levedura unicelular para filamentosa, ou seja, formação de pseudo-hifas e hifas (dificulta a fagocitose), resistência a variações de pH e temperatura, além da presença de adesinas na parede celular (permitem a formação de biofilme nas mucosas) (MENEZES et al., 2005; BROOKS et al., 2013; SARDI et al., 2013; RODLOFF et al., 2014). O biofilme é definido como comunidade biológica, constituída por uma organização de microrganismos, estruturada, coordenada e funcional, que favorece a aderência a superfícies sólidas ou úmidas, tanto bióticas como abióticas, resultando em uma maior sobrevivência dos fungos, e consequentemente, maior resistência aos agentes antimicrobianos (LIMA, 2018).

2.3. Terapia antifúngica e resistência microbiana

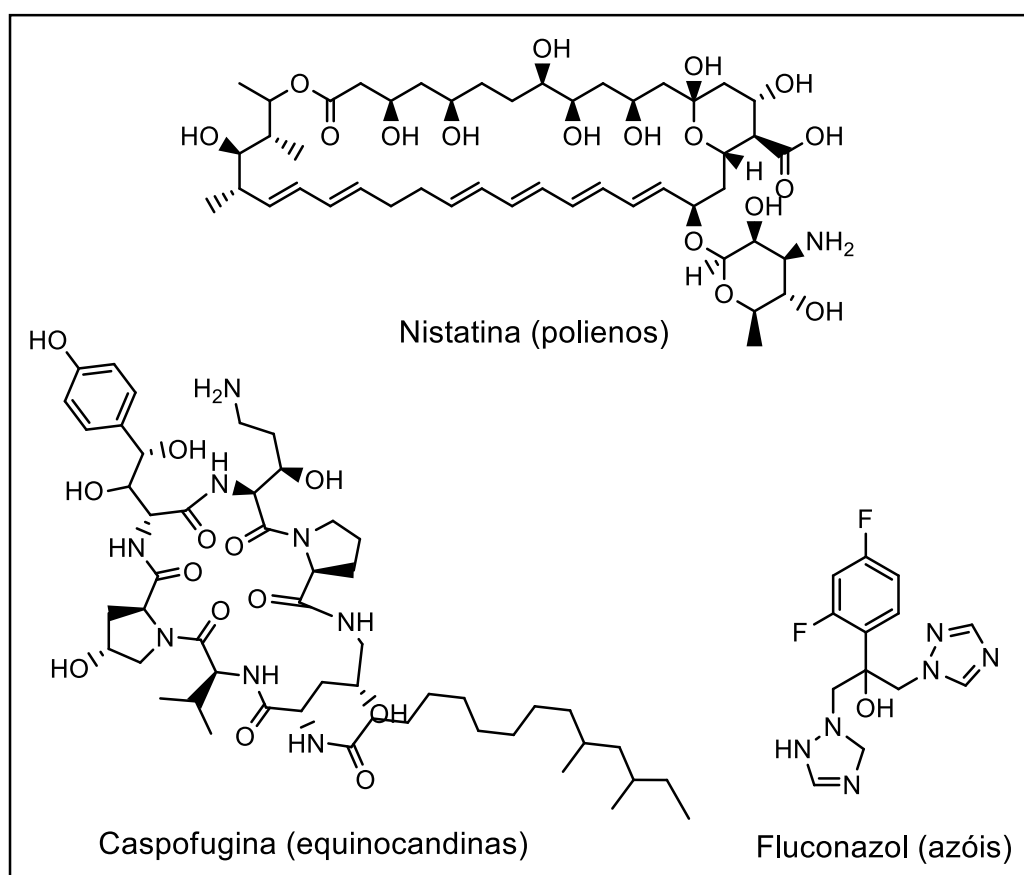
O tratamento medicamentoso das infecções fúngicas está distribuído em uma variedade de agentes antifúngicos, apresentados em diferentes formas farmacêuticas, incluindo as formas oral, tópica e sistêmica, e a escolha geralmente é baseada no tipo de infecção, localização anatômica, nos fatores de risco inerentes ao paciente, na espécie infectante e na sensibilidade da cepa aos antifúngicos disponíveis (GARCIA-CUESTA; SARRION-PEREZ; BAGAN, 2014).

Os fármacos com atividade antifúngica podem agir de duas formas: como fungistáticos ou fungicidas. Os fungistáticos agem inibindo o crescimento celular das espécies de fungos, já os fungicidas atuam por meio da morte celular. Essa divisão é essencial para definição do mecanismo de atuação dos

medicamentos disponíveis no mercado e das novas drogas antifúngicas descobertas (GEDDES-MCALISTER, 2019).

A terapia atual disponível para o tratamento de infecções por *Candida* spp. está concentrada em três classes principais: polienos (nistatina e anfotericina B), azóis (trizólicos e imidazólicos) e equinocandinas (caspofungina e micafungina) (ZARE-SHEHNEH et al., 2014; COLOMBO et al., 2013). As estruturas dos principais representantes de cada classe utilizada no tratamento de infecções por *Candida* spp. estão representadas na Figura 1.

Figura 1: Principais classes de antifúngicos disponíveis no mercado.



Fonte: Próprio autor.

Os polienos são a droga de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* spp. e agem como fungicidas, atuando nos componentes esteroides que constituem a membrana celular fúngica, promovendo ruptura por meio da formação de poros e canais, gerando o extravasamento dos componentes, consequentemente levando a morte celular (HWANG et al., 2014; COSTA, 2017).

A classe dos azóis tem sua efetividade inibindo a produção de 14- α -desmetilase, uma enzima envolvida na síntese do ergosterol, (componente essencial da membrana celular), um sistema enzimático dependente do citocromo P450, dessa forma, havendo prejuízo na síntese do ergosterol e elevando a formação de metilesteroides, alterando a fluidez da membrana celular (SOUSA et al., 2016).

As equinocandinas constituem uma nova classe de antifúngicos de uso parenteral, que agem na produção de β -1,3-glicano sintase (polissacarídeo essencial na composição da parede celular), resultando na ruptura da célula fúngica (COLOMBO et al., 2013; SOURMAGHI et al., 2015).

Embora as classes antifúngicas citadas anteriormente demonstrem atividade frente às espécies de *Candida* spp., esses antimicrobianos apresentam diversas limitações, como os elevados níveis de toxicidade, interações medicamentosas, necessidade de longos períodos de tratamento, surgimento de resistência a medicamentos, que podem impedir significativamente sua aplicabilidade, bem como elevados custos, limitações na eficácia e atividade fungicida (GEDDES-MCALISTER, 2019; DOS SANTOS SCHLOTTFELDT et al., 2015).

A resistência fúngica aos antimicrobianos é o principal problema enfrentado no tratamento das infecções, visto que, esses microrganismos desenvolveram mecanismos como subterfúgio a ação dos medicamentos existentes. Essa resistência pode ser intrínseca (resistente ao fármaco sem exposição prévia) ou adquirida (desenvolve mecanismo de resistência por modificações genéticas, após exposição ao antifúngico) (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

A resistência das espécies fúngicas a classe dos polienos é mais rara quando comparada com as outras classes, ocorrendo de forma intrínseca e geralmente se dá por meio de alterações quantitativas e qualitativas de ergosterol na membrana celular, devido a mutações nos genes da via de biossíntese do ergosterol: *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* e *ERG11* (VINCENT et al., 2013; PERFECT et al., 2017).

Os azóis possuem múltiplos mecanismos para o desenvolvimento de resistência primária e adquirida. O primeiro ocorre por mutações que impedem os azóis de bloquear a atividade catalítica e a amplificação do *ERG11*.

O segundo está relacionado a presença de bombas de efluxo amplificadas ou induzidas para remover os azóis da célula fúngica. Já o terceiro mecanismo ocorre por meio de uma sobrecarga na capacidade inibitória das moléculas *ERG11* do azol (SANGLARD; ODDS, 2002; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). A resistência a essa classe adquirida por *C. glabrata* e a intrínseca de *C. krusei* (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

A resistência as equinocandinas vem ocorrendo devido ao seu amplo uso em ambientes hospitalares nos últimos anos e acontece principalmente por meio de mutações no *FKS1*, que codifica o 1,3-Enzima β -d-glucana que ajuda na formação da parede celular fúngica. A resistência a essa classe é mais comum no gênero *Candida*, em especial *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (PERFECT et al., 2017).

Dessa forma, a resistência das espécies fúngicas, associada à elevada toxicidade, custo e eficácia dos antifúngicos existentes no mercado atualmente, vem impulsionado à busca por novas alternativas terapêuticas. (KHAN et al., 2012; FREIRES et al., 2014).

2.4. Produtos Naturais como fonte de novos fármacos

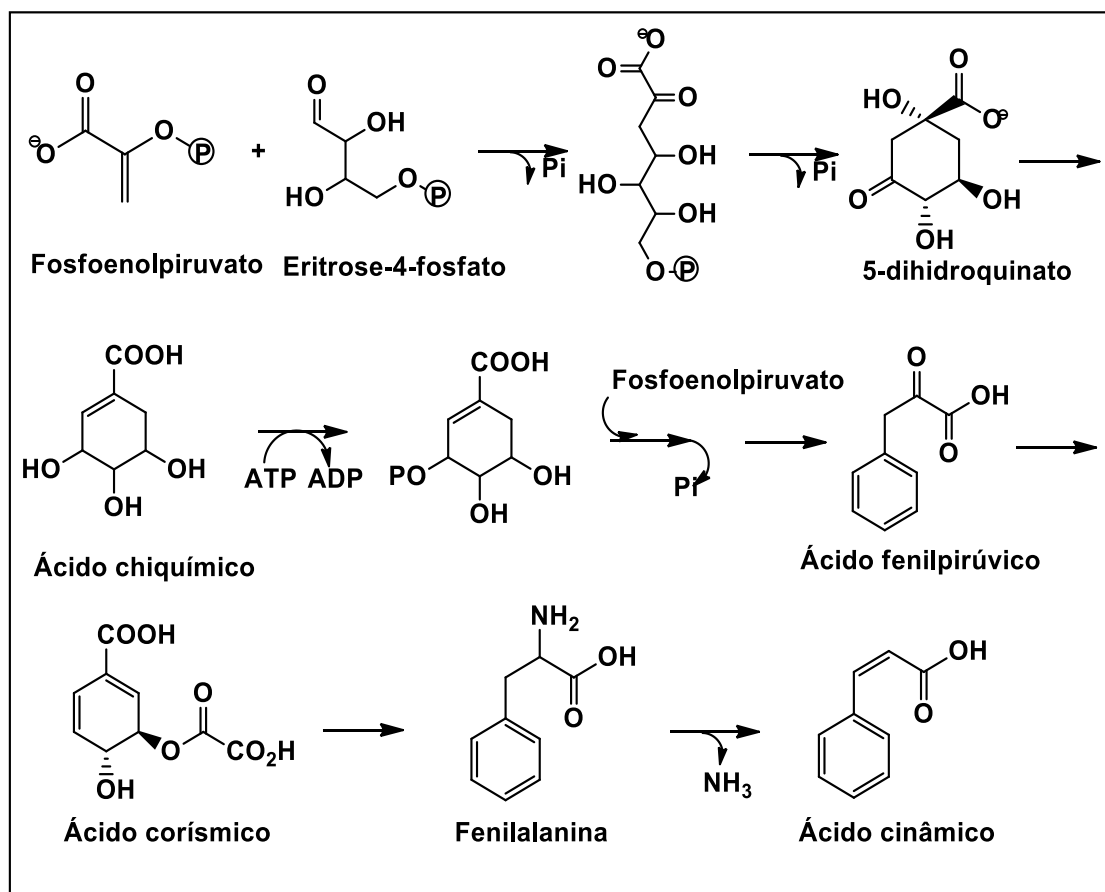
Os produtos naturais são importantes fontes de princípios ativos, com uma ampla gama de atividades biológicas. Dessa forma, nos últimos anos observa-se um crescimento na busca por novos fármacos contendo produtos naturais ou seus derivados em sua composição (NEWMAN; CRAGG, 2016; DINIZ et al., 2019).

Os fenilpropanoides são metabólitos secundários encontrados em uma variedade de plantas. Oriundos da via do ácido chiquímico, esses metabólitos geralmente apresentam-se na natureza na forma oxidativa, com uma hidroxila no anel aromático unido a três carbonos (C6-C3) (RAJPUT et al., 2018; VANHOLME, HOUARI, BOERJAN, 2019).

A biossíntese dos fenilpropanoides ocorre inicialmente com a formação do ácido chiquímico, a partir de dois metabólitos da glicose, fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato. Em seguida, o ácido chiquímico se une a uma molécula de fosfoenolpiruvato, formando o ácido corísmico, que por sua vez, origina os

aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), que sofrem ação de enzimas para originar os fenilpropanóides, como o ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico (DEWICK, 2009). A rota biossintética para formação dos fenilpropanóides encontra-se no Esquema 1.

Esquema 1: Via biossintética dos fenilpropanoides.



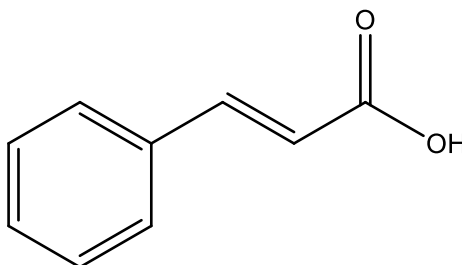
Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009.

2.5. Considerações gerais sobre o ácido cinâmico e seus derivados

O ácido cinâmico (ácido 3-fenilprop-2-enóico) (Figura 2) constitui um ácido carboxílico aromático (C6-C3) amplamente encontrado em vegetais, (SHARMA, 2011). O termo "cinâmico" está associado à *Cinnamomum verum* (Sin. *C. zeylanicum*), conhecida popularmente como "canela", de onde essa substância pode ser extraída (PITTMAN, 2011). No entanto, faz parte da composição de uma grande lista de frutas e vegetais,

incluindo o manjeriço, folhas de cacau, morango, carambola, dentre outros (YILMAZ; SOVA; ERGUN, 2018).

Figura 2: Estrutura química do ácido cinâmico.



Fonte: Próprio autor.

O ácido cinâmico e seus derivados (ésteres, amidas, aldeídos e alcoóis) apresentam uma gama de atividades biológicas descritas na literatura, como anti-inflamatória (ANDRADE et al., 2014), antioxidante (SOVA, 2012) anticancerígena (ANANTHARAJU et al., 2014), hipoglicemiante (ALAM et al., 2016), ações citoprotetoras (SZWAJGIER et al., 2017), antidepressiva (LIU et al., 2010) e atividade antimicrobiana significativa frente a bactérias e fungos. No entanto, o mecanismo pelo qual agem ainda permanece pouco conhecido. Portanto, diversas pesquisas na área da química medicinal vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de produzir compostos alternativos derivados do ácido cinâmico, potencializando suas atividades farmacológicas (GUZMAN, 2014; SILVEIRA et al., 2018).

Além disso, o ácido cinâmico em complexo com ureia apresentou atividade moderada frente à *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (OHLAN et al., 2008). Derivados cinâmicos também apresentaram bioatividade frente a três diferentes cepas de *Candida albicans* (ATCC-76645, LM-106 e LM-23) (LIMA et al., 2018).

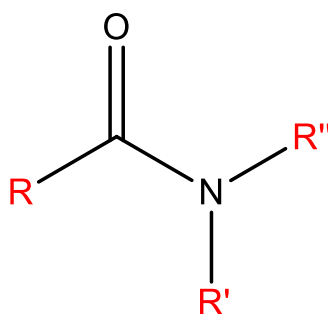
Dados da literatura relatam que o ácido cinâmico possui baixa toxicidade, apesar de sua estrutura ser semelhante a compostos toxicamente mais ativos como a cumarina e estireno, em testes de toxicidade aguda frente a porquinho-da-india, ratos e camundongos o ácido cinâmico apresentou DL₅₀ (dose capaz de matar 50% da população) maior que 5000 mg/kg, além de não promover alterações hepáticas em ratos submetidos a longos tratamentos com

este composto (HOSKINS, 1984). Em adição, o ácido cinâmico não demonstrou características citotóxicas frente a células de ovário de hamster chinês, bem como apresentou atividade antigenotóxica através da inibição de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) induzidos pelo peróxido de hidrogênio em linfócitos humanos (TANER et al., 2017). Deste modo, um dos objetivos deste estudo foi preparar uma coleção de amidas cinâmicas para investigação da atividade antifúngica.

2.6. Considerações sobre as amidas

As amidas (Figura 3) são derivadas de ácidos carboxílicos que possuem como característica a presença de uma carbonila ligada a um nitrogênio ($R-CON-R'$), são encontradas em todos os seres vivos, principalmente, em proteínas e ácidos nucleicos (MCMURRY, 2016). Quanto às características físico-químicas, geralmente, são polares, sólidas em temperatura ambiente, pouco reativas quando comparadas com outros derivados de ácidos carboxílicos e formam entre si ligações de hidrogênio altamente estáveis, exceto amidas terciárias pois não possuem hidrogênio ligado ao nitrogênio. Além disso, frequentemente apresentam altos pontos de ebulição e fusão (VALEUR; BRADLEY, 2009).

Figura 3: Estrutura geral das amidas.



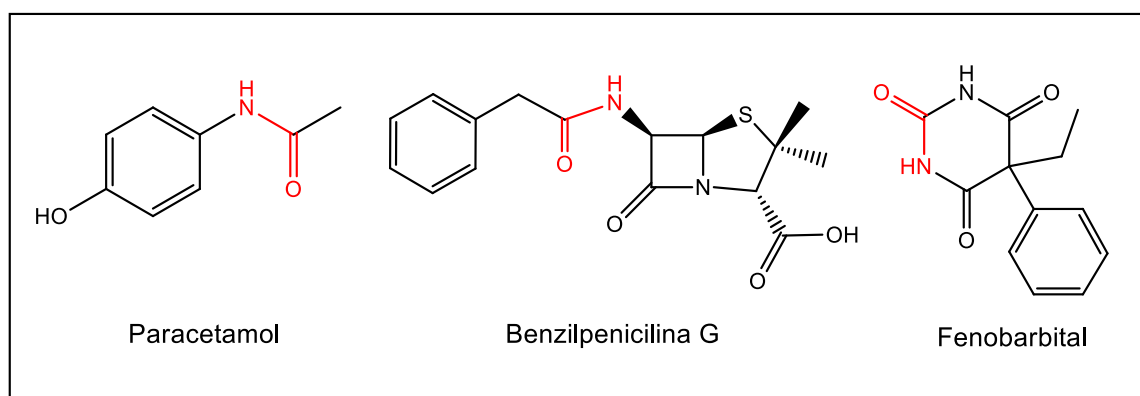
Fonte: Adaptado de MCMURRY, 2016.

As amidas são bases fracas quando comparadas às aminas, visto que o par de elétrons livres presentes no nitrogênio são atraídos pelo oxigênio da carbonila devido à eletronegatividade deste átomo. Isso resulta na formação de um momento dipolo na molécula promovendo aumento da polaridade e capacidade de solvatação em solventes próticos como água devido à formação

de ligações de hidrogênio, aumentando a estabilidade destes compostos como citado anteriormente (IUPAC, 1997).

As amidas têm grande relevância na indústria farmacêutica, visto que atualmente diversos fármacos possuem esta estrutura como grupo funcional (Figura 4), dentre eles destacam-se: paracetamol usualmente utilizado como analgésico e antipirético; penicilinas como a benzilpenicilina G que possui propriedades antibacterianas; fenobarbital da classe dos barbitúricos usados como sedativos, hipnóticos e anticonvulsivantes (JÓŹWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014; HENDERSON et al., 2019; PACIFICI, 2016).

Figura 4: Medicamentos com grupo funcional amida.



Fonte: Próprio autor.

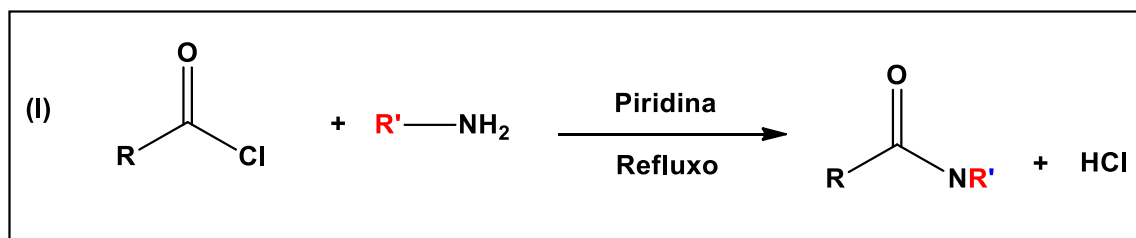
Com relação às metodologias de preparação destes compostos, a maioria envolve a interação entre ácidos carboxílicos e aminas, todavia, torna-se necessário converter o ácido carboxílico em um derivado mais reativo como cloretos ácidos ou anidridos, visto que a reação entre ácidos carboxílicos e aminas resulta na formação de um sal à temperatura ambiente em vez da amida (DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016; JONES, 1992). Deste modo, a coleção de amidas deste estudo foi preparada através da reação entre um haleto ácido, o cloreto de cinamoíla, e aminas primárias e secundárias.

2.6.1. Reação de obtenção

Levando em consideração a importância, ubiquidade e aplicabilidade da função química amida, o desenvolvimento de metodologias de rápido preparo, simples e com bons rendimentos é visado pelos pesquisadores e indústrias

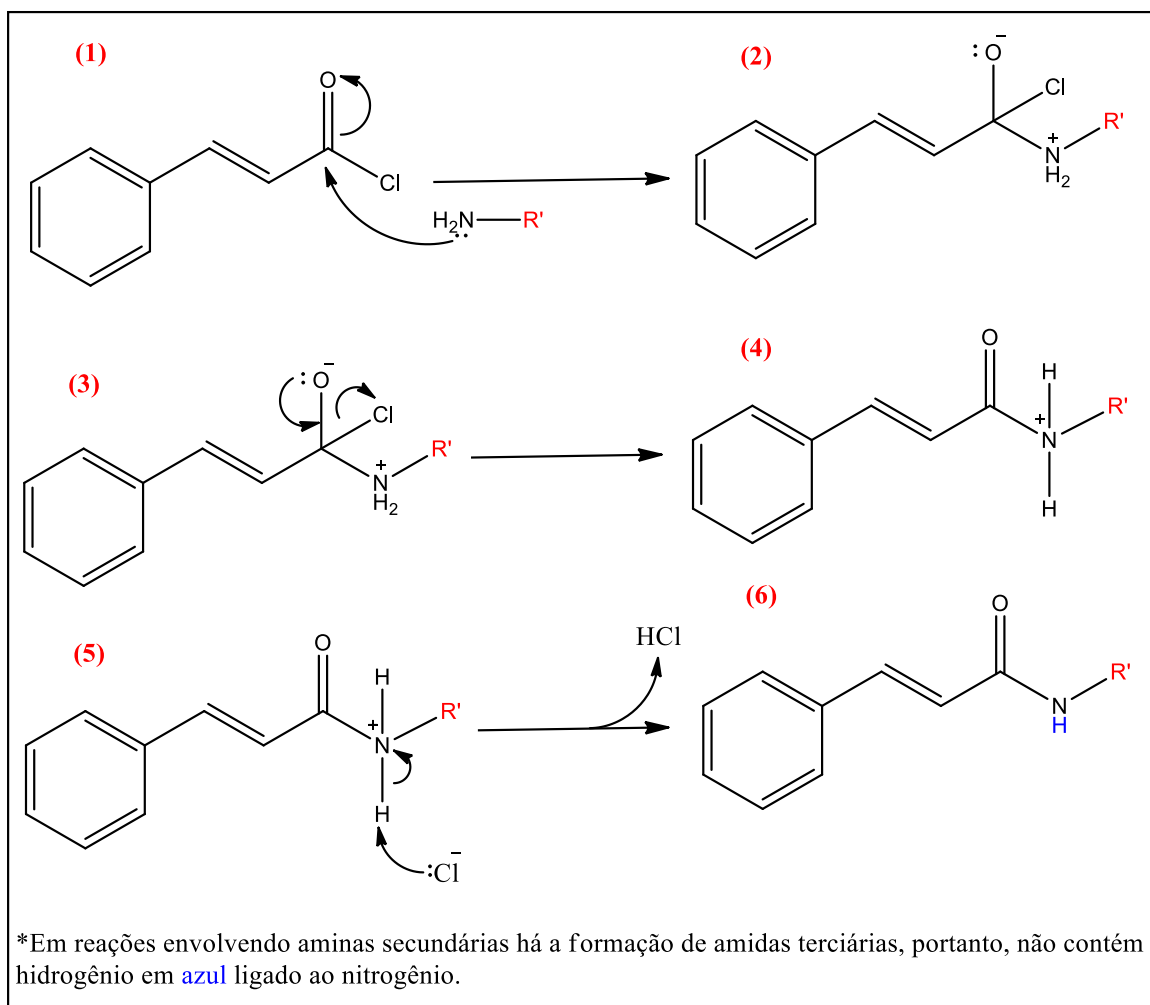
farmacêuticas. Portanto no esquema 2 está representado um exemplo de reação de amidação do cloreto de cinamoíla utilizado nesse estudo (JÓŻWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014; DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016; JONES, 1992).

Esquema 2: Reação de preparação de amidas.



Fonte: Próprio autor

A reação de cloreto ácido trata-se de amidação utilizando haletos ácidos e amina, na presença de um solvente anidro, como a piridina. O mecanismo de reação está descrito no esquema 3 e consiste em uma reação de substituição nucleofílica acíclica (S_NAc). Inicialmente, um par de elétrons do nitrogênio da amina ataca o carbono eletrofílico da carbonila em **1**, havendo a quebra da ligação π entre carbono e oxigênio com a formação de uma molécula tetraédrica em **2**. Deste modo, um par de elétrons presentes no oxigênio restauram a ligação π com o carbono em **3**, reestabelecendo a carbonila com a saída do cloro (grupo abandonador) em **4**. Com isso, ocorre a desprotonação do nitrogênio em **5**, formando a amida em **6** (DIMMOCK et al., 1998; MCMURRY, 2016).

Esquema 3: Mecanismo da reação de amidação utilizando cloreto ácido.

Fonte: Adaptado de MCMURRY, 2016.

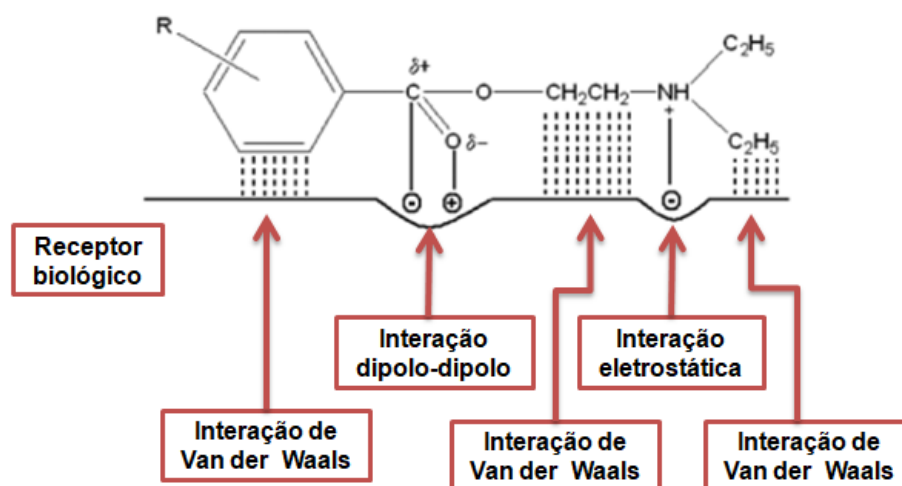
2.7. Relação entre estrutura química e atividade biológica

No âmbito da química medicinal o termo “relação estrutura-atividade” (REA), corresponde à avaliação dos efeitos causados pela estrutura química de uma determinada substância sobre um alvo biológico, interferindo, dessa forma, na sua bioatividade (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

Diversas pesquisas realizadas em química medicinal buscam relacionar a estrutura química dos compostos com suas respectivas atividades biológicas. Dessa forma, sabe-se que determinadas características químicas podem alterar a bioatividade dos compostos, tais como: propriedades físico-químicas, solubilidade, polaridade, características eletrônicas, parâmetros estéricos, extensão da cadeia carbônica, forças intermoleculares, dentre outras que

podem influenciar na interação entre fármaco e receptor (Figura 5) (ECKERT, BAJORATH, 2007; LI et al., 2019; BI et al., 2019).

Figura 5: Exemplos de interações ligante-receptor.



Fonte: Adaptado de ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010.

Dessa forma, para que ocorra o entendimento da influência da estrutura química do composto sobre a atividade biológica é necessária a utilização de algumas metodologias de análise comparativa de um conjunto de compostos estruturalmente relacionados originados de um modelo com características físico-químicas bem delimitadas na literatura. Portanto, para que possa aumentar a afinidade das substâncias pelo alvo biológico ou reduzir a toxicidade, é necessária a realização de alterações estruturais como: tamanho e conformação do esqueleto carbônico, introdução de grupos substituintes ou de centros estereogênicos (BARREIRO; FRAGA, 2014, LIMA, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Preparar e avaliar a atividade antifúngica de uma coleção de amidas estruturalmente relacionadas derivadas do cloreto de cinamoíla e estabelecer uma relação estrutura-atividade.

3.2. Objetivos específicos

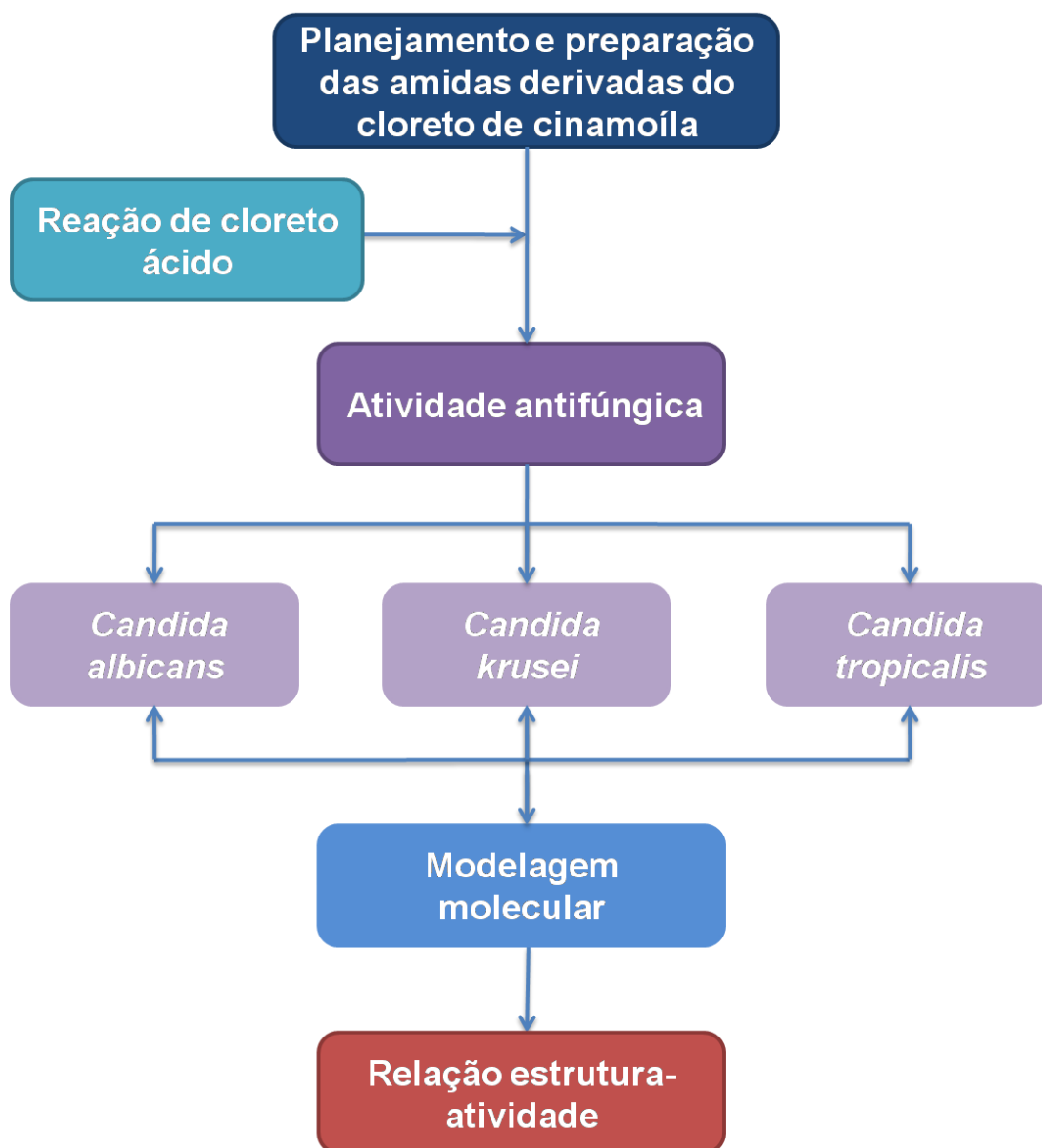
- Preparar e purificar treze amidas derivadas do cloreto de cinamoíla;
- Avaliar a atividade antifúngica das substâncias frente cepas de *Candida* spp.;
- Traçar uma relação estrutura-atividade das amidas preparadas;
- Determinar a influência dos grupos substituintes na atividade biológica dos derivados via cálculos teóricos auxiliados por computador;
- Estabelecer características estruturais químicas para o desenvolvimento de agentes antifúngicos com melhor perfil biológico;

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Planejamento do estudo

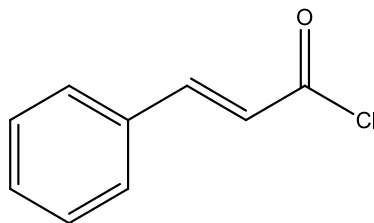
O presente estudo foi realizado seguindo as etapas do planejamento descrito no Esquema 4.

Esquema 4: Planejamento das etapas do estudo



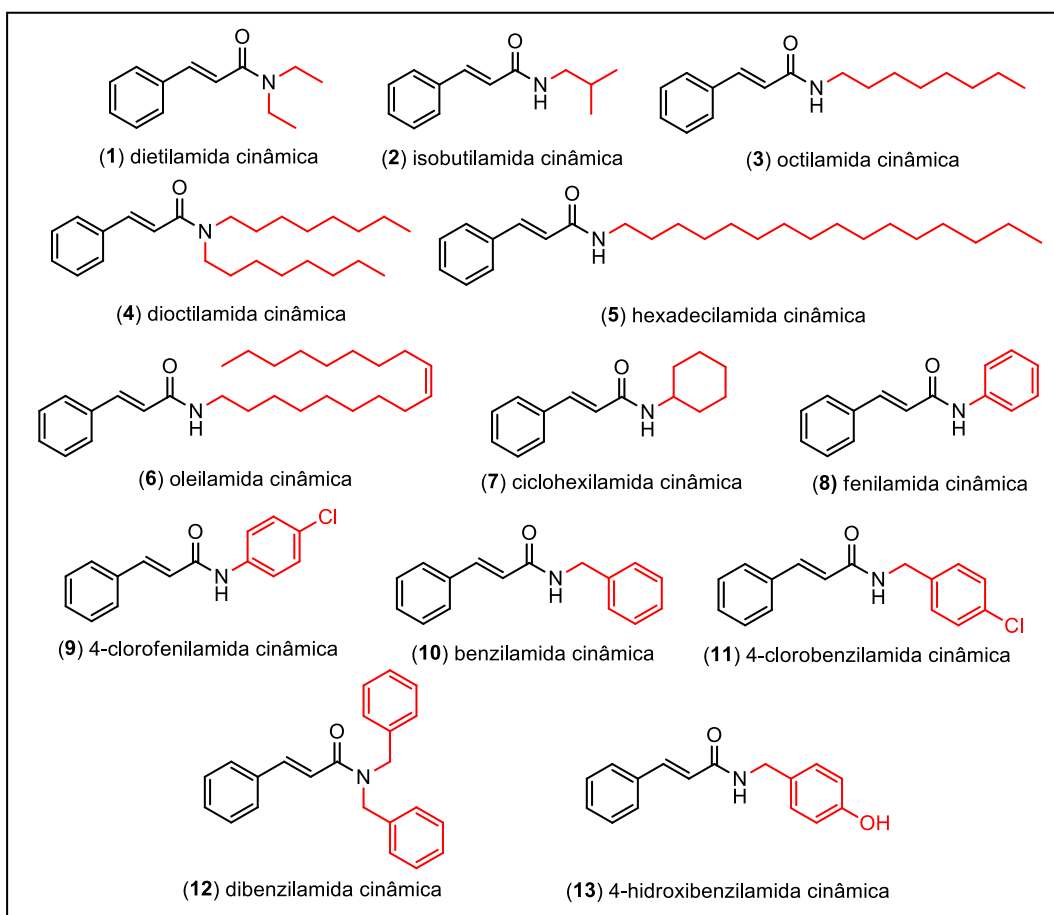
Fonte: Próprio autor.

Foram preparadas treze amidas estruturalmente relacionadas derivadas do cloreto de cinamoíla (Figura 2) através de reação do cloreto de cinamoíla com aminas.

Figura 6: Estrutura química do cloreto de cinamoíla.

Fonte: Próprio autor.

As amidas foram purificadas e tiveram suas estruturas confirmadas por técnicas de Espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . Em seguida, avaliou-se a capacidade antifúngica dessas substâncias frente a cepas de *Candida* spp. e estabeleceu-se uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica, bem como, realizou-se um estudo *in silico* dos produtos obtidos. As estruturas de todas as amidas preparadas no estudo estão listadas na figura 7.

Figura 7: Estrutura química das amidas preparadas (1-13).

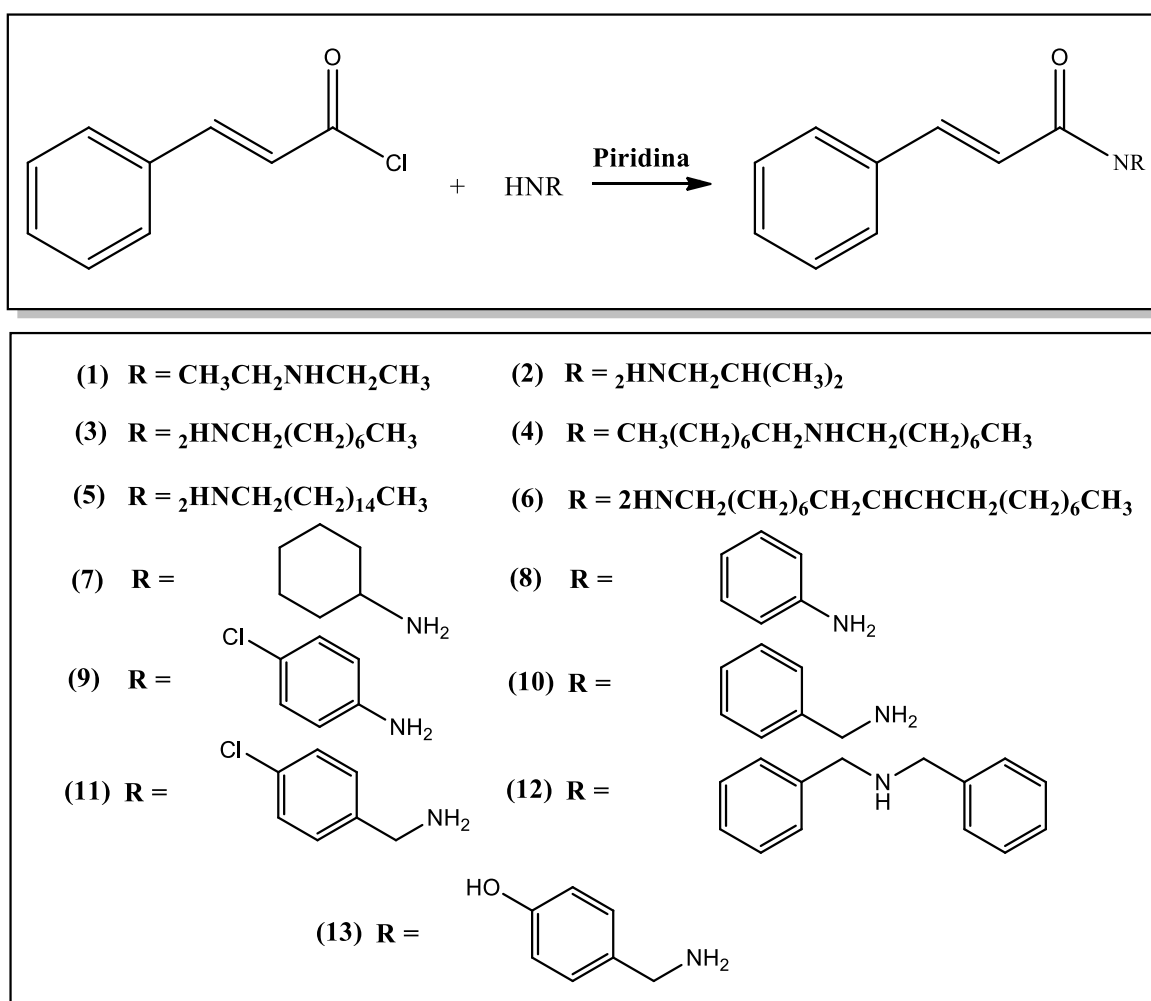
Fonte: Próprio autor.

4.2. Etapa química

4.2.1. Preparação das amidas derivadas do cloreto de cinamoíla

Conforme demonstrado no esquema 5, as amidas (**1** a **13**) foram obtidas por meio da reação entre o cloreto de cinamoíla e diferentes aminas estruturalmente relacionadas, utilizando a piridina como agente desprotonador da amina. A formação de todos os produtos foi monitorada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila. As aminas utilizadas nas reações foram: dietilamina, isobutilamina, octilamina, dioctilamina, hexadecilamina, oleilamina, ciclohexilamina, anilina, 4-cloroanilina, benzilamina, 4-clorobenzilamina, dibenzilamina e 4-hidroxibenzilamina (NARASIMHAN et al., 2004; DIMMOCK et al., 1998).

Esquema 5: Esquema geral da reação de cloreto ácido, utilizando como material de partida o cloreto de cinamoíla e diferentes aminas.

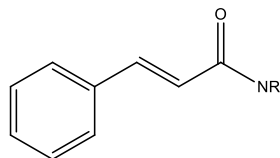


Fonte: Próprio autor.

A reação ocorre através de uma substituição nucleofílica acílica (S_NAc) em que par de elétrons do nitrogênio da amina ataca o carbono eletrofílico da carbonila havendo a quebra da ligação π entre carbono e oxigênio, seguido da restauração da ligação π com o carbono, reestabelecendo a carbonila com a saída do cloro, formando a amida (mecanismo no esquema 3, p. 37).

Desta forma, obtiveram-se as amidas: dietilamida cinâmica (**1**), isobutilamida cinâmica (**2**), octilamida cinâmica (**3**), dioctilamida cinâmica (**4**), hexadecilamida cinâmica (**5**), oleilamida cinâmica (**6**), ciclohexilamida cinâmica (**7**), fenilamida cinâmica (**8**), 4-clorofenilamida cinâmica (**9**), benzilamida cinâmica (**10**), 4-clorobenzilamida cinâmica (**11**), dibenzilamida cinâmica (**12**), 4-hidroxibenzilamida cinâmica (**13**). As substâncias **1** a **13** foram obtidas em tempo de 5 a 24 horas e apresentaram rendimentos médio a bons, variando de 36 a 85,6%, no entanto, o composto **13** apresentou rendimento relativamente menor, visto que houve formação de um subproduto.

Na tabela 2 encontram-se os dados reacionais, informações de purificação, rendimentos dos compostos preparados, pontos de fusão e fatores de retenção (R_f) em uma mistura de hexano e acetato de etila (Hex: AcOEt). Entre os compostos preparados, as amidas **4** e **13** são inéditas na literatura.

Tabela 2: Dados gerais das amidas derivadas do cloreto de cinamoíla.

Produto	R	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Massa (mg)	Rendimento (%)	Tempo de reação (h)	Aspecto	Purificação em coluna (Hex:AcOEt)	Ponto de fusão (°C)	R _f (hexano/AcOEt) 7:3
1	dietil	C ₁₃ H ₁₇ NO	203,28	81,7	67	6	Sólido amarelo	-	65-66	0,4
2	isobutil	C ₁₃ H ₁₇ NO	203,28	89,9	73,7	6	Sólido amarelo	-	107-108	0,5
3	octil	C ₁₇ H ₂₅ NO	259,39	133,3	85,6	8	Sólido amarelo	-	78-79	0,6
4	diocil	C ₂₅ H ₄₁ NO	371,60	140,9	63,2	16	Óleo amarelo	80:20	-	0,8
5	hexadecil	C ₂₅ H ₄₁ NO	371,60	95,0	42,6	18	Sólido branco	70:30	178-179	0,5
6	oleil	C ₂₇ H ₄₃ NO	397,64	100,4	42,1	24	Líquido amarelo	80:20	-	0,7
7	ciclohexil	C ₁₅ H ₁₉ NO	229,32	56,8	41,3	24	Sólido branco	80:20	86-87	0,7
8	fenil	C ₁₅ H ₁₃ NO	223,27	69,9	52,2	16	Sólido marrom	70:30	151-152	0,6

9	4-clorofenil	$C_{15}H_{12}ClNO$	257,71	75,8	49	16	Sólido marrom	70:30	182-183	0,6
10	benzil	$C_{16}H_{15}NO$	237,30	101,8	71,2	16	Sólido branco	60:40	109-110	0,4
11	4-clorobenzil	$C_{16}H_{14}ClNO$	271,74	80,5	49,3	15	Sólido amarelo	80:20	127-128	0,7
12	dibenzil	$C_{23}H_{21}NO$	327,42	101,2	61,6	16	Sólido amarelo	60:40	157-158	0,4
13	4-hidroxibenzil	$C_{16}H_{15}NO_2$	253,30	54,7	36	5	Cristal branco	40:60	188-189	0,1

Fonte: Próprio autor

4.3. Análise espectroscópica das amidas obtidas

A caracterização estrutural dos produtos foi determinada por meio das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Carbono Treze (RMN de ^{13}C).

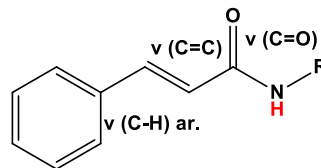
4.3.1. Espectroscopia de infravermelho

Na tabela 3 encontram-se os principais dados de espectroscopia de infravermelho característicos para as amidas derivadas do cloreto de cinamoíla. Conforme observados nos dados de infravermelho, é possível determinar a presença e/ou ausência de grupos funcionais característicos das respectivas estruturas químicas.

Dessa forma, a partir dos espectros das substâncias possibilitou-se a determinação de sinais característicos norteadores: como bandas de absorção entre $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C-H sp^3 ; sinais entre $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento C-H dos carbonos sp^2 , um sinal forte em torno de 1650 cm^{-1} pertencente ao estiramento da carbonila das amidas (C=O). Os sinais aos pares em torno de 1600 e 1475 cm^{-1} são referentes ao estiramento C=C de anéis aromáticos e por fim um sinal em aproximadamente 3290 cm^{-1} refere-se ao estiramento N-H de amidas secundárias, no entanto, as amidas (**1**), (**4**) e (**12**), por serem amidas terciárias, não apresentam esse sinal.

Tabela 3: Espectroscopia de infravermelho – estiramentos (V) das amidas cinâmicas em cm^{-1} .

Os compostos **01**, **04** e **12** não possuem estiramento N-H, pois **não possuem o H** em vermelho, logo são amidas terciárias.



R = Dietila (01)	R = Oleíla (06)	R = 4-clorobenzila (11)
R = Isobutila (02)	R = Ciclohexila (07)	R = Dibenzila (12)
R = Octila(03)	R = Fenila (08)	R = 4-hidroxibenzila (13)
R = Dioctila (04)	R = 4-clorofenila(09)	
R = Hexadecila (05)	R = Benzila (10)	

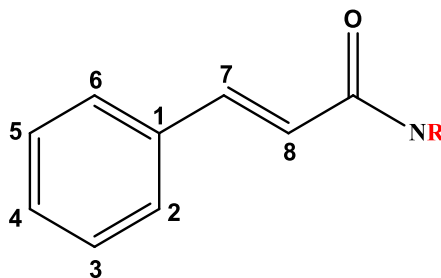
Amida	V(N-H)	V(C-H) sp^2 aro.	V(C-H) sp^3	V(C=O)	v(C=C)ar.
01	-	3028	2968	1648	1595; 1461
02	3271	3082	2961	1655	1618; 1469
03	3311	3059	2924	1655	1618; 1467
04	-	-	2958	1650	1605; 1459

05	3296	3057	2921	1653	1613; 1470
06	3294	3063	2925	1656	1618; 1467
07	3278	3080	2932	1655	1618; 1497
08	3271	3036	-	1662	1625; 1495
09	3297	3097	-	1661	1624; 1491
10	3265	3029	2926	1653	1616; 1497
11	3259	3083	2921	1655	1621; 1489
12	-	3084	2982	1643	1593; 1495
13	3246	3066	2969	1649	1614; 1465

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

De acordo com os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Tabelas 4, 5, 6 e 7) e de ^{13}C obtidos (Tabela 8), pode-se confirmar a formação das amidas cinâmicas preparadas. A caracterização foi realizada a partir de comparações com dados já existentes na literatura.

Figura 8: Estrutura em comum das amidas cinâmicas



Fonte: Próprio autor.

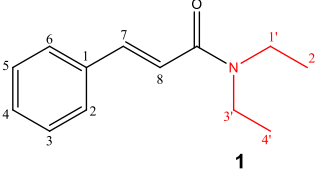
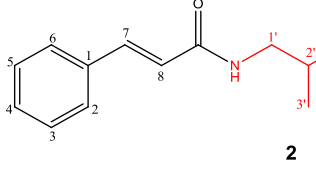
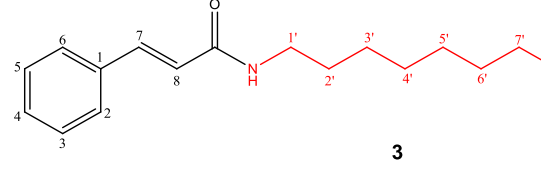
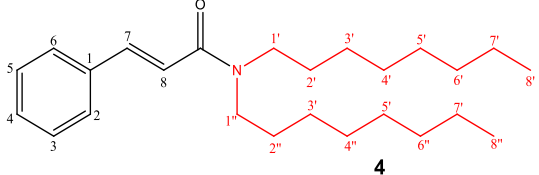
Nos espectros de RMN de ^1H e suas ampliações foi observado por meio dos deslocamentos químicos, que as amidas cinâmicas possuem sete hidrogênios em comum (Figura 8), sendo cinco hidrogênios (**H-2**, **H-3**, **H-4**, **H-5** e **H-6**) pertencentes ao anel aromático e dois hidrogênios olefínicos (**H-7**, **H-8**) referentes à cadeia carbônica lateral ligada ao **C-1**.

Tendo em vista os sinais comuns para todos análogos, o sinal de hidrogênio mais desprotegido do espectro foi o do hidrogênio olefínico, que apresentou-se em forma de dubleto próximo à δ_{H} 7,60 ppm (**H-7**), acoplado ao hidrogênio vizinho que apresenta um sinal em forma de dubleto em torno de δ_{H} 6,53 ppm (**H-8**), a configuração da dupla ligação é *trans*, visto que o valor da constante de acoplamento (*J*) é próximo à 16 Hz. No entanto, em alguns espectros o hidrogênio referente às amidas secundárias (**N-H**) apareceu como o mais desprotegido, com sinal em forma de singlete em torno de δ_{H} 9,0 ppm e em outros casos, esse sinal foi observado mais protegido, com deslocamento próximo a δ_{H} 6,1 ppm. Além disso, há um sinal em forma de multipeto com integral para dois hidrogênios referentes aos hidrogênios na posição *orto* do anel aromático (**H-2**, **H-6**) próximo à δ_{H} 7,44 ppm e, por fim, um sinal em forma de multipeto com integral para três hidrogênios referentes aos hidrogênios das posições *meta* e *para* do anel aromático (**H-3**, **H-4** e **H-5**), com deslocamento químico de aproximadamente δ_{H}

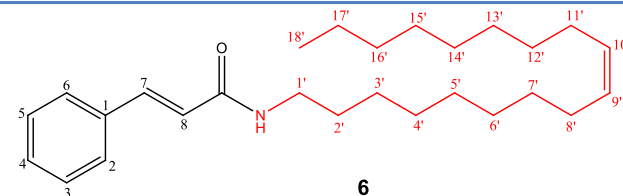
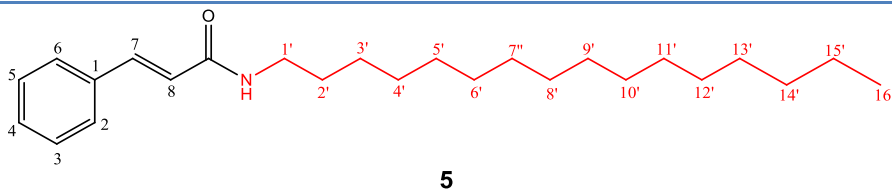
7,30 ppm. Em algumas exceções, em que há como grupo um anel aromático, ocorre sobreposição dos sinais referentes aos anéis aromáticos, podendo haver dificuldade de calcular as integrais.

No que se refere aos espectros de RMN de ^{13}C e suas ampliações observou-se por meio dos deslocamentos químicos que as amidas cinâmicas possuem nove carbonos em comum. Um sinal próximo à δ_{C} 166,0 ppm atribuído à carbonila (**C=O**) das amidas; um sinal em torno de δ_{C} 141,3 ppm pertencente ao carbono olefínico (**C-7**). Além disso, há um sinal em δ_{C} 135,0 ppm atribuído ao carbono aromático (**C-1**) adjacente ao grupo olefínico. Em seguida, há a presença de um sinal em torno de δ_{C} 129,6 ppm pertencente aos carbonos *meta* do anel aromático (**C-3**, **C-5**), posterior a esse aparece um sinal em torno de δ_{C} 128,8 ppm pertencente aos dois carbonos *orto* do anel aromático (**C-2**, **C-6**) e outro com deslocamento químico de aproximadamente δ_{C} 127,8 ppm referente ao carbono na posição *para* ao anel aromático (**C-4**). Além disso, observa-se a presença de um sinal próximo a δ_{C} 120,3 ppm atribuído ao carbono olefínico (**C-8**).

Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas 1-4.

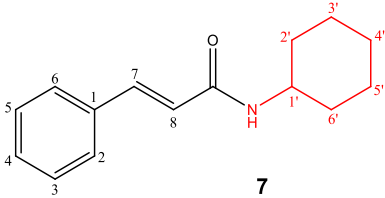
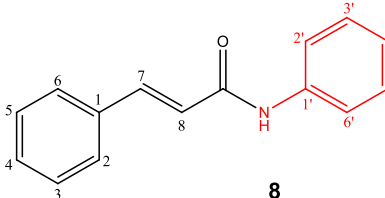
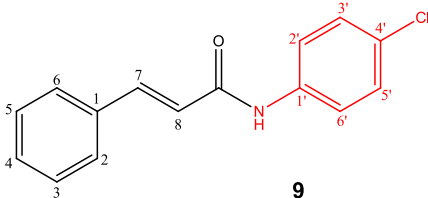
Carbonos				
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-	-
2, 6	7,51 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 2H)	7,46 (<i>m</i> , 2H)	7,48 (<i>dd</i> , $J=6,3$ Hz, 2,8 Hz, 2H)	7,50 (<i>dd</i> , $J=7,8$ Hz, 1,6 Hz, 2H)
3, 5	7,34 (<i>m</i> , 2H)	7,29 (<i>m</i> , 2H)	7,33 (<i>m</i> , 2H)	7,36 (<i>m</i> , 2H)
4	7,34 (<i>m</i> , 3H)	7,29 (<i>m</i> , 1H)	7,33 (<i>m</i> , 1H)	7,36 (<i>m</i> , 1H)
7	7,70 (<i>d</i> , $J=15,4$ Hz, 1H)	7,62 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	7,61 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	7,69 (<i>d</i> , $J=15,4$ Hz, 1H)
8	6,82 (<i>d</i> , $J=15,4$ Hz, 1H)	6,49 (<i>m</i> , 1H)	6,42 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	6,82 (<i>d</i> , $J=15,4$ Hz, 1H)
1'	3,48 (<i>m</i> , 2H)	3,21 (<i>t</i> , $J=6,6$ Hz, 2H)	3,37 (<i>dd</i> , $J=13,6$ Hz, 6,6 Hz, 2H)	3,39 (<i>quint</i> , $J=7,6$ Hz, 2H)
2'	1,21 (<i>m</i> , 3H)	1,76 (<i>m</i> , 1H)	1,56 (<i>m</i> , 2H)	1,60 (<i>s</i> , 2H)
3'	3,48 (<i>m</i> , 2H)	0,94 (<i>dd</i> , $J=6,6$ Hz, 6H)	1,30 (<i>m</i> , 2H)	1,30 (<i>m</i> , 2H)
4'	1,21 (<i>m</i> , 3H)	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)	1,30 (<i>m</i> , 2H)
5'	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)	1,30 (<i>m</i> , 2H)
6'	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)	1,30 (<i>m</i> , 2H)
7'	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)	1,30 (<i>m</i> , 2H)
8'	-	-	0,87 (<i>t</i> , $J=6,7$ Hz, 3H)	0,87 (<i>t</i> , $J=6,8$ Hz, 3H).
1''	-	-	-	3,39 (<i>quint</i> , $J=7,6$ Hz, 2H)
2''	-	-	-	1,60 (<i>s</i> , 2H)
3''	-	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)
4''	-	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)
5''	-	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)
6''	-	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)
7''	-	-	-	1,30 (<i>m</i> , 2H)
8''	-	-	-	0,87 (<i>t</i> , $J=6,8$ Hz, 3H).
N-H	-	6,25 (<i>s</i> , N-H, $H=1$)	5,92 (<i>s</i> , 1H)	-

Fonte: Próprio autor.

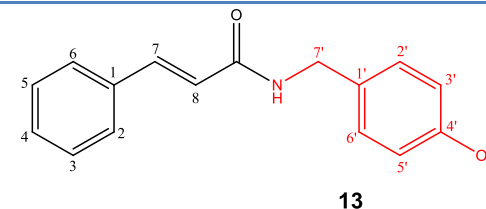
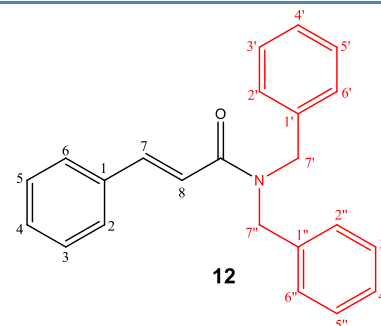
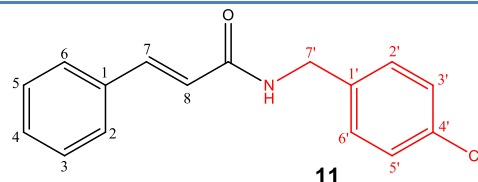
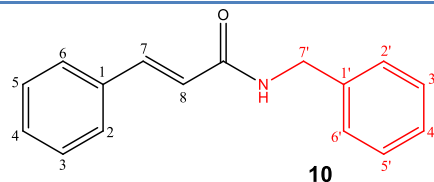
Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas **5-6**.**Carbonos**

	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-
2, 6	7,48 (<i>m</i> , 2H)	7,48 (<i>dd</i> , $J=7,3$ Hz, 2 Hz, 2H)
3, 5	7,34 (<i>m</i> , 2H)	7,34 (<i>m</i> , 2H)
4	7,34 (<i>m</i> , 1H)	7,34 (<i>m</i> , 1H)
7	7,61 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	7,62 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)
8	6,41 (<i>d</i> , $J = 15,6$ Hz, 1H)	6,41 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)
1'	3,37 (<i>dd</i> , $J=13,1$ Hz, 7,1 Hz, 2H)	3,38 (<i>dd</i> , $J = 13,2$ Hz, 6,9 Hz, 2H)
2'	1,56 (<i>quint</i> , $J=7$ Hz, 2H)	1,56 (<i>m</i> , 2H)
3'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
4'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
5'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
6'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
7'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
8'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	2,00 (<i>m</i> , 2H)
9'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	5,36 (<i>m</i> , 1H)
10'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	5,36 (<i>m</i> , 1H)
11'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	2,00 (<i>m</i> , 2H)
12'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
13'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
14'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
15'	1,25 (<i>m</i> , 2H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
16'	0,88 (<i>t</i> , $J=7$ Hz, 3H)	1,28 (<i>m</i> , 2H)
17'	-	1,28 (<i>m</i> , 2H)
18'	-	0,88 (<i>t</i> , $J=6,9$ Hz, 3H)
N-H	-	5,84 (<i>s</i> , 1H)

Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas **7-9**.

Carbonos			
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-
2, 6	7,47 (m, 2H)	7,43 (dd, J=7,5 Hz, 1,9 Hz, 2H)	6,77 (m, 2H)
3, 5	7,32 (m, 2H)	7,31 (m, 2H)	6,57 (m, 2H),
4	7,32 (m, 1H)	7,31 (m, 1H)	6,57 (m, 1H),
7	7,60 (d, J=15,6 Hz, 1H)	7,74 (d, J=15,6 Hz, 1H)	6,77 (m, 1H)
8	6,40 (d, J=15,6 Hz, 1H)	6,66 (d, J=15,6 Hz, 1H).	5,96 (d, J=15,7 Hz, 1H)
1'	3,91 (m, 1H)	-	-
2', 6'	1,72 (m, H=2) 1,20 (m, H=2)	7,67 (d, J=7,5 Hz, 2H)	6,88 (d, J=8,9 Hz, 2H)
3', 5'	1,99 (dd, J=3,5 Hz, 3,5 Hz, H=2) 1,39 (m, H=2)	7,31 (m, 2H)	6,57 (m, 2H),
4'	1,72 (m, H=1) 1,20 (m, H=1)	7,11 (t, J=7,4 Hz, 1H)	-
N-H	5,73 (s, H=1)	8,16 (s, 1H)	9,48 (s, 1H)

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para as amidas **10** – **13**.**Carbonos**

	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-	-
2, 6	7,46 (<i>dd</i> , $J=6,2$ Hz, 3,4 Hz, 2H)	7,49 (<i>m</i> , 2H)	7,50 (<i>dd</i> , $J=6,5$ Hz, 3,2 Hz, 2H)	7,37 (<i>m</i> , 2H)
3, 5	7,31 (<i>m</i> , 2H)	7,31 (<i>m</i> , 2H)	7,36 (<i>m</i> , 2H)	7,07 (<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)
4	7,31 (<i>m</i> , 1H)	7,31 (<i>m</i> , 1H)	7,36 (<i>m</i> , 1H)	7,37 (<i>m</i> , 1H)
7	7,66 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	7,67 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	7,90 (<i>d</i> , $J=15,4$ Hz, 1H)	7,37 (<i>m</i> , 1H)
8	6,47 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	6,47 (<i>d</i> , $J=15,6$ Hz, 1H)	6,95 (<i>d</i> , $J=15,4$ Hz, 1H)	6,68 (<i>m</i> , 1H)
1'	-	-	-	-
2', 6'	7,31 (<i>m</i> , 2H)	7,31 (<i>m</i> , 2H)	7,36 (<i>m</i> , 2H)	7,52 (<i>d</i> , $J=8$ Hz, 2H)
3', 5'	7,31 (<i>m</i> , 2H)	7,31 (<i>m</i> , 2H)	7,36 (<i>m</i> , 2H)	6,68 (<i>m</i> , 1H)
4'	7,31 (<i>m</i> , 1H)	-	7,36 (<i>m</i> , 1H)	-
7'	4,54 (<i>d</i> , $J=5,8$ Hz, 2H)	4,52 (<i>d</i> , $J=5,9$ Hz, 2H)	4,71 (<i>d</i> , $J=44$, 2 Hz, 2H)	4,25 (<i>d</i> , $J=5,8$ Hz, 2H)
1''	-	-	-	-
2'', 6''	-	-	7,36 (<i>m</i> , 2H)	-
3'', 5''	-	-	7,36 (<i>m</i> , 2H)	-
4''	-	-	7,36 (<i>m</i> , 1H)	-
7''	-	-	4,71 (<i>d</i> , $J=44$, 2 Hz, 2H)	-
N-H	6,35 (<i>s</i> , 1H)	6,33 (<i>s</i> , 1H)	-	9,26 (<i>s</i> , 1H)
O-H	-	-	-	8,44 (<i>s</i> , 1H)

Fonte: Próprio autor.

Carbonos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	135,6	135,0	135,0	135,8	135,0	135,1	135,1	134,7	134,6	134,9	134,8	135,3	135,0
2, 6	128,9	128,8	128,8	128,9	128,9	128,9	128,9	128,9	128,7	128,8	128,9	129,1	128,8
3, 5	129,5	129,6	135,0	129,6	129,7	129,7	129,6	129,1	129,0	129,8	129,0	129,8	128,9
4	127,8	127,8	127,8	127,8	127,9	127,9	127,8	124,6	127,8	127,9	127,9	127,8	127,5
7	142,4	140,8	140,8	142,2	140,9	140,9	140,7	142,4	140,5	141,4	141,8	144,0	138,8
8	117,9	121,1	121,1	118,1	121,1	121,0	121,4	120,3	121,9	120,7	120,4	117,4	122,3
C=O	165,8	166,3	166,0	166,3	166,0	166,0	165,1	164,6	163,6	166,0	166,1	167,4	164,8
1'	42,4	47,2	40,0	48,4	40,0	40,0	48,5	138,2	138,2	138,3	136,9	137,5	129,5
2'	15,3	28,7	31,9	31,9	32,1	29,4-29,9	3,6	121,2	120,8	127,6	129,9	128,5	127,5
3'	41,2	20,3	29,8	29,9	27,1	27,1	25,0	130,0	129,8	128,9	129,3	129,0	115,1
4'	13,3	-	29,4	29,4	29,5-29,8	29,4-29,9	25,7	128,1	126,9	128,0	133,4	127,6	156,3
5'	-	-	29,3	28,1	29,5-29,8	29,4-29,9	25,0	130,0	129,8	128,9	129,3	129,0	115,1
6'	-	-	27,1	27,3	29,5-29,8	29,4-29,9	3,6	121,2	120,8	127,6	129,9	128,5	127,5
7'	-	-	22,7	22,8	29,5-29,8	29,4-29,9	-	-	-	43,9	43,2	50,2	41,9
8'	-	-	14,2	14,2	29,5-29,8	27,4	-	-	-	-	-	-	-
9'	-	-	-	-	29,5-29,8	130,1	-	-	-	-	-	-	-
10'	-	-	-	-	29,5-29,8	129,9	-	-	-	-	-	-	-
11'	-	-	-	-	29,5-29,8	27,3	-	-	-	-	-	-	-
12'	-	-	-	-	29,5-29,8	29,4-29,9	-	-	-	-	-	-	-
13'	-	-	-	-	29,5-29,8	29,4-29,9	-	-	-	-	-	-	-
14'	-	-	-	-	29,5-29,8	29,4-29,9	-	-	-	-	-	-	-

15'	-	-	-	-	22,8	29,4-29,9	-	-	-	-	-	-	-
16'	-	-	-	-	14,3	32,00	-	-	-	-	-	-	-
17'	-	-	-	-	-	22,8	-	-	-	-	-	-	-
18'	-	-	-	-	-	14,2	-	-	-	-	-	-	-
1''	-	-	-	47,1	-	-	-	-	-	-	-	136,8	-
2''	-	-	-	31,9	-	-	-	-	-	-	-	128,0	-
3''	-	-	-	29,6	-	-	-	-	-	-	-	128,7	-
4''	-	-	-	29,3	-	-	-	-	-	-	-	126,7	-
5''	-	-	-	28,1	-	-	-	-	-	-	-	128,7	-
6''	-	-	-	27,0	-	-	-	-	-	-	-	128,0	-
7''	-	-	-	22,7	-	-	-	-	-	-	-	49,0	-
8''	-	-	-	14,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 8: Assinalamentos de RMN de ^{13}C (δ_{C}) das amidas **1-13**.

Fonte: Próprio autor.

4.4. Etapa Biológica

4.4.1. Avaliação da atividade antifúngica das amidas cinâmicas

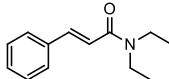
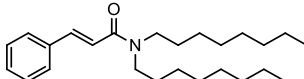
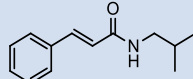
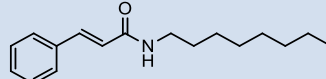
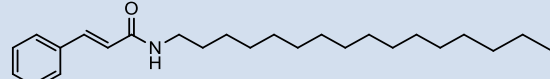
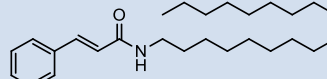
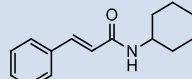
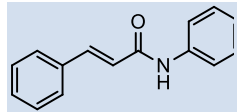
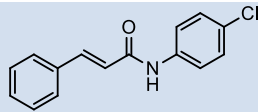
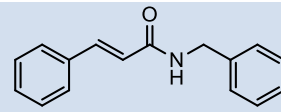
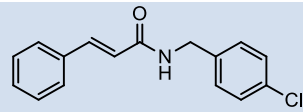
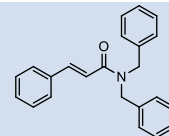
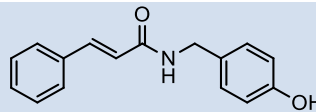
As treze amidas preparadas (**1-13**) foram submetidas a testes antifúngicos através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) frente às cepas de *C. albicans* CBS 562, *C. krusei* CBS 573 e *C. tropicalis* CBS 94. Vale salientar que as cepas eram resistentes ao fluconazol e cetoconazol, exceto a *C. krusei* sensível ao cetoconazol.

A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico visualmente, enquanto a CFM como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano em meio sólido (HOLETZ et al., 2002; HOUGHTON et al., 2007). A relação entre CFM/CIM foi avaliada para determinar se cada substância é fungistática ($CFM/CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM/CIM < 4$) (PEIXOTO et al., 2017).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 9, ao analisar a atividade dos compostos frente às cepas de *Candida*, verificou-se que a dioctilamida cinâmica (**4**) apresentou melhor atividade antifúngica com valores de $CIM=CFM=0,67$ mM, 0,33 mM 1,34 mM frente à *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, respectivamente. Seguida da dietilamida cinâmica (**1**) que apresentou $CIM=CFM$ de 2,46 mM, 4,92 mM e 4,92 mM, frente às cepas de *Candida* citadas anteriormente. Além disso, segundo a relação CFM/CIM ($CFM/CIM=1$) os compostos demonstraram capacidade fungicida, ou seja, atuam causando morte nas células fúngicas.

Estes resultados corroboram com o estudo desenvolvido por Narasimhan e colaboradores (2004) em que o composto **1** inibiu o crescimento de *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Além disso, apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (NIMSE et al., 2015).

Tabela 9: Resultados da avaliação para CIM e CFM, bem como a relação (CIM/CFM) das amidas **1**, **4** e **nistatina** e resultados da triagem antifúngica dos compostos **2**, **3**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12** e **13** contra *Candida* spp.

 01				 04			NISTATINA		
CEPAS	CIM	CFM	CFM/ CIM	CIM	CFM	CFM/ CIM	CIM	CFM	CFM/ CIM
<i>C. albicans</i> CBS 562	500 µg/mL (2,46 mM)	500 µg/mL (2,46 mM)	1	250 µg/mL (0,672 mM)	250 µg/mL (0,672 mM)	1	7,5 µg/mL (0,008 mM)	7,5 µg/mL (0,008 mM)	1
<i>C. krusei</i> CBS 573	1000 µg/mL (4,92mM)	1000 µg/mL (4,92 mM)	1	125 µg/mL (0,336 mM)	125 µg/mL (0,336 mM)	1	15 µg/mL (0,016 mM)	15 µg/mL (0,016 mM)	1
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	1000 µg/mL (4,92mM)	1000 µg/mL (4,92mM)	1	500 µg/mL (1,345 mM)	500 µg/mL (1,345 mM)	1	7,5 µg/mL (0,008 mM)	7,5 µg/mL (0,008 mM)	1
 02		 03		 05		 06		 07	
1000 µg/mL (4,92 mM)		1000 µg/mL (3,85 mM)		1000 µg/mL (2,69 mM)		1000 µg/mL (2,51 mM)		1000 µg/mL (4,36 mM)	
 08		 09		 10		 11		 12	
1000 µg/mL (4,48 mM)		1000 µg/mL (3,88 mM)		1000 µg/mL (4,21 mM)		1000 µg/mL (3,68 mM)		1000 µg/mL (3,05 mM)	
								 13	
								1000 µg/mL (3,95 mM)	

Com relação aos demais compostos, não foi possível determinar com precisão a CIM e CFM, visto que não deram atividade na maior concentração testada (1000 µg/mL). Inicialmente, adotando o composto **4** como base de comparação para as demais amidas, observa-se que a presença de duas cadeias com oito carbonos em vez de uma promoveu melhora da atividade antifúngica, visto que, a octilamida cinâmica (**3**) não apresentou atividade antimicrobiana na concentração testada, sugerindo que o aumento da apolaridade e volume molecular com a inserção de uma nova cadeia alquílica ao nitrogênio acarreta em melhora da bioatividade. Todavia, o aumento da apolaridade apenas com a substituição por uma cadeia contendo dezesseis carbonos (**5**) não promoveu melhora da atividade, bem como com a inserção do radical oleíla (**6**), destacando a importância da ramificação para a bioatividade.

Ao comparar o composto **1** com o **4** percebe-se que houve melhora da atividade fúngica frente às três cepas de *Candida* testadas devido ao aumento da cadeia carbônica. Com isso, sugere-se que a presença de amidas terciárias com cadeias longas, até oito carbonos, é relevante para a bioatividade. Além disso, a substituição da amida terciária alquílica por aromática reduziu a atividade fúngica, visto que o composto **12** (dibenzilamida cinâmica) não apresentou atividade na concentração testada.

Ao analisar a atividade dos compostos com cadeia curta, nota-se que a presença das duas cadeias etila ligado ao nitrogênio (**1**) promove melhora da atividade antifúngica quando comparado ao composto **2** com o radical isobutila (CIM=CFM=4,92 mM) frente à *C. albicans*. Com relação ao composto **7** com radical ciclohexila e os compostos com substituintes aromáticos (**8-13**), não houve diferença significativa quanto à atividade antifúngica dos compostos frente às três cepas de *Candida* testadas, nem através da adição de grupos doadores de elétrons (**13**) ou de grupos retiradores de elétrons (**9**) na posição *para* do anel. Entretanto, no estudo realizado por Montes e colaboradores (2016) o composto **9** apresentou CIM de 1024 µg/mL (3,97 mM) frente às cepas de *C. albicans* ATC-76645, *C. albicans* LM-106 e *C. krusei* LM-656.

A partir dos resultados antifúngicos obtidos foi feita uma análise a cerca das características químicas que podem influenciar a atividade biológica dos compostos, visto que a coleção de análogos preparados é estruturalmente relacionada, havendo

variações quanto ao substituinte ligado ao nitrogênio da função amida, enquanto, a estrutura cinâmica foi mantida em todos os compostos. Deste modo, os resultados aqui expressos podem servir de referência para o desenvolvimento de novos compostos com melhor atividade antifúngica.

4.4.2. Mecanismo de ação das amidas cinâmicas com melhor potencial bioativo frente à *C. albicans* CBS 562

As amidas (**1** e **4**) mostraram-se bioativas frente às cepas de *C. albicans* CBS 562, *C. krusei* CBS 573 e *C. tropicalis* CBS 94, portanto, avaliou-se o mecanismo de ação pelas quais essas substâncias atuam. Dessa forma, realizaram-se os ensaios de sorbitol e ergosterol, utilizando a cepa *C. albicans* CBS 562.

A partir dos resultados da CIM (Quadro 1), observou-se que mediante a presença do sorbitol (protetor osmótico que minimiza o efeito de agentes químicos sobre a parede celular fúngica) não houve aumento da concentração necessária para inibição do crescimento celular, ou seja, para a *C. albicans* CBS 562 os valores da CIM na presença ou ausência de sorbitol permaneceram os mesmos: 4,91 mM para o composto **1** e 2,69 mM para o **4**. No entanto, para o controle positivo (caspofungina), foram observados valores de CIM 3,65 µM na ausência de sorbitol e 3,65 µM na presença do sorbitol (0,8 M). Vale salientar que é reconhecido o efeito da caspofungina por interferência na via de biossíntese da parede celular fúngica (COLOMBO et al., 2013; SOURMAGHI et al., 2015).

No ensaio com ergosterol, observou-se que também não houve aumento da CIM (Quadro 2) mediante a presença do ergosterol (protetor osmótico que minimiza o efeito de agentes sobre a membrana celular fúngica), frente a *C. albicans* CBS 562, onde os valores permaneceram os mesmo tanto na presença, como na ausência de ergosterol para ambos os compostos **1** (CIM=4,91 mM) e **4** (CIM=2,69 mM). No entanto, para o controle positivo (nistatina), foram observados valores de CIM 0,008 mM na ausência de ergosterol e 0,129 mM na presença do ergosterol. A nistatina possui o mecanismo bem definido na literatura, atuando na membrana celular (HWANG et al., 2014; COSTA, 2017).

Dessa forma, não foi possível definir o mecanismo pelo qual as amidas **1** e **4** agem para promover a atividade antifúngica, visto que, não foi observada a atuação na membrana celular (ensaio de sorbitol) e na parede celular fúngica (ensaio de ergosterol).

Quadro 1: Valores de CIM de **1, 4 e caspofungina** na ausência e presença de sorbitol (0,8M) contra cepas de *C. albicans* CBS562. Valores expressos em mM (**1 e 4**) e **Caspofungina** µM.

C. albicans CBS562											
	Concentração µg/mL (mM)	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol		Concentração µg/mL (mM)	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol		Concentração µg/mL (µM)	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol
1	4000µg/mL (19,677mM)			4	4000µg/mL (10,76 mM)			CASPOFUNGINA	4 µg/mL (3,658µM)		
	2000 µg/mL (9,83 mM)				2000 µg/mL (5,38 mM)				2 µg/mL (3,658µM)		
	1000 µg/mL (4,91 mM)	CIM	CIM		1000 µg/mL (2,69 mM)	CIM	CIM		1 µg/mL (3,658µM)		CIM
	500 µg/mL (2,46 mM)				500 µg/mL (1,34 mM)				0,5 µg/mL (3,658µM)	CIM	
	250 µg/mL (1,23 mM)				250 µg/mL (0,67 mM)				0,25 µg/mL (3,658µM)		
	125 µg/mL (0,61 mM)				125 µg/mL (0,33 mM)				0,125 µg/mL (3,658µM)		
	62,5 µg/mL (0,307 mM)				62.5 µg/mL (0,17 mM)				0,062 µg/mL (3,658µM)		
	31,25 µg/mL (0,15 mM)				31,25 µg/mL (0,08 mM)				0,031 µg/mL (3,658µM)		

Fonte: Próprio autor

Quadro 2: Efeito do ergosterol exógeno (1008,44 µM) no **1** e **4** (CIM) contra *C. albicans* CBS 562 (valores expressos em mM (**1**, **4**) e µM (nistatina)).

C. albicans CBS562											
	Concentração µg/mL (mM)	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol		Concentração µg/mL (mM)	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol		Concentração µg/mL (µM)	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol
1	4000µg/mL (19,677mM)			4	4000µg/mL (10,76 mM)			NISTATINA	120 µg/mL (0,129 mM)		CIM
	2000 µg/mL (9,83 mM)				2000 µg/mL (5,38 mM)				60 µg/mL (0,064 mM)		
	1000 µg/mL (4,91 mM)	CIM	CIM		1000 µg/mL (2,69 mM)	CIM	CIM		30 µg/mL (0,032 mM)		
	500 µg/mL (2,46 mM)				500 µg/mL (1,34 mM)				15 µg/mL (0,016 mM)		
	250 µg/mL (1,23 mM)				250 µg/mL (0,67 mM)				7,5 µg/mL (0,008 mM)	CIM	
	125 µg/mL (0,61 mM)				125 µg/mL (0,33 mM)				3,75 µg/mL (0,004 mM)		
	62,5 µg/mL (0,307 mM)				62,5 µg/mL (0,17 mM)				1,87 µg/mL (0,002 mM)		
	31,25 µg/mL (0,15 mM)				31,25 µg/mL (0,08 mM)				0,93 µg/mL (0,001 mM)		

Fonte: Próprio autor

4.5. Docking molecular

As metodologias computacionais de “*fishing*” do alvo são tendenciosas contra associações de receptores-alvo humanos. Por esse motivo, a identificação dos alvos em potencial do composto **4** prosseguiu usando a abordagem baseada em homologia. O objetivo desta pesquisa foi identificar proteínas no homólogo de *Candida albicans*, que sirvam como alvos potenciais do composto **4**, utilizando a metodologia de Similarity Ensemble Approach (SEA). As proteínas de *Candida albicans* selecionadas para modelagem estão apresentadas na Tabela 10. Entre os quatorze possíveis alvos de *Candida albicans* do composto, dinamina-1(DNM1) e os associados à entrada UniProt C4YNS9_CANAW foram excluídos do processo de modelagem. No caso do DNM1, existem evidências que mostram que cepas de *Candida albicans* sem esse gene são viáveis e que sua inibição é útil apenas para tornar os fungos mais suscetíveis a outros antibióticos (TRUONG et al., 2020). Por outro lado, não foi possível encontrar nenhuma anotação funcional para C4YHJ1_CANAW. Os doze alvos restantes foram submetidos a estudos de acoplamento molecular (procedimento descrito na seção **8**).

Tabela 10: Alvos potenciais para o composto **4** identificados pela abordagem de “fishing” do alvo baseada em homologia.

Alvo SEA ^(a)	Alvo de <i>Candida albicans</i> ^(a)	Descrição	ID
FPPS_HUMAN Q0GKD7_LEIDO	C4YIE1_CANAW	Pirofosfato de farnesil	ERG20
DHB3_RAT	MKAR_CANAL	3-oxoacil-CoA redutase de cadeia muito longa	MKAR
FAAH1_MOUSE	C4YTX5_CANAW	Amida hidrolase de ácidos graxos	FAAH
HDAC2_HUMAN HDAC1_MOUSE	C4YP65_CANAW	Histona desacetilase RPD3	RPD3
AK1BA_HUMAN	C4YRH4_CANAW	D-xilose redutase I, II dependente de NAD(P)H	XYRA
DYN1_HUMAN	C4YNS9_CANAW	GTPase relacionada à dinamina	DNM1
KDM4A_HUMAN	C4YHJ1_CANAW	Proteína não caracterizada	N/A ^(b)
CNOT7_HUMAN	C4YSE2_CANAW	Subunidade RNase da família DEDD do núcleo CCR4-NOT	POP2
RHOA_HUMAN	RHO1_CANAL	Proteína RHO1 de ligação a GTP	RHO1
DPOLA_HUMAN	C4YQI4_CANAW	DNA polimerase	POL1
ADH1G_HUMAN	A0A1D8PU61_CANAL	S-(hidroximetil) glutationa desidrogenase	FDH3
A5H660_SCHMA	A0A1D8PMG7_CANAL	Histona desacetilase	HOS1
PLM2_PLAFA	CARPV_CANAX	Protease aspártica vacuolar	APR1
O93874_COCLU	C4YPL7_CANAW	Hidroxilase-desidrogenase-epimerase peroxissomal	FOX2

^(a)Nome da entrada UniProt^(b)Nenhuma função foi identificada para a proteína homóloga de *Candida albicans*.

Fonte: Próprio autor.

A partir daqui, qualquer parâmetro de modelagem não descrito na metodologia foi definido como seu valor padrão em todos os cálculos. Os resultados dos estudos de acoplamento molecular estão resumidos na tabela 11. FOX2 é uma enzima multifuncional (YLIANTTILA et al., 2006; KOSKI et al., 2004) e, de acordo com a pesquisa de modelos realizada pelo SWISS-MODEL, foi separada em dois sistemas diferentes. Um deles continha o domínio C-terminal de toda a sequência

FOX2 (FOX2 (C-Ter) com função hidratase. O segundo continha a sequência de sua porção N-terminal com reatividade desidrogenas. O último possui dois locais de ligação de ácidos graxos com diferentes especificidades de substrato (YLIANTTILA et al., 2006) e, em consequência, a ligação do composto **4** foi explorada independentemente em ambos os locais (FOX2 (N-Ter, Local A) e FOX2 (N-Ter, Local B).

Tabela 11: Valores de ancoragem e pontuação de consenso para os 12 alvos investigados.

Alvo	Conformação	CHEMPLP		GoldScore		ChemScore		ASP		Consensus Z-Score
		Score	Z-Score	Score	Z-Score	Score	Z-Score	Score	Z-Score	
ERG20	1	78,80	3,75	39,13	1,53	24,26	-0,65	21,55	-0,20	1,11
MKAR	1	90,53	1,86	42,44	0,83	42,92	2,36	33,02	-0,03	1,26
FAAH	1	79,74	1,04	30,84	0,24	31,84	1,13	34,43	1,30	0,93
RPD3	1	75,16	1,64	13,31	0,49	31,37	0,77	31,00	0,50	0,85
XYRA	1	70,09	1,21	24,82	0,43	32,93	2,53	33,30	2,11	1,57
	2	73,93	2,35	34,86	1,70	30,78	0,66	31,63	1,30	1,50
POP2	1	71,12	1,50	24,20	0,90	30,81	1,46	38,79	2,11	1,49
	2	72,55	1,90	-0,18	-0,56	31,92	2,11	33,56	0,81	1,07
	3	69,20	0,96	28,14	1,13	30,50	1,27	33,24	0,73	1,02
RHO1	1	74,85	-0,31	37,63	1,19	28,72	1,87	23,16	2,80	1,39
	2	82,81	1,64	42,32	1,61	26,95	0,63	18,84	1,01	1,22
POL1	1	74,56	0,39	32,69	1,19	29,54	0,83	31,75	1,81	1,05
FDH3	1	84,67	2,12	26,89	0,31	34,30	2,18	33,46	1,64	1,56
	2	83,67	1,88	25,74	0,24	34,05	2,02	29,63	0,44	1,14
HOS1	1	78,97	1,90	29,96	0,96	26,85	0,90	37,88	1,66	1,36
	2	77,63	1,51	24,07	0,63	26,73	0,84	38,84	1,94	1,23
APR1	1	61,50	1,21	15,22	0,24	30,93	1,32	30,49	1,43	1,05
FOX2 (C-Ter) ^(a)	1	87,03	1,69	38,87	1,48	32,43	0,67	31,09	1,01	1,21
FOX2 (N-Ter, Site A) ^(a)	1	85,14	0,92	34,42	0,21	33,37	1,09	26,91	2,98	1,30
FOX2 (N-Ter, Site B) ^(a)	1	83,57	2,76	55,84	1,76	28,85	0,66	18,32	-1,17	1,00

(a) Os diferentes domínios do FOX2 são denotados como C-Ter, N-Ter, Site A e N-Ter, sítio B para indicar o domínio C-terminal de toda a sequência FOX2, o sítio A do domínio N-terminal de a proteína e seu local B, respectivamente.

Fonte: Próprio autor.

A inspeção visual dos complexos previstos revela que em todos os casos o composto **4** ocupa as bolsas de ligação dos receptores. Ele também interage em todos os complexos previstos com resíduos funcionais relevantes, principalmente por meio de interações hidrofóbicas e Van der Waals. Além disso, os valores de pontuação sugerem a possibilidade de ligação a todos os receptores, com as maiores pontuações de docking obtidas para os alvos MKAR, FOX2 (C-Ter) e FDH3. Dadas as interações favoráveis previstas para os complexos de composto **4**-receptor, bem como as pontuações de acoplamento obtidas, seria difícil priorizar um conjunto de alvos preferidos para este composto. Portanto, complexos ligantes-receptor que mostram pontuações e interações favoráveis nos cálculos de acoplamento molecular podem ser previstos como inviáveis quando cálculos mais precisos são realizados (TURKEZ et al., 2019; LOPES et al., 2019). Para uma melhor descrição dos complexos previstos, suas energias livres de ligação foram previstas por meio de cálculos de MM-PBSA, mais de 200 instantâneos extraídos das simulações de Dinâmica Molecular (MD) pré-formadas. Os cálculos processados conforme descrito na seção métodos e seus resultados estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12: Energias livres previstas de ligação do composto **4** aos alvos estudados e seus componentes. Os valores de energia são expressos em kcal/mol.

Alvo	Conformação	Componente MM-PBSA							ΔG TOTAL
		VAN DER WAALS	EEL	EPB	ENPOLAR	EDISPER	DELTA G do gás	DELTA G do solvente	
ERG20	1	-49,05	-57,13	92,40	-40,45	66,92	-106,19	118,87	12,69
MKAR	1	-4569	-15,66	31,75	-35,93	60,84	-61,35	56,66	-4,69
FAAH	1	-59,87	-9,04	40,93	-43,26	74,26	-68,91	71,92	3,01
RPD3	1	-31,95	-6,65	20,71	-25,35	42,61	-38,60	37,98	-0,63
XYRA	1	-33,68	-5,11	22,86	-28,56	47,79	-38,80	42,08	3,29
	2	-30,39	-2,39	20,81	-25,95	44,26	-32,78	39,13	6,35
	1	-33,52	-3,14	27,60	-28,35	48,84	-36,66	48,08	11,42
POP2	2	-28,12	-1,05	14,14	-24,81	41,02	-29,17	30,34	1,18
	3	-30,05	-3,56	19,26	-26,03	44,02	-33,62	37,25	3,63
RHO1	1	-34,39	0,93	14,18	-27,43	45,77	-33,45	32,52	-0,94
	2	-34,24	-4,22	21,99	-26,89	44,06	-38,46	39,16	0,69
POL1	1	-44,31	-5,61	31,72	-34,69	59,13	-49,92	56,16	6,23
FDH3	1	-53,23	-8,20	36,84	-41,38	69,95	-61,43	65,41	3,98
	2	-47,34	18,66	23,35	-37,14	61,27	-28,68	47,48	18,80
HOS1	1	-42,01	-53,28	54,27	-36,21	61,88	-95,29	79,93	-15,35
	2	-42,98	-51,09	57,78	-37,15	62,80	-94,08	83,44	-10,64
APR1	1	-50,11	-3,53	68,97	-40,61	66,50	-53,64	94,86	41,22
FOX2 (C-Ter)	1	-49,29	-6,71	28,25	-36,92	61,84	-56,00	53,17	-2,83
FOX2 (N-Ter, Site A)	1	-39,79	-11,44	42,92	-30,09	52,85	-51,22	65,68	14,46
FOX2 (N-Ter, Site B)	1	-43,97	-18,99	44,39	-33,48	56,88	-62,97	67,79	4,83

Fonte: Próprio autor.

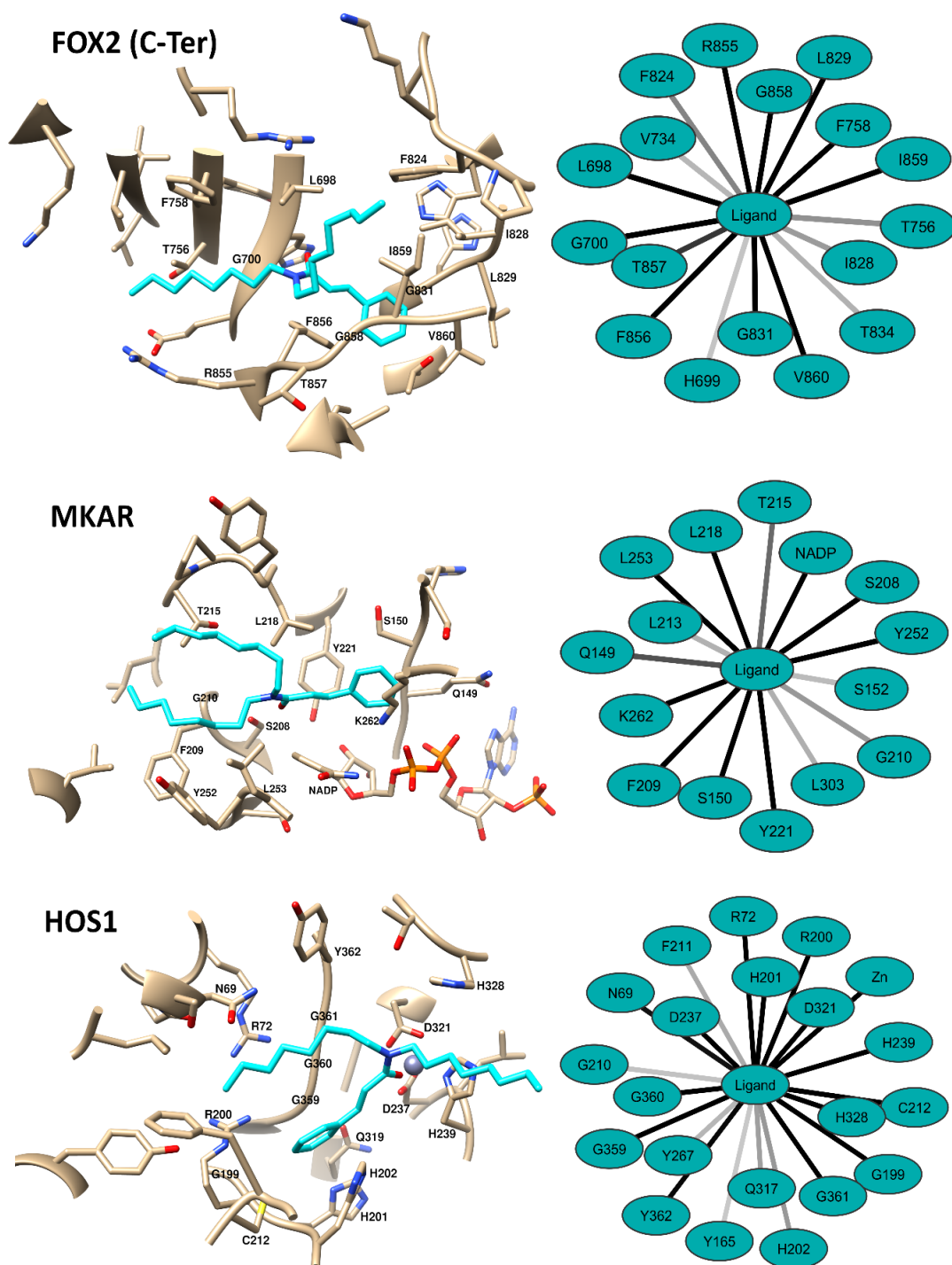
De acordo com a Tabela 12, a maioria dos complexos previstos é inviável com base nas energias livres estimadas de ligação. É o caso dos complexos formados pelo composto **4** com ERG20, FAAH, FDH3, XYRA, POP2, POL1, APR1, FOX2 (N-Ter, local A) e FOX2 (N-Ter, local B). Ou seja, mais de 60% dos alvos potenciais estudados (7 em 12) podem ser descartados devido às energias livres positivas estimadas de ligação. Entre aqueles para os quais são previstas energias

livres favoráveis de ligação, RDP3 e RHO1 mostram ΔG de ligação perto de zero. Assim, o composto **4** deve exibir apenas uma ligação muito fraca a RDP3 e RHO1. Ainda é observada uma baixa afinidade, apesar de superior à dos alvos listados anteriormente, para FOX2 (C-Ter) e MKAR. Finalmente, a menor (melhor) energia livre de ligação é prevista para o complexo composto **4**-HOS1.

Para esclarecer melhor o potencial mecanismo de ação do composto **4**, análises mais detalhadas foram realizadas para seus complexos previstos com FOX2 (C-Ter), MKAR e HOS1. A Figura 9 mostra o modo de ligação previsto do composto **4** a esses alvos, bem como a rede das interações mais frequentemente observadas ao longo dos instantâneos de MD selecionados para os cálculos de MM-PBSA. Figuras representando estruturas moleculares foram preparadas com UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) e redes de interação foram produzidas com Cytoscape (SHANNON et al., 2003). Para todas as três enzimas, o grupo fenil do ligante se orienta para o fundo dos locais de ligação, enquanto as porções octil interagem com os resíduos na boca da cavidade e com o solvente.

Como visto na figura 9, a maior rede de interações do ligante e dos receptores ocorre para o alvo HOS1. Especificamente, o composto **4** interage em mais de 50% dos instantâneos de MD selecionados com L698, G700, T756, F758, F824, I828, L829, G831, R855, F856, T857, G858, I859 e V860 de FOX2 (C-Ter). Esses resíduos contêm principalmente cadeias laterais hidrofóbicas, o que favorece as interações de Van der Waals e hidrofóbicas no complexo. Por outro lado, esses tipos de interações são fracas e fornecem pouca estabilidade, individualmente, ao complexo. A única possibilidade de interações de ligações de hidrogênio entre o ligante e o receptor é através do primeiro grupo carbonil. No complexo previsto do composto **4** com FOX2 (C-Ter), este grupo carbonil aponta para a espinha dorsal do H699. No entanto, a geometria complexa é desfavorável para a formação de uma ligação de hidrogênio entre esses dois grupos. Curiosamente, o composto não interage diretamente com os resíduos catalíticos D808 e H813 da FOX2 (C-Ter). No entanto, seu bloqueio da entrada do local de ligação impede o acesso a esses aminoácidos, levando à inativação da enzima.

Figura 9: Os modos de ligação previstos do composto **4** a *Candida albicans* FOX2 (em cima), MKAR (centro) e HOS1 (em baixo) são mostrados à esquerda. As redes de interações entre o ligante e os receptores ao longo dos instantâneos MD usados para cálculos de MM-PBSA são mostradas à direita. Linhas mais escuras indicam frequências mais altas de interação. Os resíduos são marcados de acordo com a numeração nas sequências listadas na Tabela 10 e apenas os resíduos que interagem com o ligante em mais de 50% dos instantâneos de MD selecionados são marcados. Os receptores são mostrados em cinza e o composto **4** em ciano. O esquema de coloração a seguir é usado para átomos que não sejam de carbono: vermelho para oxigênio, azul para nitrogênio, amarelo para enxofre e laranja para fósforo.



Fonte: Próprio autor.

O complexo previsto do composto sob investigação com MKAR mostra interações com Q149, S150, S208, F209, G210, T215, L218, Y221, Y252, L253, K262 e o cofator fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP) na maioria dos instantâneos de MD selecionados para cálculos de MM-PBSA. Dada a estrutura do composto **4**, como esperado, a maioria das interações nesse complexo também é do tipo hidrofóbica e Van der Waals. Em contraste com o complexo previsto com FOX2 (C-Ter), para o MKAR, a carbonila do ligante se posiciona em uma região próxima às cadeias laterais de S208 e Y221, bem como a espinha dorsal do G210. Isso permite que esse grupo aceite uma ligação de hidrogênio da cadeia lateral de S208 em 72% dos instantâneos de MD selecionados e da cadeia lateral de Y221 ou da coluna vertebral de G210 em 14% deles. Ou seja, o composto **4** liga-se ao receptor em 86% dos instantâneos de MD estudados. Mais importante, o composto bloqueia o acesso dos substratos enzimáticos ao cofator NADP, interagindo diretamente com ele.

Para o composto HOS1, o **4** faz uma grande rede de interações com o receptor em mais de 50% dos instantâneos de MD selecionados que incluem N69, R72, G199, R200, H201, H202, C212, D237, H328, H239, Q317, D321, G359, G360, G361, Y362 e o íon Zn^{2+} . Embora não sejam previstas ligações de hidrogênio entre o ligante e o receptor, o grupamento carbonila dos primeiros pontos aponta para o íon Zn^{2+} e sua distância varia de 1,7 Å a 2,5 Å ao longo de toda a simulação MD. Essas resistências favorecem muito a interação do composto **4** com o íon e com D237, D237 e H239, que coordenam o íon Zn^{2+} . Propomos que esta seja uma interação crítica para a estabilização do complexo composto **4**-HOS1. Além disso, este complexo pode ser ainda mais estabilizado pela interação p- π entre H_2O_2 e a fração fenil do ligante. Além disso, a entrada no local de ligação que acomoda os dois grupos octil do ligante é um pouco mais hidrofóbica no HOS1 do que nos outros dois receptores investigados. Isso fornece mais estabilidade ao complexo previsto com HOS1 do que àqueles previstos com FOX2 (C-Ter) e MKAR.

É interessante notar que HOS1 e RPD3, ambos com função de histona desacetilase, compartilham uma alta similaridade em seus locais de ligação ao ligante. No entanto, existe uma grande diferença nas energias livres previstas de ligação do composto **4** a esses dois alvos. Essa diferença pode ser explicada pelo comprimento de duas alças localizadas na entrada do local de ligação do ligante.

Essas alças são mais longas em RPD3 do que em HOS1 e isso impede que o ligante acomode porções do octil de tal maneira que o substituinte fenil possa entrar no fundo da cavidade de ligação de RPD3. Em consequência, o anel fenil do ligante é incapaz de empilhar na frente do H₂O₂ e a interação eletrostática entre o oxigênio da carbonila do ligante com o íon Zn²⁺ também não pode ocorrer. Essas interações particulares são postuladas como chave para a estabilização do complexo **4**-HOS1.

Os três alvos potenciais explorados dos compostos aqui propostos desempenham papéis importantes no ciclo de vida das espécies de *Candida*. Por exemplo, FOX2 (C-Ter) hidrata trans-2-enoil-CoA em 3-hidroxiacil-CoA e é crucial para o metabolismo lipídico e o funcionamento normal das células (PIEKARSKA et al., 2008). Da mesma forma, de acordo com a anotação UniProt, o MKAR também está envolvido no metabolismo dos ácidos graxos. Por outro lado, as enzimas histona desacetilase removem o grupo acetil das histonas e outras proteínas celulares e estão envolvidas no controle das respostas ao estresse. Além disso, a inibição dessas enzimas tem se mostrado eficaz no controle da virulência e desenvolvimento de fungos (GARNAUD et al., 2016; KMETZSCH et al., 2015). Assim, a interferência com esses processos celulares pode levar à atividade fungicida dos compostos aqui apresentados. Em resumo, é proposto que o mecanismo de ação dos produtos químicos analisados possa ser multialvo com a inibição do HOS1 como principal. Experiências adicionais, incluindo o design de novos derivados, serão necessárias no futuro para testar essas hipóteses e melhorar a eficácia dessa série de compostos químicos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente estudo foram preparadas treze amidas, estruturalmente relacionadas, derivadas do cloreto de cinamoíla (**1-13**) utilizando a reação de cloreto ácido. As estruturas químicas das amidas preparadas foram confirmadas por espectroscopia de Infravermelho e por RMN de ^1H e ^{13}C . Dos compostos preparados o **4** e **13** são inéditos na literatura.

Por meio dos resultados de bioatividade pode-se observar que as amidas **1** e **4** demonstraram efeito fungicida frente às cepas de *Candida* spp. O composto **4** apresentou melhor atividade antifúngica com valores de CIM=CFM=0,67 mM, 0,33 mM, 1,34 mM frente à *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, respectivamente, seguido do **1** que apresentou CIM=CFM de 2,46 mM, 4,92mM e 4,92mM contra as cepas citadas anteriormente, respectivamente.

Com base na influência das características químicas estruturais na bioatividade, notou-se que o aumento da cadeia carbônica melhorou a atividade antifúngica, portanto, a presença de amidas terciárias com cadeias longas, até oito carbonos (**4**), é relevante para a bioatividade. No entanto, a substituição da amida terciária alquílica por aromática (**12**) anula a atividade anti-*Candida*.

Além disso, a partir dos resultados de mecanismo de ação (sorbitol e o ergosterol), com as amidas **1** e **4**, pode-se concluir que as substâncias não agem em nível de membrana e parede celular. No entanto, o estudo de docking molecular sugeriu que o possível mecanismo de ação dos compostos bioativos ocorre via multialvos com a inibição do HOS1 como principal alvo biológico.

Com isso, pode-se concluir que a presença de nitrogênio terciário na amida com substituintes alifáticos contribuem para a existência de atividade antifúngica. A potência biológica é maior quando há substituintes alifáticos de cadeia longa. Estes dados possibilitam estabelecer características químicas que podem servir de referência para o desenvolvimento de novos protótipos antifúngicos com melhor perfil biológico, possibilitando a realização de novos estudos com os compostos **1** e **4** para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-*Candida*.

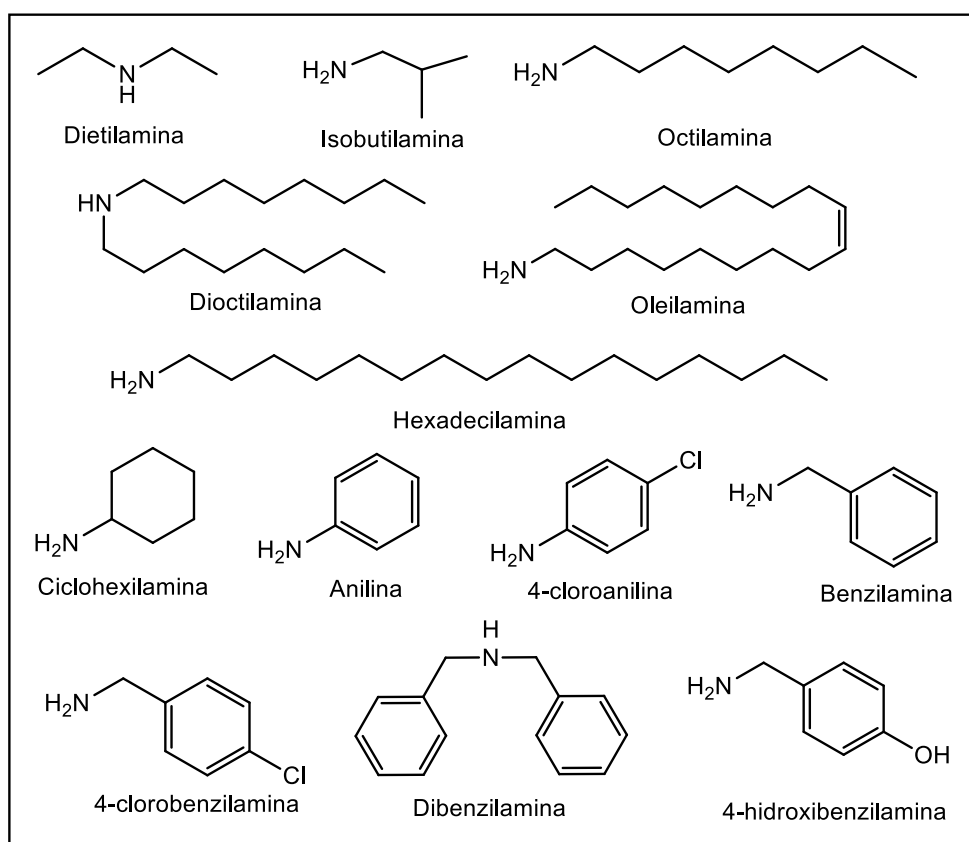
6. PARTE EXPERIMENTAL - ETAPA QUÍMICA

6.1. Substâncias, materiais e métodos utilizados na preparação das amidas cinâmicas

A etapa química do estudo foi desenvolvida no Laboratório de Química Farmacêutica (LQF), no Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos foram adquiridos das empresas Sigma Aldrich, Vetec, Neon, Dinâmica, Qhemis, entre outras. Como material de partida de todas as reações, empregou-se o cloreto de cinamoíla, variando as aminas em cada reação. As treze aminas estruturalmente relacionadas utilizadas como material de partida para preparação dos compostos, encontram-se listadas na figura 10 abaixo.

Figura 10: Aminas utilizadas como reagentes para preparação das amidas derivadas do cloreto de cinamoíla.



Fonte: Próprio autor.

6.2. Métodos cromatográficos

Os compostos foram purificados por meio da técnica de cromatografia em coluna (CC). Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 ART 7734 da MERK com (partículas de dimensões entre 0,063-0,20 mm), suportada em colunas de vidro cilíndricas. A fase móvel constituiu-se de uma mistura binária de hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt), com gradientes crescentes de polaridade.

Todos os procedimentos foram acompanhados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando com fase estacionária sílica gel suportadas em cromatofolhas de alumínio e como fase móvel um sistema de hexano e acetato de etila, em diferentes proporções. A visualização das placas ocorreu através da exposição a uma lâmpada de irradiação ultravioleta com comprimento de onda (254 nm), por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58.

6.3. Ponto de fusão

Determinou-se a pureza de cada produto através do ponto de fusão (PF), utilizando um equipamento digital de marca Microquímica, modelo MQAPF 302; funcionando a 220 V, com placa de aquecimento, usando temperatura com variação de 10-350°C.

6.4. Métodos espectroscópicos

6.4.1. Infravermelho

As treze amidas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho, por meio de um espectrofotômetro FTIR Cary 630, do fabricante Agilent Technologies, no Laboratório Analítico Multiusuário (CCS-UFPB), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) e frequência medida em cm^{-1} .

6.4.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os produtos obtidos foram caracterizados através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze (RMN de ^{13}C). Os espectros foram obtidos utilizando um equipamento VARIAN-SYSTEM (LMCA – Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise) operando a 400 ou 500 MHz (^1H) e 100 ou 125 MHz (^{13}C).

As amostras (30mg) foram previamente dissolvidas para análise em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterados (DMSO-d_6) da MERK.

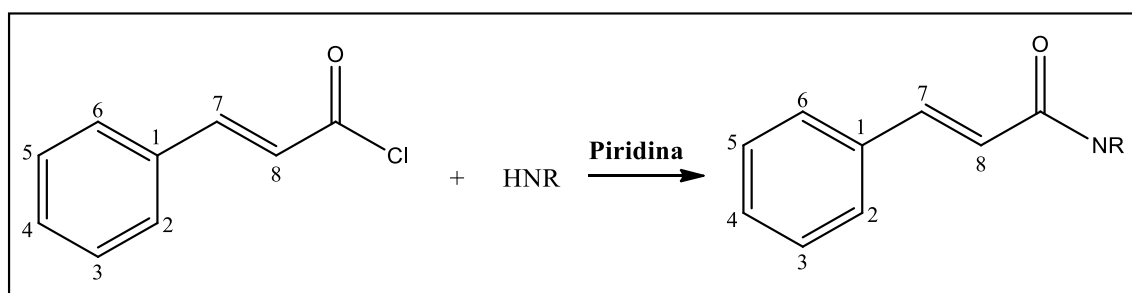
Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

As múltiplas bandas provenientes do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio foram indicadas de acordo com as convenções: *s* (Singlete), *d* (duplete), *dd* (dublo duplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete). Para os espectros de RMN de ^{13}C foi utilizada a técnica de APT em que os carbonos quaternários e metilênicos ficam na mesma face do gráfico e opostos aos sinais de carbonos metínicos e metílicos.

6.5. Preparação das amidas 1 a 13

Para preparação das treze amidas, utilizou-se a metodologia de reação de cloreto ácido (DIMMOCK et al., 1998). Esquema geral da reação demonstrado no esquema 6.

Esquema 6: Esquema geral da reação de cloreto ácido, utilizando como material de partida o cloreto de cinamoíla e diferentes aminas.



Fonte: Próprio autor.

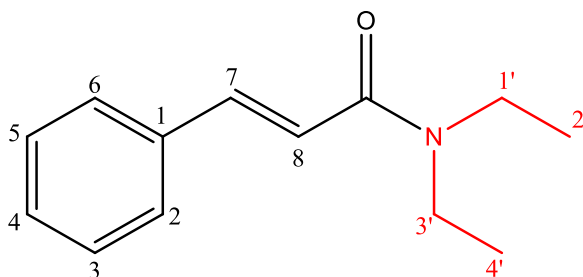
As amidas foram preparadas seguindo o procedimento geral: Em um balão de fundo chato de 50 mL, adicionou-se 0,1g (0,6 mmol) do cloreto de cinamoíla e (0,6 mmol) da amina correspondente, em piridina (1 mL), sob refluxo em banho de óleo e agitação magnética por 5-24 horas, monitorado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila. Ao final da reação, transferiu-se o produto para um funil de separação e realizou-se uma extração com 15 mL de acetato de etila. Em seguida, a fase orgânica foi tratada com 3 x 10 mL de ácido clorídrico aquoso diluído (10% p/v), com a finalidade de neutralizar a piridina, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. A fase orgânica resultante foi reunida, neutralizada com bicarbonato de sódio a 5% (3 x 10 mL). Depois, lavou-se a fase orgânica com 10 mL de água

destilada e por fim, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e removeu-se o solvente, sob pressão reduzida (DIMMOCK et al., 1998).

Para a purificação das amidas foi realizada cromatografia de adsorção em coluna, exceto para os compostos **1**, **2** e **3**, os quais apresentaram pureza satisfatória conforme análises de seus espectros de RMN. Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel um sistema de hexano e acetato de etila com gradiente crescente de polaridade, procedimento acompanhado por CCDA.

6.5. Dados espectroscópicos das amidas 1 – 13

6.5.1. Dietilamida cinâmica (**1**)



Aspecto: sólido amorfo amarelo

Rendimento: 67% (81,7 mg)

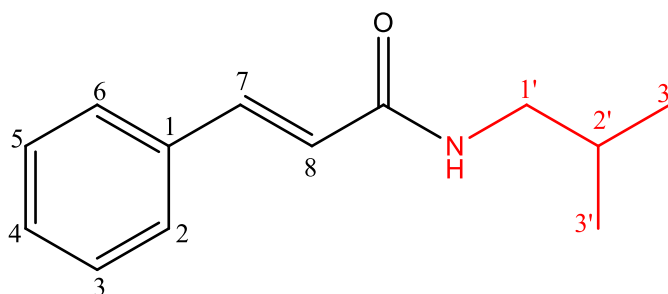
Ponto de fusão: 65-66 °C (WEIDNER-WELLS et al., 1998)

Fator de retenção: 0,4 (7:3 Hex:AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3028 (C-H sp^2 , aromático); 2968 (C-H sp^3); 1648 (C=O); 1595; 1461 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,70 (*d*, H-7, $J=15,5$ Hz, H=1), 7,51 (*d*, H-2 H-6, $J=6,5$ Hz, H=2) 7,34 (*m*, H-3, H-4, H-5, H=3), 6,82 (*d*, H-8, $J=15,5$ Hz, H=1), 3,47 (*m*, H-1', H-3', H=4), 1,21 (*m*, H-2', H-4', H=6);

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 165,8 (C=O); 142,4 (C-7); 135,6 (C-1); 129,5 (C-3, C-5); 128,9 (C-2, C-6); 127,8 (C-4); 117,9 (C-8); 42,4 (C-1'); 41,2 (C-3'); 15,3 (C-2'); 13,3 (C-4') (NIMSE et al., 2015).

6.5.2. Isobutilamida cinâmica (2)

Aspecto: sólido amorfo amarelo

Rendimento: 73,7% (89,9 mg)

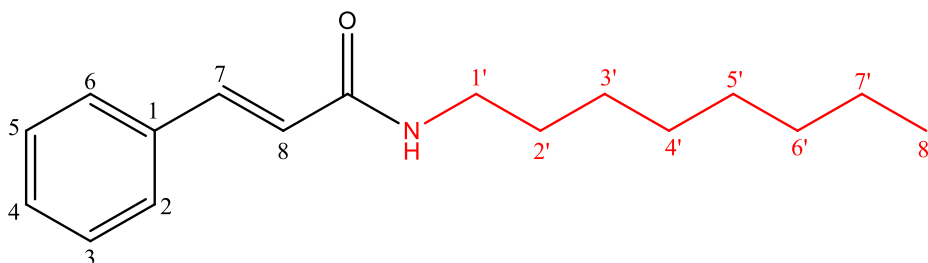
Ponto de fusão: 107-108 °C (OSUKA; HANASAKI; SUZUKI, 1998)

Fator de retenção: 0,5 (7:3 Hex:AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3271 (N-H, amidas secundárias); 3082 (C-H sp^2 , aromático); 2961 (C-H sp^3); 1655 (C=O); 1618; 1469 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,62 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,46 (*m*, H-2, H-6, H=2), 7,29 (*m*, H-3, H-4, H-5, H=3), 6,49 (*m*, H-8, H=1), 6,25 (*s*, N-H, H=1), 3,21 (*t*, H-1', $J=6,6$ Hz, H=2), 1,76 (*sept*, H-2', H=1), 0,94 (*dd*, H-3', $J=6,6$ Hz, H=6).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 166,3 (C=O); 140,8 (C-7); 135,0 (C-1); 129,6 (C-3, C-5); 128,8 (C-2, C-6); 127,8 (C-4); 121,1 (C-8); 47,2 (C-1'); 28,7 (C-2'); 20,3 (C-3') (SHULDBURG et al., 2017).

6.5.3. Octilamida cinâmica (3)

Aspecto: sólido amorfo amarelo

Rendimento: 85,6% (133,3 mg)

Ponto de fusão: 78-79 °C

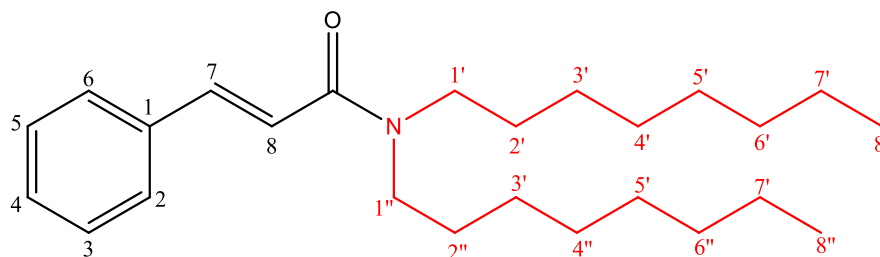
Fator de retenção: 0,6 (7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr, cm^{-1}): 3311 (N-H, amidas secundárias); 3059 (C-H sp^2 , aromático); 2924 (C-H sp^3); 1655 (C=O); 1618; 1467 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,61 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,48 (*dd*, H-2, H-6, $J=6,3$ Hz, 2,8 Hz, H=2), 7,33 (*m*, H-3, H-4, H-5, H=3), 6,42 (*d*, H-8, $J=15,6$ Hz, H=1), 5,92 (*s*, N-H, H=1), 3,37 (*dd*, H-1', $J=13,6$ Hz, 6,6 Hz, H=2), 1,56 (*m*, H-2', H=2), 1,30 (*m*, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H=10) 0,87 (*t*, H-8', $J=6,7$ Hz, H=3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 166,0 (C=O); 140,8 (C-7); 135,0 (C-1); 129,6 (C-3, C-5); 128,8 (C-2, C-6); 127,8 (C-4); 121,1 (C-8); 40,0 (C-1'); 31,9 (C-2'); 29,8 (C-3'); 29,4 (C-4'); 29,3 (C-5'); 27,1 (C-6'); 22,7 (C-7'); 14,2 (C-8') (MORCILLO et al., 2011).

6.5.4. Dioctilamida cinâmica (4)



Composto inédito

Aspecto: óleo amarelo

Rendimento: 63,2% (140,9 mg)

Fator de retenção: 0,8 (7:3 Hex:AcOEt)

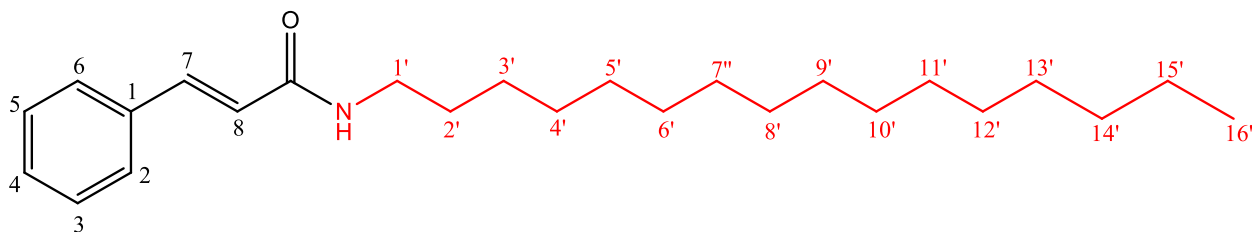
IV (KBr, cm^{-1}): 2958 (C-H sp^3); 1650 (C=O); 1605; 1459 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,69 (*d*, H-7, $J=15,4$ Hz, H=1), 7,50 (*dd*, H-2, H-6, $J=7,8$ Hz, 1,6 Hz, H=2), 7,36 (*m*, H-3, H-4, H-5, H=3), 6,82 (*d*, H-8, $J=15,4$ Hz, H=1), 3,39 (*quint*, H-1', H-1'', $J=7,6$ Hz, H=4), 1,60 (*s*, H-2', H-2'' H=4), 1,30 (*m*, H-3', H-3'', H-4', H-4'', H-5', H-5'', H-6', H-6'', H-7', H-7'', H=20), 0,87 (*t*, H-8', $J=6,8$ Hz, H=6).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 166,3 (C=O); 142,2 (C-7); 135,8 (C-1); 129,6 (C-3, C-5); 128,9 (C-2, C-6); 127,8 (C-4); 118,1 (C-8); 48,4 (C-1'); 47,1 (C-1''); 31,9 (C-

2', C-2''); 29,9 (C-3'); 29,6 (C-3''); 29,4 (C-4') 29,3 (C-4''); 28,1 (C-5'; C-5''); 27,3 (C-6'); 27,0 (C-6''); 22,8 (C-7'); 22,7 (C-7''); 14,2 (C-8', C-8'').

6.5.5. Hexadecilamida cinâmica (5)



Aspecto: sólido amorfo branco

Rendimento: 42,6 % (95,0 mg)

Ponto de fusão: 178-179 °C

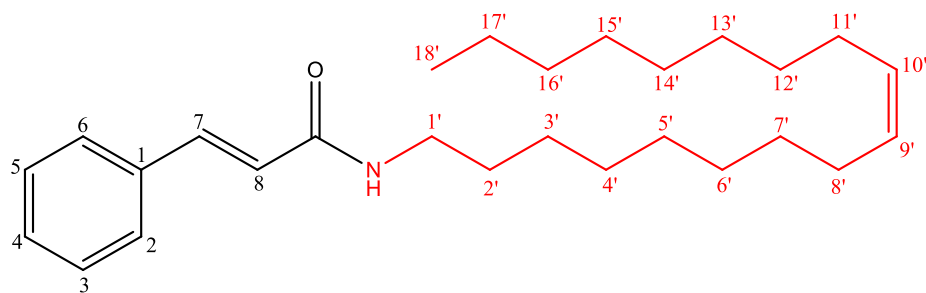
Fator de retenção: 0,5 (7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr, cm^{-1}): 3296 (N-H, amidas secundárias); 3057 (C-H sp^2 , aromático); 2921 (C-H sp^3); 1653 (C=O); 1613; 1470 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,61 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,48 (*m*, H-2, H-6, H=2), 7,34 (*m*, H-3, H-4, H-5, H=3), 6,41 (*d*, H-8, $J=15,6$ Hz, H=1) 3,37 (*dd*, H-1', $J=13,1$ Hz, 7,1 Hz, H=2), 1,56 (*quint*, H-2', $J=7$ Hz, H=2), 1,25 (*m*, H-3', H-4', H-5', H-6, H-7', H-8', H-9', H-10', H-11', H-12', H-13', H-14', H-15', H=26), 0,88 (*t*, H-16', $J=7$ Hz, H=3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 166,0 (C=O); 140,9 (C-7); 135,0 (C-1); 129,7 (C-3, C-5); 128,9 (C-2, C-6); 127,9 (C-4); 121,1 (C-8); 40,0 (C-1'); 32,1 (C-2'); 29,5-29,8 (C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-9', C-10', C-11', C-12', C-13', C-14'); 27,1 (C-3'); 22,8 (C-15'), 14,3 (C-16') (JUN et al., 2000).

6.5.6. Oleilamida cinâmica (6)



Aspecto: líquido amarelo

Rendimento: 42,1% (100,4 mg)

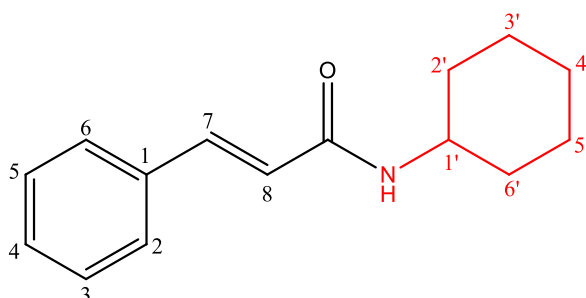
Fator de retenção: 0,7 (7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr, cm^{-1}): 3294 (N-H, amidas secundárias); 3063 (C-H sp^2 , aromático); 2925 (C-H sp^3); 1656 (C=O); 1618; 1467 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,62 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,48 (*dd*, H-2, H-6, $J=7,3$ Hz, 2 Hz, H=2), 7,34 (*m*, H-3, H-4, H-5, H=3), 6,41 (*d*, H-8, $J=15,6$ Hz, H=1), 5,84 (*s*, N-H, H=1), 5,36 (*m*, H-9', H-10', H=2), 3,38 (*dd*, H-1', $J=13,2$, 6,9 Hz, H=2), 2,00 (*m*, H-8', H-11', H=4), 1,56 (*m*, H-2', H=2), 1,28 (*m*, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-12', H-13', H-14', H-15', H-16', H-17', H=22), 0,88 (*t*, H-18', $J=6,9$ Hz, H=3)

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 166,0 (C=O); 140,9 (C-7); 135,1 (C-1); 130,1 (C-9'); 129,9 (C-10'); 129,7 (C-3, C-5); 128,9 (C-2, C-6); 127,9 (C-4); 121,0 (C-8); 40,0 (C-1'); 32,00 (C-16'); 29,4-29,9 (C-2', C-7', C-12', C-5', C-6', C-13', C-14', C-4', C-15'); 27,4 (C-8'); 27,3 (C-11'); 27,1 (C-3'); 22,8 (C-17'); 14,2 (C-18') (O'BRIEN et al., 2018).

6.5.7. Ciclohexilamida cinâmica (7)



Aspecto: sólido amorfo branco

Rendimento: 41,3% (56,8 mg)

Ponto de fusão: 86-87 °C (KNUNIANIS; GAMBARIAN, 1958)

Fator de retenção: 0,7 (7:3 Hex:AcOEt)

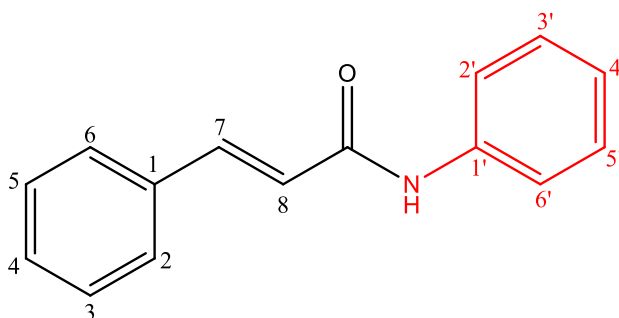
IV (KBr, cm^{-1}): 3278 (N-H, amidas secundárias); 3080 (C-H sp^2 , aromático); 2932 (C-H sp^3); 1655 (C=O); 1618; 1497 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,60 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,47 (*m*, H-2, H-6, H=2), 7,32 (*m*, H-3, H-4, H-5, H=3), 6,40 (*d*, H-8, $J=15,6$ Hz, H=1), 5,73 (*s*, N-H, H=1), 3,91 (*m*, H-1', H=1), 1,99 (*dd*, H-2'a, H-6'a, $J=3,5$ Hz, 3,5 Hz, H=2), 1,72 (*m*, H-

2'b, H-6'b, H-4'a, H=3), 1,39 (*m*, H-3'a, H-5'a, H=2), 1,20 (*m*, H-3'b, H-4'b, H-5'b, H=3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 165,1 (C=O); 140,7 (C-7); 135,1 (C-1); 129,6 (C-3, C-5); 128,9 (C-2, C-6); 127,8 (C-4); 121,4 (C-8); 48,5 (C-1'); 3,6 (C-2', C-6'); 25,7 (C-4'), 25,0 (C-3', C-5') (DUANGKAMOL et al., 2015).

6.5.8. Fenilamida cinâmica (8)



Aspecto: sólido marrom

Rendimento: 52,2% (69,9 mg)

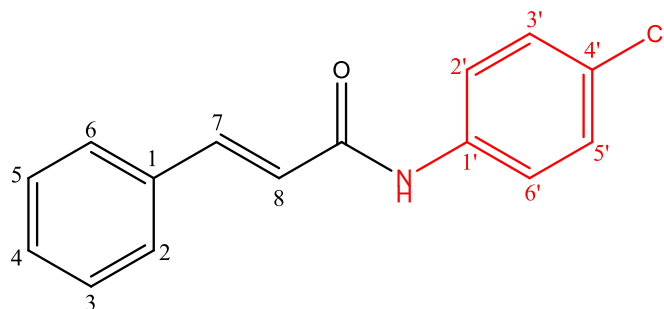
Ponto de fusão: 151-152°C (INOMATA et al., 1978)

Fator de retenção: 0,6 (7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr , cm^{-1}): 3271 (N-H, amidas secundárias); 3036 (C-H sp^2 , aromático); 1662 (C=O); 1625; 1495 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 8,16 (*s*, N-H, H=1), 7,74 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,67 (*d*, H-2', H-6', $J=7,5$ Hz, H=2), 7,43 (*dd*, H-2, H-6, $J=7,5$ Hz, 1,9 Hz, H=2), 7,31 (*m*, H-3, H-4, H-5, H-3', H-5', H=5), 7,11 (*t*, H-4', $J=7,4$ Hz, H=1), 6,66 (*d*, H-8, $J=15,6$ Hz, H=1).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 164,6 (C=O); 142,4 (C-7); 138,2 (C-1'); 134,7 (C-1); 130,0 (C-3', C-5'); 129,1 (C-3, C-5); 128,9 (C-2, C-6); 128,1 (C-4'); 124,6 (C-4) 121,2 (C-2', C-6'), 120,3 (C-8) (WANG et al., 2009).

6.5.9. 4-Clorofenilamida cinâmica (9)

Aspecto: sólido marrom

Rendimento: 49% (75,8 mg)

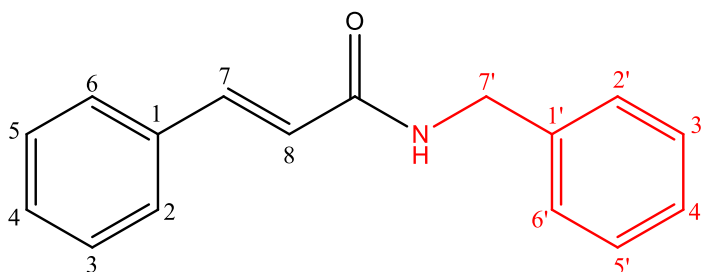
Ponto de fusão: 182-183°C (WANG et al., 2009)

Fator de retenção: 0,6 (7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr, cm^{-1}): 3297 (N-H, amidas secundárias); 3097 (C-H sp^2 , aromático); 1661 (C=O); 1624; 1491 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ_{H} 9,48 (s, N-H, H=1), 6,88 (*d*, H-2', H-6', $J=8,9$ Hz, H=2), 6,77 (*m*, H-2, H-6, H-7, H=3), 6,57 (*m*, H-3, H-4, H-5, H-3', H-5', H=5), 5,96 (*d*, H-8, $J=15,7$ Hz, H=1).

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ_{C} 163,6 (C=O); 140,5 (C-7); 138,2 (C-1'); 134,6 (C-1); 129,8 (C-3', C-5'); 129,0 (C-3, C-5); 128,7 (C-2, C-6); 127,8 (C-4); 126,9 (C-4') 121,9 (C-8), 120,8 (C-2', C-6') (RHAZRI et al., 2015).

6.5.10. Benzilamida cinâmica (10)

Aspecto: sólido amorfo branco

Rendimento: 71,2% (101,8 mg)

Ponto de fusão: 109-110 °C (SAITO; OUCHI; TAKAHATA, 2008)

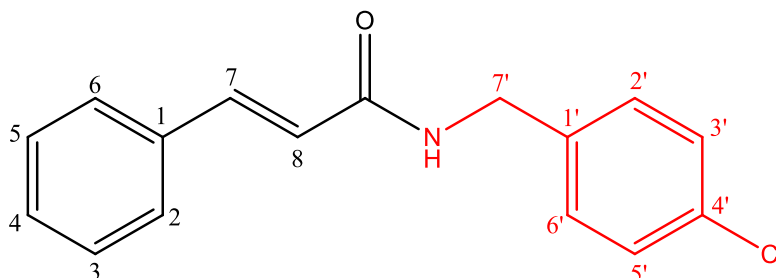
Fator de retenção: 0,4 (7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr, cm^{-1}): 3265 (N-H, amidas secundárias); 3029 (C-H sp^2 , aromático); 2926 (C-H sp^3); 1653 (C=O); 1616; 1497 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,66 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,46 (*dd*, H-2, H-6, $J=6,2$ Hz, 3,4 Hz, H=2), 7,31 (*m*, H-3, H-4, H-5, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H=8), 6,47 (*d*, H-8, $J=15,6$ Hz, H=1), 6,35 (*s*, N-H, H=1), 4,54 (*d*, H-7', $J=5,8$ Hz, H=2).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 166,0 (C=O); 141,4 (C-7); 138,3 (C-1'); 134,9 (C-1); 129,8 (C-3, C-5); 128,9 (C-3', C-5'); 128,8 (C-2, C-6); 128,0 (C-4'); 127,9 (C-4) 127,6 (C-2', C-4', C-6'), 120,7 (C-8), 43,9 (C-7') (CHAUDHARI et al., 2010).

6.5.11. 4-clorobenzilamida cinâmica (11)



Aspecto: sólido amorfo amarelo

Rendimento: 49,3% (80,5 mg)

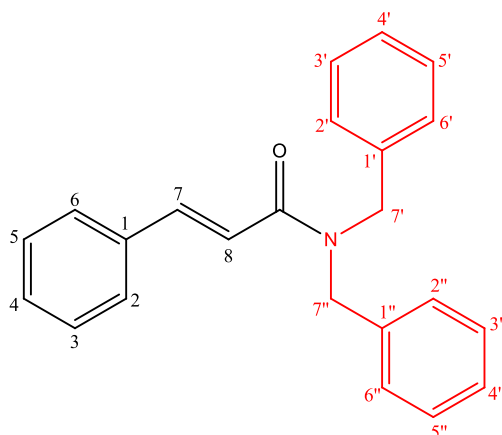
Ponto de fusão: 127-128 °C (BARAJAS et al., 2008)

Fator de retenção: 0,7(7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr, cm^{-1}): 3259 (N-H, amidas secundárias); 3083 (C-H sp^2 , aromático); 2921 (C-H sp^3); 1655 (C=O); 1621; 1489 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,67 (*d*, H-7, $J=15,6$ Hz, H=1), 7,49 (*m*, H-2, H-6, H=2), 7,31 (*m*, H-3, H-4, H-5, H-2', H-3', H-5', H-6', H=7), 6,47 (*d*, H-8, $J=15,6$ Hz, H=1), 6,33 (*s*, N-H, H=1), 4,52 (*d*, H-7', $J=5,9$ Hz, H=2).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 166,1 (C=O); 141,8 (C-7); 136,9 (C-1'); 134,8 (C-1); 133,4 (C-4'); 129,9 (C-2', C-6'); 129,3 (C-3', C-5'); 129,0 (C-3, C-5); 128,9 (C-2, C-6) 127,9 (C-4), 120,4 (C-8), 43,2 (C-7') (MONTES et al., 2011).

6.5.12. 4-dibenzilamida cinâmica (12)

Aspecto: sólido amorfo amarelo

Rendimento: 61,6% (101,2 mg)

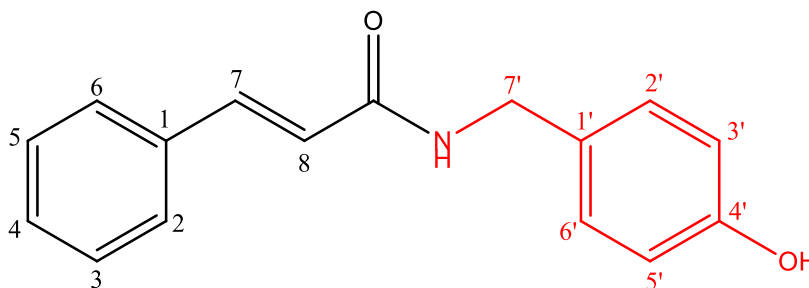
Ponto de fusão: 157-158 °C (YASUI et al., 2007)

Fator de retenção: 0,4 (7:3 Hex:AcOEt)

IV (KBr, cm^{-1}): 3084 (C-H sp^2 , aromático); 2982 (C-H sp^3); 1643 (C=O); 1593; 1495 (C=C, aromático).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,90 (*d*, H-7, $J=15,4$ Hz, H=1), 7,50 (*dd*, H-2, H-6, $J=6,5$ Hz, 3,2 Hz, H=2), 7,36 (*m*, H-3, H-4, H-5, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H=13), 6,95 (*d*, H-8, $J=15,4$ Hz, H=1), 4,71 (*d*, H-7', H-7'', $J=44,2$ Hz, H=4).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 167,4 (C=O); 144,0 (C-7); 137,5 (C-1'); 136,8 (C-1''); 135,3 (C-1); 129,8 (C-3, C-5); 129,1 (C-2, C-6); 129,0 (C-3', C-5'); 128,7 (C-3'', C-5''); 128,5 (C-2', C-6') 128,0 (C-2'', C-6''), 127,8 (C-4), 127,6 (C-4'), 126,7 (C-4''), 117,4 (C-8), 50,2 (C-7'), 49,0 (C-7'') (YASUI et al., 2007).

6.5.13. 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13)

Composto inédito**Aspecto:** cristais brancos**Rendimento:** 36% (54,7 mg)**Ponto de fusão:** 188-189 °C**Fator de retenção:** 0,1(7:3 Hex:AcOEt)**IV (KBr, cm^{-1}):** 3246 (N-H, amidas secundárias); 3066 (C-H sp^2 , aromático); 2969 (C-H sp^3); 1649 (C=O); 1614; 1465 (C=C, aromático).**RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz):** δ_{H} 9,26 (s, N-H, H=1), 8,44 (s, O-H, H=1), 7,52 (d, H-2', H-6', $J=8$ Hz, H=2), 7,37 (m, H-2, H-4, H-6, H-7, H=4), 7,07 (d, H-3, H-5, $J=8$ Hz, H=2), 6,68 (m, H-8, H-3', H-5', H=3), 4,25 (d, H-7', $J=5,8$ Hz, H=2).**RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz):** δ_{C} 164,8 (C=O); 156,3 (C-O); 138,8 (C-7); 135,0 (C-1); 129,5 (C-1'); 128,9 (C-3, C-5); 128,8 (C-2, C-6); 127,5 (C-4, C-2', C-6'); 122,3 (C-8); 115,1 (C-3', C-5'); 41,9 (C-7').**7. PARTE EXPERIMENTAL - ETAPA BIOLÓGICA****7.1. Local de trabalho**

A etapa biológica do estudo foi realizada no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC), no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

7.2. Substâncias, materiais e métodos utilizados

Para realização dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e possíveis mecanismos de ação, utilizaram-se as cepas de referência de *Candida* spp. obtidas da Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS): *C. albicans* CBS562, *C. krusei* CBS573e *C. tropicalis* CBS94. Nistatina, Tween 80%, dimetil-sulfóxido (DMSO) e ergosterol foram obtidos da Sigma-Aldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) eo sorbitol (D-sorbitol anidro) do INLAB® (São Paulo, Brasil). Já o meio de cultura utilizado nos ensaios de avaliação da atividade antifúngica foi o Caldo Sabouraud Dextrose (ASD), da Kasvi, preparado segundo as normas do fabricante.

7.3. Ajuste de inóculo

Para que os microrganismos fossem reativados, inicialmente foram inoculados em meio de cultura estéril (ASD) e incubados por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. O inóculo foi ajustado a concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, utilizando a absorbância (obtida no espectrofotômetro) do inóculo inicial para detectar o volume (em μL) necessário, em seguida, submeteu-se a diluição em meio ASD, obtendo-se assim o inóculo final ajustado (PEIXOTO et al., 2017).

7.4. Triagem antifúngica

Realizou-se inicialmente uma triagem com as treze amidas cinâmicas preparadas nesse estudo (**1-13**), para avaliar quais apresentariam atividade frente às cepas de *Candida* spp. na concentração máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para isso, utilizou-se uma placa de 96 poços de fundo em U contendo meio e estéreis, onde aplicou-se as substâncias em triplicatas, sem realizar as diluições. Em paralelo foram realizados os controles: controle do meio (ASD), controle dos microrganismos (ASD + inóculo), controle para as substâncias (ASD + 50 μL de cada produto) e controle positivo utilizando a nistatina na concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C , e os resultados foram lidos por observação visual de agregados celulares no fundo dos poços. As amidas **1** e **4** apresentaram atividade antifúngica na concentração testada e foram então utilizadas nos ensaios de CIM, CFM e determinação do mecanismo.

7.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM das amidas **1** e **4** foi realizada utilizando a técnica de microdiluição em placa de 96 poços com fundo em U, de acordo com o previsto pelo CLSI (Instituto de Padrões para Laboratório Clínico) (2002). Para realização do teste as amostras e os controles foram diluídos em DMSO e água destilada e distribuiu-se 100 μL do caldo sabouraud dextrose (ASD) nos orifícios das placas. Posteriormente, 100 μL da solução dos produtos preparados foram aplicados em triplicata nos poços distribuídos na primeira linha da placa e então realizou-se uma diluição seriada a uma razão 1:2, obtendo concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ até 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, distribuiu-se 100 μL do inóculo da cepa fúngica em cada poço das placas. Em paralelo foram realizados os controles: controle do meio (ASD), controle dos microrganismos (ASD + inóculo), controle para as substâncias (ASD + 50 μL de cada produto) e controle positivo (nistatina na concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$). As placas

foram incubadas por 24 horas a 35 °C, e os resultados foram lidos por observação visual de agregados celulares no fundo dos poços.

Após as 24 horas de incubação foi adicionado a cada poço, 50 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (TCT) a 1% (Sigma-Aldrich®), que é um indicador colorimétrico de óxido-redução para fungos. As placas foram incubadas novamente 35 ± 2 °C por 24 horas (GRABE, 1976; DESWAL; CHAND, 1997; DUARTE et al., 2005; HAMIDPOUR et al., 2015).

A CIM foi definida como a menor concentração capaz de produzir uma inibição visível do crescimento fúngico observado através da coloração vermelha nos poços, comparando ao controle. A atividade antifúngica das duas amidas foi interpretada seguindo os critérios a seguir: < abaixo de 500 µg/mL = atividade forte/ótima; 600-1500 µg/mL = atividade moderada; > acima de 1500 µg/mL = atividade fraca ou produto inativo (SARTORATTO et al., 2004; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

7.6. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM foi realizada após leitura da CIM, onde três alíquotas de 30 µL foram retiradas dos poços correspondentes à CIM em maiores concentrações e subcultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI1, Kasv Imp e Dist de Prod/Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil). Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C e realizada a leitura (PEIXOTO et al., 2017).

A CFM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico em meio sólido. Em seguida, calculou-se a razão CFM/CIM para determinar se a substância era fungistática ($CFM / CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM/CIM < 4$) (PEIXOTO et al., 2017).

7.7. Determinação do mecanismo de ação

7.7.1. Ensaio de sorbitol

O teste foi realizado por meio da determinação da CIM (metodologia descrita na seção 7.5.) na presença e ausência de sorbitol (D-sorbitol anidro), com finalidade de comparar os valores da CIM das substâncias **1** e **4** frente às cepas de *C. albicans* CBS562. Utilizou-se como controle positivo a caspofungina na concentração inicial de 4µg/mL, visto que, visto que, já existem estudos na literatura sobre a atividade

dessa substância na parede celular da levedura (COLOMBO et al., 2013; SOURMAGHI et al., 2015).

Considerando a capacidade do sorbitol em atuar como protetor osmótico da parede celular fúngica, quando há valores maiores de CIM após adição de sorbitol (meio padrão), indica a parede celular como um dos possíveis alvos celulares da substância testada.

7.7.2. Ensaio de ergosterol

O ensaio de ergosterol é semelhante ao realizado com sorbitol (citado na seção 7.7.1., onde a CIM na presença de ergosterol é definida como a menor concentração da substância inibindo o crescimento microbiano. Portanto, utiliza-se a nistatina como controle positivo, tendo em vista, sua atividade conhecida nas membranas das células de levedura, alterando a permeabilidade da membrana por meio da ligação aos esteróis presentes na mesma (HWANG et al., 2014; COSTA, 2017).

8. PARTE EXPERIMENTAL - QUÍMICA COMPUTACIONAL

8.1. Local de trabalho

A etapa computacional do estudo foi realizada na Universidade das Américas, Quito, Equador pelo pesquisador Yunierkis P. Castillo.

8.2. Seleção de alvos

O composto **4** foi objeto de “*fishing*” computacional de alvos usando o Similarity Ensemble Approach (SEA) (KEISER et al., 2007). Os alvos em potencial identificados por esse método foram usados para consultas em uma pesquisa “*Blast*” contra o proteoma de *Candida albicans* (taxid: 5476) usando o servidor NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1997). Para evitar duplicações na lista de alvos em potencial e reduzir seu comprimento, apenas o principal, ou seja, aquele com o menor valor de E de cada alvo identificado pela SEA foi considerado em análises posteriores. A partir da lista gerada, proteínas de *Candida albicans* com pelo menos 30% de identidade com qualquer alvo potencial identificado pela SEA e coberto em mais de 70% de suas sequências pelo alinhamento “*Blast*” foram consideradas alvos potenciais do composto **4**. As sequências de aminoácidos

desses possíveis alvos foram recuperados do GenBank (BENSON et al., 2013) e mapeados para os códigos de acesso do UniProt através de uma pesquisa “Blast” em todo o banco de dados UniProtKB usando a implementação posterior do servidor Blast.

8.3. Docking molecular

A estrutura tridimensional inicial do composto **4** foi obtida com o Omega da OpenEye e cargas parciais atômicas de AM1-BCC foram adicionadas a essa conformação inicial com Molcharge. Como nenhuma proteína selecionada como alvo potencial do composto **4** tem sua estrutura resolvida, modelos de proteínas e homologia foram gerados com o servidor SWISS-MODEL (BIENERT et al., 2017). Quaisquer metais e cofatores importantes cataliticamente ou funcionalmente foram adicionados aos modelos de homologia usando suas orientações nos respectivos modelos estruturais.

Os cálculos de acoplamento molecular foram realizados conforme estudos anteriores (TURKEZ et al., 2019; LOPES et al., 2019) usando o Gold (JONES et al., 1997). Os locais de ligação foram definidos tomando como referência qualquer ligante co-cristalizado com as estruturas do modelo ou um resíduo funcionalmente relevante na bolsa de ligação do receptor. O encaixe e as pontuações primárias foram realizados com a função de pontuação CHEMPLP, com o parâmetro de eficiência de busca definido em 30 e 200%, soluções de pontuação diferentes foram exploradas para todos os sistemas receptores de ligantes. As posições dos ligantes obtidas durante a etapa de acoplamento primário foram recuperadas com as funções de pontuação “GoldScore”, “ChemScore” e ASP do “Gold”. O modo de ligação mais provável do composto **4** para cada alvo foi selecionado com base em uma estratégia de pontuação por consenso. Essa estratégia considera a pontuação da posição de acordo com todas as funções de pontuação j ($S_{i,j}$), o valor médio da função de pontuação j em todos os modos de ligação previstos ($\bar{S}_j$) e seu desvio padrão ($std(S_j)$). Com esses valores, a pontuação Z_i de consenso correspondente à parte superior foi calculado com a equação A. Para todos os sistemas, a pose com a maior pontuação de consenso e qualquer pose prevista com $Z_i > 1$ foram selecionadas para análises posteriores.

$$Z_i = \sum_j \frac{S_{i,j} - \bar{S}_j}{std(S_j)} \quad (\text{Equação A})$$

8.4. Simulações de dinâmica molecular e cálculos de MM-PBSA

Todas as simulações de Dinâmica Molecular (MD) como cálculos de MM-PBSA foram realizadas com Amber 18 (CASE et al., 2018). Os sistemas estavam sujeitos ao mesmo esquema de modelagem que incluía preparação, minimização, aquecimento, equilíbrio e produção, usando o mesmo protocolo utilizado em pesquisa anterior do grupo de pesquisa (LOPES et al., 2019). Resumindo, as simulações de MD foram realizadas em solvente explícito usando os campos ff14SB e gaff force para resíduos aminoácidos e não aminoácidos, respectivamente. O método PME foi utilizado para tratar interações eletrostáticas de longo alcance. A distância de corte da PME foi ajustada para 10 Å durante a minimização e para 12 Å para as etapas restantes.

A preparação dos sistemas foi realizada com antecâmara. Os sistemas foram incorporados em caixas de octaedro truncados e solvatados com moléculas de água TIP3P. As cargas excedentes foram neutralizadas pela adição de íons Na^+ ou Cl^- . A minimização dos sistemas prosseguiu em duas etapas com volume constante, a primeira consistindo em 500 etapas do método de descida mais íngreme, seguidas por 500 ciclos de gradiente conjugado. Durante esta primeira etapa de minimização, todos os átomos, exceto os contra-íons e as moléculas de água, foram restringidos com uma constante de força de 500 Kcal/mol.Å^2 . Por outro lado, nenhuma restrição foi aplicada durante o segundo estágio de minimização, que consistiu em 500 etapas do método de descida mais íngreme, seguidas por 1000 ciclos de gradiente conjugado.

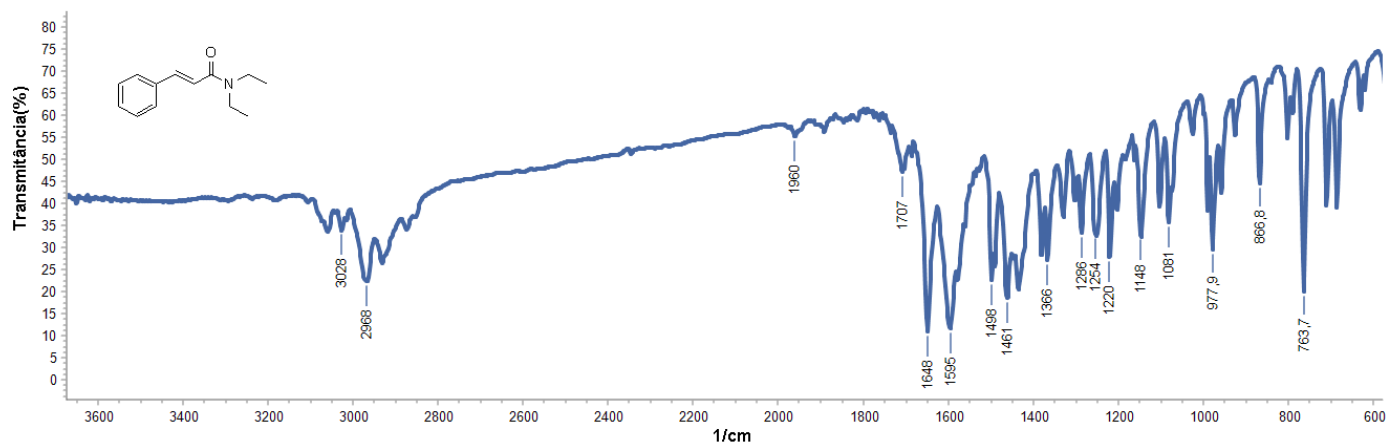
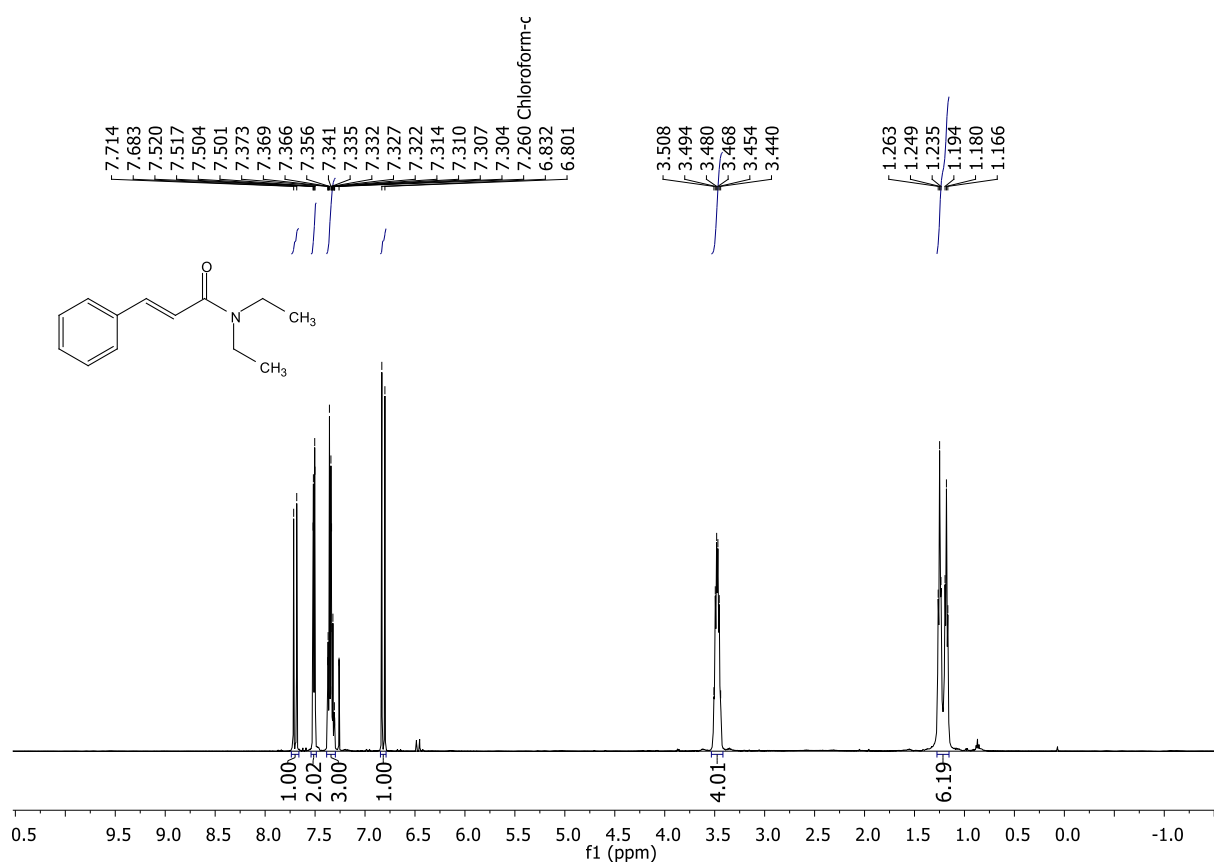
Os sistemas minimizados foram aquecidos de 0 K a 300 K durante 10000 etapas com uma etapa de tempo de 2 fs. O aquecimento foi realizado em volume constante e tudo, exceto as moléculas de água e os contra-íons, foi restringido com uma constante de força de 10 Kcal/mol.Å^2 . Um termostato Langevin com uma frequência de colisão de $1,0 \text{ ps}^{-1}$ foi empregado durante as execuções de aquecimento, equilíbrio e produção. Da mesma forma, as ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas com o algoritmo SHAKE e suas interações foram negligenciadas durante os estágios listados anteriormente.

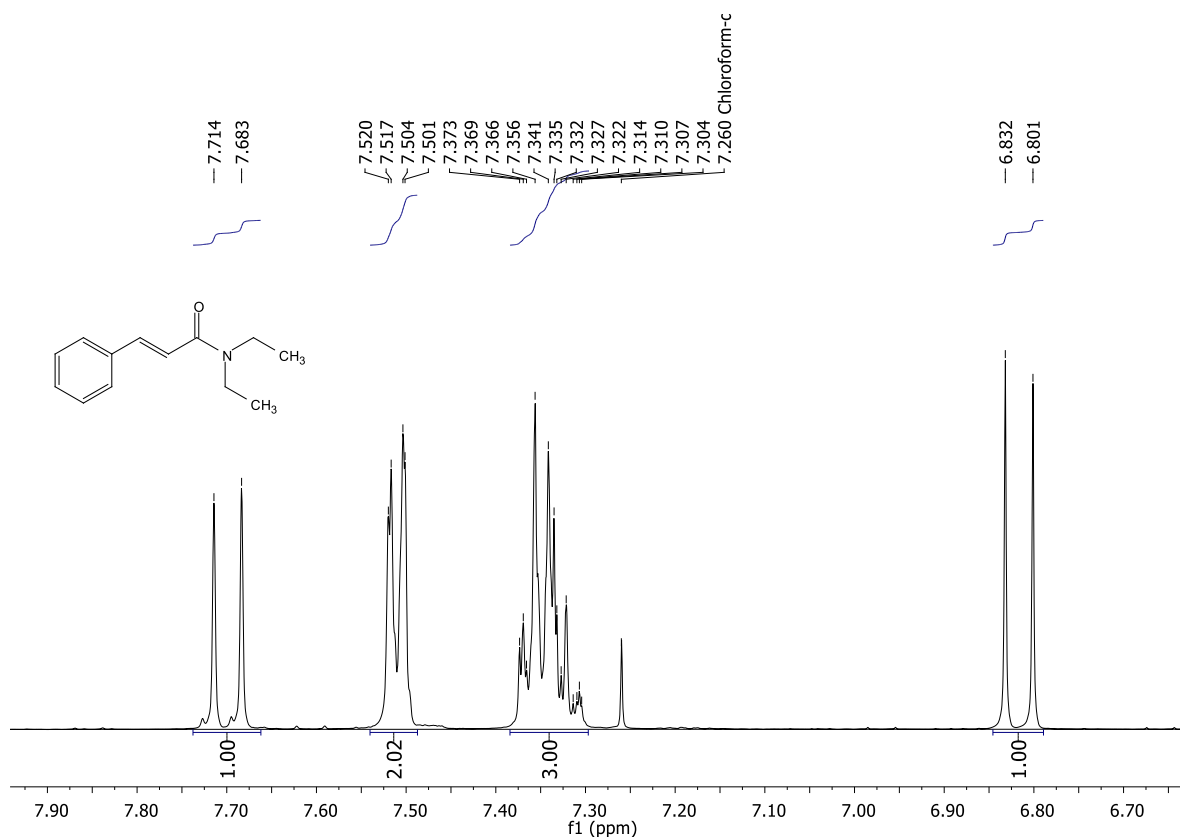
Os sistemas aquecidos foram então equilibrados durante 100 ps a pressão constante e temperatura constante. A temperatura foi mantida a 300 K e a pressão a

1 equilíbrio de barragem. A pressão foi controlada com escala de posição isotrópica, estabelecendo um tempo de relaxamento de 2 ps. Os sistemas equilibrados foram utilizados como entrada para 20 séries diferentes de produção de MD, cada uma com duração de 2 ns. Os parâmetros das execuções de produção foram os mesmos que durante o estágio de equilíbrio. Para garantir a exploração de diversos estados dos sistemas, as velocidades atômicas foram inicializadas aleatoriamente antes de cada produção.

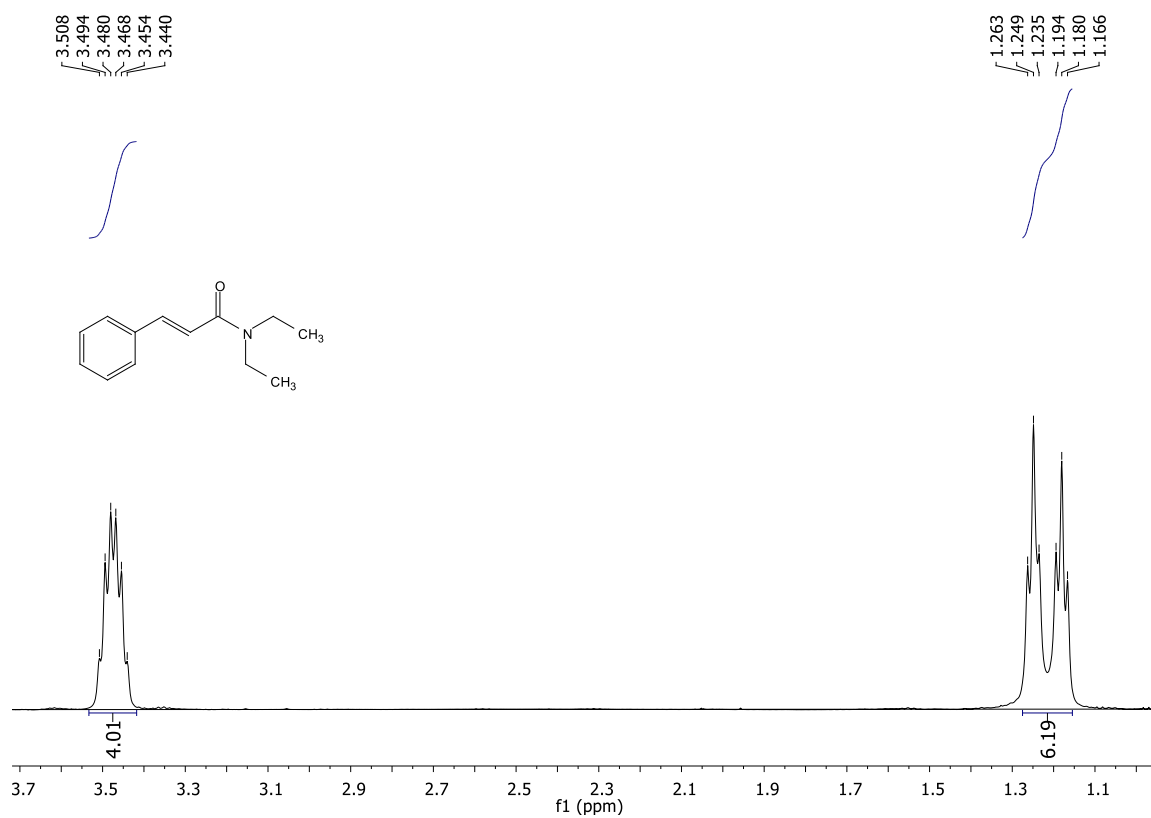
Para a estimativa das energias livres de ligação através dos cálculos de MM-PBSA, 200 sistemas de captura instantânea (um a cada 200 ps) foram extraídos de todas as execuções de produção MD. A força iônica foi ajustada para 100 mM e os parâmetros padrão foram empregados durante os cálculos de MM-PBSA. Os cálculos foram realizados com a implementação em python do algoritmo MM-PBSA distribuído com Amber 18 (MILLER et al., 2012).

9. ESPECTROS REFERENTES AOS COMPOSTOS OBTIDOS

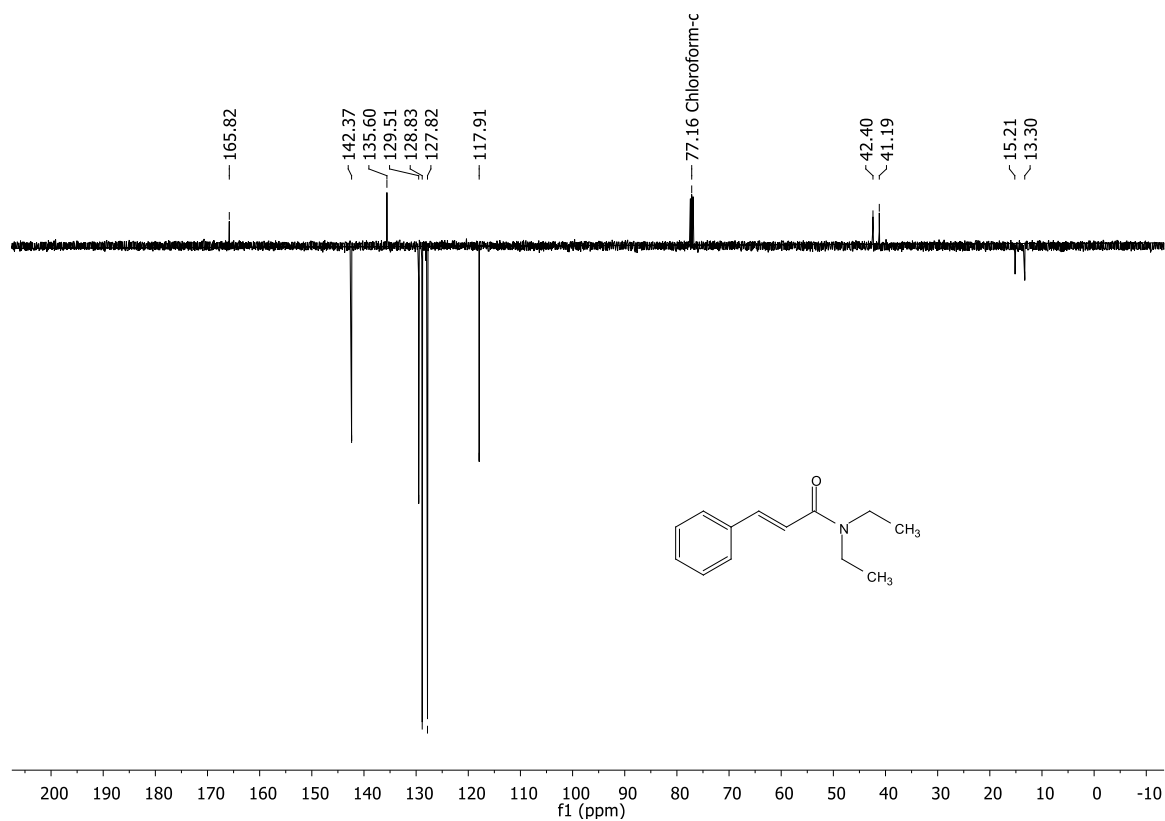
Espectro 1: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da dietilamida cinâmica (1).Espectro 2: Espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da dietilamida cinâmica (1).



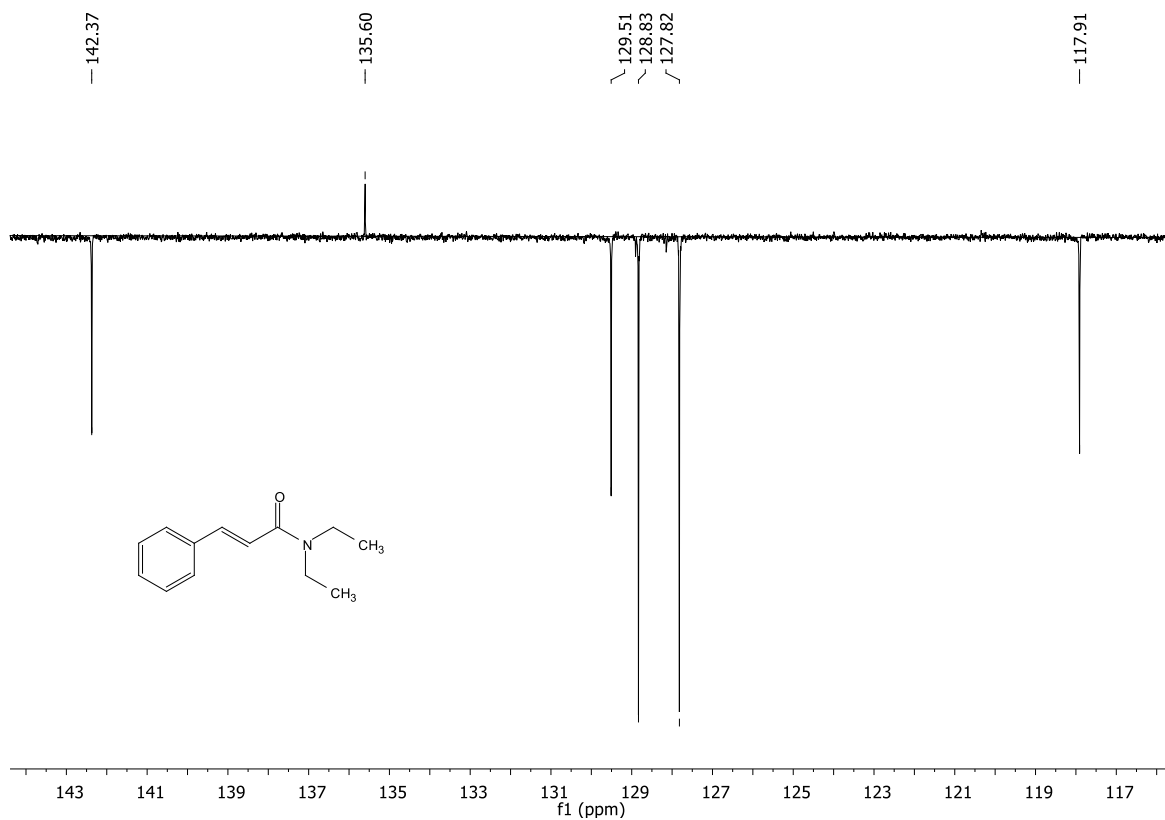
Espectro 3: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da dietilamida cinâmica (1).



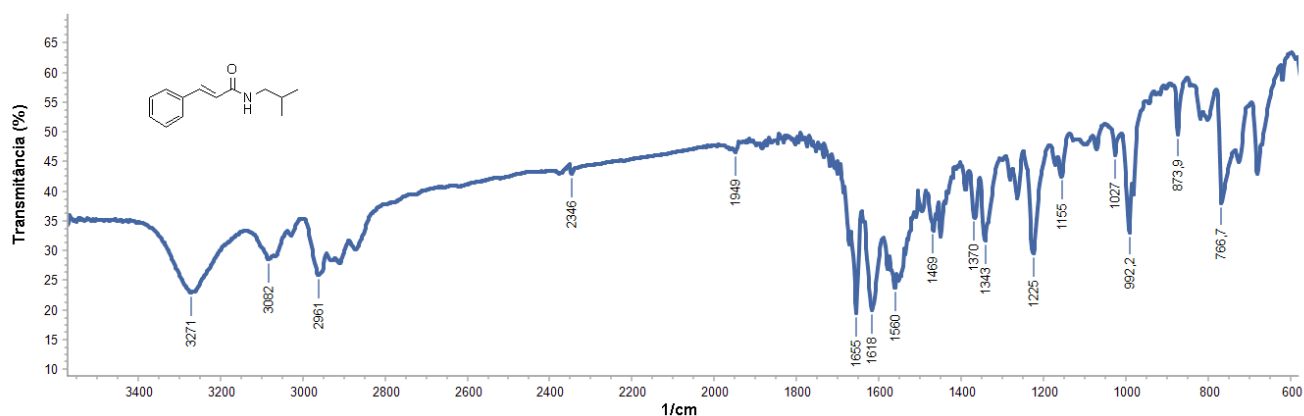
Espectro 4: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da dietilamida cinâmica (1).



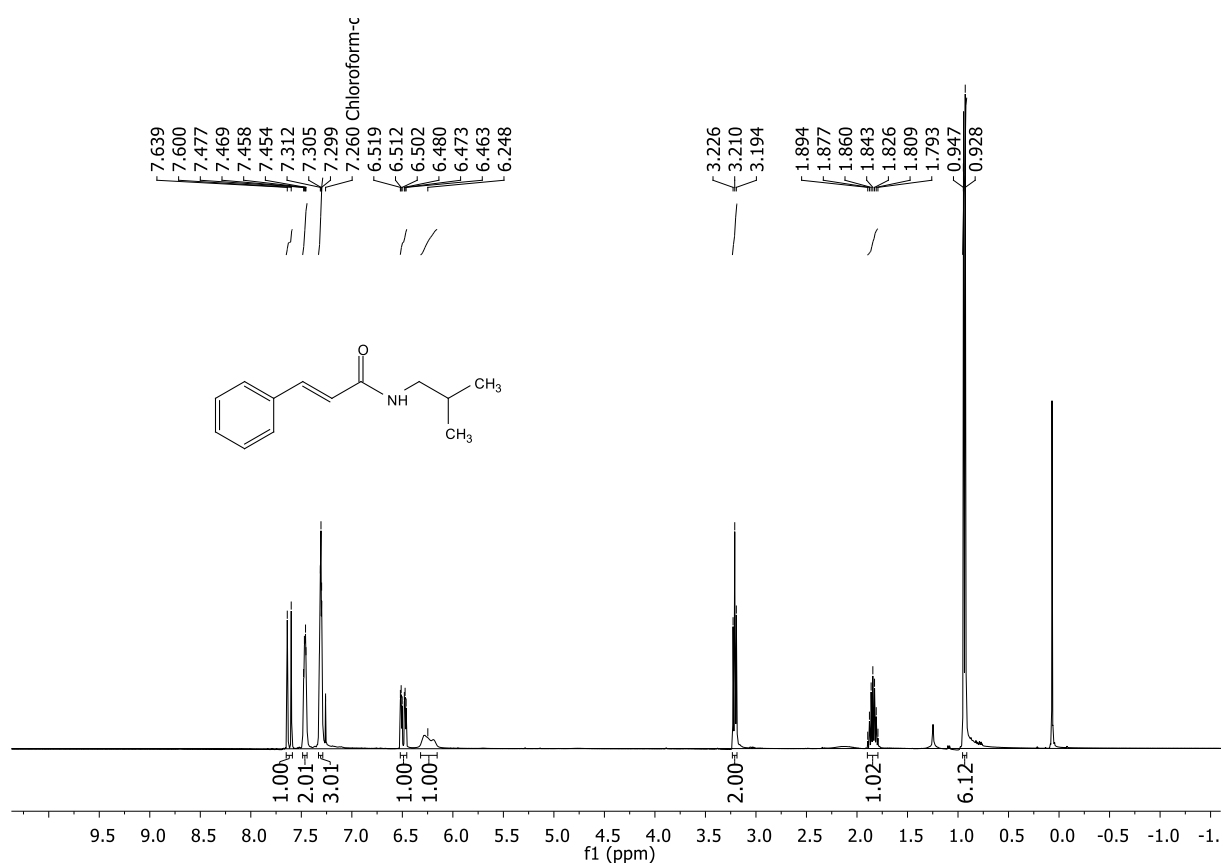
Espectro 5: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da dietilamida cinâmica (1).



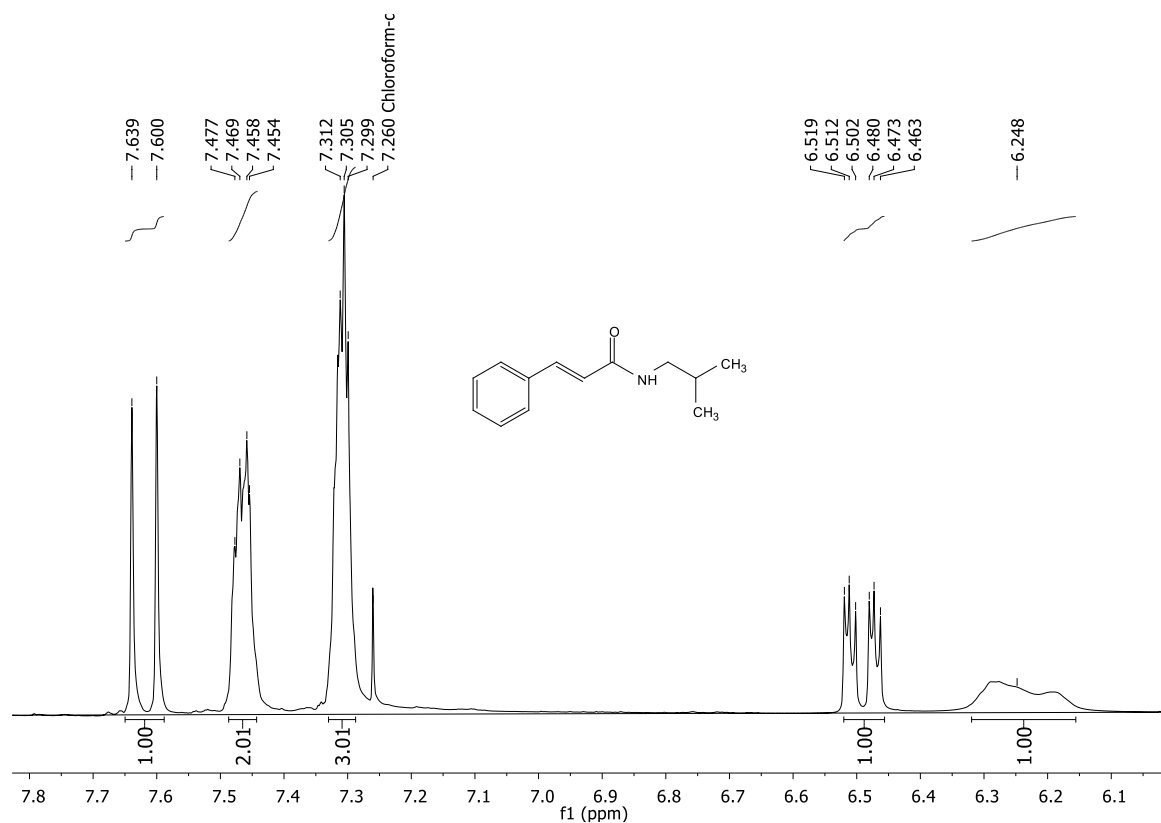
Espectro 6: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da dietilamida cinâmica (1).



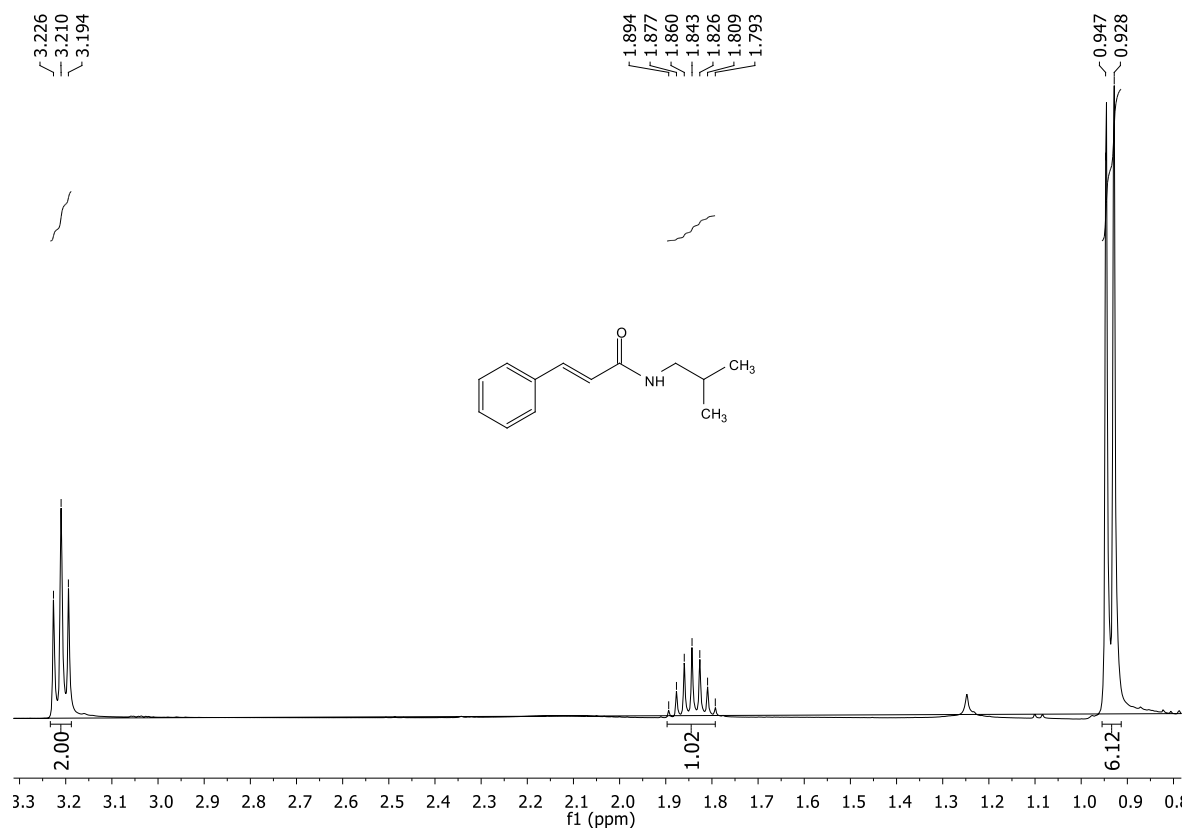
Espectro 7: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da isobutilamida cinâmica (2).



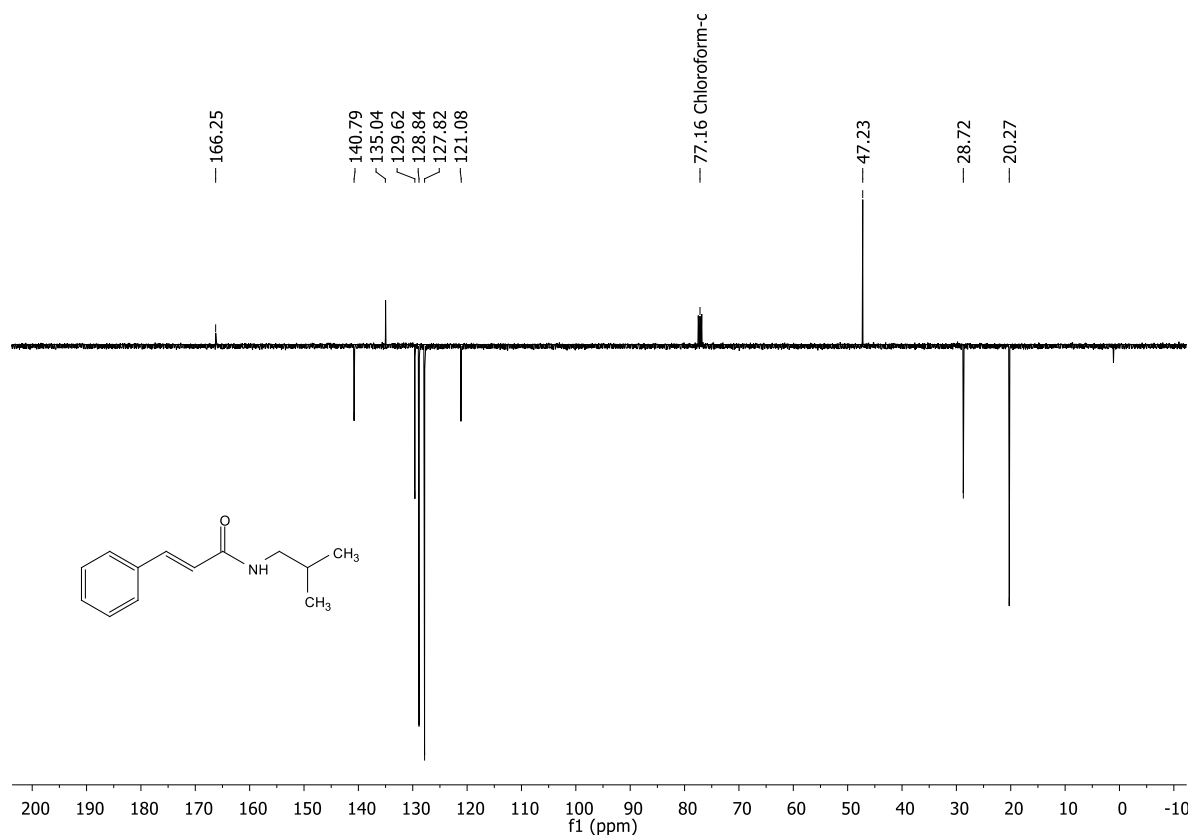
Espectro 8: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da isobutilamida cinâmica (2).



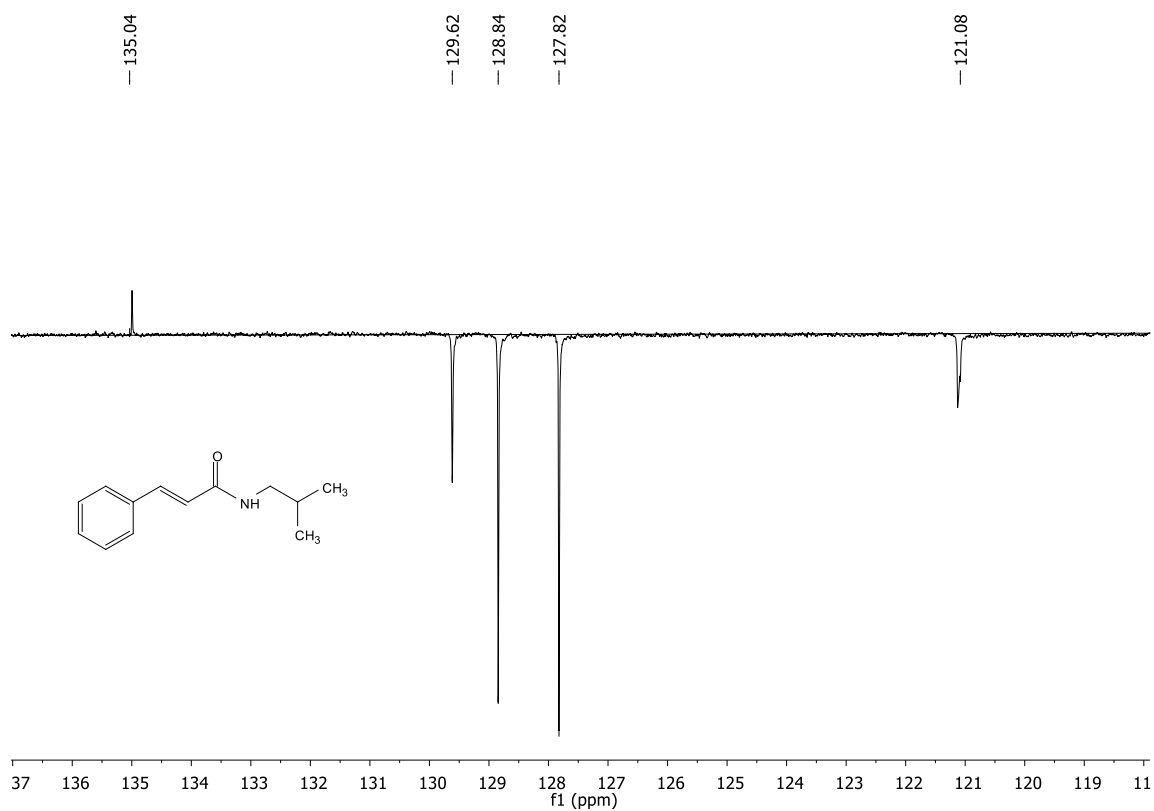
Espectro 9: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).



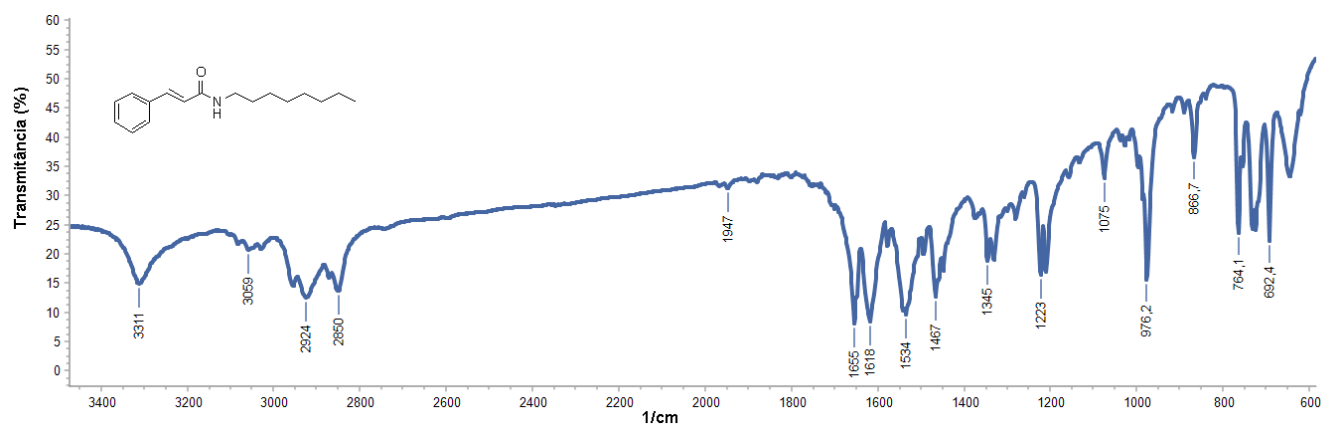
Espectro 10: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).



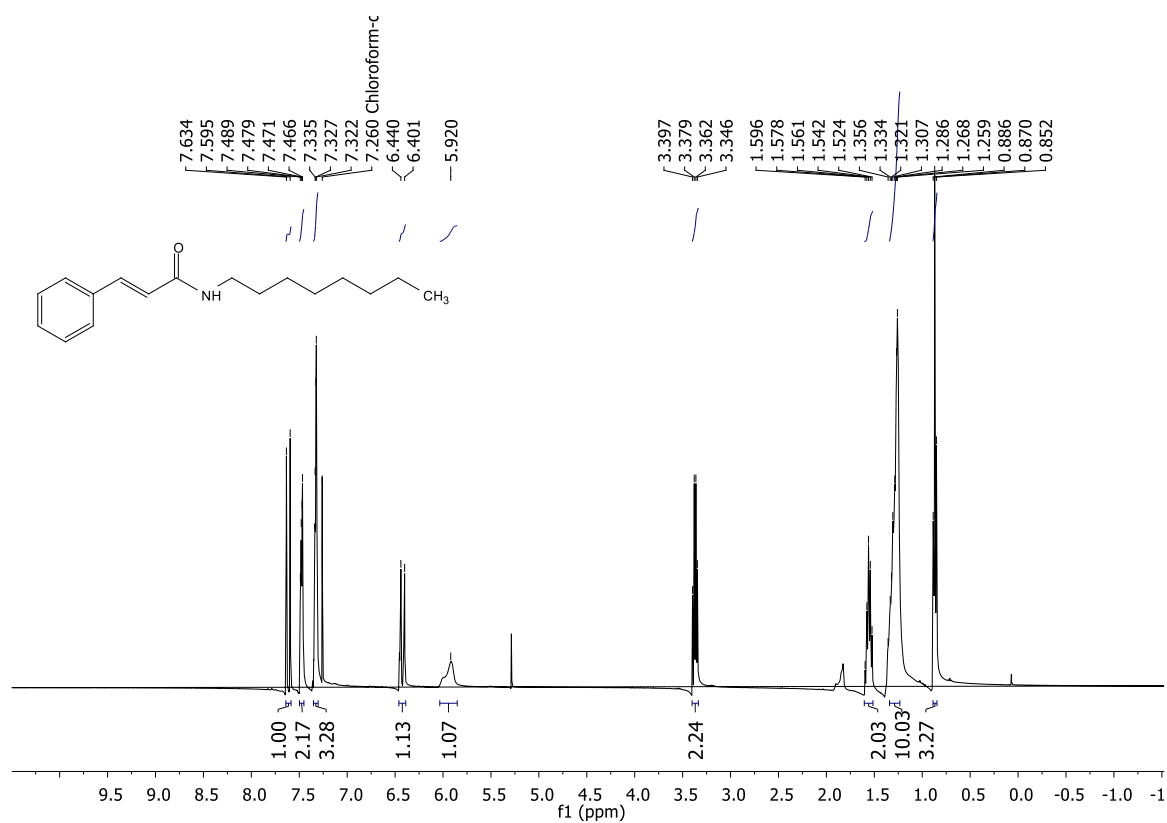
Espectro 11: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).



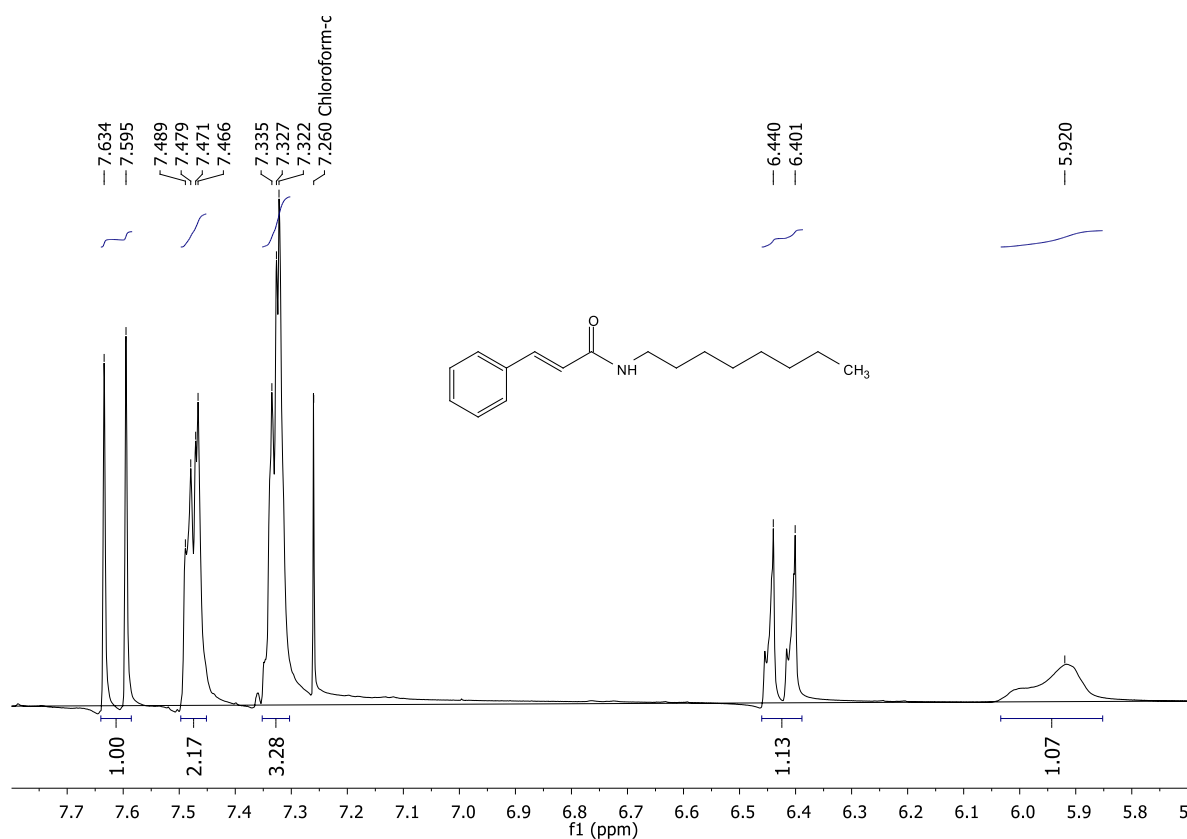
Espectro 12: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da isobutilamida cinâmica (2).



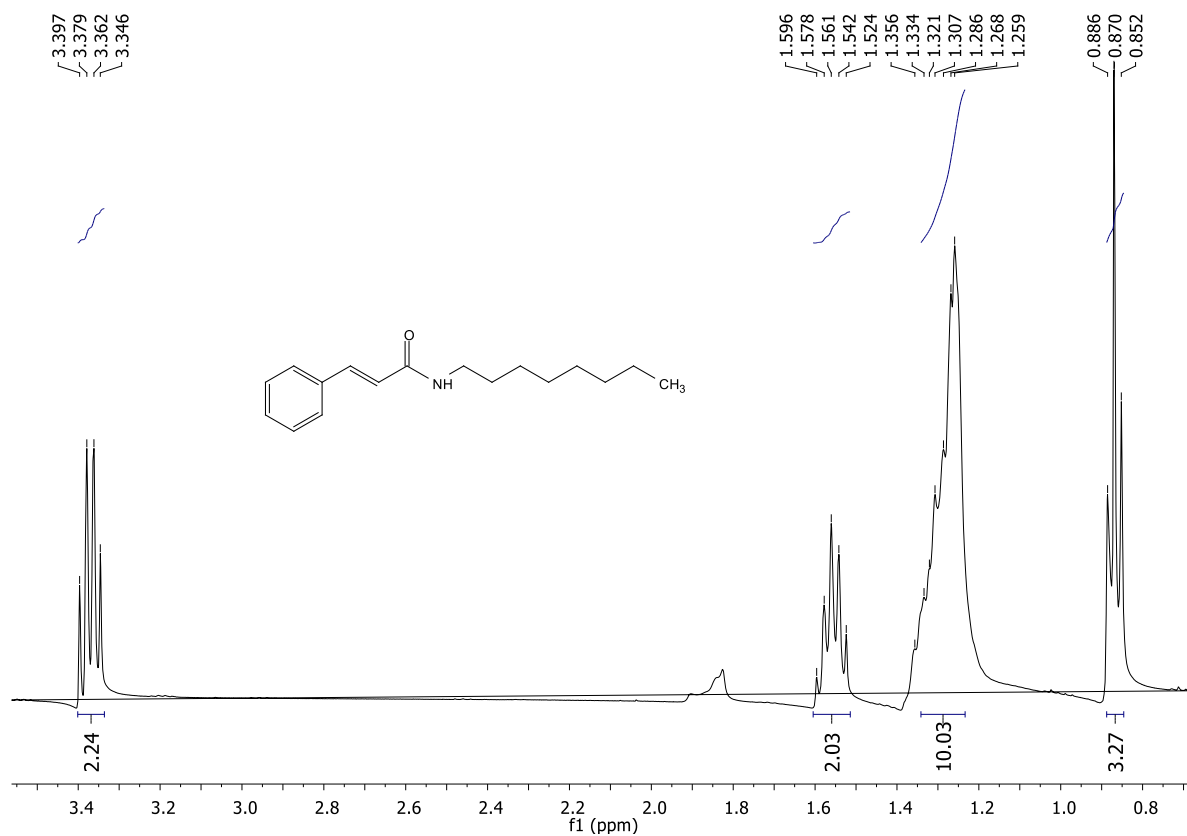
Espectro 13: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da octilamida cinâmica (3).



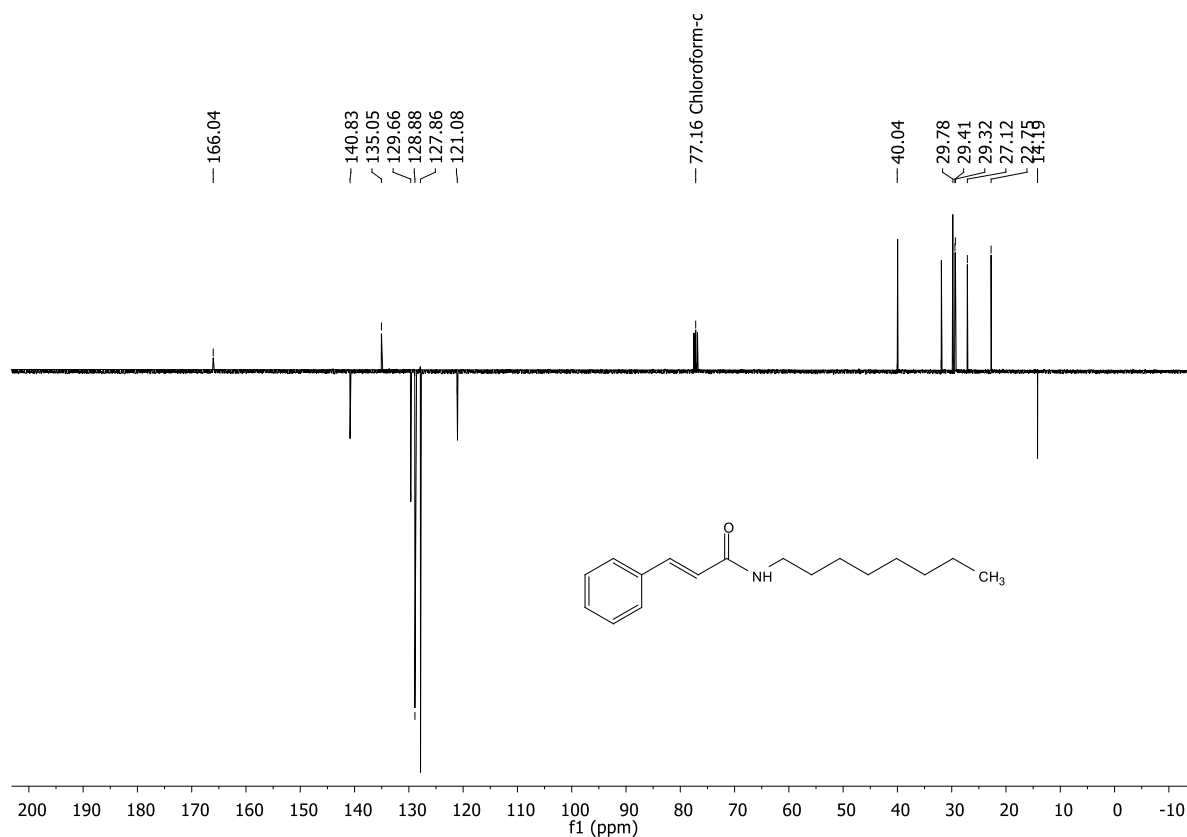
Espectro 14: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da octilamida cinâmica (3).



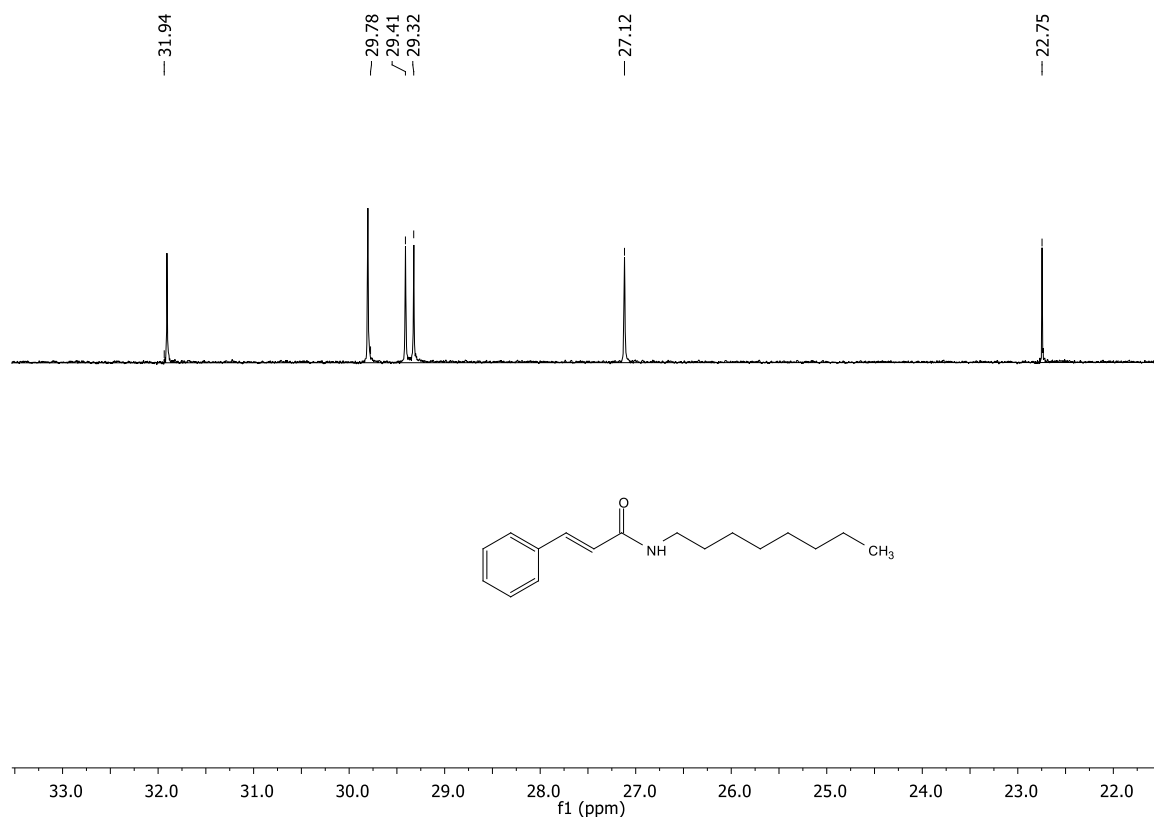
Espectro 15: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da octilamida cinâmica (3).



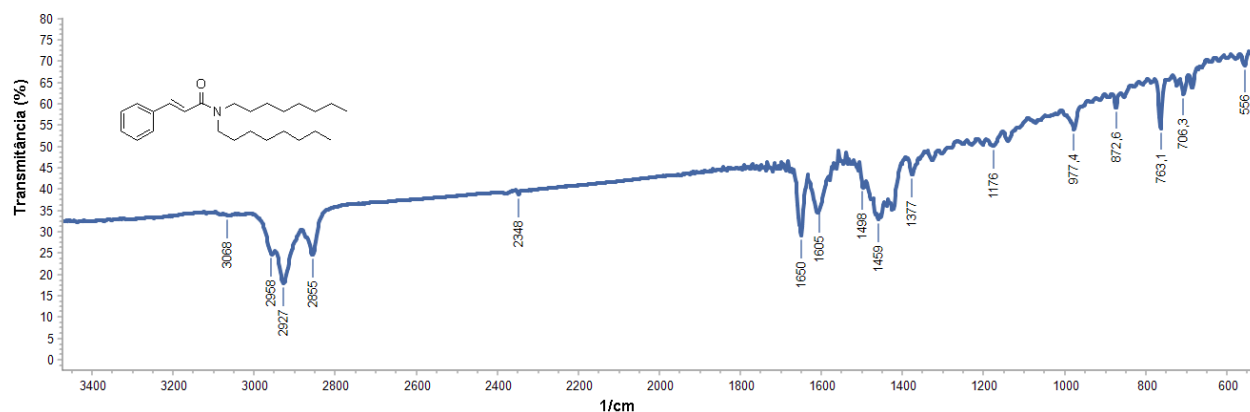
Espectro 16: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da octilamida cinâmica (3).



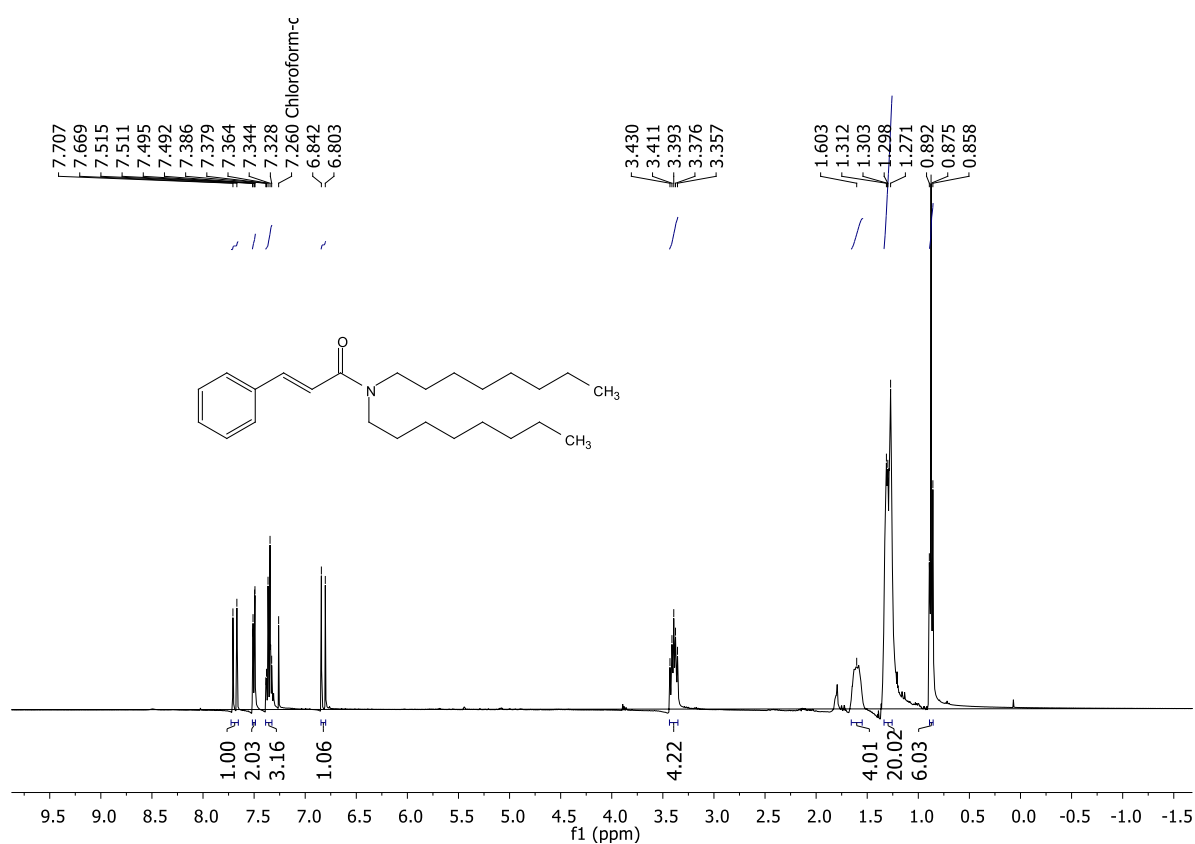
Espectro 17: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) octilamida cinâmica (3).



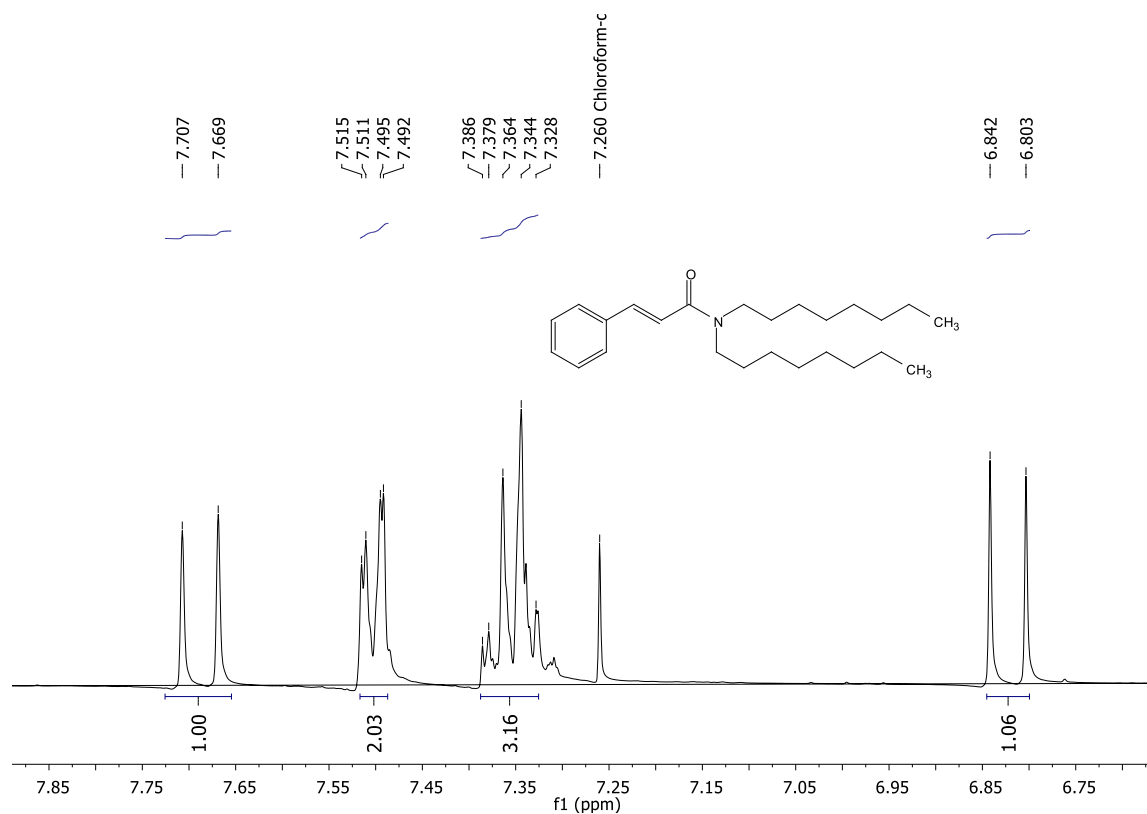
Espectro 18: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) octilamida cinâmica (3).



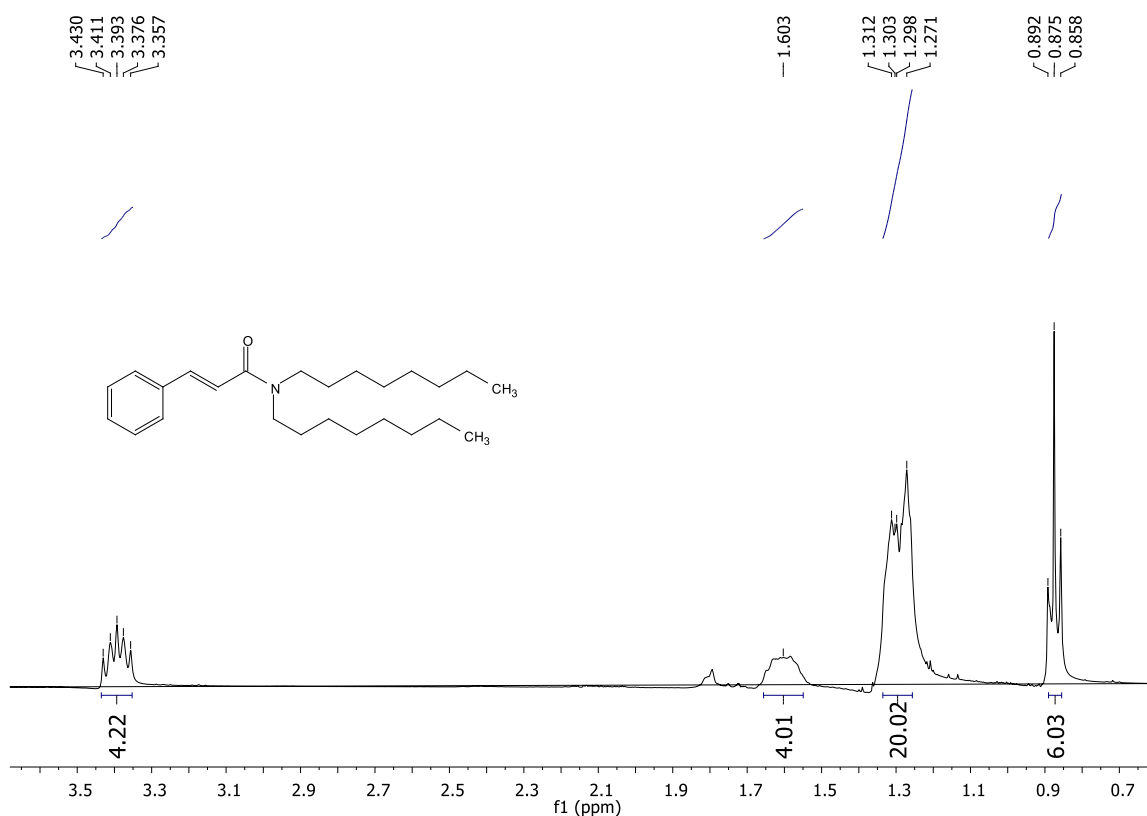
Espectro 19: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da dioctilamida cinâmica (4).



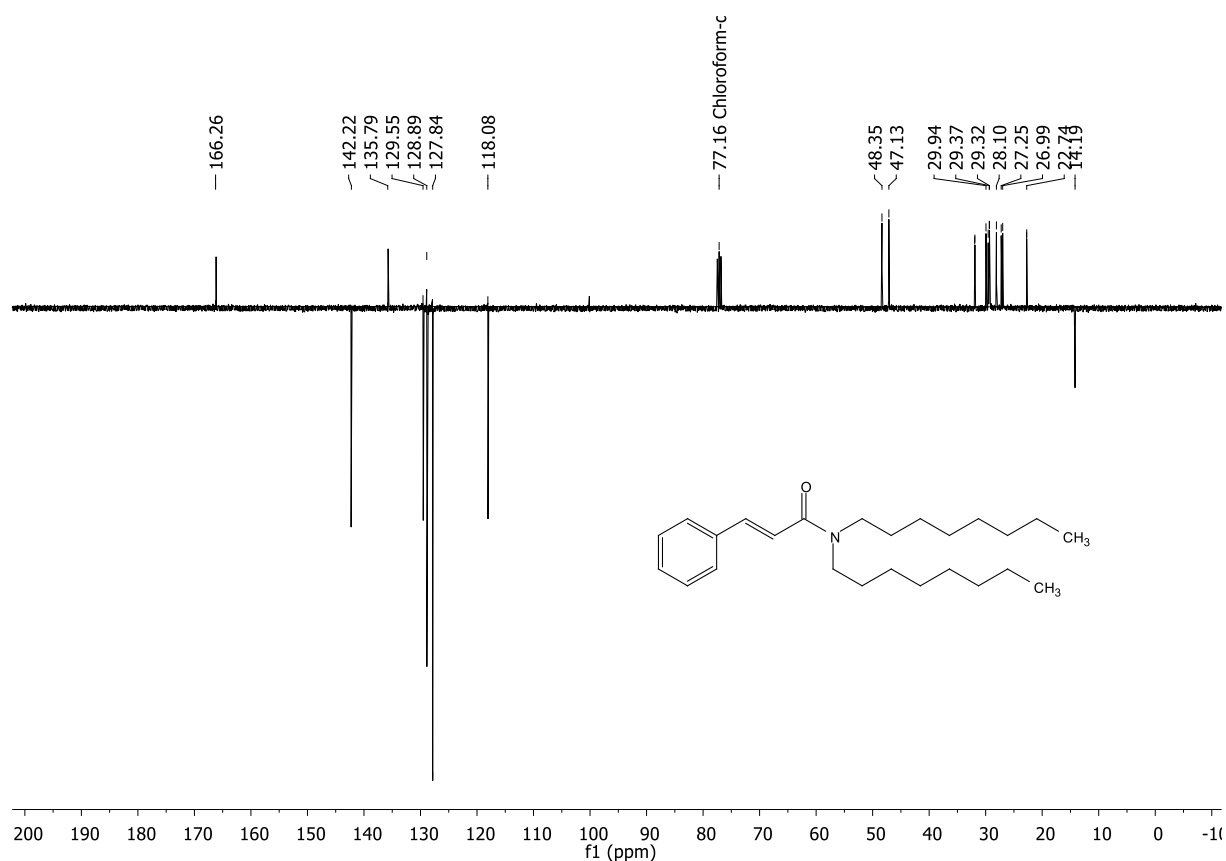
Espectro 20: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da dioctilamida cinâmica (4).



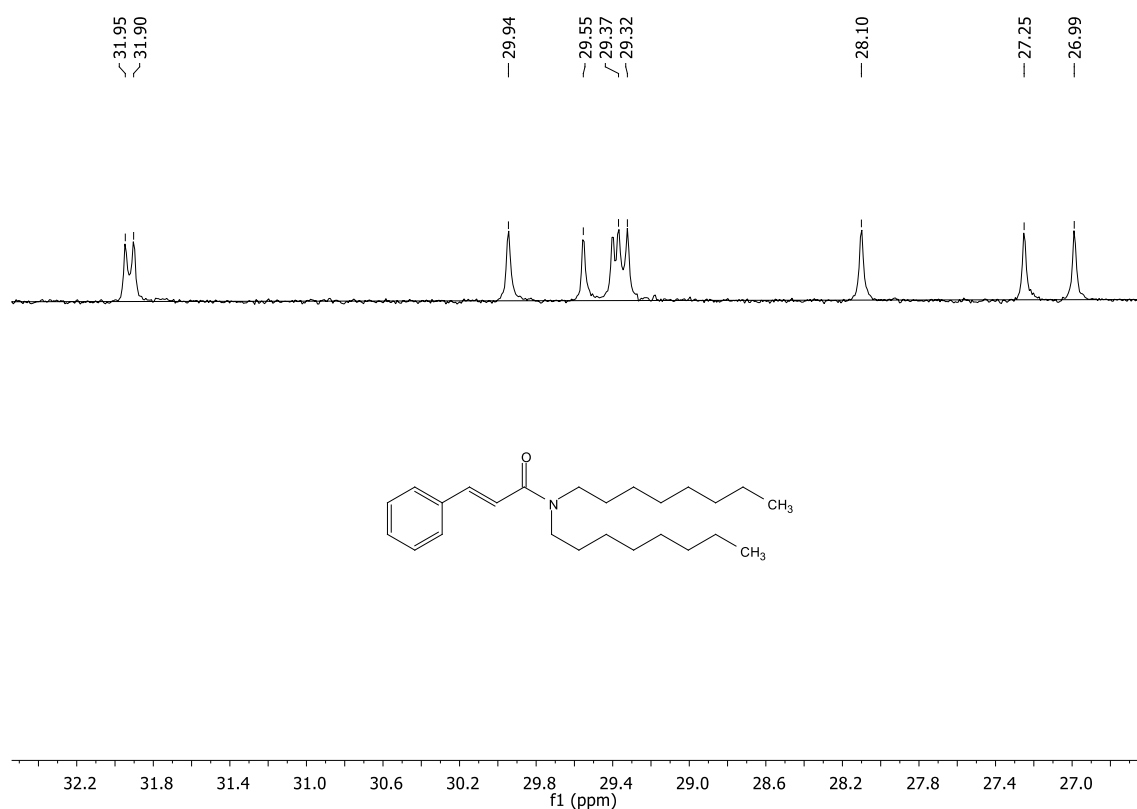
Espectro 21: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da dioctilamida cinâmica (4).



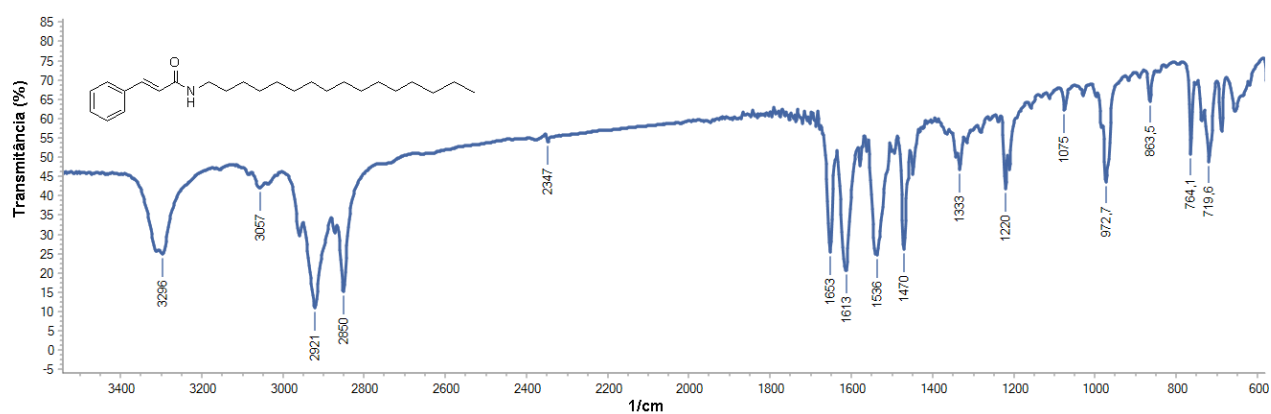
Espectro 22: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da dioctilamida cinâmica (4).



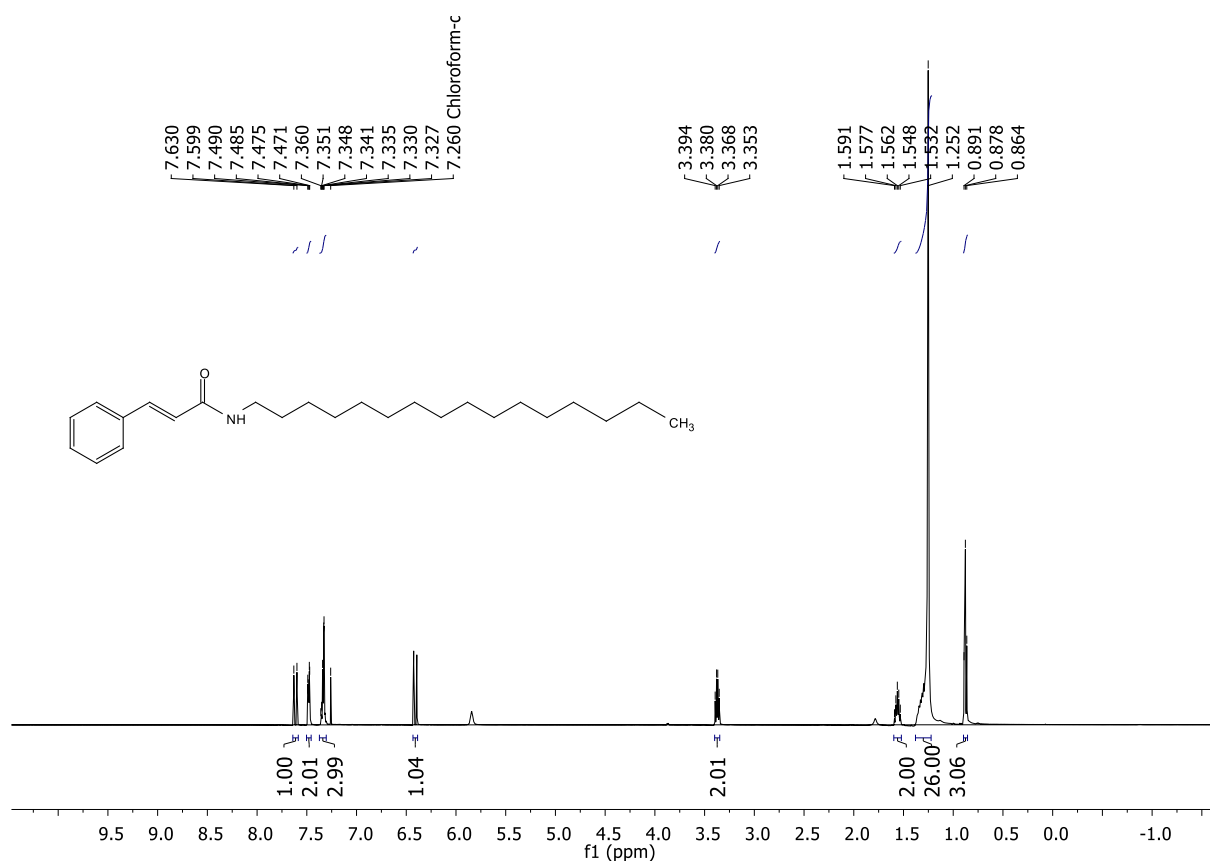
Espectro 23: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) dioctilamida cinâmica (4).



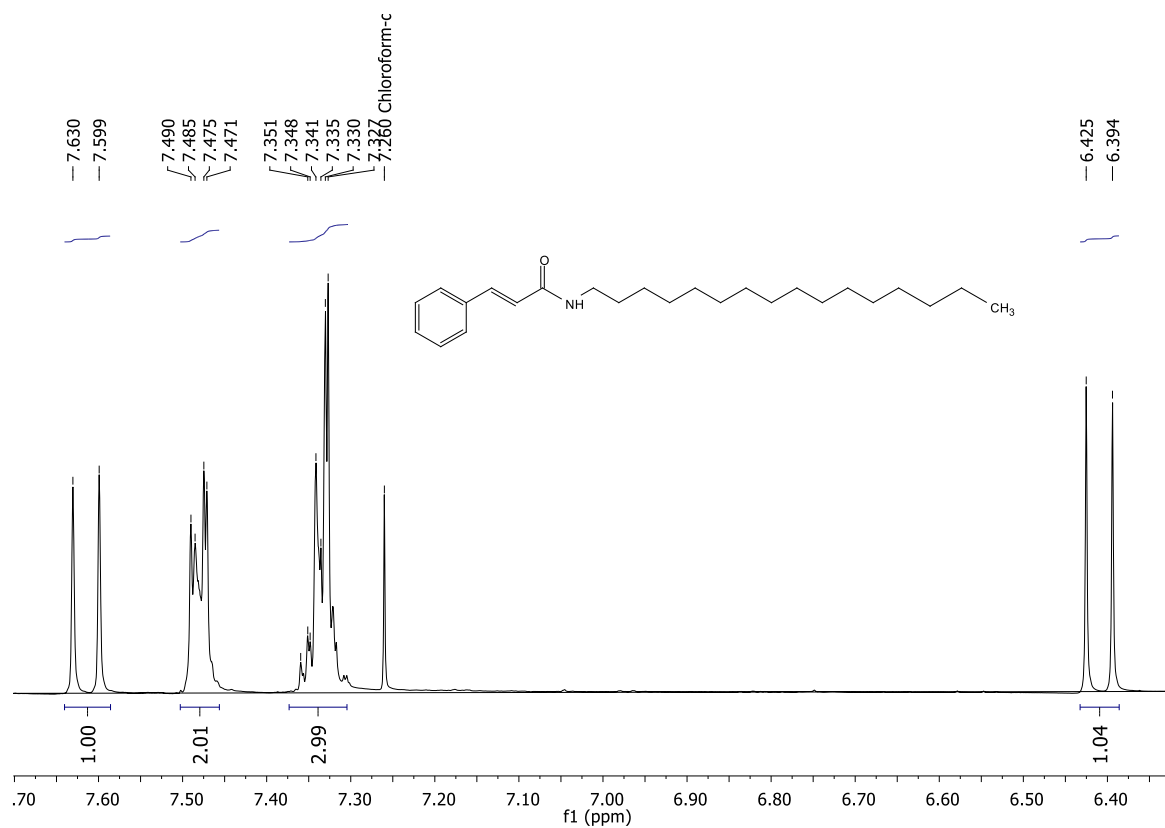
Espectro 24: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) dioctilamida cinâmica (4).



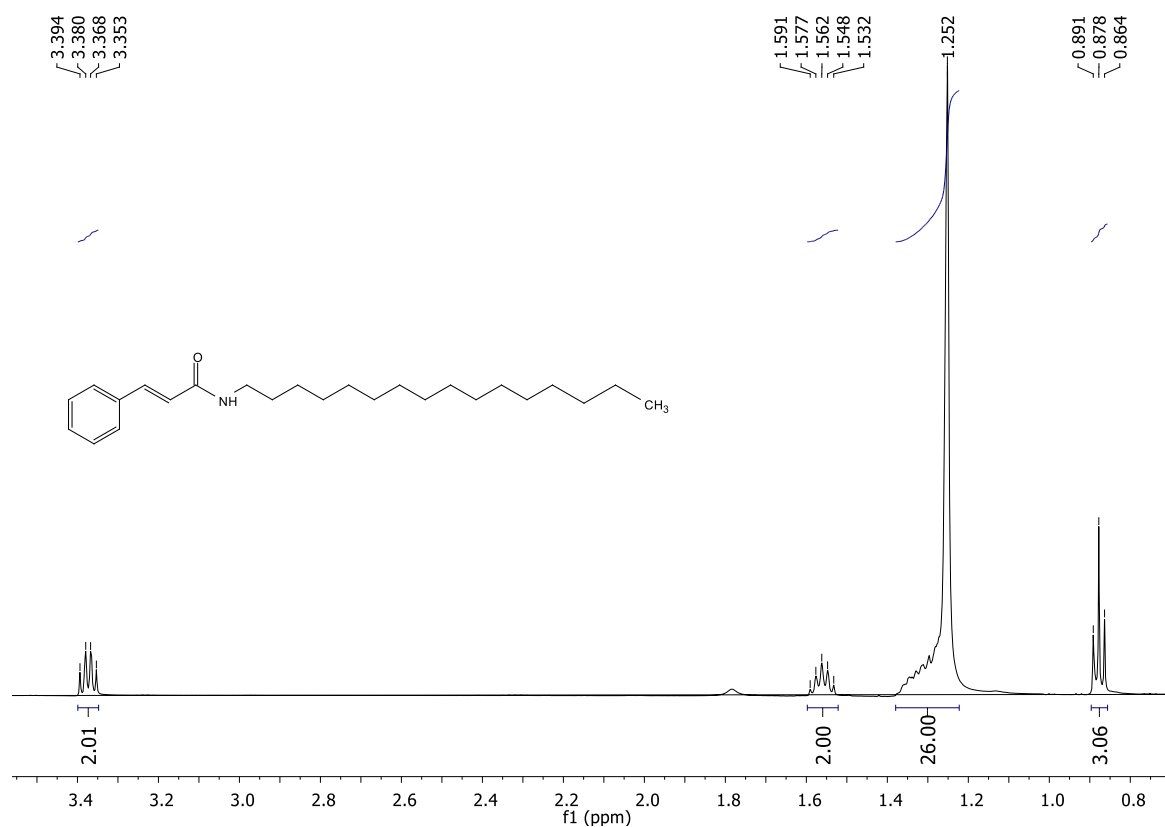
Espectro 25: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da hexadecilamida cinâmica (5).



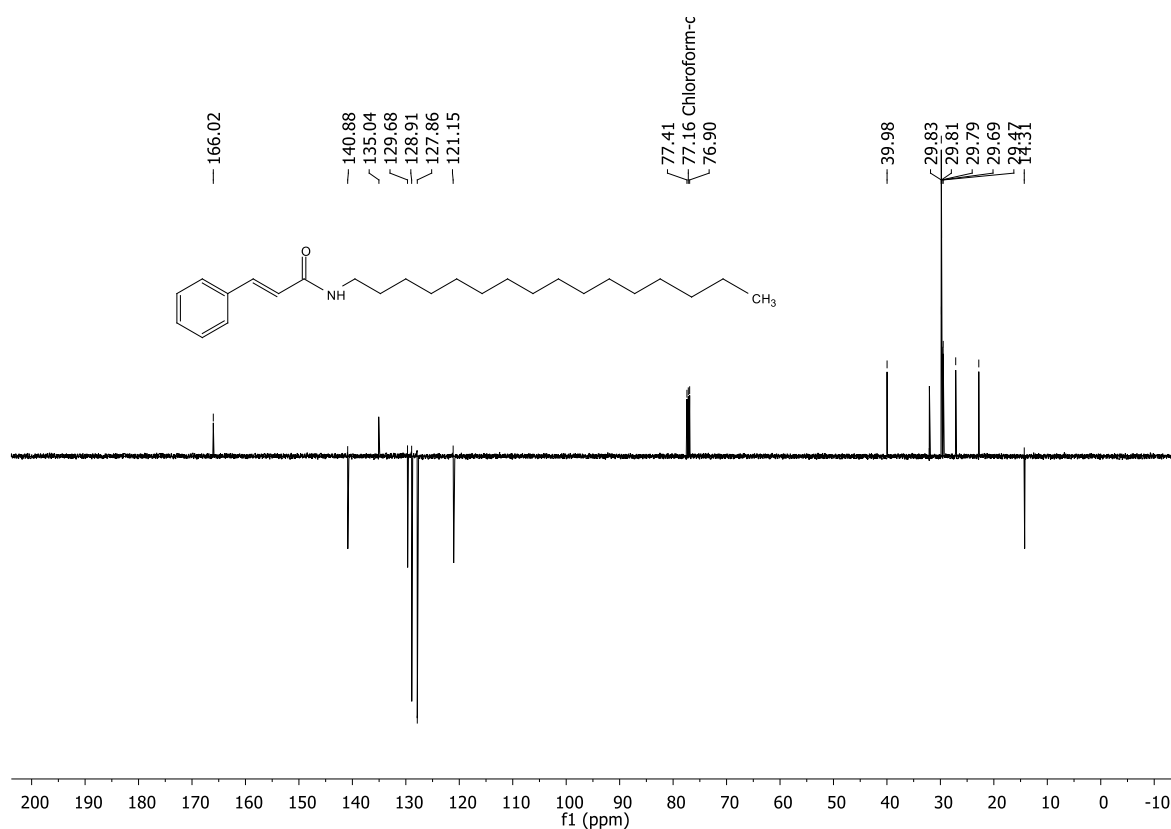
Espectro 26: Espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da hexadecilamida cinâmica (5).



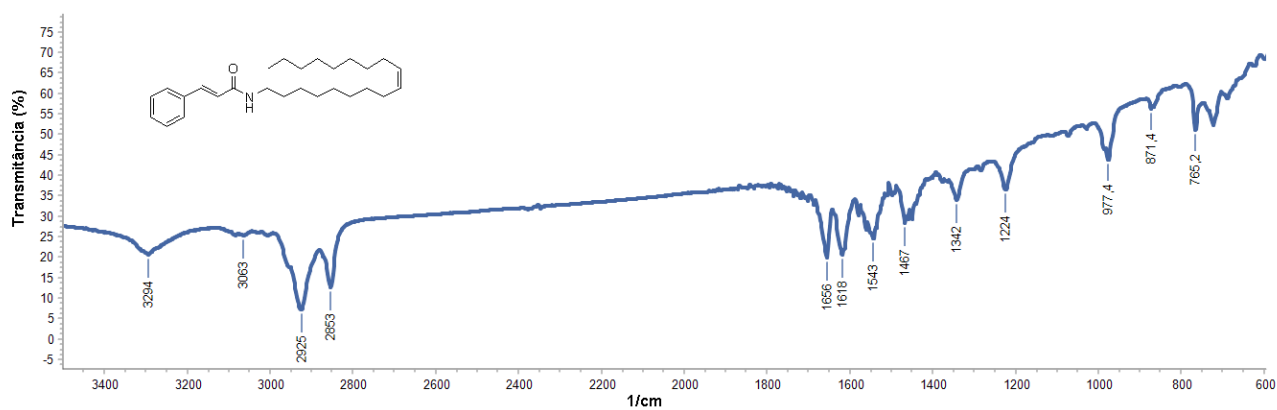
Espectro 27: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da hexadecilamida cinâmica (5).



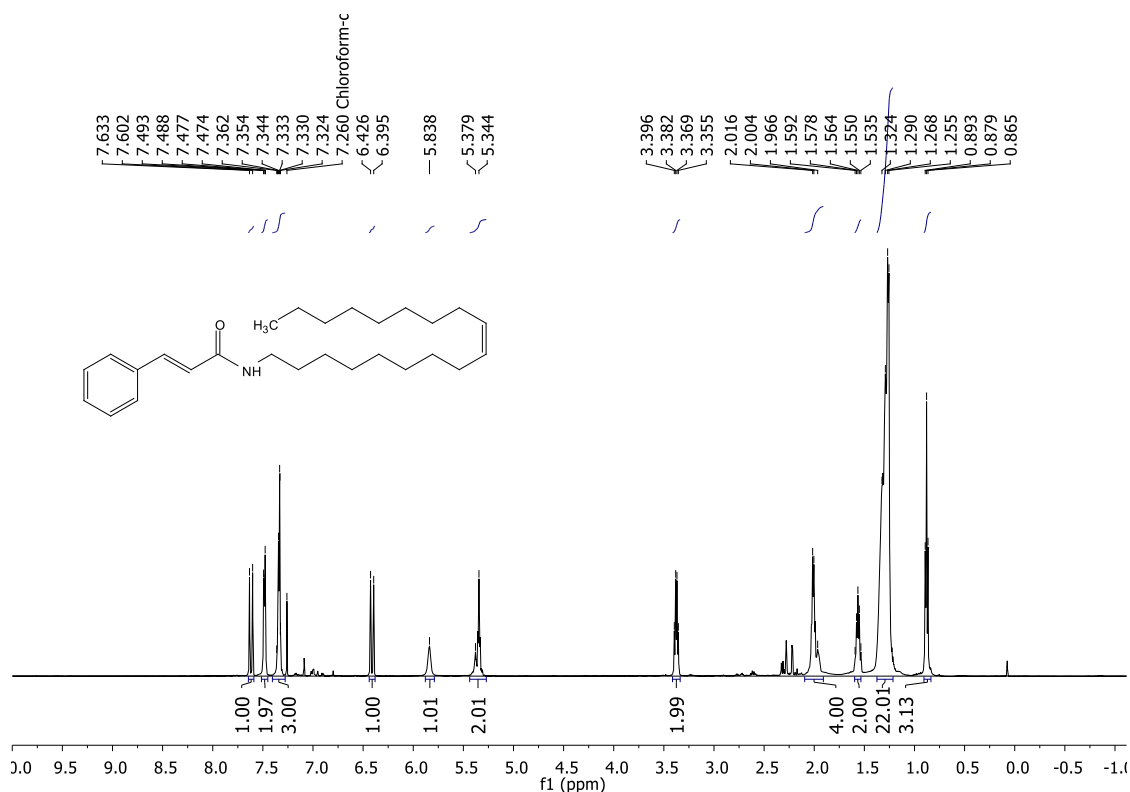
Espectro 28: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da hexadecilamida cinâmica (5).



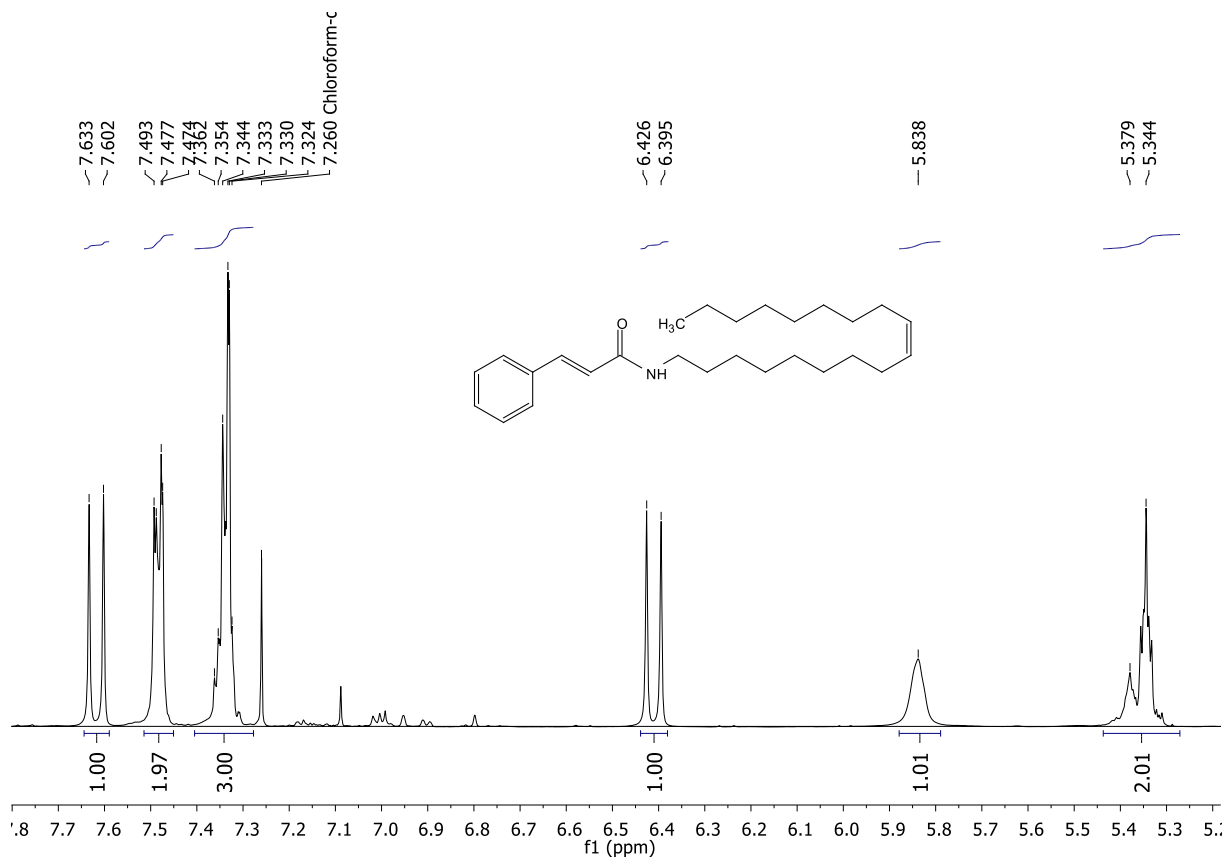
Espectro 29: Espectro de RMN de ¹³C-APT (125 MHz, CDCl₃) hexadecilamida cinâmica (5).



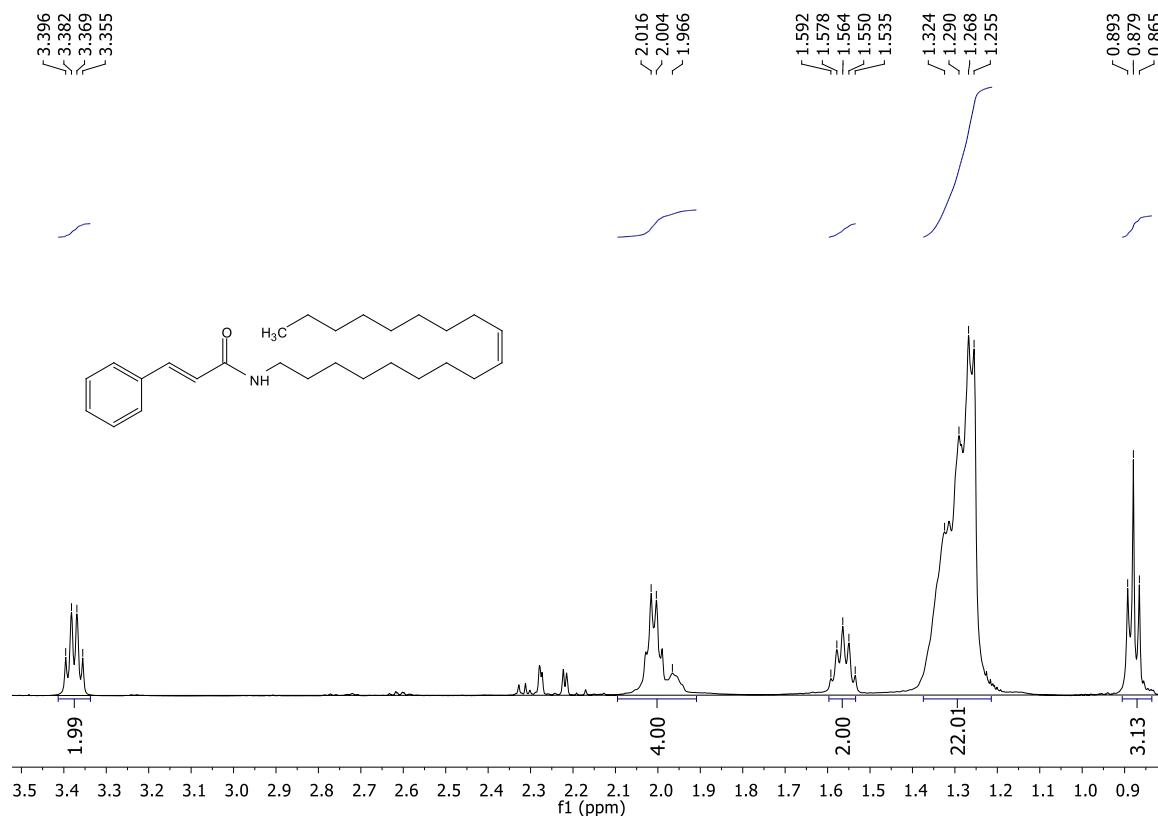
Espectro 30: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da oleilamida cinâmica (6).



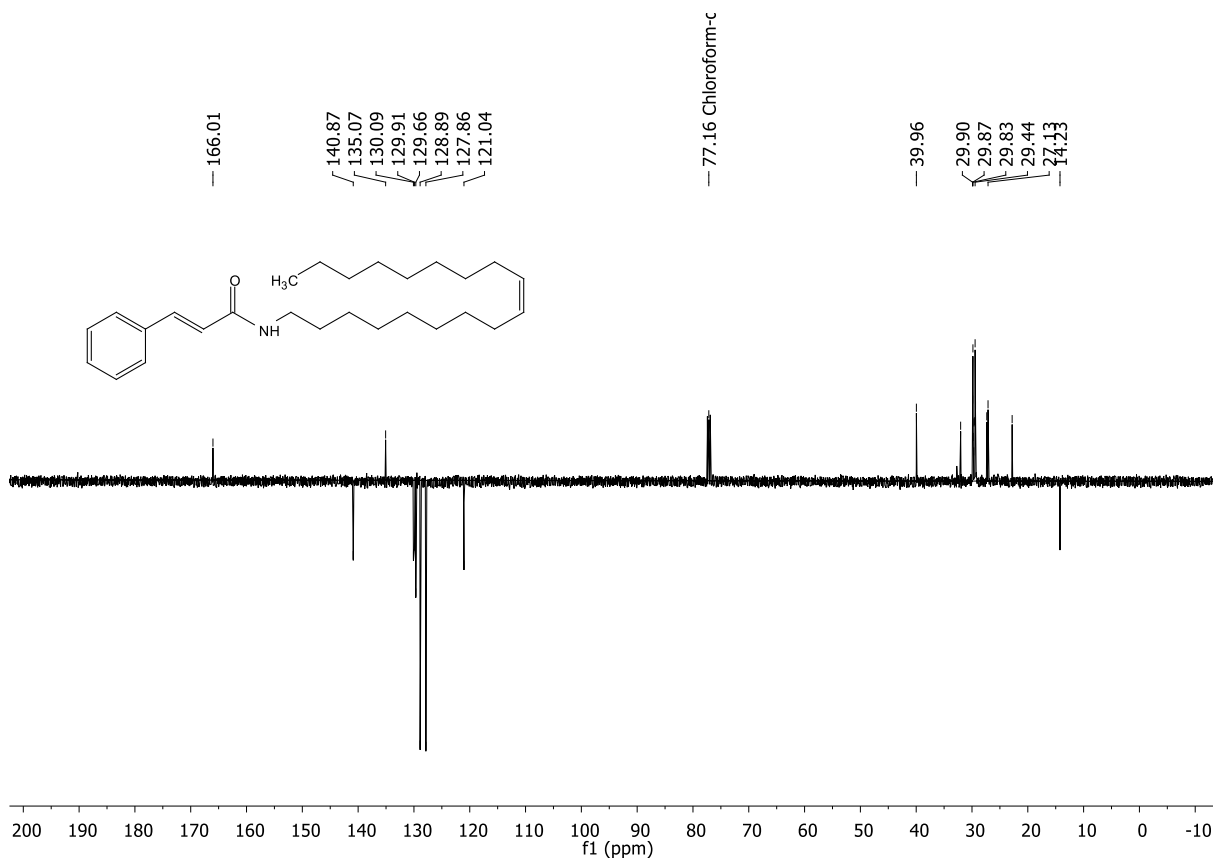
Espectro 31: Espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da oleilamida cinâmica (6).



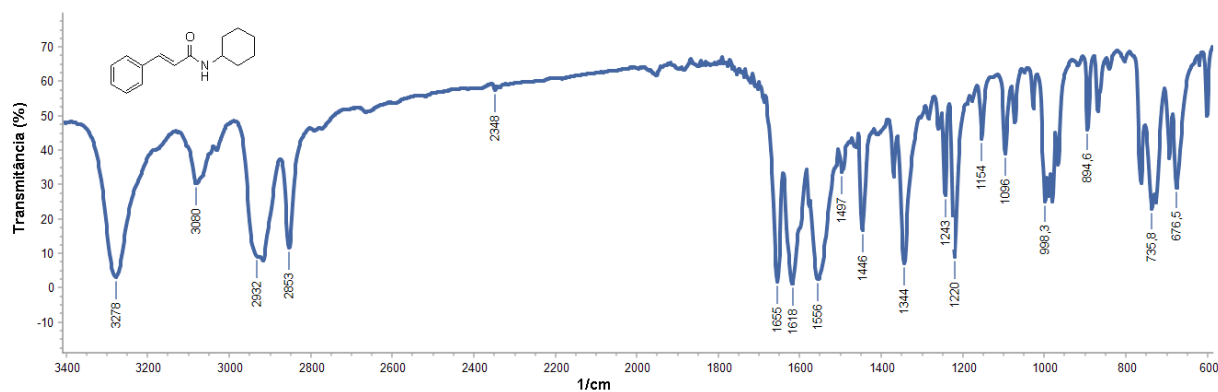
Espectro 32: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da oleilamida cinâmica (6).



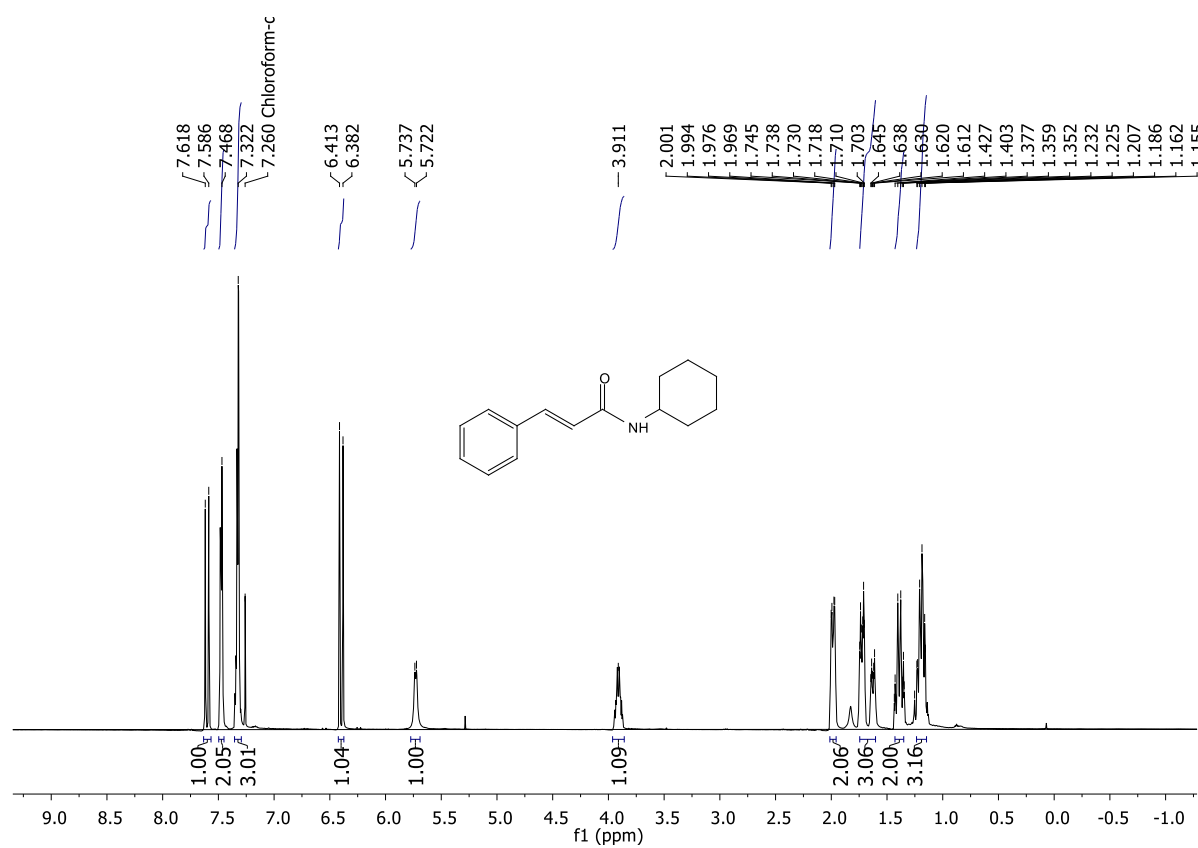
Espectro 33: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da oleilamida cinâmica (6).



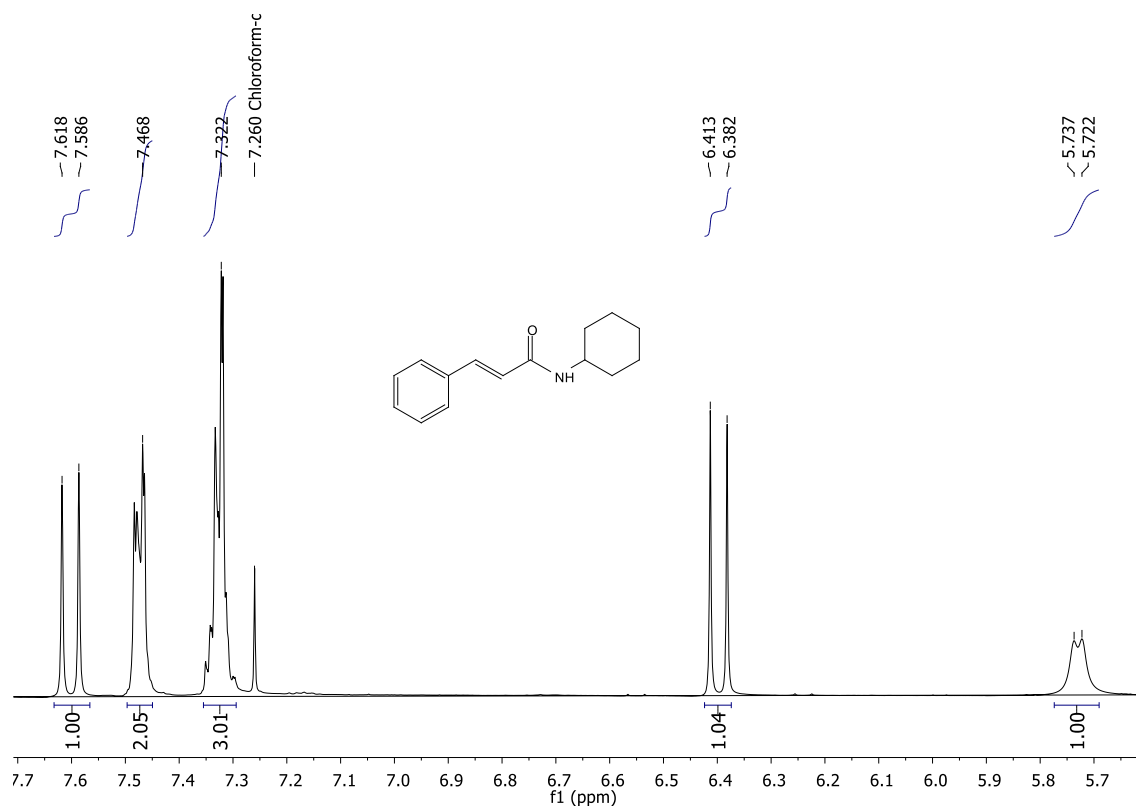
Espectro 34: Espectro de RMN de ¹³C-APT (125 MHz, CDCl₃) oleilamida cinâmica (6).



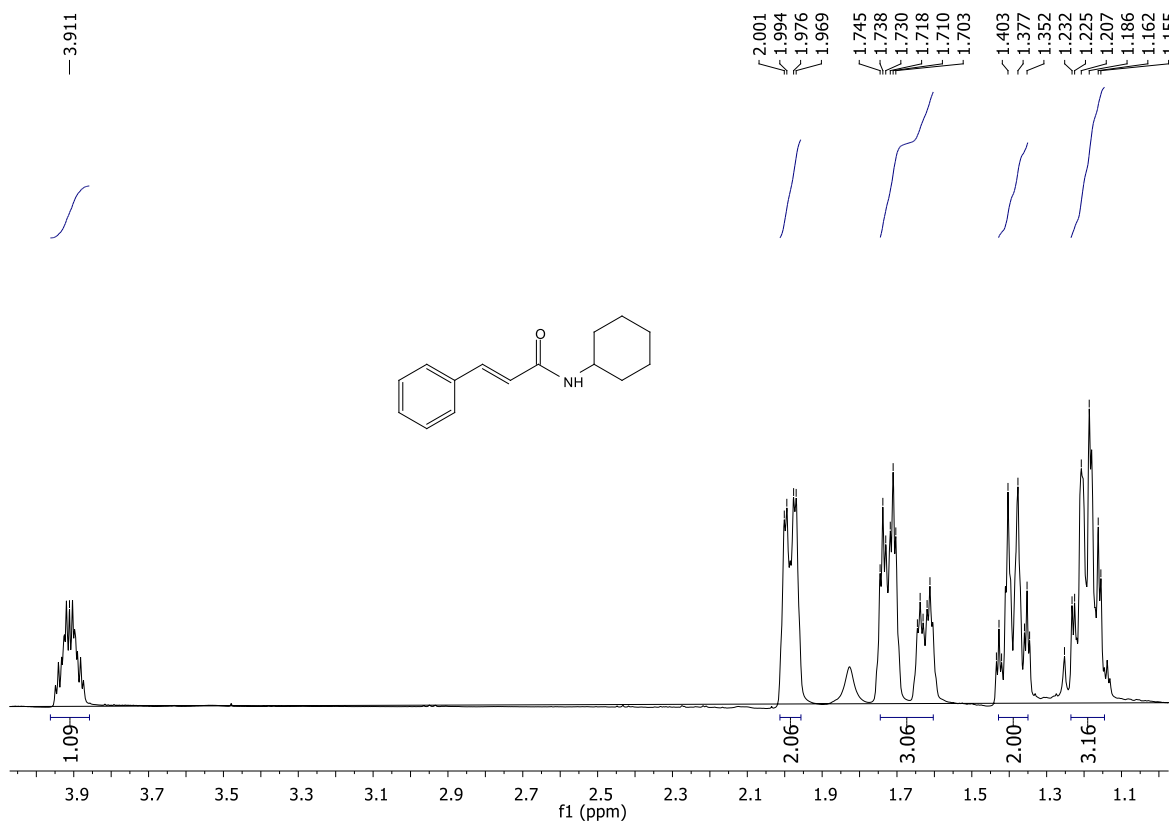
Espectro 35: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da ciclohexilamida cinâmica (7).



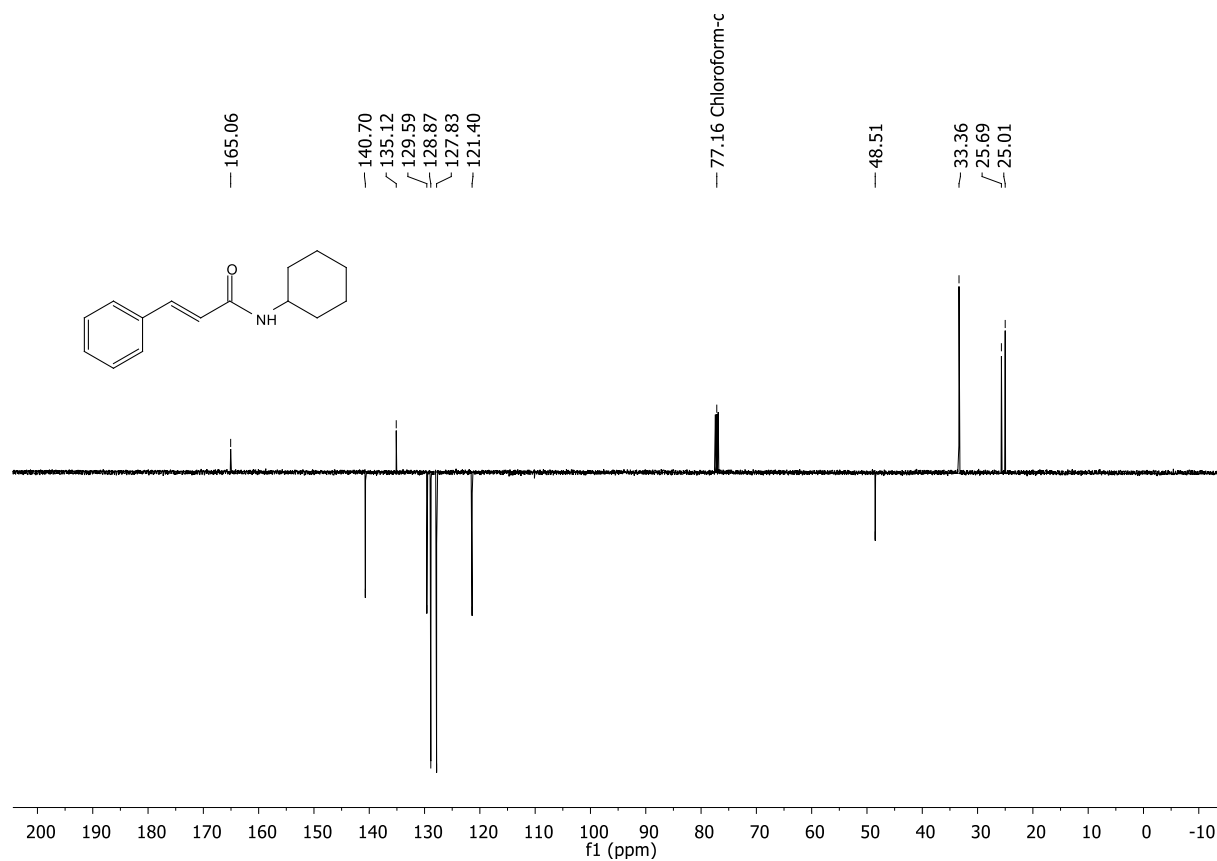
Espectro 36: Espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da ciclohexilamida cinâmica (7).



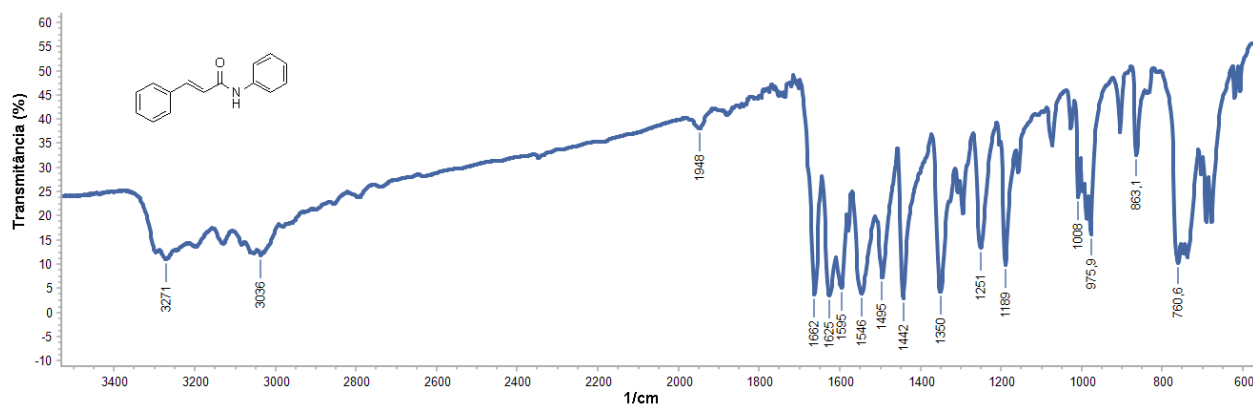
Espectro 37: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da ciclohexilamida cinâmica (7).



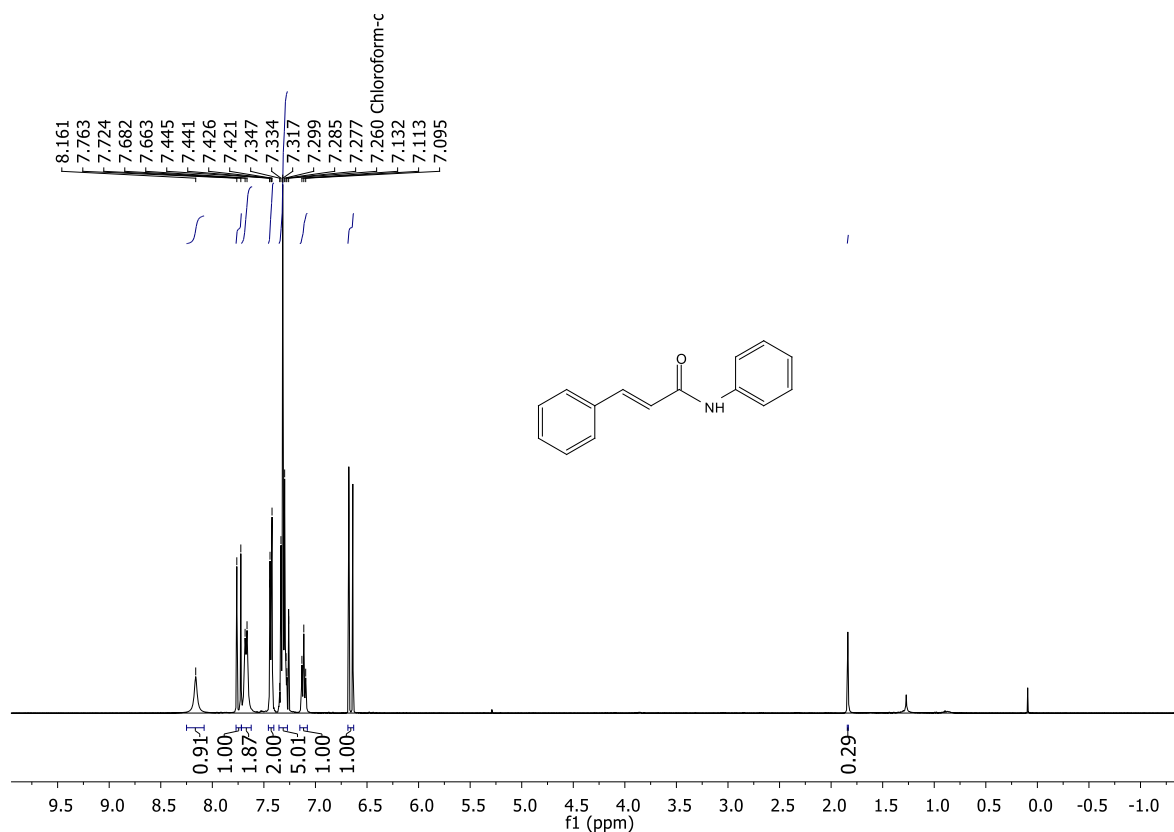
Espectro 38: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da ciclohexilamida cinâmica (7).



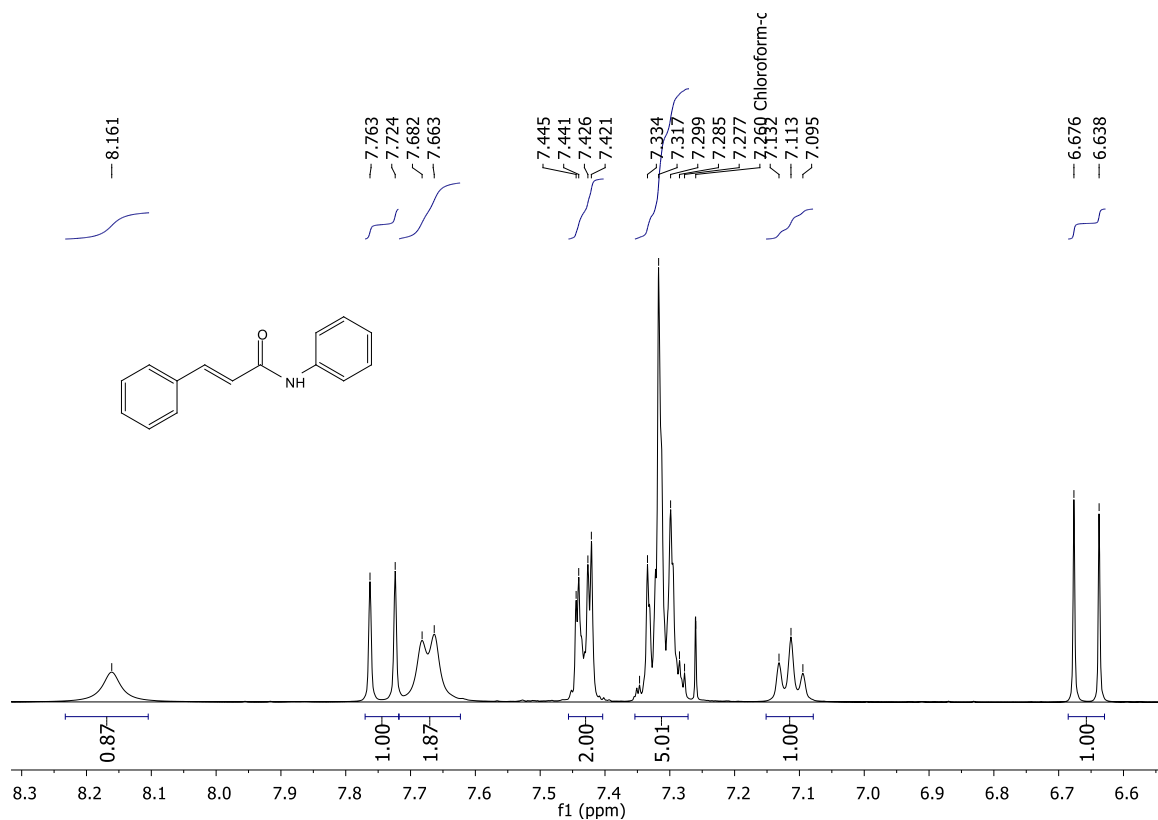
Espectro 39: Espectro de RMN de ¹³C-APT (125 MHz, CDCl₃) ciclohexilamida cinâmica (7).



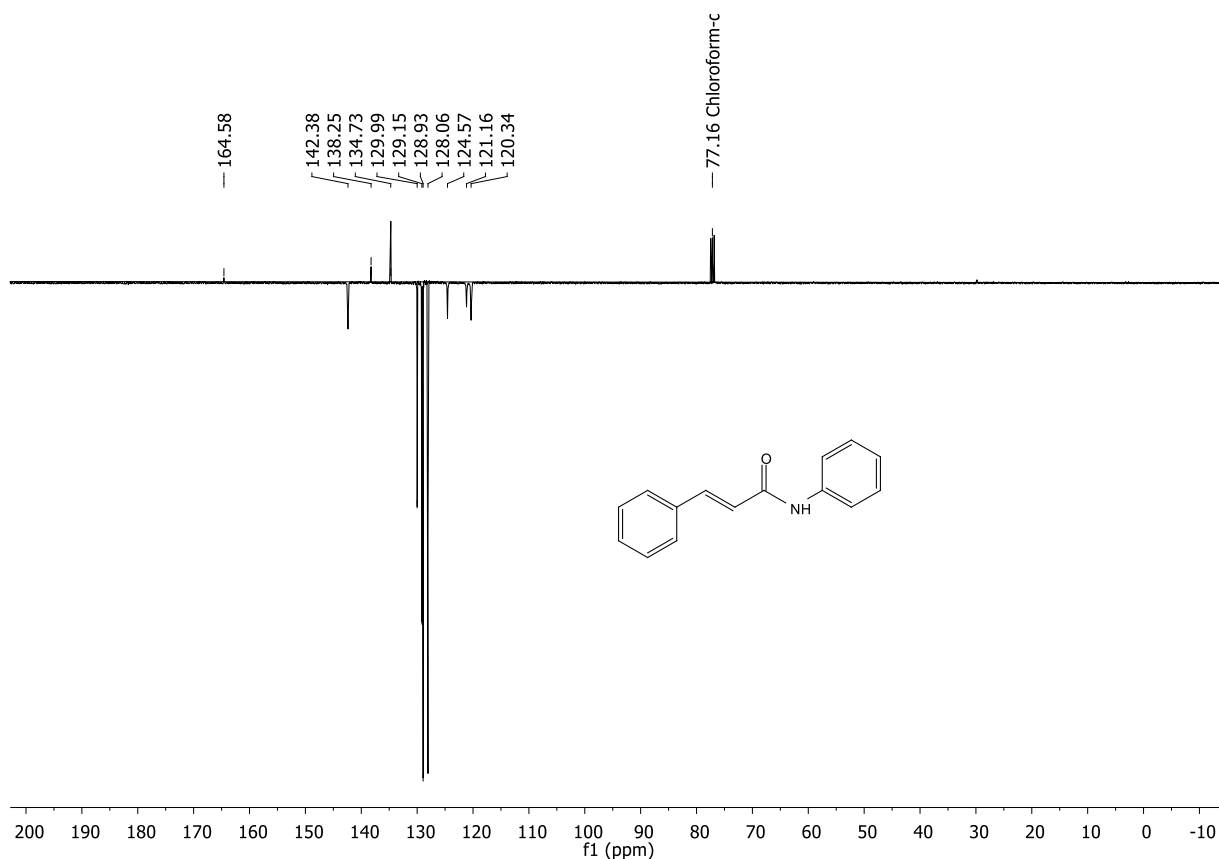
Espectro 40: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da fenilamida cinâmica (8).



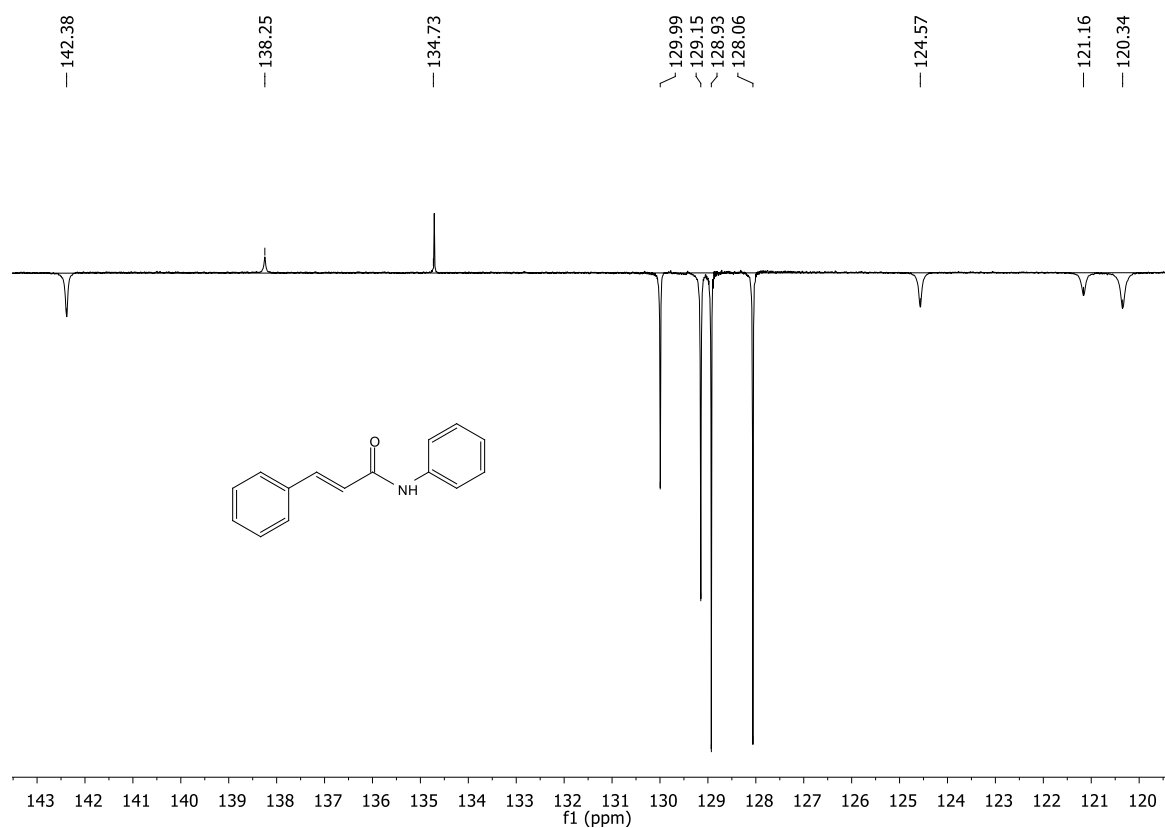
Espectro 41: Espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da fenilamida cinâmica (8).



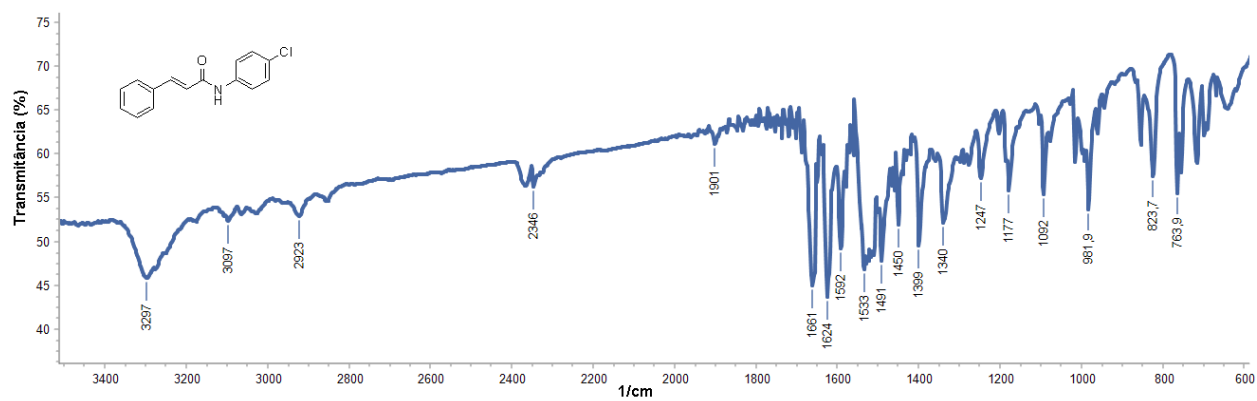
Espectro 42: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) da fenilamida cinâmica (8).



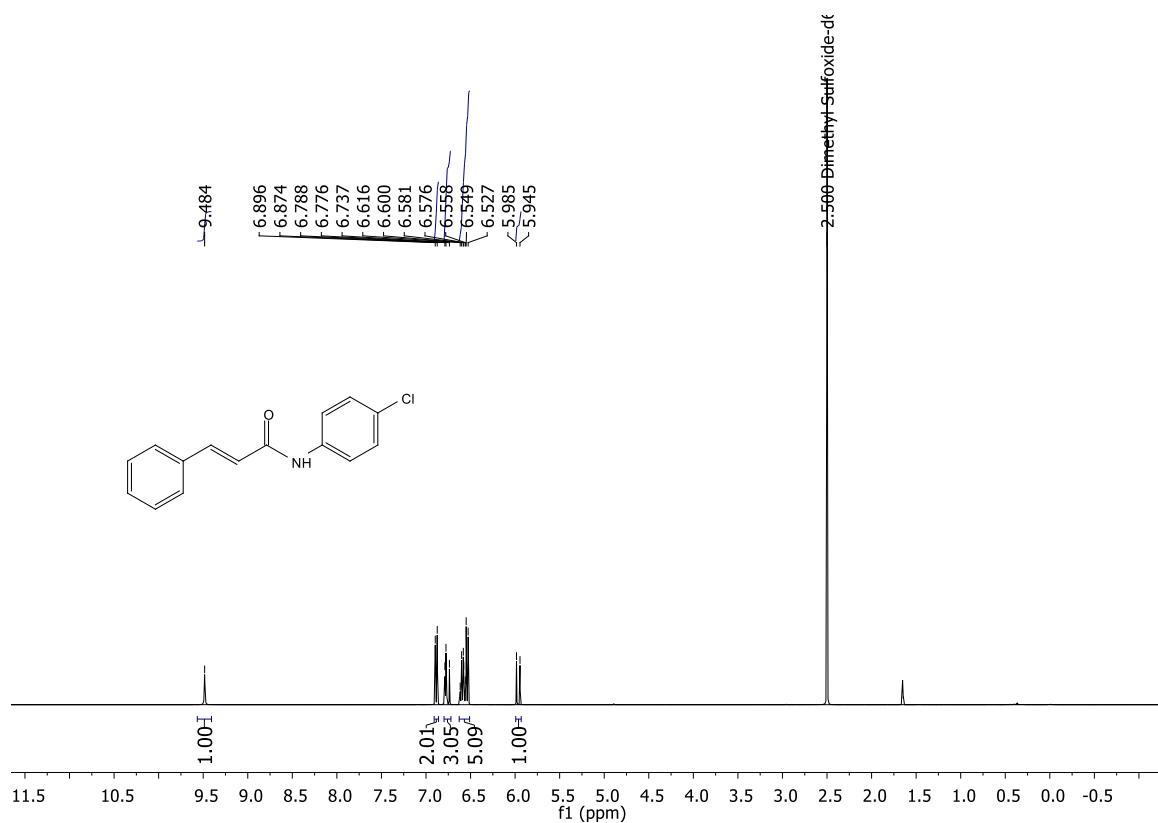
Espectro 43: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) fenilamida cinâmica (8).



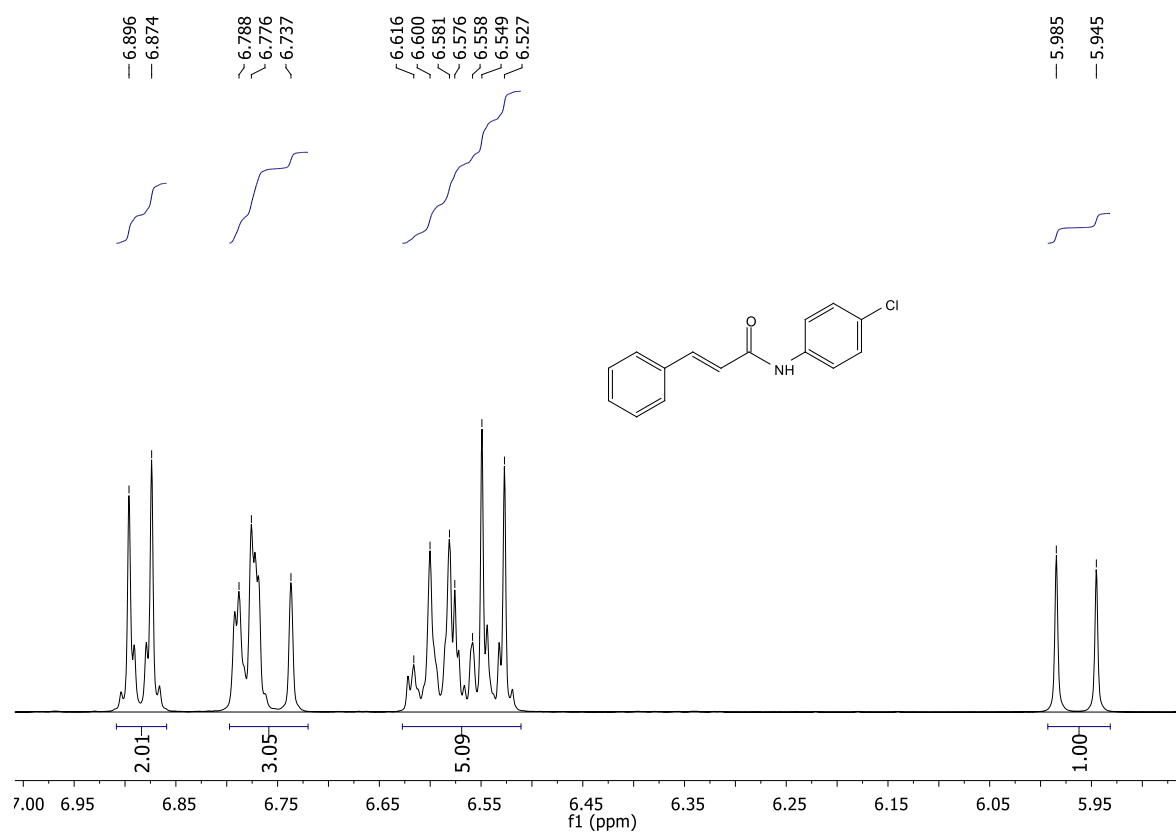
Espectro 44: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) fenilamida cinâmica (8).



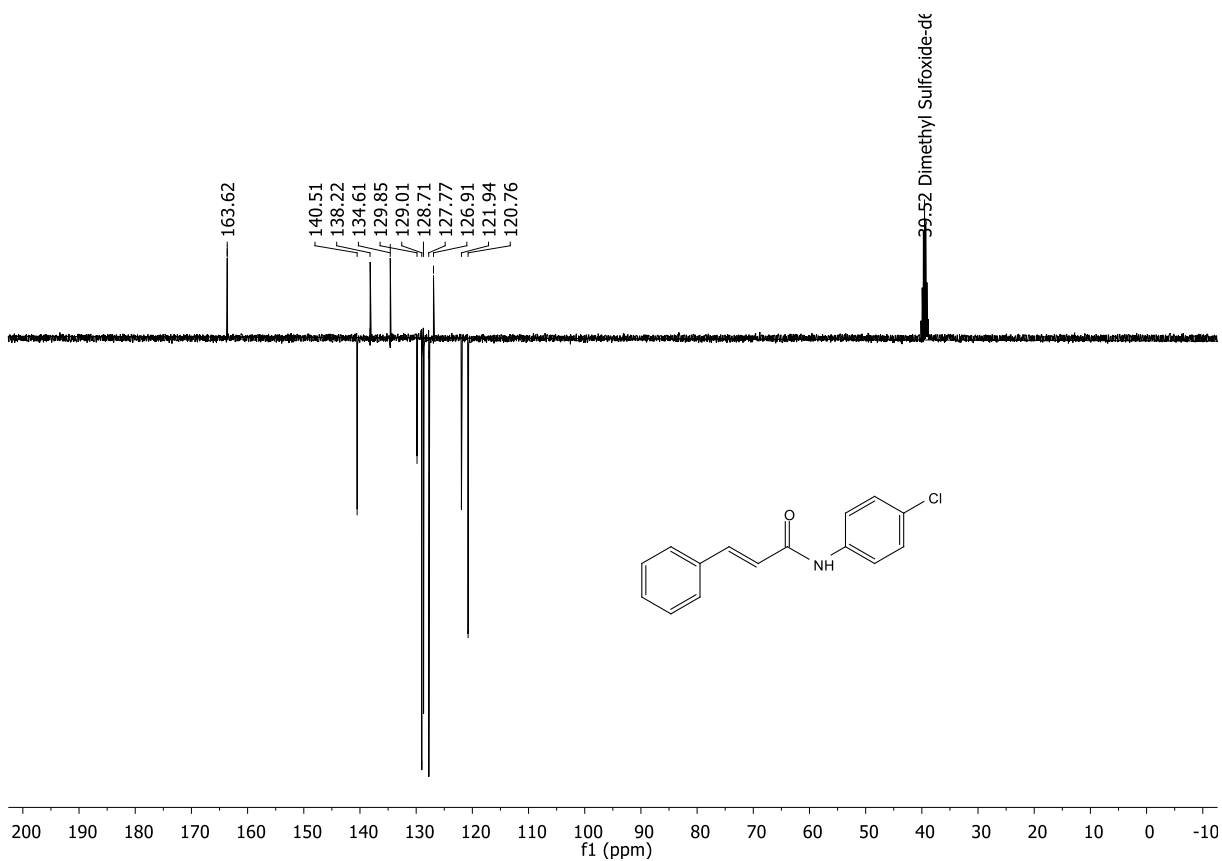
Espectro 45: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da 4-clorofenilamida cinâmica (9).



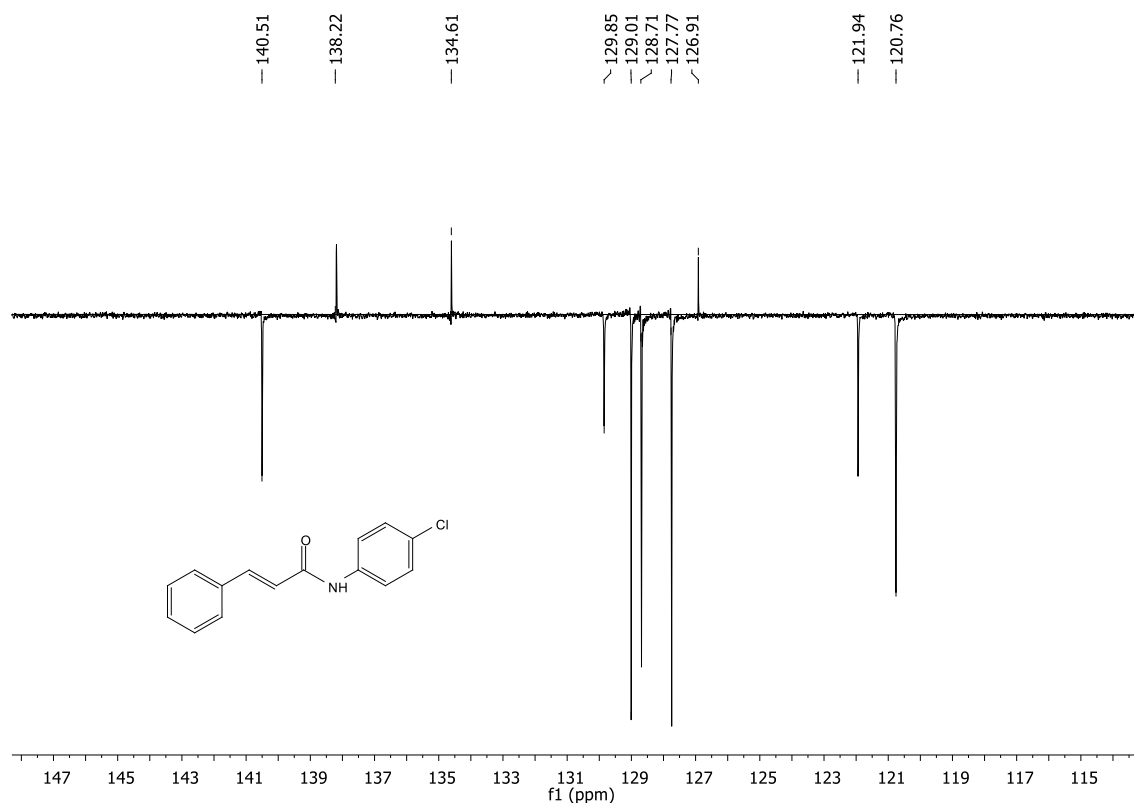
Espectro 46: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) da 4-clorofenilamida cinâmica (9).



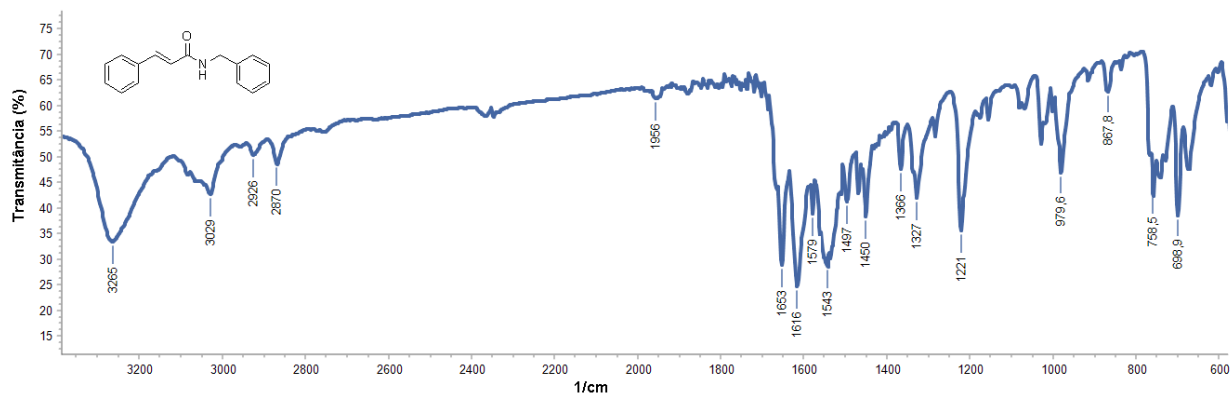
Espectro 47: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) da 4-clorofenilamida cinâmica (9).



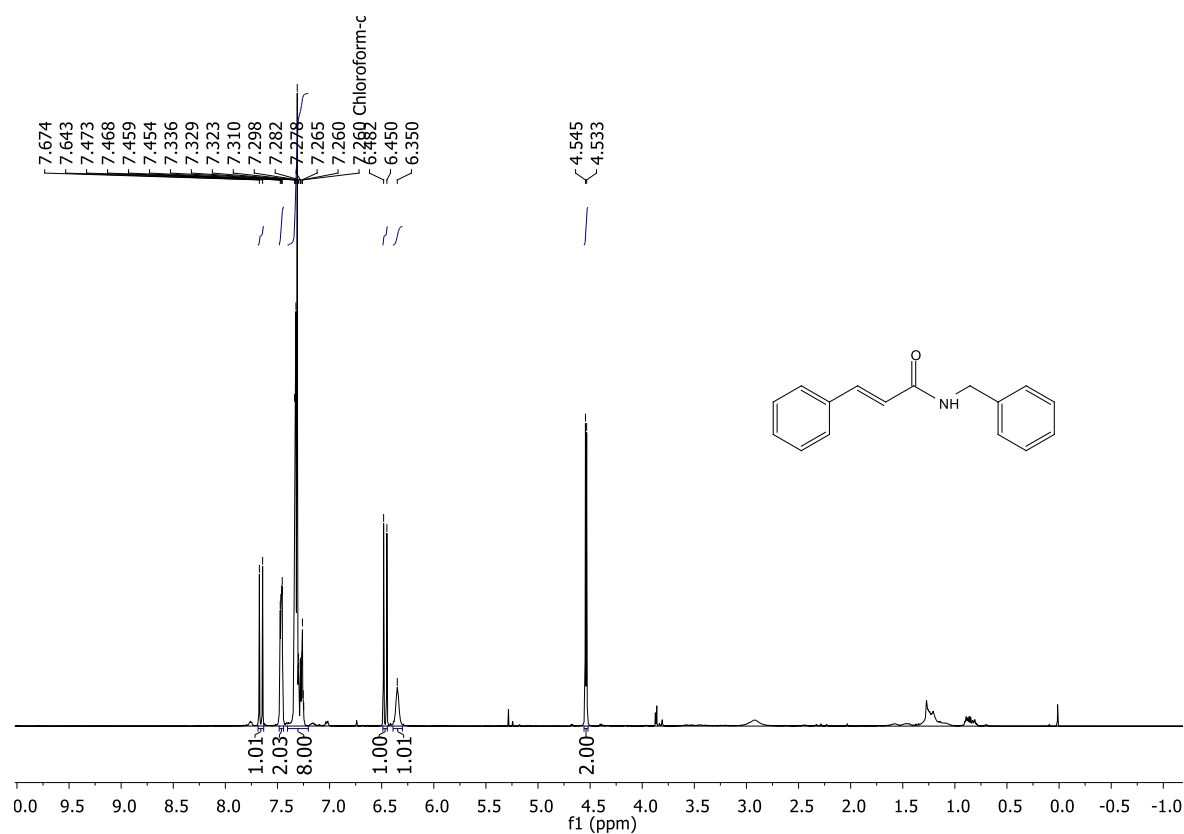
Espectro 48: Espectro de RMN de ¹³C-APT (100 MHz, DMSO-d₆) 4-clorofenilamida cinâmica (9).



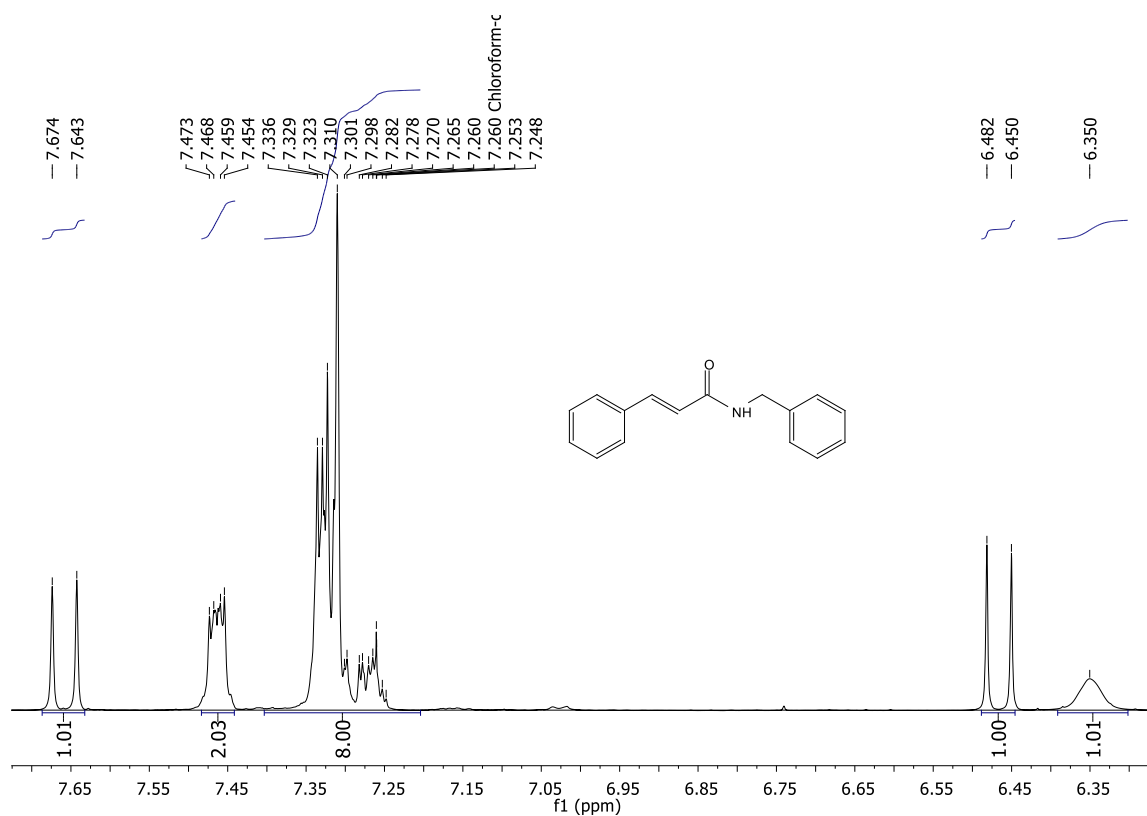
Espectro 49: Espectro de RMN de ¹³C-APT (125 MHz, DMSO-d₆) 4-clorofenilamida cinâmica (09).



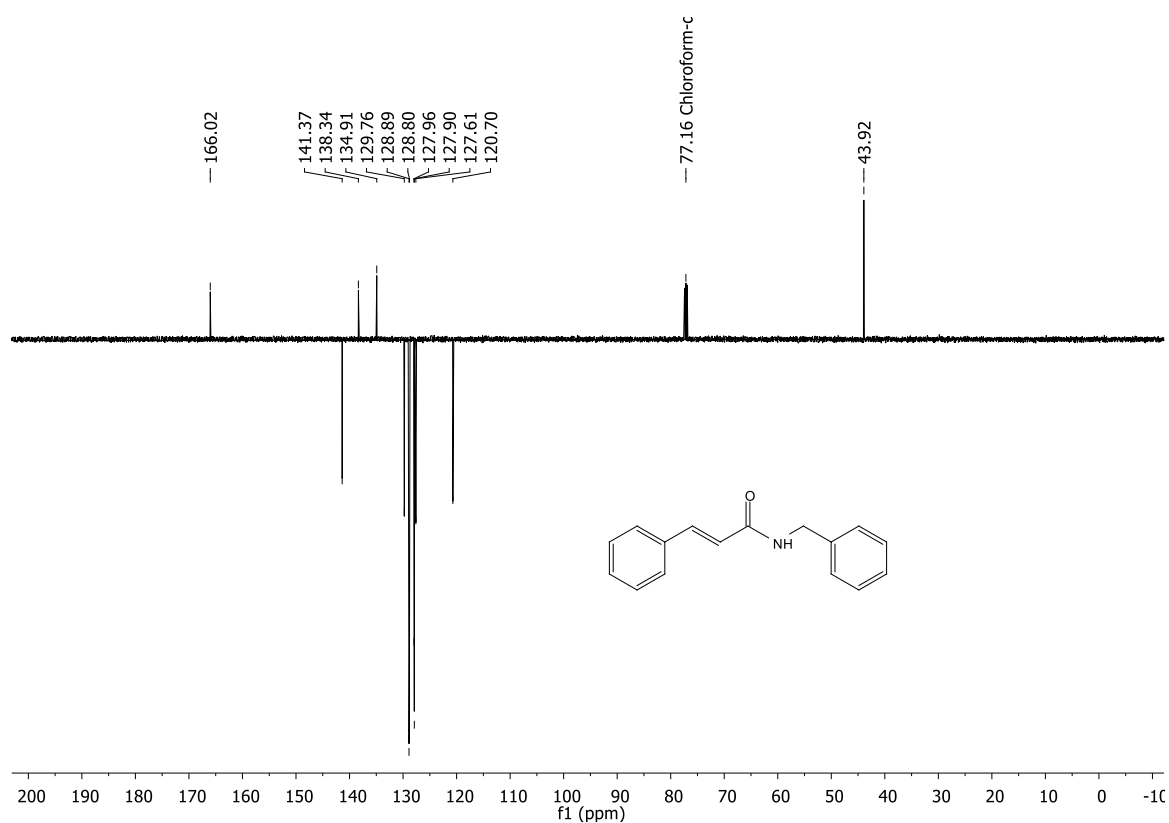
Espectro 50: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da benzilamida cinâmica (10).



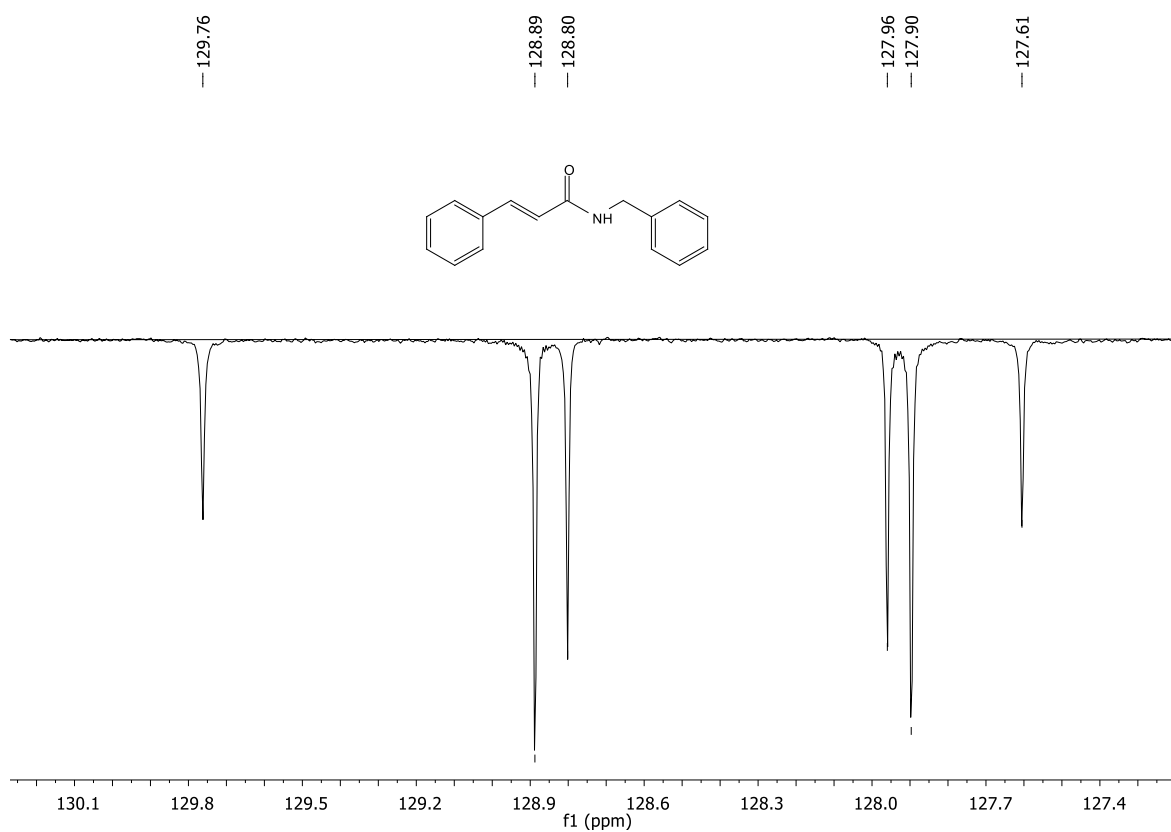
Espectro 51: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da benzilamida cinâmica (10).



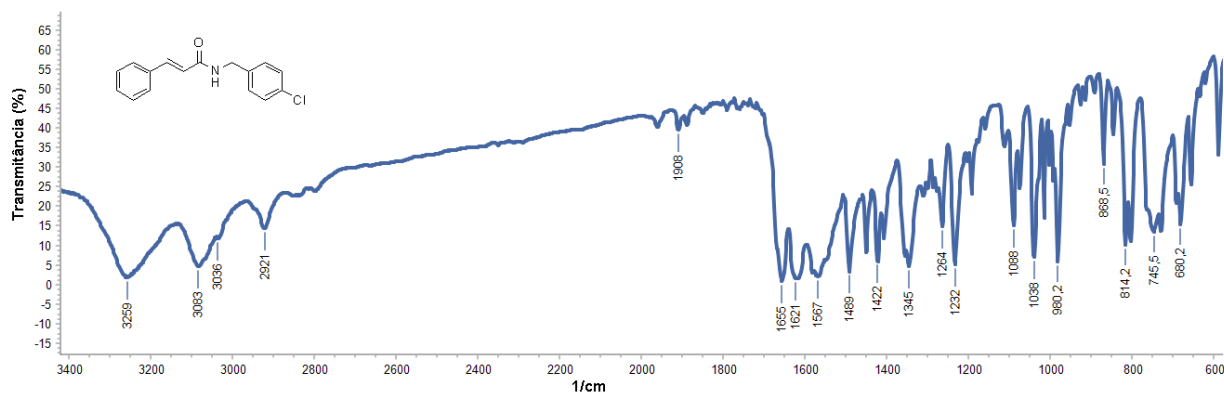
Espectro 52: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) da benzilamida cinâmica (10).



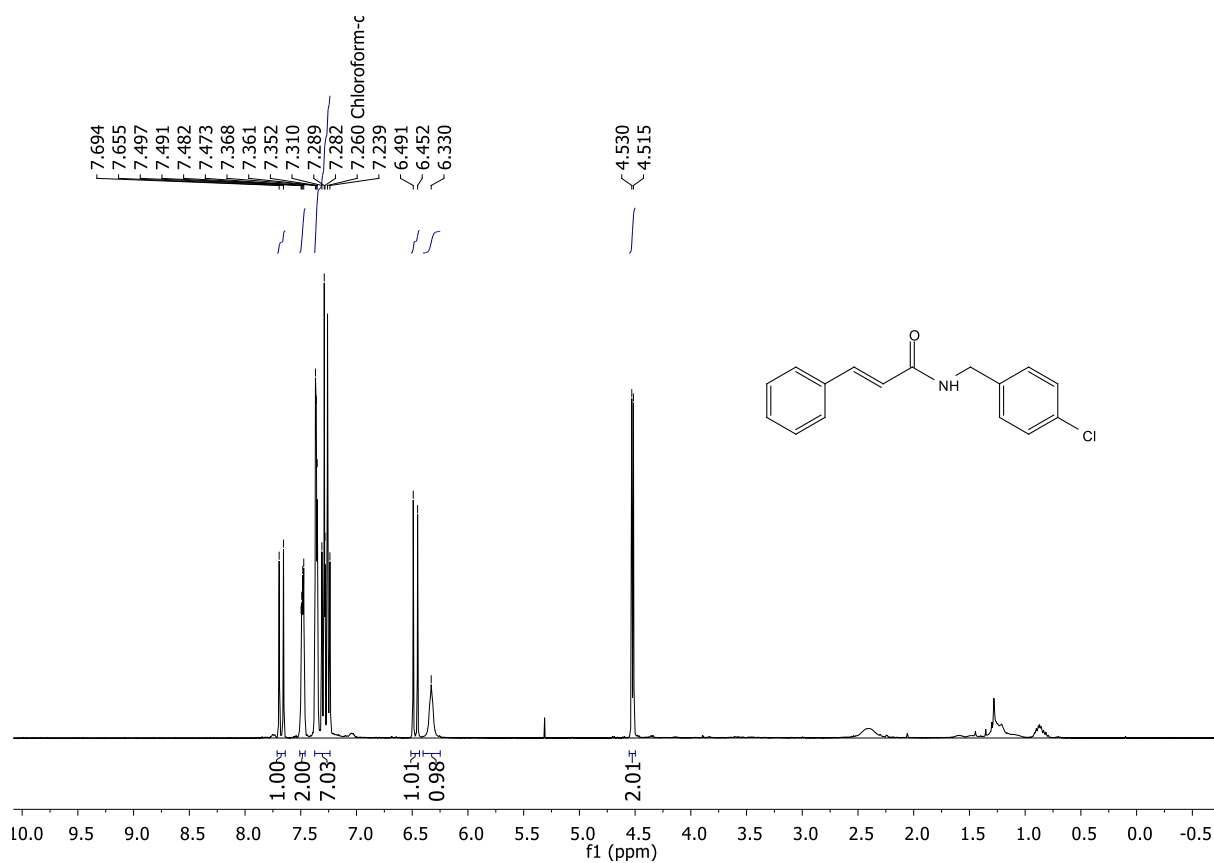
Espectro 53: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) benzilamida cinâmica (10).



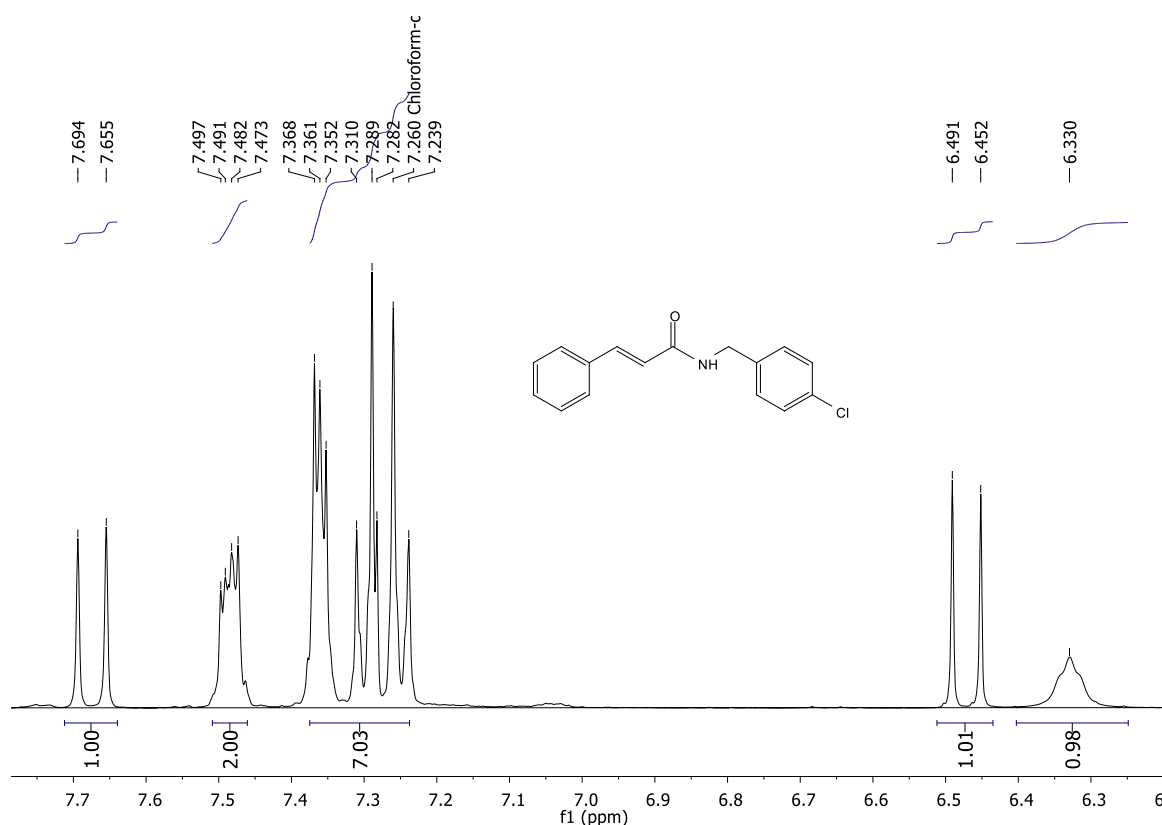
Espectro 54: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) benzilamida cinâmica (10).



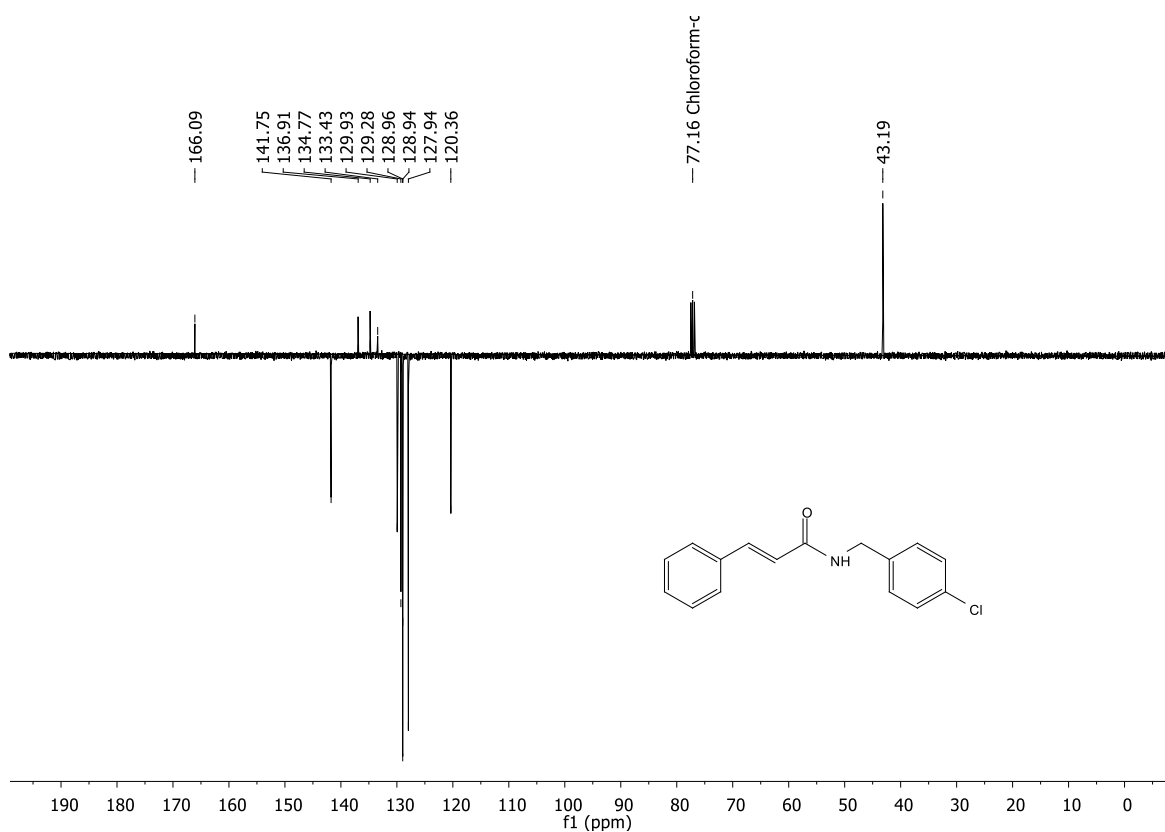
Espectro 55: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da 4-clorobenzilamida cinâmica (**11**).



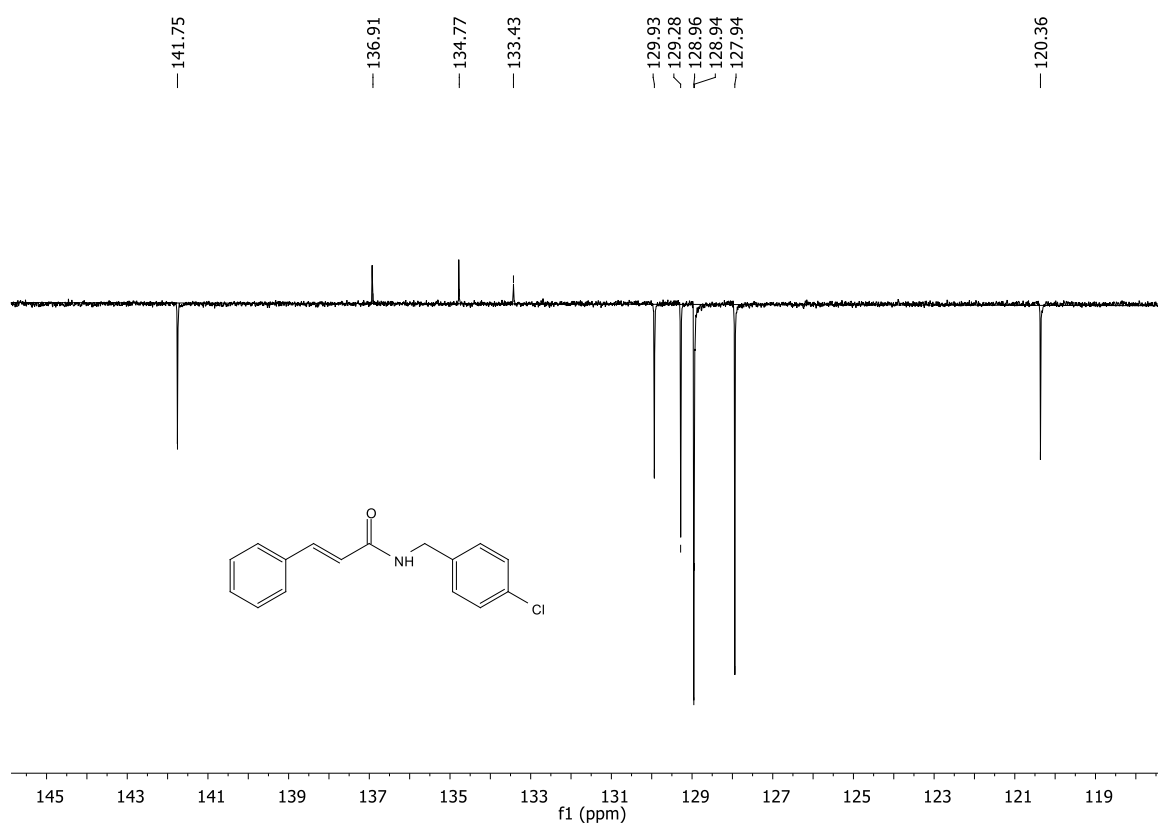
Espectro 56: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da 4-clorobenzilamida cinâmica (**11**).



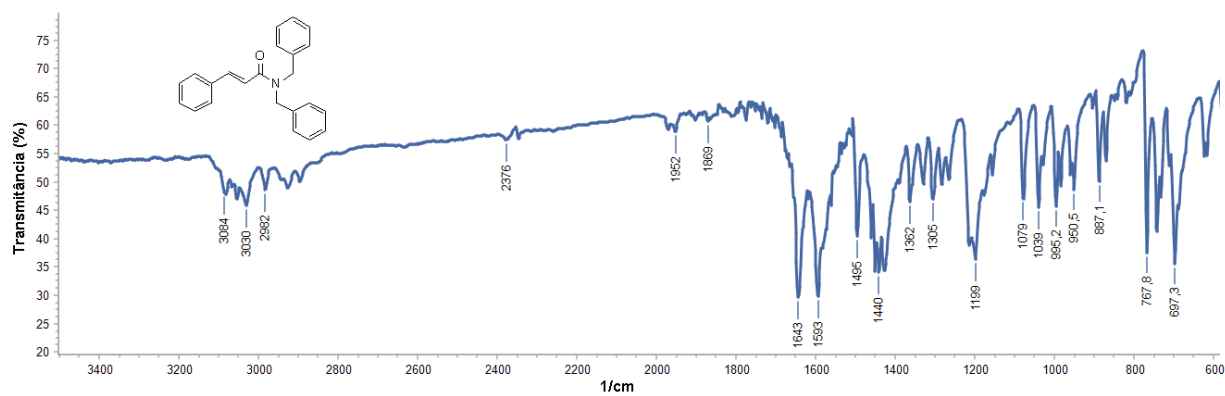
Espectro 57: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) da 4-clorobenzilamida cinâmica (**11**).



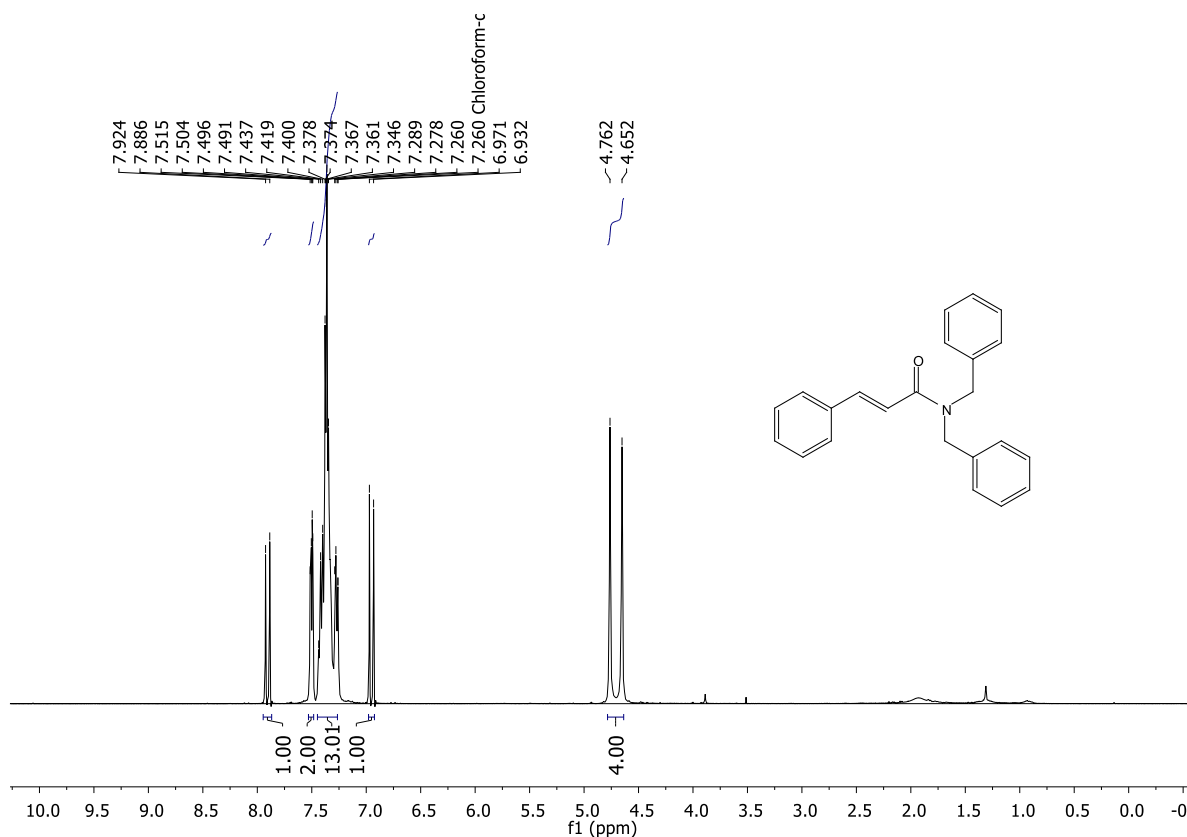
Espectro 58: Espectro de RMN de ¹³C-APT (100 MHz, CDCl₃) 4-clorobenzilamida cinâmica (**11**).



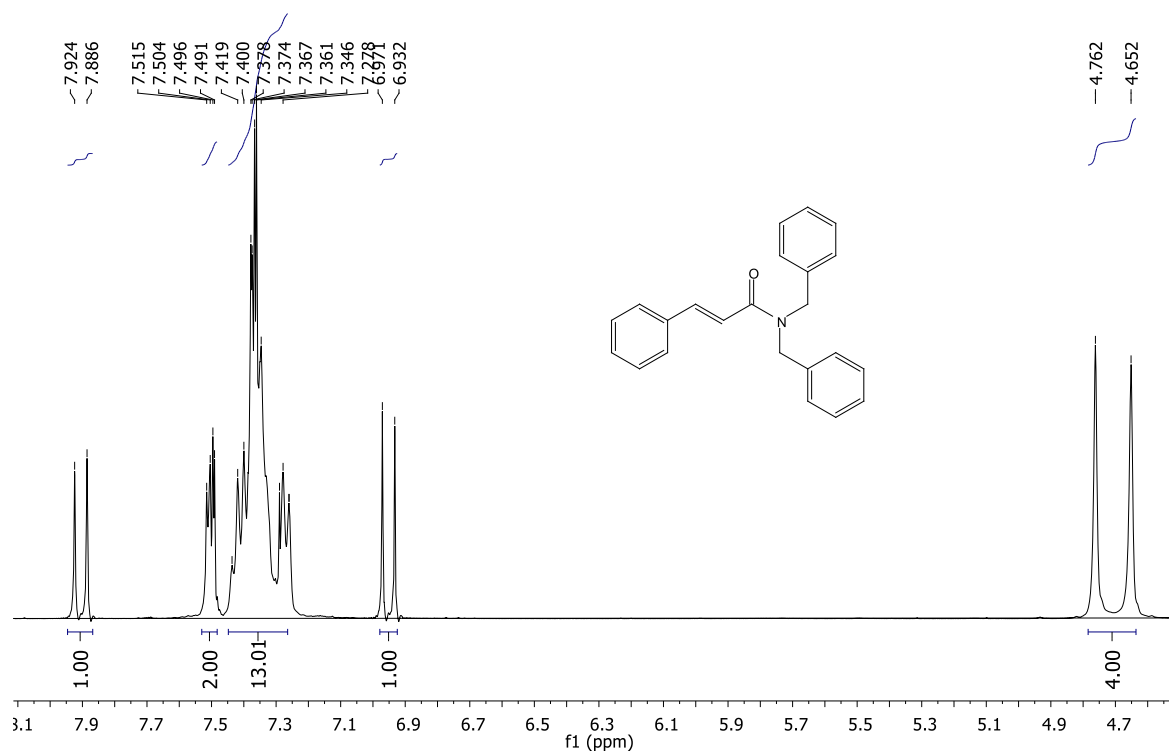
Espectro 59: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) 4-clorobenzilamida cinâmica (11).



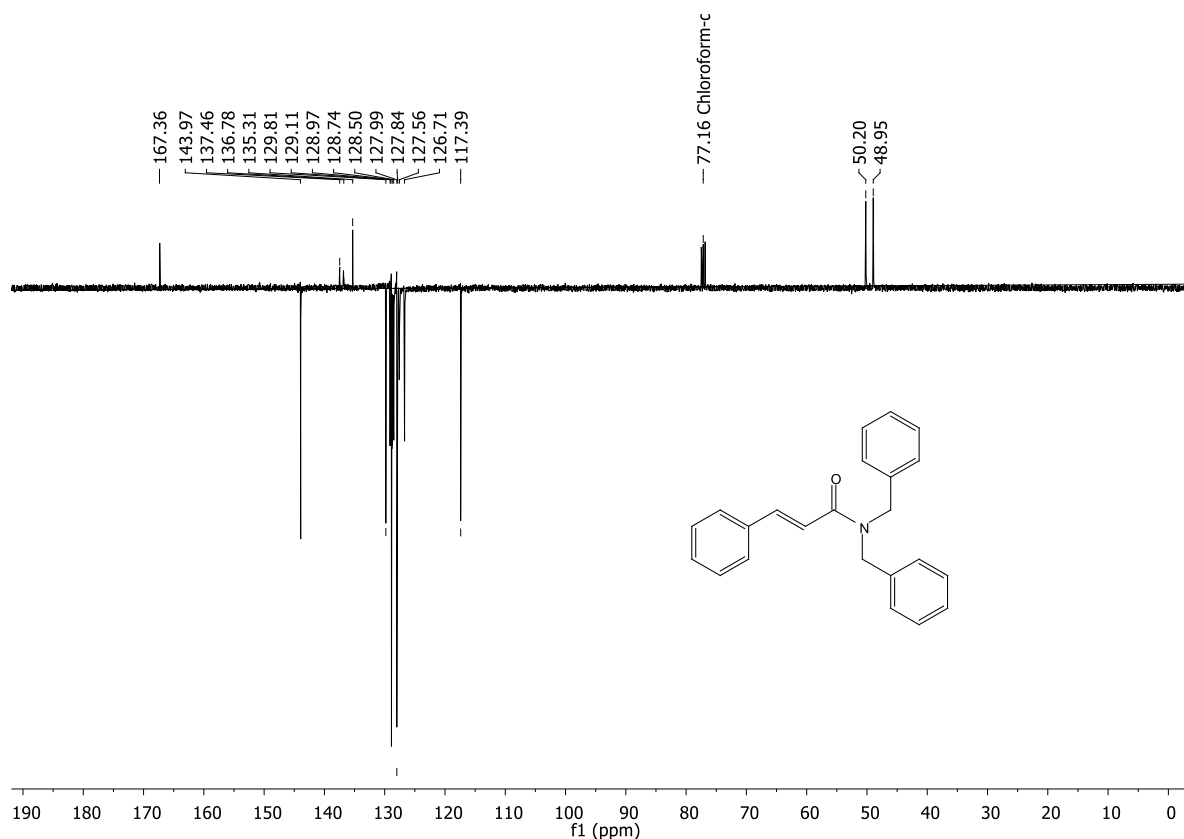
Espectro 60: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) da dibenzilamida cinâmica (12).



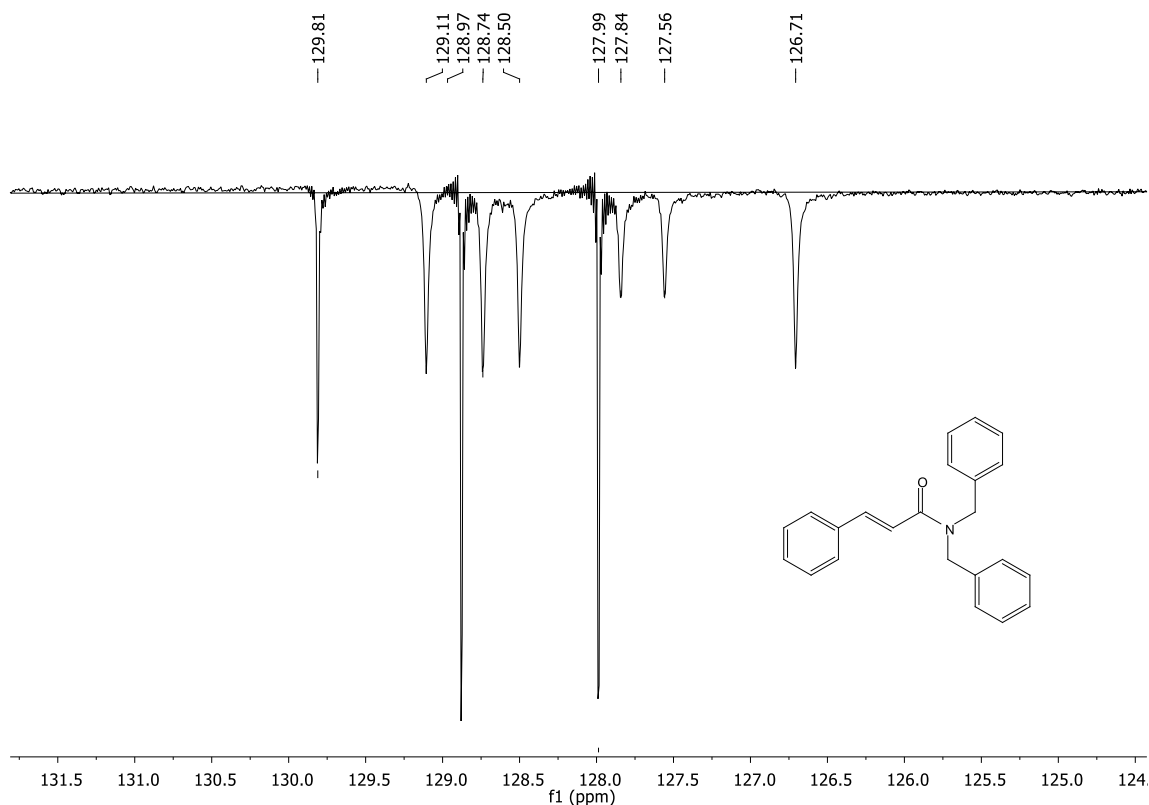
Espectro 61: Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (**12**).



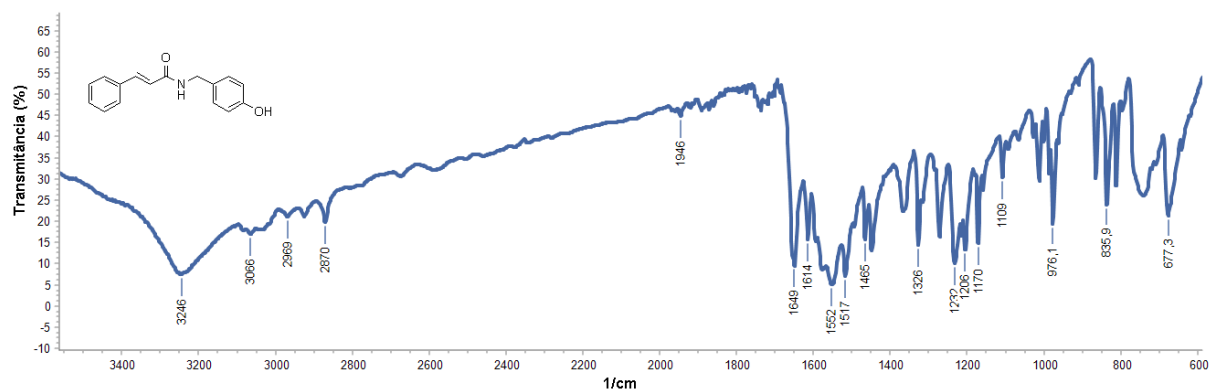
Espectro 62: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (**12**).



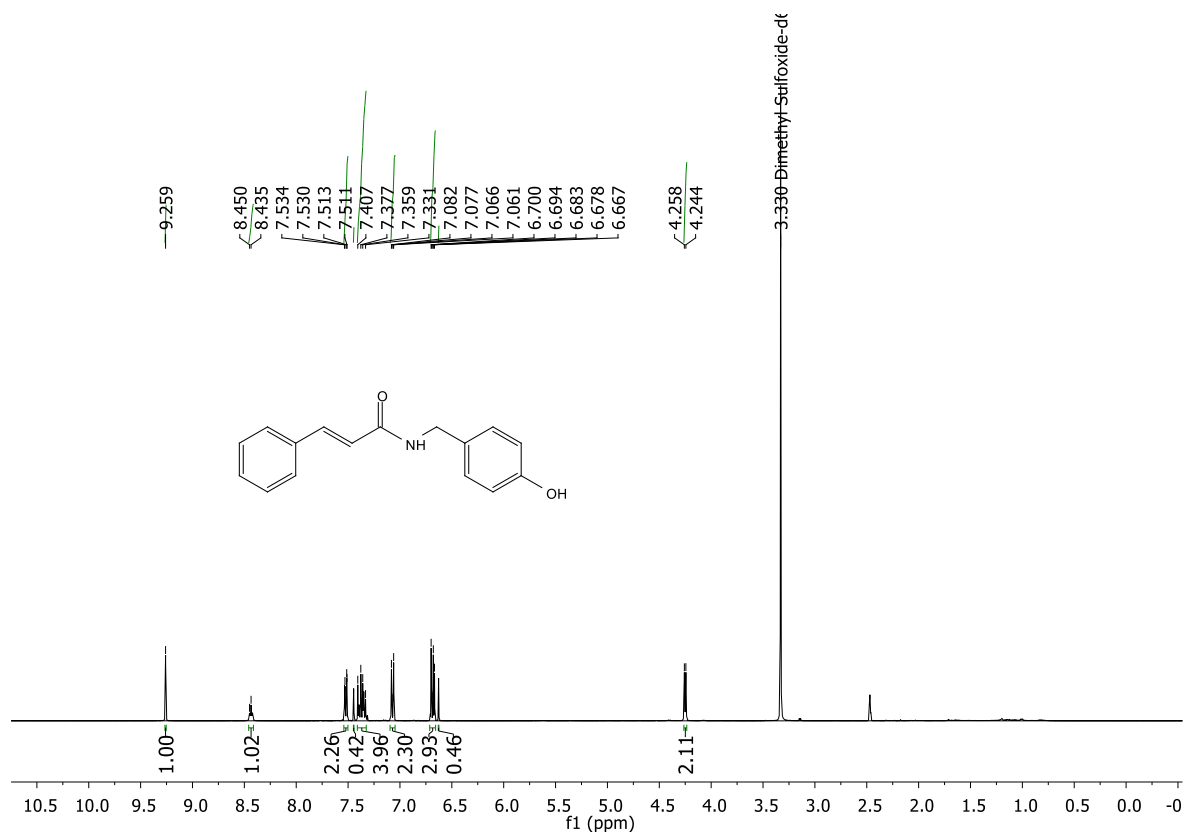
Espectro 63: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (12).



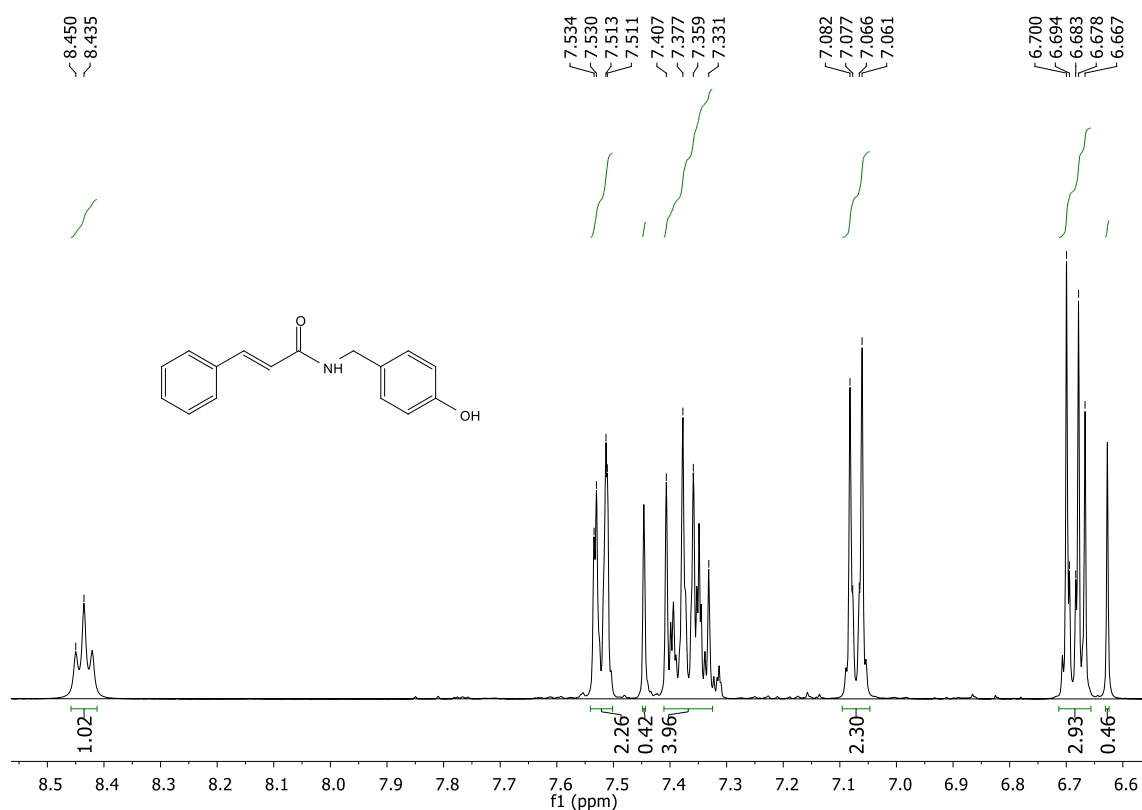
Espectro 64: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da dibenzilamida cinâmica (12).



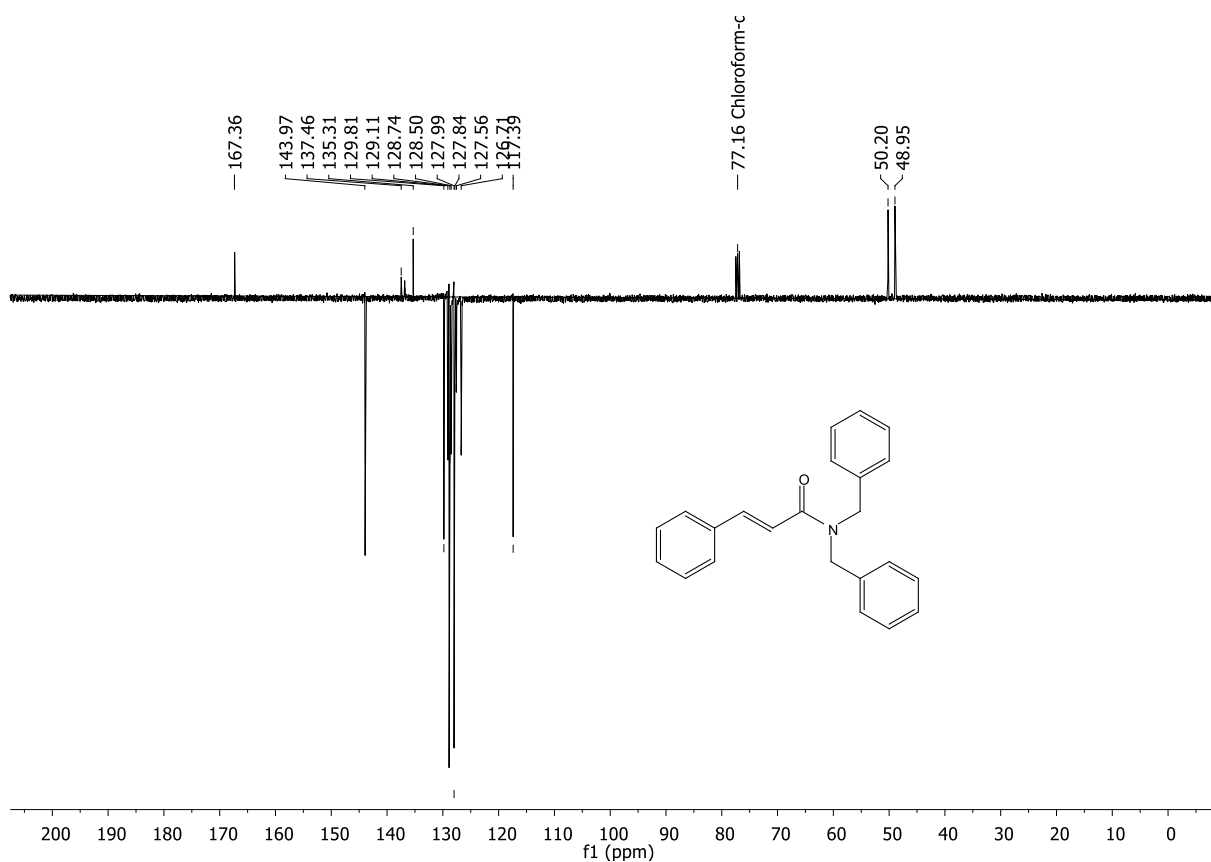
Espectro 65: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).



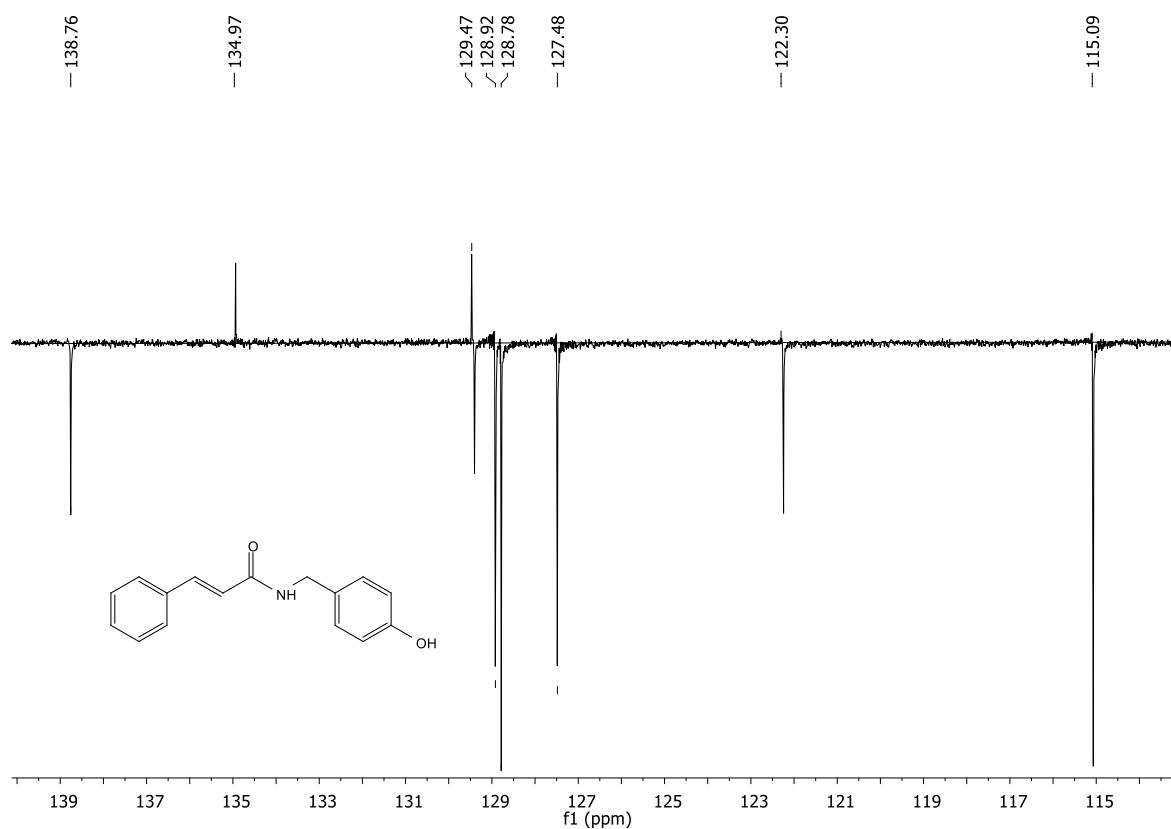
Espectro 66: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).



Espectro 67: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).



Espectro 68: Expansão do espectro de RMN de ¹³C-APT (100 MHz, DMSO-d₆) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (13).



Espectro 69: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) da 4-hidroxibenzilamida cinâmica (**13**).

10. REFERÊNCIAS

ALAM, M. A.; SUBHAN, N.; HOSSAIN, H.; HOSSAIN, M.; REZA, H. M.; RAHMAN, M. M.; ULLAH, M. O. Hydroxycinnamic acid derivatives: A potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. **Nutrition Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 27, 2016.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n.17, p. 3389-3402, 1997.

ANANTHARAJU, P.G.; GOWDA, P.C.; VIMALAMBIKE, M.G.; MADHUNAPANTULA, S.V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p.99, 2016.

ANDRADE, L. N.; OLIVEIRA, R. B. O.; SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, v. 19, n. 2, p.1459-1480, 2014.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BARAJAS, J. G. H.; MÉNDEZ, L. Y. V.; KOUZNETSOV, V. V.; Stashenko, E.E. Efficient synthesis of new N-Benzyl-or N-(2-furylmethyl) cinnamamides promoted by the 'Green' catalyst boric acid, and their spectral analysis. **Synthesis**, v. 2008, n. 03, p. 377-382, 2008.

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

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos**, 3º ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p.D36-42, 2013.

BI, J.; WANG, W.; DU, J.; CHEN, K.; CHENG, K. Structure-activity relationship study and biological evaluation of SAC-Garlic acid conjugates as novel anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 233-245, 2019.

BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; DE BEER, T. A.; TAURIELLO, G.; STUDER, G.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, V. 45, n. D1, p. D313-D319, 2017.

BONGOMIN, F; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

CASE, D. A.; BEN-SHALOM, I. Y.; BROZELL, S. R.; CERUTTI, D. S.; CHEATHAM, T.E.; CRUZEIRO, V. W. D.; DARDEN, T. A.; DUKE, R. E.; GHOREISHI, D.; GILSON, M. K.; GOHLKE, H.; GOETZ, A.W.; GREENE, D.; HARRIS, R.; HOMEYER, N.; IZADI, S.; KOVALENKO, A.; KURTZMAN, T.; LEE, T. S.; LEGRAND, S.; LI, P.; LIN, C.; LIU, J.; LUCHKO, T.; LUO, R.; MERMELSTEIN, D. J.; MERZ, K.M.; MIAO, Y.; MONARD, G.; NGUYEN, C.; NGUYEN, H.; OMELIAN, I.; ONUFRIEV, A.; PAN, F.; QI, R.; ROE, D. R.; ROITBERG, A.; SAGUI, C.; SCHOTT-VERDUGO, S.; SHEN, J.; SIMMERLING, C. L.; SMITH, J.; SALOMON-FERRER, R.; SWAILS, J.; WALKER, R.C.; WANG, J.; WEI, H.; WOLF, R. M.; WU, X.; XIAO, L.; YORK, D. M.; KOLLMAN, P.A. AMBER 2018. **University of California, San Francisco**, 2018.

CHANDRASEKAR, P., Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457-465, 2010.

CHAUDHARI, P. S.; SALIM, S. D.; SAWANT, R. V.; AKAMANCHI, K. G. Sulfated tungstate: a new solid heterogeneous catalyst for amide synthesis. **Green Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1707-1710, 2010.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COSTA, A. O. C. Estudo *in vitro* e *in silico* da atividade antifúngica dos isômeros r-(+) e s-(-) citronelal sobre fungos do gênero *Cryptococcus*. 2017.

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.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**: A biosynthetic approach. 3rd ed. Reino Unido: John Wiley and Sons, 2009.

DIMMOCK, J. R.; KANDEPU, N. M.; HETHERINGTON, M.; QUAIL, J. W.; PUGAZHENTHI, U.; SUDOM, A. M.; CHAMANKHAH, M.; ROSE, P.; PASS, E.; ALLEN, T. M.; HALLERAN, S.; SZYDLOWSKI, J.; MUTUS, B.; TANNOUS, M.; MANAVATHU, E.K.; MYERS, T.G.; DE CLERCQ, E.; BALZARINI, J. Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1014-1026, 1998.

DINIZ, L. R. L.; SOUZA, M. T. D. S.; BARBOZA, J. N.; ALMEIDA, R. N. D.; Sousa, D. P. D. Antidepressant Potential of Cinnamic Acids: Mechanisms of Action and Perspectives in Drug Development. **Molecules**, v. 24, n. 24, p. 4469, 2019.

DUANGKAMOL, C.; JAITA, S.; WANGNGAE, S.; PHAKHODEE, W.; PATTARAWARAPAN, M. An efficient mechanochemical synthesis of amides and dipeptides using 2, 4, 6-trichloro-1, 3, 5-triazine and PPh₃. **RSC Advances**, v. 5, n. 65, p. 52624-52628, 2015.

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.

DUNETZ, JOSHUA R.; MAGANO, JAVIER; WEISENBURGER, GERALD A. In vitro anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activity of amides derived from cinnamic acid. **Compendium of Chemical Terminology**, 2ed. the "Gold Book", 1997.

ECKERT, H.; BAJORATH, J. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 5-6, p. 225-233, 2007.

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

FREIRES, I. D. A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A.; ALENCAR, S. M.; FIGUEIRA, G. M.; ROSALEN, P. L. *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, p. 1-13, 2014.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PÉREZ, M. G.; BAGÁN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of Clinical and Experimental dentistry**, v. 6, n. 5, p. e576, 2014.

GARNAUD, C.; CHAMPLEBOUX, M.; MAUBON, D.; CORNET, M.; GOVIN, J. Histone deacetylases and their inhibition in *Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1238, 2016.

GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57-78, 2019.

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

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

GUZMAN, Juan David. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 2014.

HAMIDPOUR, R.; HAMIDPOUR, M.; HAMIDPOUR, S.; SHAHLARI, M. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of

angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaracidal, and repellent activities. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n.2, p. 66–70, 2015.

HAWKINS, P.C.D.; SKILLMAN, A.G; WARREN, G.L.; ELLINGSON, B.A.; STAHL, M.T. OMEGA. Santa Fe, NM: OpenEye Scientific Software; Available: <http://www.eyesopen.com>

HENDERSON, A.; HARRIS, P.; HARTEL, G.; PATERSON, D.; TURNIDGE, J.; DAVIS, J. S.; TONG, S. Y. C. Benzylpenicillin versus flucloxacillin for penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections from a large retrospective cohort study. **International Journal of Antimicrobial agents**, v. 54, n. 4, p. 491-495, 2019.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSKINS, John A. The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds. **Journal of Applied Toxicology**, v. 4, n. 6, p. 283-292, 1984.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

HWANG, E.; LEE D. G.; PARK, S. H.; OH M. S.; KIM, S. Y. Coriander Leaf extract exerts antioxidant activity and protects Against UVB-Induced photoaging of skin 28 by regulation of procollagen type i and MMP-1 expression. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 9, p. 985–995, 2014.

INOMATA, K.; KINOSHITA, H.; FUKUDA, H.; TANABE, K.; KOTAKE, H. The Reactions of 2-Fluoro-1,3,5-trinitrobenzene (FTNB) as a New Condensing Reagent. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 51, n.6, p.1866-1868, 1978.

JEFFERY-SMITH, A.; TAORI, S. K.; SCHELENZ, S.; JEFFERY, K.; JOHNSON, E.M., BORMAN, A., MANUEL, R.; BROWN, C.S. *Candida auris*: a review of the literature. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 1, p. e00029-00017, 2018.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

JONES, JOHN. **Amino acid and peptide synthesis**. Volume 7. Oxford University Press, 1992.

JÓŹWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J. Z. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 71, n. 1, p. 11-23, 2014.

JUN ZHU, et al. Fungitoxic and phytotoxic activities of cinnamic acid ester and amides. **Journal of Pesticide Science**, v. 25, n. 3, p. 263-266, 2000.

KEISER, M. J.; ROTH, B. L.; ARMBRUSTER, B. N.; ERNSBERGER, P.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p.197-206, 2007.

KHAN, M. S.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p.33–42, 2012.

KMETZSCH, L. Histone deacetylases: targets for antifungal drug development. **Virulence**, v. 6, p. 535–536, 2015.

KNUNIAN, I. L.; GAMBARIAN, N. P. Determination of the strength of the bond between radicals and sulfur in unsymmetric sulfides by the method of destructive bromination. **Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science**, v. 7, n. 10, p. 1176-1184, 1958.

KOSKI, M. K.; HAAPALAINEN, A. M.; HILTUNEN, J. K.; GLUMOFF, T. A two-domain structure of one subunit explains unique features of eukaryotic hydratase 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24666-24672, 2004.

KRIENGKAUYKIAT, J.; ITO, J. I.; DADWAL, S. S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clinical Epidemiology**, v. 3, p. 175, 2011.

LI, X.; ROBBINS, N.; O'MEARA, T. R.; COWEN, L. E. Extensive functional redundancy in the regulation of *Candida albicans* drug resistance and morphogenesis by lysine deacetylases H os2, H da1, R pd3 and R pd31. **Molecular microbiology**, v. 103, n. 4, p. 635-656, 2017.

LI, Y. G.; WANG, J. X.; ZHANG, G. N.; ZHU, M.; YOU, X. F.; HU, X. X.; WANG, Y. C. Antibacterial Activity and Structure– Activity Relationship of a Series of Newly Synthesized Pleuromutilin Derivatives. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 2, p. e1800560, 2019.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

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, n. 5, p. 572-575, 2018.

LIU, P.; HU, Y.; GUO, D. H.; WANG D. X.; TU, H. H.; MA, L.; XIE, T.T.; KONG L.Y. Potential antidepressant properties of *Radix polygalae* (Yuan Zhi). **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p.794–799, 2010.

LOPES, S. P.; CASTILLO, Y. P.; MONTEIRO, M. L.; DE MENEZES, R. R.; ALMEIDA, R. N.; MARTINS, A.; SOUSA, D. P. D. Trypanocidal Mechanism of Action

and *in silico* Studies of p-Coumaric Acid Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5916, 2019.

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

MAGILL, S. S.; EDWARDS, J. R.; BAMBERG, W.; BELDAVS, Z. G.; DUMYATI, G.; KAINER, M. A.; RAY, S. M. Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 2014.

MARTINS, E. A.; GUERRER, L. V.; CUNHA, K. C.; SOARES, M. M. C. N.; ALMEIDA, M. T. G. D. 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. 596–598, 2007.

MCMURRAY, J. **Química Orgânica**. 3rd edição, São Paulo, SP: Cengage Learning, p.856, 2016.

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

MILLER III, B. R.; MCGEE JR, T. D.; SWAILS, J. M.; HOMEYER, N.; GOHLKE, H.; ROITBERG, A. E. MMPBSA. py: an efficient program for end-state free energy calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 2012.

MONTES, R. C.; PEREZ, A. L. A.; MEDEIROS, C. I. S.; ARAÚJO, M. O. D.; LIMA, E. D. O.; SCOTTI, M. T.; SOUSA, D. P. D. Synthesis, antifungal evaluation and *in silico* study of n-(4-halobenzyl) amides. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1716, 2016.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G.; WORM, B. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. 1001127, 2011.

MORCILLO, S. P.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, L.; MOTA, A. J.; JUSTICIA, J.; ROBLES, R. Mild Method for the Selective Esterification of Carboxylic Acids Based on the Garegg–Samuelsson Reaction. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 7, p. 2277–2281, 2011.

NARASIMHAN, B.; BELSARE, D.; PHARANDE, D.; MOURYA, V.; DHAKA, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 827–834, 2004.

NASCIMENTO, L. G. **Preparação de ésteres nitrocinâmicos e avaliação da sua atividade antimicrobiana**. 115p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e

Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

NEPPELENBROEK, K. H.; SEÓ, R.S., URBAN, V. M.; SILVA, S.; DOVIGO, L. N.; JORGE, J. H.; CAMPANHA, N. H. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, v. 20, n. 4, p. 329-344, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NG, K. P.; KUAN, C. S.; KAUR, H.; NA, S. L.; ATIYA, N.; VELAYUTHAN, R. D. *Candida* species epidemiology 2000–2013: a laboratory-based report. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n.11, p. 1447-1453, 2015.

NIMSE, S.B.; PAL, D.; MAZUMDER, A.; MAZUMDER, R. Synthesis of cinnamanilide derivatives and their antioxidant and antimicrobial activity. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

O'BRIEN, M. J.; MCNULTY, T. F.; CHAN, K. P. **Composition and method for use in three dimensional printing**. U.S. Patent n. 9,873, p. 798, 2018.

OHLAN, R.; NARASIMHAN, B.; OHLAN, S.; NARANG, R. JUDGE, V. Synthesis and antimicrobial evaluation of urea inclusion complexes. **Organic Communications**, v. 1, n. 2, 2008.

OpenEye Scientific Software.QUACPAC. Santa Fe, NM: OpenEye Scientific Software; Available: <http://www.eyesopen.com>

OSUKA, A.; HANASAKI, Y.; SUZUKI, H. Synthesis of α , β - Unsaturated Carboxamides Using Dialkyltelluronium Carbamoylmethylide..**ChemInform**, v. 19, n. 4, p. no-no, 1988.

PACIFICI, G. Clinical pharmacology of phenobarbital in neonates: effects, metabolism and pharmacokinetics. **Current Pediatric Reviews**, v. 12, n. 1, p. 48-54, 2016.

PAPPAS, Peter G. Invasive candidiasis.**Infectious Disease Clinics**, v. 20, n. 3, p. 485-506, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução àespectroscopia**. Tradução da 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEIXOTO, J.; ROCHA, M.; NASCIMENTO, R.; MOREIRA, V.;KASHIWABARA, T. G. B. Candidiasis—a literature review. **Journal of Clinical and Experimental dentistry**, 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

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

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p.603–616, 2017.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. Series Fungal infections 5. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PIANALTO, K.M; ALSPAUGH, J.A. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 26, 2016.

PIEKARSKA, K.; HARDY, G.; MOL, E.; VAN DEN BURG, J.; STRIJBS, K.; VAN ROERMUND, C.; DISTEL, B. The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional β -oxidation pathway: Evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 3061-3072, 2008.

PITTMAN, Sarah. Cinnamon: It's not just for making cinnamon rolls. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 2000, n. 2, p. 11, 2011.

RAJA, H.A.; MILLER, A. N.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p.756-770, 2017.

RAJPUT, J. D.; BAGUL, S. D.; PETE, U. D.; ZADE, C. M.; PADHYE, S. B.; BENDRE, R. S. Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. **Molecular Diversity**, v. 22, n. 1, p. 225–245, 2018.

RHAZRI, Khalidet al. Design, Synthesis and Evaluation of N-ArylCarboxamide Derivatives as potential anti-Proliferative effect on the pulmonary artery smooth muscle cells.

ROBBINS, N.; CAPLAN T.; COWEN, L. E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annual Review Microbiology**, v. 71, p. 753–775, 2017.

RUBY J.; BARBEAU, J. The buccale puzzle: the symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 13, n.1, p. 34–41, 2002.

SADEGHI, G.; EBRAHIMI-RAD, M.; MOUSAVI, S.F.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; Razzaghi, A. M. Emergence of non- *Candida albicans* species: Epidemiology,

phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 1, p. 6–13, 2018.

SAITO, Y.; OUCHI, H.; TAKAHATA, H. Carboxamidation of carboxylic acids with 1-tert-butoxy-2-tert-butoxycarbonyl-1, 2-dihydroisoquinoline (BBDI) without bases. **Tetrahedron**, v. 64, n. 49, p. 11129-11135, 2008.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, n. 2,p. 73–85, 2002.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2–13, 2015.

SARDI, J. C. O.;SCORZONI, L.;BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

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, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHLOTTFELDT, S. F.; FERNANDES, S. M.;MARTINS, D. M.;CORDEIRO, P.;DA FONSECA, C. D.; WATANABE, M.; VATTIMO, M. D. 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.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

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

SHULDBURG, S.; CARROLL, J. Scaffolding Students' Skill Development by First Introducing Advanced Techniques through the Synthesis and 15N NMR Analysis of Cinnamamides. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 12, p. 1974-1977, 2017.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, R. H. D. N. **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.

SILVEIRA, G.R.; CAMPELO, K.A.; LIMA, G.R.S.; CARVALHO, L.P.; SAMARÃO, S.S.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; MARIA, E.J. *In vitro* anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activity of amides derived from cinnamic acid. **Molecules**, v.23, n.4, p. 774, 2018.

SOURMAGHI, M. H. S.; KIAEE, G.; GOLFAKHRABADI, F.; JAMALIFAR, H.; KHANAVI, M. Comparison of essential oil composition and antimicrobial activity of *Coriandrum sativum* L. extracted by hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. **Journal Food Science Technololy**, v. 52, n. 4, p. 2452–2457, 2015.

SOUSA, J. P.; QUEIROZ, E. O.; GUERRA, F. Q. C.; MENDES, J. M.; PEDROSA, Z. V.; FILHO, A. A. O.; PEREIRA, F. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, F. S. O.; LIMA, E. O. Morphological alterations and time-kill studies of the essential oil from the leaves of *Coriandrum sativum* L. on *Candida albicans*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas** v. 15, n. 6; p. 398-406, 2016.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. v.12, n. 8, p. 749–767, 2012.

SZWAJGIER, D., BOROWIEC, K., & PUSTELNIAK, K. The neuroprotective effects of phenolic acids: molecular mechanism of action. **Nutrients**, v. 9, n.5, p. 477, 2017.

TANER, G., ÖZKAN VARDAR, D., AYDIN, S., AYTAÇ, Z., BAŞARAN, A., & BAŞARAN, N. Use of *in vitro* assay to assess the potential cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of vanillic and cinnamic acid. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2, p. 183-190, 2017.

TEDERSOO, L.; BAHAM, M.; POLME, S.; KOLJALG, U.; YOROU, N. S.; WIJESUNDERA, R.; RUIZ, L. V.; VASCO-PALACIOS, A.M.; THU, P. Q.; SUIJA, A.; SMITH, M. E.; SHARP, C.; SALUVEER, E.; SAITTA, A.; ROSAS, M.; RIIT, T.; RATKOWSKY, D.; PRITSCH, K.; POLDMAA, K.; PIEPENBRING, M.; PHOSRI, C.; PETERSON, M.; PARTS, K.; PARTEL, K.; OTSING, E.; NOUHRA, E.; NJOUONKOU, A. L.; NILSSON, R. H.; MORGADO, L. N.; MAYOR, J.; MAY, T. W.; MAJUAKIM, J.; LODGE, D. J.; LEE, S. S.; LARSSON, K. H.; KOHOUT, P.; HOSAKA, K.; HIIESALU, I.; HENKEL, T. W.; HAREND, H.; GUO, L. D.; GRESLEBIN, A.; GRELET, G.; GEML, J.; GATES, G.; DUNSTAN, W.; DUNK, C.; DRENKHAN, R.; DEARNALEY, J.; DE KESEL, A.; DANG, T.; CHEN, X.; BUEGGER, F.; BREARLEY, F. Q.; BONITO, G.; ANSLAN, S.; ABELL, S.; ABARENKOV, K. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1256688, 2014.

TRUONG, T.; ZENG, G.; LIM, T. K.; CAO, T.; PANG, L. M.; LEE, Y. M.; SENEVIRATNE, C. J. Proteomics analysis of *Candida albicans* dnm1 haploid mutant unraveled the association between mitochondrial fission and antifungal susceptibility. **Proteomics**, v. 20, n. 1, p. 1900240, 2020.

TURKEZ, H.; NÓBREGA, F. R. D.; OZDEMIR, O.; BEZERRA FILHO, C. D. S. M.; ALMEIDA, R. N. D.; TEJERA, E.; SOUSA, D. P. D. NFBTA: A Potent Cytotoxic Agent against Glioblastoma. **Molecules**, v. 24, n.13, p. 2411, 2019.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506-D515, 2019.

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

VANHOLME, B.; EL HOUARI, I.; BOERJAN, W. Bioactivity: phenylpropanoids' best kept secret. **Current opinion in biotechnology**, v. 56, p. 156-162, 2019.

VINCENT, B. M.; LANCASTER, A. K.; SCHERZ-SHOUVAL, R.; WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. **PLoS biology**, v. 11, n. 10, 2013.

WANG, X.; HE, L.; LI, Z.; WANG, W.; LIU, J. SmI²-Catalyzed Addition of Amines to α , β -Unsaturated N-Acylbenzotriazoles. **Synthetic Communications**, v. 39, n.5, p.819-829, 2009.

WEIDNER, W. M. A.; FRAGA, S. S. A.; TURCHI, I. J. Unusual region selectivity of the Dipolar Cyclo addition Reactions of Nitrile Oxides and Tertiary Cinnamides and Crotonamides. **The Journal of organic chemistry**, v. 63, n. 18, p. 6319-6328, 1998.

WILLIAMS, D. W.; JORDAN, R. P.; WEI, X. Q.; ALVES, C. T.; WISE, M. P.; WILSON, M. J.; Lewis, M. A. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of oral Microbiology**, v. 5, n. 1, p.22434, 2013.

YASUI, Y.; TSUCHIDA, S.; MIYABE, H.; TAKEMOTO, Y. YASUI, Yoshizumi One-pot amidation of olefins through Pd-catalyzed coupling of alkylboranes and carbamoyl chlorides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 15, p. 5898-5900, 2007.

YILMAZ, S.; SOVA, M.; ERGÜN, S. Antimicrobial activity of trans- cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v.125, n.6, p.1714-1727, 2018.

YLIANTTILA, M. S.; PURSIANEN, N. V.; HAAPALAINEN, A. M.; JUFFER, A. H.; POIRIER, Y.; HILTUNEN, J. K.; GLUMOFF, T. Crystal structure of yeast peroxisomal multifunctional enzyme: structural basis for substrate specificity of (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase units. **Journal of Molecular Biology**, v. 358, n. 5, p. 1286-1295, 2006.

YU, Q.; DING, X.;ZHANG, B.;XU, N.; JIA, C.; Mao, J. Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 4, p. 633-41, 2014.

ZARE-SHEHNEH, M.;ASKARFARASHAH, M.;EBRAHIMI, L.;KOR, N. M.;ZARE-ZARDINI, H.;SOLTANINEJAD, H.; JABINIAN, F. Biological activities of a new antimicrobial peptide from *Coriandrum sativum*. **International Journal of Bioscience**, v. 4, n. 6, p. 89-99, 2014.