



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

TESE DE DOUTORADO

3,5-DINITROBENZAMIDAS E 3,5-DINITROBENZOATOS SINTÉTICOS:
AValiação ANTIFÚNGICA E DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOEMULSÃO

ALLANA BRUNNA SUCUPIRA DUARTE

João Pessoa
UFPB – 2023



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

3,5-DINITROBENZAMIDAS E 3,5-DINITROBENZOATOS SINTÉTICOS:
AValiação ANTIFÚNGICA E DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOEMULSÃO

ALLANA BRUNNA SUCUPIRA DUARTE

Tese 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 Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

João Pessoa
UFPB – 2023

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D812t Duarte, Allana Brunna Sucupira.
3,5-dinitrobenzamidas e 3,5-dinitrobenzoatos sintéticos : avaliação
antifúngica e desenvolvimento de uma nanoemulsão / Allana Brunna
Sucupira Duarte. - João Pessoa, 2023.
208 f. : il.

Orientação: Damião Pergentino de Sousa.

Coorientação: Elquio Eleamen Oliveira.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Ácido benzoico. 3. Modelagem
molecular. 4. Nanotecnologia. I. Sousa, Damião Pergentino de.
II. Oliveira, Elquio Eleamen. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.282(043)

ALLANA BRUNNA SUCUPIRA DUARTE

**3,5-DINITROBENZAMIDAS E 3,5-DINITROBENZOATOS SINTÉTICOS:
AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA E DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOEMULSÃO**

Aprovada em 24/01/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 DAMIAO PERGENTINO DE SOUSA
Data: 24/01/2023 12:05:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

Presidente da Banca - UFPB

Documento assinado digitalmente
 ELQUIO ELEAMEN OLIVEIRA
Data: 24/01/2023 12:27:04-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

Coorientador - UEPB

Documento assinado digitalmente
 ELISANGELA AFONSO DE MOURA KRETZSCHMAR
Data: 24/01/2023 14:50:28-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

Examinador Externo - UFPB

Documento assinado digitalmente
 RICARDO MARTINS RAMOS
Data: 24/01/2023 14:41:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos

Examinador Externo – IFPI

Documento assinado digitalmente
 JOSE MARIA BARBOSA FILHO
Data: 24/01/2023 12:55:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Examinador Interno - UFPB

Documento assinado digitalmente
 LUCIANA SCOTTI
Data: 24/01/2023 13:42:43-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dra. Luciana Scotti

Examinador Interno - UFPB

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha tia Nita “*in memoriam*”, por todo amor e dedicação. Tenho certeza que você sempre estará ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que esteve, está e sempre estará abençoando meu caminho e renovando minha fé.

Ao professor e orientador Dr. Damião Pergentino de Sousa, pelas orientações, oportunidade, paciência e confiança.

Ao professor e o coorientador Elquio Eleamen Oliveira pela disponibilidade, apoio e incentivo.

Ao professor Dr. Ricardo Castro por todo auxílio nos testes antifúngicos destinados ao projeto.

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica: Ana Júlia, Anna Emanuella, Alana Rodrigues, Carlos, Joice, Lázaro, Marianna, Marina, Mayara, Rayanne, Severino e Susiany pelas conversas, companhia, contribuição e auxílio durante as atividades realizadas no laboratório.

Ao colega Rafael Limongi pela ajuda e apoio durante a execução de todo o trabalho.

Ao meu namorado Lucas Pimentel, por todo amor, carinho e paciência.

A minha amiga Geovana Quixabeira, por todo apoio e suporte emocional durante todos esses anos.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e a UFPB pelo apoio institucional e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste grande sonho.

E por último, porque em destaque, agradeço à minha família, mas, em especial a minha mãe Benedita, meu tio Antônio, minhas tias, Irene, Socorro e Nita (*in memoriam*) e a minha irmã Andressa pelo amor incondicional e apoio em todas as fases da minha vida.

RESUMO

Duarte, Allana Brunna Sucupira. **3,5-Dinitrobenzamidas e 3,5-dinitrobenzoatos sintéticos: avaliação antifúngica e desenvolvimento de uma nanoemulsão**. 210 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2023.

As infecções ocasionadas por fungos estão entre os mais frequentes agravos a saúde pública acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. Atualmente, existe um número restrito de antifúngicos e a resistência dos microrganismos a esses medicamentos comprometem a eficácia do tratamento. Dessa forma, a pesquisa por compostos sintéticos antimicrobianos aumentou devido ao seu papel chave no desenvolvimento de novos fármacos. O ácido benzoico e seus derivados possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas, dentre elas, a atividade antifúngica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi preparar uma coleção de vinte e um derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico (**1-21**), avaliar a atividade antifúngica dos compostos frente a cepas do gênero *Candida* e realizar o desenvolvimento e caracterização de uma nanoemulsão antifúngica. Os produtos foram obtidos através da esterificação de Fischer, esterificação com haletos de alquila e arila, reação de Mitsunobu e reação com cloreto ácido. Na caracterização estrutural dos derivados utilizou-se os métodos espectroscópicos de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas de alta resolução. 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) utilizando a técnica de microdiluição. A formulação foi produzida por ultrassom e caracterizada pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS). Os produtos foram obtidos com rendimentos de 12,46%-85,17%. Dentre as vinte e uma substâncias obtidas, uma é inédita na literatura (**9**). O éster **1** apresentou o melhor perfil antifúngico contras todas as cepas de *Candida* e foi selecionado para o desenvolvimento da nanoemulsão. A MDNB-NE exibiu um tamanho de gota de $181,16 \pm 3,20$ nm e índice de polidispersidade de $0,30 \pm 0,03$. O estudo *in vitro* mostrou que o composto **1** e a MDNB-NE inibiram o crescimento de todas as cepas com concentrações inibitórias mínimas de 0,27-1,10 mM. Os resultados biológicos corroboraram com a abordagem *in silico*, que apontou para um mecanismo de ação antifúngico multialvo para os compostos **1** e **2** em *C. albicans*, e estão de acordo com a interferência experimental do **2** na síntese do ergosterol. Assim, o presente estudo poderá servir de base para novas pesquisas envolvendo compostos com atividade antifúngica.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; ácido benzoico; modelagem molecular; nanotecnologia.

ABSTRACT

Duarte, Allana Brunna Sucupira. **Synthetic 3,5-dinitrobenzamides and 3,5-dinitrobenzoates: antifungal evaluation and development of a nanoemulsion.** 210 p. Thesis (Doctorate in Natural and Synthetic Bioactive Products) Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba. João Pessoa, 2023.

Infections caused by fungi are among the most frequent public health problems affecting mainly immunocompromised patients. Currently, there is a restricted number of antifungals and the resistance of microorganisms to these drugs compromises the effectiveness of the treatment. Thus, the search for synthetic antimicrobial compounds increased due to their key role in the development of new drugs. Benzoic acid and its derivatives have a wide spectrum of pharmacological activities, including antifungal activity. Therefore, the objective of this work was to prepare a collection of twenty-one derivatives of 3,5-dinitrobenzoic acid (**1-21**), to evaluate the antifungal activity of the compounds against strains of the genus *Candida* and to carry out the development and characterization of an antifungal nanoemulsion. The products were obtained through Fischer's esterification, esterification with alkyl and aryl halides, Mitsunobu reaction and reaction with acid chloride. In the structural characterization of the derivatives, infrared spectroscopic methods, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance and high resolution mass spectrometry were used. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), the determination of the minimum fungicidal concentration (MFC) and the assay of determination of the mechanism of action (sorbitol and ergosterol) were carried out using the microdilution technique. The formulation was produced by ultrasound and characterized by dynamic light scattering (DLS) technique. Products were obtained in 12.46%-85.17% yields. Among the twenty-one substances obtained, one is unprecedented in the literature (**9**). Ester **1** showed the best antifungal profile against all *Candida* strains and was selected for the development of the nanoemulsion. MDNB-NE exhibited a droplet size of 181.16 ± 3.20 nm and a polydispersity index of 0.30 ± 0.03 . The *in vitro* study showed that compound **1** and MDNB-NE inhibited the growth of all strains with minimum inhibitory concentrations of 0.27-1.10 mM. The biological results corroborate the *in silico* approach, which pointed to a multi-target antifungal mechanism of action for compounds **1** and **2** in *C. albicans*, and are in agreement with the experimental interference of **2** in the synthesis of ergosterol. Thus, the present study may serve as a basis for further research involving compounds with antifungal activity.

Key-Words: antimicrobial activity; benzoic acid; molecular modeling; nanotechnology.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reações utilizadas na obtenção dos ésteres.	36
Esquema 2: Mecanismo de esterificação de Fischer.....	37
Esquema 3: Mecanismo de esterificação com haletos de alquila e arila	38
Esquema 4: Mecanismo de reação de Mitsunobu para síntese de ésteres.....	40
Esquema 5: Mecanismo de formação do cloreto ácido	42
Esquema 6: Mecanismo de esterificação via reação de Schotten-Baumann.	43
Esquema 7: Reação utilizada na obtenção das amidas.	44
Esquema 8: Mecanismo de amidação com cloreto ácido.....	45
Esquema 9: Planejamento experimental do estudo.....	48
Esquema 10: Reação de esterificação de Fischer utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e álcoois alifáticos.....	51
Esquema 11: Reação de esterificação utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e haletos de alquila e arila	52
Esquema 12: Reação de Mitsunobu utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e álcoois aromáticos	53
Esquema 13: Reação de esterificação com cloreto ácido e álcoois aromáticos...	54
Esquema 14: Reação de amidação com cloreto ácido e aminas	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ácido 3,5-dinitrobenzoico	34
Figura 2: Estrutura química dos derivados preparados	49
Figura 3: Estrutura química dos derivados preparados	50
Figura 4: Estrutura base dos ésteres derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico.....	63
Figura 5: Estrutura base das amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico.....	65
Figura 6: Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9).....	67
Figura 7: Energias livres previstas de ligação do composto 1 aos seus potenciais alvos	82
Figura 8: Modos gerais de ligação do composto 1 aos receptores GAP1 e GAP5	84
Figura 9: Modo de ligação previsto do 3,5-dinitrobenzoato de metila a MEP2	85
Figura 10: Energias livres previstas de ligação do composto 2 aos seus alvos potenciais classificados do melhor ΔG de ligação (verde) ao pior (vermelho).....	93
Figura 11: Os modos de ligação previstos do composto 2 aos alvos MEP2 (esquerda) e HSP90 (direita)	95
Figura 12: Rede prevista de interações do composto 2 para os alvos MEP2, HSP90, ERG20, ERG1, ERG12 e ERG7.....	96
Figura 13: Modos de ligação previstos do composto 2 para os alvos ERG20 (superior esquerdo), ERG1 (superior direito), ERG12 (inferior esquerdo) e ERG7 (inferior direito).....	98
Figura 14: Representação da superfície da região dos alvos potenciais do composto 2 interagindo com seu grupo etila.	100

Figura 15: Curva DTA do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	103
Figura 16: Curva TG do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1).....	104
Figura 17: Aspecto visual da nanoemulsão em branco (BNE) e nanoemulsão com 3,5-dinitrobenzoato de metila (MDNB-NE) após 90 dias de armazenamento a 4 °C.	105
Figura 18: Curva de calibração do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	106
Figura 19: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	130
Figura 20: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de metila (1), (CDCl_3 , 400 MHz).	130
Figura 21: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de metila (1), (CDCl_3 , 100 MHz).	131
Figura 22: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2)	132
Figura 23: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2), (CDCl_3 , 400 MHz)	132
Figura 24: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2), (CDCl_3 , 400 MHz)	133
Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2), (CDCl_3 , 100 MHz).	133
Figura 26: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de propila (3)	134
Figura 27: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 400 MHz)	135
Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H 3,5-dinitrobenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 400 MHz).	135

Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 100 MHz).	136
Figura 30: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (4).....	137
Figura 31: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (4), (CDCl_3 , 400 MHz).	137
Figura 32: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (4), (CDCl_3 , 400 MHz).....	138
Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (4), (CDCl_3 , 100 MHz).	138
Figura 34: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de butila (5)	139
Figura 35: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de butila (5), (CDCl_3 , 400 MHz)	140
Figura 36: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de butila (5), (CDCl_3 , 400 MHz).	140
Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de butila (5), (CDCl_3 , 100 MHz).	141
Figura 38: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6)	142
Figura 39: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz).	142
Figura 40: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz)	143
Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz)	143

Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6), (CDCl_3 , 100 MHz)	144
Figura 43: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-nitrobenzoato de isopentila (7)	145
Figura 44: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz)	145
Figura 45: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz).....	146
Figura 46: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz).....	146
Figura 47: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (7), (CDCl_3 , 100 MHz)	147
Figura 48: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de decila (8)	149
Figura 49: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de decila (8), (CDCl_3 , 400 MHz)	149
Figura 50: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de decila (8), (CDCl_3 , 400 MHz)	150
Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de decila (8), (CDCl_3 , 100 MHz)	150
Figura 52: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9).....	151
Figura 53: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 400 MHz)	152
Figura 54: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 400 MHz)	152

Figura 55: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 400 MHz)	153
Figura 56: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 100 MHz)	153
Figura 57: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (10)	155
Figura 58: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (10), (CDCl_3 , 400 MHz)	156
Figura 59: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (10), (CDCl_3 , 400 MHz)	156
Figura 60: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (10), (CDCl_3 , 100 MHz)	157
Figura 61: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (11)	158
Figura 62: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (11), (CDCl_3 , 400 MHz)	158
Figura 63: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (11), (CDCl_3 , 400 MHz)	159
Figura 64: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (11), (CDCl_3 , 400 MHz)	159
Figura 65: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (11), (CDCl_3 , 100 MHz)	160
Figura 66: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (12)	161
Figura 67: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (12), (CDCl_3 , 400 MHz)	161

Figura 68: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (12), (CDCl_3 , 400 MHz)	162
Figura 69: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (12), (CDCl_3 , 400 MHz)	162
Figura 70: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (12), (CDCl_3 , 100 MHz).....	163
Figura 71: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (13).....	165
Figura 72: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (13), (DMSO-d_6 , 500 MHz).....	165
Figura 73: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (13), (DMSO-d_6 , 500 MHz)	166
Figura 74: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (13), (DMSO-d_6 , 125 MHz).....	166
Figura 75: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (14)	167
Figura 76: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (14), (CDCl_3 , 400 MHz)	168
Figura 77: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (14), (CDCl_3 , 400 MHz).	168
Figura 78: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (14), (CDCl_3 , 100 MHz).....	169
Figura 79: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de <i>N</i> -benzil-3,5-dinitrobenzamida (15)	171
Figura 80: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de <i>N</i> -benzil-3,5-dinitrobenzamida (15), (DMSO-d_6 , 400 MHz).....	172

Figura 81: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -benzil-3,5-dinitrobenzamida (15), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	172
Figura 82: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -benzil-3,5-dinitrobenzamida (15), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	173
Figura 83: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de <i>N</i> -benzil-3,5-dinitrobenzamida (15), (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	173
Figura 84: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de <i>N,N</i> -dietil-3,5-dinitrobenzamida (16)	174
Figura 85: Espectro de RMN ^1H de <i>N,N</i> -dietil-3,5-dinitrobenzamida (16), (CDCl_3 , 500 MHz)	175
Figura 86: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N,N</i> -dietil-3,5-dinitrobenzamida (16), (CDCl_3 , 500 MHz).....	175
Figura 87: Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N,N</i> -dietil-3,5-dinitrobenzamida (16), (CDCl_3 , 125 MHz)	176
Figura 88: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenilbenzamida (17)	177
Figura 89: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenilbenzamida (17), (DMSO- d_6 , 500 MHz)	177
Figura 90: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenilbenzamida (17), (DMSO- d_6 , 500 MHz)	178
Figura 91: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenilbenzamida (17), (DMSO- d_6 , 500 MHz)	178
Figura 92: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenilbenzamida (17), (DMSO- d_6 , 125MHz)	179
Figura 93: Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de <i>N</i> -(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (18)	180

Figura 94: Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (18), (DMSO- d_6 , 400 MHz)	180
Figura 95: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (18), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	181
Figura 96: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (18), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	181
Figura 97: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de <i>N</i> -(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (18), (DMSO- d_6 , 100 MHz)	182
Figura 98: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>N</i> -(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19).....	183
Figura 99: Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19), (DMSO- d_6 , 500 MHz)	183
Figura 100: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19), (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	184
Figura 101: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19), (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	184
Figura 102: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19), (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	185
Figura 103: Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19), (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	185
Figura 104: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19), (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	186
Figura 105: Espectro de RMN ^{19}F de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19), (DMSO- d_6 , 500 MHz)	186
Figura 106: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>N</i> -ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (20)	187

Figura 107: Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (20), (DMSO- d_6 , 500 MHz)	188
Figura 108: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (20), (DMSO- d_6 , 500MHz).....	188
Figura 109: Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (20), (DMSO- D_6 , 500 MHz)	189
Figura 110: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21).....	190
Figura 111: Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21), (DMSO- d_6 , 400 MHz)	190
Figura 112: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	191
Figura 113: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	191
Figura 114: Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	192
Figura 115: Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21), (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	192

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados das reações de esterificação e dos ésteres derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico.....	55
Tabela 2: Dados das reações de amidação e das amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico.....	58
Tabela 3: Espectroscopia de Infravermelho dos 3,5-dinitrobenzoatos em cm^{-1}	60
Tabela 4: Espectroscopia de Infravermelho das 3,5-dinitrobenzamidas em cm^{-1} ..	62
Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δH) e de ^{13}C (δC) para o 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9)	64
Tabela 6: Assinalamento de Espectrometria de Massa do 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9)	66
Tabela 7: Concentrações inibitórias e fungicidas mínimas (CFM/CIM) do ácido 3,5-dinitrobenzoico e seus derivados expressos em $\mu\text{g/mL}$ e mM	70
Tabela 8: Valores de CIM em ($\mu\text{g/mL}$) e (mM) dos ésteres 1, 2 e 3 na ausência e presença de sorbitol (0,8 M) e ergosterol contra <i>Candida albicans</i>	76
Tabela 9: Alvos potenciais do composto 1 em <i>C. albicans</i>	77
Tabela 10: Resultados da ancoragem do composto 1 aos seus alvos potenciais.	78
Tabela 11: Energias livres previstas de ligação do composto 1 aos seus alvos potenciais de acordo com o método MM-PBSA	80
Tabela 12: Alvos potenciais do composto 2 em <i>C. albicans</i>	86
Tabela 13: Alvos potenciais do composto 2 em <i>C. albicans</i> selecionados para estudos de modelagem	89
Tabela 14: Resultados do acoplamento molecular do composto 2 aos seus potenciais alvos	90

Tabela 15: Energias livres de ligação previstas e seus componentes para os complexos previstos para o composto 2 . Os valores de energia são expressos em kcal/mol	92
Tabela 16: Previsões físico-químicas e ADMET para o composto 2 e nistatina .	101
Tabela 17: Dados da análise térmica diferencial do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	103
Tabela 18: Dados de decomposição do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	104
Tabela 19: Parâmetros de estabilidade das nanoemulsões (MDNB-NE) e (BNE): diâmetro médio da gota, índice de polidispersão e pH	108
Tabela 20: Concentrações inibitórias e fungicidas mínimas (CFM/CIM) do composto 1 , MDNB-NE e BNE expressas em (µg/mL) e (mM).....	110
Tabela 21: Valores de CIM em (µg/mL) e (mM) do composto 1 e MDNB-NE na ausência e presença de ergosterol e sorbitol (0,8M) contra <i>Candida albicans</i>	112
Tabela 22: Composição das nanoemulsões MDNB-NE e BNE	126

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC: 5-flucitosina

AcOEt: acetato de etila

APT: *Attached Proton Test*

ATCC: American Type Culture Collection

CC: Cromatografia em coluna

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

DEAD: Azodicarboxilato de dietila

DLS: Espalhamento dinâmico de luz

DMSO-d₆: dimetil-sulfóxido deuterado

DM: Dinâmica molecular

Et₃N: trietilamina

Hex: hexano

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

J: constante de acoplamento

MCT: triglicerídeo de cadeia média

MDNB-NE: nanoemulsão de 3,5-dinitrobenzoato de metila

Me: Metila

MHz: Megahertz

mL: mililitro

OMe: Metoxila

PDI: Índice de polidispersidade

P.F.: Ponto de fusão

PPh₃: Trifenilfosfina

ppm: partes por milhão

Rf: Fator de Retenção

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SOCl₂: Cloreto de Tionila

t. a.: temperatura ambiente

THF: Tetrahidrofurano

TPP: Trifenilfosfina

UV: Ultravioleta

δ : Deslocamento químico em ppm

μg : Micrograma

***d*:** Dubleto

***m*:** Multiplete

***q*:** Quarteto

***quint*:** Quinteto

***s*:** Singleto

***sept*:** Septeto

***sex*:** Sexteto

***t*:** Tripleto

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO	28
2.0. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	32
2.1. O gênero <i>Candida</i> e a candidíase	30
2.2. Tratamento e resistência.....	31
2.3. Derivados benzoicos com potencial antimicrobiano	33
2.4. O ácido 3,5-dinitrobenzoico e seus derivados	34
2.5. Considerações sobre os ésteres.....	35
2.5.1. Propriedades gerais dos ésteres	35
2.5.2. Reações para obtenção dos ésteres	35
2.6. Considerações sobre as amidas	43
2.6.1. Reação para obtenção das amidas	44
2.7. Nanoemulsões	45
3.0. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo geral	47
3.2. Objetivos específicos	47
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Planejamento do estudo	48
4.2. Etapa química	51
4.2.1. Preparação dos ésteres derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico.....	51

4.2.2. Preparação das amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico.....	56
4.3. Análise espectroscópica dos ésteres obtidos.....	59
4.3.1. Espectroscopia de Infravermelho dos ésteres	59
4.3.2. Espectroscopia de Infravermelho das amidas	61
4.3.3. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C dos ésteres	62
4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C das amidas	65
4.3.5. Interpretação do espectro de massas de alta resolução do composto 9	66
4.4. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos	67
4.5. Mecanismo de ação dos compostos com maior potencial de bioatividade	75
4.6. Docking Molecular do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1).....	77
4.7. Docking Molecular do 3,5-dinitrobenzoato de etila (2).....	86
4.8. Análise térmica do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	102
4.8.1. Análise térmica diferencial (DTA)	102
4.8.2. Termogravimetria (TG)	103
4.9. Preparação da nanoemulsões de 3,5-dinitrobenzoato de metila (MDNB-NE) e nanoemulsão branca (BNE) e análise do teor.....	105
4.10. Caracterização e estudo de estabilidade das nanoemulsões.....	106
4.11. Teste de atividade antifúngica das nanoemulsões	108
4.12. Mecanismo de ação do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1) e da nanoemulsão (MDNB-NE)	111
5.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	113

6.0. PARTE EXPERIMENTAL - QUÍMICA	114
6.1. Substâncias, materiais e métodos utilizados no preparo dos compostos	114
6.2. Métodos cromatográficos	114
6.3. Ponto de fusão	115
6.4. Métodos espectroscópicos	115
6.4.1. Ressonância magnética nuclear.....	115
6.4.2. Infravermelho.....	116
6.4.3. Espectrometria de massas de alta resolução	116
7.0. PARTE EXPERIMENTAL - BIOLÓGICA	116
7.1. Local de trabalho	116
7.2. Microrganismos	117
7.3. Concentração inibitória mínima (CIM)	117
7.4. Concentração fungicida mínima (CFM)	118
7.5. Ensaios para avaliação do possível modo de ação dos compostos	118
7.5.1. Ensaio do sorbitol	118
7.5.2. Ensaio do ergosterol.....	119
8.0. PARTE EXPERIMENTAL – QUÍMICA COMPUTACIONAL	119
8.1. Local de trabalho	119
8.2. Seleção de alvos para o 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	119
8.3. Docking molecular do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	120

8.4. Cálculos de dinâmica molecular e estimativa das energias livres de ligação para o 3,5-dinitrobenzoato de metila (1).....	120
8.5. Seleção de alvos para o 3,5-dinitrobenzoato de etila (2).....	122
8.6. Docking Molecular do 3,5-dinitrobenzoato de etila (2).....	122
8.7. Simulações de dinâmica molecular e estimativa das energias livres de ligação para o 3,5-dinitrobenzoato de etila (2).....	124
9.0. PARTE EXPERIMENTAL – ANÁLISE TÉRMICA.....	125
9.1. Análise térmica diferencial (DTA) do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1).....	125
9.2. Termogravimetria (TG) do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1).....	125
10.0. PARTE EXPERIMENTAL – DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO..	126
10.1. Local de trabalho	126
10.2. Preparação das nanoemulsões de óleo em água	126
10.3. Curva de calibração.....	127
10.4. Determinação do teor de 3,5-dinitrobenzoato de metila (1) na nanoemulsão.....	127
10.5. Caracterização das nanoemulsões	127
10.6. Estudo de estabilidade.....	128
11.0. PARTE EXPERIMENTAL - QUÍMICA.....	128
11.1. Preparação dos derivados (1-7)	128
11.2. Dados espectroscópicos dos ésteres 1-7	129
11.2.1. 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)	129
11.2.2. 3,5-dinitrobenzoato de etila (2)	131

11.2.3. 3,5-dinitrobenzoato de propila (3)	134
11.2.4. 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (4)	136
11.2.5. 3,5-dinitrobenzoato de butila (5)	139
11.2.6. 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6)	141
11.2.7. 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (7)	144
11.3. Preparação dos derivados 8-9	147
11.4. Dados espectroscópicos dos ésteres 8-9	148
11.4.1. 3,5-dinitrobenzoato de decila (8)	148
11.4.2. 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9)	151
11.5. Preparação dos derivados 10-12	154
11.6. Dados espectroscópicos dos ésteres 10-12	155
11.6.1. 3,5-dinitrobenzoato de benzila (10)	155
11.6.2. 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (11)	157
11.6.3. 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (12)	160
11.7. Preparação de 13 e 14	163
11.8. Dados espectroscópicos dos ésteres 13 e 14	164
11.8.1. 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (13)	164
11.8.2. 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (14)	167
11.9. Preparação dos derivados 15-21	170
11.10. Dados espectroscópicos das amidas 15-21	171
11.10.1. N-benzil-3,5-dinitrobenzamida (15)	171

11.10.2. <i>N,N</i> -dietil-3,5-dinitrobenzamida (16)	174
11.10.3. 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenilbenzamida (17)	176
11.10.4. <i>N</i> -(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (18)	179
11.10.5. <i>N</i> -(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (19)	182
11.10.6. <i>N</i> -ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (20)	187
11.10.7. <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21).....	189
REFERÊNCIAS	193
ANEXOS	208
Anexo 1 - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa pelo Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS)	208

1.0. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por fungos passaram a ter uma grande importância nos últimos anos devido ao seu aumento progressivo e pelas altas taxas de morbidade e mortalidade. Muitas destas infecções são adquiridas por via endógena e outras por via exógena, sendo a última, proveniente de mãos de profissionais de saúde, instrumentos e biomateriais. Dentre essas infecções, a ocasionada pela levedura do gênero *Candida* é a mais frequente e se apresenta como várias manifestações, conforme o local afetado, podendo ser superficiais ou invasivas estas, associadas à imunossupressão (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; ABRANTES et al., 2013).

O tratamento da candidíase é realizado por diferentes classes de fármacos incluindo, equinocandinas, azóis, polienos e 5-flucitosina (5-FC) que podem agir como fungistáticos ou fungicidas (GARCIA et al., 2019; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Entretanto, o crescente número de casos de candidíase, a toxicidade relacionada a esses fármacos e o aumento do número de infecções desenvolvidas por cepas resistentes ampliou a busca por novos agentes antifúngicos (ARAUJO et al., 2020a; DAELE et al., 2019).

O ácido benzoico e seus derivados substituídos são muito importantes para a medicina e para as indústrias química e farmacêutica. Dentre eles, o ácido 3,5-dinitrobenzoico é um importante intermediário para a indústria farmacêutica que apresenta grupos retiradores de elétrons como o nitro. O grupamento nitro se faz presente na estrutura de várias substâncias bioativas e contribui em diversas atividades farmacológicas (KARABACAK et al., 2012; DHIVYA; VANDARKUZHALI; RADHA, 2019; PARRY; NISHINO; SPAIN, 2011; FRIES et al., 2011).

Estudos anteriores realizados por Nascimento (2017) e Ferreira (2018) no Laboratório de Química Farmacêutica da UFPB demonstraram, que alguns nitrocompostos derivados do ácido *o*-nitrocinâmico e do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico apresentam atividade antifúngica contra cepas do gênero *Candida*.

Além disso, a nanotecnologia também tem se tornado uma importante ferramenta no tratamento dessas infecções, explorando de modo mais eficiente às propriedades farmacológicas de produtos naturais e de novas moléculas (ARAUJO et al., 2020a). Dentre os nanossistemas, as nanoemulsões oferecem importantes

vantagens como taxa de absorção controlada, melhor estabilidade do fármaco e eficácia aprimorada (PANDEY et al., 2020).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi preparar uma série de ésteres e amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico, avaliar sua atividade antifúngica frente às cepas de *Candida*, realizar estudos *in silico* e preparar e caracterizar uma nanoemulsão com atividade antifúngica.

2.0. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O gênero *Candida* e a candidíase

Os fungos são microrganismos oportunistas eucarióticos, heterotróficos que possuem parede celular. Esses organismos podem ter morfologia diferente segundo as condições nutricionais e a temperatura e estão presentes no solo, na água, nos vegetais, no ar e nos animais. A grande maioria não causa patogenicidade, entretanto, algumas espécies podem ocasionar infecções em humanos que pode ser superficial ou invasiva conforme os tecidos e órgãos afetados (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; SUN; HOY; HEITMAN, 2020).

O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas em hospitais. Este fungo diploide que regularmente coloniza a flora normal do ser humano pode ocasionar infecções oportunistas cuja incidência, cresceu nos últimos anos devido ao uso exacerbado de antimicrobianos de amplo espectro e o aumento de pacientes imunocomprometidos (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013; MBA; NWEZE, 2020; NEPPELENBROEK et al., 2014).

Das 200 espécies de *Candida* que foram descritas até o presente momento, apenas 15 foram isolados de infecções em humanos e a grande maioria dessas infecções é provocada por cinco espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; NEPPELENBROEK et al., 2014). Dentre essas espécies, *Candida albicans* é a mais predominante e uma das principais causas de candidíase e candidemia (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; NEVES et al., 2020; SPIVAK; HANSON, 2018).

A candidíase é uma das infecções fúngicas mais prevalentes e apresenta uma ampla variedade de manifestações, desde infecções superficiais como a candidíase oral e vaginal, a tipos invasivos com altas taxas de mortalidade e morbidade como a candidemia (NISHIMOTO; SHARMA; ROGERS, 2020; MBA; NWEZE, 2020; DUBEY; SINGLA, 2019).

A candidíase superficial é a forma mais frequente de infecção por *Candida* e atua afetando principalmente a pele, mucosas, cabelo e unhas acometendo pacientes com irrelevantes alterações fisiológicas (JAYATILAKE, 2011; NAKAMURA et al., 2013). Em contraste, a candidíase sistêmica ocorre quando há disseminação

hematogênica do microrganismo atingindo especialmente pacientes imunocomprometidos.

Esse tipo de infecção pode causar meningoencefalite, abscessos cerebrais, endoftalmite, endocardite, peritonite, osteomielite, abscessos intra-abdominais e infecções pulmonares resultando, em uma alta mortalidade (PUEL, 2020; NAKAMURA et al., 2013).

A patogenicidade desses fungos está associada a diversos fatores de virulência (SARDI et al., 2013). Um considerável fator de virulência de *C. albicans* é sua capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas ou bióticas (SARDI et al., 2013; MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Os biofilmes são estruturas complexas compostas por uma comunidade de células microbianas ligadas ao tecido do hospedeiro ou superfícies abióticas embutidas em uma substância polissacarídica extracelular, que fornece proteção aos microrganismos, e consequentemente, maior resistência aos agentes antimicrobianos (PEREIRA et al., 2021; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

2.2. Tratamento e resistência

Os tratamentos disponíveis para infecções fúngicas sistêmicas e micoses superficiais são realizados principalmente por azóis, alilaminas, polienos e equinocandinas. Entretanto, essas classes de fármacos apresentam uma série de desvantagens em relação à toxicidade, segurança e propriedades farmacocinéticas (CAMPOY; ADRIO, 2017; GARCIA et al., 2019; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Essas diferentes classes de fármacos podem agir como: fungistáticos ou fungicidas (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Os fungistáticos atuam inibindo o crescimento celular e os fungicidas atuam por meio da morte celular (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2019).

Os polienos são fungicidas e têm como alvo o ergosterol na membrana plasmática. Os principais representantes dessa classe são a anfotericina B e a nistatina. A nistatina é utilizada no tratamento de candidíase cutânea, vaginal e esofágica enquanto, a anfotericina B é utilizada em casos de infecções sistêmicas (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; CAMPOY; ADRIO, 2017).

A classe das alilaminas age bloqueando a biossíntese de ergosterol através, da inibição reversível da esqualeno epoxidase. A inibição desta enzima resulta em um acúmulo de esqualeno ocasionando ruptura da organização celular (CAMPOY; ADRIO, 2017; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

As equinocandinas são lipopeptídeos que atuam inibindo a β -1,3-glucano sintase, uma enzima envolvida na biossíntese da parede celular. Esses fármacos são extremamente ativos contra a maioria das espécies de *Candida* e são os antifúngicos de escolha para o tratamento de infecções invasivas (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; HÜTTEL, 2021).

Os azóis são fungistáticos que atua bloqueando a síntese de ergosterol ao inibir a enzima lanosterol 14 α -desmetilase. Esses fármacos são muito utilizados no tratamento de micoses e estão disponíveis em formulações orais, tópicas e intravenosas (DAELE et al., 2019; CAMPOY; ADRIO, 2017).

O uso frequente desses fármacos para tratar diversos tipos de candidíase resultou na seleção de cepas resistentes. A resistência fúngica aos antimicrobianos representa uma ameaça à saúde pública, pois, o desenvolvimento de novos antimicrobianos não consegue acompanhar o acelerado surgimento de resistência, além disso, as infecções resistentes costumam levar a internações hospitalares mais longas, invalidez e até morte (MONROY-PÉREZ et al., 2020; HILL; O'MEARA; COWEN, 2015; ALNUFAIE et al., 2020).

As cepas desenvolvem três principais mecanismos de resistência. O primeiro é baseado na diminuição a concentração efetiva do fármaco, o segundo é a alteração do alvo do fármaco e o terceiro são modificações no metabolismo para desviar os efeitos tóxicos exercidos por alguns fármacos (CAMPOY; ADRIO, 2017).

A resistência aos polienos ainda é rara em comparação com a resistência a outros fármacos antifúngicos, ocorrendo através de alterações nas enzimas que reduzem a afinidade de ligação ao fármaco ou reduzem a concentração o ergosterol da membrana. Em *C. albicans* a redução da sensibilidade à anfotericina B acontece mediante mutações em várias enzimas da biossíntese de ergosterol como *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, e *ERG11* (CAROLUS et al., 2020; LEE et al., 2020; SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014)

A resistência as equinocandinas ocorre por meio de mutações nos genes FKS, que codificam o principal alvo desses fármacos a β -1,3-glucano sintase. As mutações

que conferem resistência a *C. albicans* e *C. auris* ocorrem no gene FKS1 e para *C. glabrata* nos genes FKS1 e FKS2 (LEE et al., 2020; MORACE; PERDONI, BORGHI, 2014; SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Os azóis apresentam uma elevada propensão para o desenvolvimento de resistência através de diversos mecanismos. Contudo, seu principal mecanismo está relacionado com a regulação positiva das bombas de efluxo da membrana plasmática (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014; LEE et al., 2020)

Dessa forma, os antimicrobianos convencionais estão se tornando cada vez mais ineficazes no combate das infecções resultando, em uma grande necessidade de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para ampliar o espectro de ação contra esses microrganismos (LEE et al., 2020; ALVES et al., 2021).

2.3. Derivados benzoicos com potencial antimicrobiano

O ácido benzoico é um ácido monocarboxílico aromático amplamente encontrado na natureza na forma de ácido livre, éster ou derivado (GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ et al., 2020; LI et al., 2021). O ácido benzoico e seus derivados são compostos biologicamente importantes utilizados como agentes antibacterianos e conservantes antifúngicos em alimentos, cosméticos, produtos de higiene e medicamentos em formulações de uso oral, parenteral e tópico (YE et al., 2020; HOLLINGSWORTH; SEYBOLD; HADAD, 2002; OLMO; CALZADA; NUÑEZ, 2018; KALAYCI et al., 2021).

Dando maior ênfase ao potencial antimicrobiano dos derivados benzoicos, alguns estudos são encontrados na literatura. No estudo realizado por Amin; Cuca; González-Coloma, 2019 foram isolados e identificados três derivados do ácido benzoico de *Piper cumanense*. A atividade antifúngica desses compostos foi avaliada contra seis fungos fitopatogênicos (*Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *F. solani*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*) e todos os compostos foram ativos apresentando, uma maior atividade contra os fungos do gênero *Fusarium*.

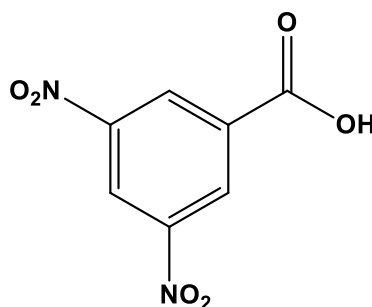
Li et al., 2021 sintetizaram uma série de moléculas híbridas através da conjugação de amoxicilina e derivados do ácido benzoico. Esses híbridos foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e todos os compostos sintetizados apresentaram uma boa atividade

contra bactérias, com destaque para o ácido amoxicilina-*p*-nitrobenzoico que apresentou uma melhor atividade contra *S. aureus* resistente à metilicina do que o fármaco de referência.

2.4. O ácido 3,5-dinitrobenzoico e seus derivados

O ácido 3,5-dinitrobenzoico (Figura 1) é um ácido forte que contém um grupo carboxila doador de elétrons e grupos nitro que aceitam elétrons (BALACHANDAR; THANGAMANI, 2020). Esse ácido representa um importante intermediário na indústria farmacêutica utilizado na síntese de vários fármacos (LI; DU; ZHAO, 2017).

Figura 1: Ácido 3,5-dinitrobenzoico



Fonte: Elaborado pelo autor

A porção nitro (NO₂) representa um importante farmacóforo de moléculas com atividade antimicrobiana. Além disso, diversas atividades farmacológicas foram atribuídas à presença desse grupo como atividade antifúngica, antitumoral e antiparasitária (ANDRADE et al., 2020; PARRY; NISHINO; SPAIN, 2011; FRIES, 2011).

O -NO₂ tem forte caráter aceptor de elétrons (espécie elétron-retiradora) e possui uma capacidade redutora que, no interior das células de parasitas, bactérias e fungos, resulta na formação de radicais livres que interagem com as biomoléculas essenciais à sobrevivência do microrganismo, causando danos por estresse oxidativo (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009; OLEA et al., 2019).

Olea et al. (2019) revelaram que a inserção de um grupo nitro no anel aromático de derivados do eugenol contribuiu significativamente para a atividade antifúngica desses compostos. Os trabalhos desenvolvidos por Nascimento (2017) e Rodrigues

(2018) demonstraram que a presença do grupo nitro em derivados do ácido o-nitrocínâmico e do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico está diretamente relacionada ao aumento da atividade antifúngica desses compostos contra cepas do gênero *Candida*.

2.5. Considerações sobre os ésteres

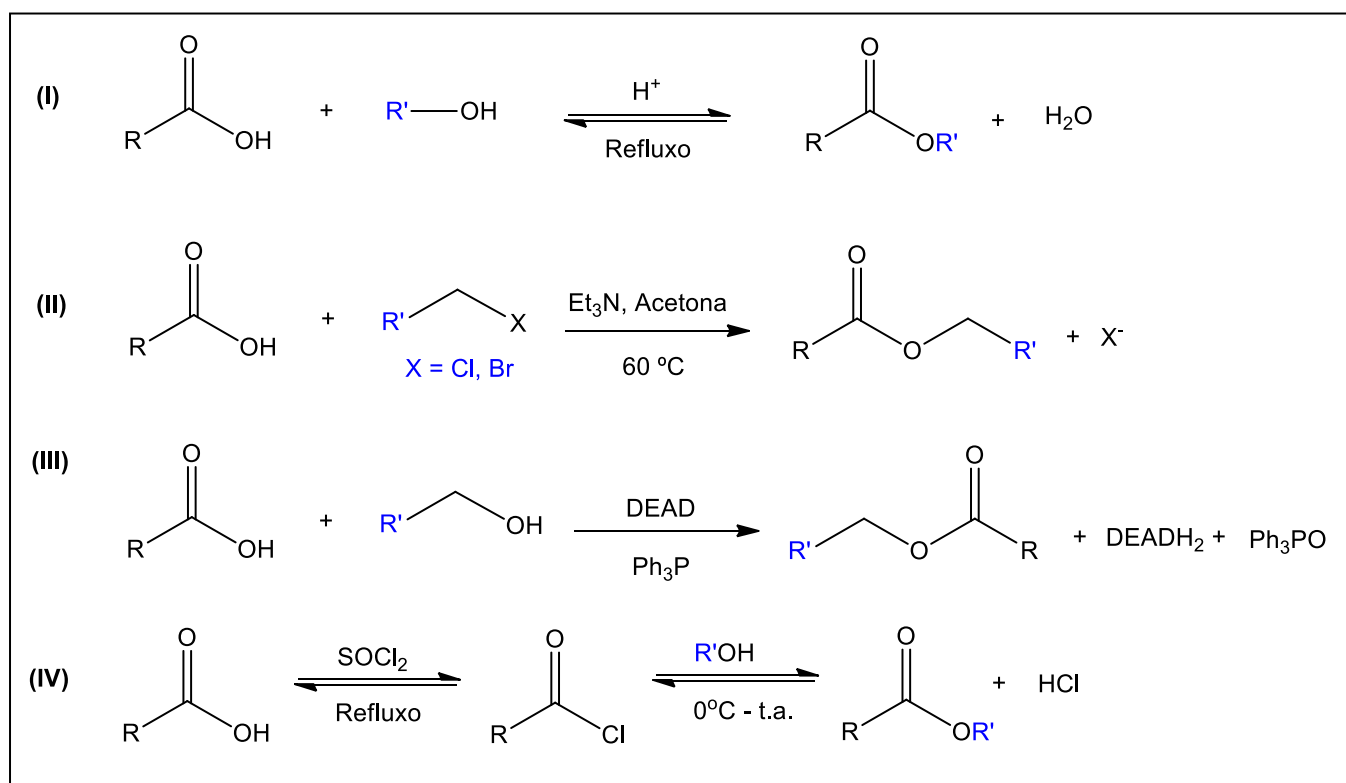
2.5.1. Propriedades gerais dos ésteres

Essa classe química é versátil e amplamente utilizada no setor industrial na fabricação de polímeros, cosméticos e pela indústria alimentícia como flavorizante de alimentos e bebidas (RAGHUNANAN; NARINE, 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Os ésteres também apresentam diversas aplicações na indústria farmacêutica desde o revestimento de cápsulas a preparação de princípios ativos, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico cuja preparação, envolve a reação de esterificação do ácido salicílico (OLIVEIRA et al., 2014).

Os ésteres podem ser obtidos por síntese química ou extraídos de produtos naturais (SKORONSKI et al., 2010). A obtenção por meio da síntese orgânica ocorre, por exemplo, através da reação de álcoois com ácidos, cloretos de ácido ou anidridos na presença de um catalisador. A reação mais utilizada para se obter um éster é a reação reversível entre um ácido carboxílico e um álcool conhecida como a esterificação de Fischer (OLIVEIRA et al., 2014; CALVALCANTE et al., 2015; SKORONSKI et al., 2010).

2.5.2. Reações para obtenção dos ésteres

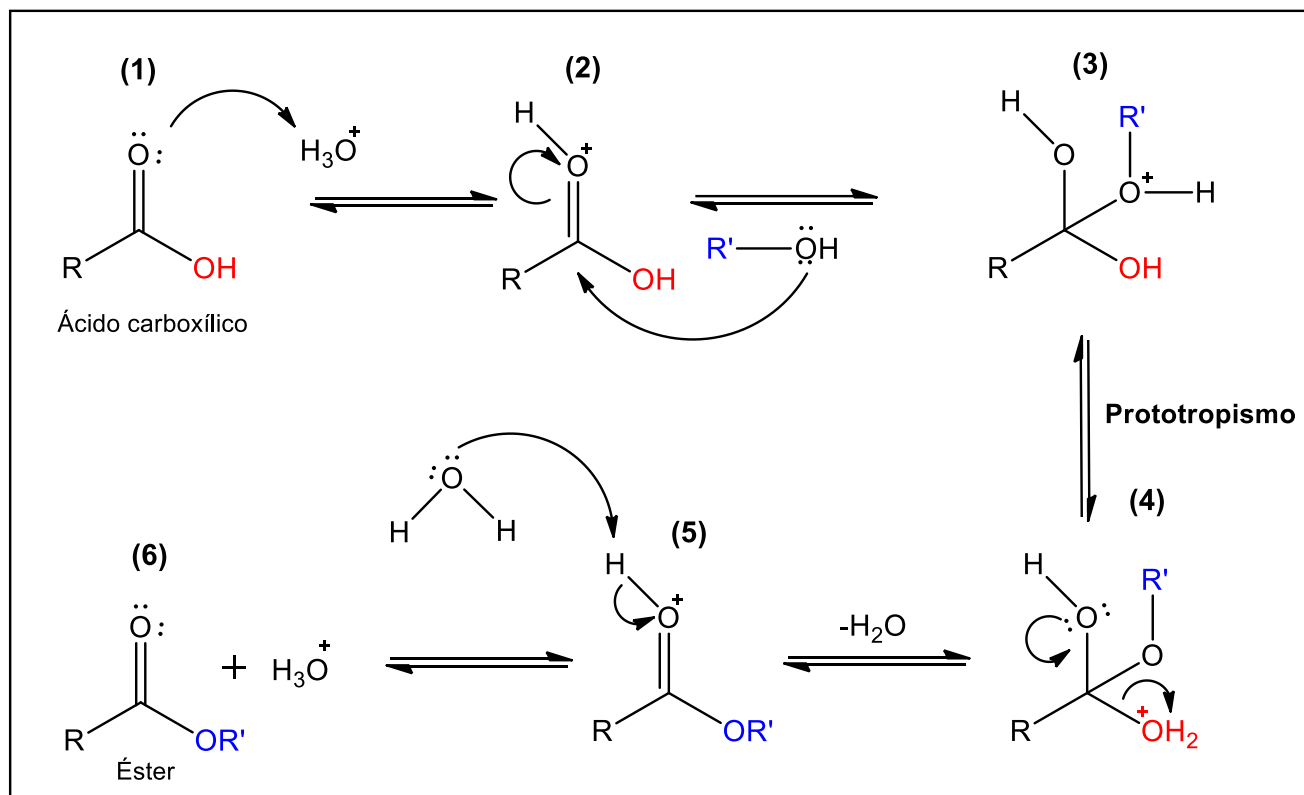
Conforme inferido, a importância econômica dos ésteres em diversos setores industriais induz o desenvolvimento de diversas metodologias de esterificação. No esquema 1 estão representadas algumas das principais reações de esterificação utilizadas no presente estudo.



Esquema 1: Reações utilizadas na obtenção dos ésteres: (I) Esterificação de Fischer; (II) Esterificação com haletos; (III) Reação de Mitsunobu; (IV) Reação com cloreto ácido. Fonte: Adaptado de CALVALCANTE et al., 2015; MUSKAWAR et al., 2014; BUT; LU; TOY et al., 2010; JI et al., 2013

A primeira reação trata-se de uma esterificação de Fischer (I), um dos principais métodos para síntese de ésteres no âmbito industrial (CALVALCANTE et al., 2015). Essa reação ocorre através do aquecimento de um ácido carboxílico e um álcool, sob presença de um catalisador ácido (CALVALCANTE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014).

Por se tratar de uma reação reversível, é preciso deslocar o equilíbrio químico para formação dos produtos, adicionando um excesso de álcool ou removendo a água. Além disso, é necessário cautela durante todo o processo reacional, de purificação e de armazenamento (CALVALCANTE et al., 2015). O mecanismo de reação proposto está descrito no esquema 2.



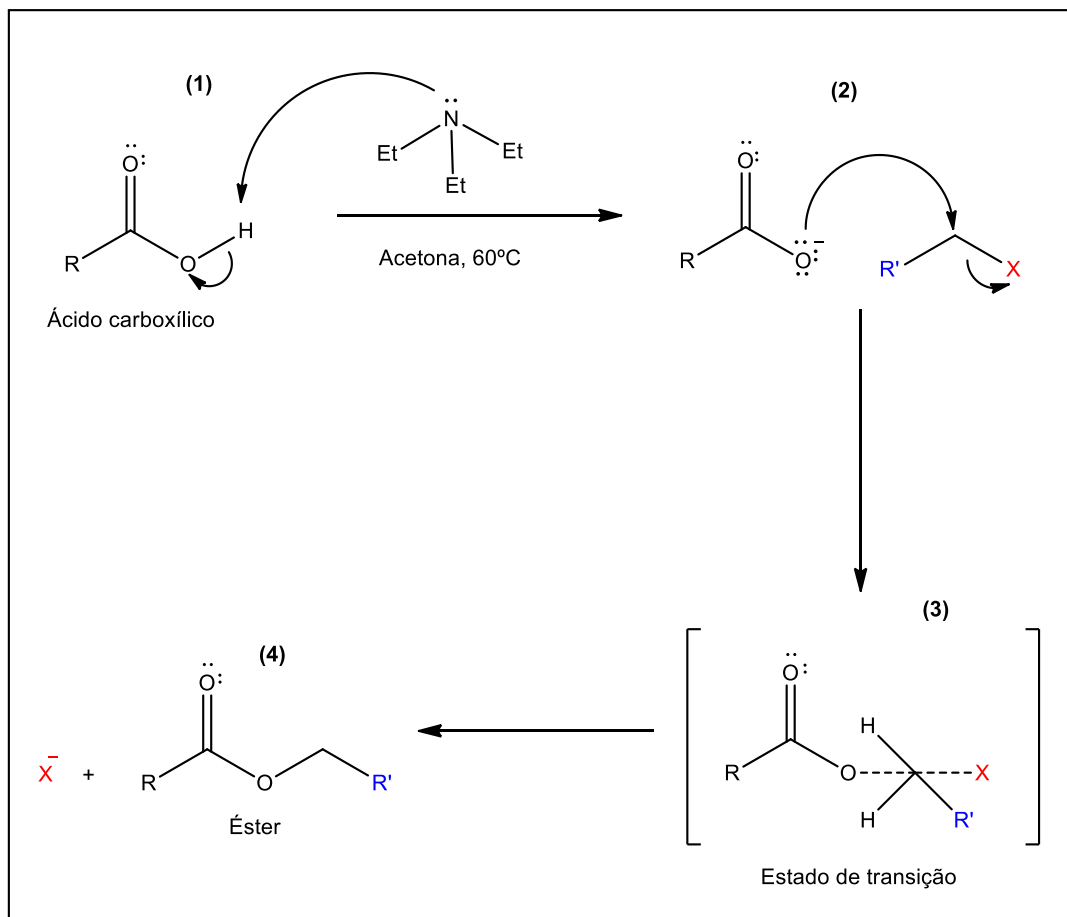
Esquema 2: Mecanismo de esterificação de Fischer

Fonte: Adaptado de CALVALCANTE et al., 2015.

A esterificação de Fischer é uma reação de substituição nucleofílica. Conforme pode ser observado no esquema 2, primeiramente, o catalisador ácido protona o oxigênio carbonílico (1) tornando o ácido carboxílico muito mais reativo ao ataque nucleofílico do álcool. Posteriormente, o álcool ataca o grupo carbonila protonado (2) originando, um intermediário tetraédrico (3). Em (4), ocorre a transferência de um próton de um oxigênio para outro, gerando a molécula de água, um bom grupo abandonador. A perda de uma molécula de água reestabelece a carbonila e resulta na formação de um éster protonado (5). Por fim, a transferência de um próton para uma base leva a formação do éster (6) e regeneração do catalisador ácido (CALVALCANTE et al., 2015; SOLOMONS; FRYLE; SNYDER, 2018 p. 207-208).

Na segunda reação (II), o ácido carboxílico reage com haletos de alquila e arila, através de uma substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$). Por se tratar de uma reação de segunda ordem, a velocidade da reação depende da concentração do nucleófilo e do substrato. Esse tipo de reação ocorre preferencialmente em carbonos primários que possuem um menor impedimento estérico, além disso, o uso de um solvente aprótico é ideal para se evitar a solvatação do nucleófilo. O mecanismo de

reação está representado no esquema **3** (BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014).



Esquema 3: Mecanismo de Esterificação com Haletos de Alquila e Arila.

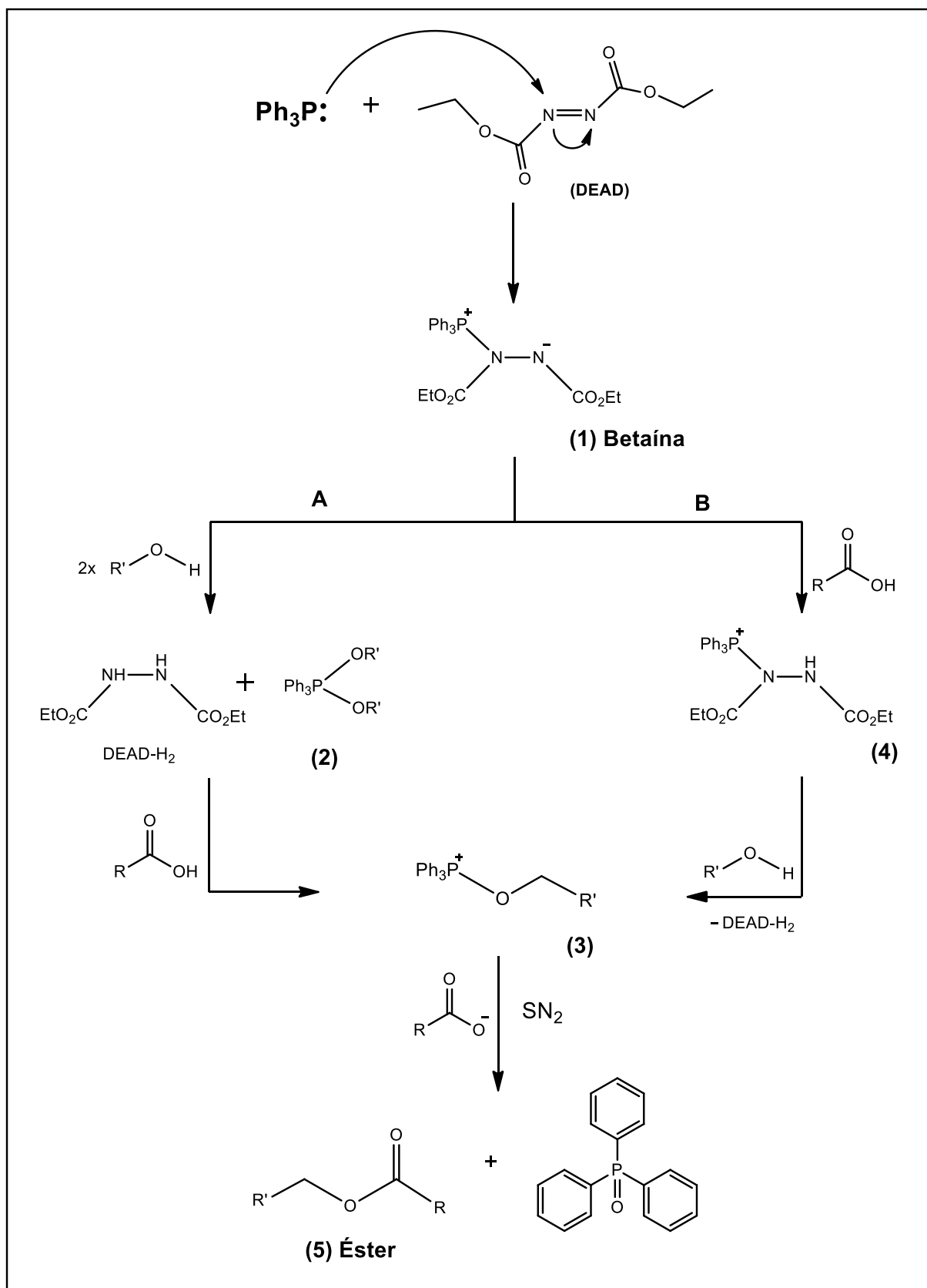
Fonte: Adaptado de BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014.

De acordo com o esquema 3, primeiramente, a trietilamina promove a desprotonação do ácido carboxílico **1**, formando o sal do ácido, um forte nucleófilo. Subsequentemente, um par de elétrons do oxigênio ataca o carbono do haleto **2** pelo lado oposto ao grupo abandonador X , resultando na formação do estado de transição **3** em que a entrada do nucleófilo e saída do grupo abandonador ocorrem de forma simultânea, originando o éster **4** (BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014).

Os ésteres também podem ser preparados pela reação de Mitsunobu (**III**) uma metodologia versátil e amplamente utilizada. Esse método propicia o acoplamento desidratante de um pró-nucleofílico (ácido) com um álcool, mediado pela combinação de um reagente redutor de fosfina, a exemplo da trifenilfosfina (Ph_3P), e um reagente

oxidante do tipo azo, usualmente o azodicarboxilato de dietila (DEAD) (BUT; LU; TOY, 2010). O mecanismo proposto para essa reação está representado no esquema 4.

Segundo o esquema 4, inicialmente, um par de elétrons presente no fósforo da trifenilfosfina forma uma ligação com o DEAD gerando o intermediário **1**, a betaína de Morrison–Brunn–Huisgen. A betaína (**1**) pode seguir duas vias distintas, **A** e **B**. Na via **A**, o intermediário (**1**) reage com duas moléculas de álcoois produzindo DEADH₂ e um intermediário **2** que, reage com o ácido formando o derivado **3**. Na via **B**, o intermediário (**1**) promove a desprotonação do ácido carboxílico, formando o intermediário **4**, que depois reage com um equivalente álcool originando o derivado **3** e eliminação do DEAD-H₂. Em conclusão, o derivado **3** reage com o carboxilato via reação de substituição nucleofílica S_N2, originando o éster **5** e (BUT; LU; TOY, 2010).

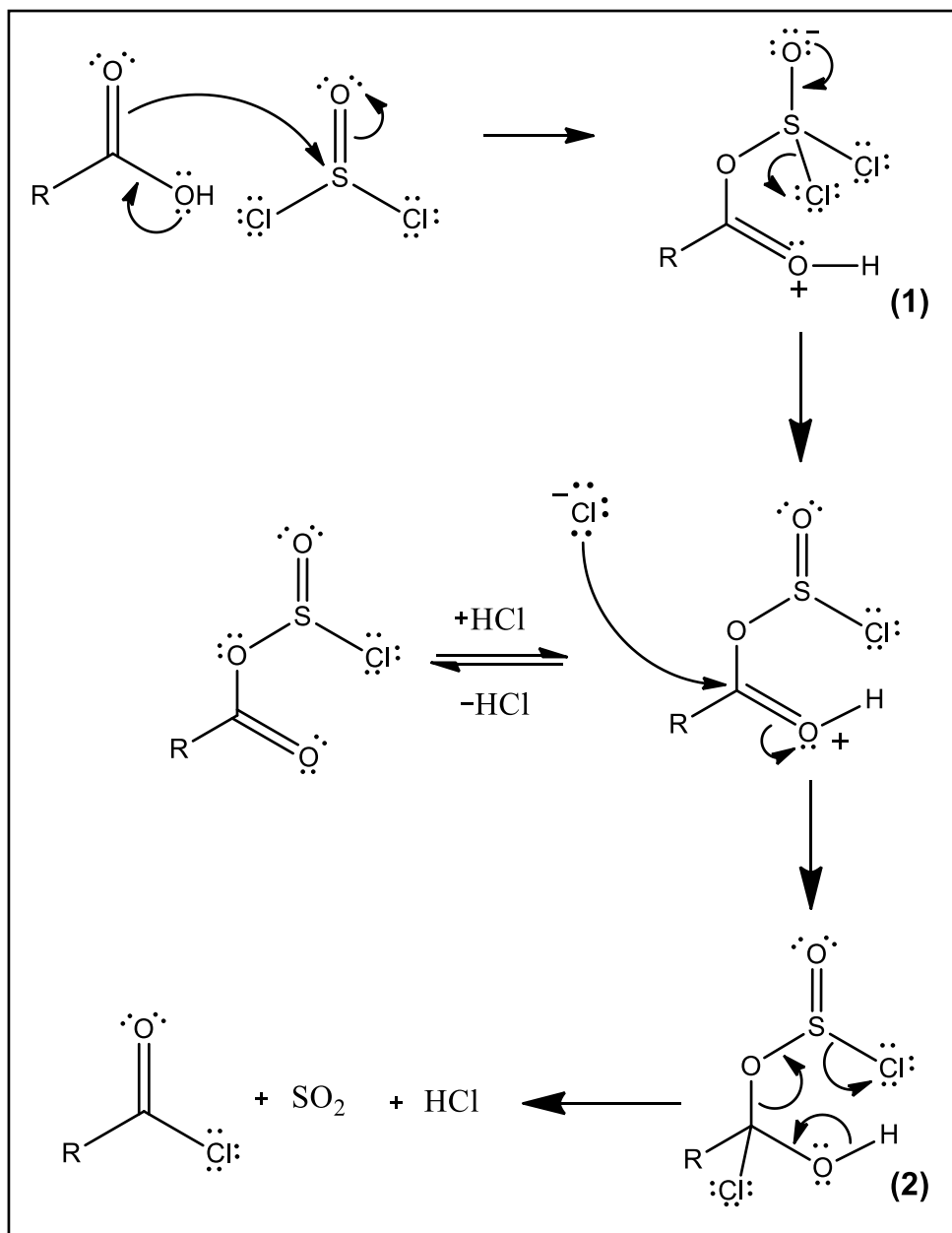


Esquema 4: Mecanismo de reação de Mitsunobu para síntese de ésteres.

Fonte: Adaptado de BUT; LU; TOY et al., 2010.

Os ésteres também podem ser obtidos em duas etapas: a formação de cloreto de acila e a esterificação por meio da reação de Schotten-Baumann. A reação de Schotten-Baumann foi descrita pela primeira vez em 1833, pelos químicos Carl Schotten e Eugen Baumann para a síntese de ésteres e amidas (POTADAR et al., 2018; SILVA; JUNIOR; BATALINI, 2021).

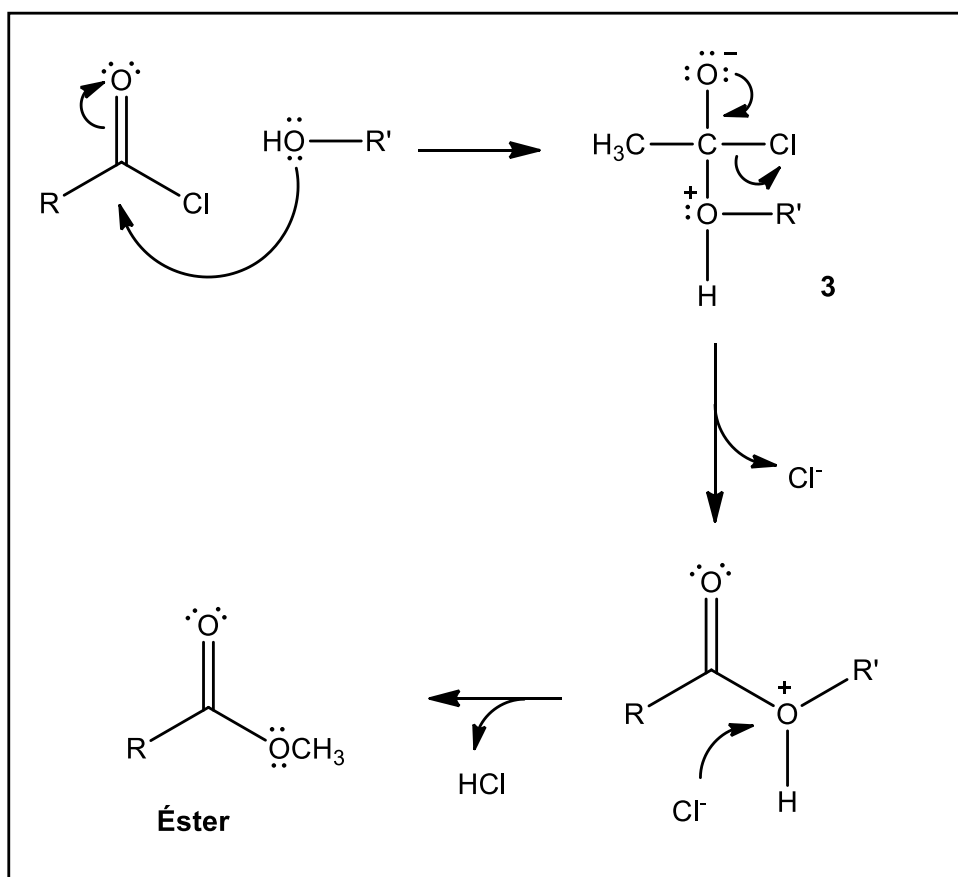
Para a formação do cloreto de acila, primeiramente, o ácido carboxílico reage com o cloreto de tionila, resultando na formação do intermediário **1** que desloca o íon cloreto. O íon cloreto ataca o carbono do ácido carboxílico formando o intermediário **2**, que libera dióxido de enxofre, ácido clorídrico e cloreto de acila. Esse mecanismo reacional está detalhado no (Esquema 5) (SOLLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018, p. 204).



Esquema 5: Mecanismo de Formação do Cloreto Ácido

Fonte: Adaptado de SOLLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018, p. 205.

Após a formação do cloreto de acila, este produto é utilizado na reação de Schotten-Baumann, no qual há a reação do cloreto ácido e álcool para a formação de ésteres (REZENDE et al., 2021). Nesse tipo de reação, ocorre o ataque nucleofílico do álcool ao cloreto ácido, formando o intermediário tetraédrico **3**. Na última etapa ocorre a saída do íon cloreto e desprotonação resultando na formação do éster **4**, esquema 6 (SCHOTTEN-BAUMANN, 1886).



Esquema 6: Mecanismo de esterificação via reação de Schotten-Baumann.

Fonte: Adaptado de Bruice, 2006, p.98.

2.6. Considerações sobre as amidas

O grupamento amida ($-\text{CO}-\text{NH}-$) tem destacada importância na síntese orgânica e indústria devido à vasta presença de amidas em produtos farmacêuticos. Esta classe química está presente em diversas classes de fármacos como os hipnóticos, anticonvulsivantes, relaxantes musculares e antivirais (BARAK; BATRA, 2021; PATTABIRAMAN; BODE, 2011; WINN et al., 2020; ALCÂNTARA; BARROSO; PILÓ-VELOSO, 2002).

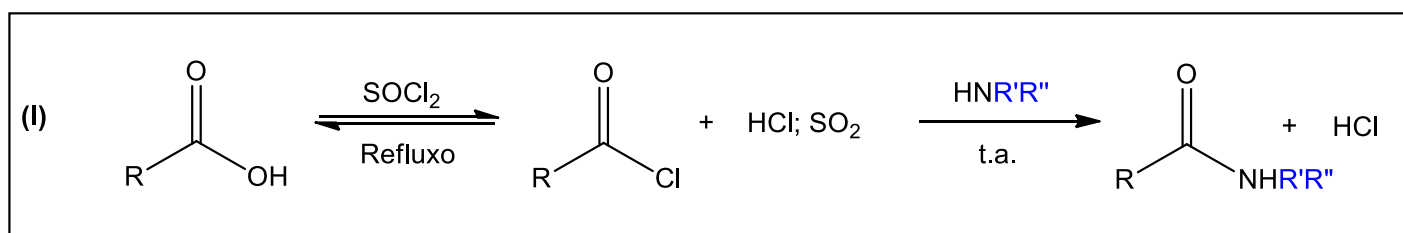
Além disso, as amidas apresentam propriedades favoráveis como alta polaridade, estabilidade, diversidade conformacional e várias atividades farmacológicas como antifúngicas, antiprotozoárias e anti-inflamatórias (SATHE et al., 2018; PATTABIRAMAN; BODE, 2011).

Com relação à atividade antifúngica, alguns estudos já mostraram a bioatividade de amidas derivadas do ácido benzoico contra diferentes espécies

pertencentes ao gênero *Candida*. Em estudos realizados por Oliveira et al., 2019 e Perez-Castillo et al., 2021, amidas derivadas do ácido benzoico apresentaram atividade antifúngica contra ao menos uma cepa de *Candida*.

2.6.1. Reações para obtenção das amidas

Tendo em vista a relevância das amidas para a indústria farmacêutica, no esquema 7 está representada a reação de amidificação realizada no presente estudo.

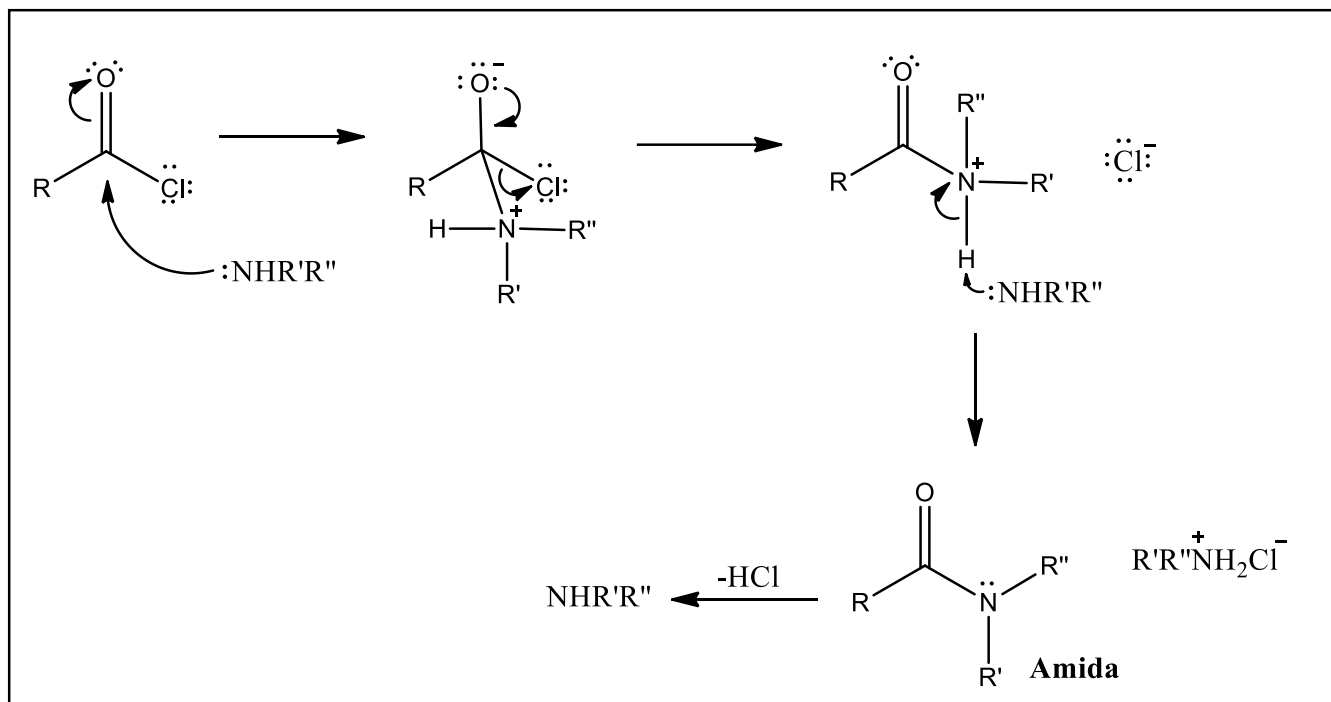


Esquema 7: Reação utilizada na obtenção das amidas.

Fonte: Adaptado de SOLLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018, p. 213.

As amidas foram obtidas através da união de duas metodologias a amidificação de Schotten-Baumann e o método descrito por JI et al., 2013. A reação de Schotten-Baumann envolve o uso de um cloreto de ácido que atua como um eletrófilo e reage com uma amina formando uma amida (POTADAR et al., 2018).

A princípio, ocorre à formação do cloreto ácido conforme descrito anteriormente, esquema 5. Na reação seguinte há o ataque nucleofílico do nitrogênio da amina a carbonila do cloreto de acila resultando, na saída do íon cloreto. Por último, ocorre a formação da amida e liberação de ácido clorídrico. Como recurso, utiliza-se uma base para neutralizar o meio ácido, promover a não protonação da amina (aminas protonadas não podem reagir com o cloreto ácido) e deslocar o equilíbrio para formação da amida. No esquema 8, está representado o mecanismo da reação.



Esquema 8: Mecanismo de amidação com cloreto ácido.

Fonte: Adaptado de SOLLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018, p. 213.

2.7. Nanoemulsões

A nanotecnologia pode ser utilizada em uma grande variedade de produtos, incluindo medicamentos, alimentos e cosméticos (CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2020). Atualmente, diversos sistemas como nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões são alvos de estudos sobre novas formas de carrear fármacos para locais específicos (SAGAVE et al., 2015).

As nanoemulsões são dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis com o auxílio de uma mistura de surfactante ou co-surfactante, com diâmetro médio entre 20 e 200 nm. O pequeno tamanho das gotas e sua habilidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos as tornam eficazes sistemas de entrega de bioativos (PÁEZ-HERNÁNDEZ; MONDRAGÓN-CORTEZ; ESPINOSA-ANDREWS, 2019; KHANI et al., 2019; SHAKER et al., 2019).

Na entrega de medicamentos tópicos, as nanoemulsões oferecem importantes vantagens em termos de aumento da permeação para fármacos lipofílicos e compatibilidade com a pele (KLANG et al., 2010). Além disso, esses nanosistemas apresentam outras vantagens como melhor estabilidade do fármaco, eficácia aprimorada, aumento da biodisponibilidade, taxa de absorção controlada e

redução de efeitos adversos (PANDEY et al., 2020; NIMARLA et al., 2020; WILSON et al., 2021).

As nanoemulsões são produzidas usando métodos de baixa energia e de alta energia. Entretanto, geralmente são formuladas utilizando métodos de alta energia, como homogeneização de alta pressão, ultrassom e microfluidização (PÁEZ-HERNÁNDEZ; MONDRAGÓN-CORTEZ; ESPINOSA-ANDREWS, 2019; DANTAS et al., 2021; HERRERA-RODRÍGUEZ et al., 2019). Dentre essas abordagens, o ultrassom é o método mais atraente que atua produzindo ondas interfaciais instáveis e rompendo as gotículas primárias em gotículas de tamanho nanométrico (BRUXEL et al., 2012; NIMARLA et al., 2020; KOTTA et al., 2021).

Esses nanosistemas são termodinamicamente instáveis e tendem à separação de fases ao longo do tempo. Nesse contexto, o potencial zeta representa uma importante ferramenta para compreender a estabilidade das formulações e verificar os resultados do tamanho da gota (BRUXEL 2012; WILSON et al., 2021; KUMAR;VERMA;MANDAL, 2021).

Além disso, o índice de polidispersidade (PDI) também representa uma medida considerável da homogeneidade e estabilidade de uma nanoemulsão. Um pequeno valor de PDI indica homogeneidade e uma distribuição estreita do sistema formulado (MOHD NARAWI et al., 2020).

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Preparar e avaliar a atividade antifúngica de uma coleção de derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico, estruturalmente relacionados, estabelecer uma relação estrutura-atividade e desenvolver uma nanoemulsão.

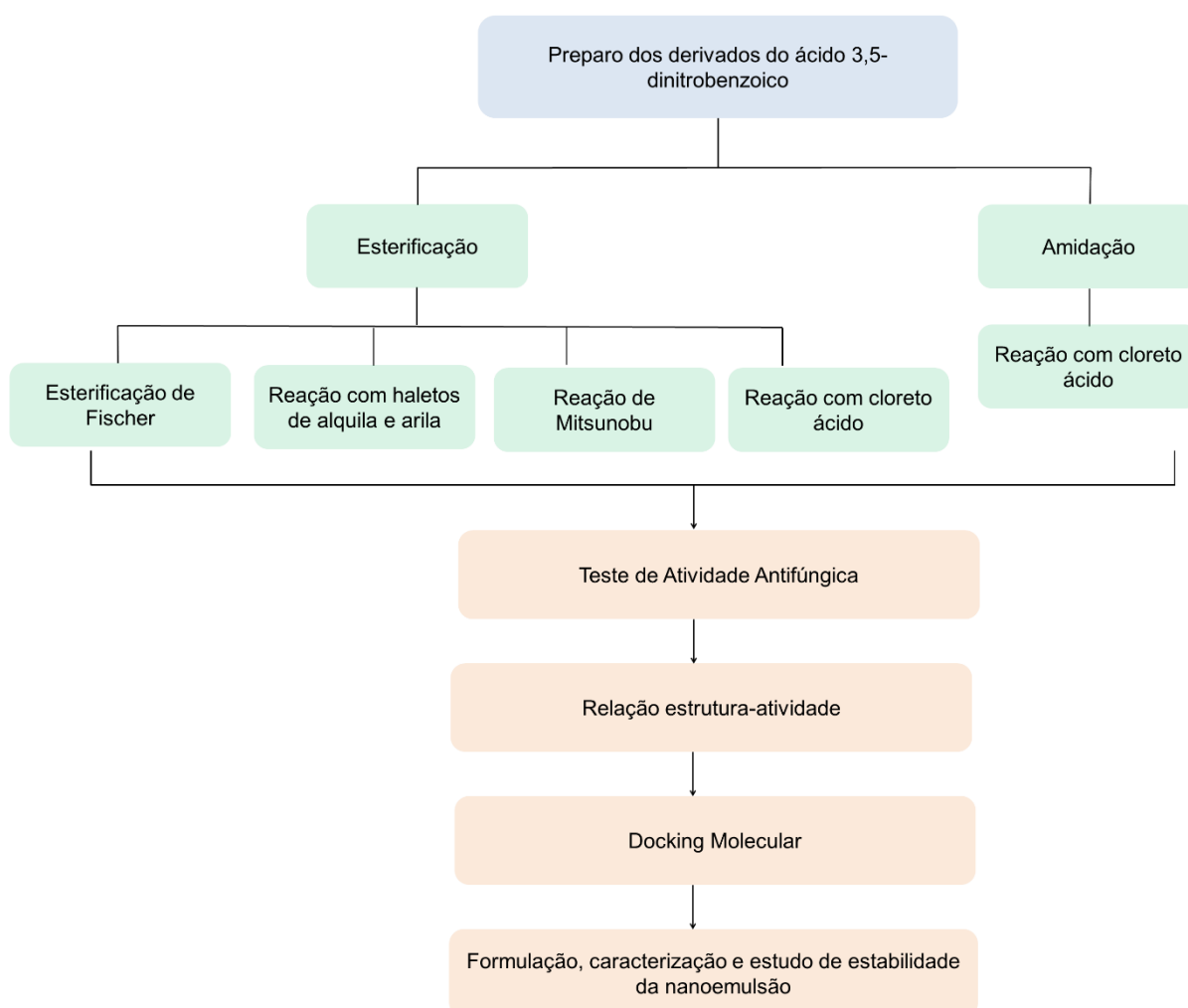
3.2. Objetivos específicos

- Preparar os derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico utilizando reações de esterificação e amidação;
- Avaliar a atividade antifúngica dos derivados frente a várias espécies de *Candida*;
- Realizar estudos computacionais (*in silico*) para analisar a interação dos ligantes (derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico) com receptores (alvos biológicos) relacionados a doenças causadas por várias espécies de *Candida*;
- Preparação de uma nanoemulsão a partir do derivado com melhor perfil antifúngico;
- Realizar os estudos de caracterização e estabilidade da nanoemulsão utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- Realizar o teste de atividade antifúngica da nanoemulsão.

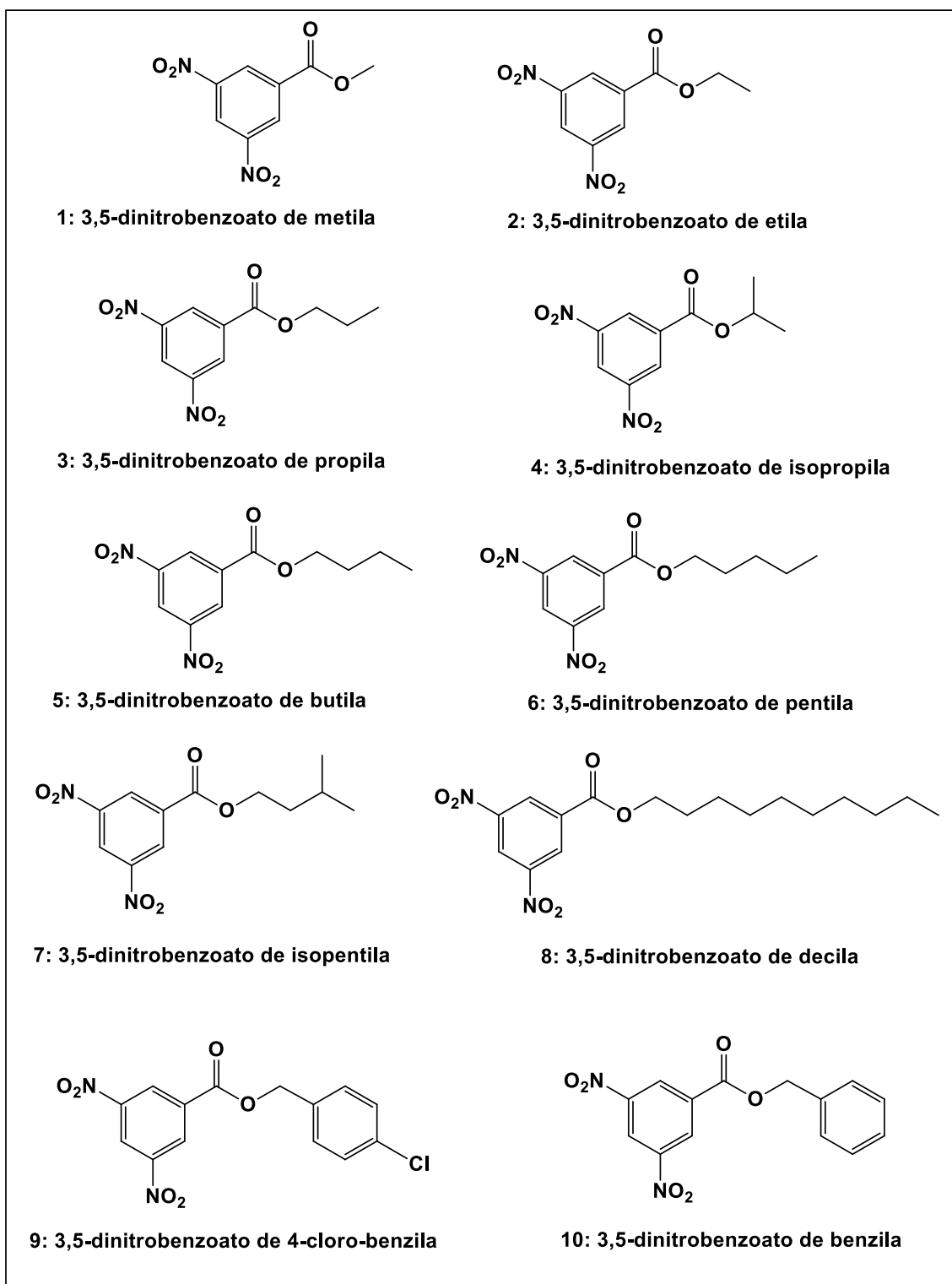
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Planejamento do estudo

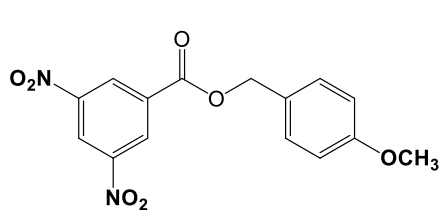
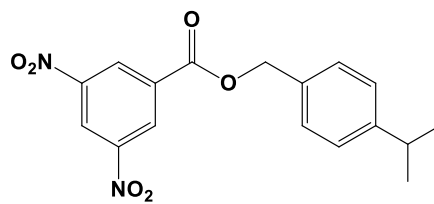
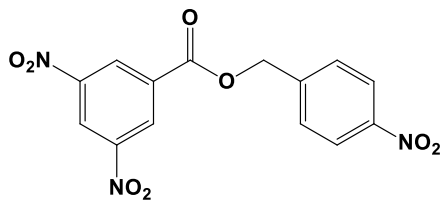
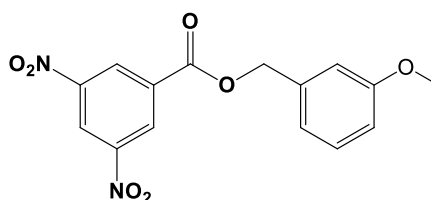
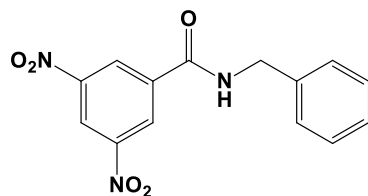
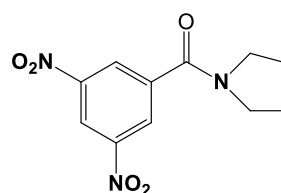
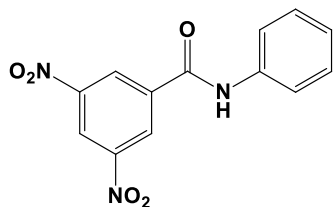
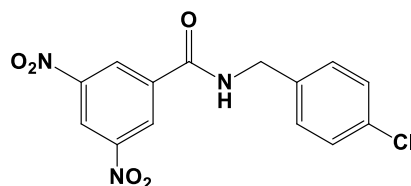
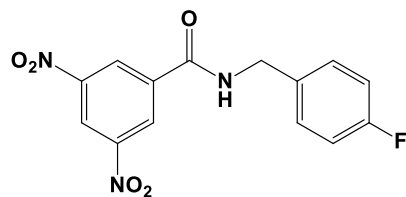
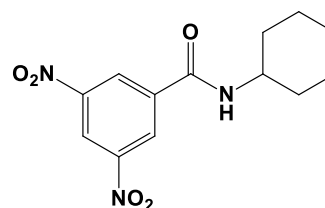
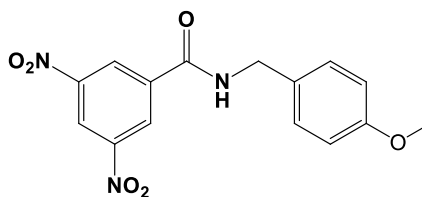
Neste estudo, foram preparados vinte e um derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico (Figuras 2, 3) que foram caracterizados através das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono Treze (RMN de ^{13}C). A análise em espectrometria de massas de alta resolução foi feita nos compostos inéditos. Após a caracterização, os compostos foram testados frente às cepas de *Candida*, bem como foi estabelecida a relação estrutura-atividade dos derivados. Os compostos **1** e **2** foram submetidos a cálculos computacionais e o éster **1**, foi selecionado para o desenvolvimento da formulação. O planejamento e o desenvolvimento do estudo ocorreram conforme o esquema 9.



Esquema 9: Planejamento experimental do estudo

Figura 2: Estrutura química dos derivados preparados

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3: Estrutura química dos derivados preparados**11:** 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila**12:** 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila**13:** 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila**14:** 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila**15:** *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida**16:** *N,N*-dietil-3,5-dinitrobenzamida**17:** 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida**18:** *N*-(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida**19:** *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida**20:** *N*-ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida**21:** *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida

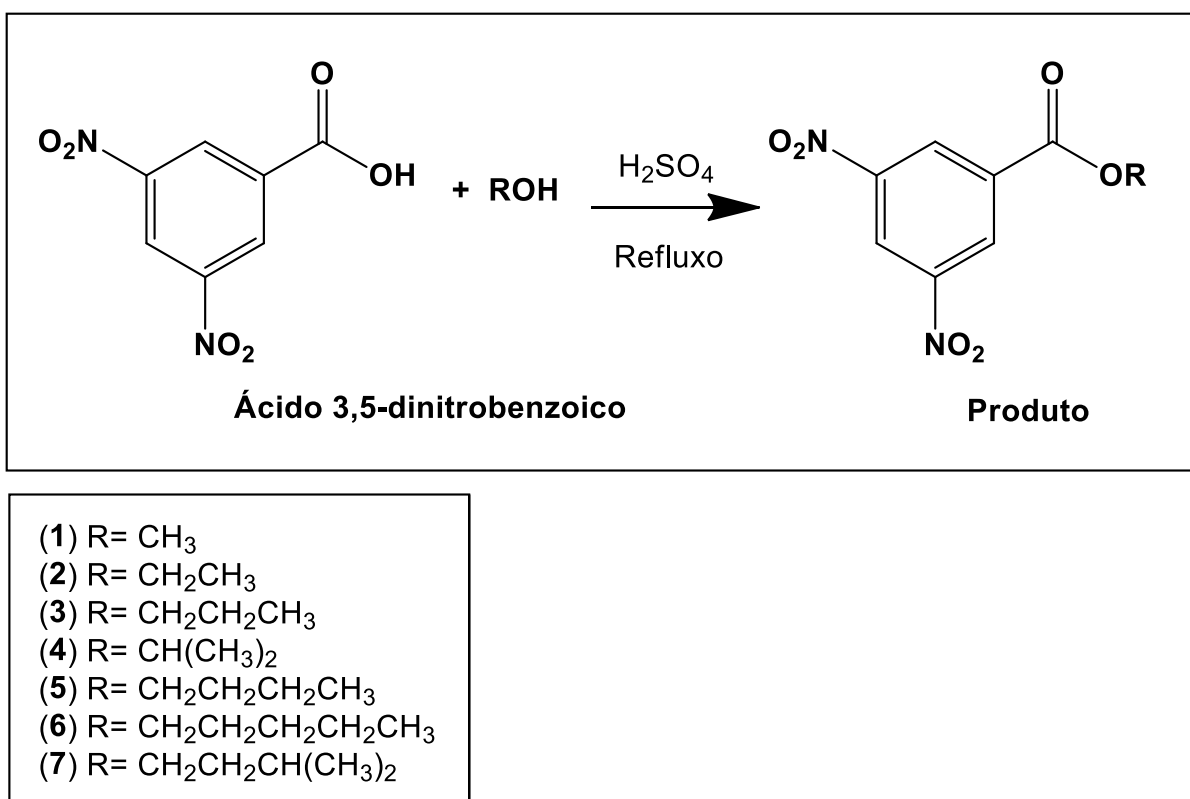
Fonte: Elaborado pelo autor

4.2. Etapa química

4.2.1. Preparação dos ésteres derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico

Os ésteres foram obtidos através de quatro diferentes metodologias: Esterificação de Fischer (SANDERSON et al., 2013); esterificação com haletos de alquila e arila (BOECK et al., 2005; LI et al., 2012); reação de Mitsunobu (HANDIQUE et al., 2013) e reação com cloreto ácido (Schotten-Baumann; JI et al., 2013).

Os sete primeiros ésteres (**1- 7**) foram preparados por meio da esterificação de Fischer. Os álcoois utilizados nas reações foram: metanol, etanol, n-propanol, álcool isopropílico, butanol, pentanol e álcool isoamílico, conforme mostrado no esquema reacional (Esquema 10).



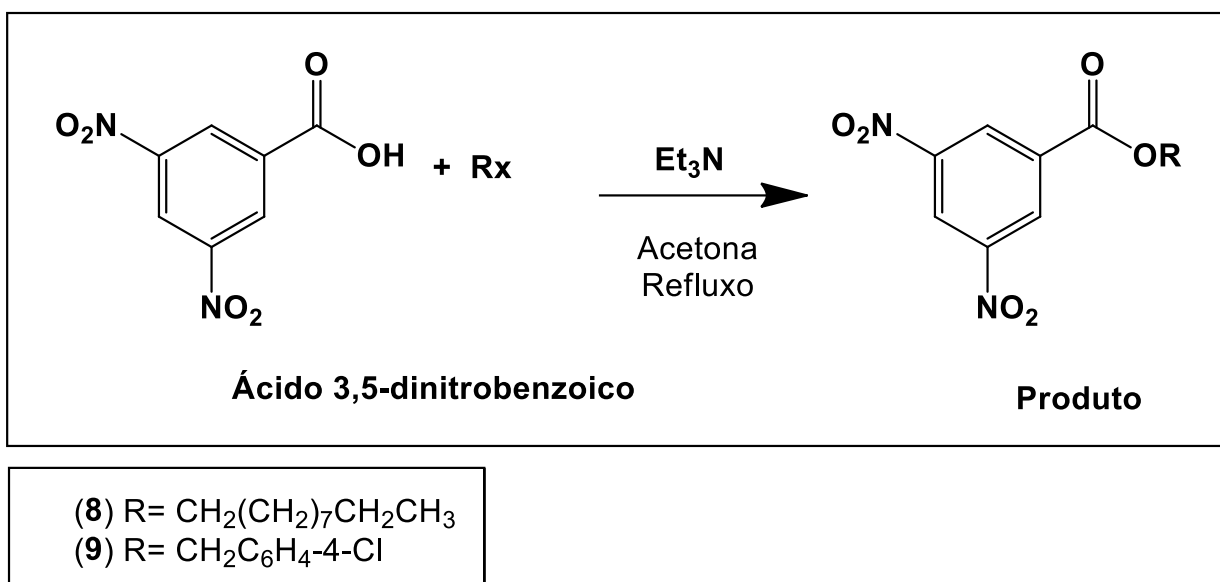
Esquema 10: Reação de esterificação de Fischer utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e álcoois alifáticos.

Fonte: Elaborado pelo autor

Com isso, foram obtidos os seguintes ésteres: 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**), 3,5-dinitrobenzoato de etila (**2**), 3,5-dinitrobenzoato de propila (**3**), 3,5-

dinitrobenzoato de isopropila (**4**), 3,5-dinitrobenzoato de butila (**5**), 3,5-dinitrobenzoato de pentila (**6**), 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (**7**). Os produtos foram obtidos em tempo reacional de 3-24 horas, apresentando rendimentos satisfatórios (68,84%-85,17%) e utilizando reagentes de baixo custo.

Os ésteres **8-9** foram obtidos pela reação entre o ácido 3,5-dinitrobenzoico e haletos de alquila e arila, em acetona anidra sob refluxo na presença da base trietilamina (Et_3N), segundo a metodologia de BOECK et al. (2005) e LI et al. (2012), como mostrado no Esquema 11. Os haletos utilizados nas reações foram: 1-bromodecano e cloreto de 4-clorobenzila.



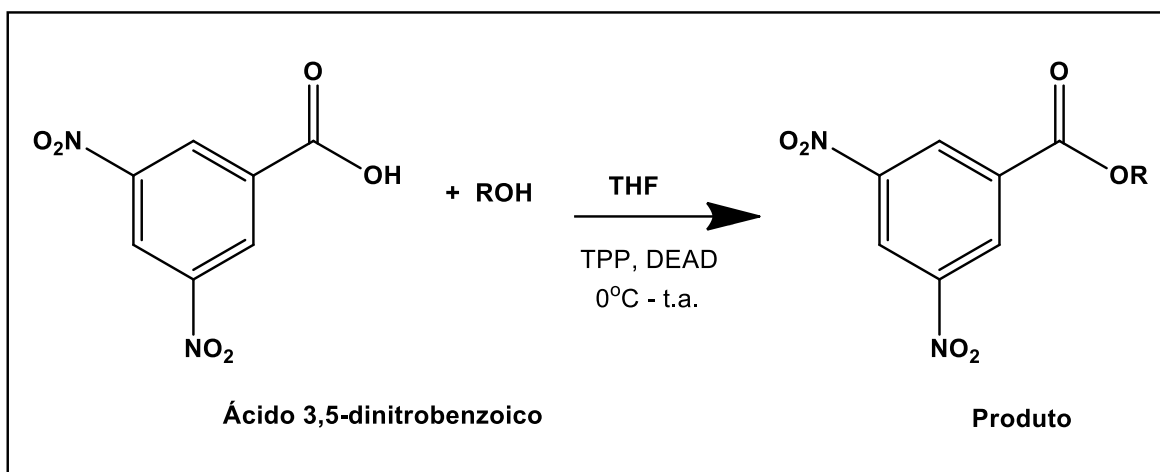
Esquema 11: Reação de esterificação utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e haletos de alquila e arila

Fonte: Elaborado pelo autor

Deste modo, foram preparados os ésteres: 3,5-dinitrobenzoato de decila (**8**) e 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**). O éster 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**) é inédito na literatura. As reações duraram 48 horas e apresentaram rendimentos que variaram entre 33,4% - 44,7%, tendo o éster **8** maior rendimento.

A obtenção dos ésteres **10-12**, ocorreu via reação de Mitsunobu entre o ácido 3,5-dinitrobenzoico e os álcoois aromáticos em tetrahidrofurano (THF) a 0 °C. Em seguida, trifetilfosfina (TPP) e o azodicarboxilato de dietila (DEAD) foram adicionados e a reação foi conduzida à temperatura ambiente, segundo a metodologia de

HANDIQUE et al., (2013), como mostrado no Esquema 12. Os álcoois utilizados nas reações foram: álcool benzílico, álcool 4-metoxibenzílico e álcool 4-isopropilbenzílico. Os tempos reacionais foram 48-72 horas, tendo-se obtido rendimentos de 48,05%-23,86%, sendo o éster **12** o produto com maior rendimento.



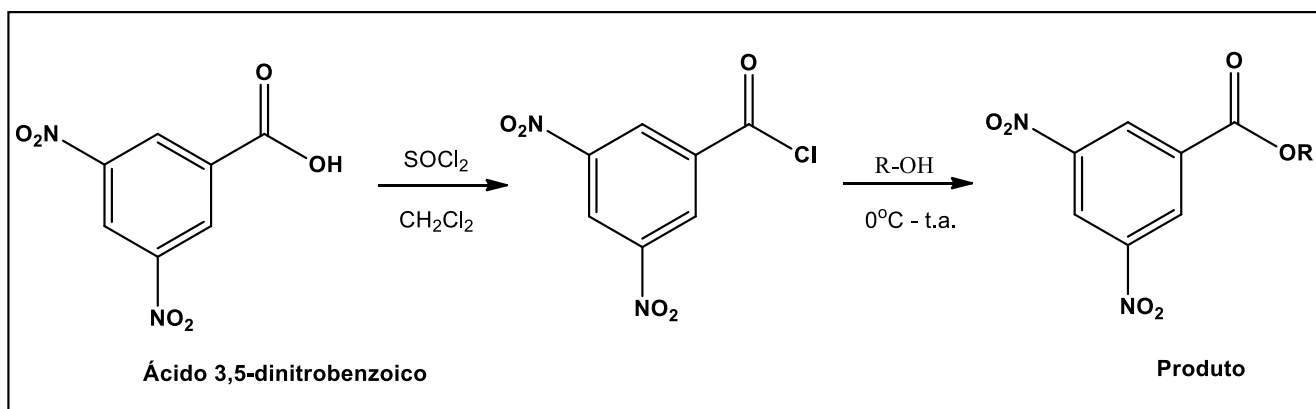
- (10)** R= CH₂C₆H₅
(11) R= CH₂C₆H₄-4-OCH₃
(12) R= CH₂C₆H₄-4-CH(CH₃)₂

Esquema 12: Reação de Mitsunobu utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e álcoois aromáticos.

Fonte: Elaborado pelo autor

Em comparação com as outras metodologias, os produtos 3,5-dinitrobenzoato de benzila (**10**), 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (**11**) e 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (**12**) foram obtidos em 72 horas, com rendimentos inferiores a 50%. Os baixos rendimentos e a cinética da reação podem estar relacionados ao efeito estérico do grupamento aromático.

Os produtos **13-14** foram sintetizados utilizando a reação com cloreto de tionila (SOCl₂), esquema 13. Os ésteres foram preparados utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico, cloreto de tionila (SOCl₂) e o álcool 4-nitrobenzílico e o álcool 3-metoxibenzílico.



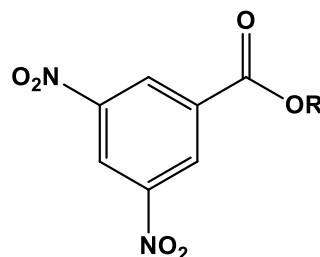
(13) R= CH₂C₆H₄-4-NO₂
(14) R= CH₂C₆H₄-3-OCH₃

Esquema 13: Reação de esterificação com cloreto ácido e álcoois aromáticos.

Fonte: Elaborado pelo autor

O tempo reacional para a formação dos produtos 3,5-dinitrobenzoato de 3-nitrobenzila (**13**) e 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (**14**) foi de 4 horas, com rendimentos entre 12,46% e 25,60%.

A tabela 1 contém os principais dados físico-químicos e experimentais dos ésteres preparados, incluindo dados reacionais, de purificação, rendimento, ponto de fusão e fator de retenção (R_f) em uma mistura de hexano e acetato de etila (Hex: AcOEt).

Tabela 1: Dados das reações de esterificação e dos ésteres derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico

Éster	R	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Faixa de fusão (°C)	Rf (Hex:AcOEt)	Tempo de Reação (h)	Purificação em coluna (Hex:AcOEt)	Quantidade em massa (mg)	Rendimento (%)
1	CH ₃	C ₈ H ₆ N ₂ O ₆	226,14	106,0-106,4	0,30 (9:1)	I-3	-	90,8	85,17
2	C ₂ H ₅	C ₉ H ₈ N ₂ O ₆	240,17	90,1-90,5	0,39 (9:1)	I-3	-	92,4	81,61
3	C ₃ H ₇	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₆	254,20	69,8-70,4	0,48 (9:1)	I-3	-	93,5	78,02
4	C ₃ H ₇	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₆	254,20	114,5-114,8	0,51 (9:1)	I-5	-	98,7	82,36
5	C ₄ H ₉	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₆	268,22	62,7-63,1	0,55 (9:1)	I-4	-	99,3	78,53
6	C ₅ H ₁₁	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₆	282,25	43,7-43,8	0,69 (9:1)	I-3	-	96,5	72,52
7	C ₅ H ₁₁	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₆	282,25	59,9-60,2	0,74 (9:1)	I-3	9:1	91,6	68,84
8	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₆	352,38	53,2-53,7	0,74 (9:1)	II-48	9:1	74,4	44,79
9	C ₇ H ₆ Cl	C ₁₄ H ₉ ClN ₂ O ₆	336,68	123,7-123,9	0,41 (9:1)	II-48	9:1	106,0	33,42
10	C ₇ H ₇	C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₆	302,24	106,4-106,9	0,48 (9:1)	III-72	98:2	34,0	23,86
11	C ₈ H ₉ O	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₇	332,26	89,2-89,6	0,39 (9:1)	III-72	9:1	58,4	18,67
12	C ₁₀ H ₁₄	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₆	344,32	92,8-93,2	0,62 (9:1)	III-72	9:1	78,0	48,05
13	C ₇ H ₇ NO ₂	C ₁₄ H ₉ N ₃ O ₈	347,24	151,8-152,4	0,30 (9:1)	IV-4	8:2	20,4	12,46
14	C ₈ H ₉ O	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₇	332,26	123,1-123,3	0,39 (9:1)	IV-4	9:1	40,1	25,60

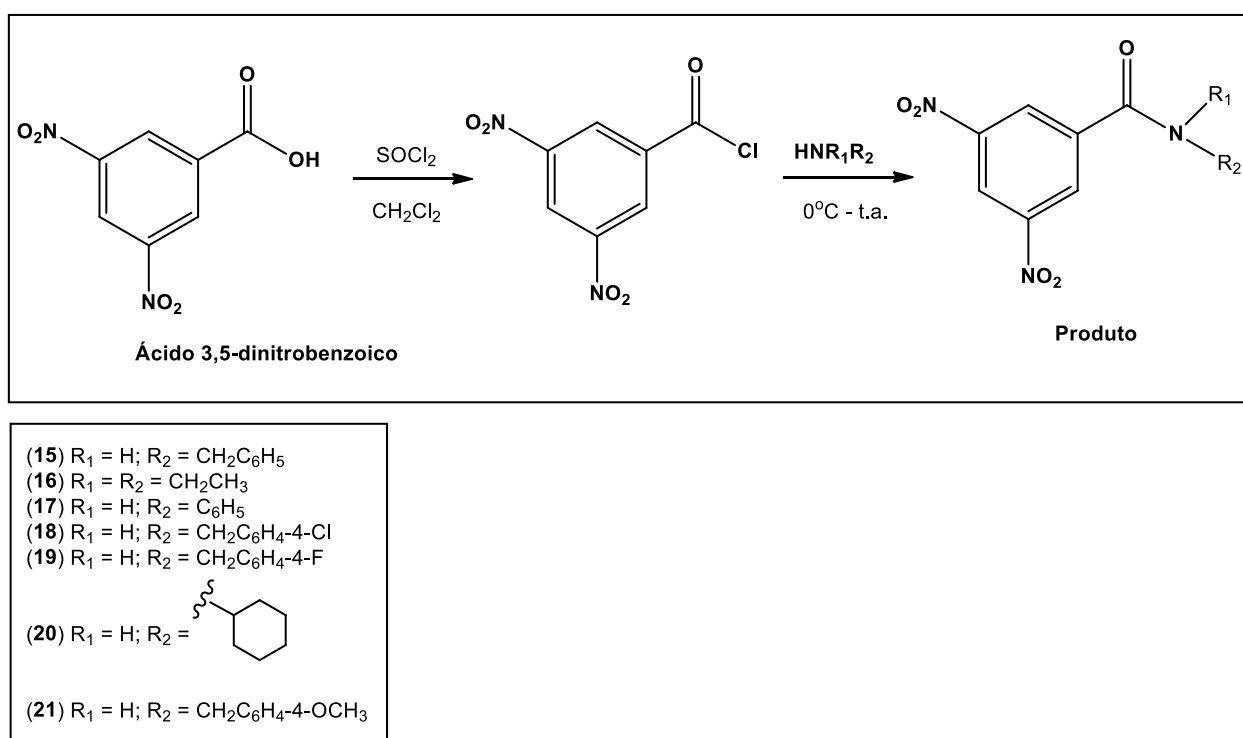
I – Reação de Esterificação de Fischer; II- Reação de Haletos; III – Reação de Mitsunobu; IV- Reação com cloreto ácido.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.2. Preparação das amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico

As amidas **15-21** foram preparadas utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e cloreto de tionila (SOCl_2), sob refluxo para formar um cloreto ácido. Em seguida, o cloreto ácido reagiu com as aminas dissolvidas em diclorometano (CH_2Cl_2) na presença da base trietilamina (Et_3N), sob agitação magnética a 0°C (banho de gelo) e posteriormente, à temperatura ambiente.

As aminas utilizadas foram: benzilamina, dietilamina, anilina, 4-clorobenzilamina, 4-fluorobenzilamina, ciclohexilamina e 4-metoxibenzilamina segundo a metodologia de Schotten-Baumann e JI et al., (2013), como exposto no Esquema 14.



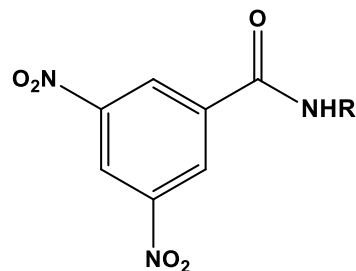
Esquema 14: Reação de amidação com cloreto ácido e aminas.

Fonte: Elaborado pelo autor

As amidas *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida (**15**), *N,N*-dietil-3,5-dinitrobenzamida (**16**), 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida (**17**), *N*-(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**18**),

N-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), *N*-ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (**20**) e *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**21**) foram obtidas com rendimentos de 46,12-63,58% e tempo reacional de 4 horas.

A tabela 2 contém os principais dados físico-químicos e experimentais de todas as amidas preparadas, incluindo dados reacionais, de purificação, rendimento, ponto de fusão e fator de retenção (*R_f*) em uma mistura de hexano e acetato de etila (Hex: AcOEt).

Tabela 2: Dados das reações de amidação e das amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico

Amida	R	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Faixa de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	R _f (Hex:AcOEt)	Tempo de reação (h)	Purificação em coluna (Hex:AcOEt)	Quantidade em massa (mg)	Rendimento (%)
15	C_7H_8	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_5$	301,25	198,8-199,1	0,57 (7:3)	IV-4	7:3	67,0	47,17
16	C_4H_{10}	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$	267,24	88,6-88,8	0,42 (7:3)	IV-4	7:3	78,2	62,07
17	C_6H_6	$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_5$	287,23	233,1-233,6	0,64 (7:3)	IV-4	8:2	80,0	59,08
18	$\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_5$	335,70	190,4-190,7	0,48 (7:3)	IV-4	8:2	73,0	46,12
19	$\text{C}_7\text{H}_7\text{F}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}_5$	319,24	197,3-198,0	0,48 (7:3)	IV-4	7:3	95,4	63,38
20	C_6H_{12}	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$	293,38	205,1-205,8	0,66 (7:3)	IV-4	8:2	75,0	54,22
21	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6$	331,28	142,4-143,1	0,46 (7:3)	IV-4	8:2	99,3	63,58

IV- Reação com cloreto ácido.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3. Análise espectroscópica dos ésteres obtidos

A caracterização estrutural dos compostos foi estabelecida 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 dos ésteres

A análise dos espectros de infravermelho dos ésteres derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico permite evidenciar a presença de grupos funcionais, que são importantes para a identificação da molécula.

Na análise dos espectros dos diferentes análogos, as estruturas moleculares dos ésteres **1-14** apresentam sinais característicos da função éster exibindo bandas de absorção semelhantes como: bandas de estiramento $\text{C}=\text{O}$ de éster entre $1750\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ características de carbonilas de ésteres; absorções de estiramento $\text{C}-\text{O}$ do éster que aparecem como duas bandas entre 1300 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} e nas substâncias apresentadas, aparecem entre $1301\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$ e $1180\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$. Além disso, a ausência da banda de absorção forte do grupo hidroxila de ácido carboxílico em torno de 3400 cm^{-1} evidenciou a esterificação.

Foram observadas, bandas acima de 3000 cm^{-1} referentes ao estiramento de $\text{C}-\text{H}$ sp^2 de aromáticos ($3118\text{-}3078\text{ cm}^{-1}$); bandas de estiramento das ligações $\text{C}=\text{C}$ aromáticas entre $1633\text{-}1627\text{ cm}^{-1}$ e $1498\text{-}1452\text{ cm}^{-1}$, que sugerem a presença do anel aromático.

Todos os análogos apresentam em comum o substituinte nitro (NO_2) no anel aromático, que pode ser caracterizado pela espectroscopia de infravermelho através de duas bandas estiramento em $1550\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ e $1350\text{-}1315\text{ cm}^{-1}$. Essas bandas foram visualizadas nas estruturas entre $1548\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ e $1349\text{-}1346\text{ cm}^{-1}$. Esses resultados são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Espectroscopia de Infravermelho dos 3,5-dinitrobenzoatos em cm^{-1} .

-	V (C-H) $\text{sp}^2_{\text{AROM.}}$	V (C-H) sp^3	V (C=O) ÉSTER	V (C=C) AROM.	V (NO ₂)	V (C-O) ÉSTER
1	3078	2966	1730	1630	1543	1301
				1461	1346	1165
2	3093	2984	1731	1627	1544	1277
				1467	1347	1180
3	3114	2969	1723	1633	1546	1295
				1461	1347	1177
4	3118	2989	1718	1631	1548	1292
				1461	1347	1178
5	3113	2963	1721	1631	1548	1286
				1465	1346	1176
6	3097	2962	1729	1629	1543	1286
				1461	1346	1172
7	3111	2964	1721	1631	1547	1293
				1463	1348	1174
8	3095	2922	1728	1627	1542	1288
				1461	1346	1171
9	3101	2885	1720	1629	1545	1277
				1493	1347	1167
10	3103	2877	1740	1629	1540	1278
				1498	1347	1168
11	3092	2963	1719	1629	1543	1282
				1461	1348	1163
12	3076	2962	1729	1627	1542	1275
				1461	1349	1167
13	3097	2921	1722	1627	1543	1275
				1452	1349	1160
14	3090	2963	1728	1631	1545	1282
				1457	1349	1159

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2. Espectroscopia de Infravermelho das amidas

A análise dos espectros de infravermelho das amidas derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico permite evidenciar a presença de grupos funcionais, que são importantes na identificação da molécula.

Na análise dos espectros dos diferentes análogos, as estruturas moleculares das amidas **15-21** apresentam sinais característicos da função amida exibindo, bandas de absorção semelhantes como: banda de estiramento assimétrico N-H em aproximadamente 3300 cm^{-1} referente a amidas secundárias **15, 17, 18, 19, 20** e **21** que apresentaram essa absorção entre 3302 e 3297 cm^{-1} .

Foram observadas, bandas acima de 3000 referentes ao estiramento de C-H sp^2 de aromáticos ($3109\text{-}3089\text{-cm}^{-1}$); bandas de estiramento C=O de amidas entre $1659\text{-}1639\text{ cm}^{-1}$ características de carbonilas de amidas.

Todos os análogos apresentam em comum o substituinte nitro (NO_2) no anel aromático, que pode ser caracterizado pela espectroscopia de infravermelho através de duas bandas estiramento entre $1550\text{-}1490$ e $1350\text{-}1315\text{ cm}^{-1}$. Essas bandas foram visualizadas nas estruturas entre $1545\text{-}1534\text{ cm}^{-1}$ e $1345\text{-}1342\text{ cm}^{-1}$. Esses resultados são apresentados na **Tabela 4**.

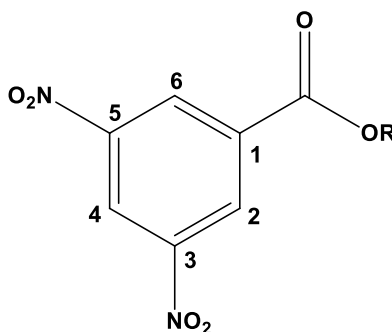
Tabela 4: Espectroscopia de Infravermelho das 3,5-dinitrobenzamidás em cm^{-1} .

-	ν (N-H) Estiramento	ν (C-H) $\text{sp}^2_{\text{AROM.}}$	ν (C-H) sp^3	ν (C=O) AMIDA	ν (NO ₂)
15	3316	3093	2931	1639	1543 1343
16	-	3089	2970	1641	1546 1343
17	3284	3105	-	1659	1545 1334
18	3303	3099	2926	1644	1535 1344
19	3302	3099	2939	1642	1534 1342
20	3297	3109	2941	1646	1542 1345
21	3306	3095	2934	1643	1541 1344

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.3. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C dos ésteres

De acordo com a Figura 4, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos sintetizados provenientes do ácido 3,5-dinitrobenzoico demonstram a presença de 3 (três) hidrogênios em comum (**H2**, **H4**, **H6**,) sendo os 3 (três) do anel aromático; como também, 7 (sete) carbonos em comum (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6**, **C=O**), sendo 6 (seis) do anel aromático e 1 referente a carbonila do éster.

Figura 4: Estrutura base dos ésteres derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico

Fonte: Elaborado pelo autor

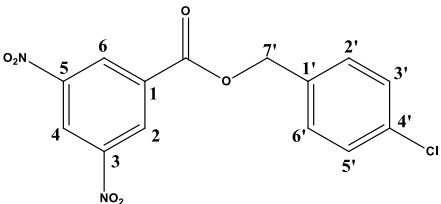
Nos espectros de RMN ¹H dois sinais são comuns a todos os ésteres: um tripleto na região de δ 9,23-9,06 ppm (H-4) seguido de um duplete na região de δ 9,17-8,96 ppm (H-2 e H-6) referente aos hidrogênios do anel aromático provenientes do ácido 3,5-dinitrobenzoico. Esta faixa de deslocamento é característica de hidrogênios aromáticos devido à desblindagem ocasionada pela circulação de elétrons π do anel aromático. O maior desblindamento desses hidrogênios aromáticos também pode ser atribuído à presença de dois grupos elétron-retirador (NO₂) que, ao remover a densidade eletrônica do anel aromático, por efeito de ressonância, desprotege os hidrogênios aromáticos.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do carbono que está diretamente ligado ao grupamento oxigênio foram essenciais para confirmar a esterificação. Devido a sua eletronegatividade, o átomo de oxigênio fica com a maior densidade eletrônica deixando os hidrogênios do carbono desblindados. Os sinais foram encontrados na região de 4,07-5,61 ppm.

Os espectros de RMN ¹³C também revelaram a formação dos compostos; convém destacar para os deslocamentos do carbono carbonílico C=O (entre 163,1-162,1 ppm), dos carbonos diretamente ligados aos grupos nitro C-3 e C-5 (entre 150,2-148,4 ppm) que estão desblindados devido ao efeito retirador de elétrons do NO₂. São observados sinais de carbono metínicos do anel aromático e C-2 e C-6 são os mais desprotegidos devido a perda de densidade eletrônica para o grupo C=O. Também são assinalados os deslocamentos dos carbonos do restante da cadeia de cada éster; os carbonos diretamente ligados ao oxigênio do grupo funcional carbonila tiveram sinais característicos, entre 53,7-71,3 ppm, o que confirma a esterificação. Na tabela

5 estão representados os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C que confirmam a formação de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila.

Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δH) e de ^{13}C (δC) para o 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**).

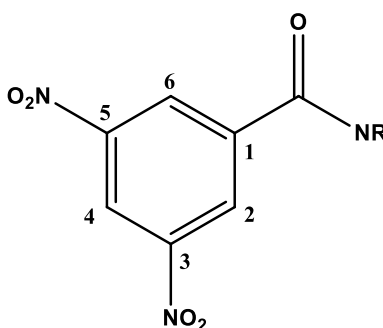
9		
Posição		
	δH	δC
1	-	135,24
2 e 6	9,15 (<i>d</i> , $J=2,1$ Hz, 2H)	129,64
3 e 5	-	148,83
4	9,22 (<i>t</i> , $J=2,2$ Hz, 1H)	122,74
C=O	-	162,46
1'	-	133,76
2' e 6'	7,44-7,38 (<i>m</i> , 2H)	130,42
3' e 5'	7,44-7,38 (<i>m</i> , 2H)	129,25
4'	-	133,11
7'	5,44 (<i>s</i> , 2H)	67,90

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C das amidas

De acordo com a Figura 5, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos sintetizados provenientes do ácido 3,5-dinitrobenzoico demonstram a presença de 3 (três) hidrogênios em comum (**H2**, **H4**, **H6**,) sendo os 3 (três) do anel aromático; como também, 7 (sete) carbonos em comum (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6**, **C=O**), sendo 6 (seis) do anel aromático e 1 referente a carbonila da amida.

Figura 5: Estrutura base das amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico



Fonte: Elaborado pelo autor

Nos espectros de RMN ^1H dois sinais são comuns a todos as amidas: um duplete na região de δ 9,17-9,05 ppm (H-2 e H-6) seguido de um tripleto na região de δ 9,00-8,94 ppm (H-4) referente aos hidrogênios do anel aromático provenientes do ácido 3,5-dinitrobenzoico. Esta faixa de deslocamento é características de hidrogênios aromáticos devido à desblindagem ocasionada pela circulação de elétrons π do anel aromático. O maior desblindamento desses hidrogênios aromáticos também pode ser atribuído à presença de dois grupos elétron-retirador (NO_2) que, ao remover a densidade eletrônica do anel aromático, por efeito de ressonância, desprotege os hidrogênios aromáticos.

Foram observados nos compostos **15**, **18**, **19** e **21** um singleto na região de (4,47-4,56 ppm) atribuído a hidrogênios metilênicos (NH-CH_2) proveniente da amina que foi adicionada a molécula.

O composto **16** não exibiu sinais de acoplamento e se apresentou como singletos.

Os espectros de RMN ^{13}C também revelaram a formação dos compostos; convém destaque para os deslocamentos do carbono carbonílico C=O (entre 166,3-161,2 ppm), dos carbonos diretamente ligados aos grupos nitro C-3 e C-5 (entre 148,6-148,1 ppm) que estão desblindados devido ao efeito retirador de elétrons do NO_2 .

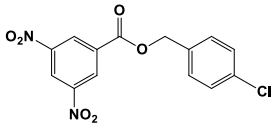
O composto **19** apresentou um sinal em 162,3 ppm característico de C=O de amida e um sinal na região de 162,1 ppm atribuído ao acoplamento C-F (Carbono-Flúor).

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

4.3.5. Interpretação do espectro de massas de alta resolução do composto **9**

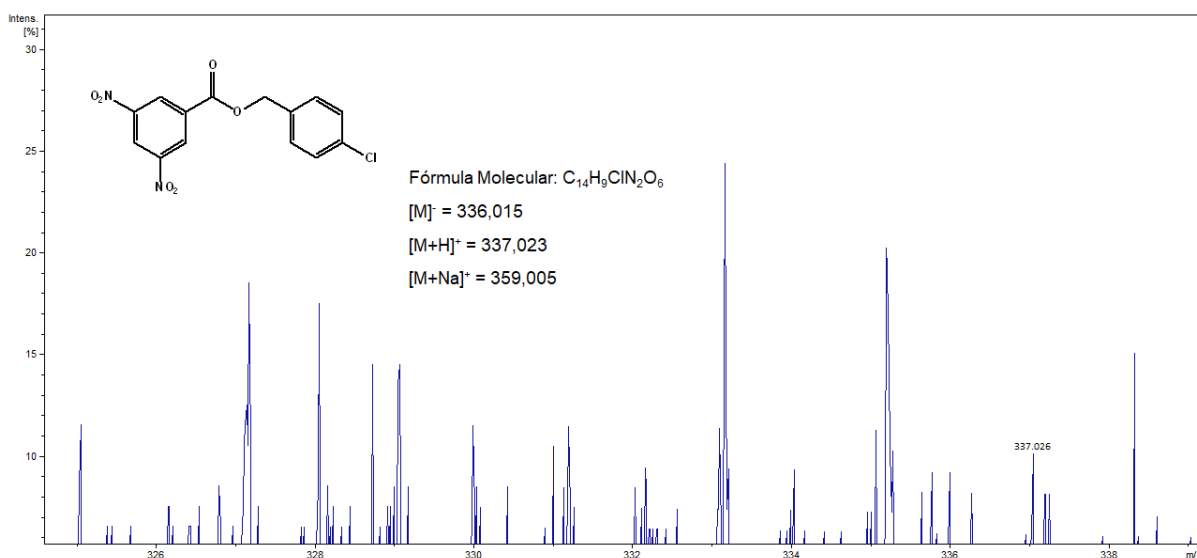
O espectro de massa do éster **9**, inédito na literatura, foi obtido por espectrômetro de massas tipo MALDI de alta resolução, o qual permitiu a obtenção da massa com elevada exatidão do éster derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico (Tabela 6 e na figura 6).

Tabela 6: Assinalamento de Espectrometria de Massa do 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**)

Composto	Pico íon-molecular	Massa calculada	Massa do espectro	Erro percentual (%)
9 	$[\text{M}+\text{H}]^+$	337,023	337,026	0,0009

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6: Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9)



Fonte: Elaborado pelo autor

4.4. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos

Todos os ésteres e amidas sintetizados foram avaliados quanto à atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (Tabela 7). Dos vinte e um derivados, onze apresentaram atividade fungicida sobre pelo menos uma das cepas testadas, com destaque para cinco compostos (**1**, **3**, **9** e **16**) que apresentaram atividade contra todas as cepas ensaiadas e maior potência antifúngica do que o material de partida, o ácido 3,5-dinitrobenzoico.

O efeito do grupo éster com substituinte alquílico (R) na atividade contra cepas de *Candida* é evidente. Dentre as séries estudadas, uma cadeia alquila linear curta potencializou a atividade biológica, enquanto os maiores grupos alquilas resultaram em uma menor atividade. Assim, o éster 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**: grupo metila) foi o mais bioativo contra todas as cepas testadas e selecionado para o desenvolvimento da formulação.

O éster 3,5-dinitrobenzoato de etila (**2**: grupo etila) apresentou atividade contra *Candida albicans* (CIM = 0,52 mM), *Candida krusei* (CIM = 4.16 mM) e *Candida tropicalis* (CIM = 2,08 mM) e, o composto **3** (grupo propila) também foi bioativo frente as cepas de *Candida*. A presença de um grupo isopropila no éster **4** contribui para uma fraca atividade contra *Candida krusei* (CIM = 3,92 mM), sendo inativo para as

demais cepas.

A comparação de **1** com **5** (grupo *n*-butano) sugere que o aumento da cadeia carbônica demonstrado no éster **5**, resultou em inatividade do composto contra *Candida tropicalis* e redução da potência frente as demais cepas. Dentro da série estudada, uma cadeia alquila linear de tamanho médio demonstrou atividade antifúngica, enquanto um grupo alquila ramificado não apresentou atividade. Assim, o composto **6** apresentou atividade contra *Candida albicans* (CIM = 3,54 mM) enquanto seu análogo, o composto **7** (grupo isopentila) não apresentou atividade antifúngica. A presença de um substituinte de cadeia alquila linear longa (10 átomos de carbono), composto **8**, resultou em atividade apenas contra *Candida albicans* (CIM = 2,83 mM).

Os compostos que apresentam radicais arila, apresentaram menor ou ausência de atividade antifúngica, destacadamente com a presença do grupo benzila (compostos **10** e **15**) levou à perda total da atividade antifúngica. Entretanto, no éster **9**, foi observado que a presença de um grupo retirador de elétrons, como o cloro, contribui para a atividade antifúngica desse composto contra todas as cepas testadas. LIMA et al., (2018a) observaram em seu estudo que a presença do substituinte cloro resultou em um aumento da atividade antifúngica dos ésteres derivados dos ácidos cinâmico e benzoico. Curiosamente, a presença do cloro na posição *para* do seu análogo, a amida **18** não favoreceu a atividade antifúngica desse composto.

A comparação das amidas **18** e **19** sugere que a modificação do substituinte cloro (**18**) por flúor (**19**) na posição *para* do anel aromático não resultou em bioatividade desse composto. Entretanto, OLIVEIRA et al., (2019) usaram o ácido vanílico como material de partida para preparar uma amida contendo o substituinte flúor na posição *para*. A presença desse substituinte favoreceu a atividade do composto contra cepas de *Candida*.

O 3,5-dinitrobenzoato de 4-metóxi-benzila (**11**) que possui um anel aromático com um grupo doador de elétrons, a metoxila na posição *para* apresentou atividade contra *Candida krusei* (CIM = 3,01 mM). Enquanto o derivado **14** (grupo MeO na posição *meta*) não apresentou atividade antifúngica. Este resultado demonstra a importância do substituinte na posição *para* na atividade antifúngica. Em contraste, ao comparar o composto **11**, o qual foi fracamente ativo contra *Candida krusei*, com seu análogo, a amida **21**, a troca da função éster pela função amida tornou-o inativo frente a todas as cepas.

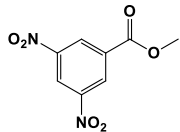
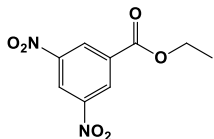
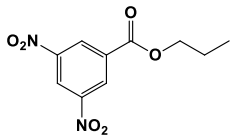
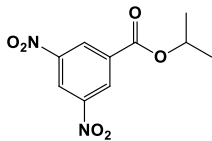
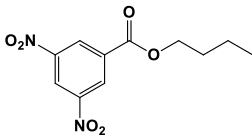
O éster **12** que possui anel aromático com substituinte isopropila também apresentou atividade contra *Candida krusei* (CIM = 2,90 mM). Contudo, a introdução de um grupo nitro na posição *para* resultou em uma ausência de atividade do 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (**13**). Ao comparar os ésteres **9**, **10**, **11**, **12**, **13** e **14** é possível verificar que as trocas de substituintes no anel aromático influenciaram a atividade antifúngica.

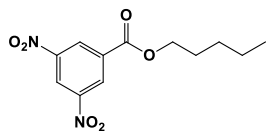
A amida **16** (grupo dietila) apresentou atividade contra *Candida albicans* (CIM = 3.74 mM), *Candida krusei* (CIM = 3.74 mM) e *Candida tropicalis* (CIM = 3.74 mM). Os dados indicam que dentre as benzamidas testadas, a presença de grupos alquílicos de tamanho pequeno ligados ao nitrogênio contribuem para a ação antifúngica deste derivado.

A maioria das amidas avaliadas (**15**, **17**, **18**, **19**, **20** e **21**) não apresentaram atividade antifúngica, apesar da literatura relatar esta atividade biológica para diversas amidas frente a espécies de *Candida* (OLIVEIRA et al., 2019; PEREZ-CASTILLO et al., 2021). Este dado sugere que a subestrutura 3,5-dinitrobenzoila não é promissora em derivados amidas.

Os resultados também revelaram que os compostos foram considerados mais ativos contra cepas de *Candida albicans* com exceção dos produtos **4**, **11** e **12**, que foram bioativos apenas contra *Candida krusei*. Os dados obtidos através da relação MFC/MIC dos compostos que apresentaram bioatividade indicam que todos que apresentaram atividade biológica são fungicidas (PEIXOTO et al. 2017). No geral, os ésteres apresentaram um melhor perfil de atividade antifúngica, se comparados às amidas, frente às cepas do gênero *Candida*.

Tabela 7: Concentrações inibitórias e fungicidas mínimas (CFM/CIM) do ácido 3,5-dinitrobenzoico e seus derivados expressos em µg/mL e mM.

Compostos	<i>Candida albicans</i> (CBS 562)			<i>Candida krusei</i> (CBS 573)			<i>Candida tropicalis</i> (CBS 94)		
	CIM (µg/mL)/(mM)	CFM (µg/mL)/(mM)	CFM/CIM	CIM(µg/mL)/(mM)	CFM(µg/mL)/(mM)	CFM/CIM	CIM(µg/mL)/(mM)	CFM(µg/mL)/(mM)	CFM/CIM
1 	125/0,55	125/0,55	1	250/1,10	250/1,10	1	250/1,10	250/1,10	1
2 	125/0,52	250/1,04	2	1000/4,16	1000/4,16	1	500/2,08	500/2,08	1
3 	250/0,98	500/1,96	2	1000/3,92	1000/3,92	1	500/1,96	500/1,96	1
4 	+	+		1000/3.92	1000/3.92	1	+	+	
5 	1000/3,73	1000/3,73	1	1000/3,73	1000/3,73	1	+	+	

6

1000/3,54

1000/3,54

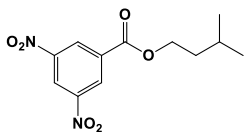
1

+

+

+

+

7

+

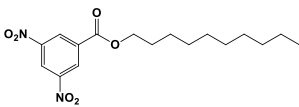
+

+

+

+

+

8

1000/2,83

1000/2,83

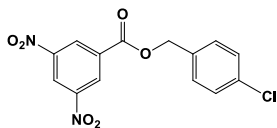
1

+

+

+

+

9

1000/2,97

1000/2,97

1

250/0,74

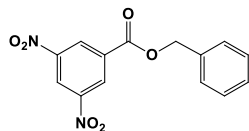
250/0,74

1

1000/2,97

1000/2,97

1

10

+

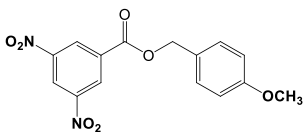
+

+

+

+

+

11

+

+

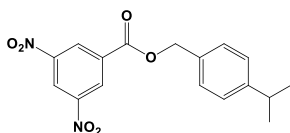
1000/3.01

1000/3.01

1

+

+

12

+

+

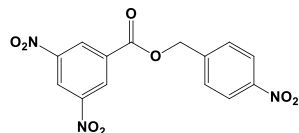
1000/2.90

1000/2.90

1

+

+

13

+

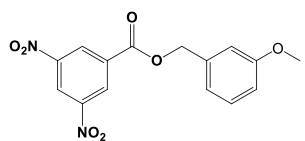
+

+

+

+

+

14

+

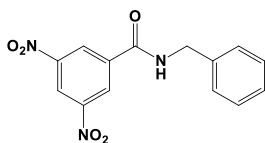
+

+

+

+

+

15

+

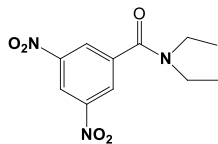
+

+

+

+

+

16

1000/3,74

1000/3,74

1

1000/3,74

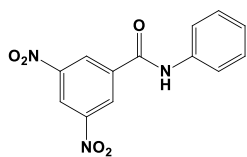
1000/3,74

1

1000/3,74

1000/3,74

1

17

+

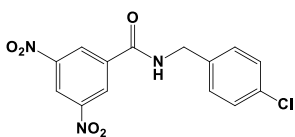
+

+

+

+

+

18

+

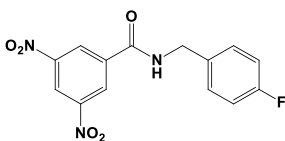
+

+

+

+

+

19

+

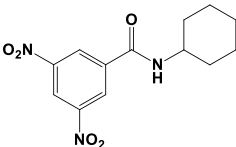
+

+

+

+

+

20

+

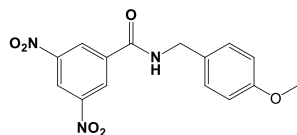
+

+

+

+

+

21

+

+

+

+

+

+

Ácido 3,5-dinitrobenzoico	1000/4,70	1000/4,70	1	1000/4,70	1000/4,70	1	1000/4,70	1000/4,70	1
Nistatina	3,75/0,0040	3,75/0,0040	1	3,75/0,0040	3,75/0,0040	1	3,75/0,0040	3,75/0,0040	1
Controle do meio	-			-			-		
Controle do microrganismo	+			+			+		
Solução de DMSO 5%	+			+			+		

(+): indica crescimento do microrganismo. (-): sem crescimento do microrganismo

Fonte: Elaborado pelo autor

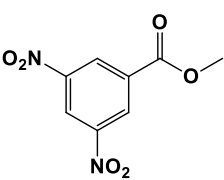
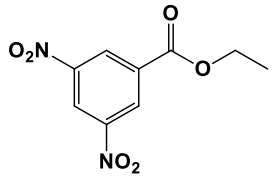
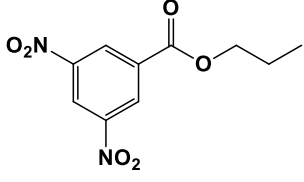
4.5. Mecanismo de ação dos compostos com maior potencial de bioatividade

Os compostos que apresentaram maior atividade biológica (**1-3**) foram submetidos a testes de elucidação do possível mecanismo de ação contra as cepas de *Candida albicans* (CBS 562) utilizando o ergosterol e sorbitol para determinar o provável alvo farmacológico (Tabela 8).

O ergosterol é um componente da membrana celular de fungos importante para a fluidez e integridade da membrana e alvo de fármacos que atuam na ligação direta ao ergosterol ou inibindo sua biossíntese, tais como polienos e azólicos, respectivamente (ESCALANTE et al., 2008). Os resultados demonstram que quando o ergosterol foi adicionado ao meio contendo o microrganismo e o composto **3**, houve um aumento significativo da CIM (3,92 mM) indicando, que este composto possivelmente atua alterando as funções fisiológicas que envolvem a presença do ergosterol na membrana celular. Os compostos **1** e **2** apresentaram um discreto aumento da CIM indicando, que esses compostos podem interferir na síntese do ergosterol.

O sorbitol é reconhecido como um protetor osmótico de parede celular fúngica e, quando adicionado ao meio de cultura em testes *in vitro*, protege a célula de possíveis danos promovidos por drogas que atuam na inibição da síntese da parede celular, que é formada por quitina e glicana (FROST et al., 1995). Neste estudo, em presença de sorbitol, não foi observada alteração nos valores das concentrações inibitórias mínimas apresentadas pelos compostos **1**, **2** e **3**, indicando, portanto, que o provável mecanismo de ação dos mesmos não está relacionado a alterações na função da parede celular.

Tabela 8: Valores de CIM em ($\mu\text{g/mL}$) e (mM) dos ésteres **1**, **2** e **3** na ausência e presença de sorbitol (0,8 M) e ergosterol contra *Candida albicans*.

Composto	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	<i>Candida albicans</i> (CBS 562)		<i>Candida albicans</i> (CBS 562)	
		Sem sorbitol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	Com sorbitol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	Sem ergosterol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	Com ergosterol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)
1 	1000/4,40	-	-	-	-
	500/2,20	-	-	-	-
	250/1,10	-	-	-	-
	125/0,55	-	-	-	+
	62,5/0,27	+	+	+	+
	31,25/0,13	+	+	+	+
2 	1000/4,16	-	-	-	-
	500/2,08	-	-	-	-
	250/1,04	-	-	-	-
	125/0,52	-	-	-	+
	62,5/0,26	+	+	+	+
	31,25/0,13	+	+	+	+
3 	1000/3,92	-	-	-	-
	500/1,96	-	-	-	+
	250/0,98	-	-	-	+
	125/0,49	+	+	+	+
	62,5/0,24	+	+	+	+
	31,25/0,12	+	+	+	+
Nistatina	120/0,128			-	-
	60/0,064			-	-
	30/0,032			-	+
	15/0,016			-	+
	7,5/0,008			-	+
	3,75/0,0040			-	+
	1,87/0,002			+	+
	0,93/0,001			+	+
Caspofungina	1/0,000896	-	-		
	0,5/0,000448	-	-		
	0,25/0,000224	-	+		
	0,125/0,000112	-	+		
	0,0625/0,000056	-	+		
	0,031/0,000028	-	+		
	0,015/0,000014	+	+		

(+): indica crescimento do microrganismo. (-): sem crescimento do microrganismo

Fonte: Elaborado pelo auto

4.6. Docking molecular do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

Os potenciais alvos do composto **1** previstos seguindo o procedimento descrito na seção Métodos estão listados na Tabela 9. Dentre as proteínas listadas na tabela, duas delas possuem estruturas experimentais depositadas no Protein Data Bank, foram gerados modelos de homologia para oito, e para quatro transportadores de aminoácidos, seus modelos estruturais foram recuperados do repositório AlphaFold.

Tabela 9: Alvos potenciais do composto **1** em *C. albicans*

Adesão UniProt	ID ^(a)	Descrição	Origem da estrutura ^(b)
Q59NQ5	GLR1	Glutathione redutase	Modelo de homologia
A0A1D8PQQ3	GPH1	Alfa-1,4 glucano fosforilase	Modelo de homologia
Q5A4E2	DED1	RNA helicase DED1 dependente de ATP	Modelo de homologia
O74261	HSP60	Proteína de choque térmico 60	Modelo de homologia
O74201	UBC2	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 2	Modelo de homologia
Q59RL1	GNP1	Transportador de aminoácidos	AlphaFold
A0A1D8PMB1	GAP5	Aminoácido permease GAP5	AlphaFold
Q5AG77	GAP1	Aminoácido permease GAP1	AlphaFold
A0A1D8PU37	GAP2	Aminoácido permease	AlphaFold
Q59PZ5	GCN5	Histona acetiltransferase GCN5	Modelo de homologia
Q59UP8	MEP2	Transportador de amônio	PDB
P46598	HSP90	Proteína de choque térmico 90	PDB
A0A1D8PSY1	GLN1	Glutamina sintetase	Modelo de homologia
P12461	TMP1	Timidilato sintase	Modelo de homologia

^(a) Identificação do alvo ao longo do manuscrito. ^(b) Fonte da estrutura da proteína: PDB, Banco de dados de proteínas; Modelo de homologia, modelo de homologia obtido com o servidor SwissModel; AlphaFold, repositório AlphaFold.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados dos estudos de ancoramento (docagem) molecular com o composto **1** são apresentados na tabela 10. Para TMP1, o encaixe foi realizado separadamente nos locais de substrato e cofator.

Tabela 10: Resultados do ancoramento do composto **1** aos seus alvos potenciais.

Alvo	Pose	PLP	Z_PLP	GS	Z_GS	CS	Z_CS	ASP	Z_ASP	Z-Score agregado
GLR1	1	39,27	2,01	23,88	0,89	15,17	2,28	20,21	0,69	1,46
	2	38,10	1,60	30,93	1,69	12,30	0,99	20,05	0,63	1,23
	3	37,42	1,36	30,30	1,62	13,68	1,61	18,85	0,21	1,20
GPH1	1	38,54	1,60	27,70	1,86	13,83	0,74	22,26	0,80	1,25
DED1	1	58,07	1,90	30,70	1,05	18,53	0,43	29,44	0,69	1,02
	2	52,47	0,89	30,84	1,07	20,41	1,16	31,14	0,93	1,01
HSP60	1	47,09	2,10	8,02	-0,17	16,32	1,74	18,17	0,45	1,03
UBC2	1	27,41	0,60	6,67	-0,22	10,51	1,78	17,12	2,53	1,17
GNP1	1	10,05	2,13	11,86	0,71	11,91	2,17	-0,96	1,74	1,69
	2	3,74	1,47	9,81	1,22	21,29	1,07	-3,32	1,50	1,31
GAP5	1	51,72	1,02	24,53	0,82	16,13	1,05	29,11	1,06	0,99
	1	36,68	1,14	19,88	0,78	12,74	2,05	24,91	1,93	1,47
GAP1	2	39,57	1,68	11,91	-0,39	12,76	2,05	25,15	1,97	1,33
	3	36,47	1,10	26,44	1,74	9,47	0,84	18,82	0,96	1,16
	1	36,68	1,14	19,88	0,78	12,74	2,05	24,91	1,93	1,47
GAP2	2	39,57	1,68	11,91	-0,39	12,76	2,05	25,15	1,97	1,33
	3	36,47	1,10	26,44	1,74	9,47	0,84	18,82	0,96	1,16
	1	52,14	1,90	25,10	0,66	18,79	1,93	26,57	0,71	1,30
GCN5	2	53,90	2,71	26,87	1,01	17,55	1,14	24,69	-0,15	1,18
	3	51,72	1,71	19,62	-0,42	18,14	1,51	27,77	1,26	1,02
MEP2	1	33,68	2,57	18,49	1,45	7,52	-0,71	19,65	1,06	1,09
HSP90	1	39,50	2,71	20,23	1,84	9,08	-0,90	18,88	1,19	1,21
GLN1	1	38,31	1,56	24,84	0,78	16,60	1,76	21,17	1,24	1,33
	2	36,61	1,22	24,88	0,79	16,00	1,55	20,19	0,94	1,12
TMP1 (Sítio ativo)	1	41,75	1,62	39,01	1,52	10,54	0,84	16,14	0,02	1,00
TMP1 (Local do cofator)	1	52,06	2,25	23,08	0,56	15,16	0,91	29,74	0,94	1,17

Fonte: Elaborado pelo autor

No geral, as soluções de encaixe previstas estão dentro dos sítios de ligação dos receptores, mostrando interações ligando-receptor significativas. Além disso, para metade das proteínas estudadas, mais de um modo de ligação possível (pontuação Z de consenso maior que 1) é previsto para o composto **1**. Isso leva a 26 complexos ligante-receptor envolvendo os 14 receptores potenciais a serem analisados. De acordo com os resultados de encaixe, os alvos mais pontuados são DED1, GCN5 e GAP5. Por outro lado, as piores pontuações de docking são obtidas

para MEP2, UBC2 e GNP1.

Apesar de o docking molecular ser uma ferramenta amplamente utilizada para estudar as interações ligando-receptor, suas limitações precisam ser consideradas. Uma dessas limitações é a representação altamente simplificada de interações moleculares em algoritmos de encaixe necessários para atingir suas capacidades de processamento. Uma alternativa para aumentar a confiabilidade das estruturas de modelagem molecular é o pós-processamento de resultados de docking molecular usando uma técnica mais precisa, como simulações por dinâmica molecular (DM) (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006; LIU; KOKUBO, 2017; GUTERRES; IM, 2020). Levando isso em consideração, os complexos previstos pela metodologia de docking molecular foram submetidos ao protocolo de simulações DM descrito na seção Métodos. Posteriormente, as energias livres de ligação do composto **1** aos seus alvos potenciais foram previstas a partir de conjuntos conformacionais derivados das simulações de DM com o método MM-PBSA.

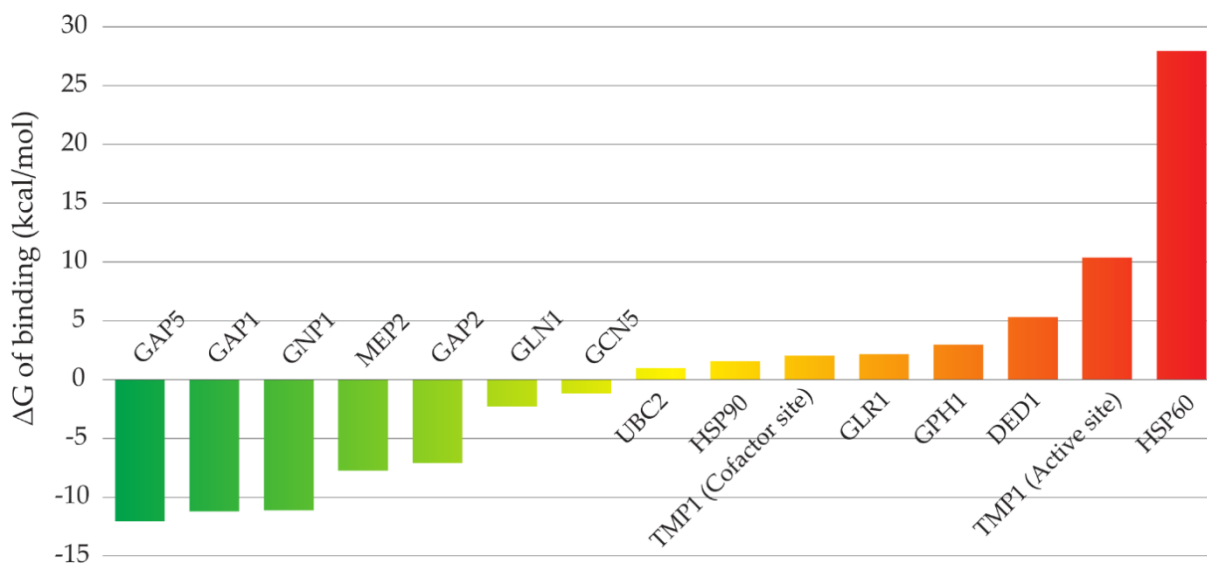
As energias livres previstas de ligação de **1** aos seus receptores potenciais são fornecidas como Informações de Apoio na Tabela 11 e resumidas na Figura 7. Esses resultados mostram que as energias livres de ligação mais baixas (melhores) são obtidas para quatro permeases de aminoácidos (GAP5, GAP1, GNP1 e GAP2) e o transportador de amônio MEP2. Entre as proteínas não transportadoras, as proteínas melhor classificadas são GLN1 e GCN5. Com base nas energias livres de ligação previstas, os complexos do composto **1** com as permeases de aminoácidos GAP5 e GAP1, bem como com o transportador de amônio MEP2, foram analisados em detalhes.

Tabela 11: Energias livres previstas de ligação do composto **1** aos seus alvos potenciais de acordo com o método MM-PBSA

Alvo	Conformador	Componente MM-PBSA							ΔG TOTAL
		VD WAALS	EEL	EPB	ENPOLAR	EDISPER	ΔG gas	ΔG solv	
GLR1	1	-30,07	-14,86	32,15	-20,68	35,61	-44,94	47,09	2,15
	2	-27,53	-7,30	24,32	-19,61	33,74	-34,82	38,46	3,63
	3	-27,06	-13,68	30,20	-19,88	33,17	-40,74	43,50	2,75
GPH1	1	-29,28	-8,38	26,43	-18,82	33,02	-37,66	40,62	2,96
DED1	1	-31,94	-0,98	23,20	-21,38	36,42	-32,92	38,24	5,32
	2	-29,04	-2,33	25,79	-20,18	34,20	-31,37	39,81	8,44
HSP60	1	-33,68	-2,50	47,38	-22,11	38,83	-36,18	64,10	27,92
UBC2	1	-17,37	-4,16	14,26	-12,30	20,54	-21,52	22,50	0,98
GNP1	1	-37,30	10,87	0,00	-22,92	38,24	-26,43	15,33	-11,10
	2	-38,25	12,58	0,00	-23,06	38,70	-25,67	15,64	-10,02
GAP5	1	-38,29	11,02	0,00	-22,98	38,20	-27,27	15,22	-12,05
GAP1	1	-34,70	10,11	0,00	-22,51	37,99	-24,58	15,48	-9,10
	2	-35,96	9,70	0,00	-22,90	37,95	-26,26	15,05	-11,21
	3	-35,73	10,99	0,00	-22,68	38,67	-24,74	15,99	-8,75
GAP2	1	-35,53	12,78	0,00	-22,45	38,10	-22,75	15,64	-7,11
	2	-33,29	10,92	0,00	-21,21	38,89	-22,37	17,67	-4,70
	3	-35,76	13,78	0,00	-21,91	39,85	-21,98	17,94	-4,05

	1	-28,81	-2,68	16,08	-19,66	34,06	-31,48	30,48	-1,01
GCN5	2	-27,48	-8,03	21,31	-20,03	33,62	-35,51	34,90	-0,61
	3	-31,28	-7,78	23,03	-21,27	36,13	-39,07	37,89	-1,18
MEP2	1	-27,22	6,32	0,00	-19,03	32,21	-20,90	13,18	-7,72
HSP90	1	-31,79	-6,35	25,09	-20,79	35,40	-38,14	39,70	1,55
	1	-30,15	-8,09	21,89	-17,69	31,76	-38,24	35,96	-2,28
GLN1	2	-26,12	1,43	10,57	-15,68	28,88	-24,69	23,77	-0,93
TMP1 (Sítio ativo)	1	-29,96	-7,41	32,63	-19,90	35,01	-37,38	47,74	10,36
TMP1 (Local do cofator)	1	-34,02	-10,83	31,89	-22,54	37,52	-44,85	46,88	2,03

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7: Energias livres previstas de ligação do composto **1** aos seus potenciais alvos

Fonte: Elaborado pelo autor

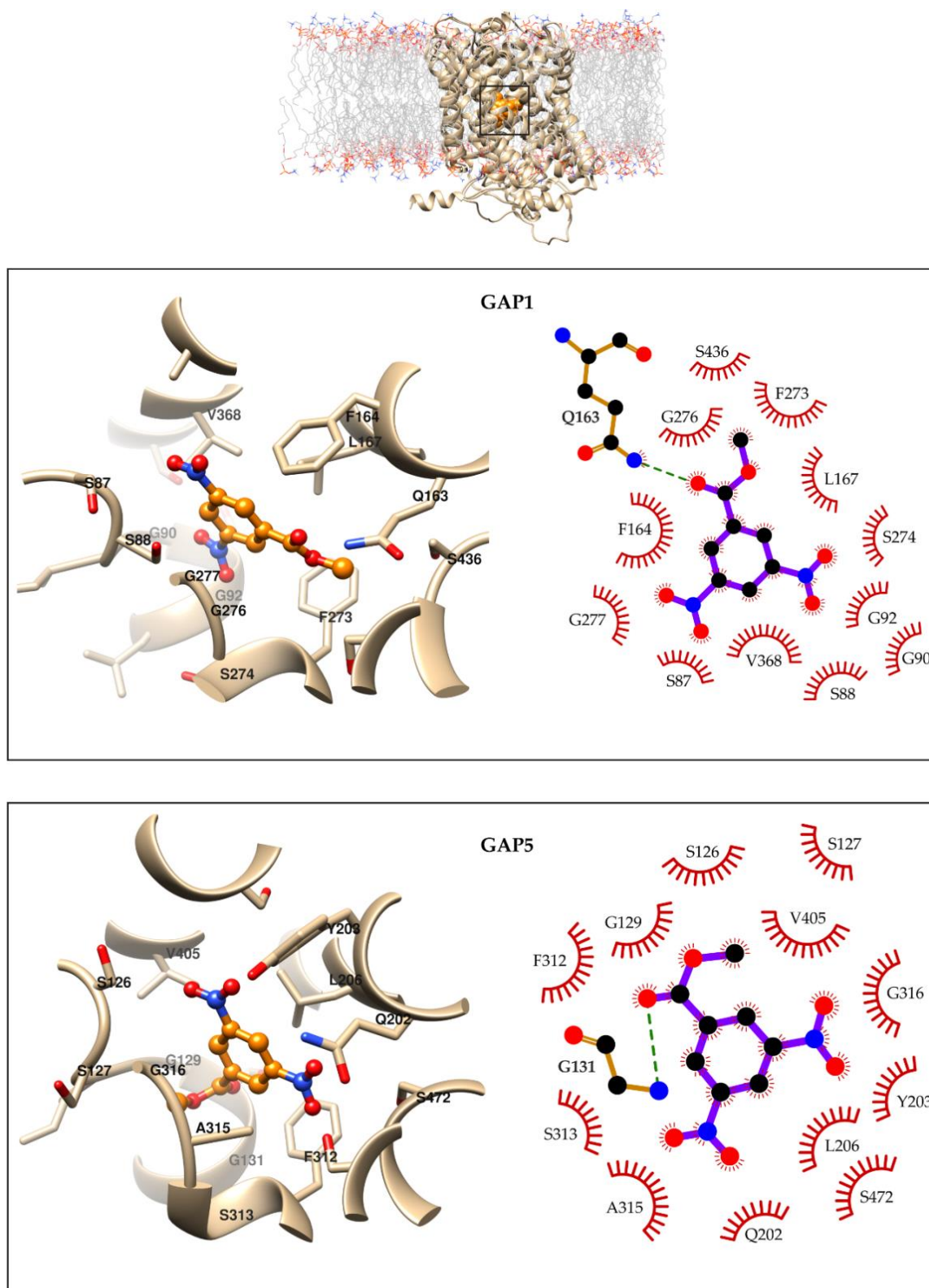
Os modos de ligação previstos do composto **1** para GAP5 e GAP1 são apresentados na Figura 8. A conformação do ligante representada corresponde ao centroide do cluster mais populoso resultante do agrupamento dos instantâneos de 100ns de DM empregados para cálculos de MM-PBSA. Apenas os resíduos que interagem com o receptor em pelo menos 50% dos instantâneos de DM analisados são discutidos a partir daqui e a mesma regra é aplicada para marcar os resíduos na figura. Figuras contendo estruturas moleculares foram produzidas com UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004), a frequência de interações ligante-receptor foram analisadas com o software posterior e Cytoscape (SHANNON et al., 2003), e os diagramas de interação foram produzidos com LigPlot+ (LASKOWSKI;SWINDELLS, 2011).

Prevê-se que o composto **1** se ligue a GAP1 e GAP5 na mesma região central, fazendo extensos contatos com os receptores. Em ambos os casos, uma ligação de hidrogênio mediada pelo grupo carbonila é observada na maioria dos instantâneos de DM analisados. Essas interações estão previstas para ocorrer com a cadeia lateral de Q163 e G131 para GAP1 e GAP5, respectivamente. Ligações de hidrogênio ocasionais, em menos de 50% dos instantâneos estudados, também são previstas no complexo composto 1-GAP5 com a cadeia lateral de Q202 e G129. Além disso, prevê-se que o ligante se oriente perpendicularmente a F273 e L167 com o anel central flanqueado por S88, F164, G276, G277 e V368 no complexo com

GAP1. No mesmo sistema um dos grupos nitro aponta para G90, G92 e S274 enquanto o segundo interage com S87, S88 e V368 e a porção hidroximetil interage com Q163, F273 e S436.

Além das ligações de hidrogênio listadas anteriormente, o anel central do composto **1** em seu complexo com GAP5 está localizado em uma região delimitada por L206, F312, A315 e G316. Neste complexo a orientação do grupo hidroximetila é diferente daquela observada no sistema ligante-GAP1, e está orientado para S127, G129, G131 e S313. Além disso, um dos grupos nitro interage com S126, Y203 e V405 do GAP5 enquanto o outro faz contatos principalmente com Q202 e S472.

Figura 8: Modos gerais de ligação do composto **1** aos receptores GAP1 e GAP5

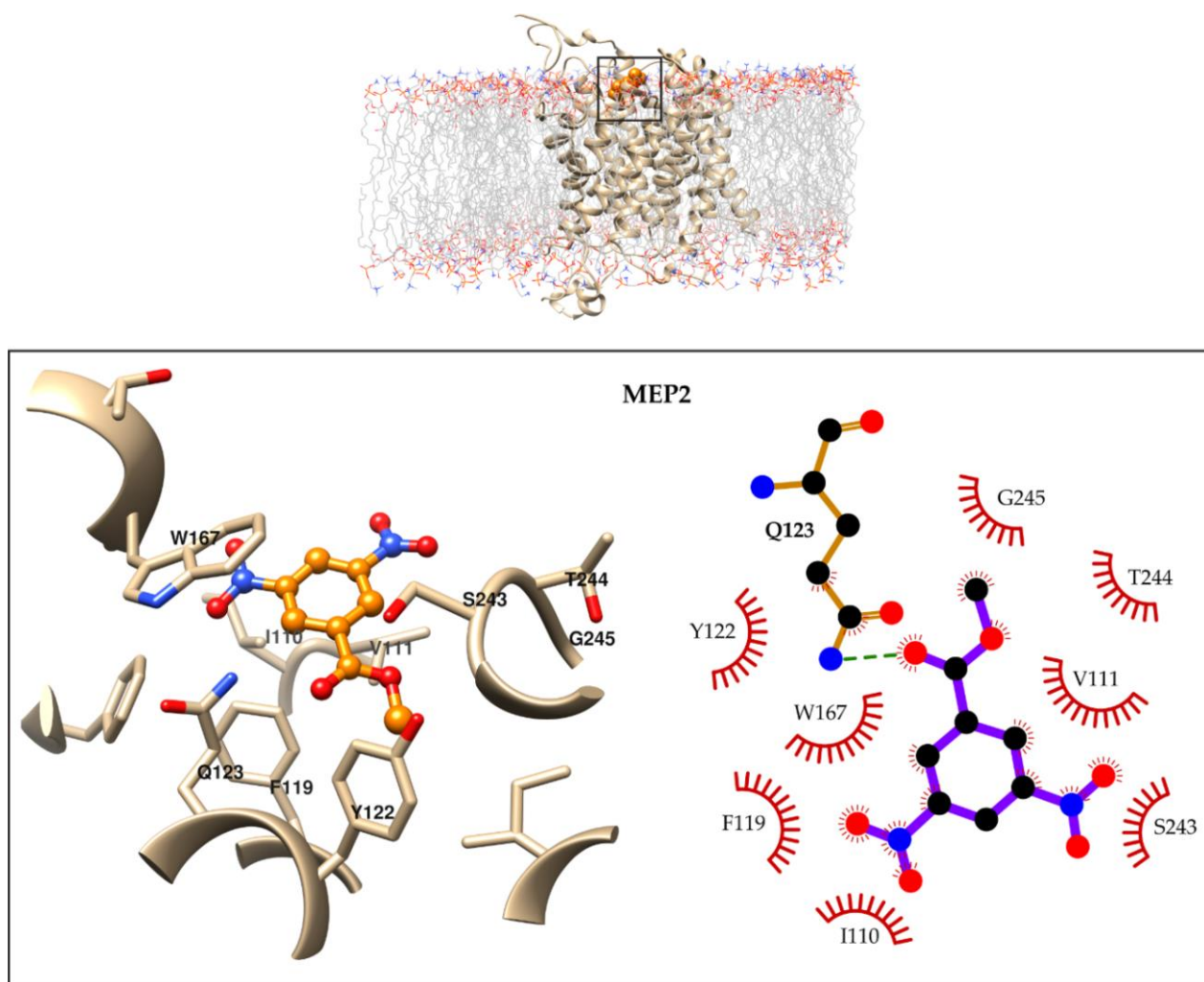


Estrutura global das conformações resultantes do ancoramento. (A) Representação em fitas. (B) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor GAP1_composto **1**. (C) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor GAP5_composto **1**.

Fonte: Elaborado pelo autor

No complexo previsto de 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**) com MEP2, mostrado na Figura 9, prevê-se que o composto se ligue na entrada do canal de transporte de amônio. O anel central se empilha na frente do W167, também interagindo com o V111 e o F119. Um dos grupos nitro do composto **1** é exposto ao solvente enquanto o segundo se orienta paralelamente à cadeia lateral de I110. Finalmente, a porção éster se enterra na cavidade de ligação e interage principalmente com Y122, Q123, S243, T244 e G245. Uma ligação de hidrogênio que contribui com a estabilidade do complexo é prevista entre o oxigênio da carbonila do composto **1** e a cadeia lateral de Q123.

Figura 9: Modo de ligação previsto do 3,5-dinitrobenzoato de metila a MEP2



Estrutura global das conformações resultantes do ancoramento. (A) Representação em fitas. (B) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor MEP2_composto **1**.

Fonte: Elaborado pelo autor

No geral, nossos resultados sugerem um mecanismo de ação antifúngico multialvo interferindo em diferentes processos celulares. Dentre as proteínas estudadas em *C. albicans*, os alvos mais prováveis do 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**) são quatro permeases de aminoácidos e um transportador de amônio. A absorção de aminoácidos é essencial para os fungos e este processo tem sido proposto como um alvo potencial para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (MCCARTHY;WALSH, 2018; GARBE;VYLKOVA, 2019). MEP2 tem sido associada não apenas ao transporte de amônio, mas também a mudanças morfológicas em *C. albicans*, tornando-se assim um alvo atraente para o desenvolvimento de compostos antifúngicos (VOLKOVA et al., 2021). Apesar dos resultados de modelagem aqui apresentados exigirem validação experimental, eles podem orientar outros ensaios de laboratório com foco no mecanismo de ação antifúngico do 3,5-dinitrobenzoato de metila.

4.7. Docking molecular do 3,5-dinitrobenzoato de etila (2)

Os potenciais alvos do composto **2** em *C. albicans* foram selecionados conforme descrito na seção “PARTE EXPERIMENTAL – QUÍMICA COMPUTACIONAL” e sua lista completa está representada na Tabela 12.

Tabela 12: Alvos potenciais do composto **2** em *C. albicans*

<i>C. albicans</i> alvos ^(a)	Descrição	ID
Q59NQ5_CANAL ^(b)	Glutathione redutase	GLR1
HSP60_CANAL ^(b)	Proteína de choque térmico 60	HSP60
Q59UP8_CANAL ^(b)	Transportador de amônio	MEP2
DCOR_CANAL ^(b)	Ornitina descarboxilase	SPE1
ERG1_CANAL ^(b)	Esqualeno monooxigenase	ERG1
KMO_CANAL ^(b)	Cinurenina 3-monooxigenase	BNA4
A0A1D8PJI5_CANAL ^(b)	Arilsulfatase	atsA
HSP90_CANAL ^(b)	Proteína de choque térmico 90	HSP90
Q5AI15_CANAL ^(d)	Proteína de ligação a poliadenilato, citoplasmática e nuclear	PAB1
A0A1D8PK40_CANAL ^(d)	Proteína ribossomal L19	RPL19A

A0A1D8PLH1_CANAL ^(d)	Transportador de proteína	TIM10
Q59YG5_CANAL ^(d)	Subunidade de translocase de membrana interna de importação mitocondrial TIM23	TIM23
A0A1D8PCB9_CANAL ^(c)	C-8 esterol isomerase	ERG2
ERG6_CANAL ^(c)	Esterol 24-C-metiltransferase	ERG6
ERG7_CANAL ^(c)	Lanosterol sintase	ERG7
A0A1D8PI71_CANAL ^(c)	Farnesil-difosfato bifuncional farnesiltransferase/esqualeno sintase	ERG9
A0A1D8PH52_CANAL ^(c)	Acetil-CoA C-acetiltransferase	ERG10
CP51_CANAL ^(c)	Lanosterol 14-alfa demetilase	ERG11
A0A1D8PEL1_CANAL ^(c)	Mevalonato quinase	ERG12
A0A1D8PTW6_CANAL ^(c)	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintase	ERG13
A0A1D8PH78_CANAL ^(c)	Bifuncional (2E,6E)-farnesil difosfato sintase/dimetilaliltransferase	ERG20
A0A1D8PD39_CANAL ^(c)	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase	HMG1
A0A1D8PLI2_CANAL ^(c)	Isopentenil-difosfato delta-isomerase	IDI1
A0A1D8PC43_CANAL ^(c)	Difosfomevalonato descarboxilase	MVD
A0A1D8PLH0_CANAL ^(d)	Fosfomevalonato quinase	ERG8
Q5A1B0_CANAL ^(d)	Esterol-4-alfa-carboxilato 3-desidrogenase (descarboxilação)	ERG26
Q5A888_CANAL ^(d)	3-ceto-esteroide redutase	ERG27
A0A1D8PJ25_CANAL ^(d)	Delta(24(24(1)))-esterol redutase	ERG4
G1UB11_CANAL ^(d)	C-22 esterol dessaturase	ERG5
Q59VG6_CANAL ^(d)	C-5 esterol dessaturase	ERG3
MSMO_CANAL ^(d)	Metilesterol monooxygenase	ERG25
A0A1D8PIC7_CANAL ^(d)	Delta(14)-esterol redutase	ERG24

Legenda: ^(a) Nome da entrada UniProt. ^(b) Previsto a partir da abordagem computacional de pesca ao alvo. ^(c) Parte da via de síntese do ergosterol. ^(d) Excluído do processo de modelagem

Fonte: Elaborado pelo autor

Até onde sabemos, não há informações anteriores sobre os alvos moleculares dos derivados de 3,5-dinitrobenzoato em *C. albicans*. Um levantamento da literatura para o mecanismo de ação antifúngico deste tipo de composto não retornou resultados. Além disso, os resultados experimentais aqui relatados confirmam que o composto **2** interfere na síntese de ergosterol em *C. albicans*. Por esta razão, a modelagem computacional foi realizada com o objetivo de identificar prováveis alvos do composto **2** que pudessem explicar sua atividade antifúngica. Em vez de focar apenas nas proteínas envolvidas na síntese de ergosterol no fungo, também incluímos outros alvos moleculares potenciais que foram selecionados seguindo a abordagem de pesca de alvos baseada em homologia descrita na seção “PARTE EXPERIMENTAL – QUÍMICA COMPUTACIONAL”.

Das 32 proteínas inicialmente selecionadas, 12 delas foram excluídas do processo de modelagem por motivos diversos. Estes estavam relacionados com a baixa qualidade dos modelos de homologia previstos, a falta de informação sobre os mecanismos das proteínas e, conseqüentemente, sobre o seu potencial de inibição, e a obtenção de modelos de homologia para apenas um pequeno fragmento da sequência alvo. A lista dos 20 receptores selecionados para estudos de modelagem é apresentada na Tabela 13. Entre estes, oito abrangendo diferentes processos biológicos foram identificados pela abordagem computacional de pesca ao alvo. Por outro lado, as 12 proteínas restantes pertencem à via de biossíntese do ergosterol em *C. albicans*. Além disso, o ERG1 que pertence à via sintética do ergosterol também foi recuperado das previsões de pesca alvo.

Tabela 13: Alvos potenciais do composto **2** em *C. albicans* selecionados para estudos de modelagem

<i>C. albicans</i> alvos ^(a)	Descrição	ID
Q59NQ5_CANAL ^(b)	Glutaciona redutase	GLR1
HSP60_CANAL ^(b)	Proteína de choque térmico 60	HSP60
Q59UP8_CANAL ^(b)	Transportador de amônio	MEP2
DCOR_CANAL ^(b)	Ornitina descarboxilase	SPE1
ERG1_CANAL ^{(b),(c)}	Esqualeno monooxigenase	ERG1
KMO_CANAL ^(b)	Cinurenina 3-monooxigenase	BNA4
A0A1D8PJ15_CANAL ^(b)	Arilsulfatase	atsA
HSP90_CANAL ^(b)	Proteína de choque térmico 90	HSP90
A0A1D8PCB9_CANAL ^(c)	C-8 esterol isomerase	ERG2
ERG6_CANAL ^(c)	Esterol 24-C-metiltransferase	ERG6
ERG7_CANAL ^(c)	Lanosterol sintase	ERG7
A0A1D8PI71_CANAL ^(c)	Farnesil-difosfato bifuncional farnesiltransferase/esqualeno sintase	ERG9
A0A1D8PH52_CANAL ^(c)	Acetil-CoA C-acetiltransferase	ERG10
CP51_CANAL ^(c)	Lanosterol 14-alfa demetilase	ERG11
A0A1D8PEL1_CANAL ^(c)	Mevalonato quinase	ERG12
A0A1D8PTW6_CANAL ^(c)	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintase	ERG13
A0A1D8PH78_CANAL ^(c)	Bifuncional (2E,6E)-farnesil difosfato sintase/dimetilaliltransferase	ERG20
A0A1D8PD39_CANAL ^(c)	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase	HMG1
A0A1D8PLI2_CANAL ^(c)	Isopentenil-difosfato delta-isomerase	IDI1
A0A1D8PC43_CANAL ^(c)	Difosfomevalonato descarboxilase	MVD

Legenda: ^(a) Nome da entrada UniProt. ^(b) Previsto a partir da abordagem computacional de pesca ao alvo. ^(c) Parte da via de síntese do ergosterol.

Fonte: Elaborado pelo autor

O protocolo descrito na seção “PARTE EXPERIMENTAL – QUÍMICA COMPUTACIONAL” foi aplicado para encaixar o composto **2** nos sítios de ligação das proteínas listadas na Tabela 13. Os resultados completos dos estudos de encaixe molecular são fornecidos na Tabela 14. A inspeção visual dos complexos previstos listados na Tabela 14 revela interações significativas entre o ligante e os receptores, com o ligante dentro das respectivas cavidades de ligação. Se o mesmo esquema de pontuação de consenso usado para a seleção das poses de ligante mais prováveis for aplicado às listadas na Tabela 14, pode-se concluir que os alvos mais pontuados são HSP90, ERG11, ERG20, ERG9 e ERG1. Por outro lado, a lista

de receptores com as piores previsões inclui GLR1, HMG1, atsA, MEP2 e MVD. Ao todo, 40 diferentes complexos ligante-receptor foram identificados através de cálculos de docking molecular com uma média de 2 orientações possíveis do composto **2** no sítio de ligação de cada receptor estudado.

Tabela 14: Resultados do acoplamento molecular do composto **2** aos seus potenciais alvos

Alvo	Conformador	CHEMPLP		GoldScore		ChemScore		ASP		Consensus
		Score	Z-Score	Score	Z-Score	Score	Z-Score	Score	Z-Score	
GLR1	1	32,28	2,20	-18,37	0,38	4,36	1,83	11,69	1,38	1,45
HSP60	1	38,95	0,94	22,68	2,12	13,61	1,99	21,02	1,83	1,72
MEP2	1	31,12	2,74	19,82	0,55	6,36	0,71	17,34	1,76	1,44
	2	28,10	1,39	22,91	1,62	6,37	0,71	16,12	1,33	1,26
SPE1	1	44,46	3,01	25,66	1,10	9,87	1,64	28,55	1,91	1,92
	2	40,97	1,86	25,20	0,91	9,66	1,47	27,02	1,48	1,43
ERG1	1	46,92	1,60	29,25	2,20	14,95	1,13	33,43	1,58	1,63
	2	47,23	1,70	23,00	-0,15	16,53	2,08	33,67	1,66	1,32
BNA4	1	49,37	1,40	23,99	0,94	17,02	1,74	28,63	0,56	1,16
	2	50,06	1,62	18,38	0,43	13,28	-0,44	33,98	2,91	1,13
	3	48,69	1,19	24,56	0,99	16,99	1,72	28,41	0,46	1,09
atsA	1	22,21	1,05	25,29	1,37	-1,17	0,67	12,91	0,88	0,99
HSP90	1	60,94	1,89	38,92	1,32	17,32	0,82	38,88	1,04	1,27
ERG2	1	37,86	1,70	22,90	1,23	14,50	1,79	27,70	1,17	1,47
	2	36,22	1,10	24,04	1,84	12,46	0,53	28,50	1,49	1,24
	3	37,07	1,41	23,19	1,38	13,10	0,92	26,04	0,50	1,05
ERG6	1	36,38	2,18	24,87	1,44	12,39	3,13	22,72	0,96	1,93
	2	34,21	1,44	21,02	0,35	10,66	1,68	25,68	2,09	1,39
	3	37,72	2,64	28,83	2,57	9,19	0,45	18,62	-0,60	1,26
ERG7	1	42,15	2,19	31,72	1,12	6,81	0,73	32,22	0,75	1,20
	2	35,69	0,38	28,42	-0,18	9,96	1,57	40,03	2,97	1,19

ERG9	1	49,50	2,18	28,28	1,74	17,04	2,18	31,97	1,07	1,79
	2	45,33	0,68	28,25	1,73	16,23	1,29	30,84	0,69	1,10
ERG10	1	43,04	2,66	24,07	1,50	14,55	1,55	27,95	2,26	1,99
	2	41,12	2,02	22,93	1,18	11,54	0,11	22,56	0,70	1,00
ERG11	1	61,79	1,64	27,23	0,58	18,61	0,98	29,41	1,30	1,13
ERG12	1	35,43	1,26	19,31	0,74	13,40	1,77	22,46	1,19	1,24
	2	34,55	0,94	19,79	0,94	14,03	2,11	21,15	0,85	1,21
	3	37,95	2,17	21,45	1,63	10,81	0,40	19,40	0,41	1,15
	4	37,94	2,16	20,23	1,12	10,15	0,05	21,53	0,95	1,07
ERG13	1	37,67	2,03	22,24	1,98	11,08	0,49	25,54	1,51	1,50
	2	36,69	1,68	22,42	2,05	12,35	1,50	22,62	0,71	1,49
	3	38,20	2,23	19,74	1,01	9,77	-0,55	28,05	2,20	1,22
ERG20	1	53,43	2,27	32,68	1,91	18,58	2,42	30,21	1,56	2,04
HMG1	1	22,69	2,36	19,13	1,61	1,00	1,78	6,93	0,91	1,67
	2	18,46	1,28	19,60	1,80	-0,11	1,30	8,12	1,24	1,41
	3	18,04	1,17	17,16	0,81	-1,52	0,69	10,91	2,02	1,17
IDI1	1	39,63	1,52	26,00	0,55	8,50	1,27	22,30	0,75	1,02
	2	37,30	1,04	28,70	1,04	6,64	0,68	24,93	1,32	1,02
MVD	1	34,25	2,10	22,92	0,95	5,50	-0,25	19,27	1,93	1,18

Fonte: Elaborado pelo autor

Foi demonstrado que o refinamento de modelos de docking molecular com simulações de DM e a estimativa de suas energias livres de ligação é uma abordagem valiosa para refinar ainda mais a lista de alvos potenciais de compostos bioativos (TURKEZ et al., 2019; LOPES et al., 2019; PEREZ-CASTILLO et al., 2020).

Levando isso em consideração, as energias livres de ligação do composto **2** às proteínas listadas na Tabela 24 foram calculadas conforme descrito na seção “**PARTE EXPERIMENTAL – QUÍMICA COMPUTACIONAL**”. Os resultados detalhados dos cálculos de MM-PBSA são fornecidos como informações de suporte na Tabela 15 e estão resumidos na Figura 10.

Tabela 15: Energias livres de ligação previstas e seus componentes para os complexos previstos para o composto **2**. Os valores de energia são expressos em kcal/mol

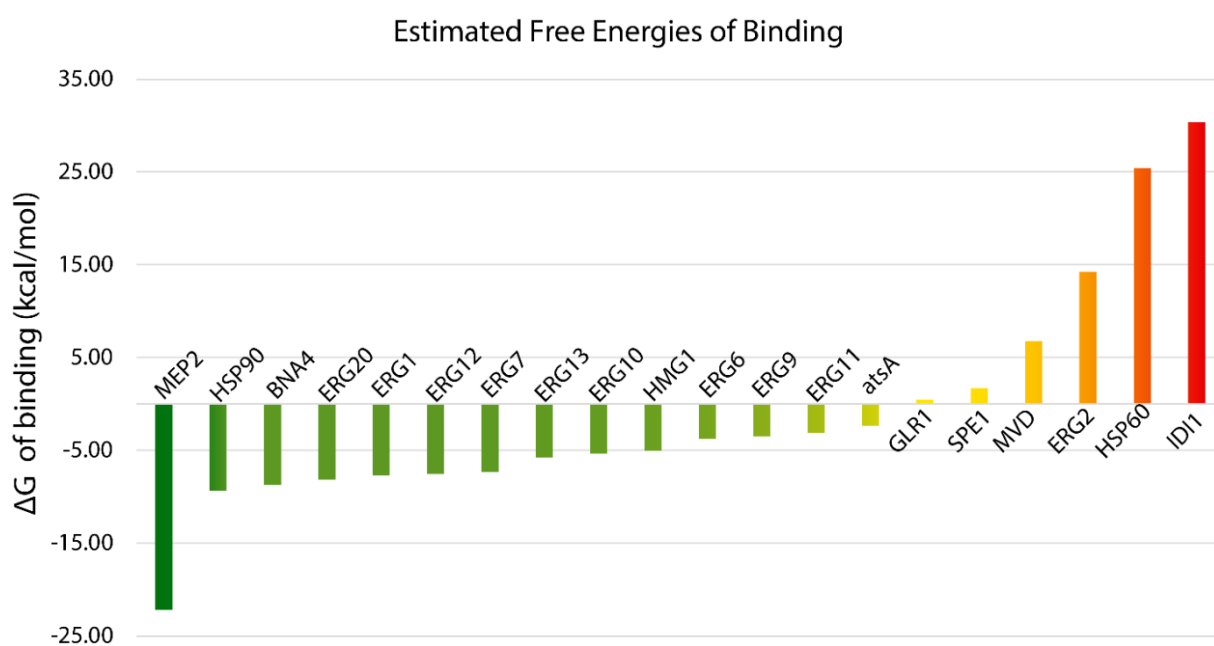
Alvo	Conformador	MM-PBSA Component							DELTA
		VDWAALS	EEL	EPB	ENPOLAR	EDISPER	DELTA G gas	DELTA G solv	TOTAL
GLR1	1	-30,64	-6,91	21,44	-20,64	37,19	-37,55	37,99	0,44
HSP60	1	-36,98	-5,07	47,43	-22,72	42,76	-42,05	67,47	25,42
MEP2	1	-34,47	-14,94	10,23	-20,97	37,98	-49,41	27,24	-22,17
	2	-28,62	-14,20	10,26	-17,31	33,59	-42,82	26,55	-16,27
SPE1	1	-37,27	-7,15	25,38	-22,17	42,87	-44,42	46,09	1,67
	2	-39,35	-6,81	35,43	-23,42	43,79	-46,16	55,80	9,64
ERG1	1	-36,71	-5,54	16,29	-24,15	42,41	-42,25	34,55	-7,71
	2	-40,85	-2,85	17,33	-24,37	43,58	-43,71	36,54	-7,17
BNA4	1	-36,03	-7,71	27,83	-22,48	40,43	-43,74	45,78	2,04
	2	-36,44	-10,27	21,47	-23,44	39,94	-46,70	37,98	-8,72
	3	-41,37	-8,89	28,47	-23,82	42,48	-50,27	47,13	-3,14
atsA	1	-40,63	-4,93	24,34	-24,30	43,19	-45,56	43,24	-2,32
HSP90	1	-37,88	-8,47	20,08	-23,50	40,45	-46,34	37,02	-9,32
ERG2	1	-37,38	-3,33	34,46	-22,86	43,36	-40,71	54,96	14,24
	2	-41,07	-2,28	59,49	-23,34	41,08	-43,35	77,23	33,88
	3	-39,85	1,24	42,29	-23,46	42,35	-38,62	61,18	22,56
ERG6	1	-31,82	-3,14	29,01	-20,37	35,94	-34,96	44,58	9,62
	2	-31,26	-7,54	22,75	-19,73	34,37	-38,80	37,39	-1,41
	3	-32,76	-9,01	23,71	-20,48	34,79	-41,78	38,01	-3,76
ERG7	1	-41,67	-3,58	18,32	-24,17	43,78	-45,25	37,93	-7,32
	2	-41,41	-12,14	27,81	-24,53	43,73	-53,55	47,01	-6,54
ERG9	1	-34,27	-3,75	16,13	-21,53	40,88	-38,03	35,48	-2,55
	2	-34,07	-0,07	12,21	-22,03	40,45	-34,14	30,63	-3,50
ERG10	1	-36,71	-8,02	21,64	-23,21	40,97	-44,73	39,40	-5,34
	2	-32,05	-2,30	15,76	-20,33	36,61	-34,36	32,04	-2,32

ERG11	1	-40,29	0,37	17,01	-23,21	43,02	-39,92	36,83	-3,09
	1	-30,35	-5,77	17,75	-20,93	35,85	-36,11	32,67	-3,45
ERG12	2	-34,41	-3,90	14,94	-22,03	37,87	-38,32	30,78	-7,54
	3	-36,51	-4,99	18,92	-23,05	40,09	-41,51	35,96	-5,55
	4	-26,85	-2,08	11,08	-18,64	31,59	-28,94	24,03	-4,91
	1	-34,60	-11,52	21,62	-22,48	41,24	-46,12	40,39	-5,74
ERG13	2	-37,61	-13,34	26,83	-23,03	41,72	-50,95	45,52	-5,43
	3	-38,24	-1,60	16,20	-23,14	41,80	-39,84	34,86	-4,98
ERG20	1	-36,58	-10,77	23,26	-23,43	39,37	-47,36	39,20	-8,16
	1	-32,34	-6,87	18,33	-20,25	36,11	-39,21	34,20	-5,01
HMG1	2	-31,41	-1,37	14,45	-19,18	36,16	-32,78	31,43	-1,35
	3	-29,86	-4,48	20,06	-19,69	35,27	-34,34	35,65	1,31
IDI1	1	-38,64	-4,88	59,17	-23,42	43,90	-43,52	79,65	36,14
	2	-40,19	-9,15	58,96	-23,47	44,21	-49,34	79,70	30,36
MVD	1	-30,24	-3,49	23,10	-18,14	35,51	-33,73	40,47	6,74

Fonte: Elaborado pelo autor

Na figura 10 é apresentada a pose do ligante com o menor valor previsto de ΔG de ligação para cada alvo molecular usado para modelagem.

Figura 10: Energias livres previstas de ligação do composto **2** aos seus alvos potenciais classificados do melhor ΔG de ligação (verde) ao pior (vermelho)



Fonte: Elaborado pelo autor

As previsões das energias livres de ligação mostram que os complexos formados pelo composto **2** com a maioria dos alvos avaliados são viáveis ($\Delta G < 0$). Prevê-se que apenas as proteínas GLR1, SPE1, MVD, ERG2, HSP60 e IDI1 formem complexos instáveis com o ligante. Por outro lado, os menores valores de ΔG de ligação são obtidos para os alvos MEP2, HSP90, BNA4, ERG20 e ERG1. É interessante notar que os três alvos mais bem classificados (MEP2, HSP90 e BNA4) foram previstos através da abordagem de pesca ao alvo e não fazem parte da via de biossíntese de ergosterol em *C. albicans*. Além disso, entre os 13 alvos moleculares para os quais as energias livres de ligação previstas são inferiores a -3 kcal/mol, 10 estão diretamente ligados à síntese de ergosterol. No geral, os resultados da modelagem concordam com as observações experimentais de que o composto **2** reduz os níveis de ergosterol no fungo, mas também aponta para um possível mecanismo alternativo de ação. Com base nos resultados da modelagem, decidimos investigar os complexos previstos do composto com os alvos MEP2, HSP90, ERG20, ERG1, ERG12 e ERG7. Os dois primeiros não estão diretamente relacionados à via de síntese do ergosterol, enquanto os demais fazem parte dela.

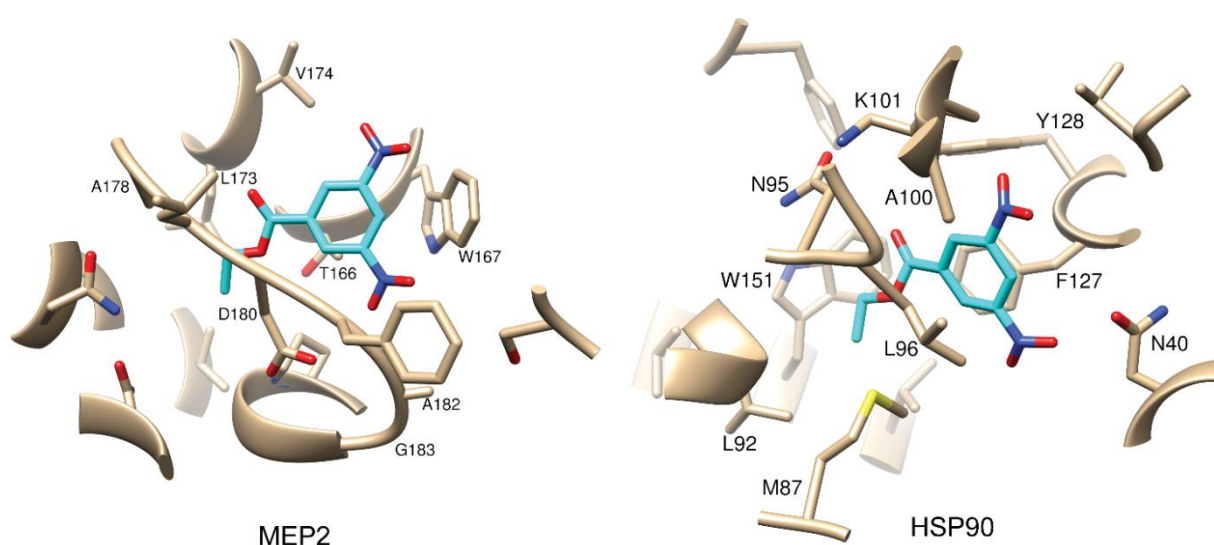
Os modos de ligação previstos do composto **2** aos alvos MEP2 e HSP90 são mostrados na Figura 11. As estruturas representadas nas figuras foram selecionadas como os centróides dos clusters mais populosos obtidos do agrupamento dos conformeros do ligante ao longo dos instantâneos de 200ns usados para Cálculos MM-PBSA. Todas as imagens contendo estruturas moleculares foram produzidas com UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004). As redes de interações ligante-receptor previstas são fornecidas como informações de suporte na Figura 12 e foram obtidas com o Cytoscape (SHANNON et al., 2003).

Prevê-se que o composto **2** interaja com MEP2 e HSP90 principalmente através de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Para MEP2 nenhuma ligação de hidrogênio é prevista para formar no complexo enquanto para HSP90 as ligações de hidrogênio do ligante para Y128 em uma pequena fração (17%) dos instantâneos DM analisados. Uma característica comum a ambos os complexos é que o anel fenil do ligante se empilha na frente dos aminoácidos aromáticos, W167 de MEP2 e F127 de HSP90. Nossa hipótese é que essas interações de empilhamento π - π servem como âncora para a ligação e têm uma contribuição determinante para a estabilização dos complexos.

Em MEP2, prevê-se que o composto **2** se oriente com um de seus grupos

nitro apontando para a entrada da cavidade, enquanto o outro, bem como a porção éster, se orientam para o fundo do canal de ligação de amônio. Além do empilhamento com W167, o composto também interage em mais de 50% dos snapshots DM analisados com T166, L173, V174, A178, D180, A182 e G183. No modelo previsto de ligação a HSP90, o composto **2** é orientado com os dois grupos nitro ocupando a entrada da cavidade de ligação e o substituinte éster voltado para W151 na parte inferior da bolsa do receptor. O resto da interação mais frequente do produto químico com HSP90 inclui N40, M87, L92, N95, L96, A100, K101 e Y128.

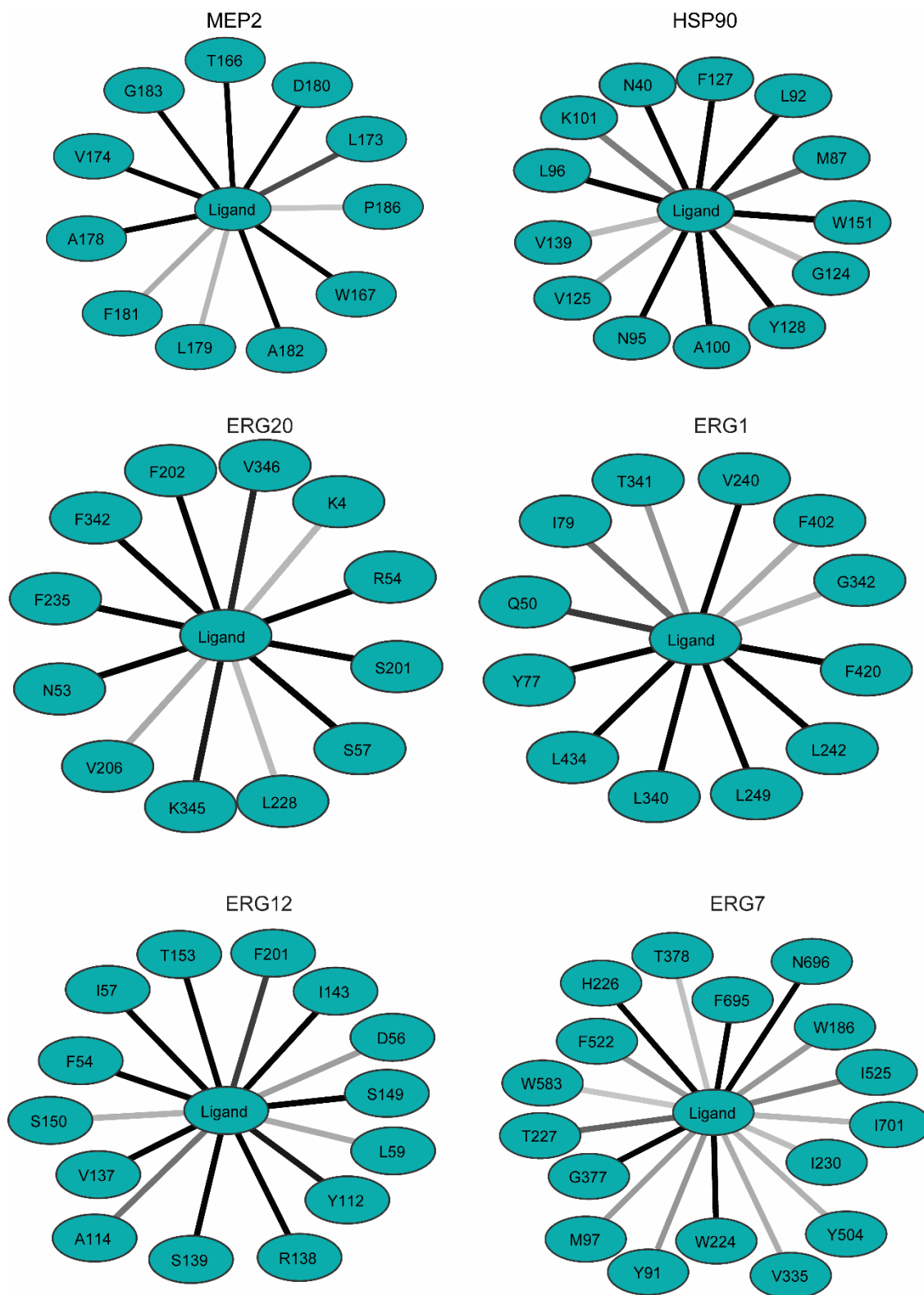
Figura 11: Os modos de ligação previstos do composto **2** aos alvos MEP2 (esquerda) e HSP90 (direita)



Estrutura global das conformações resultantes do ancoramento. (A) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor MEP2_composto **2**. (B) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor HSP90_composto **2**.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12: Rede prevista de interações do composto **2** para os alvos MEP2, HSP90, ERG20, ERG1, ERG12 e ERG7.



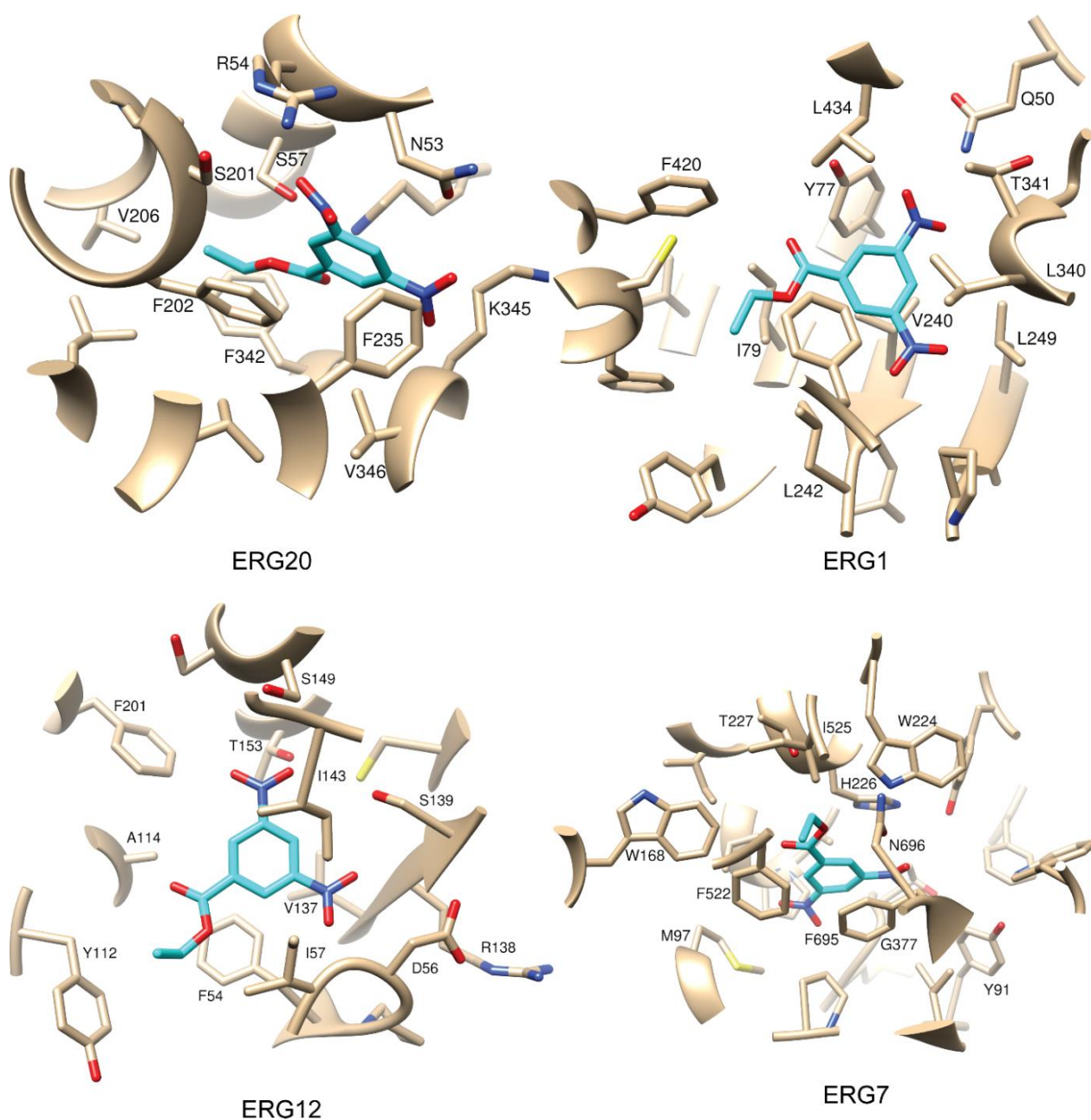
Rede prevista de interações do composto **2** para os alvos MEP2, HSP90, ERG20, ERG1, ERG12 e ERG7. Linhas mais escuras indicam interações mais frequentes ao longo dos instantâneos de 200 DM empregados para cálculos de MM-PBSA.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os complexos previstos para o composto **2** com os alvos ERG20, ERG1, ERG12 e ERG7 que fazem parte da via de síntese de ergosterol em *C. albicans* são mostrados na Figura 13. Algo comum a esses complexos, como observado anteriormente também para MEP2 e HSP90, é o empilhamento do anel fenil do ligante na frente dos resíduos aromáticos dos receptores: F202 de ERG20; F402 e Y77 de ERG1; F54 de ERG12; e F695 e H226 de ERG7. Embora mais frequente do que com os alvos discutidos anteriormente, observa-se pouca presença de ligações de hidrogênio com os receptores pertencentes à via do ergosterol. A maior frequência de interações de ligações de hidrogênio entre esses alvos é obtida para ERG1 através das cadeias laterais de Q50 e Y77 em 41% e 59% dos instantâneos DM analisados, respectivamente. Da mesma forma, esse tipo de interação é observado em 10% e 25% dos snapshots analisados com o backbone do A114 no ERG12 e com a cadeia lateral do K4 no ERG20, respectivamente. Finalmente, o composto **2** aceita ligações de hidrogênio das cadeias laterais de Y504 e W224 de ERG7 com baixa frequência (menos de 15%).

No geral, os complexos com ERG20, ERG1, ERG12 e ERG7 são principalmente estabilizados por Van der Waals e interações hidrofóbicas, além da âncora que postulamos a partir das interações de empilhamento π - π entre o anel fenil do ligante e os resíduos aromáticos dos receptores. Uma observação interessante é que o composto **2** não interage diretamente com o cofator FAD de ERG1 e, em vez disso, ocupa uma subbolso hidrofóbica do outro lado da cavidade de ligação. Ainda assim, essa localização do ligante interfere na ligação do substrato à enzima. Além dos resíduos listados anteriormente, aqueles em contato com o composto **2** nos alvos envolvidos na síntese do ergosterol são: N53, R54, S57, S201, V206, F235, F342, K345, V346 em ERG20; Q50, I79, V240, L242, L249, L340, T341, F420, L434 em ERG1; D56, I57, Y112, A114, V137, R138, S139, I143, S149, T153, F201 em ERG12; e Y91, M97, W186, W224, T227, G377, F522, I525, N696 em ERG7.

Figura 13: Modos de ligação previstos do composto **2** para os alvos ERG20 (superior esquerdo), ERG1 (superior direito), ERG12 (inferior esquerdo) e ERG7 (inferior direito)



Estrutura global das conformações resultantes do ancoramento. (A) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor ERG20_composto **2**. (B) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor ERG1_composto **2**. (C) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor ERG12_composto **2**. (D) Diagrama LigPlot+ da interação do Receptor ERG7_composto **2**.

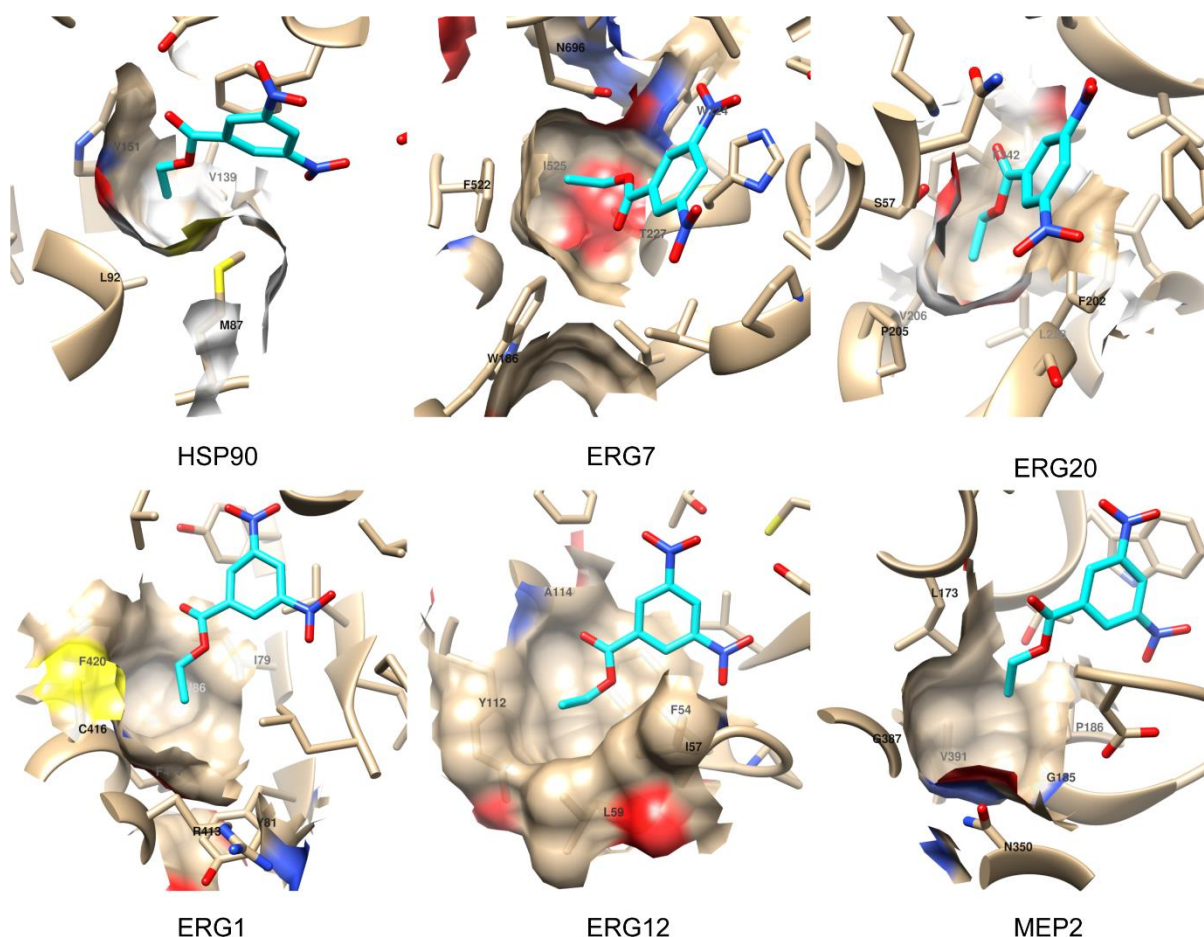
Fonte: Elaborado pelo autor

Em resumo, os resultados da modelagem apontam para um mecanismo de ação antifúngico multialvo para o composto **2** em *C. albicans* relacionado a diferentes processos celulares. Também estão de acordo com a interferência experimental deste composto na síntese do ergosterol. A síntese de ergosterol tem se mostrado um processo crítico em *C. albicans*, com ERG20, ERG1, ERG12 e ERG7 previamente identificados como essenciais para seu crescimento e virulência e propostos como alvos para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (BECKER et al., 2010; PASRIJA et al., 2005; NAKAYAMA et al., 2011; BHATTACHARYA; ESQUIVEL; WHITE, 2018; SHAH; WU; CHEN, 2019). Além disso, MEP2 é um importante componente regulatório no desenvolvimento dos fungos, tornando-se assim um potencial alvo de drogas (RUTHERFORD et al., 2019). Finalmente, HSP90 também foi validado como alvo molecular para compostos antifúngicos contra *C. albicans* (O'MEARA; ROBBINS; COWEN, 2017; WHITESELL et al., 2019). Curiosamente, o comprometimento de HSP90 neste fungo resulta em níveis reduzidos de ergosterol por meio de um mecanismo que ainda precisa ser determinado (HAUWENHUYSE; FIORI; VAN DIJCK, 2014).

Para investigar ainda mais a influência dos substituintes na atividade antifúngica da série de compostos, examinamos o ambiente estérico da região onde se prevê que o grupo etil do composto **2** se ligue em cada receptor. Isso é ilustrado na Figura 14, onde são apresentadas as superfícies moleculares das regiões das proteínas que interagem com o grupo etil do composto **2**. Esta análise revela que esta região está estericamente restrita em HSP90, ERG7 e ERG20. Assim, substituintes grandes e volumosos não são permitidos nestas subcavidades formadas em HSP90, ERG7 e ERG20. Por outro lado, as regiões que acomodam o grupo etil podem aceitar substituintes maiores em ERG1, ERG12 e MEP2. No caso do ERG12, a cadeia alquílica localiza-se na entrada da cavidade de ligação, o que proporciona flexibilidade no tipo de substituintes capazes de reter a inibição do transporte de amônio. As limitações estéricas observadas nas cavidades de ligação de HSP90, ERG7 e ERG20 poderiam explicar a melhor atividade antifúngica dos compostos **2** e **3** que apresentam cadeias alquílicas lineares curtas. Ou seja, grupos alquil curtos são necessários para reter a ligação simultânea aos seis receptores. Em contraste, compostos com substituintes mais volumosos serão incapazes de se ligar a HSP90, ERG7 e ERG20, mas podem interagir com ERG1, ERG12 e MEP2. Em consequência, as relações estrutura-atividade observadas para a série de compostos não podem ser explicadas

a partir de apenas um de seus alvos propostos. Essas observações apóiam o mecanismo de ação antifúngico multialvo proposto para o composto **2**.

Figura 14: Representação da superfície da região dos alvos potenciais do composto **2** interagindo com seu grupo etila.



Fonte: Elaborado pelo autor

A previsão das propriedades físico-químicas e toxicidade do composto **2** e da nistatina antifúngica de referência foram obtidas com os servidores web SwissADME e pkCSM, respectivamente (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017; PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). De acordo com os resultados dessas previsões apresentadas na Tabela 16, a nistatina excede o peso molecular e a área de superfície polar topológica (TPSA) considerados adequados para biodisponibilidade oral. Por outro lado, o composto **2** está dentro da região aconselhável de propriedades físico-químicas e oferece espaço para sua otimização sem afetar a

biodisponibilidade oral. O servidor SwissADME prevê ambos os compostos com alertas 0 PAINS. Em termos de toxicidade, o composto **2** e a nistatina são previstos como não inibidores de hERG I e hERG II, bem como não hepatotóxicos e não indutores de sensibilização da pele. Uma grande diferença em termos de toxicidade são as doses toleradas previstas, com o composto **2** tendo uma dose tolerada 100 vezes menor que a nistatina. Finalmente, o composto **2** é previsto como carcinogênico em contraste com a nistatina, possivelmente ligado à presença dos grupos nitro. No geral, a análise das propriedades físico-químicas e a toxicidade prevista do composto **2** indicam que há oportunidades para modificar suas propriedades físico-químicas sem afetar sua biodisponibilidade oral. Além disso, é necessária a avaliação experimental do potencial mutagênico do composto antes de proceder à sua otimização. Considerando que o composto **2** é um composto de sucesso, sua otimização de calor para chumbo exigirá a melhoria de seu perfil toxicológico juntamente com sua bioatividade.

Tabela 16: Previsões físico-químicas e ADMET para o composto **2** e nistatina

Parâmetros	Composto 2	Nistatina
Propriedades físico-químicas		
Peso molecular (g/mol)	240.17	926.09
Títulos rotativos	5	3
Aceitadores de ligação H	6	18
Doadores de ligação H	0	12
Fração Csp3	0.22	0.7
TPSA (A3)	117.94	319.61
Toxicidade		
Toxicidade AMES	Sim	Não
Máx. dose tolerada (humano, log(mg/kg/dia))	0.003	0.281
inibidor de hERG I	Não	Não
inibidor de hERG II	Não	Não
Toxicidade aguda oral em ratos (LD50, mol/kg)	2.721	2.518
Toxicidade Crônica de Ratos Orais (LOAEL, log(mg/kg_bw/dia))	1.439	2.035

Hepatotoxicidade	Não	Não
Sensibilização da pele	Não	Não

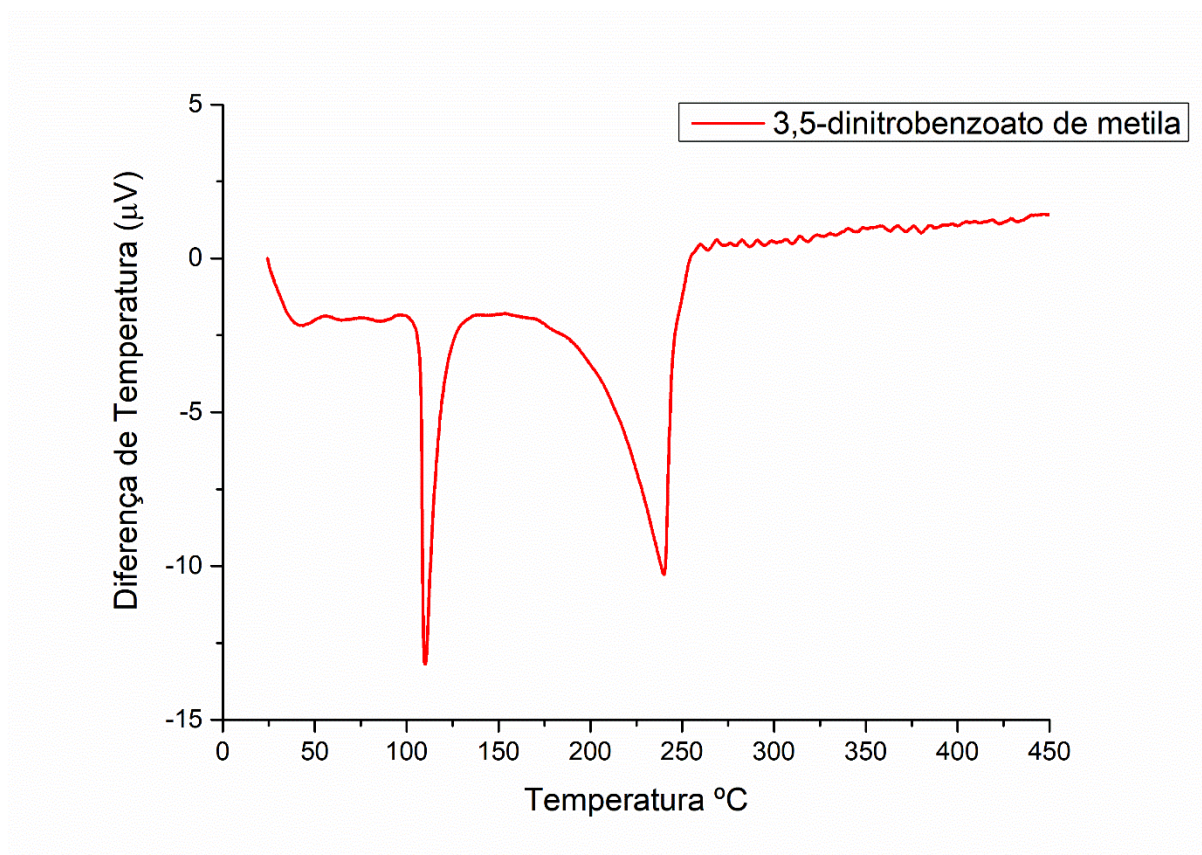
Fonte: Elaborado pelo autor

São necessários mais experimentos para entender completamente o mecanismo de ação antifúngico dos compostos aqui propostos. Nesse sentido, nossos modelos são ferramentas valiosas para orientar e otimizar esses próximos experimentos, fornecendo hipóteses sobre seus potenciais mecanismos de ação. Além disso, os modelos desenvolvidos são úteis para a otimização da potência e seletividade de novos compostos antifúngicos com base no andaime químico aqui estudado. Além das melhorias na atividade antifúngica dos derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico, suas propriedades físico-químicas e toxicológicas também devem ser otimizadas.

4.8. Análise térmica do composto 1

4.8.1. Análise térmica diferencial (DTA)

As técnicas termoanalíticas têm sido amplamente utilizadas em estudos de caracterização e decomposição térmica de fármacos (BÖER et al., 2013). A curva DTA do 3,5-dinitrobenzoato de metila (Figura 15) eventos decorrentes de transições de fases em função da temperatura. O primeiro pico endotérmico ocorreu a uma temperatura de 110,68°C próxima à relatada por Legouin et al., 2010 (109-111°C), correspondente a fusão da amostra. O segundo evento endotérmico ocorreu a uma temperatura de 239,12 °C, atribuído à degradação do composto. Os dados térmicos estão descritos na Tabela 17.

Figura 15: Curva DTA do 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**)

Fonte: Elaborado pelo autor

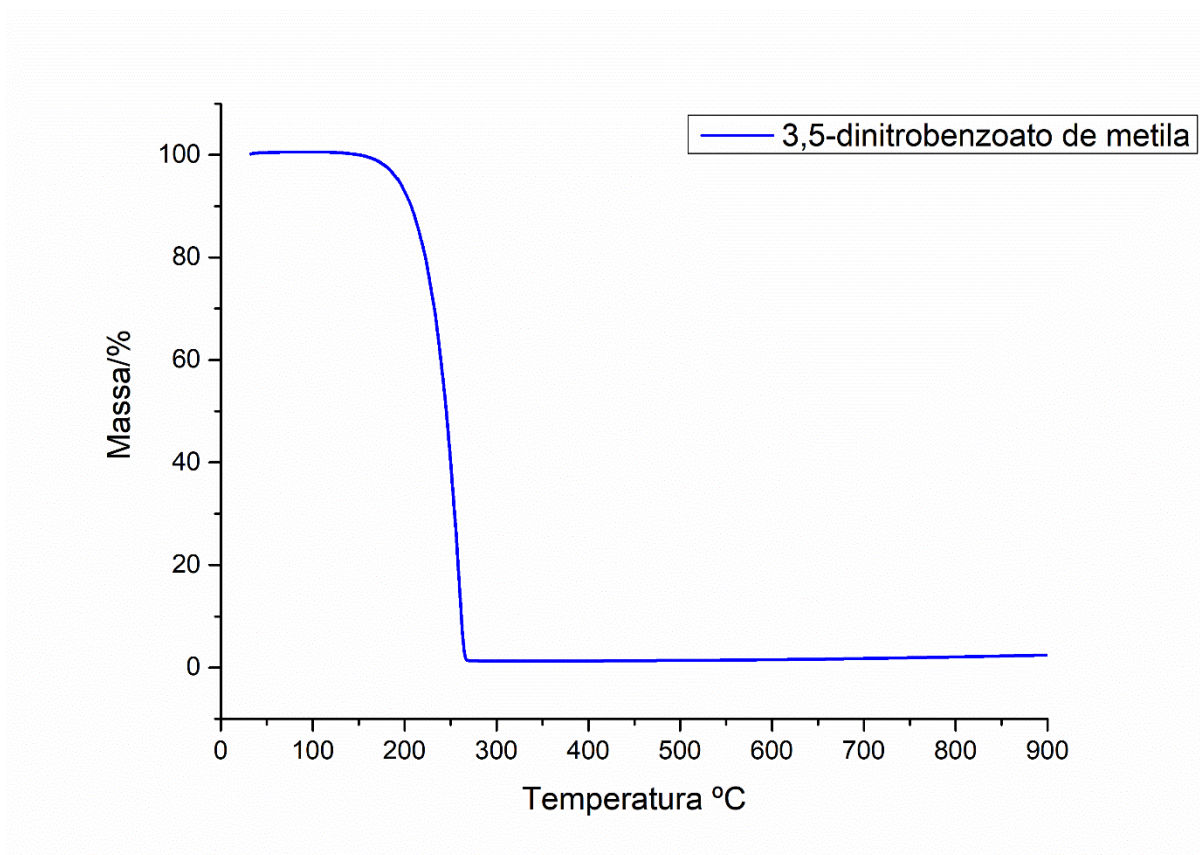
Tabela 17: Dados da análise térmica diferencial do 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**)

Amostra	Pico 1			Pico 2		
	Início-Final ($^{\circ}C$)	Pico ($^{\circ}C$)	ΔH (J/g)	Início-Final ($^{\circ}C$)	Pico ($^{\circ}C$)	ΔH (J/g $^{-1}$)
1	107,04-119,84	110,68	108,69	213,41-246,10	239,12	377,78

Fonte: Elaborado pelo autor

4.8.2. Termogravimetria (TG)

A curva termogravimétrica do 3,5-dinitrobenzoato de metila (Figura 16) mostrou um único estágio de decomposição. O processo de decomposição inicia em 231,82 $^{\circ}C$, e continua até a faixa analisada, que representa uma perda de 98,98% da massa da amostra. A Tabela 18 lista os valores associados à decomposição termogravimétrica do 3,5-dinitrobenzoato de metila.

Figura 16: Curva TG do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 18: Dados de decomposição do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

Amostra	Temperatura Inicial (°C)	Temperatura Final (°C)	Perda de Massa (%)
1	231,82	264,22	98,98

Fonte: Elaborado pelo autor

4.9. Preparação da nanoemulsões de 3,5-dinitrobenzoato de metila (MDNB-NE) e nanoemulsão branca (BNE) e análise do teor

Neste estudo, foram desenvolvidas duas nanoemulsões, a primeira com o composto 3,5-dinitrobenzoato de metila (MDNB-NE) e a segunda sem essa molécula, na forma de uma nanoemulsão em branco (BNE), pelo método de ultrassom.

O ultrassom foi escolhido como método devido à sua capacidade de formar pequenas gotículas com um consumo mínimo de energia. Esse método quebra as gotículas de emulsão aplicando ondas de ultrassom de alta frequência (NIRMALA et al., 2020; PÁEZ-HERNÁNDEZ, 2019). Durante esse processo, forças disruptivas causadas pelo sonicador promovem turbulência e cavitação na amostra, quebrando gotas maiores em gotas menores, criando condições para interações entre os surfactantes e a fase oleosa (WU et al., 2021; MCCLEMENTS, 2011).

Na Figura 17 é possível observar que as nanoemulsões permaneceram macroscopicamente estáveis e preservando a aparência leitosa sem formação de creme ou separação de fases durante 90 dias.

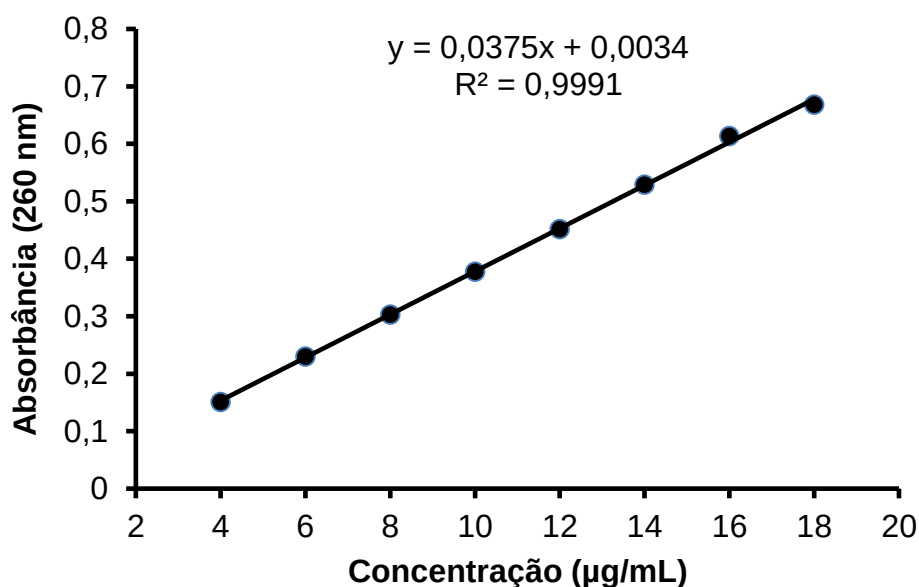
Figura 17: Aspecto visual da nanoemulsão em branco (BNE) e nanoemulsão com 3,5-dinitrobenzoato de metila (MDNB-NE) após 90 dias de armazenamento a 4 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor

O teor de 3,5-dinitrobenzoato de metila na nanoemulsão foi analisado utilizando o espectro UV-vis. Os dados foram obtidos pela absorbância ($A = 0,37 \pm 0,004$) na curva padrão ($y = 0,0375x + 0,0034$), com coeficiente de determinação de 0,9991 (Figura 18). A formulação apresentou um rendimento de 98,90% referente a $9,89 \mu\text{g/mL}$ de ativo. Recentemente, Dantas e colaboradores (2021) também utilizaram Tween 80®, Span 80® e MCT, nas mesmas proporções deste estudo, para desenvolver uma nanoemulsão pelo método de ultrassom e obtiveram um rendimento de 87,83%.

Figura 18: Curva de calibração do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)



Fonte: Elaborado pelo autor

4.10. Caracterização e estudo de estabilidade das nanoemulsões

Os parâmetros do tamanho da gotícula e índice de polidispersão (PDI) foram avaliados durante 90 dias pela técnica de espalhamento dinâmico de luz e pH. Os resultados são mostrados na tabela 19.

A MDNB-NE teve um diâmetro médio de gota (média z) de $185,46 \pm 4,01 \text{ nm}$ após 90 dias, próximo aos valores do BNE (tabela 30), mostrando que o 3,5-dinitrobenzoato de metila não influenciou o diâmetro médio de gota da nanoemulsão. Uma ligeira variação no tamanho médio das gotas foi observada em comparação com

o tamanho médio das gotas nos dias 1 e 90. Além disso, nenhuma formação de creme ou separação de fases foi observada na observação visual, confirmando a estabilidade do nanossistema (Tabela 30). O tamanho das gotas e a estabilidade das nanoemulsões resultam do processamento empregado e dos componentes da formulação. Os surfactantes foram imprescindíveis para promover a estabilidade. Dois tensoativos não iônicos foram utilizados neste estudo: Tween 80® e Span 80®. Esses tensoativos foram escolhidos por sua baixa toxicidade e por já serem utilizados na preparação de nanoemulsões com alta estabilidade (LANDA et al., 2009; FELÍCIO et al., 2021; DAVIS et al., 2019; PENSADO et al., 2014).

Outro fator que contribuiu para a estabilidade dessas nanoemulsões foi a presença de um triglicerídeo de cadeia média (Mygliol® 812). O principal objetivo de usar um triglicerídeo de cadeia média é transportar a molécula alvo dentro das gotículas de óleo. Além disso, o triglicerídeo de cadeia média pode retardar o fenômeno de maturação de Ostwald, que é um dos mais importantes mecanismos de desestabilização de sistemas dispersos (RYU et al., 2019).

O índice de polidispersidade (PDI) é utilizado para medir a homogeneidade e estabilidade de uma nanoemulsão, e a MDNB-NE não apresentou alta variação de PDI ao longo do tempo, com valores $\leq 0,3$ (Tabela 30). Este parâmetro avalia o grau de uniformidade da distribuição do tamanho das gotas dentro do sistema (DANAEI et al., 2018). Valores de PDI de 0 indicam uma partícula monodispersa. Um $PDI \leq 0,3$ indica uma distribuição homogênea, valores próximos a 1 indicam uma nanoemulsão polidispersa (MOHD NARAWI et al., 2020; DEGHIEDY et al., 2021).

Tabela 19: Parâmetros de estabilidade das nanoemulsões (MDNB-NE) e (BNE): diâmetro médio da gota, índice de polidispersão e pH

Nanoemulsão	Análise do dia	Diâmetro médio da gota (nm)	PDI	pH
MDNB-NE	1	181,16±3,20	0,30±0,03	4,75
	7	187,00±4,34	0,27±0,02	4,75
	15	185,93±3,37	0,297±0,02	4,77
	45	181,93±3,24	0,32±0,02	4,34
	60	187,90±0,5	0,27±0,01	4,64
	90	185,46±4,01	0,28±0,02	4,64
BNE	1	179,70±3,17	0,33±0,03	5,02
	7	179,93±1,70	0,31±0,03	5,09
	15	181,86±1,15	0,28±0,003	5,11
	45	184,66±1,61	0,28±0,007	4,90
	60	180,93±5,49	0,30±0,01	4,84
	90	182,96±1,46	0,29±0,02	4,86

Fonte: Elaborado pelo autor

4.11. Teste de atividade antifúngica das nanoemulsões

Embora a literatura científica relate as atividades antifúngicas de vários ésteres derivados do ácido benzoico contra espécies de *Candida*, a bioatividade do 3,5-dinitrobenzoato de metila nunca foi testada (SILVA et al., 2017; LIMA et al., 2018a; LIMA et al., 2018b; Perez -Castillo et al., 2020).

Além disso, no estudo desenvolvido por Lima et al. (2018b), um análogo do composto **1**, o metil 3-metil-4-nitrobenzoato, apresentou atividade antifúngica contra diferentes cepas do gênero *Candida*. Assim, o presente estudo avaliou a atividade antifúngica do composto **1** e do MDNB-NE contra cepas de *Candida albicans* (LIMA et al., 2018b).

As concentrações inibitórias mínimas (MICs) e concentrações fúngicas mínimas (MFCs) para o composto **1** e MDNB-NE são apresentadas na Tabela 20. Uma nanoemulsão sem MDNB (BNE), também foi usada como controle e não mostrou atividade contra qualquer patógeno fúngico, indicando que os componentes da

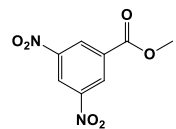
formulação não exibiram atividade antifúngica nas concentrações utilizadas neste estudo (Tabela 31).

As relações MFC/MIC mostraram que o composto **1** e MDNB-NE tiveram efeitos fungicidas contra *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* PLA5 e *C. albicans* PLA15. Os resultados demonstraram que MDNB-NE não apresentou atividade fungicida (MFC/MIC ≥ 4) contra *C. albicans* PLA1. A MDNB-NE (MFC: 1,10 mM) foi mais eficaz que o composto livre o 3,5-dinitrobenzoato de metila (MFC: 2,21 mM) contra *C. albicans* ATCC 90028. Andrade e colaboradores (2019), desenvolveram uma nanoformulação carregada com composto nitro que também mostrou uma atividade antimicrobiana aumentada em comparação com o composto livre (ANDRADE et al., 2019).

As cepas clínicas *C. albicans* PLA1 e *C. albicans* PLA5 apresentaram resistência ao medicamento de referência cetoconazol. No entanto, o composto **1** e o MDNB-NE apresentaram CIMs na faixa de 0,27–1,10 mM e inibiram o crescimento de cepas clínicas, comprovando que o desenvolvimento de compostos antifúngicos é uma estratégia essencial para a obtenção de novos fármacos com eficácia semelhante ou superior às observadas para os medicamentos disponíveis (ALVES et al., 2021).

O MDNB-NE apresentou a mesma CIM (1,10 mM) do composto **1** contra ATCC 90028. Entretanto, para as cepas clínicas, a CIM da MDNB-NE foi superior à do composto **1**, indicando que o composto livre foi mais eficaz em inibir o crescimento dessas cepas *in vitro*. Essa maior ação sobre *C. albicans* pode estar relacionada à pronta disponibilidade do fármaco em disseminação no meio (RIBEIRO et al., 2016). Além disso, esse resultado também pode estar associado ao fato de que o modelo *in vitro* utilizado neste estudo apresenta limitações e não consegue avaliar a capacidade das nanoemulsões em melhorar a absorção e permeabilidade do fármaco (ANUAR et al., 2020). Assim, estudos complementares *in vivo* podem ser realizados para entender melhor o efeito do 3,5-dinitrobenzoato de metila carregado em uma nanoemulsão.

Tabela 20: Concentrações inibitórias e fungicidas mínimas (CFM/CIM) do composto **1**, MDNB-NE e BNE expressas em (µg/mL) e (mM).

Compostos	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)			<i>Candida albicans</i> (PLA1)			<i>Candida albicans</i> (PLA5)			<i>Candida albicans</i> (PLA 15)		
	CIM (µg/mL)/(mM)	CFM (µg/mL)/(mM)	CFM/CIM	CIM (µg/mL)/(mM)	CFM (µg/mL)/(mM)	CFM/CIM	CIM (µg/mL)/(mM)	CFM (µg/mL)/(mM)	CFM/CIM	CIM (µg/mL)/(mM)	CFM (µg/mL)/(mM)	CFM/CIM
1												
	250/1,10	500/2,21	2	62,5/0,27	125/0,55	2	62,5/0,27	125/0,55	2	62,5/0,27	62,5/0,27	2
MDNB-NE	250/1,10	250/1,10	1	250/1,10	+		250/1,10	250/1,10	1	250/1,10	250/1,10	1
BNE	+			+			+			+		
Nistatina	1,5/0,0016	1,5/0,0016	1	1,5/0,0016	1,5/0,0016	1	3/0,0032	3/0,0032	1	3/0,0032	3/0,0032	1
Cetoconazol	0,5/0,00094	0,5/0,00094	1	0,5/0,00094	0,5/0,00094	1	1/0,0018	1/0,0018	1	1/0,0018	1/0,0018	1
Meio de Controle	-			-			-			-		
Controle de crescimento de fungos	+			+			+			+		
Solução de DMSO a 5%	+			+			+			+		

(+): indica o crescimento do microrganismo. (-): sem crescimento do microrganismo

Fonte: Elaborado pelo autor

4.12. Mecanismo de ação do 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**) e da nanoemulsão (MDNB-NE)

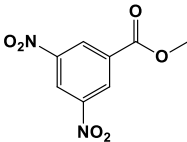
O mecanismo pelo qual o composto **1** atua contra *Candida albicans* ainda não foi descrito. Assim, o composto **1** e sua nanoemulsão foram submetidos a testes para elucidar o possível mecanismo de ação contra as cepas de *Candida albicans* ATCC 90038. Ergosterol e sorbitol foram utilizados para determinar os prováveis alvos de ação farmacológica (Tabela 21).

O ergosterol é o principal esterol da membrana celular fúngica, onde regula a fluidez e a permeabilidade, tornando-se alvo da maioria dos agentes antifúngicos (SUN; LIAO, 2020; RODRIGUES, 2018). Os resultados demonstraram que a adição de ergosterol ao meio contendo *Candida albicans* e o composto **1** não afetou a concentração inibitória mínima deste composto. Da mesma forma, a MDNB-NE não apresentou alterações na CIM, indicando que o provável mecanismo de ação não está relacionado a alterações na função da membrana celular.

O sorbitol é um protetor osmótico essencial para o crescimento fúngico que funciona minimizando os efeitos de agentes químicos nas paredes celulares dos microrganismos (SILVA et al., 2010; STANISZEWSKA et al., 2016; ALVES et al., 2020). Em nosso estudo, na presença de sorbitol, não foram observadas alterações nas concentrações inibitórias mínimas do composto **1** e MDNB-NE, sugerindo que o mecanismo de ação desses compostos não está associado à ruptura da parede celular. Em contraste, a CIM da droga de controle caspofungina aumentou (de 0,000028 mM para 0,0036 mM) na presença de sorbitol, pois é conhecida por estar envolvida na biossíntese da parede celular. Andrade e colaboradores (2020) também demonstraram que os compostos nitro não atuam na parede celular do fungo de *Candida albicans* ATCC 10231 (ANDRADE et al., 2020).

Como esperado, os resultados biológicos indicaram que o sistema nanoemulsionado (MDNB-NE) não interferiu no mecanismo de ação. Além disso, os resultados dos testes *in vitro* corroboram com os dados de modelagem molecular, que apontaram para um mecanismo de ação antifúngico multialvo para o composto **1** em *C. albicans*, interferindo em diferentes processos celulares.

Tabela 21: Valores de CIM em ($\mu\text{g/mL}$) e (mM) do composto **1** e MDNB-NE na ausência e presença de ergosterol e sorbitol (0,8M) contra *Candida albicans*

Composto	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)		<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	
		Sem Sorbitol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	Com sorbitol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	Sem ergosterol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)	Com ergosterol ($\mu\text{g/mL}$)/(mM)
1 	500/2,08	-	-	-	-
	250/1,04	-	-	-	-
	125/0,52	-	-	-	-
	62,5/0,26	+	+	+	+
	31,25/0,13	+	+	+	+
MDNB-NE	500/1,96	-	-	-	-
	250/0,98	-	-	-	-
	125/0,49	+	+	+	+
	62,5/0,24	+	+	+	+
	31,25/0,12	+	+	+	+
Nistatina	96/0,103			-	+
	48/0,051			-	+
	24/0,025			-	+
	15/0,016			-	+
	6/0,0064			-	+
	3/0,0032			-	+
	1,5/0,0016			-	+
	0,75/0,0008			+	+
Caspofungina	4/0,0036	-	+		
	2/0,0018	-	+		
	1/0,00090	-	+		
	0,5/0,00045	-	+		
	0,25/0,00022	-	+		
	0,125/0,00011	-	+		
	0,0625/0,000057	-	+		
	0,031/0,000028	-	+		

(+): indica o crescimento do microrganismo. (-): sem crescimento do microrganismo

Fonte: Elaborado pelo autor

5.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente estudo foi possível preparar 21 ésteres e amidas derivadas do ácido 3,5-dinitrobenzoico (**1-21**). Os produtos foram preparados utilizando diferentes metodologias e foram caracterizados por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho e por RMN de ^1H e ^{13}C , e espectrometria de massas de alta resolução para o composto **9**.

O teste de atividade antifúngica revelou que o derivado **1** apresentou a melhor atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* sugerindo que a inserção de um grupo metila na cadeia lateral potencializa a atividade biológica. Além disso, os compostos **2** e **3** também foram bioativos. Dentre a série de amidas avaliadas, somente a **16** apresentou atividade antifúngica contra as cepas testadas.

Os testes de mecanismo de ação contra *C. albicans* sugerem que o composto **3**, atua alterando as funções fisiológicas que envolvem a presença do ergosterol na membrana celular e os compostos **1** e **2** podem interferir na síntese do ergosterol. Os resultados de modelagem molecular também indicam com a interferência experimental do composto **2** na síntese do ergosterol e sugerem um mecanismo de ação multialvo para esse composto. Enquanto, o estudo de modelagem molecular do composto **1** sugere um mecanismo de ação antifúngico multialvo interferindo em diferentes processos celulares.

Foi possível formular uma nanoemulsão estável carregada de 3,5-dinitrobenzoato de metila ao longo de 90 dias de avaliação. Os estudos *in vitro* mostraram que o composto **1** e MDNB-NE inibiram o crescimento de *C. albicans*. No entanto, para as cepas clínicas, a CIM do MDNB-NE *in vitro* foi maior que a do composto **1**, indicando que o composto livre foi mais eficaz na inibição do crescimento dessas cepas. Os resultados de testes *in vitro* envolvendo ergosterol e sorbitol corroboraram com o estudo de modelagem molecular. Assim, os dados apresentados neste estudo servirão de base para novas pesquisas sobre nitrocompostos com atividade antifúngica.

6.0. PARTE EXPERIMENTAL - QUÍMICA

6.1. Substâncias, materiais e métodos utilizados no preparo dos compostos

A etapa química foi realizada no Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) da Universidade Federal da Paraíba (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde).

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich, Neon, Dinâmica, dentre outros. Para preparação dos ésteres e amidas, foram utilizados 12 álcoois, 2 haletos e 7 aminas. Os 21 reagentes foram submetidos a uma reação com o ácido 3,5-dinitrobenzoico.

6.2. Métodos cromatográficos

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

O Fator de Retenção (R_f) foi calculado com o auxílio de placas de cromatografia sílica gel 60 medindo 5,0 cm de comprimento e utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt) nas proporções de 9:1 e 7:3.

6.3. Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho da Microquímica Equipamentos LTDA, modelo MQAPF 302, localizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. A faixa de temperatura do aparelho varia entre 10-350°C.

6.4. Métodos espectroscópicos

6.4.1. Ressonância magnética nuclear

Os compostos foram identificados através dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os mesmos foram registrados nos espectrômetros Bruker Avance III HD operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C) e Varian NMR operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C); ambos do NUCAL-Núcleo de Caracterização e Análise/UFPB. Para as análises as amostras foram preparadas com dois tipos de solventes deuterados da MERCK os quais foram: o DMSO- d_6 utilizado para solubilizar as amostras: **13, 15, 17, 18, 19, 20 e 21** e o clorofórmio deuterado (CDCl_3) para as demais. Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm).

Nas substâncias solubilizadas com DMSO- d_6 , adotou-se como referência de RMN de ^1H , os picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente DMSO ($\delta\text{H}=2,50$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados, através dos picos de DMSO- d_6 ($\delta\text{C}=39,5$ ppm).

Nas substâncias solubilizadas com CDCl_3 , adotou-se como referência de RMN de ^1H , os picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente CDCl_3 ($\delta\text{H}= 7,26$ ppm, singleto), enquanto que para os espectros de RMN de ^{13}C , utilizou-se como referência os sinais do clorofórmio ($\delta\text{C} = 77,20$ ppm, tripleto). As multiplicidades das bandas de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *d* (duplete), *t* (tripleto), *quint* (quinteto), *sex* (sexteto), *sept* (septeto), *m* (multiplete).

6.4.2. Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em aparelho de Cary 630 FTIR Agilent technologies e uma faixa espectral na região de 4000 - 400 cm^{-1} , do Laboratório de Analítico de Multiusuário do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde da UFPB, utilizando de 1,00 mg de amostra em 15,00 mg pastilhas de KBr, com frequência medida em cm^{-1} .

6.4.3. Espectrometria de massas de alta resolução

O espectro de massa de alta resolução foi realizado no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, PE, Brasil (www.cetene.gov.br). Matrizes e produtos químicos de calibração foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A medição foi efetuada utilizando um espectrômetro de massas Ultraflex II TOF / TOF equipado com um laser de alto desempenho de estado sólido ($\lambda = 355 \text{ nm}$) e um reflector, utilizando a técnica MALDI - ionização por dessorção a laser assistida por matriz. A amostra foi carregada em uma placa de aço (base de aço MTP 384; Bruker Daltonics GmbH). O sistema foi operado pelo pacote de software FlexControl 2,4 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

A amostra foi irradiada com um laser de potência de 20% e medida em forma linear e refletida, em forma de íons positivos e negativos. A amostra foi carregada numa placa formada de aço para amostra (base de aço MTP 384; Bruker Daltonics GmbH). O espectro de massa foi à soma de 100 a 300 disparos de laser individuais, dependendo das condições da amostra.

7.0. PARTE EXPERIMENTAL - BIOLÓGICA

7.1. Local de trabalho

Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), coordenado pelo prof. Dr. Ricardo Dias de Castro.

7.2. Microrganismos

Para os testes de avaliação antifúngica dos derivados do ácido 3,5-dinitrobenzoico foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* CBS 562, *Candida krusei* CBS 573 e *Candida tropicalis* CBS 94.

A atividade antifúngica do composto **1** e das formulações foi avaliada em relação a uma cepa de referência obtida da American Type Culture Collection (ATCC), *C. albicans* (ATCC 90028) e cepas clínicas, que foram coletadas da cavidade oral, isoladas, identificadas e fornecidas pelo Laboratório de Farmacologia e Cultivo Celular (LAFECC) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba: *C. albicans* PLA1, *C. albicans* PLA5 e *C. albicans* PLA15 com prévia aprovação do comitê de ética.

7.3. Concentração inibitória mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima foi realizada utilizando a técnica de microdiluição em placas de 96 poços, conforme especificado pelo (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Através de diluições em série, foram obtidas concentrações dos produtos avaliados que variam de 1000 µg/mL a 7,8 µg/mL. Os produtos foram solubilizados em DMSO 5% e as nanoemulsões (MDNB-NE) e (BNE) em água destilada e esterilizada. Em seguida, foram adicionados 100 µL do inóculo das cepas fúngicas em todos os poços, resultado em uma concentração celular final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Foram realizados controles de esterilidade do meio de cultura e de viabilidade de crescimento fúngico. A solução de DMSO 5% foi testada para avaliar possível interferência desse agente na inibição do crescimento microbiano. Nistatina e cetoconazol foram utilizados como controle positivo (PEIXOTO et al., 2017). As placas foram incubadas a temperatura de 35 ± 2 ° C por 24 horas. Após o período de incubação, para confirmar a viabilidade celular, foi adicionado o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico (Sigma-Aldrich®) (TTC) a 1% (UNO; SHIGEMATSU; ARAI 1982). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico.

Considerando que as potências farmacológicas das moléculas sintetizadas podem ser ampliadas a partir de novas modificações químicas em suas estruturas, a bioatividade dos compostos foi determinada a partir dos valores da CIM e classificada

de acordo com as seguintes categorias: a) bioatividade muito forte (MIC <10 µg/ml); b) bioatividade forte (CIM entre 10 e 25 µg/mL); c) boa bioatividade (CIM entre 26 - 125 µg/mL); d) bioatividade moderada (CIM de 126 a 500 µg/mL); e) bioatividade leve (CIM na faixa de 501-1000 µg/mL) e; f) Ausência de bioatividade (CIM > 1000 µg/mL) (POPIOLEK et al., 2016).

7.4. Concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM foi determinada por subcultivo de alíquotas (30 µL) dos poços correspondentes à CIM e concentrações mais altas em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI1, Kasv Imp e Dist. Prod/Laboratórios LTDA, Curitiba, Brasil). As placas foram incubadas por 48 horas a 35°C ± 2°C, e a leitura foi realizada por observação visual do crescimento fúngico com base na contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se a substância tinha atividade fungistática (CFM/CIM ≥ 4) ou fungicida (CFM/CIM < 4) (SIDDIQUI, et al., 2013).

7.5. Ensaios para avaliação do possível modo de ação dos compostos

7.5.1. Ensaio do sorbitol

Para definir o possível mecanismo de ação dos compostos e da formulação na parede celular de *Candida albicans* o teste de microdiluição foi efetuado na presença de Sorbitol (D-sorbitol, anidro) INLAB laboratório. O teste foi realizado com *Candida albicans* CBS 5562 para os compostos **1**, **2** e **3** e com *Candida albicans* ATCC 90028 para o composto **1** e a nanoemulsão (MDNB-NE). Dessa forma, o inóculo foi preparado com sorbitol em concentração final de 0,8 M. As placas foram seladas assepticamente e incubadas a 35 ± 2 ° C por 48 horas. Caspofungina foi usada como controle positivo (ESCALANTE et al., 2008; FREIRES et al., 2014; LIMA et al., 2013).

7.5.2. Ensaio do ergosterol

O ensaio do ergosterol, conduzido para avaliar possível efeito dos compostos e da formulação na membrana celular fúngica, foi executado através do método de microdiluição, conforme descrito anteriormente. O teste foi realizado com *Candida albicans* CBS 5562 para os compostos **1**, **2** e **3** e com *Candida albicans* ATCC 90028 para o composto **1** e a nanoemulsão (MDNB-NE). O inóculo foi preparado com ergosterol em uma concentração de 400 µg/mL (1008.44 µM). As placas foram incubadas a uma temperatura de 35 ± 2 ° C por 48 horas. Nistatina foi utilizada como controle positivo (ESCALANTE et al., 2008; FREIRES et al., 2014; LIMA et al., 2013; PERLIN et al., 2011; PIERCE et al., 2013).

8.0. PARTE EXPERIMENTAL – QUÍMICA COMPUTACIONAL

8.1. Local de trabalho

O estudo computacional foi produzido na Universidade das Américas, Quito, Equador pelo pesquisador Yunierkis P. Castillo

8.2. Seleção de alvos para o 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

Os alvos moleculares foram selecionados seguindo a metodologia baseada em homologia descrita em estudos anteriores (LOPES et al., 2020; ARAÚJO et al., 2020b). Para isso, os potenciais alvos do composto **1** foram previstos com o servidor web Similarity Ensemble Approach (SEA) (KEISER et al., 2007). Todas as proteínas identificadas nesta etapa foram usadas como consulta para uma pesquisa do Blast (ALTSCHUL et al., 1997) contra as proteínas de *C. albicans* (taxid 5476) incluídas no Reference Proteins Database (refseq_protein). Proteínas em *C. albicans* idênticas em pelo menos 45% aos potenciais alvos identificados pelo método SEA e cobertas em pelo menos 75% de suas sequências pelo alinhamento Blast foram selecionadas como potenciais alvos do composto **1** nos fungos.

Três fontes diferentes foram empregadas para as estruturas dos alvos

estudados. Primeiro, o banco de dados Protein Data Bank (PDB) foi pesquisado para estruturas experimentais das proteínas. Para aqueles sem estrutura 3D resolvida, modelos obtidos por modelagem comparativa (ou por homologia) foram gerados com o servidor SwissModel (BIENERT et al., 2017). Vários modelos diferentes foram construídos com o servidor SwissModel e dentre eles aquele com maior pontuação QMEAN foi selecionado para estudos de modelagem. Nos casos em que nenhum modelo 3D adequado ($QMEAN < -4$) pôde ser recuperado para uma proteína, os modelos estruturais foram obtidos do banco de dados AlphaFold Protein Structure Database depositado no EMBL-EBI (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (JUMPER et al., 2021).

8.3. Docking molecular do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

Os cálculos de docking molecular prosseguiram usando a estratégia de consenso empregada em estudo anterior (MORAIS et al, 2021). Uma conformação 3D inicial do composto **1** foi gerada com o Omega da OpenEye (HAWKINS et al., 2010) e cargas atômicas parciais foram adicionadas a essa estrutura com MolCharge (OpenEye Scientific Software). Os cálculos de encaixe foram realizados com o software Gold (JONES et al., 1997) usando a função de pontuação ChemPLP para encaixe primário. A flexibilidade do ligante para encaixe foi muito flexível e 30 orientações diferentes do ligante na cavidade de ligação foram salvas. Essas orientações foram pontuadas com as funções de pontuação ChemScore, GoldScore e ASP do Gold. Em seguida, as pontuações de encaixe foram transformadas em Z-scores e calculada a média para obter o consenso Z-score. Qualquer pose de ligante com Z-score maior que 1 foi selecionada para análises adicionais. Se nenhum modo de ligação previsto que atendesse ao critério anterior pudesse ser encontrado, o conformero com melhor pontuação foi selecionado para as próximas etapas de modelagem.

8.4. Cálculos de dinâmica molecular e estimativa das energias livres de ligação para o 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

Simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas com Amber 20

(CASE et al., 2021) de acordo com o protocolo descrito em nossos estudos anteriores (MORAIS et al., 2021; LOPES et al., 2019). Todas as simulações de DM ocorreram em solvente explícito empregando moléculas de água OPC. Os campos de força ff19SB e gaff2 foram empregados para parametrizar as proteínas e o ligante, respectivamente. Os mesmos protocolos de preparação, minimização de energia, aquecimento e equilíbrio foram aplicados a todos os sistemas, exceto aos que continham receptores de membrana.

Para proteínas solúveis, os sistemas foram encerrados em caixas de octaedros truncados, solvatados e neutralizados pela adição de íons Na^+ ou Cl^- . Uma minimização de energia em dois estágios envolvendo os algoritmos de gradiente conjugado e de descida mais acentuada foi implementada. Todos os átomos, exceto o solvente e os contra-íons, foram restringidos durante o primeiro estágio de minimização de energia. Em seguida, os sistemas foram aquecidos gradualmente de 0 K a 300 K e os sistemas aquecidos foram equilibrados por 100 ps.

As proteínas de membrana foram preparadas para simulações de DM com o servidor CHARMM-GUI (LEE et al., 2016; WU et al., 2014). Estes foram incorporados em uma bicamada lipídica contendo, em cada lado, 50 moléculas de 1-Palmitoil-2-oleoilglicero-3-fosfocolina (POPC), 50 1-Palmitoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (POPE) e 25 de Colesterol (CHL). Os sistemas contendo o receptor, o ligante e a bicamada lipídica foram solvatados e neutralizados pela adição de 0,15 M de KCl. Os arquivos de configuração fornecidos pelo servidor CHARMM-GUI orientaram os processos de minimização de energia, aquecimento e equilíbrio para os complexos contendo membranas.

Cinco ciclos de produção curtos (4 ns) foram realizados para cada sistema. As velocidades iniciais foram inicializadas aleatoriamente antes de cada corrida de produção para amostrar diferentes espaços conformacionais dos complexos. Vinte instantâneos DM, distribuídos uniformemente no intervalo de tempo de 1 ns – 4 ns, foram extraídos de cada produção para a estimativa das energias livres de ligação.

Estas energias foram calculadas com o método MM-PBSA como implementado em Amber 20 (MILLER et al., 2012). Os parâmetros de solvente implícito padrão foram empregados para cálculos de MM-PBSA e a força iônica foi definida para 150 mM. Para os complexos contendo proteínas de membrana, as energias livres de ligação foram obtidas com um modelo de membrana implícita dielétrica heterogênea (memopt=3). A espessura e o centro da membrana implícita foram definidos como a

distância média entre os átomos de N31 dos lipídios e a coordenada z média para o mesmo conjunto de átomos, respectivamente.

8.5. Seleção de alvos para o composto 3,5-dinitrobenzoato de etila (2)

Os potenciais alvos moleculares do composto **2** foram selecionados seguindo duas abordagens. Com base nos resultados experimentais, o primeiro deles consistiu na seleção das proteínas envolvidas na síntese do ergosterol. Esses receptores foram definidos a partir das informações disponíveis no *Candida* Genome Database (Pathway PWY3B3-3) (SKRZYPEK et al., 2017). O segundo conjunto de alvos potenciais do composto **2** foi selecionado a partir de uma abordagem de pesca de alvo computacional baseada em homologia. Para este último, o composto foi usado como entrada para o servidor web Similarity Ensemble Approach (SEA) (KEISER et al., 2007) para prever seus possíveis alvos. Dado que as abordagens de pesca de alvos são tendenciosas contra as interações ligante-receptor em humanos, os homólogos dos alvos previstos em *C. albicans* foram identificados através de uma pesquisa Blast (ALTSCHUL et al., 1997). Esta busca tomou como entrada as sequências dos alvos previstos por SEA e foi realizada contra as proteínas *C. albicans* (taxid 5476) presentes no banco de dados de proteínas de referência (refseq_protein) através da implementação do servidor NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Qualquer proteína de *C. albicans* idêntica em pelo menos 35% a qualquer uma das sequências de consulta e coberta pelo alinhamento Blast em mais de 85% de seu comprimento foi selecionada como um alvo potencial do composto **2**.

8.6. Docking molecular do 3,5-dinitrobenzoato de etila (2)

Os cálculos de encaixe molecular foram realizados conforme descrito anteriormente em nossas publicações anteriores (TURKEZ et al., 2019; LOPES et al., 2019; PEREZ-CASTILLO et al., 2020). Em pouco tempo, um confórmero 3D do composto foi gerado e cargas atômicas parciais am1-bcc foram adicionadas a ele com o software Omega (HAWKINS et al., 2010) e Molcharge (OpenEye Scientific Software) da OpenEye, respectivamente. O Merck Molecular Force Field (MMFF94), conforme implementado no Omega, foi usado para obter o confórmero composto usando parâmetros padrão. As estruturas cristalinas dos alvos moleculares HSP90 (código

6CJR), MEP2 (código 5AF1) e ERG11 (código 5TZ1) foram recuperadas do banco de dados Protein Data Bank (BERMAN et al., 2000). Para o restante dos receptores explorados que não possuem estruturas 3D experimentais, modelos de homologia foram obtidos através do servidor SWISS-MODEL (BIENERT et al., 2017). Todas as moléculas de água foram removidas dos receptores para ancoragem molecular e apenas cofatores funcionalmente relevantes e átomos de metal foram retidos neles.

Todos os cálculos de encaixe foram realizados com o software Gold (JONES et al., 1997). Os sítios de ligação do ligante foram definidos como qualquer resíduo dentro de 6 Å do ligante cocrystalizado ou dos ligantes presentes nas estruturas molde usadas para construir os modelos de homologia. Caso nenhum ligante de referência estivesse presente, um ponto de referência foi definido manualmente dentro da cavidade de ligação e qualquer aminoácido a uma distância inferior a 10 Å dele foi selecionado para a cavidade de ligação. A orientação primária e a pontuação foram realizadas com a função de pontuação CHEMPLP e 30 poses de ligação diferentes foram previstas para cada receptor. Estas orientações previstas do composto **2** em cada receptor foram pontuadas com as funções de pontuação GoldScore, ChemScore e ASP. As cadeias laterais dos resíduos apontando para a cavidade de ligação foram consideradas flexíveis para docking molecular. Além disso, o parâmetro de eficiência de pesquisa de Ouro definido para 200% (muito flexível) e o ligante foi considerado flexível para estudos de docking.

Os modos de ligação mais prováveis do ligante a cada receptor foram determinados a partir de um método de pontuação de consenso que considera os valores de pontuação fornecidos pelas quatro funções de pontuação empregadas. Essa pontuação de consenso é calculada como:

$$Z_i = \frac{\sum_j \frac{S_{i,j} - \bar{S}_j}{std(S_j)}}{4} \quad (\text{eq. 1})$$

onde $S_{i,j}$ é a pontuação da pose do ligante i de acordo com a função de pontuação j , $std(S_j)$ é o desvio padrão dos valores de $S_{i,j}$ e $\bar{S}_j$ sua média.

8.7. Simulações de dinâmica molecular e estimativa das energias livres de ligação para o 3,5-dinitrobenzoato de etila (2)

Simulações de dinâmica molecular (DM) e a estimativa das energias livres de ligação foram realizadas com Amber 18 (CASE et al., 2018) conforme descrito em estudo anterior (PEREZ-CASTILLO et al., 2020). Resumidamente, os campos de força Amber ff14SB e gaff foram usados para parametrizar proteínas e composto **2**, respectivamente. Todos os complexos, exceto aqueles contendo MEP2 que é uma proteína de membrana, foram submetidos ao mesmo protocolo de preparação que incluiu minimização de energia, aquecimento e equilíbrio.

Os sistemas contendo proteínas solúveis foram colocados em caixas de octaedros truncados, solvatados com moléculas de água TIP3P e o excesso de carga foi neutralizado pela adição de contra-íons Na^+ (para sistemas com carga formal negativa) ou Cl^- (para sistemas com carga formal positiva). Os sistemas preparados tiveram energia minimizada em duas etapas a volume constante e com interações eletrostáticas de longo alcance tratadas com o método Particle Mesh Ewald (PME). A primeira delas consistiu em 500 passos do método de descida mais íngreme seguido de 500 ciclos de gradiente conjugado. Durante a segunda etapa de minimização de energia, foram aplicados 500 passos do algoritmo de descida mais íngreme seguido de 1000 ciclos de gradiente conjugado. Todos os átomos, exceto o solvente e os contra-íons, foram restringidos com uma constante de força de 500 kcal/mol.Å^2 durante a primeira etapa de minimização de energia, enquanto nenhuma restrição foi aplicada durante a segunda.

Os sistemas de energia minimizada foram aquecidos de 0 K a 300 K durante 20 ps, mantendo o soluto restringido com uma força constante de 10 kcal/mol.Å^2 . A partir desta etapa, a temperatura foi controlada por um termostato Langevin com frequência de colisão de $1,0 \text{ ps}^{-1}$ e as ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas com o algoritmo SHAKE. Em seguida, os sistemas foram equilibrados por 100 ps a temperatura constante (300 K) e pressão constante (1 bar). A pressão foi controlada com escala de posição isotrópica definindo um tempo de relaxamento de 2 ps durante o equilíbrio. As corridas de produção foram definidas para 2 ns usando os mesmos parâmetros que durante o estágio de equilíbrio. No total, 20 dessas simulações curtas de 2 ns DM foram executadas para cada sistema tomando como entrada o último instantâneo do processo de equilíbrio e com diferentes velocidades

iniciais aleatórias por simulação.

Por outro lado, os complexos do composto **2** com MEP2 foram preparados com o servidor CHARMM-GUI (JO et al., 2008; LEE et al., 2016). Esses sistemas foram integrados em uma membrana de bicamada contendo, em cada lado, 25 moléculas de colesterol (CHL), 50 moléculas de 1-Palmitoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (POPE) e 50 de 1-Palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC). Os sistemas contendo o complexo e a membrana foram colocados em uma caixa retangular, solvatados com moléculas de água TIP3P e qualquer excesso de carga foi neutralizado pela adição de íons K^+ e Cl^- . Os arquivos de configuração fornecidos pelo servidor CHARMM-GUI foram utilizados para a minimização de energia, aquecimento e equilíbrio destes sistemas. Quanto às proteínas solúveis, os complexos com MEP2 foram submetidos a 20 simulações DM de 2 ns de comprimento cada.

As energias livres de ligação do composto **2** a todos os alvos foram estimadas com o método MM-PBSA implementado em Amber (MILLER et al., 2012). Esses cálculos foram realizados em 200 instantâneos DM que foram selecionados um a cada 200 ps das simulações DM de 40 ns realizadas para cada complexo. A força iônica para cálculos de MM-PBSA foi ajustada para 0,100 mM. Para os complexos com MEP2, foi empregado o modelo de membrana implícito disponível em Amber e o fator dielétrico da membrana ajustado para 4.

9.0. PARTE EXPERIMENTAL – ANÁLISE TÉRMICA

9.1. Análise térmica diferencial (DTA) do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

A curva de análise térmica diferencial (DTA) foi obtida em um analisador térmico Shimadzu (DSC-50) utilizando um cadinho de alumínio com amostra de 5 mg, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} . O experimento foi realizado na faixa de temperatura de 25 a 450°C , com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

9.2. Termogravimetria (TG) do 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)

A curva termogravimétrica foi obtida em um analisador térmico Shimadzu (DSC-50) utilizando cadinho de alumina com amostra de 5 mg, sob atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 50 mL min^{-1} . O experimento foi realizado na faixa de temperatura de 25- 900°C , com uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

10.0. PARTE EXPERIMENTAL – DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

10.1. Local de trabalho

O desenvolvimento, caracterização e estudo de estabilidade das nanoemulsões foram realizados no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob orientação do prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira.

10.2. Preparação das nanoemulsões de óleo em água

Foram produzidas duas nanoemulsões, a primeira composta com composto 3,5-dinitrobenzoato de metila (MDNB-NE) e a segunda sem essa molécula, na forma de uma nanoemulsão em branco (BNE).

Para o desenvolvimento da formulação da formulação MDNB-NE, 0,025 g de 3,5-dinitrobenzoato de metila, foi previamente solubilizado em 1000 µl de etanol e 0,5 g de Miglyol 812. Em seguida, os tensoativos (0,12 g Tween 80® + 0,08 g Span 80®) foram adicionados à fase oleosa. Por fim, adicionou-se água destilada (9,3 g). Para a nanoemulsão BNE, 3,5-dinitrobenzoato de metila foi substituído por miglyol (Tabela 22).

Tabela 22: Composição das nanoemulsões MDNB-NE e BNE

Formulações	Fase aquosa	Fase Oleosa
MDNB-NE	0,12g Tween 80	
	0,08g Span 80	0,025g 3,5-dinitrobenzoato de metila + 0,475g MCT
	9,3g Água Milli-Q	
BNE	0,12g Tween 80	
	0,08g Span 80	0,5g MCT
	9,3g Água Milli-Q	

Fonte: Elaborado pelo autor

As formulações foram preparadas por ultrassom, e os componentes foram

submetidos a três ciclos de homogeneização em um aparelho de sonicação (modelo QE200, Ultronique, Brasil) por 1 min a 300 W usando um banho de gelo, seguido de um banho de ultrassom por 1 min.

10.3. Curva de calibração

Para a curva calibração, foi preparada uma solução mãe, com concentração final de 200 µg/mL, em dimetilsufóxido. A partir desta solução foram preparadas por diluição, soluções de concentrações de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18 µg/mL. As análises foram feitas em triplicata, no mesmo equipamento e com a mesma marca de dimetilsufóxido (DMSO). A absorbância máxima para o doseamento do 3,5-dinitrobenzoato de metila no comprimento de onda de 260 nm foi determinada após varredura entre os comprimentos de onda de 190 a 700 nm.

10.4. Determinação do teor de 3,5-dinitrobenzoato de metila (1) na nanoemulsão

O conteúdo de 3,5-dinitrobenzoato de metila na nanoemulsão foi medido por espectrofotômetro ultravioleta-visível (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Alemanha). A concentração de 3,5-dinitrobenzoato de metila na nanoemulsão foi calculada usando uma curva de calibração ($n = 8$) $y = 0,0375x - 0,0034$; $R^2 = 0,9991$). A MDNB-NE foi diluída em dimetilsulfóxido (1:2000) e filtrado usando um filtro de membrana de 0,2 µm (LANDA et al., 2009).

10.5. Caracterização das nanoemulsões

O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade (PDI) foram determinados com um instrumento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido) usando a técnica de dispersão dinâmica de luz a 25°C. As medições do diâmetro médio da gota e distribuição de tamanho foram realizadas em um ângulo de espalhamento fixo de 173°. As nanoemulsões foram diluídas com água deionizada (1:25, v/v) para caracterização. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e os resultados são apresentados como médias com desvio padrão ($\pm$) (OLIVEIRA; BARENDJI; VAUTHIER, 2020).

10.6. Estudo de estabilidade

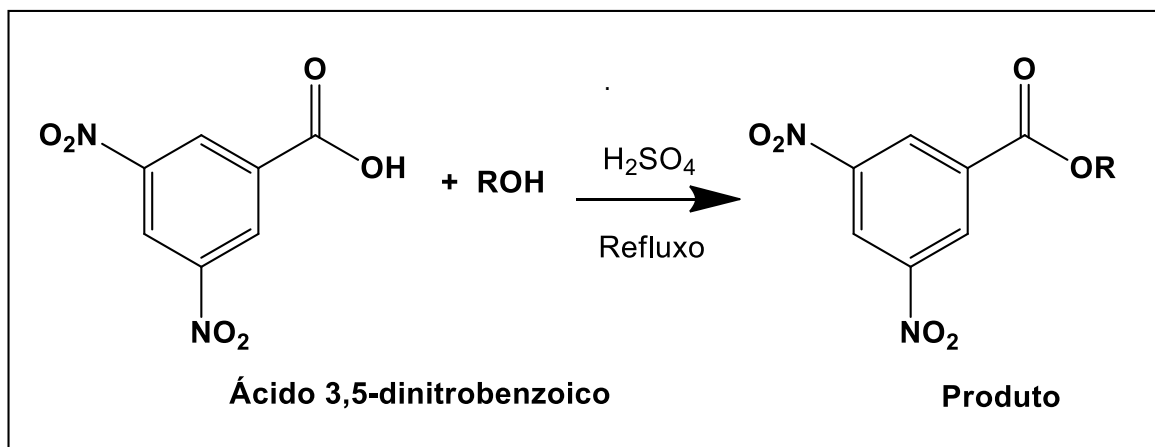
As nanoemulsões MDNB-NE e BNE foram mantidas em frascos de vidro de 10 mL selados com tampas plásticas e mantidos em geladeira a 4 ± 2 °C. MDNB-NE e BNE foram avaliadas quanto à sua estabilidade por um período de 90 dias. Os tempos de amostragem foram de 1, 7, 15, 45, 60 e 90 dias. As formulações foram analisadas quanto a alterações no tamanho das partículas, PDI, pH e aparência macroscópica.

O pH da MDNB-NE e BNE foi medido utilizando um autotitulador multiuso (modelo MPA-210, Tecnopon Instruments, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

As formulações também foram avaliadas quanto às suas características macroscópicas de cor, aparência e separação de fases.

11.0. PARTE EXPERIMENTAL – QUÍMICA

11.1. Preparação dos derivados 1-7



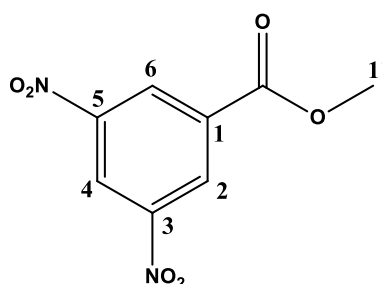
- (1) R= CH₃
- (2) R= CH₂CH₃
- (3) R= CH₂CH₂CH₃
- (4) R= CH(CH₃)₂
- (5) R= CH₂CH₂CH₂CH₃
- (6) R= CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃
- (7) R= CH₂CH₂CH(CH₃)₂

Esquema 10: Reação de esterificação de Fischer utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e álcoois alifáticos.

Os ésteres foram preparados conforme o seguinte procedimento geral: O ácido 3,5-dinitrobenzoico (0,100 g; 0,47 mmol), foi dissolvido em 20 mL do álcool alifático. Posteriormente, foram adicionados 0,2 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 (96% v/v). A mistura reacional foi agitada e aquecida sob refluxo durante 3-24 horas, monitorada por CCDA. Após o término da reação, o solvente foi parcialmente removido sob pressão reduzida e a solução foi diluída em 20 ml de água. O produto obtido foi extraído com acetato de etila (3x10 mL). A fase orgânica foi tratada sucessivamente com uma solução de NaHCO_3 a 5%, água, seca com Na_2SO_4 , filtrada e rotaevaporada originando o derivado éster. Os produtos foram purificados em coluna cromatográfica de sílica gel 60 utilizando como eluentes hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (SANDERSON et al., 2013).

11.2. Dados espectroscópicos dos ésteres 1-7

11.2.1. 3,5-dinitrobenzoato de metila (1)



Aspecto: Sólido amorfo âmbar

Rendimento: 85,17%

Ponto de Fusão: 106,0-106,4°C (lit. 109-111 °C LEGOUIN et al., 2010)

Fator de Retenção: 0,30 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3078 (C-H sp^2); 2966 (C-H, sp^3); 1730 (estiramento C=O); 1630 e 1461 (estiramento C=C aromático); 1543 e 1346 (estiramento NO_2); 1301 e 1165 (estiramento C-O)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δH 9,22 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4); 9,16 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 4,07 (s, 3H, H-1')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δC 163,12 (C=O), 148,82 (C-3, C-5); 133,88 (C-1); 129,60 (C-2, C-6); 122,53 (C-4); 53,72 (C-1') (POSTA; SOÓS; BEIER, 2016;

LEGOUIN et al., 2010).

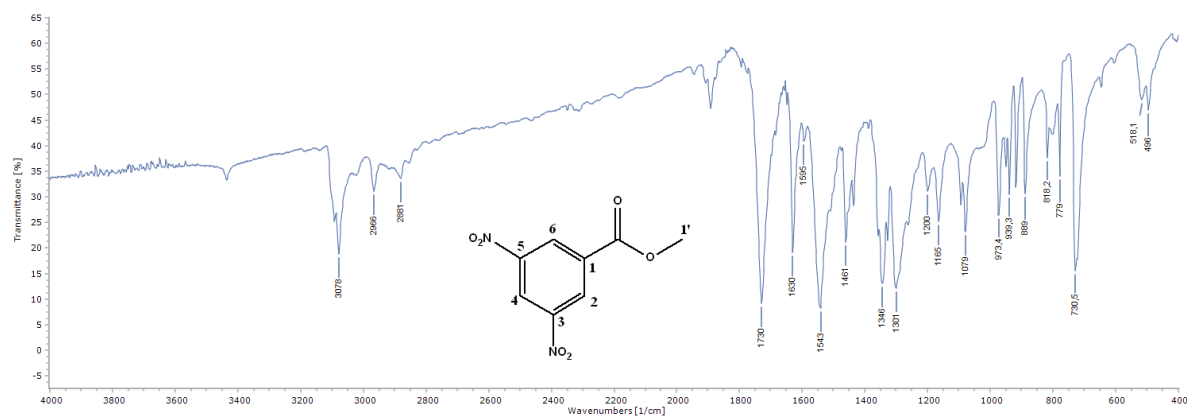


Figura 19: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**).

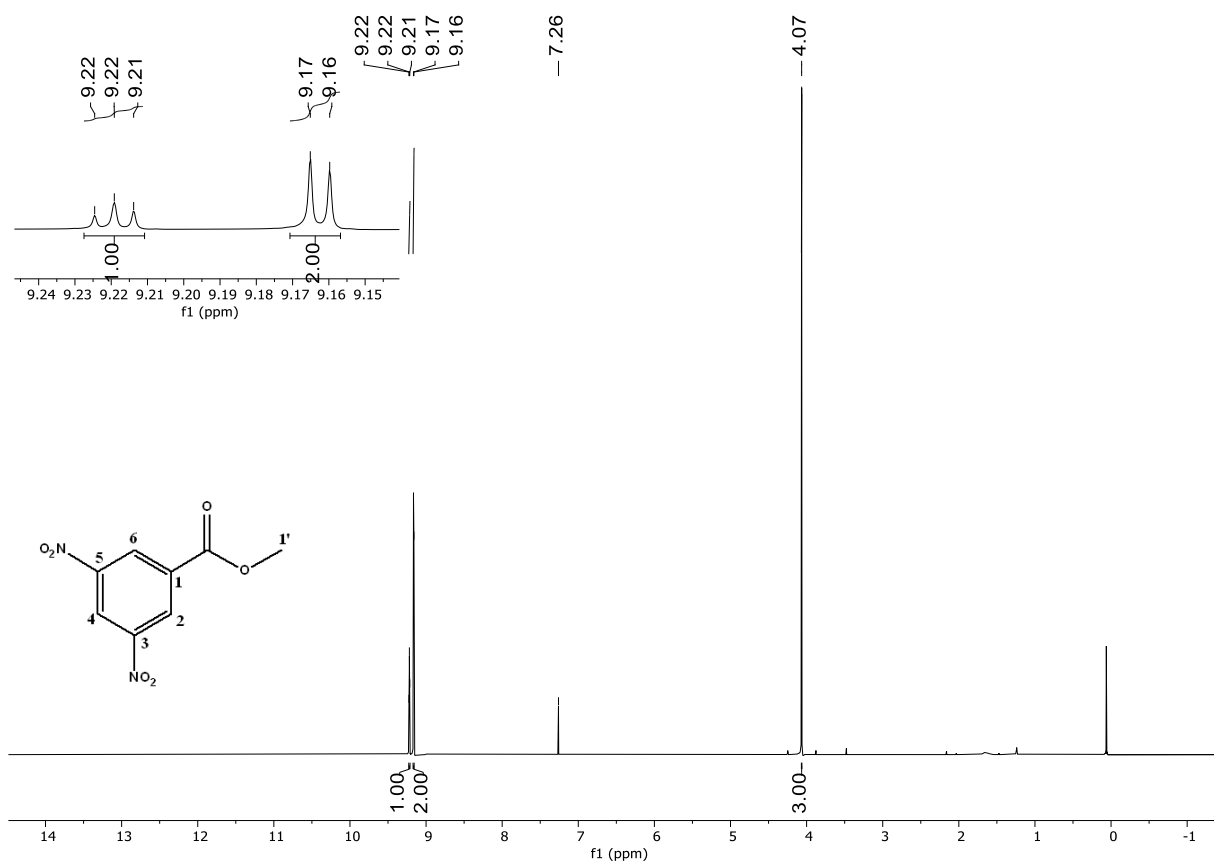
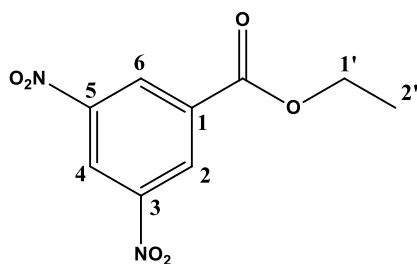


Figura 20: Espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**), (CDCl₃, 400 MHz).



Figura 21: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de metila (**1**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.2.2. 3,5-dinitrobenzoato de etila (**2**)



Aspecto: Sólido amorfo âmbar

Rendimento: 81,61

Ponto de Fusão: 90,1-90,5°C (lit. 92-93°C, (YOSHINO; IMORI; TOGO, 2006).

Fator de Retenção: 0,39 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3093 (C-H sp²); 2984 (C-H, sp³); 1731 (estiramento C=O); 1627 e 1467 (estiramento C=C aromático); 1544 e 1347(estiramento NO₂); 1277 e 1180 (estiramento C-O)

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ H 9,21 (t, J = 2,1 Hz, 1H, H-4); 9,15 (d, J = 2,1 Hz,

2H, H-2, H-6); 4,52 (*q*, $J = 7,2$ Hz, 2H, H-1'); 1,47 (*t*, $J = 7,2$ Hz, 3H, H-2')

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δC 162,62 (C=O); 148,78 (C-3, C-5); 134,27 (C-1); 129,55 (C-2, C-6); 122,42 (C-4); 63,14 (C-1'); 14,35 (C-2') (YOSHINO; IMORI; TOGO, 2006).

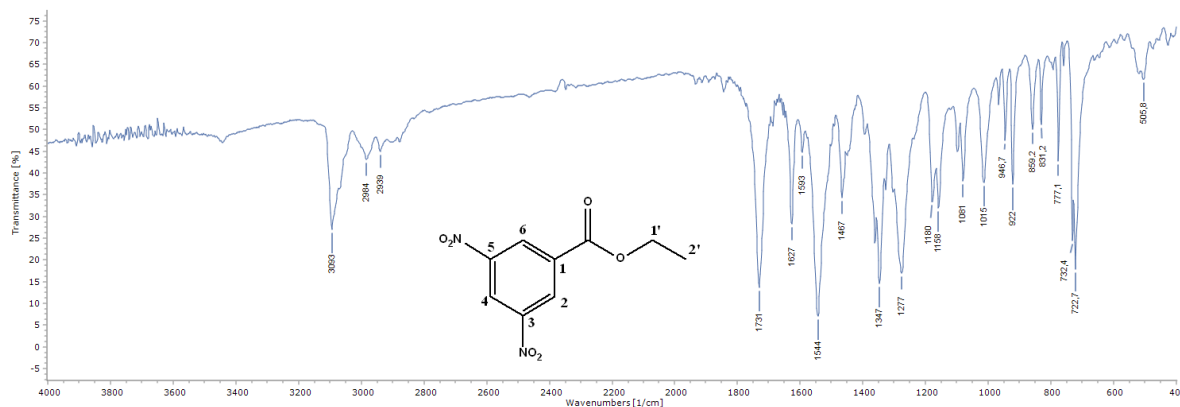


Figura 22: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2).

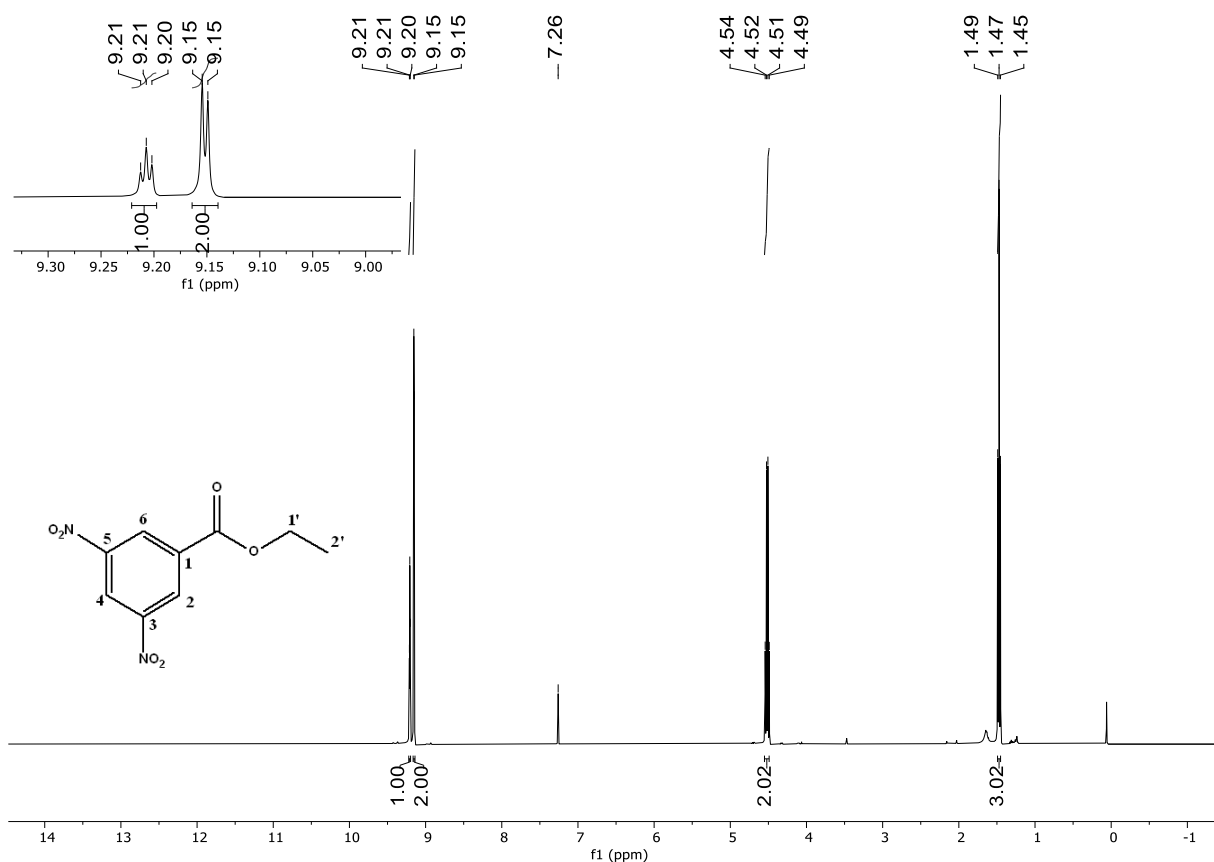


Figura 23: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2), (CDCl_3 , 400 MHz).

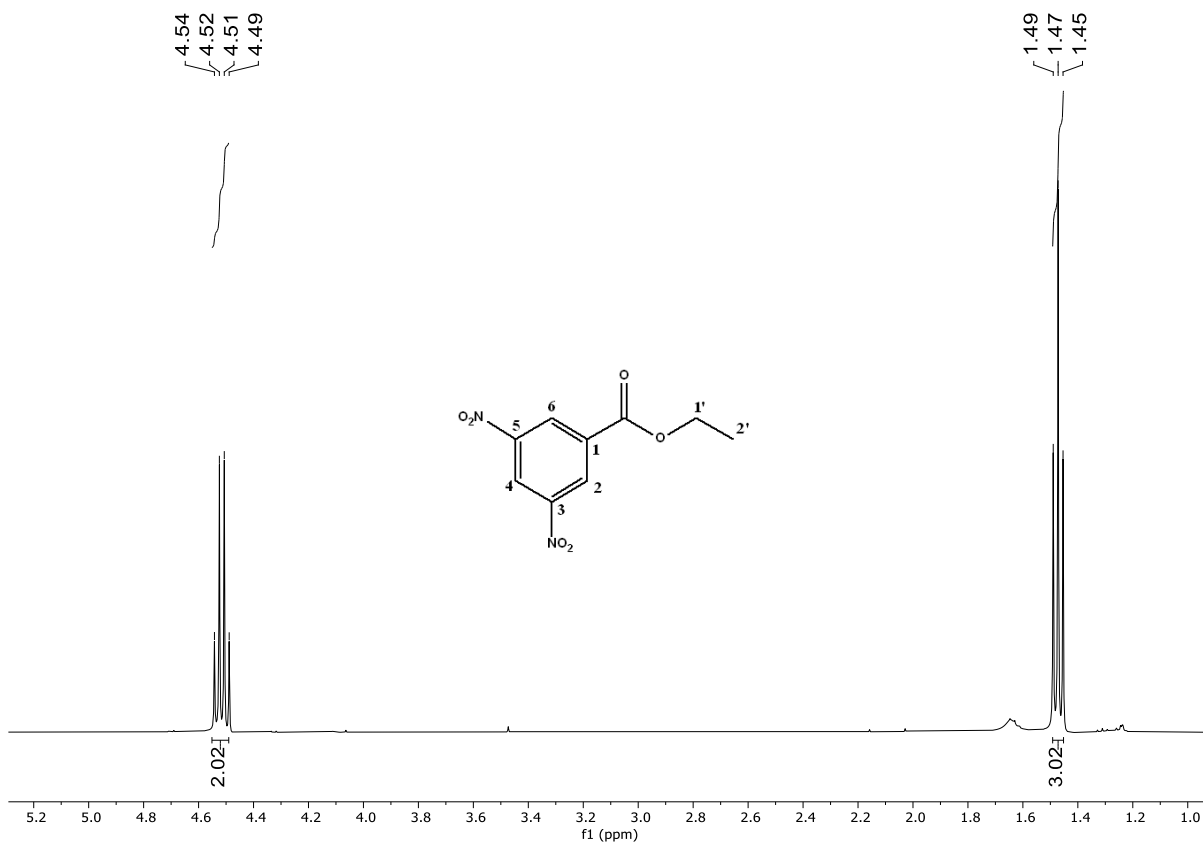


Figura 24: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2), (CDCl₃, 400 MHz).

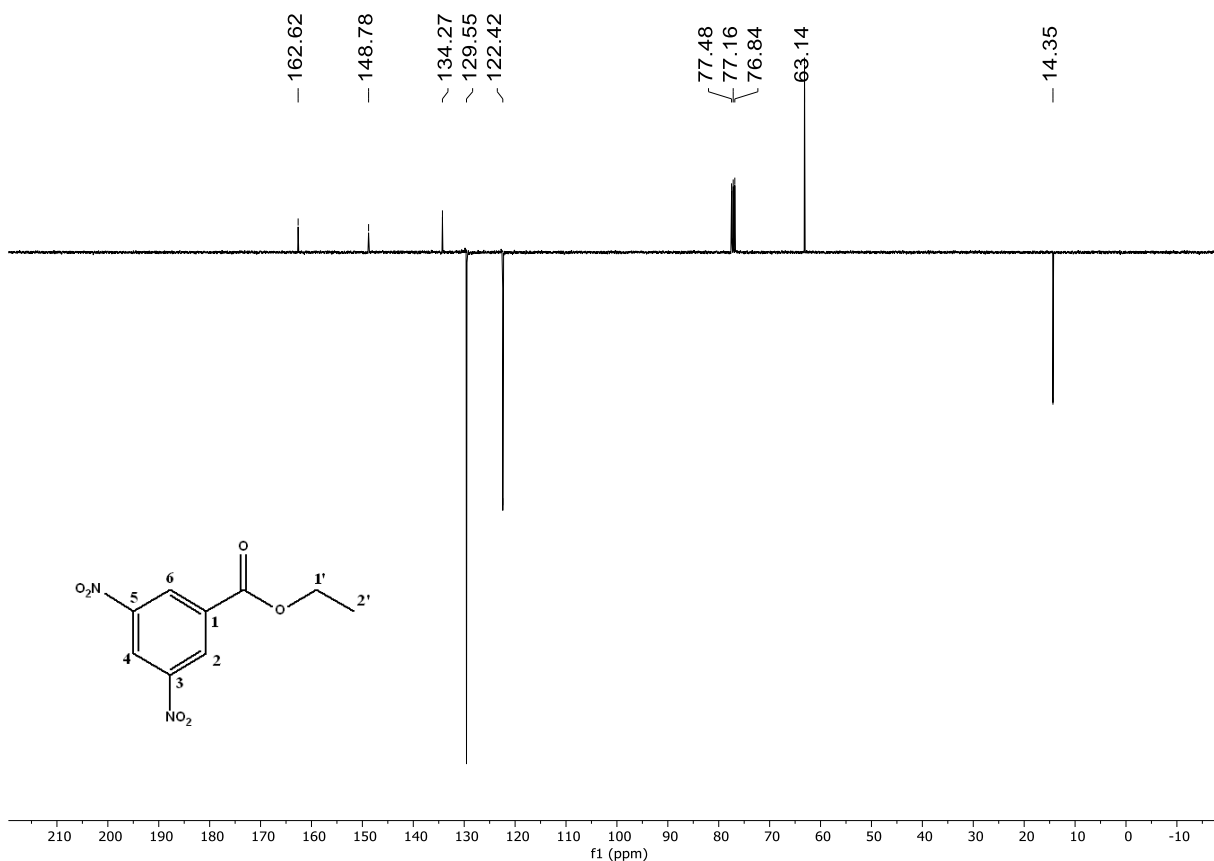
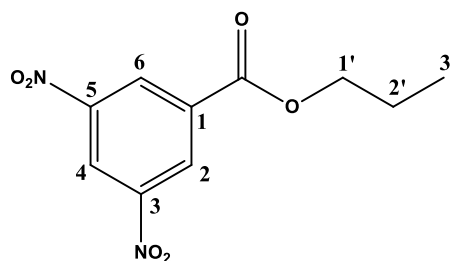


Figura 25: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de etila (2), (CDCl₃, 100 MHz).

11.2.3. 3,5-dinitrobenzoato de propila (3)



Aspecto: Sólido amorfo âmbar

Rendimento: 78,02%

Ponto de Fusão: 69,8-70,4°C (lit. 72,8-73,8 °C, BURNS, 1955)

Fator de Retenção: 0,48 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3114 (C-H sp^2); 2969 (C-H, sp^3); 1723 (estiramento C=O); 1633 e 1461 (estiramento C=C aromático); 1546 e 1347 (estiramento NO_2); 1295 e 1177 (estiramento C-O)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 9,23 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4); 9,17 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H, H-2, H-6); 4,43 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-1'); 1,92-1,83 (sex, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-2'); 1,07 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-3')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 162,69 (C=O); 148,81 (C-3, C-5); 134,30 (C-1); 129,54 (C-2, C-6); 122,40 (C-4); 68,62 (C-1'); 22,10 (C-2'); 10,52 (C-3') (FABIAN et al., 2014).

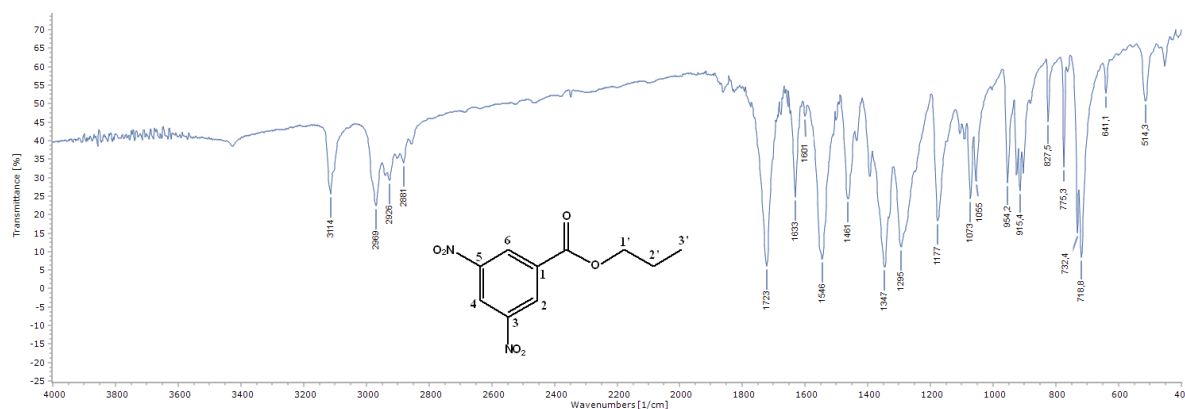


Figura 26: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de propila (3).

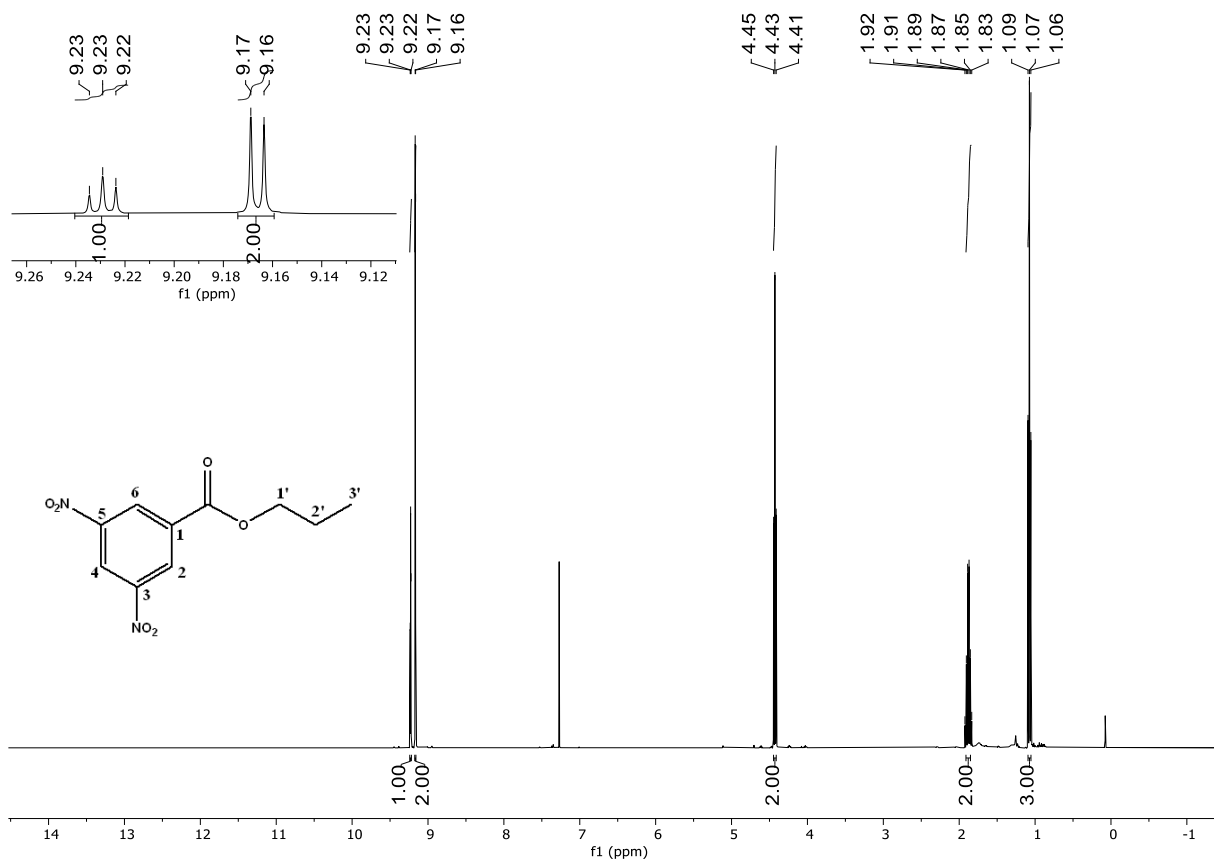


Figura 27: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 400 MHz).

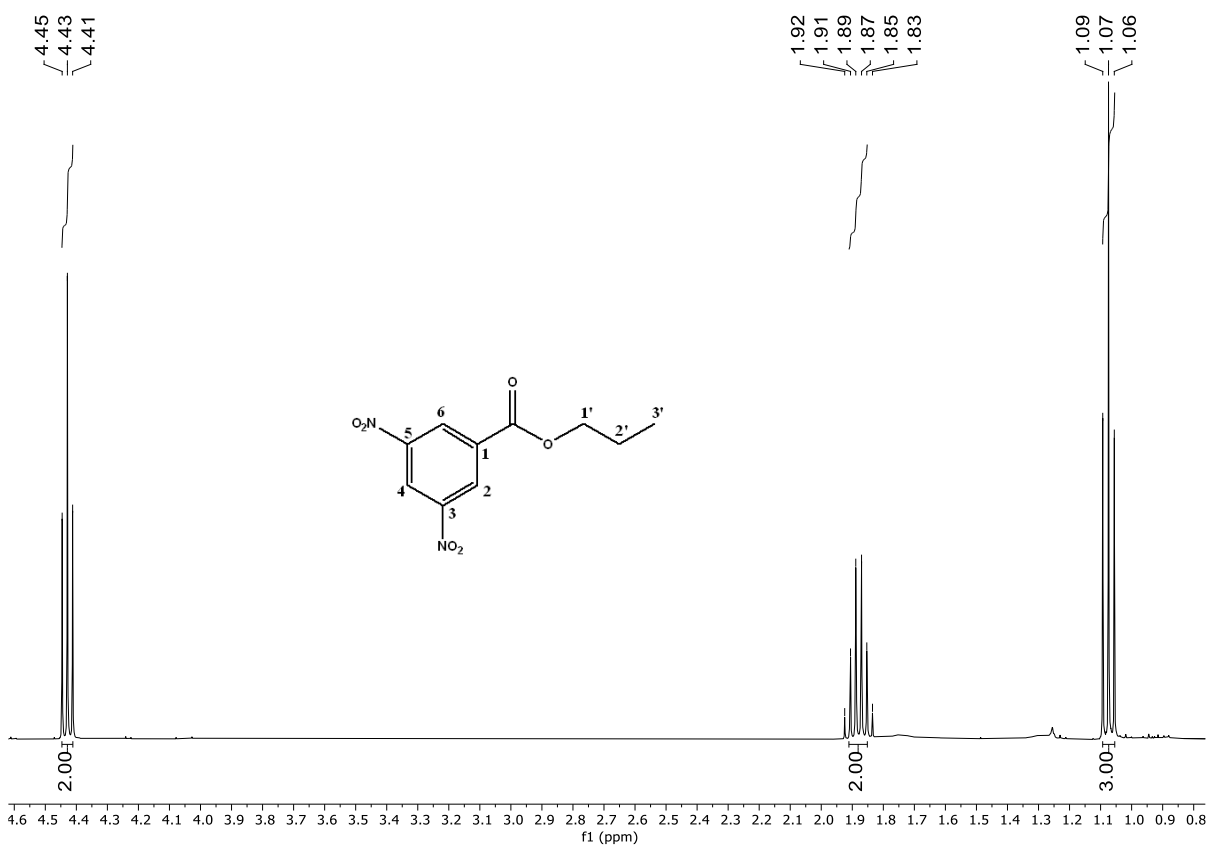


Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H 3,5-dinitrobenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 400 MHz).

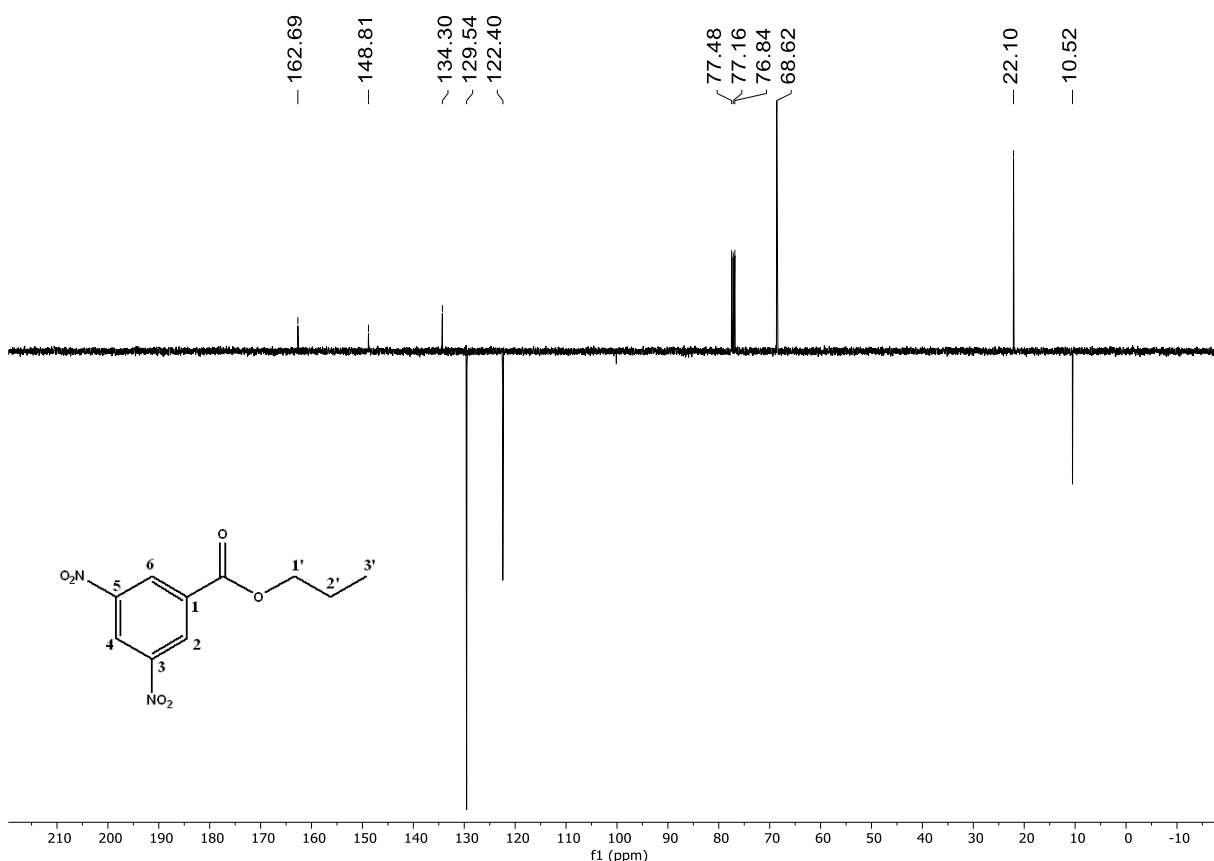
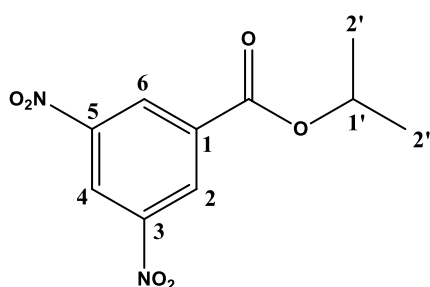


Figura 29: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de propila (**3**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.2.4. 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (**4**)



Aspecto: Sólido amorfo âmbar

Rendimento: 82,36%

Ponto de Fusão: 114,5-114,8 °C (lit. 118-119°C, GARCIA; ARRIETA; PALOMO, 1982)

Fator de Retenção: 0,51 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3118 (C-H sp²); 2989 (C-H, sp³); 1718 (estiramento C=O); 1631 e 1461 (estiramento C=C aromático); 1548 e 1347(estiramento NO₂); 1292 e 1178

(estiramento C-O)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δH 9,21 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4); 9,15 (d, $J = 2,2$ Hz, 2H, H-2, H-6); 5,38 (sept, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-1'), 1,46 (d, $J = 6,3$ Hz, 6H, H-2')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δC 162,10 (C=O); 148,76 (C-3, C-5); 134,70 (C-1); 129,52 (C-2, C-6); 122,31 (C-4); 71,31 (C-1'); 21,95 (C-2') (FABIAN et al., 2014).

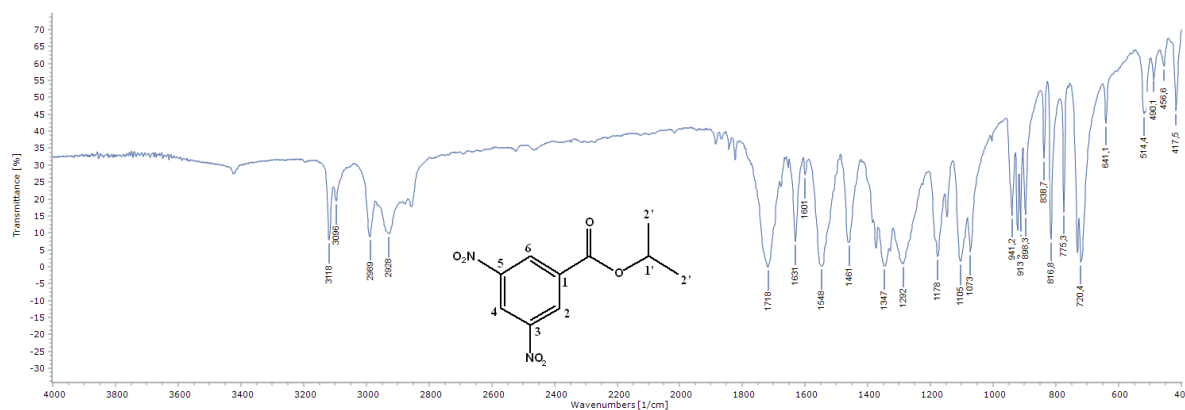


Figura 30: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (4).

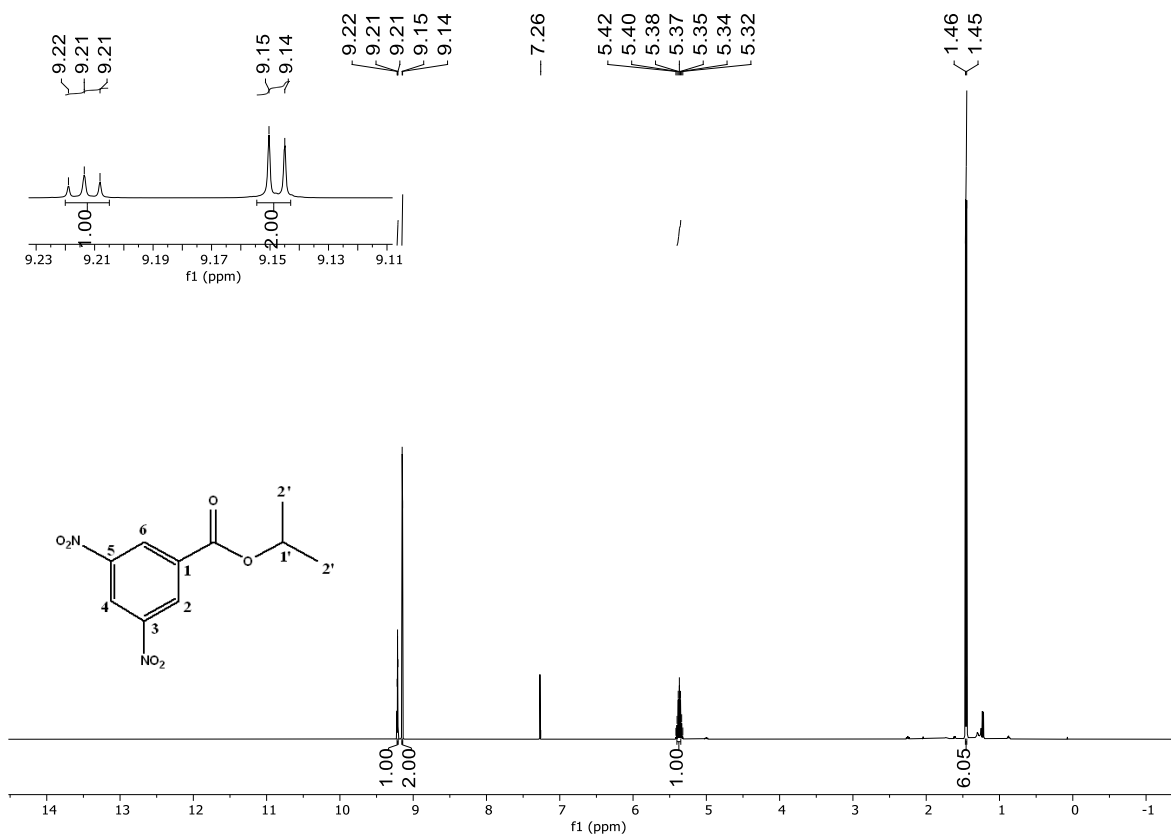


Figura 31: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (4), (CDCl_3 , 400 MHz).

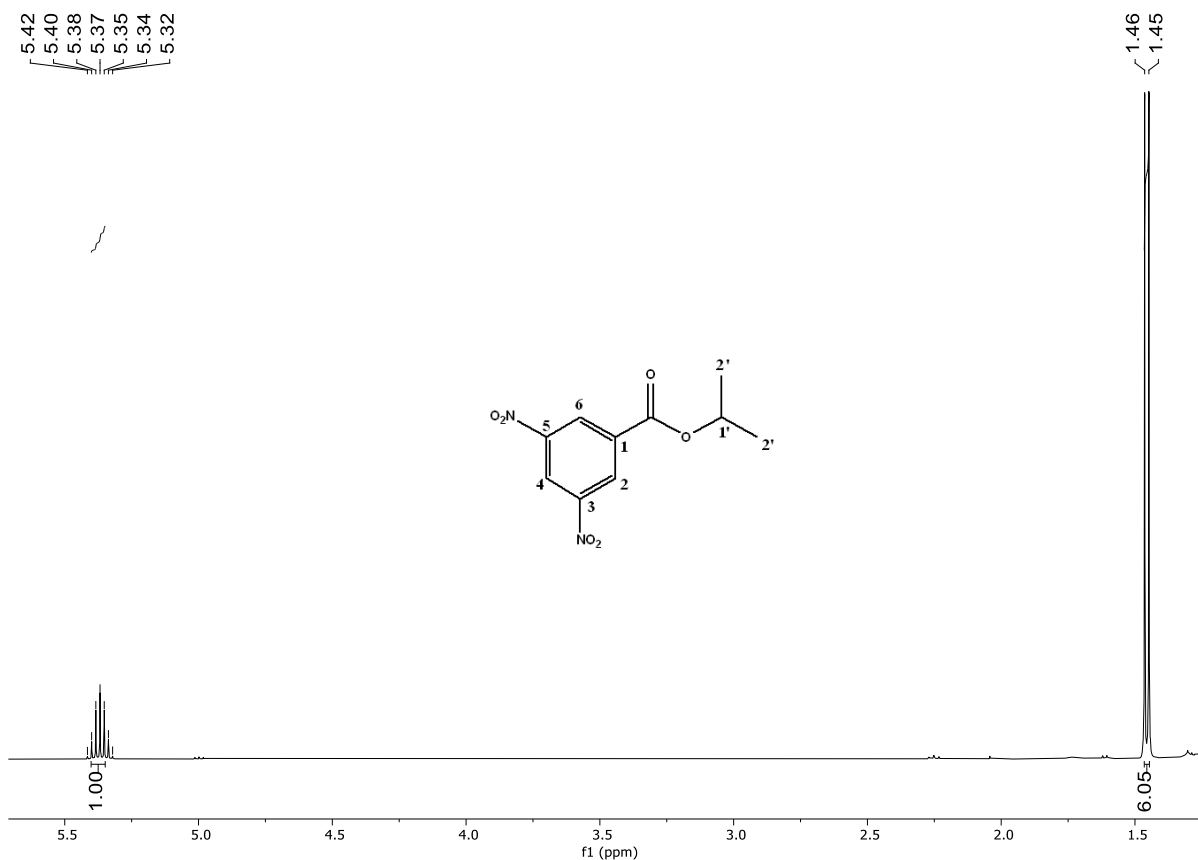


Figura 32: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (**4**), (CDCl₃, 400 MHz).

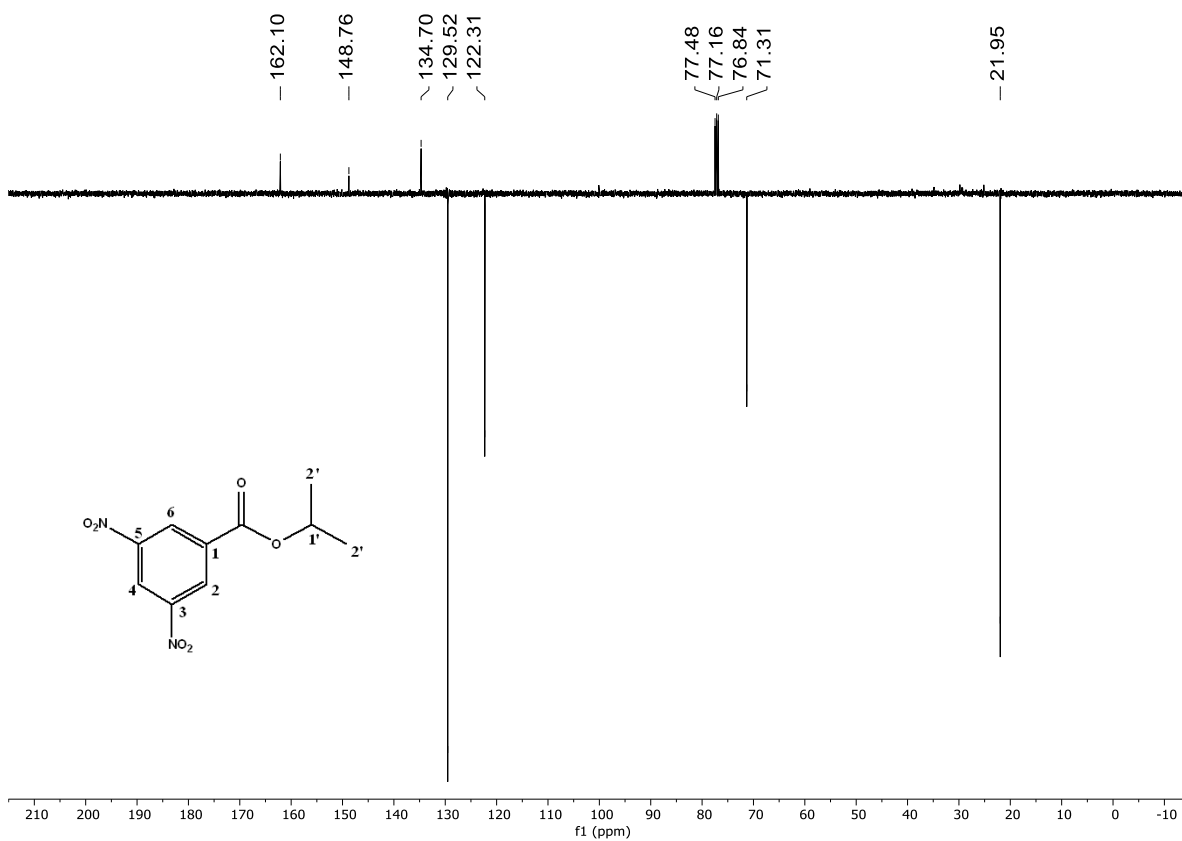
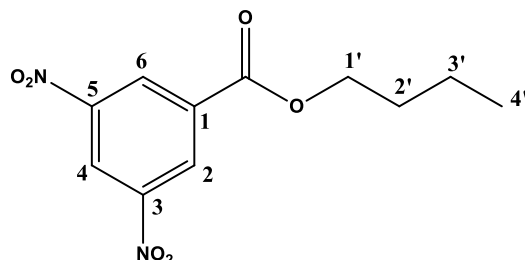


Figura 33: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de isopropila (**4**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.2.5. 3,5-dinitrobenzoato de butila (5)



Aspecto: Sólido cristalino âmbar

Rendimento: 78,53%;

Ponto de Fusão: 62.7-63.1 °C (lit. 63°C, SASTHAV; HARRIS, 1995)

Fator de Retenção: 0,55 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3113 (C-H sp^2); 2963 (C-H, sp^3); 1721 (estiramento C=O); 1631 e 1465 (estiramento C=C aromático); 1548 e 1346 (estiramento NO_2); 1286 e 1176 (estiramento C-O)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ H 9,21 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4), 9,15 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6), 4,46 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-1'), 1,82 (quint, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-2'), 1,50 (sex, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-3'), 1,01 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-4')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ C 162,69 (C=O); 148,80 (C-3, C-5); 134,30 (C-1); 129,53 (C-2, C-6); 122,41 (C-4); 66,97 (C-1'); 30,66 (C-2'); 19,23 (C-3'); 13,82 (C-4') (SASTHAV; HARRIS, 1995)

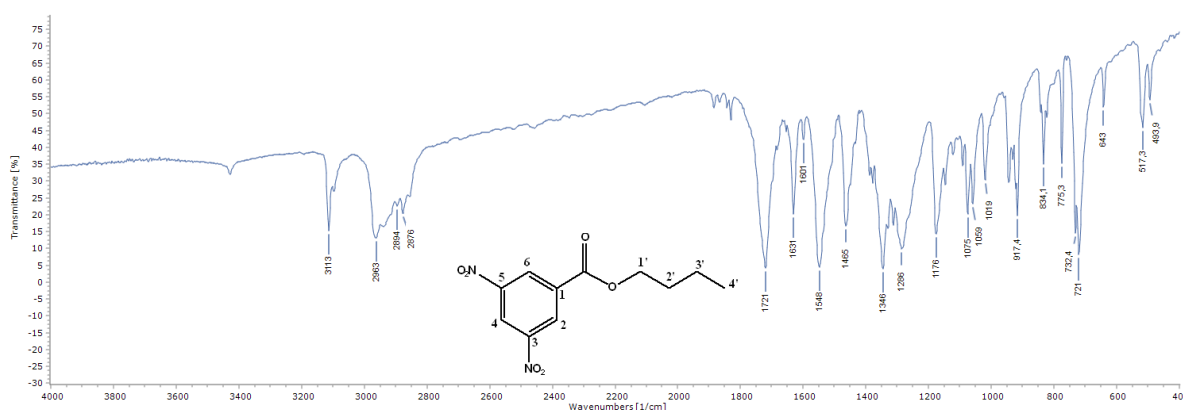


Figura 34: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de butila (5).

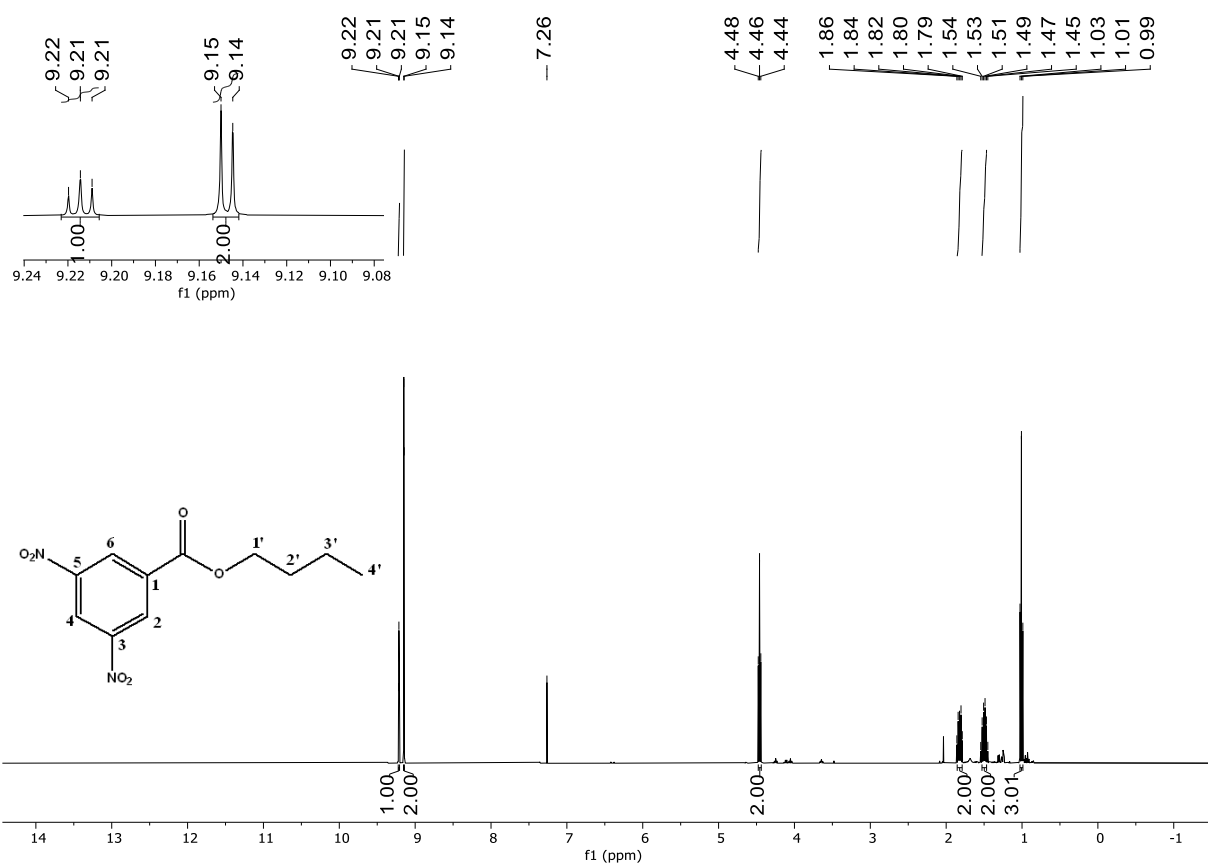


Figura 35: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de butila (**5**), (CDCl_3 , 400 MHz).

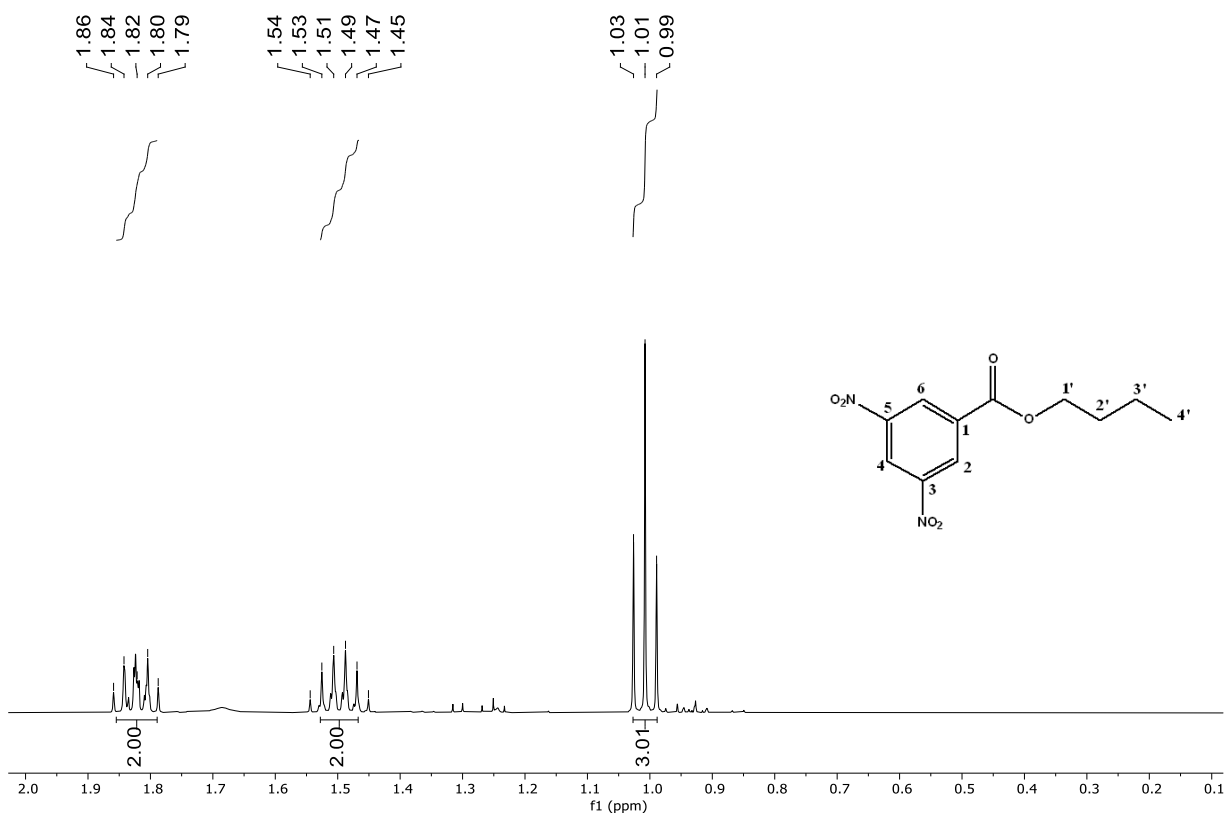


Figura 36: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de butila (**5**), (CDCl_3 , 400 MHz).

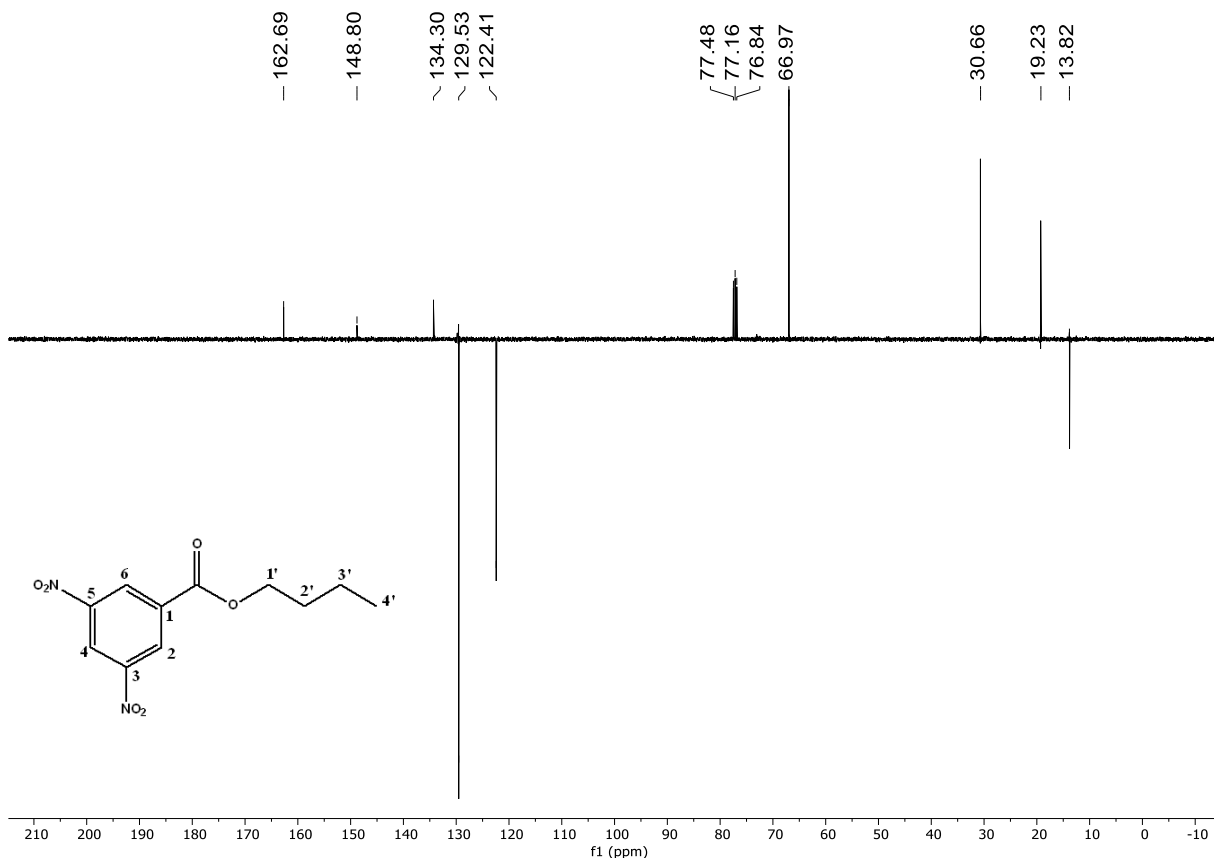
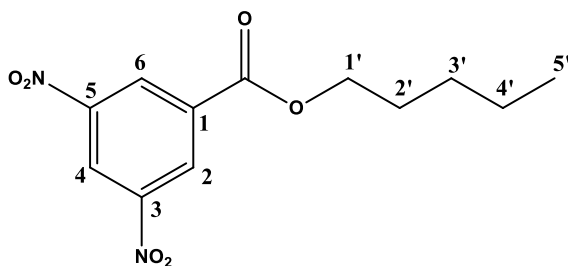


Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de butila (**5**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.2.6. 3,5-dinitrobenzoato de pentila (**6**)



Aspecto: Sólido amorfo marrom

Rendimento: 72,52%

Ponto de Fusão: 43,7-43,8 °C (lit. 46.4 MALONE; REID, 1929)

Fator de Retenção: 0,69 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3097 (C-H sp²); 2962 (C-H, sp³); 1729 (estiramento C=O); 1629

e 1461 (estiramento C=C aromático); 1543 e 1346 (estiramento NO₂); 1286 e 1172 (estiramento C-O)

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δH 9,21 (*t*, *J* = 2,2 Hz, 1H, H- 4); 9,15 (*d*, *J* = 2,2 Hz, 2H, H- 2, H- 6); 4,44 (*t*, *J* = 6,8 Hz, 2H, H- 1'); 1,83 (*quint*, *J* = 7,0 Hz, 2H, H- 2'); 1,45 – 1,39 (*m*, 4H, H- 3', H- 4'); 0,94 (*t*, *J* = 7,1 Hz, 3H, H-5')

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δC 162,71 (C=O); 148,82 (C-3, C-5); 134,32 (C-1); 129,55 (C-2, C-6); 122,43 (C-4); 67,29 (C-1'); 28,39 (C-2'); 28,15 (C-3'); 22,43 (C-4'); 14,06(C-5')

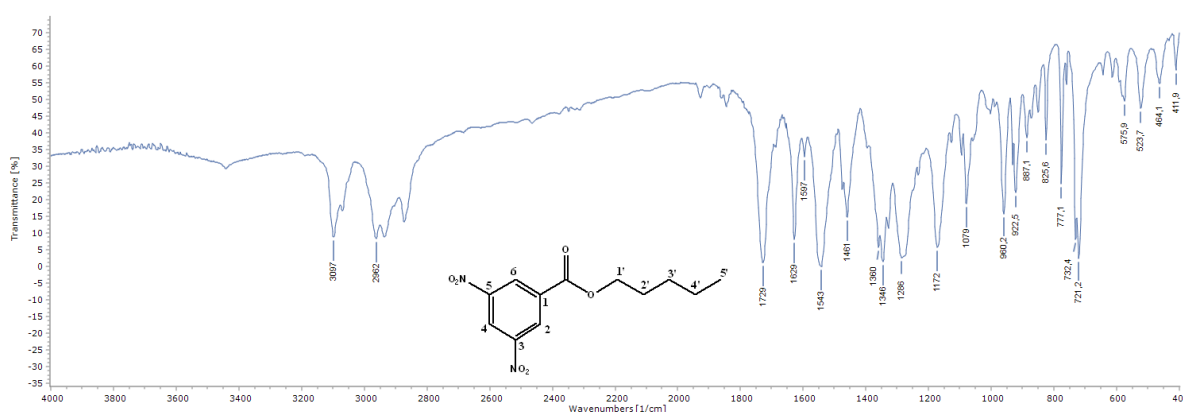


Figura 38: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de 3,5-nitrobenzoato de pentila (**6**).

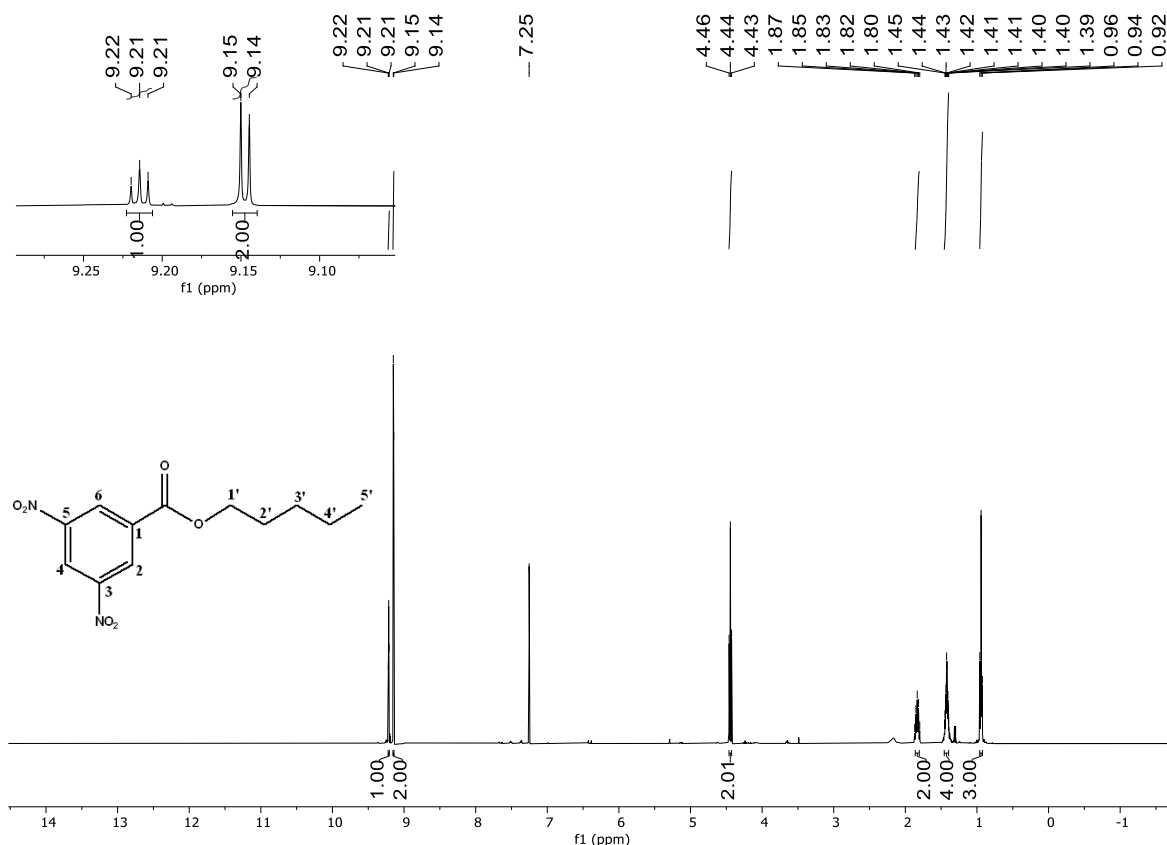


Figura 39: Espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (**6**), (CDCl₃, 400 MHz).

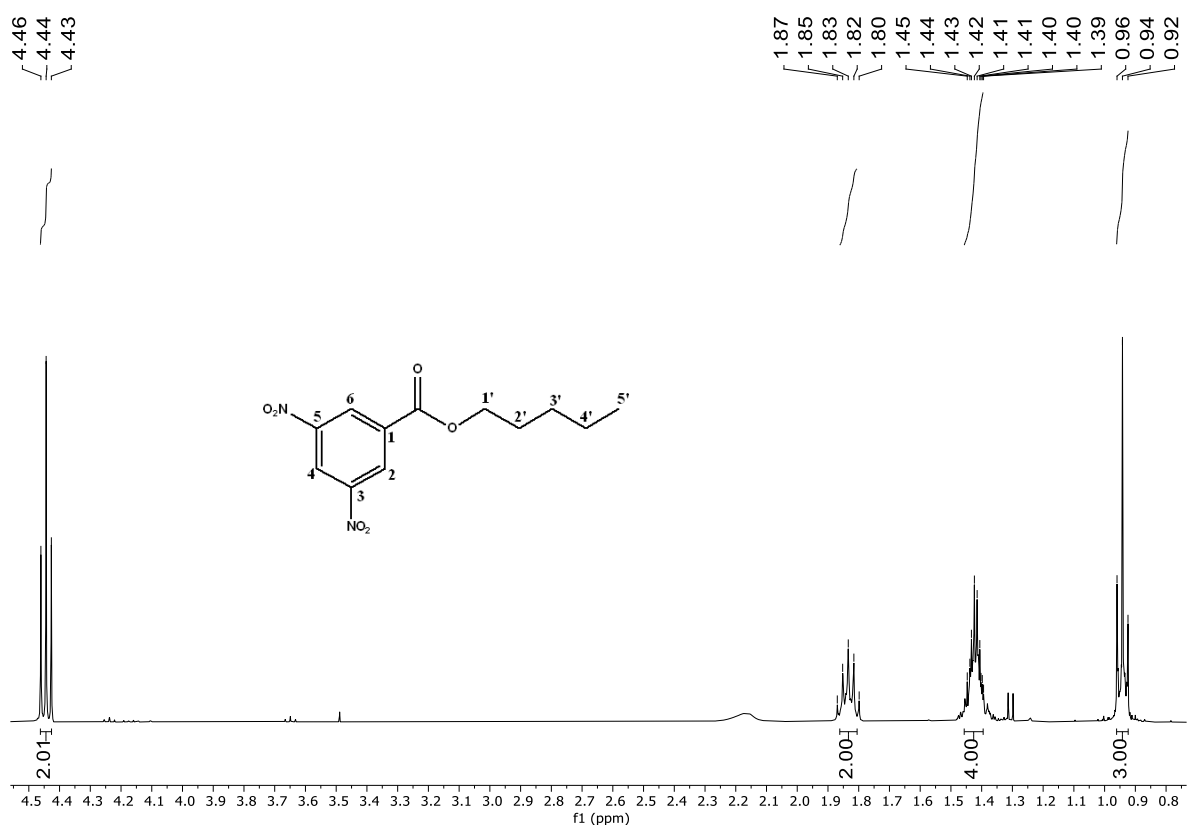


Figura 40: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz).

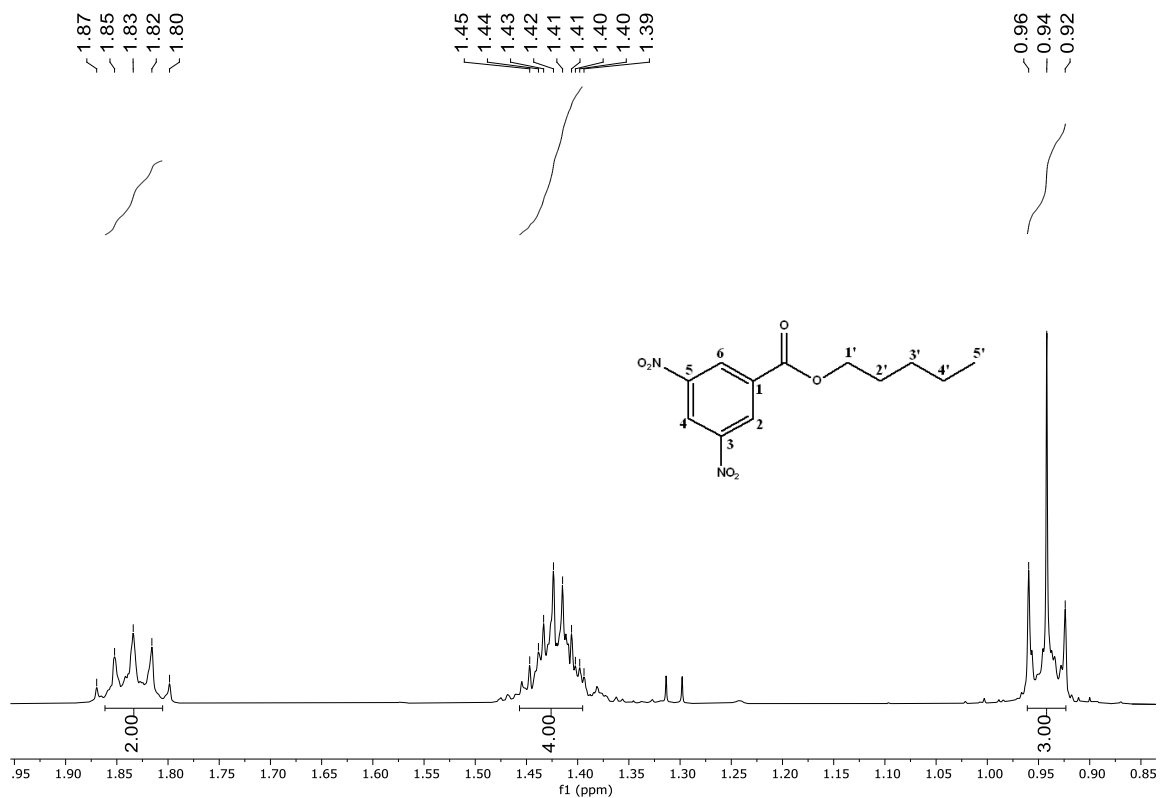


Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz).

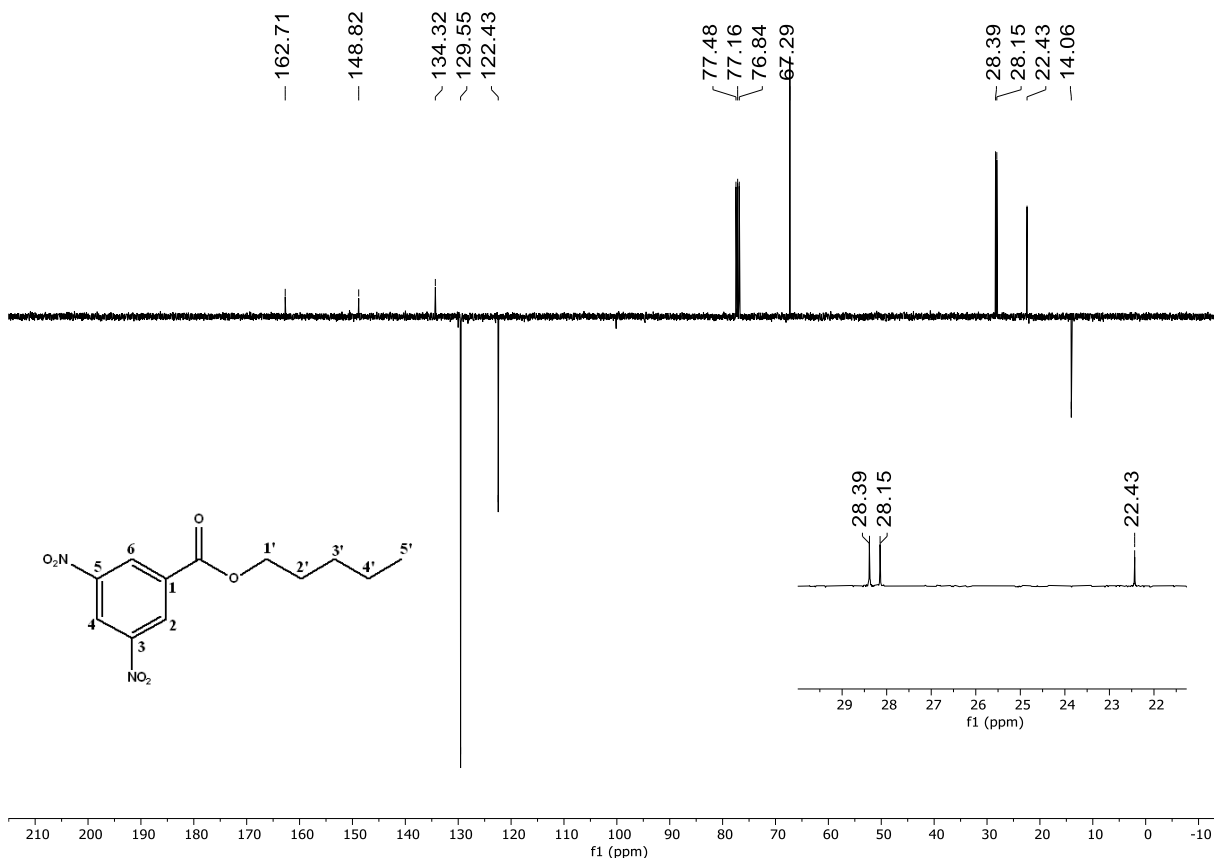
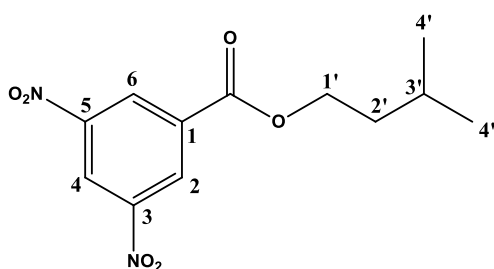


Figura 42: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de pentila (**6**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.2.7. 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (**7**)



Aspecto: Sólido cristalino amarelo

Rendimento: 68,84 %

Ponto de Fusão: 59,9-60,2 °C (lit. 61-62 °C, OELSCHLAGER; FRITSCH, 1985)

Fator de Retenção: 0,74 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3111 (C-H sp²); 2964 (C-H, sp³); 1721 (estiramento C=O); 1631 e 1463 (estiramento C=C aromático); 1547 e 1348 (estiramento NO₂); 1293 e 1174 (estiramento C-O)

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ H 9,22 (*t*, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-4); 9,15 (*d*, *J* = 2,1 Hz,

2H, H-2, H-6); 4,49 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-1'); 1,83-1,70 (m, 3H, H-2', H-3'); 1,00 (d, $J = 6,4$ Hz, 6H, H-4')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δC 162,69 (C=O); 148,78 (C-3, C-5); 134,28 (C-1); 129,54 (C-2, C-6); 122,44 (C-4); 65,82 (C-1'); 37,31 (C-2'); 25,28 (C-3'); 22,59 (C-4') (CHAKRABORTY et al., 2015).

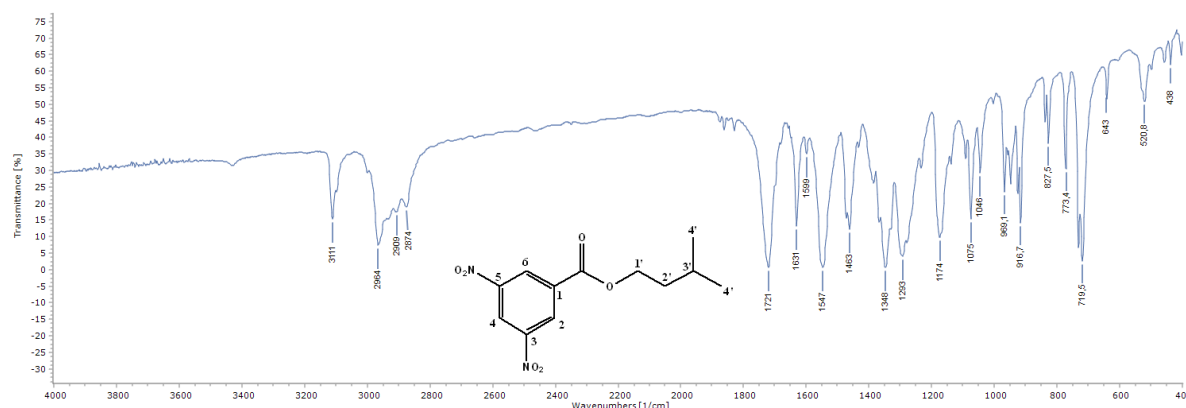


Figura 43: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (7).

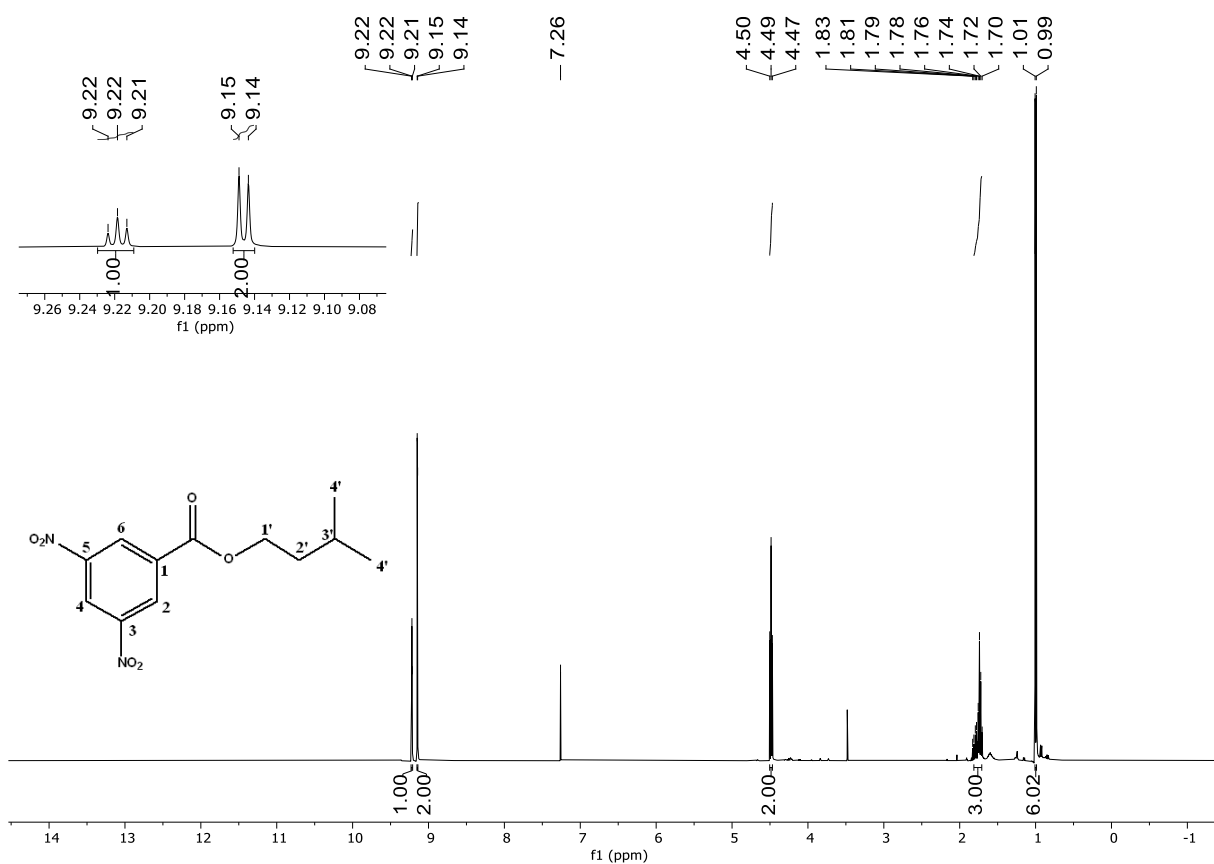


Figura 44: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz).

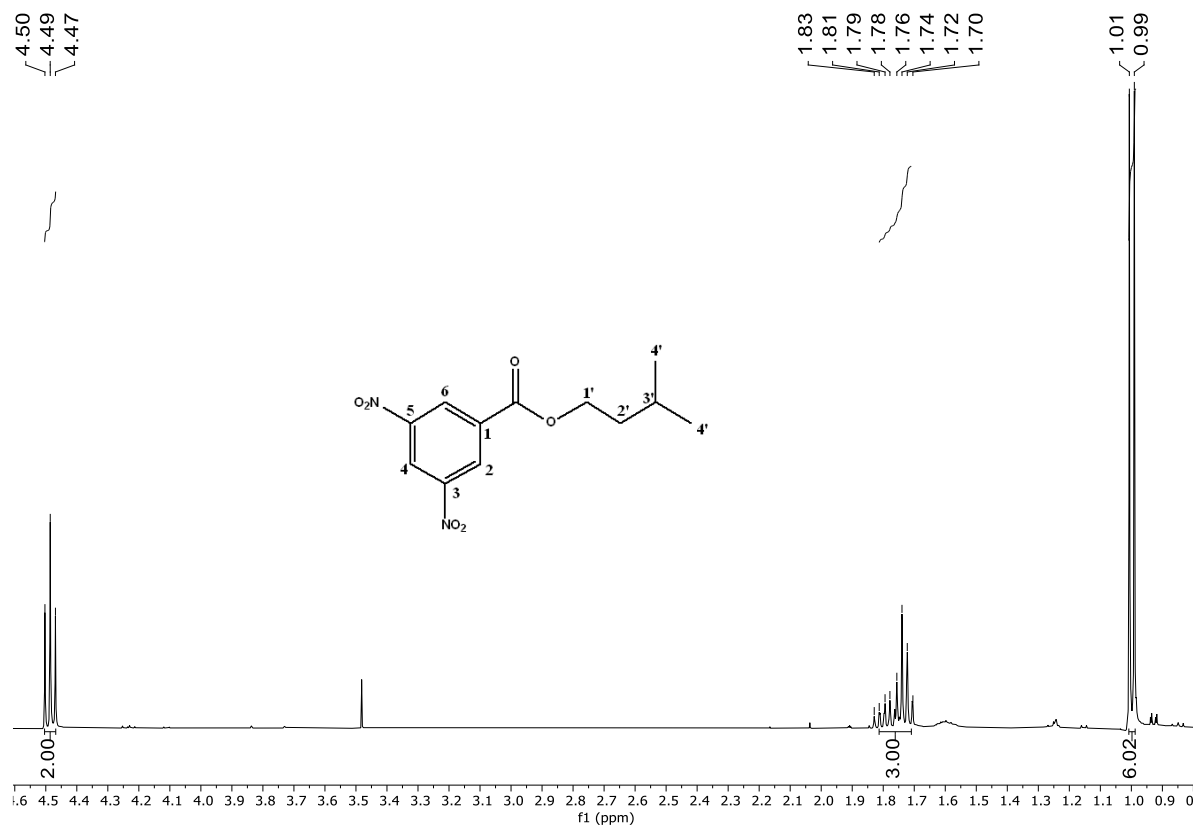


Figura 45: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (**7**), (CDCl_3 , 400 MHz).

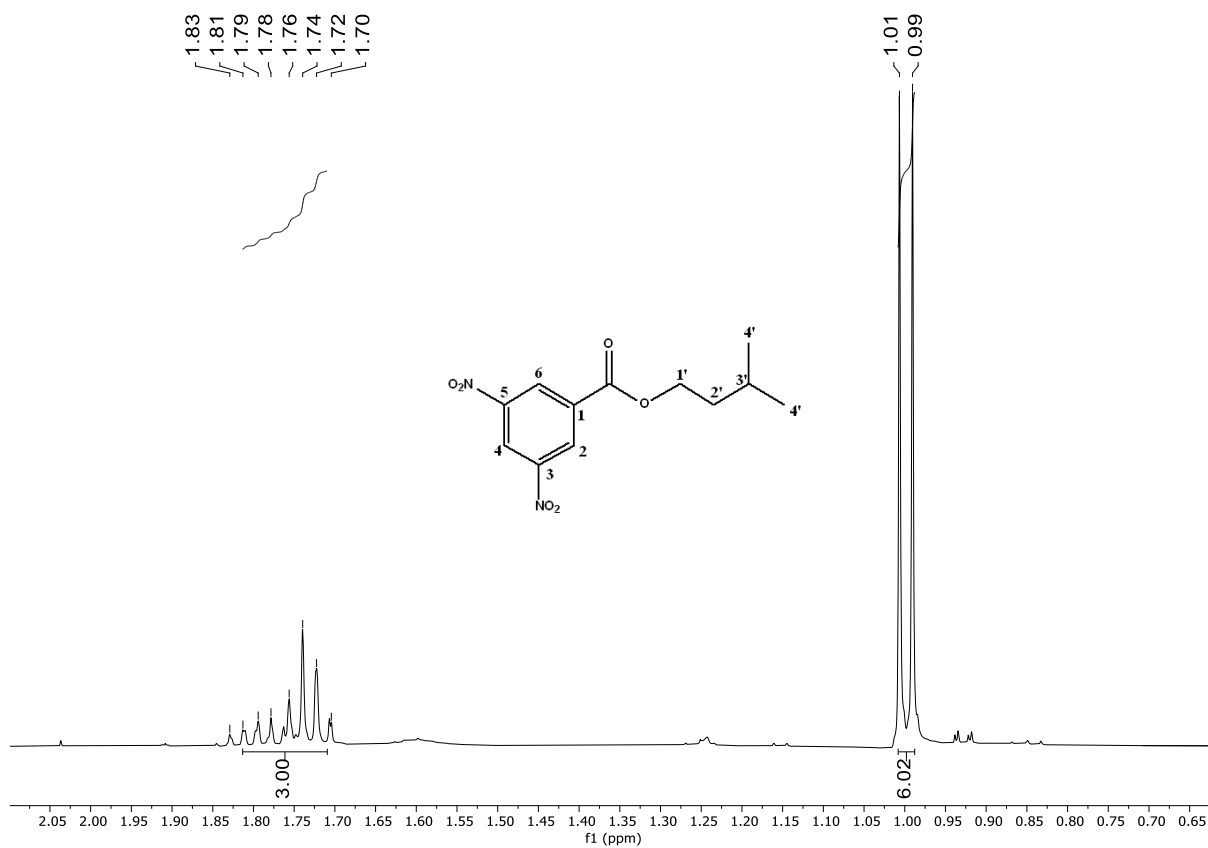


Figura 46: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (**7**), (CDCl_3 , 400 MHz).

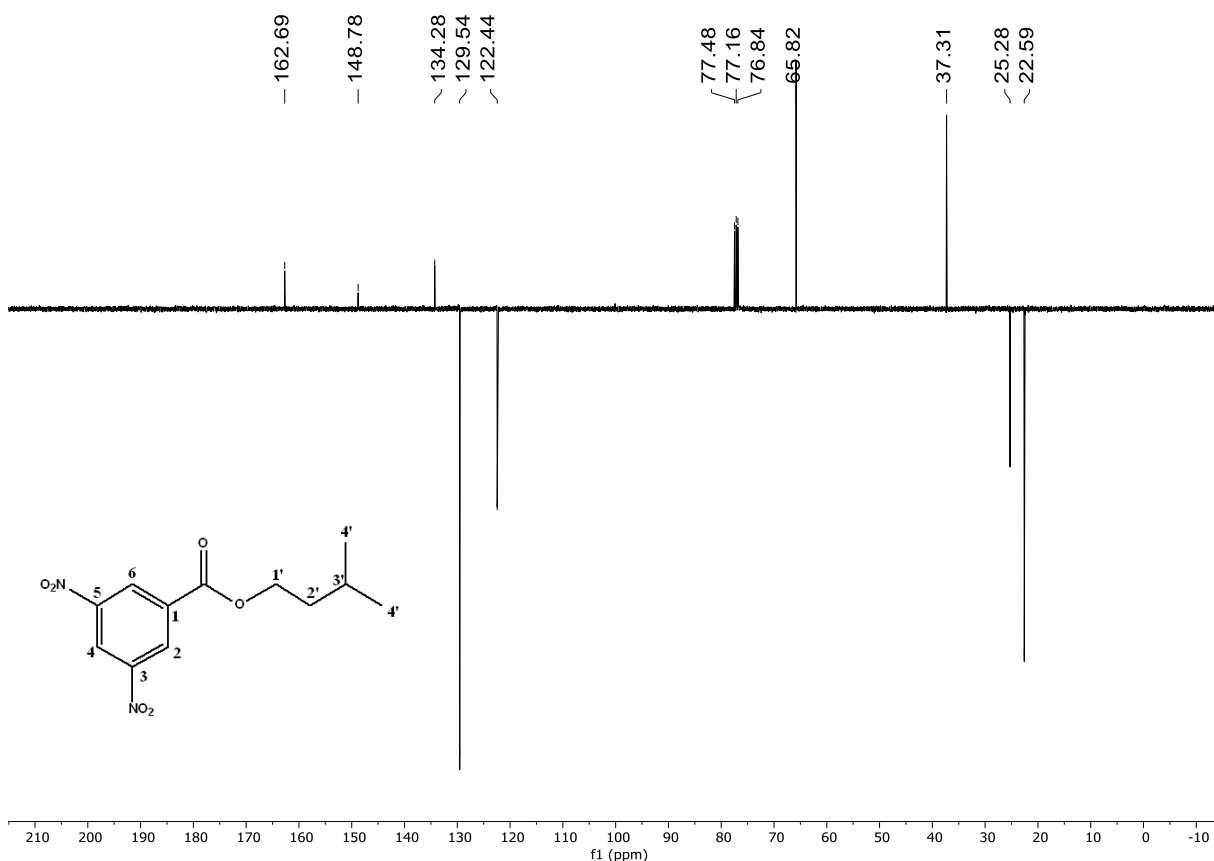
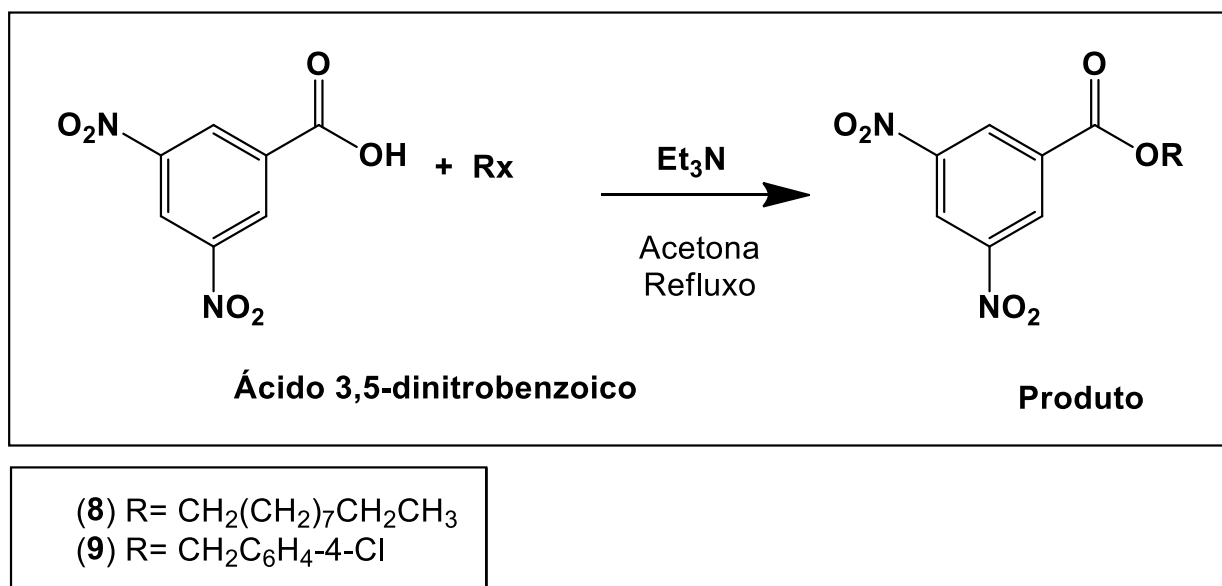


Figura 47: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de isopentila (**7**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.3. Preparação dos derivados 8-9



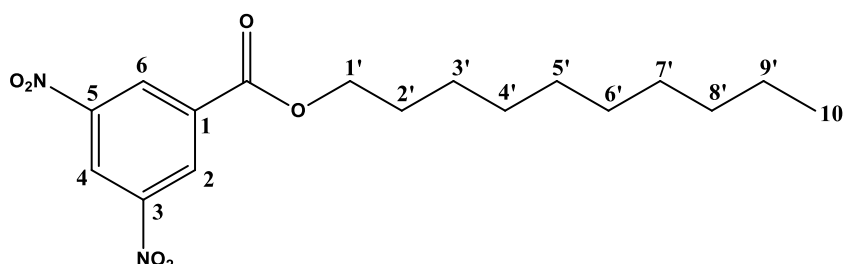
Esquema 11: Reação de esterificação utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e haletos de alquila e arila

Fonte: Elaborado pelo autor

O ácido 3,5-dinitrobenzoico (0,1 g; 0,47 mmol), foi dissolvido em 15 mL de acetona. Posteriormente, foram adicionados 0,25 mL de trietilamina (1,89 mmol) e o haleto (0,49 mmol). A mistura reacional foi aquecida sob refluxo durante 48 horas, monitorada por CCDA. Em seguida, o solvente foi parcialmente evaporado sob pressão reduzida. O produto obtido foi extraído com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada sucessivamente com água destilada, seca com Na₂SO₄, filtrada, e evaporada sob pressão reduzida. Os resíduos foram purificados por meio de uma coluna cromatográfica em sílica gel 60, tendo como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila, em gradiente crescente de polaridade (BOECK et al., 2005; LI et al., 2012).

11.4. Dados espectroscópicos dos ésteres 8-9

11.4.1. 3,5-dinitrobenzoato de decila (8)



Aspecto: Sólido amorfo amarelo

Rendimento: 44,79%

Ponto de Fusão: 53,2-53,7°C (lit. 44,6°C, (TSUDA; KOJIMA; OH, 2006)

Fator de Retenção: 0,74 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3095 (C-H sp²); 2922 (C-H, sp³); 1728 (estiramento C=O); 1627 e 1461 (estiramento C=C aromático); 1542 e 1346 (estiramento NO₂); 1288 e 1171 (estiramento C-O)

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ H 9,22 (*t*, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-4); 9,15 (*d*, *J* = 2,2 Hz, 2H, H-2, H-6); 4,45 (*t*, *J* = 6,8 Hz, 2H, H-1'), 1,83 (*quint*, *J* = 6,8 Hz, 2H, H-2'), 1,46 – 1,27 (*m*, 14H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'); 0,87 (*t*, *J* = 6,8 Hz, 3H, H-10')

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ C 162,70 (C=O); 148,81 (C-3, C-5); 134,33 (C-1); 129,54 (C-2, C-6); 122,37 (C-4); 67,30 (C-1'); 32,00 (C-2'); 29,64 (C-3'); 29,61 (C-4');

29,42 (C-5'); 29,35 (C-6'); 28,68 (C-7'); 26,02 (C-8'); 22,80 (C-9'); 14,23 (C-10')
(TSUDA; KOJIMA; OH, 2006).

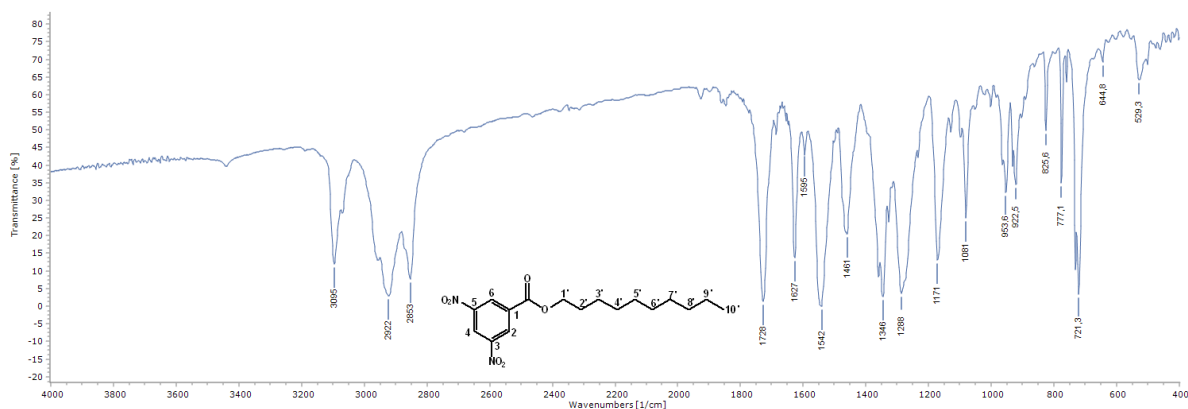


Figura 48: Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de 3,5-dinitrobenzoato de decila (**8**).

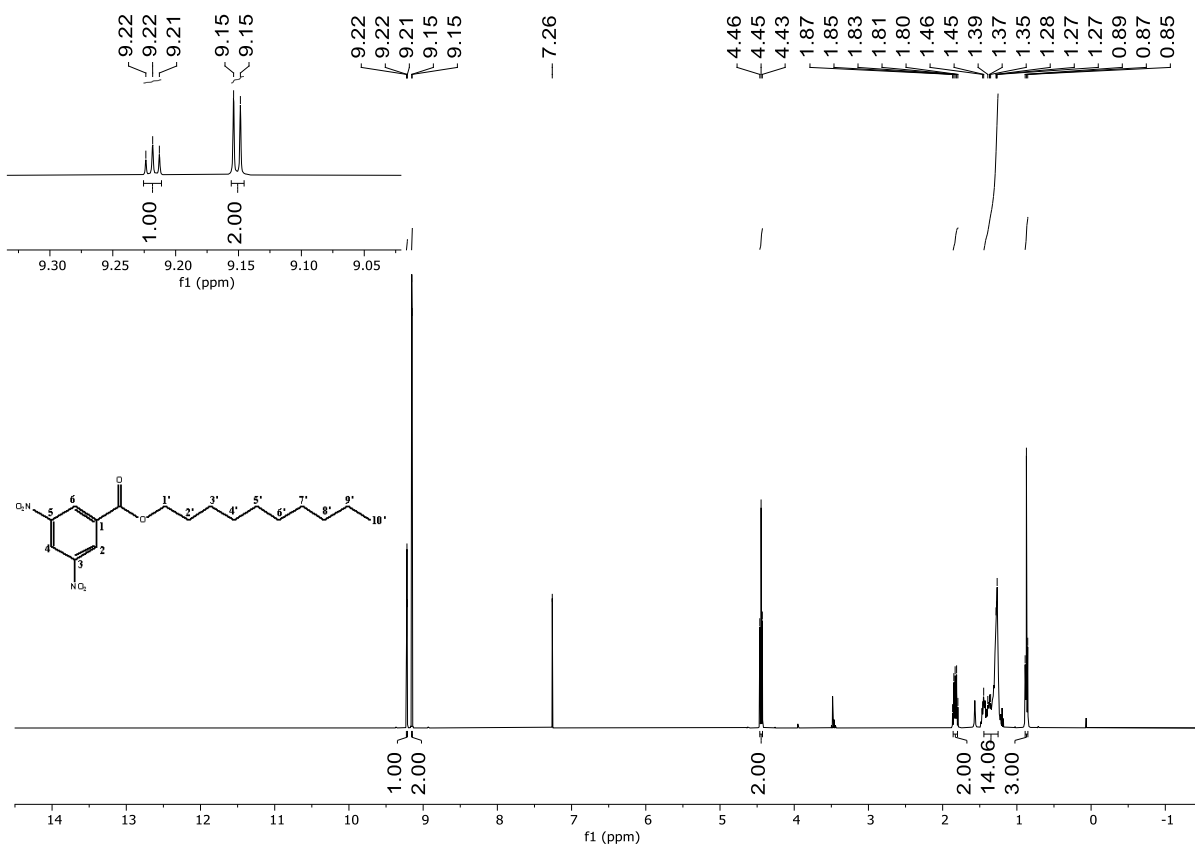


Figura 49: Espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de decila (**8**), (CDCl₃, 400 MHz).

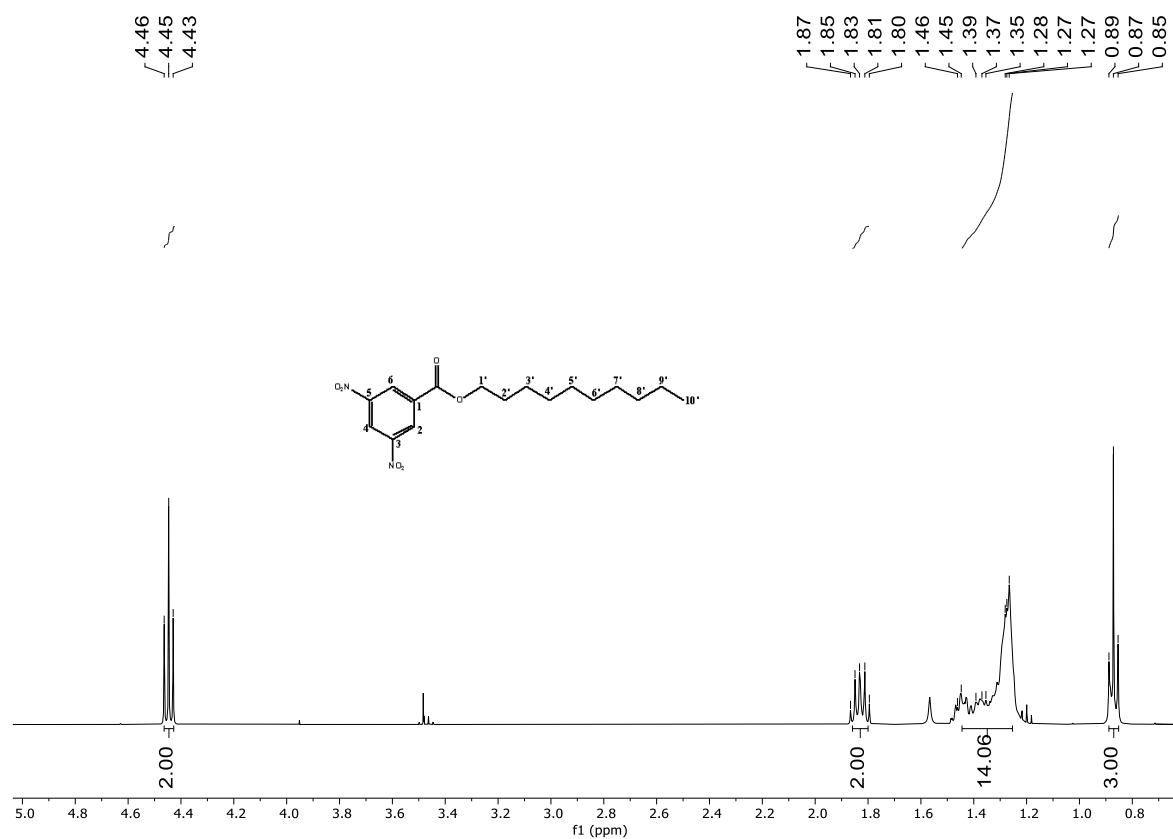


Figura 50: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de decila (8), (CDCl₃, 400 MHz).

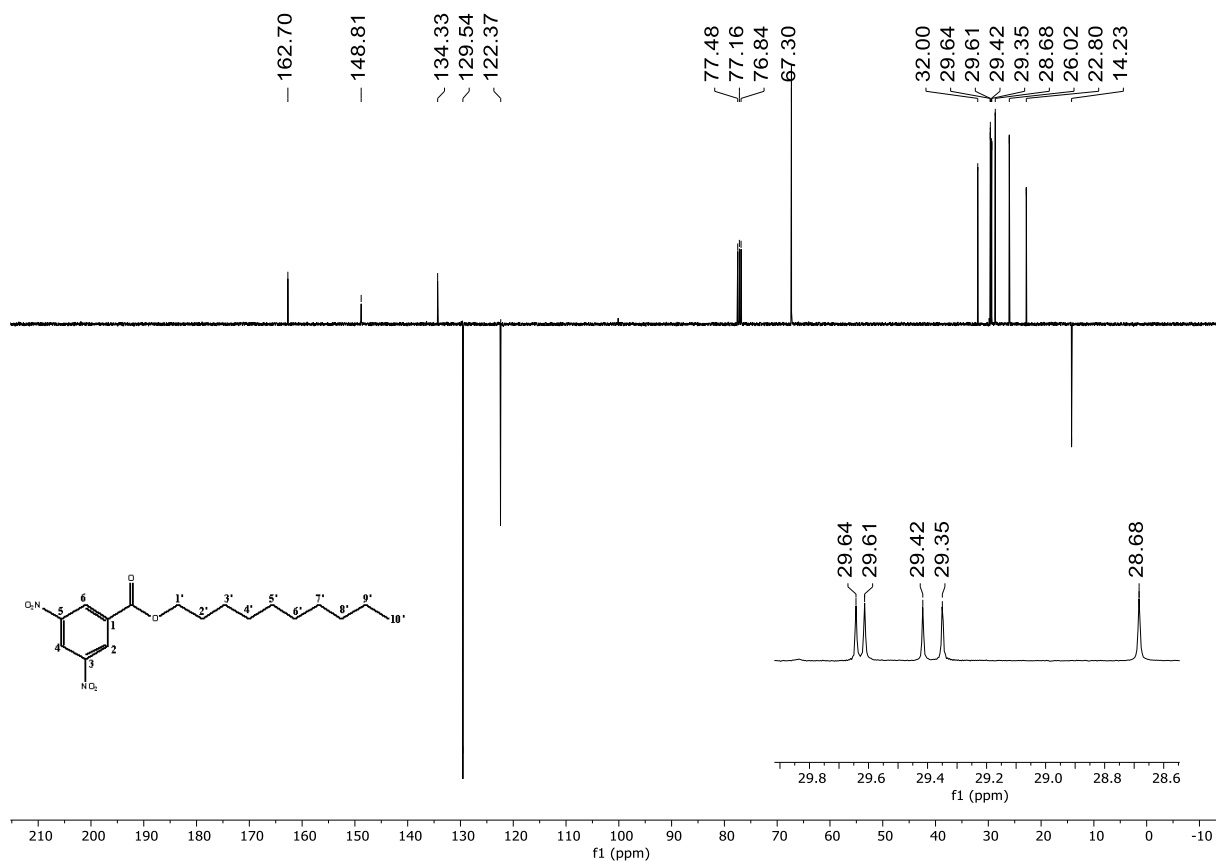
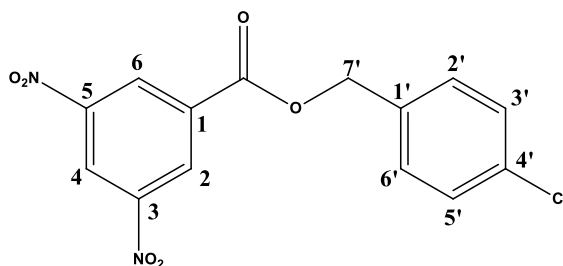


Figura 51: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de decila (8), (CDCl₃, 100 MHz).

11.4.2. 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9)



Aspecto: Sólido cristalino amarelo

Rendimento: 33,42%

Ponto de Fusão: 123,7-123,9 °C

Fator de Retenção: 0,41(9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3101 (C-H sp^2); 2885 (C-H, sp^3); 1720 (estiramento C=O); 1629 e 1493 (estiramento C=C aromático); 1545 e 1347 (estiramento NO_2); 1277 e 1167 (estiramento C-O); 1014 (C-Cl)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 9,22 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4); 9,15 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,44 – 7,38 (m, 4H, (H-2', H-3', H-5', H-6')); 5,44 (s, 2H, H-7')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 162,46 (C=O); 148,83 (C-3, C-5); 135,24 (C-1); 133,76 (C-1'); 133,11 (C-4'); 130,42 (C-2', C-6'); 129,64 (C-2, C-6); 129,25 (C-3', C-5'); 122,74 (C-4); 67,90 (C-7'). EMAR (MALDI) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 337,023; encontrado 337,026.

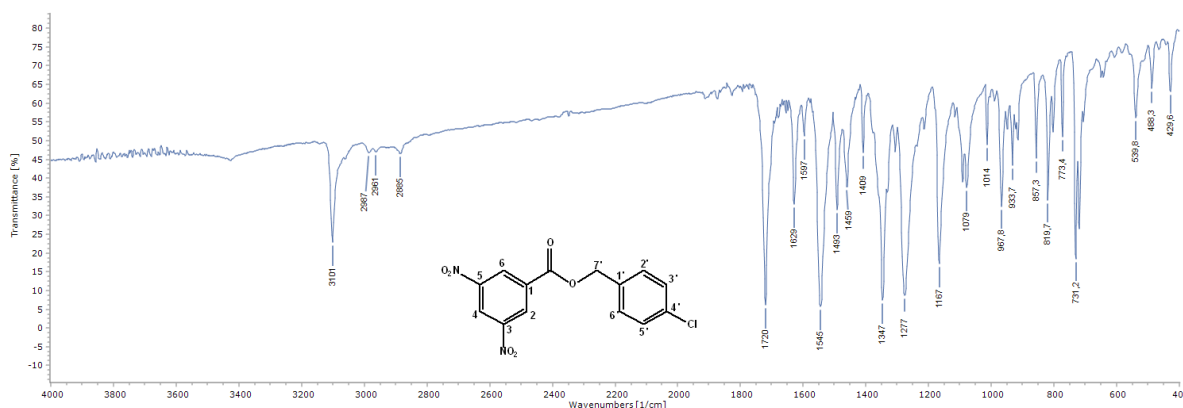


Figura 52: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (9).

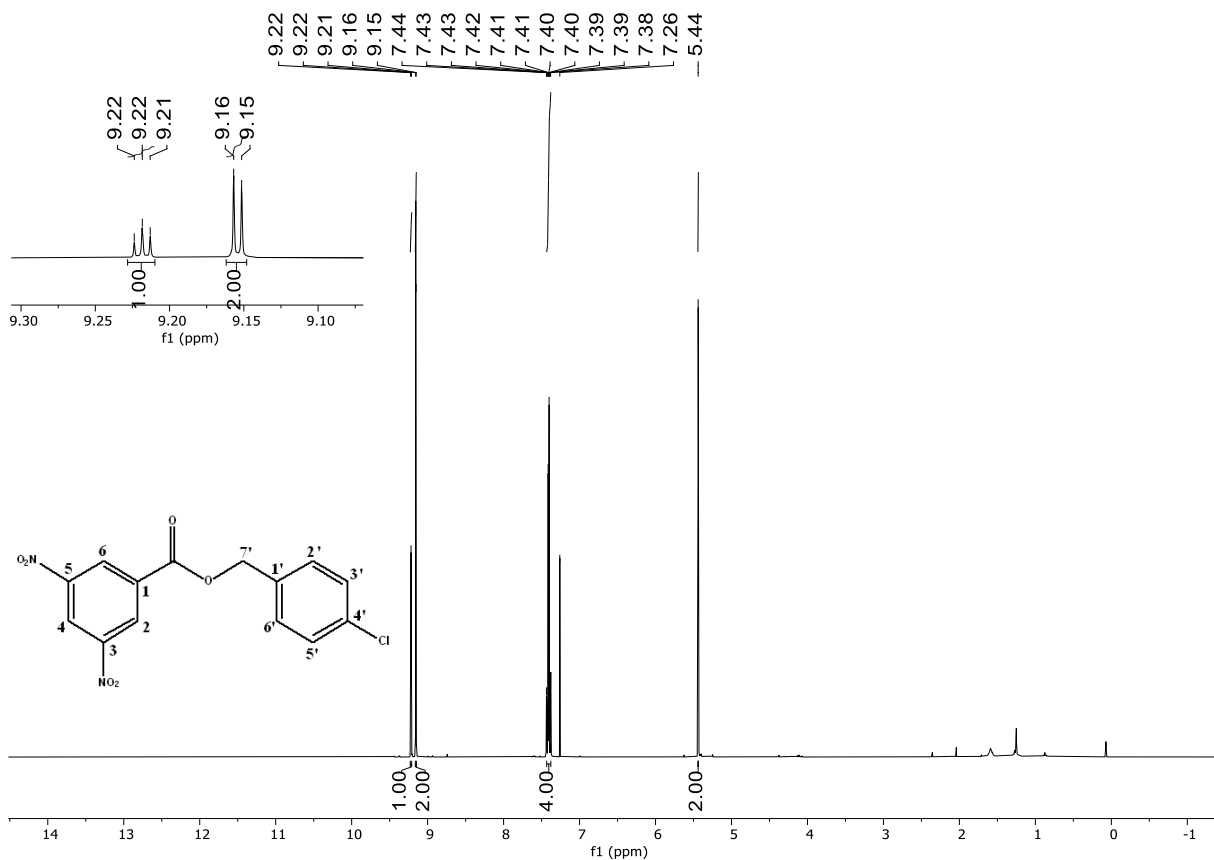


Figura 53: Espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl₃, 400 MHz).

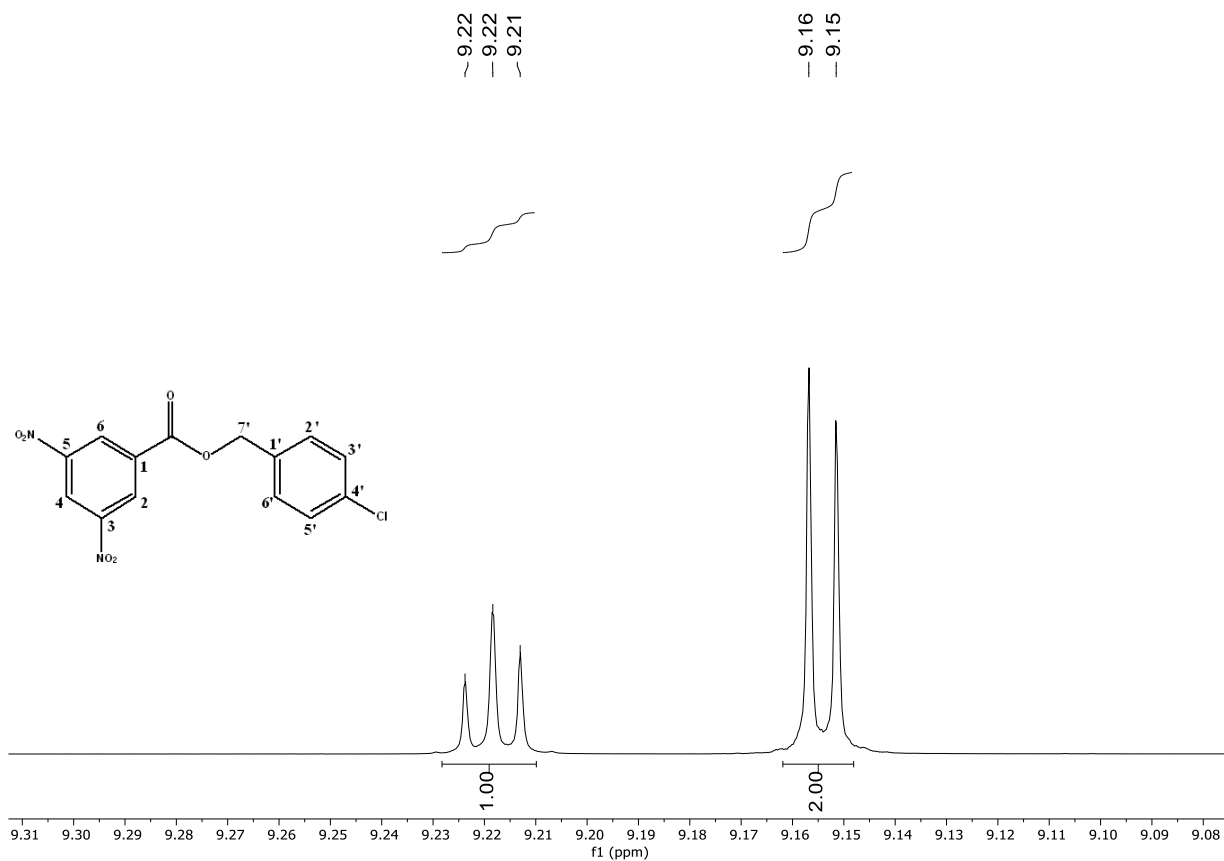


Figura 54: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl₃, 400 MHz).

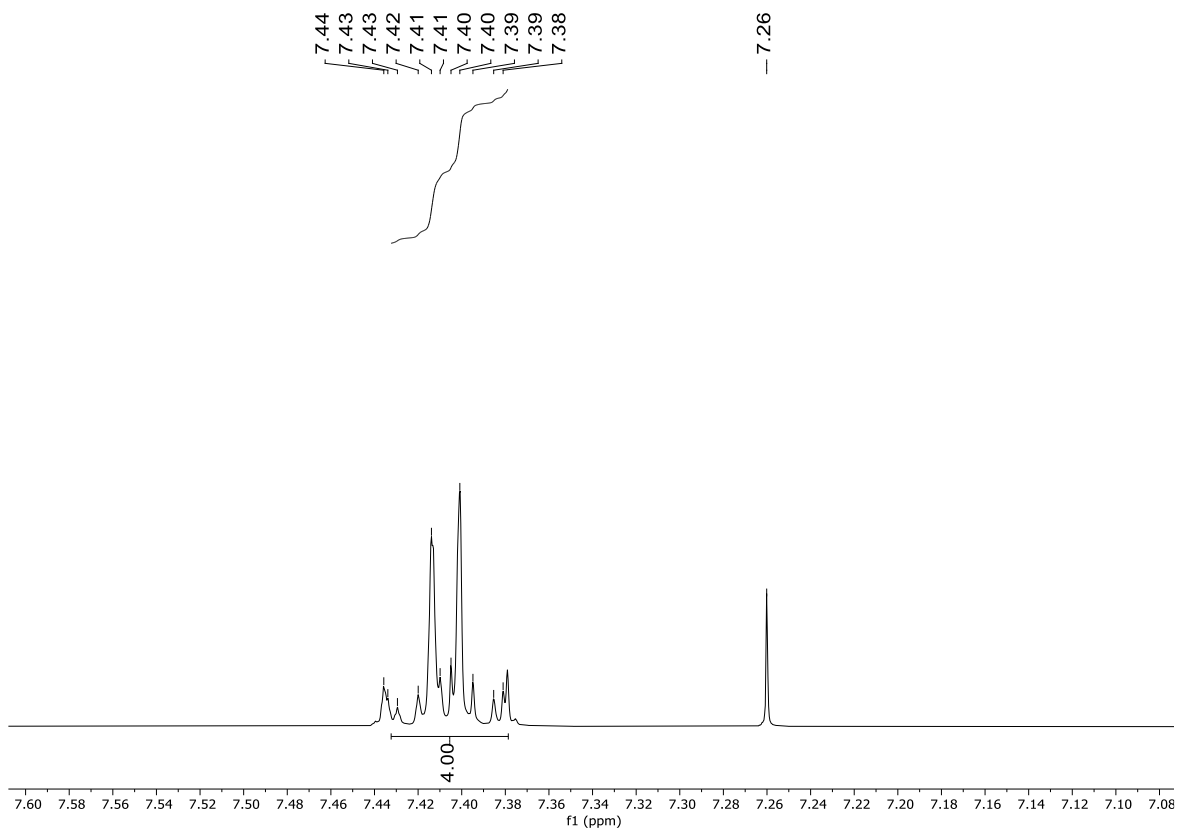


Figura 55: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl_3 , 400 MHz).

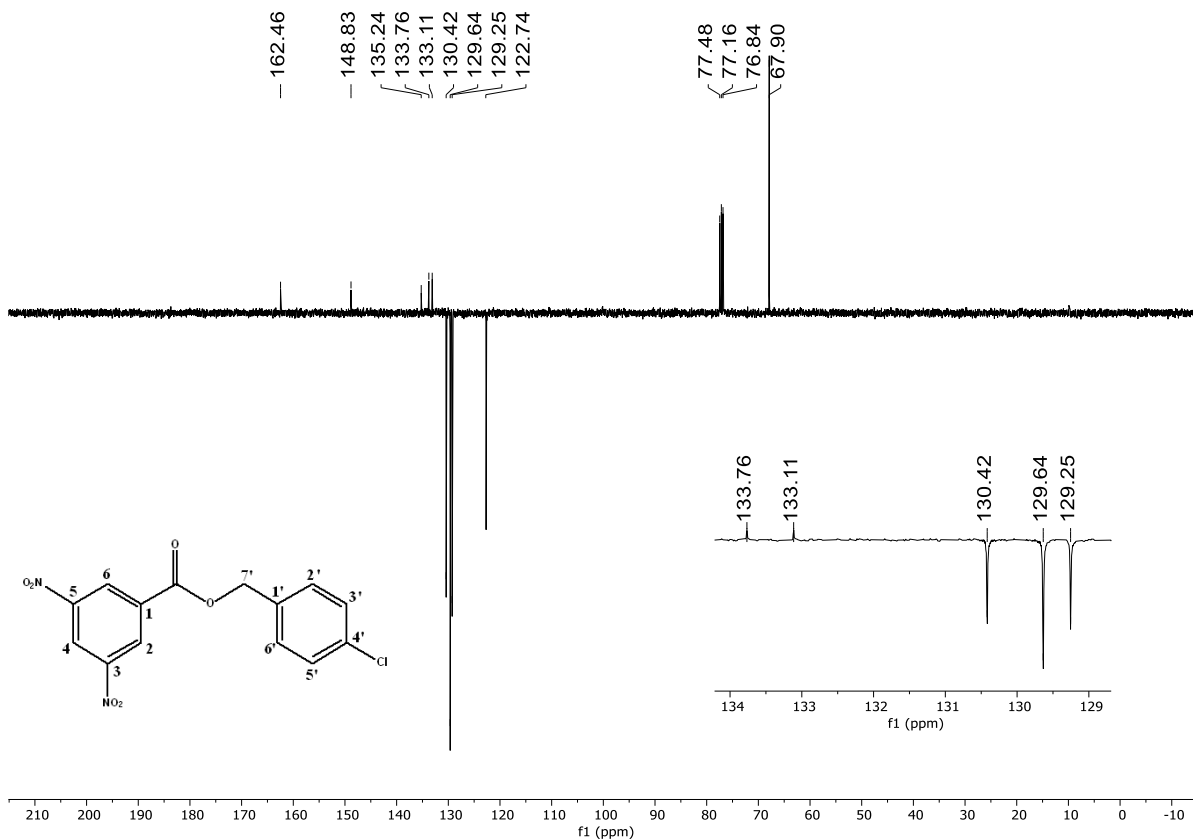
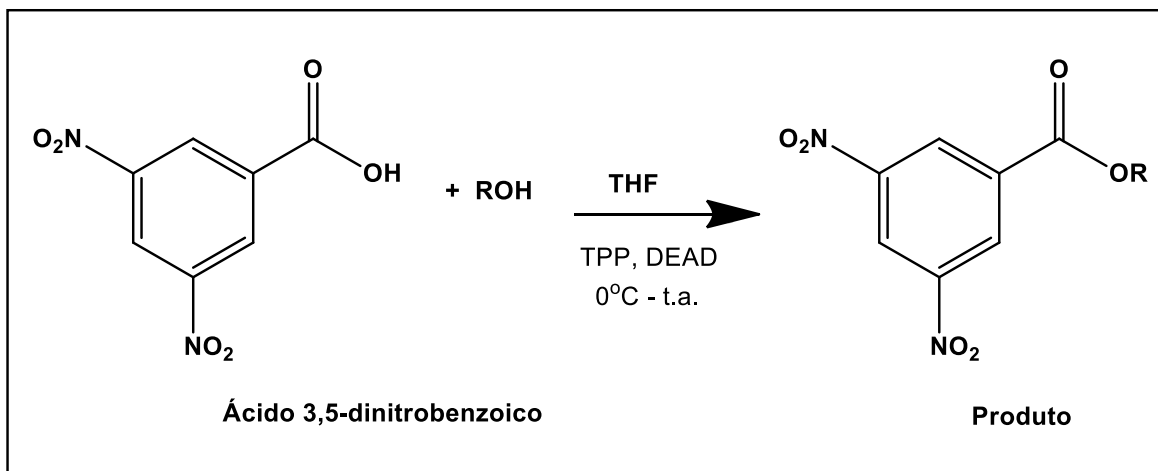


Figura 56: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl_3 , 100 MHz).

11.5. Preparação dos derivados 10-12

Esquema 12: Reação de Mitsunobu utilizando o ácido 3,5-dinitrobenzoico e álcoois aromáticos.



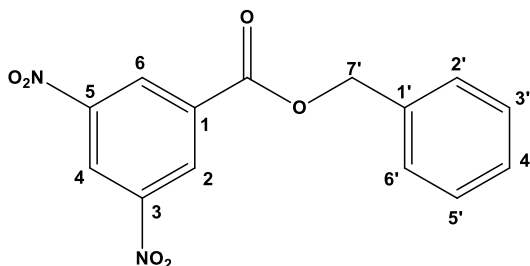
- (10) R= CH₂C₆H₅
 (11) R= CH₂C₆H₄-4-OCH₃
 (12) R= CH₂C₆H₄-4-CH(CH₃)₂

Fonte: Elaborado pelo autor

O ácido 3,5-dinitrobenzoico (0,1 g; 0,47 mmol) e o álcool (0,47 mmol), foram dissolvidos em 1,57 mL tetrahydrofurano (THF). O conteúdo ficou sob agitação magnética, à temperatura de 0° C, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados agentes de esterificação azodicarboxilato de dietila (0,09 mL; 0,47 mmol) e trifenilfosfina - PPh₃ (0,12 g; 0,47 mmol) e a agitação foi mantida à temperatura ambiente, durante 72 horas, monitorada por TLC. Posteriormente, o solvente foi parcialmente rotaevaporado sob pressão reduzida. O produto obtido foi extraído com de acetato de etila (3x10 mL) e 10 mL de água destilada. A fase orgânica foi tratada com 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio a 5% (NaHCO₃), lavada com água destilada, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Os resíduos foram purificados em coluna cromatográfica em sílica gel 60, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila, em diferentes proporções (HANDIQUE et al., 2013).

11.6. Dados espectroscópicos dos ésteres 10-12

11.6.1. 3,5-dinitrobenzoato de benzila (10)



Aspecto: Sólido amorfo amarelo

Rendimento: 23,86%

Ponto de Fusão: 106,4-106,9°C (lit. 117-118°C, MOU et al., 2017)

Fator de Retenção: 0,48 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3103 (C-H sp^2); 2877 (C-H, sp^3); 1740 (estiramento C=O); 1629 e 1498 (estiramento C=C aromático); 1540 e 1347 (estiramento NO_2); 1278 e 1168 (estiramento C-O)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 9,21 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4); 9,17 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H H-2, H-6); 7,49 – 7,46 (m, 2H, H-2', H-6'); 7,45 – 7,39 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'), 5,48 (s, 2H, H-7')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 162,54 (C=O); 148,84 (C-3, C-5); 134,67 (C-1'); 134,02 (C-1); 129,64 (C-2, C-6); 129,18 (C-3', C-5'); 129,02 (C-4'); 128,95 (C-2', C-6'); 122,57 (C-4) 68,77 (C-7') (CHAKRABORTY et al., 2015; MOU et al., 2017; BUT; LU; TOY, 2010).

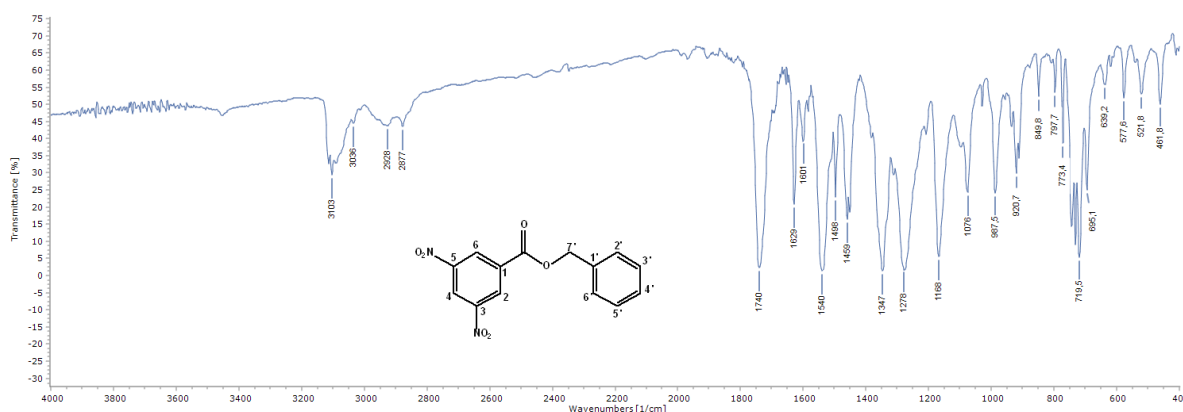


Figura 57: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (10).

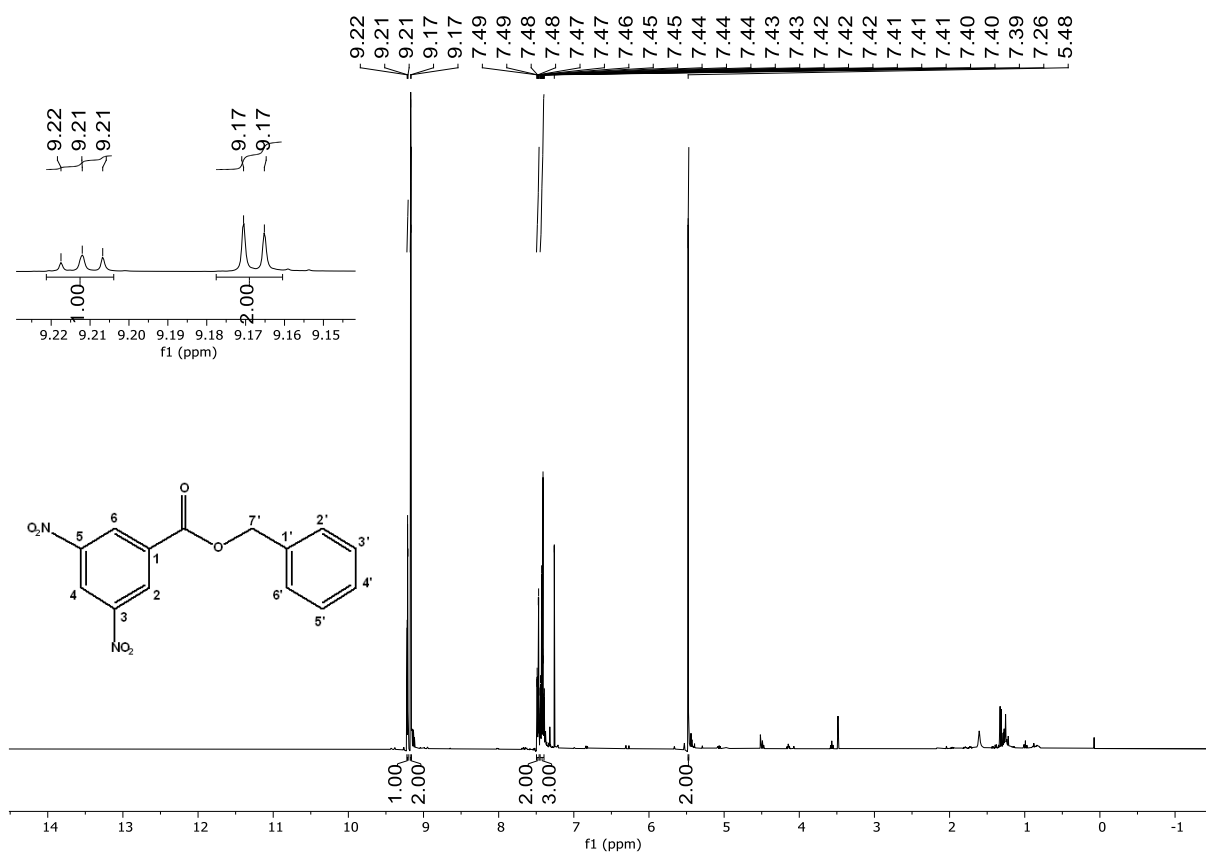


Figura 58: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (**10**), (CDCl_3 , 400 MHz).

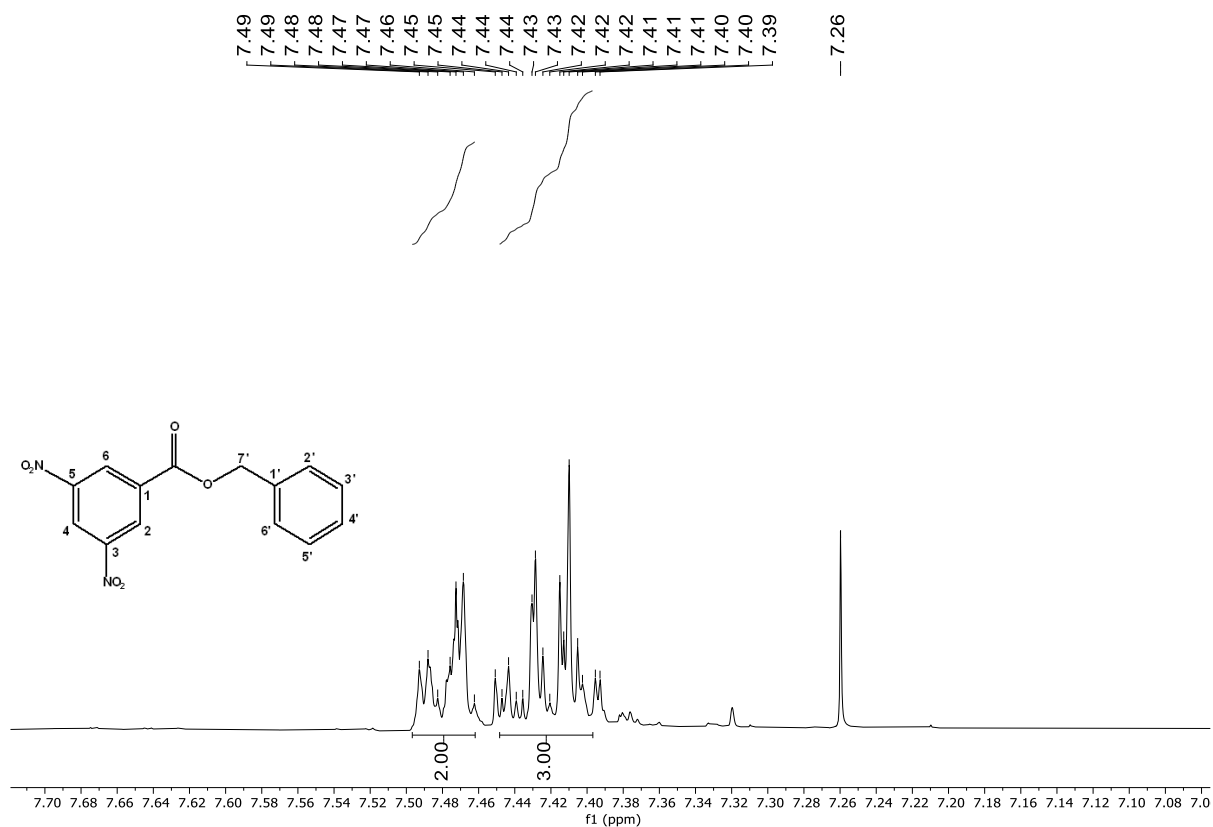


Figura 59: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (**10**), (CDCl_3 , 400 MHz).

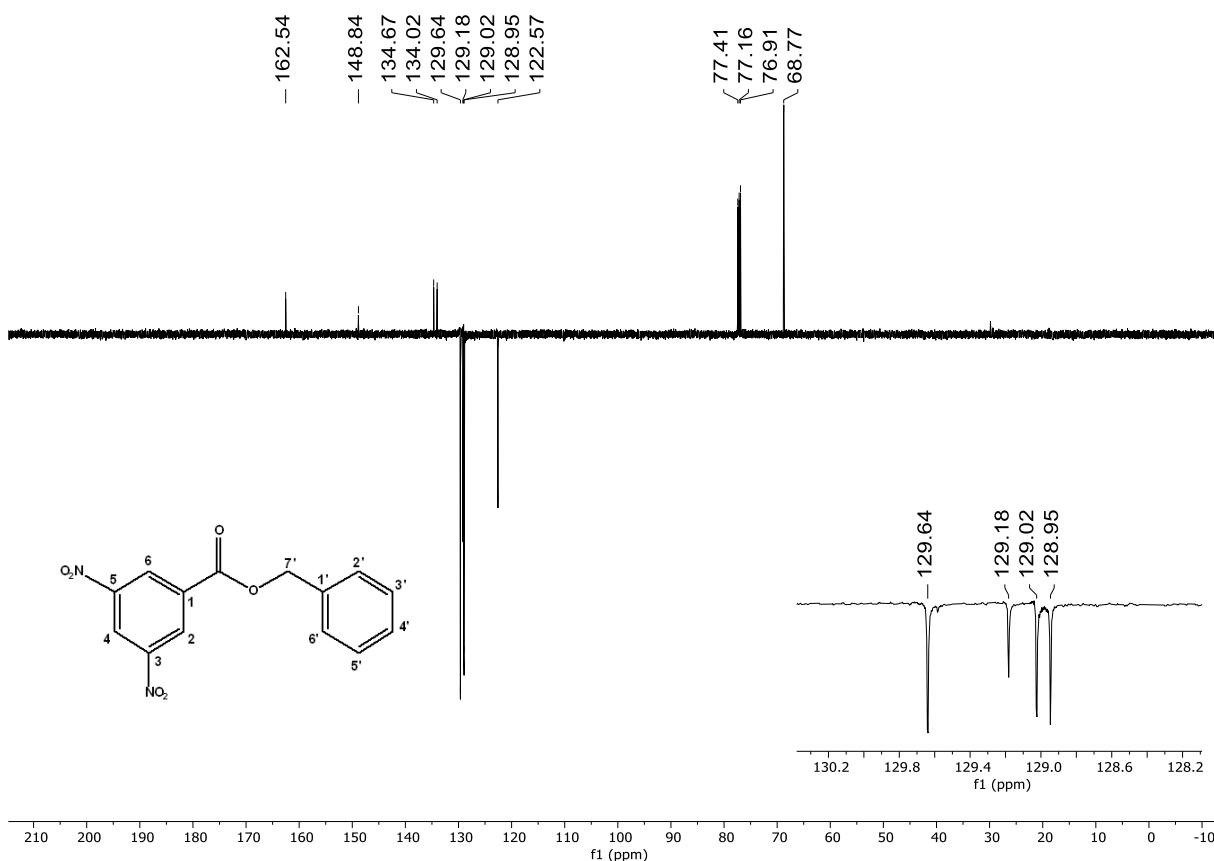
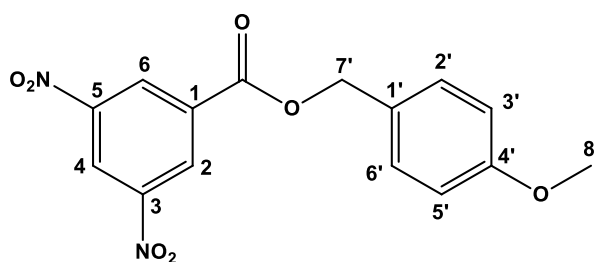


Figura 60: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de benzila (**10**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.6.2. 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (**11**)



Aspecto: Sólido amorfo amarelo

Rendimento: 18,67%

Ponto de Fusão: 89,2-89,6 °C (lit. 101-102°C, AMYES; RICHARD, 1990)

Fator de Retenção: 0,39 (9:1 Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3092 (C-H sp²); 2963 (C-H, sp³); 1719 (estiramento C=O); 1629 e 1461 (estiramento C=C aromático); 1543 e 1348 (estiramento NO₂); 1282 e 1163 (estiramento C-O)

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ H 9,20 (*t*, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-4); 9,15 (*d*, *J* = 2,1 Hz,

2H, H-2, H-6); 7,41 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 6,93 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 5,41 (*s*, 2H, H-7'); 3,82 (*s*, 3H, H-8')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δC 162,58 (C=O), 160,31 (C-4'); 148,73 (C-3, C-5); 134,11 (C-1); 130,92 (C-2, C-6); 129,62 (C-2', C-6'); 126,55 (C-1'); 122,25 (C-4); 114,32 (C-3', C-5'); 68,63 (C-7'); 55,46 (C-8') (AMYES; RICHARD, 1990).

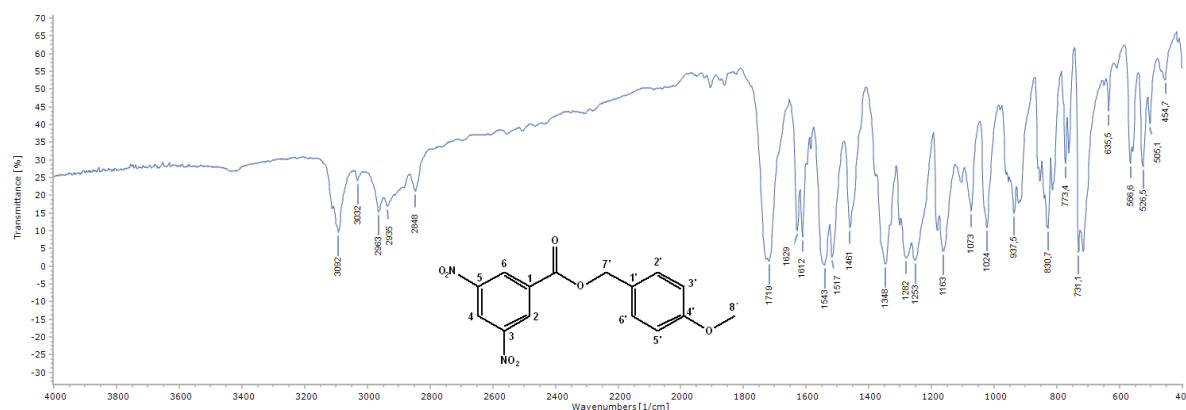


Figura 61: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (**11**).

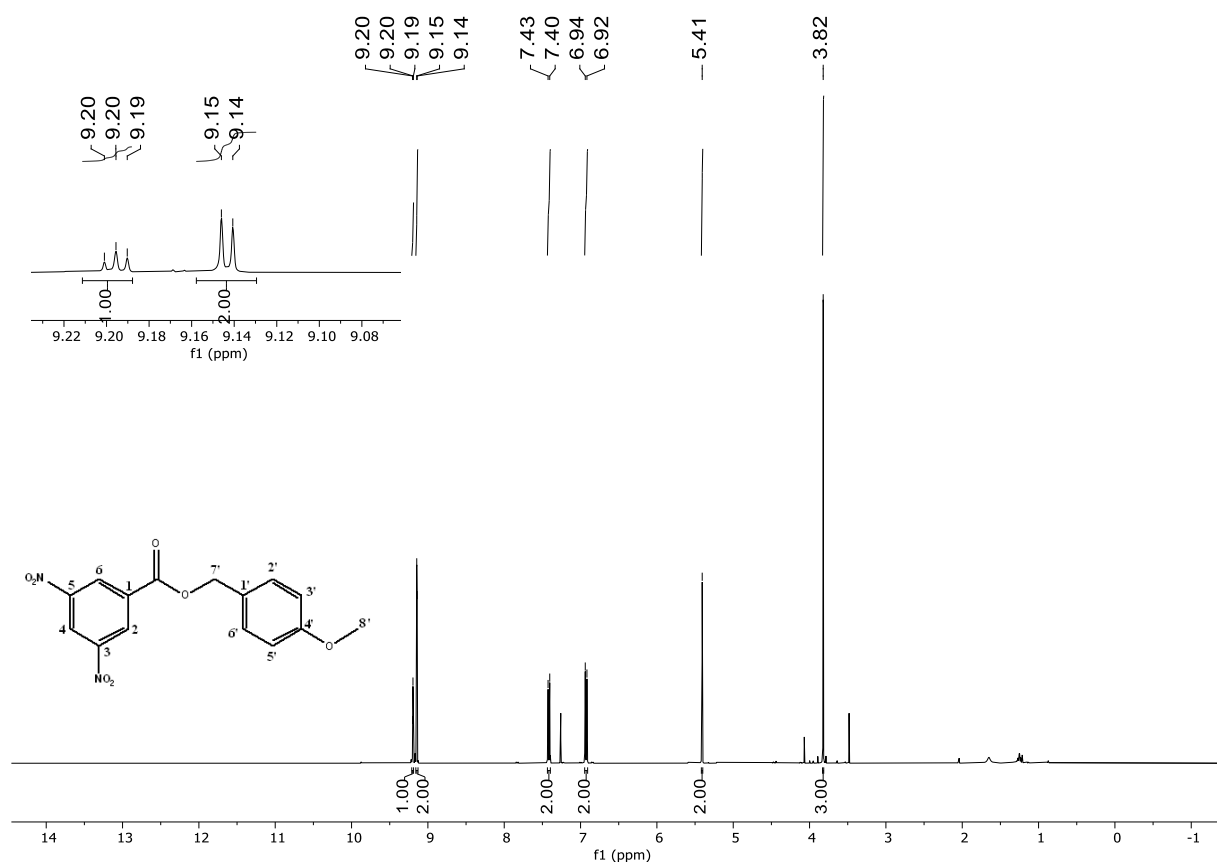


Figura 62: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (**11**), (CDCl_3 , 400 MHz).

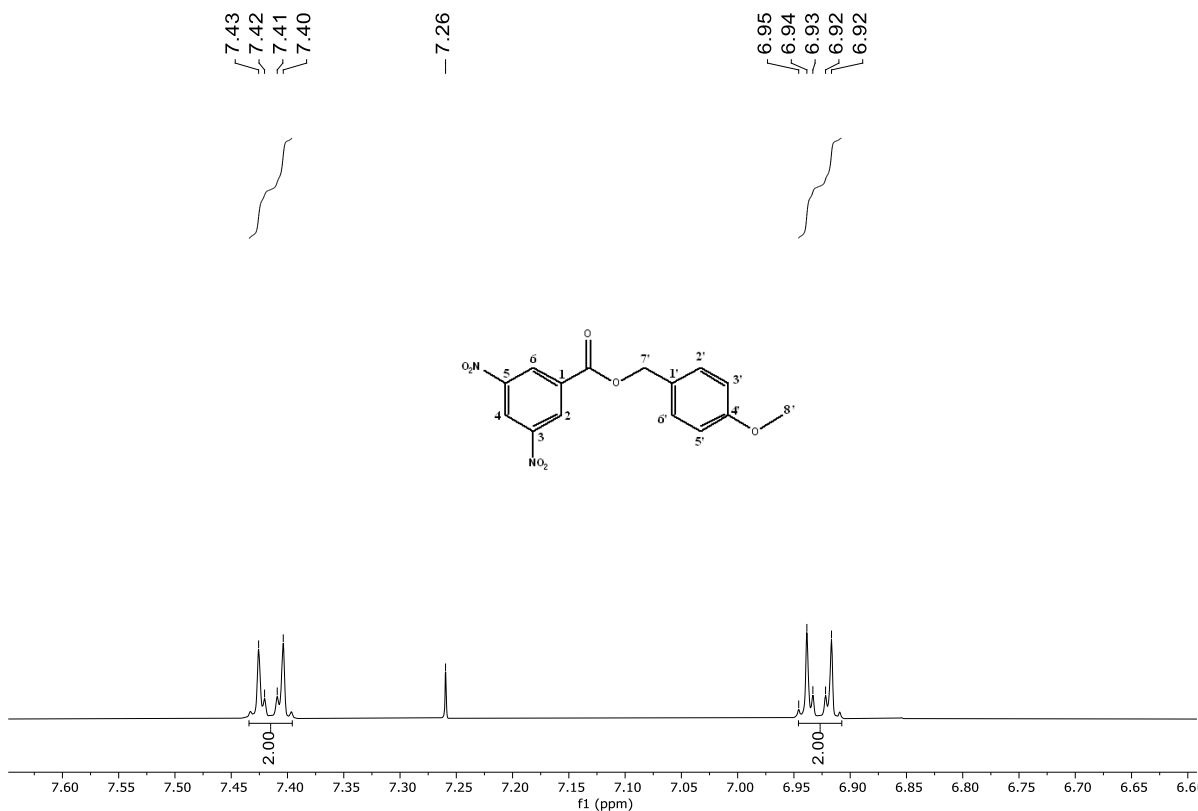


Figura 63: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (**11**), (CDCl_3 , 400 MHz).

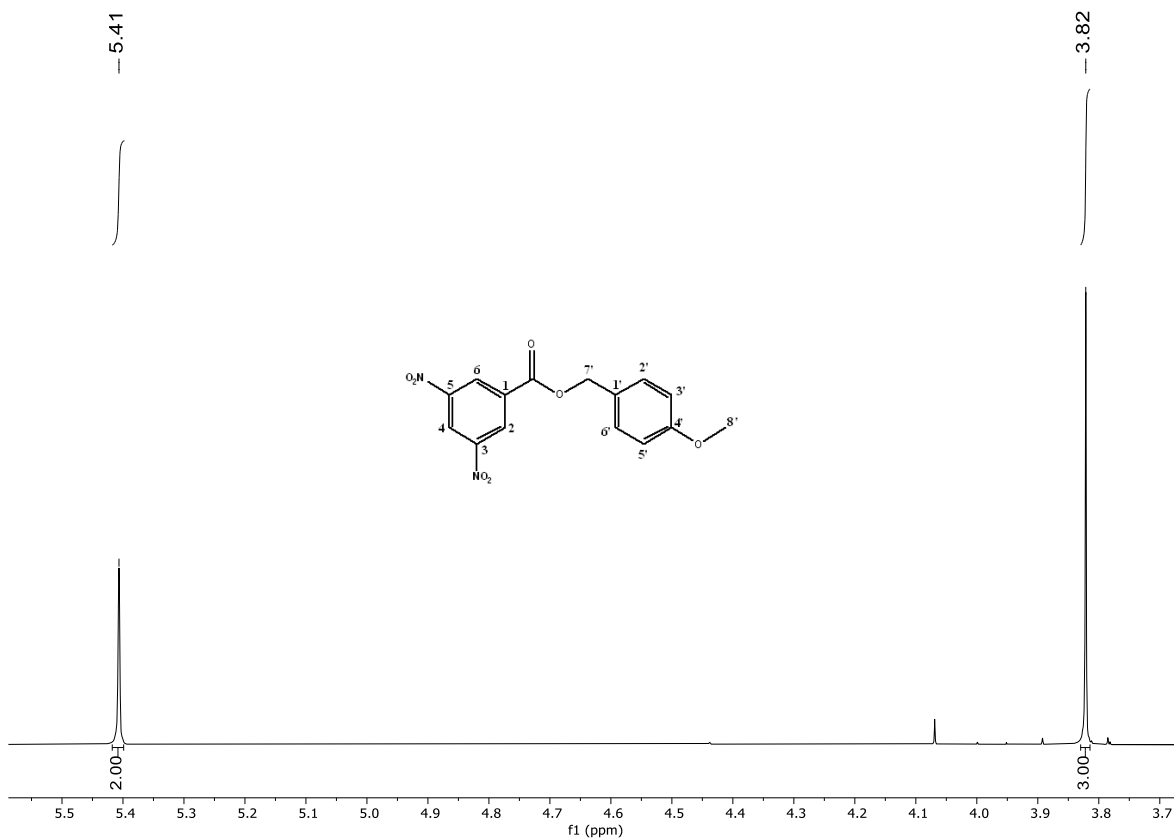


Figura 64: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (**11**), (CDCl_3 , 400 MHz).

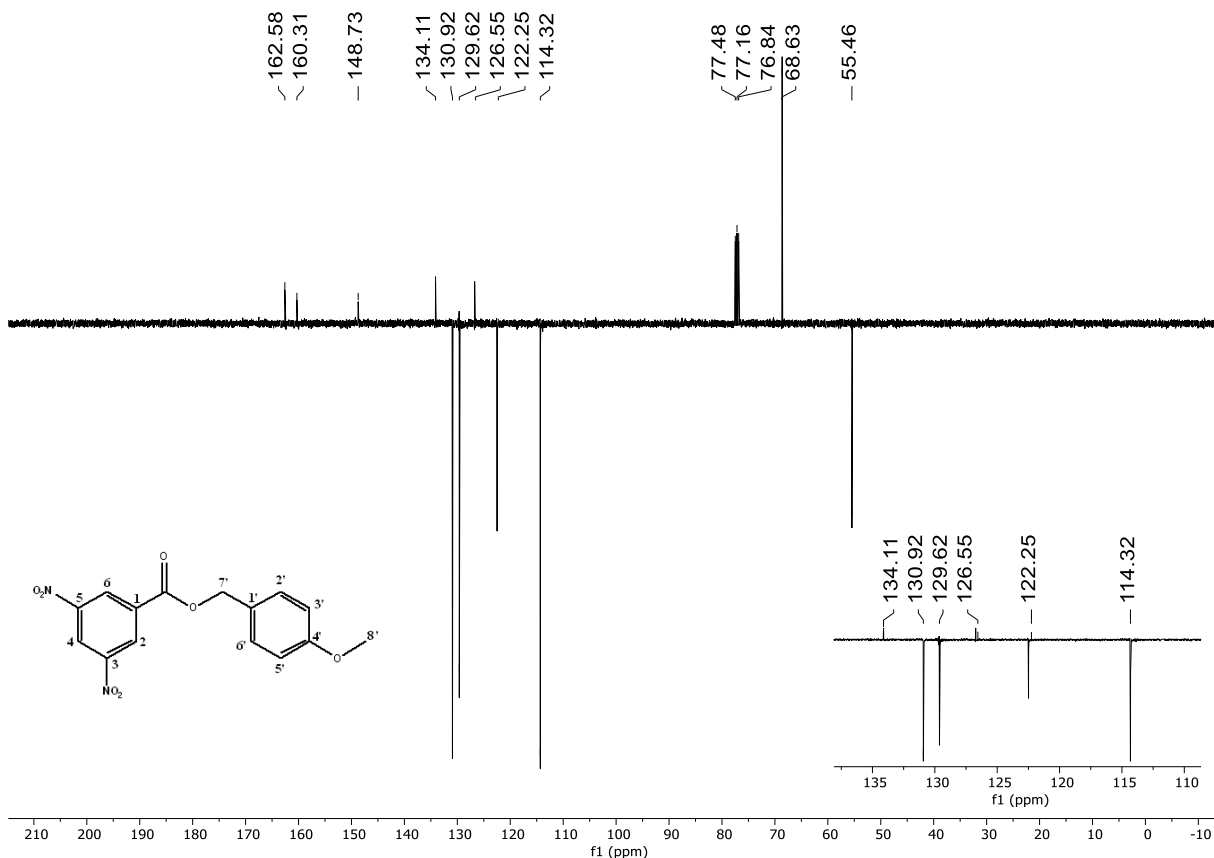
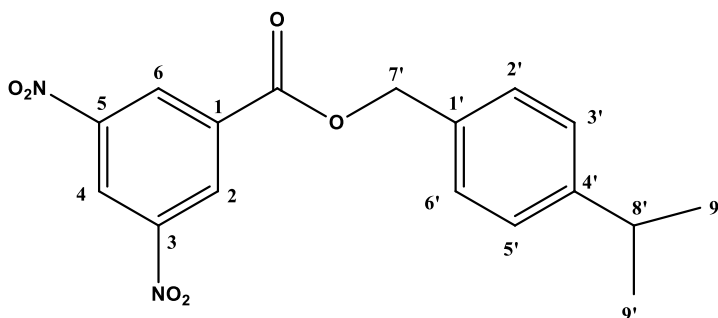


Figura 65: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-metoxi-benzila (**11**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.6.3. 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (**12**)



Aspecto: Sólido cristalino branco

Rendimento: 48,05%

Ponto de Fusão: 92.8-93.2°C

Fator de Retenção: 0,62 (9:1Hexano/AcOEt)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3076 (C-H sp²); 2962 (C-H, sp³); 1729 (estiramento C=O); 1627 e 1461 (estiramento C=C aromático); 1542 e 1349 (estiramento NO₂); 1275 e 1167 (estiramento C-O)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δH 9,22 (*t*, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4); 9,17 (*d*, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,41 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7,29 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 5,44 (*s*, 2H, H-7'); 2,94 (*sept*, $J = 6,81$ Hz, 1H, H-8'); 1,27 (*d*, $J = 6,9$ Hz, 6H, H-9')

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δC 162,59 (C=O); 150,16 (C-3, C-5); 148,78 (C-4'); 134,11 (C-1); 131,98 (C-1'); 129,68 (C-2, C-6); 129,23 (C-2', C-6'); 127,10 (C-3', C-5'); 122,55 (C-4); 68,76 (C-7'); 34,10 (C-8'); 24,06 (C-9') (MOZINGO; FOLKERS, 1948).

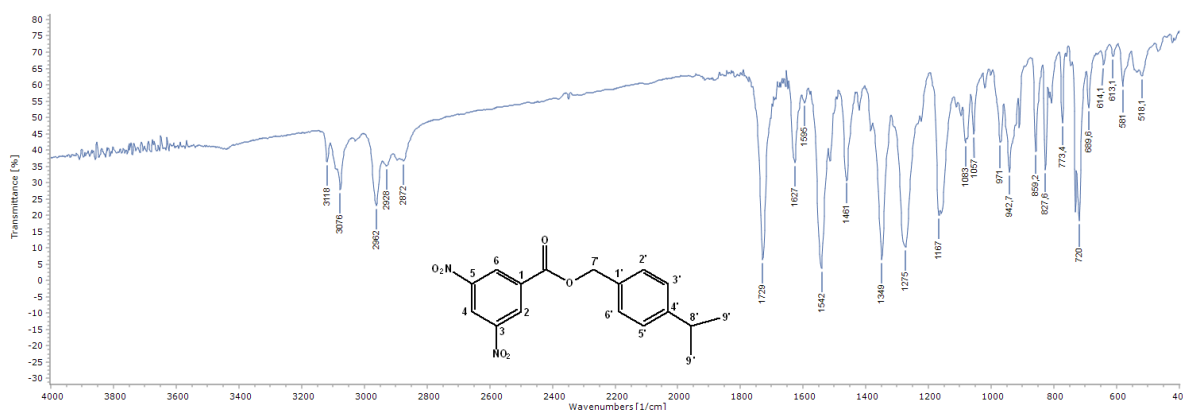


Figura 66: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (**12**).

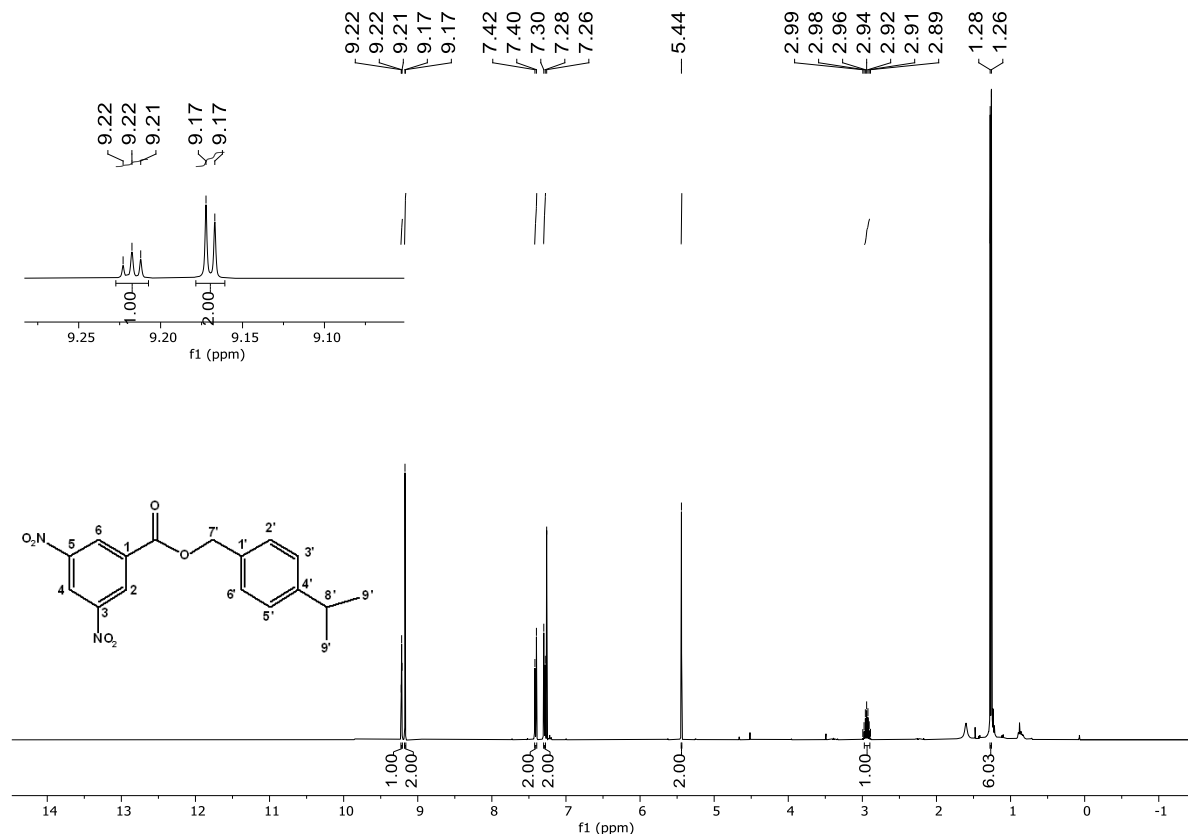


Figura 67: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (**12**), (CDCl_3 , 400 MHz).

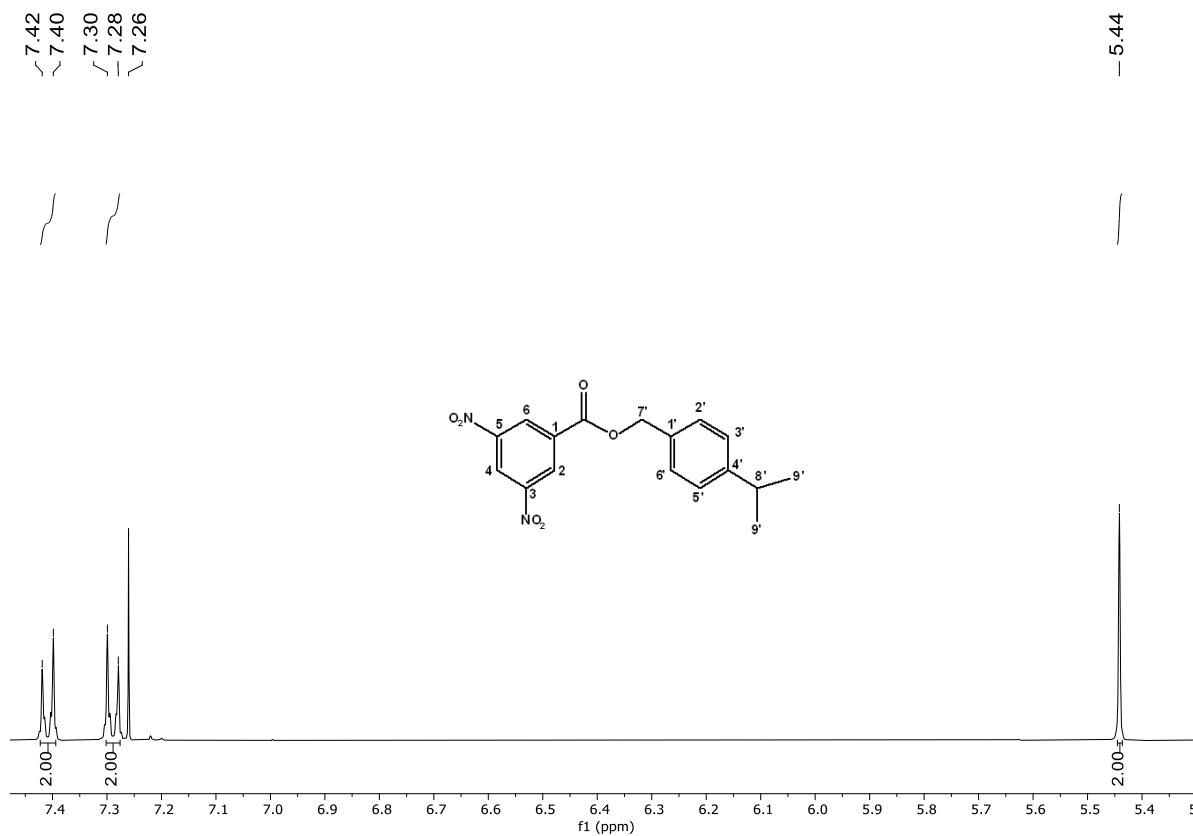


Figura 68: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (**12**), (CDCl₃, 400 MHz).

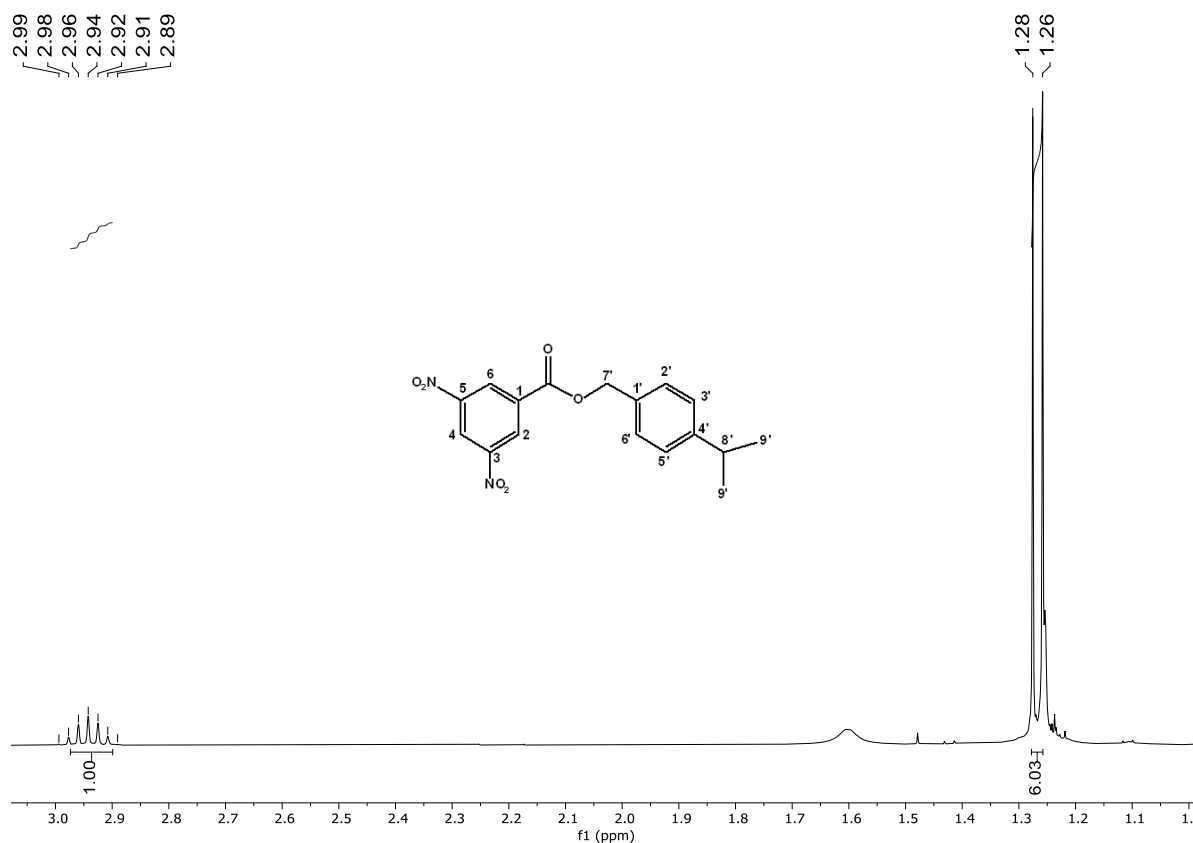


Figura 69: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (**12**), (CDCl₃, 400 MHz).

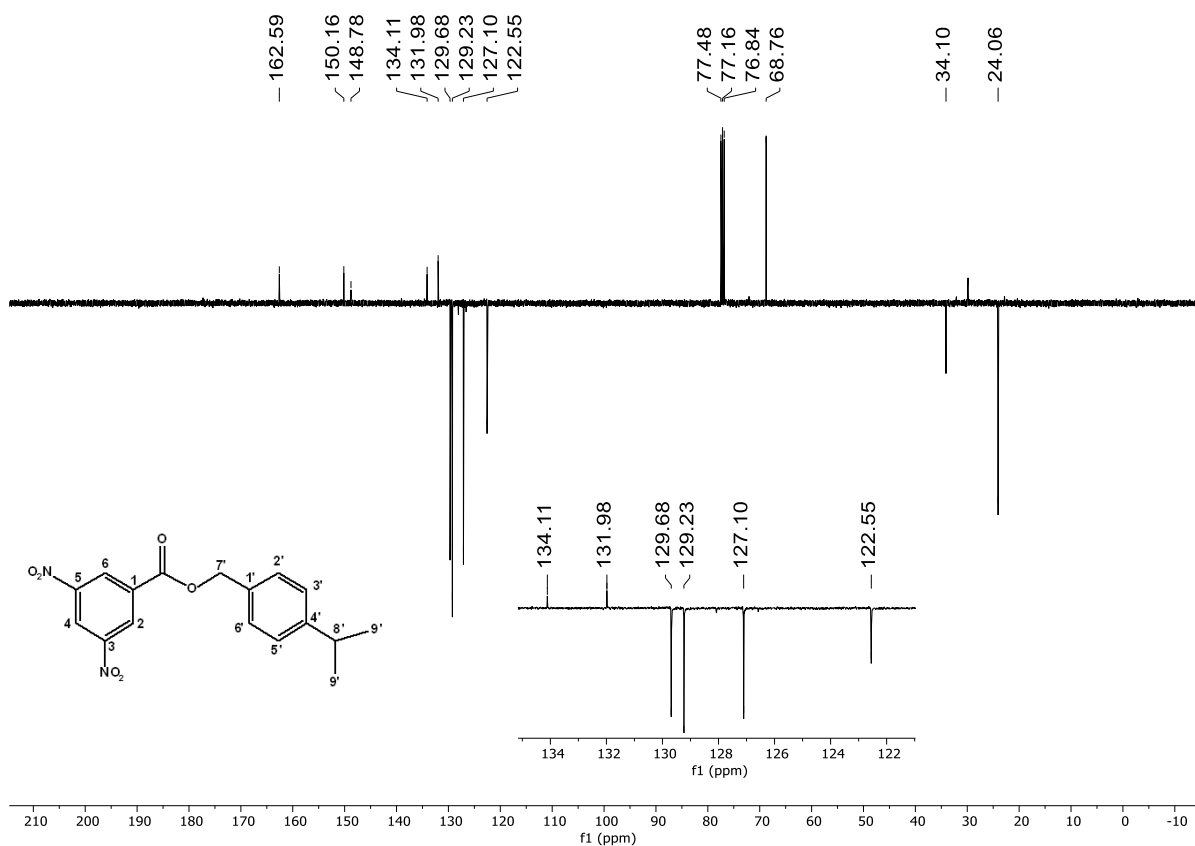
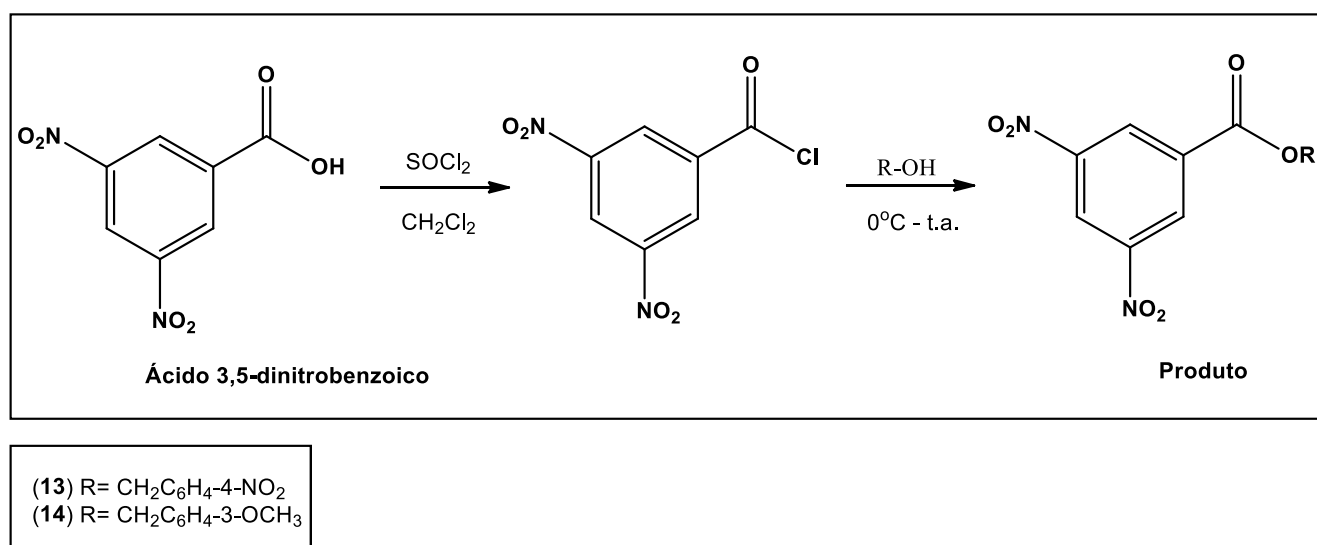


Figura 70: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-isopropil-benzila (**12**), (CDCl₃, 100 MHz).

11.7. Preparação dos derivados 13 e 14



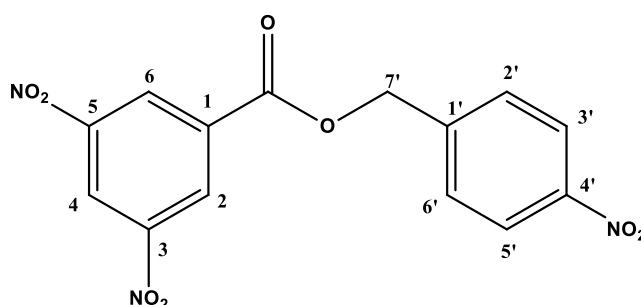
Esquema 13: Reação de esterificação com cloreto ácido e álcoois aromáticos

Fonte: Elaborado pelo autor

O ácido 3,5-dinitrobenzoico (0,1 g; 0,47 mmol) foi colocado sob refluxo por 3 horas na presença de 3,17 mL de SOCl_2 (43,51 mmol). O excesso de SOCl_2 foi removido sob pressão reduzida. O cloreto ácido formado foi dissolvido em CH_2Cl_2 (1 mL) e utilizado sem purificação adicional. Em outro balão, foram adicionados 0,08 g (0,57 mmol) do álcool dissolvido em 4 mL de CH_2Cl_2 . Posteriormente, a solução de cloreto ácido (1 mL) foi adicionada gota a gota à solução à 0 °C. A mistura resultante foi mantida a temperatura ambiente e agitação por 1 hora. A reação foi monitorada por CCDA. Os produtos foram purificados por meio de cromatografia em coluna de sílica gel 60 utilizando como eluentes hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (JI et al., 2013).

11.8. Dados espectroscópicos dos ésteres 13 e 14

11.8.1. 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (**13**)



Aspecto: Sólido cristalino amarelo

Rendimento: 12,46%

Ponto de Fusão: 151,8-152,4 °C

Fator de Retenção: 0,30 (9:1Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3097 (C-H sp^2); 2921 (C-H, sp^3); 1722 (estiramento C=O); 1627 e 1452 (estiramento C=C aromático); 1543 e 1349 (estiramento NO_2); 1275 e 1160 (estiramento C-O);

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 9,06 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4); 8,96 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 8,28 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7,81 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 5,61 (s, 2H, H-7')

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 162,45 (C=O); 148,45 (C-3, C-5); 147,43 (C-4'), 142,96 (C-1'); 132,30 (C-1); 129,09 (C-2, C-6), 129,05 (C-2', C-6'); 123,72 (C-3', C-5'); 122,79 (C-4); 66,51 (C-7') (BUT; LU; TOY, 2010).

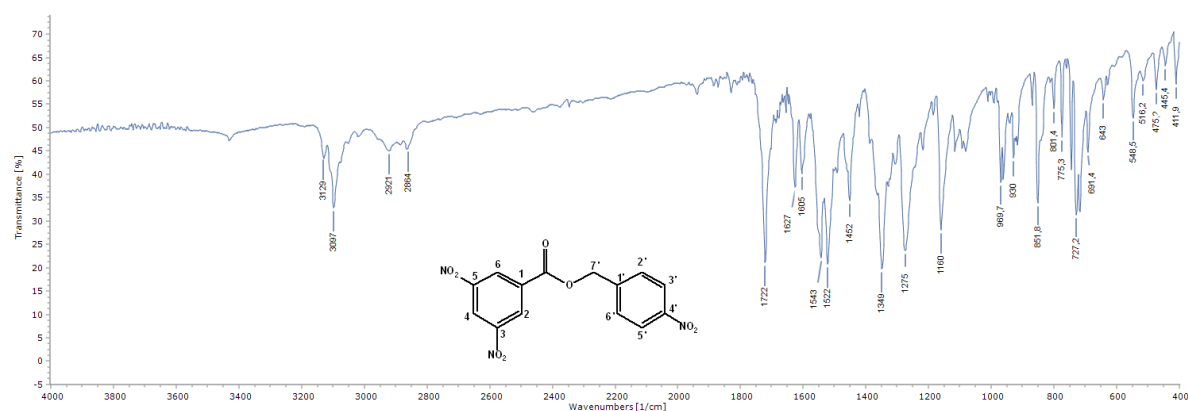


Figura 71: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (**13**).

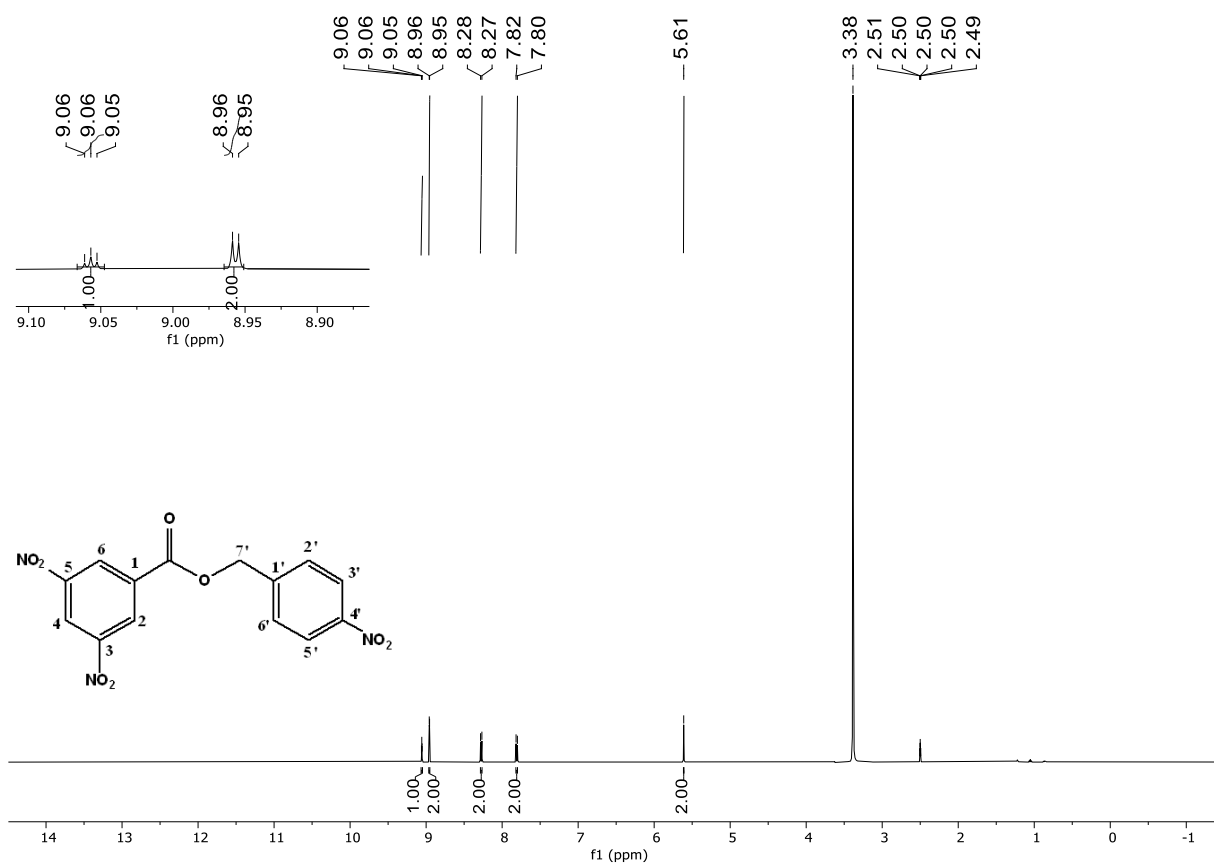


Figura 72: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (**13**), (DMSO-d_6 , 500 MHz).

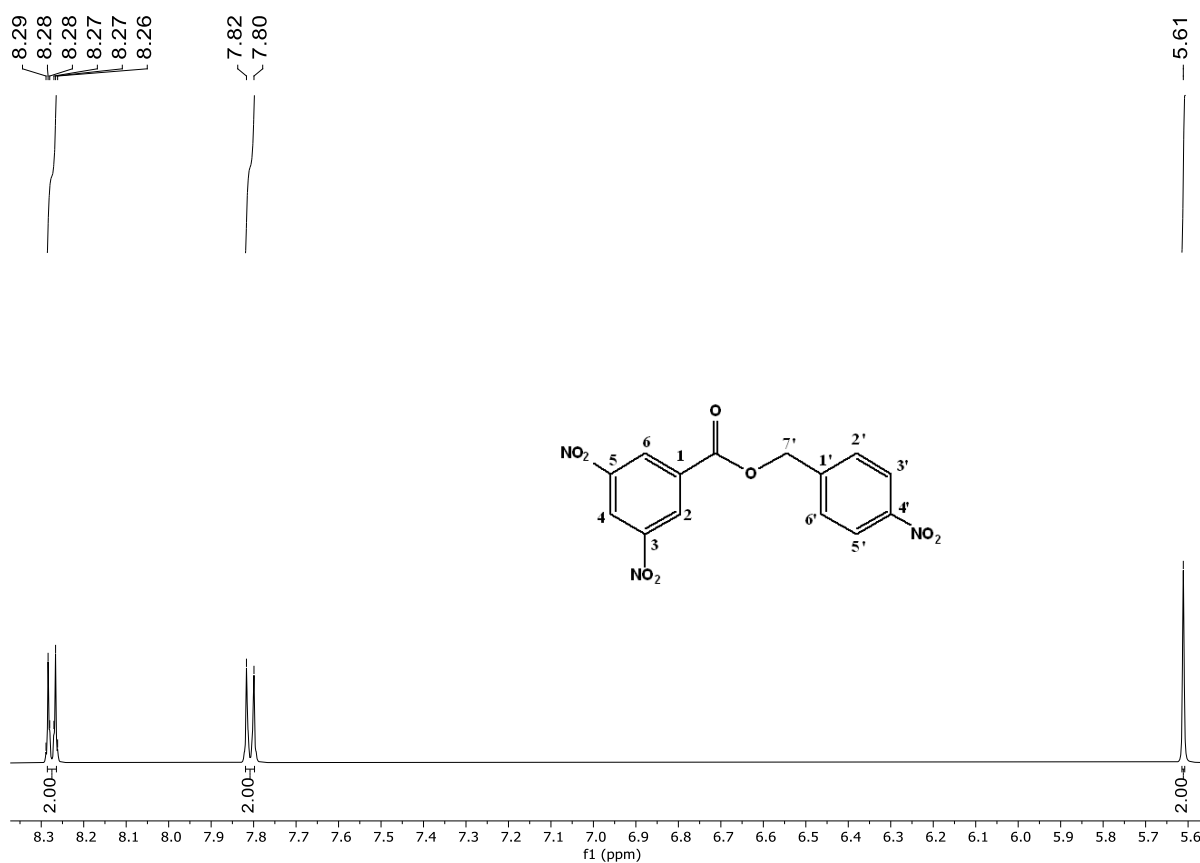


Figura 73: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (**13**), (DMSO-d₆, 500 MHz).

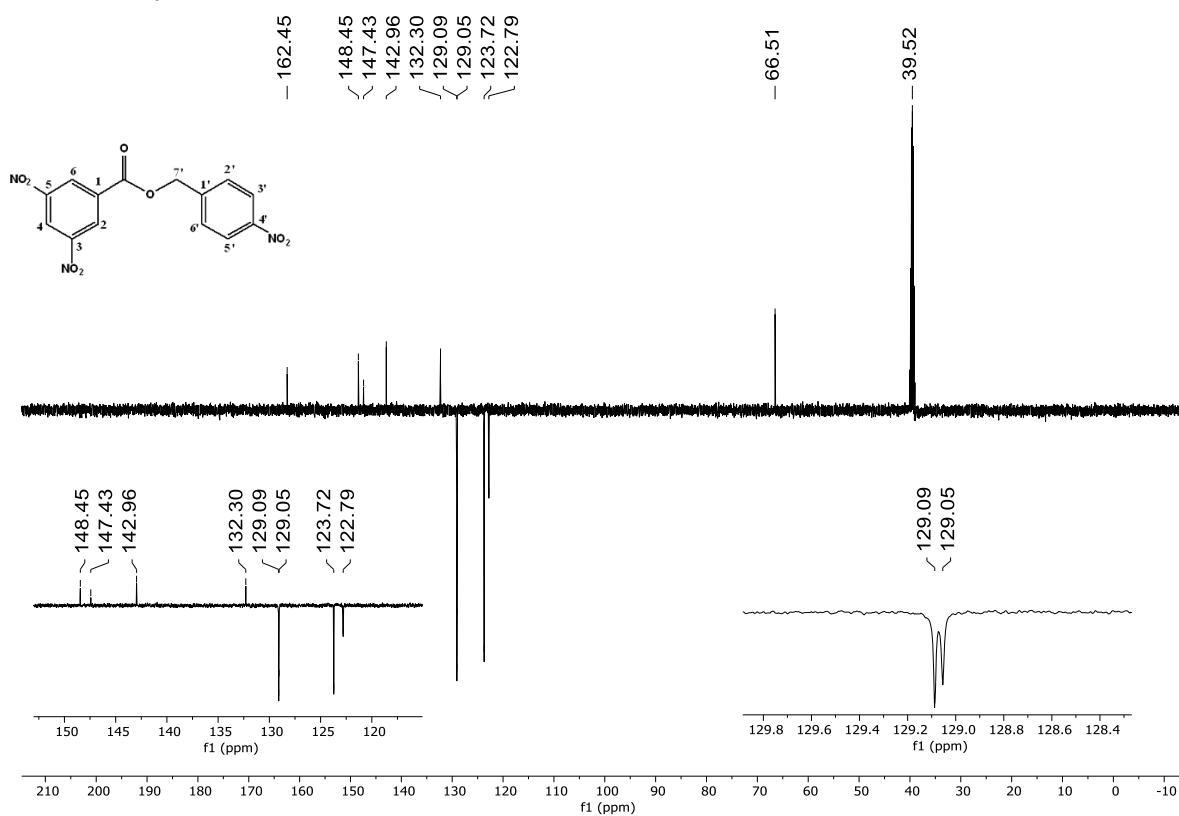
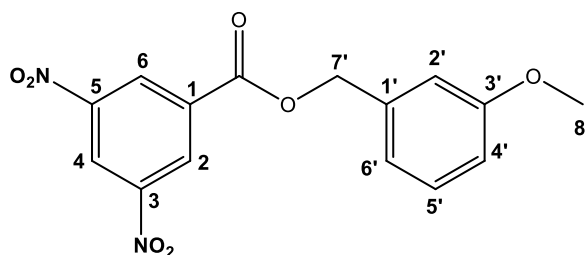


Figura 74: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de 4-nitro-benzila (**13**), (DMSO-d₆, 125 MHz).

11.8.2. 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (**14**)

Aspecto: Sólido cristalino amarelo

Rendimento: 25,60%

Ponto de Fusão: 123,1-123,3 °C (lit. 124 °C NORMAN;WILSON;READ, 1935)

Fator de Retenção: 0,39 (9:1Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3090 (C-H sp^2); 2963 (C-H, sp^3); 1728 (estiramento C=O); 1631 e 1457 (estiramento C=C aromático); 1545 e 1349 (estiramento NO_2); 1282 e 1159 (estiramento C-O)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 9,22 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4); 9,17 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7,34 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-5'); 7,04 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-6'); 7,00 – 6,99 (m, 1H, H-2'); 6,93 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4'); 5,44 (s, 2H, H-7'); 3,84 (s, 3H, H-8')

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ_{C} 162,52 (C=O); 160,04 (C-3'); 148,81 (C-3,C-5); 136,10 (C-1'); 133,97 (C-1); 130,12 (C-5'); 129,66 (C-2, C-6); 122,59 (C-4); 121,06 (C-6'); 114,56 (C-2'); 114,46 (C-4'); 68,60 (C-7'); 55,46 (C-8') (BUT; LU; TOY, 2010).

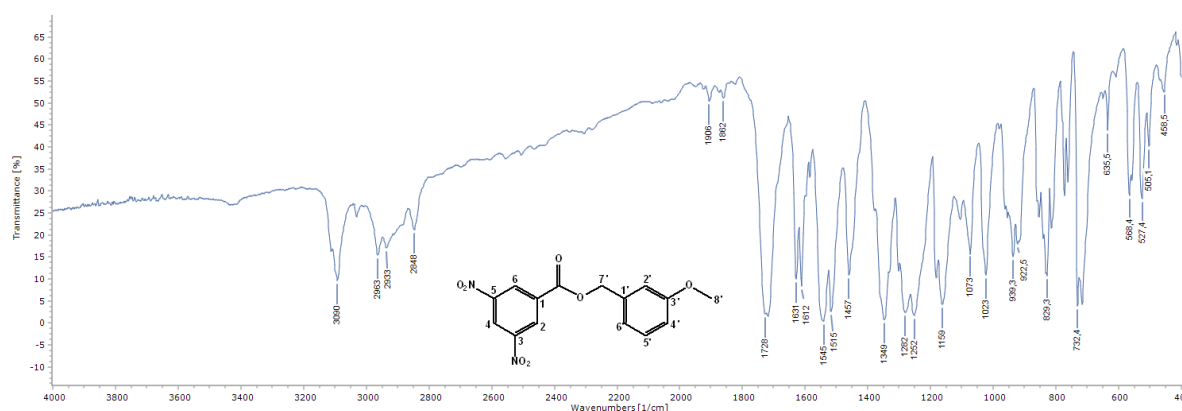


Figura 75: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (**14**).

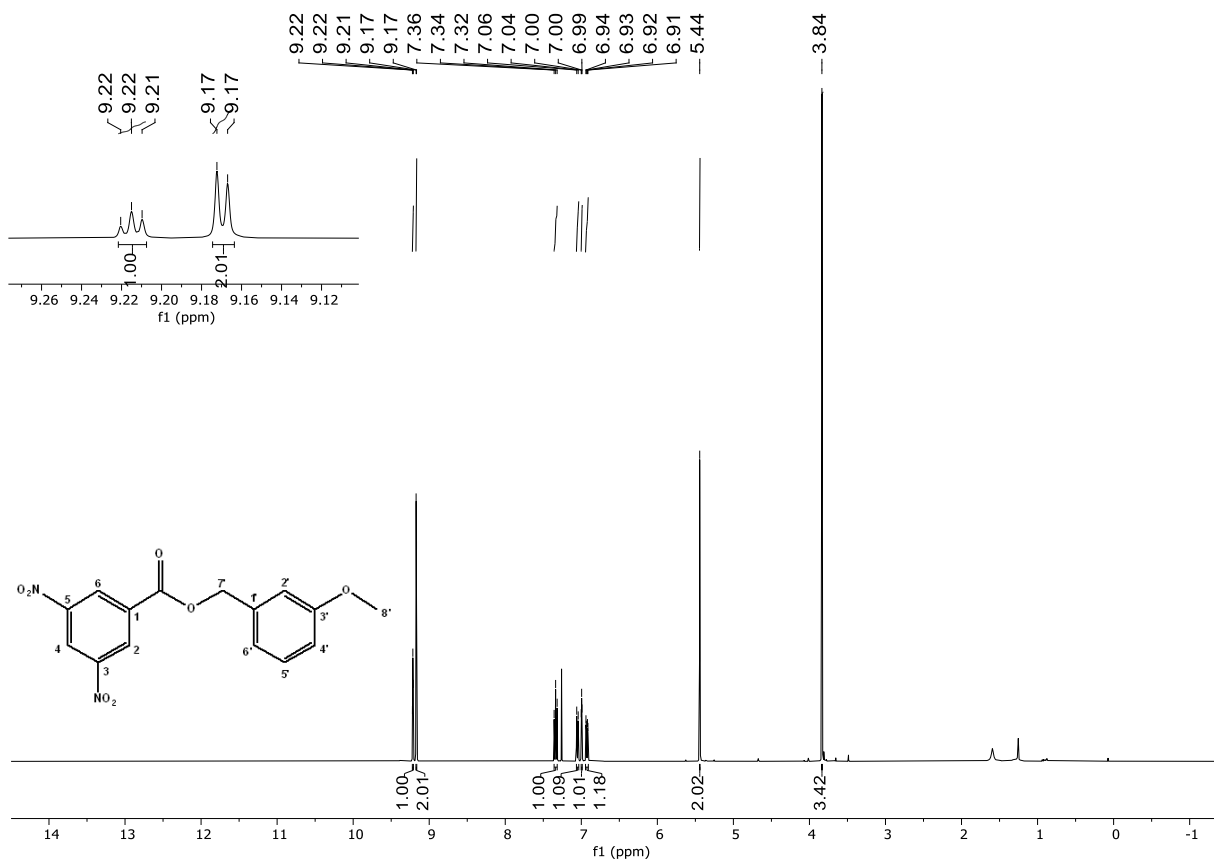


Figura 76: Espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (**14**), (CDCl₃, 400 MHz).

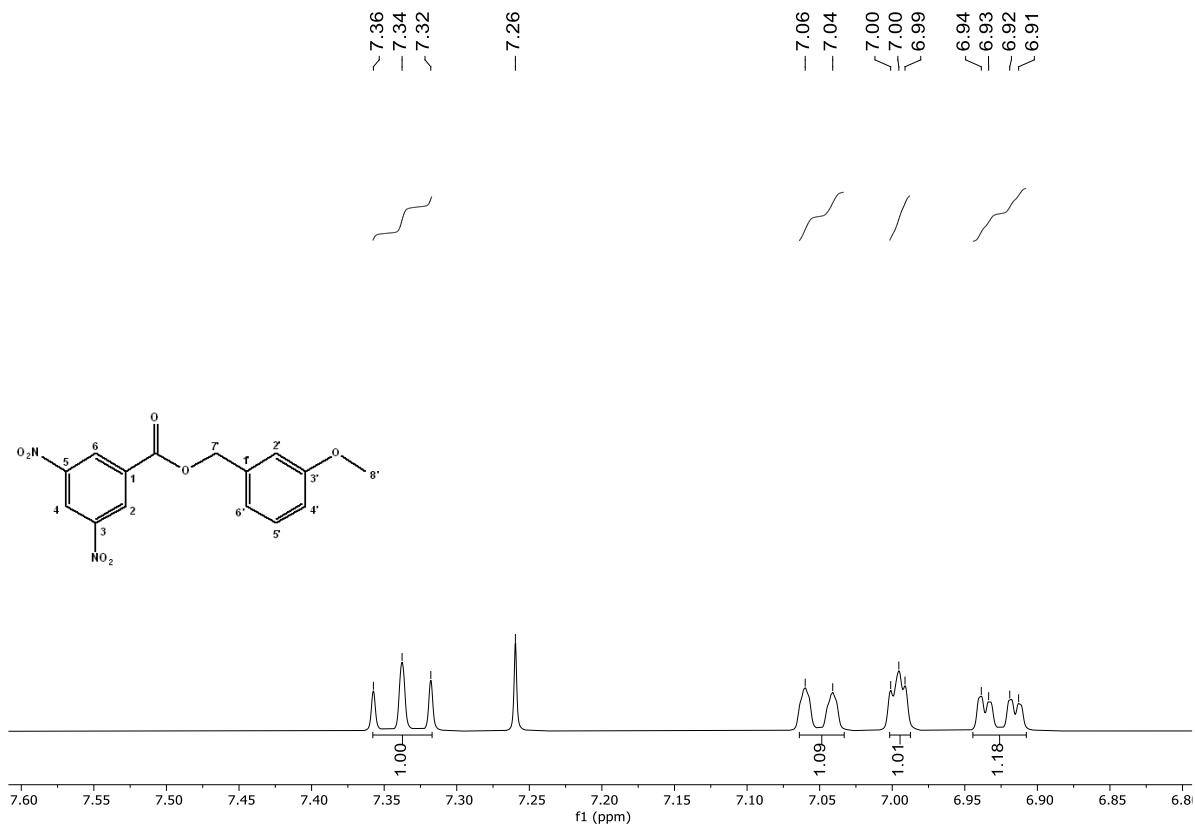


Figura 77: Expansão do espectro de RMN ¹H de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (**14**), (CDCl₃, 400 MHz).

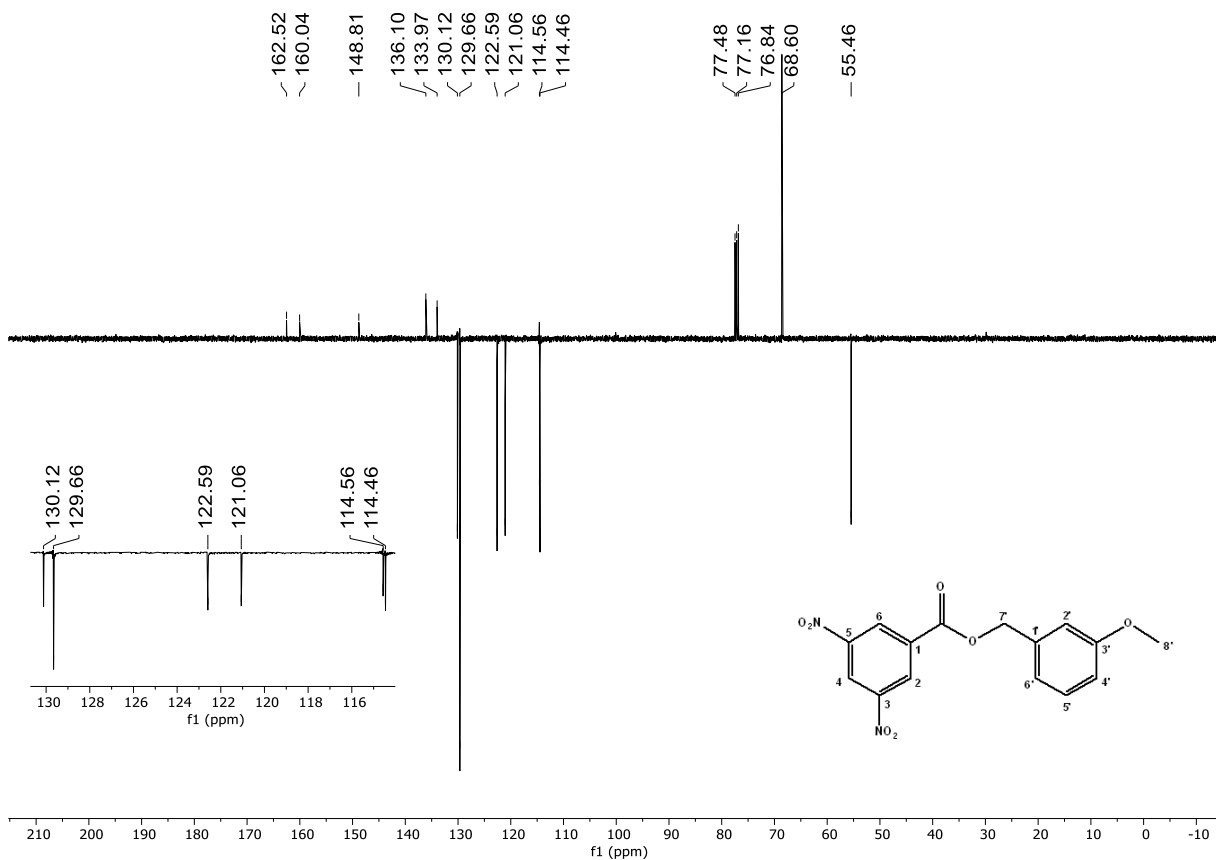
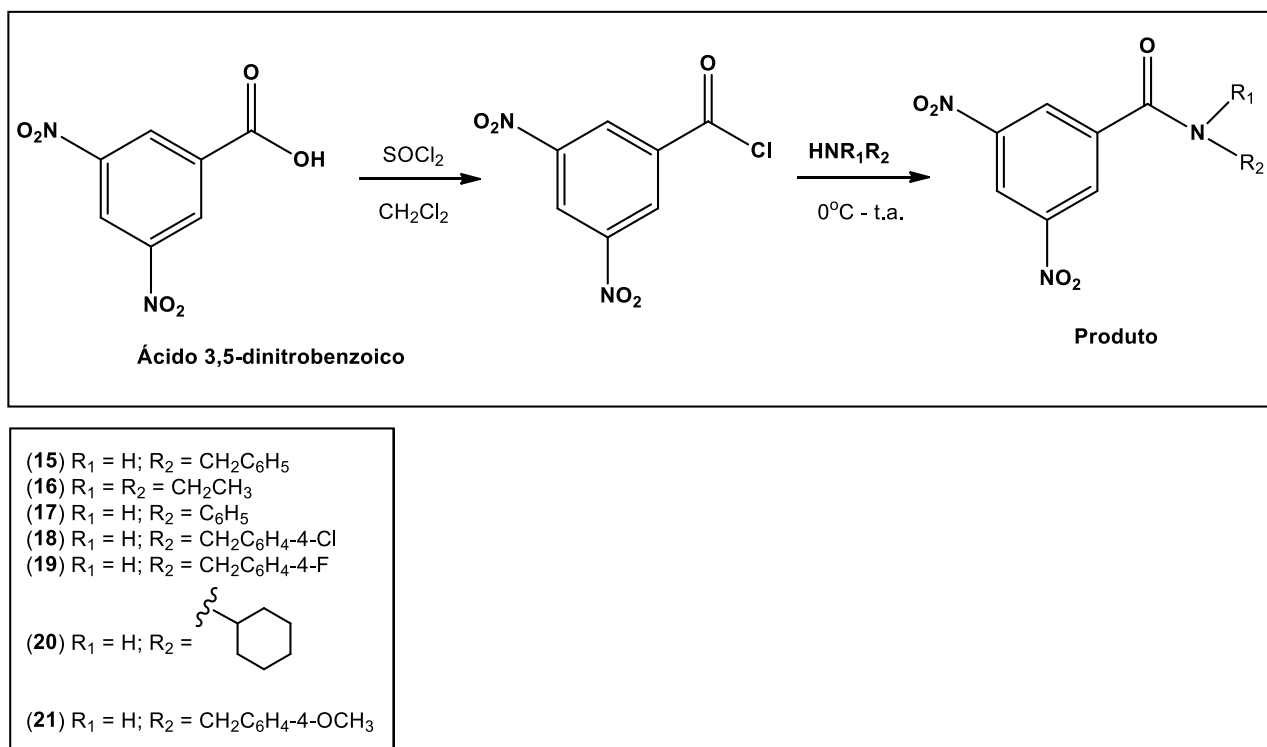


Figura 78: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitrobenzoato de 3-metoxi-benzila (**14**), (CDCl_3 , 100 MHz).

11.9. Preparação dos derivados 15-21



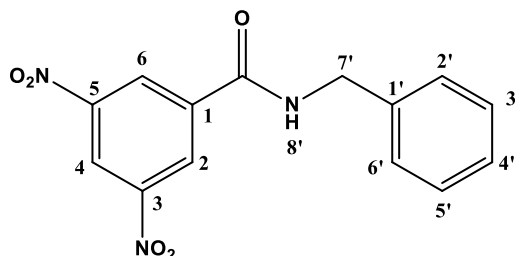
Esquema 14: Reação de amidação com cloreto ácido e aminas.

Fonte: Elaborado pelo autor

O ácido 3,5-dinitrobenzoico (0,1 g; 0,47 mmol) foi adicionado em um balão de 50 mL com 3,17 mL de SOCl_2 (43,51 mmol), sob refluxo por 3 horas. O excesso de SOCl_2 foi removido com o auxílio de um rotaevaporador. O cloreto ácido formado foi dissolvido em diclorometano (1 mL) e adicionado gota a gota à uma solução da amina (0,57 mmol, 1,2 eq) em CH_2Cl_2 (4 mL) e Et_3N (0,07 g, 0,70 mmol) à 0°C . A mistura resultante foi mantida a temperatura ambiente e agitação magnética por 1 hora e monitorada por TLC. Os produtos foram purificados em coluna cromatográfica de sílica gel 60 utilizando como eluentes hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (JI et al., 2013).

11.10. Dados Espectroscópicos das amidas 15-21

11.10.1. *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida (**15**)



Aspecto: Sólido cristalino âmbar

Rendimento: 47,17%

Ponto de Fusão: 198,8-199,1 °C, (lit. 202-203, AHMADI; MORADI; SADEGHZADEH, 2018)

Fator de Retenção: 0,57 (7:3 Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3316 (estiramento N-H); 3093 (C-H, sp^2); 2931 (C-H, sp^3); 1639 (estiramento C=O); 1543 e 1343 (estiramento NO_2)

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ H 9,76 (*t*, $J = 5,7$ Hz, 1H, N-H); 9,11 (*d*, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 8,96 (*t*, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4); 7,36 – 7,33 (*m*, 5H), 4,56 (*d*, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-7')

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ C 162,19 (C=O); 148,27 (C-3, C-5); 138,75 (C-1'); 136,80 (C-1); 128,45 (C-2, C-6); 127,65 (C-2', C-6'), 127,58 (C-3', C-5'); 127,12 (C-4'); 120,96 (C-4); 43,21 (C-7') (AHMADI; MORADI; SADEGHZADEH, 2018).

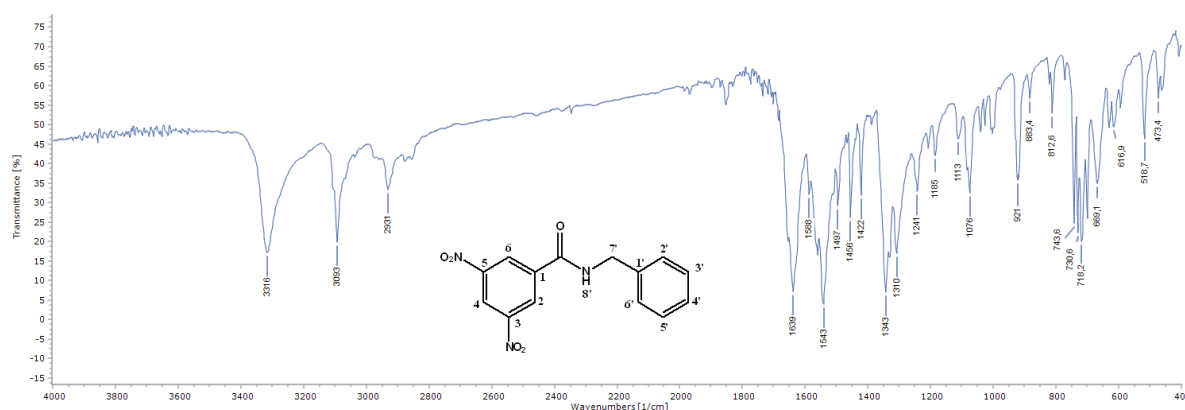


Figura 79: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida (**15**).

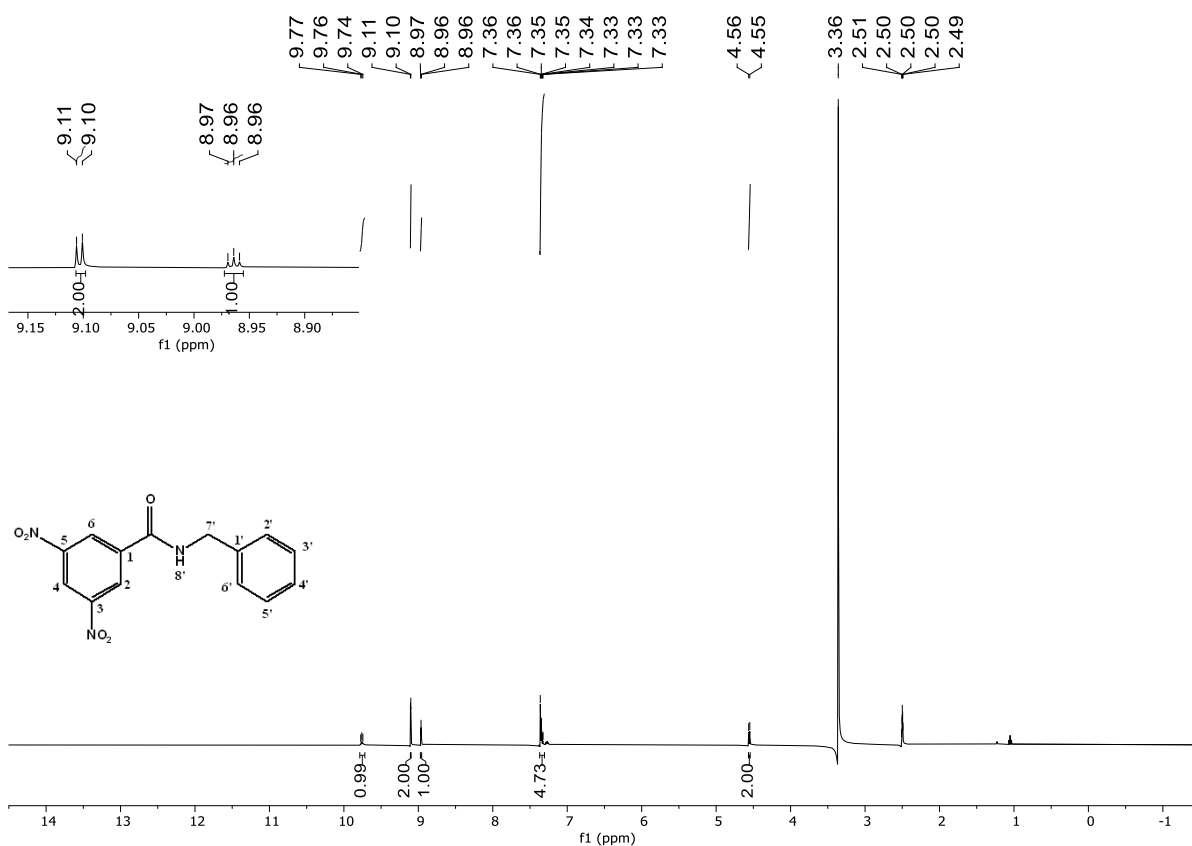


Figura 80: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitrobenzoato de *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida (**15**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

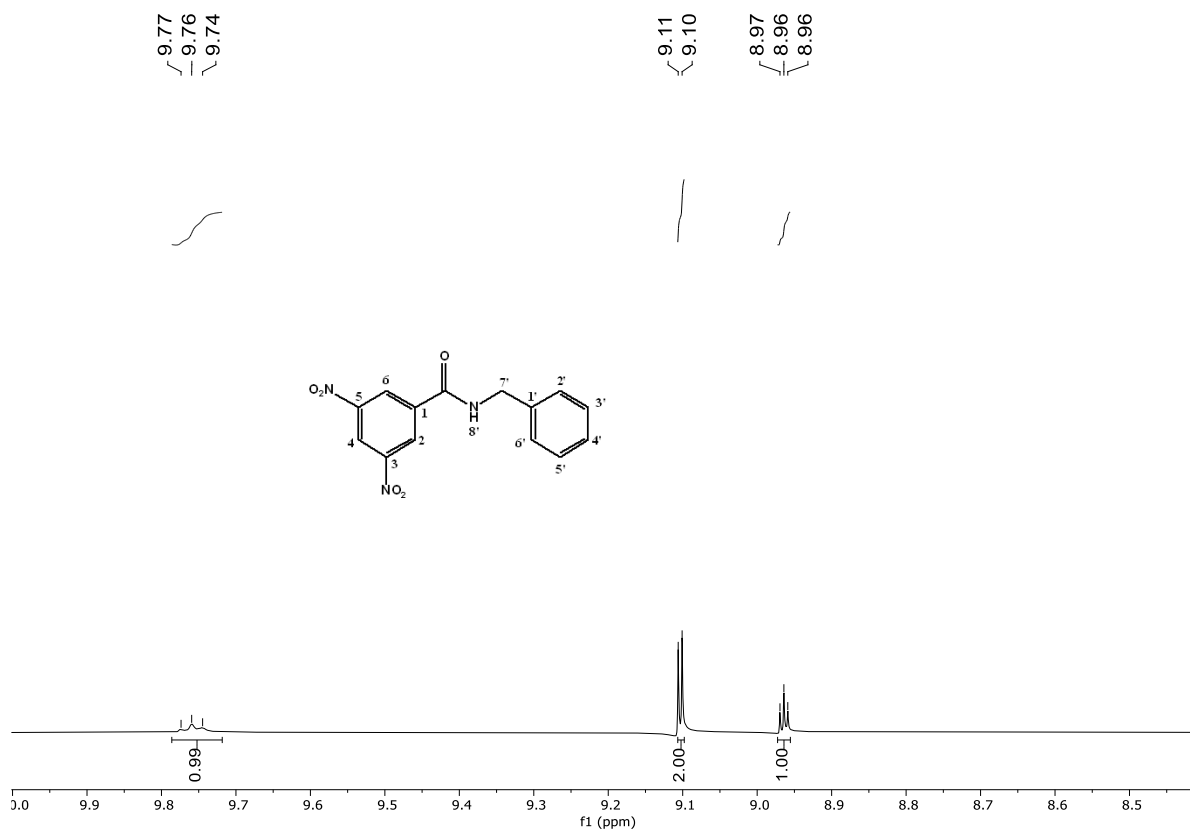


Figura 81: Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida (**15**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

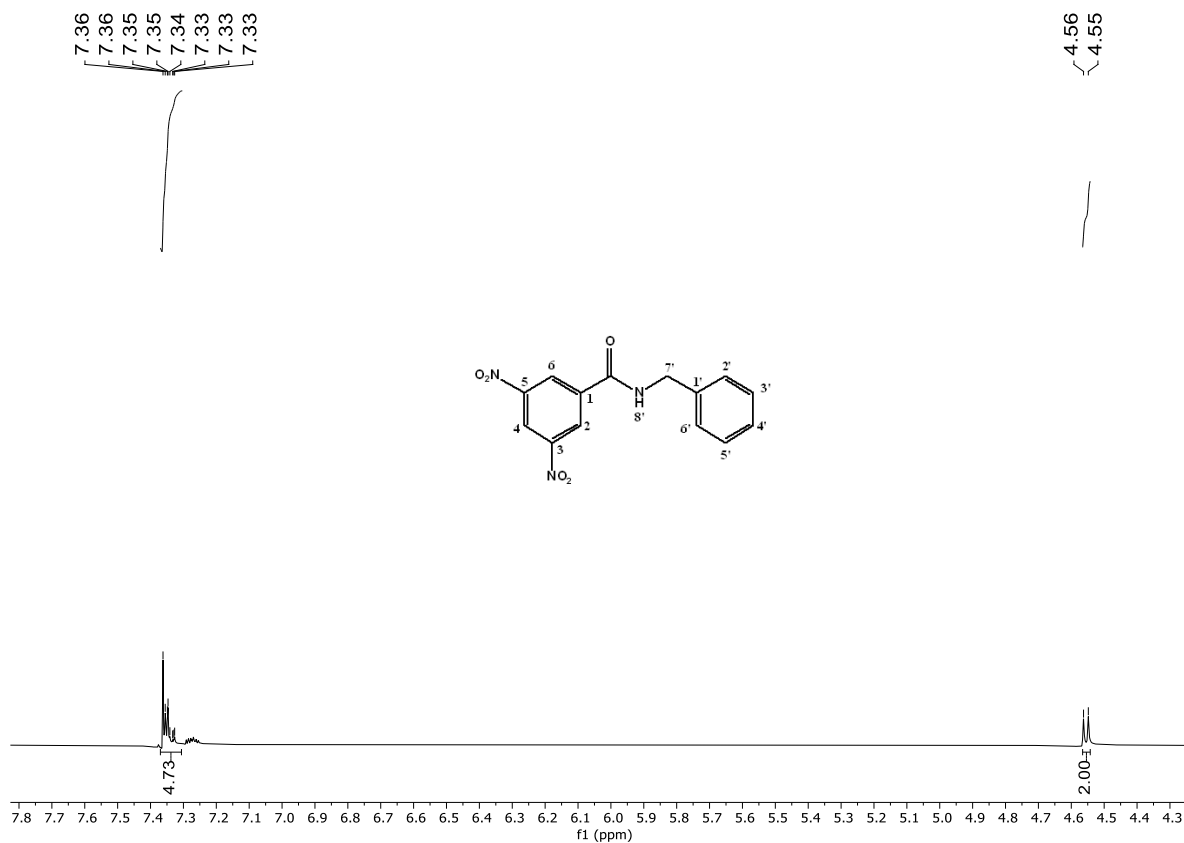


Figura 82: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida (15), (DMSO-d₆, 400 MHz).

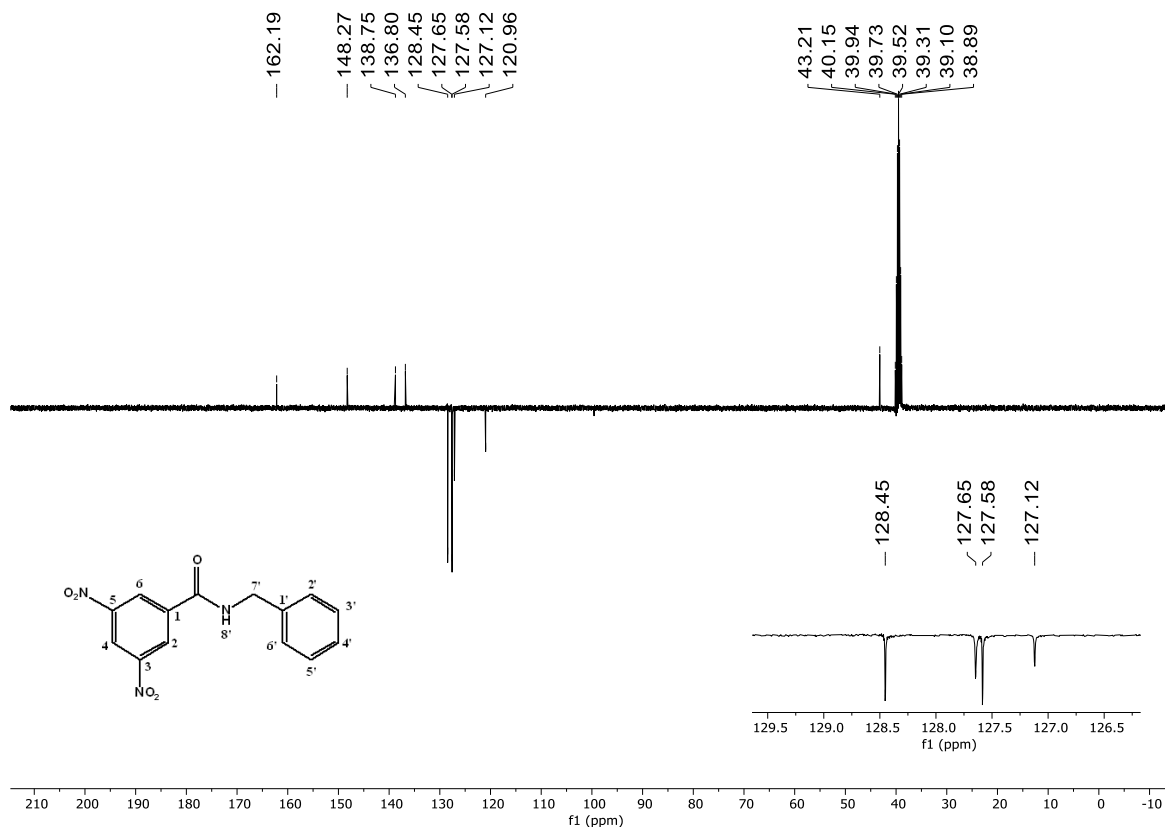
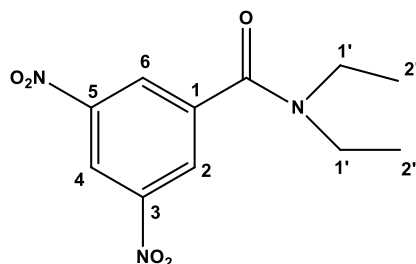


Figura 83: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de *N*-benzil-3,5-dinitrobenzamida (15), (DMSO-d₆, 100 MHz).

11.10.2. *N,N*-dietil-3,5-dinitrobenzamida (**16**)



Aspecto: Sólido cristalino âmbar

Rendimento: 62,07%

Ponto de Fusão: 88,6-88,8°C (lit. 89-90 °C, MOHAMMADPOOR; MEMARIAN; BAHRAMI, 2004)

Fator de Retenção: 0,42 (7:3 Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3089 (C-H, sp^2); 2970 (C-H, sp^3); 1641 (estiramento C=O); 1592 (estiramento C=C aromático); 1546 e 1343 (estiramento NO_2)

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 9,05 (s, 1H, H-4); 8,56 (s, 2H, H-2, H-6); 3,59 (s, 2H, H-1'); 3,27 (s, 2H, H-1'); 1,29 (s, 3H, H-2') 1,20 (s, 3H, H-2')

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} 166,26 (C=O); 148,63 (C-3, C-5); 140,51 (C-1); 126,96 (C-2, C-6); 119,37 (C-4); 43,79 (C-1'); 40,22 (C-1'); 14,38 (C-2'); 12,88 (C-2') (PHAKHODEE et al., 2016).

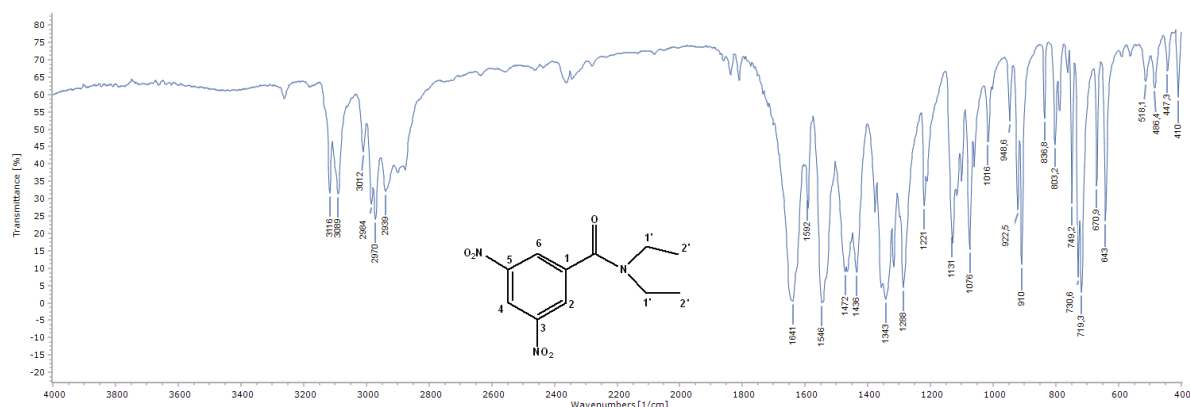


Figura 84: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N,N*-dietil-3,5-dinitrobenzamida (**16**).

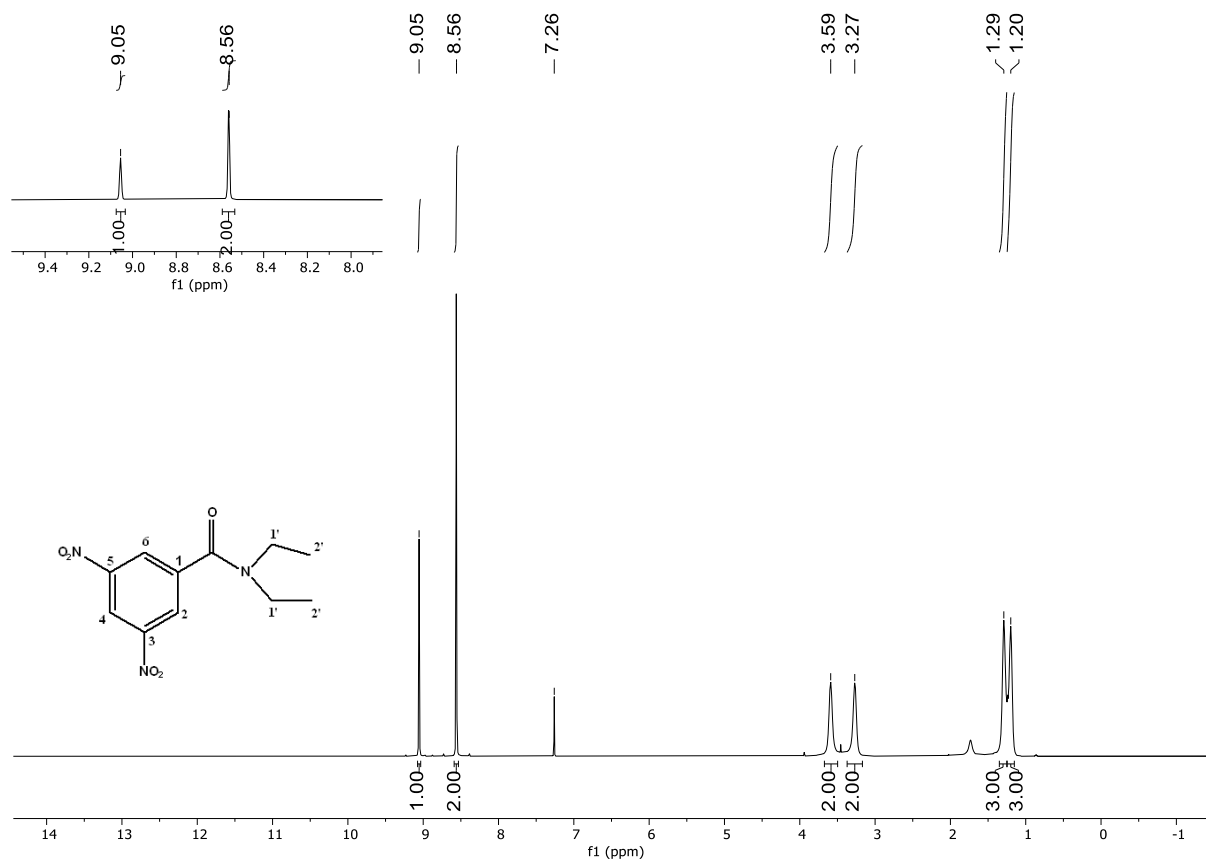


Figura 85: Espectro de RMN ^1H de *N,N*-dietil-3,5-dinitrobenzamida (**16**), (CDCl_3 , 500 MHz).

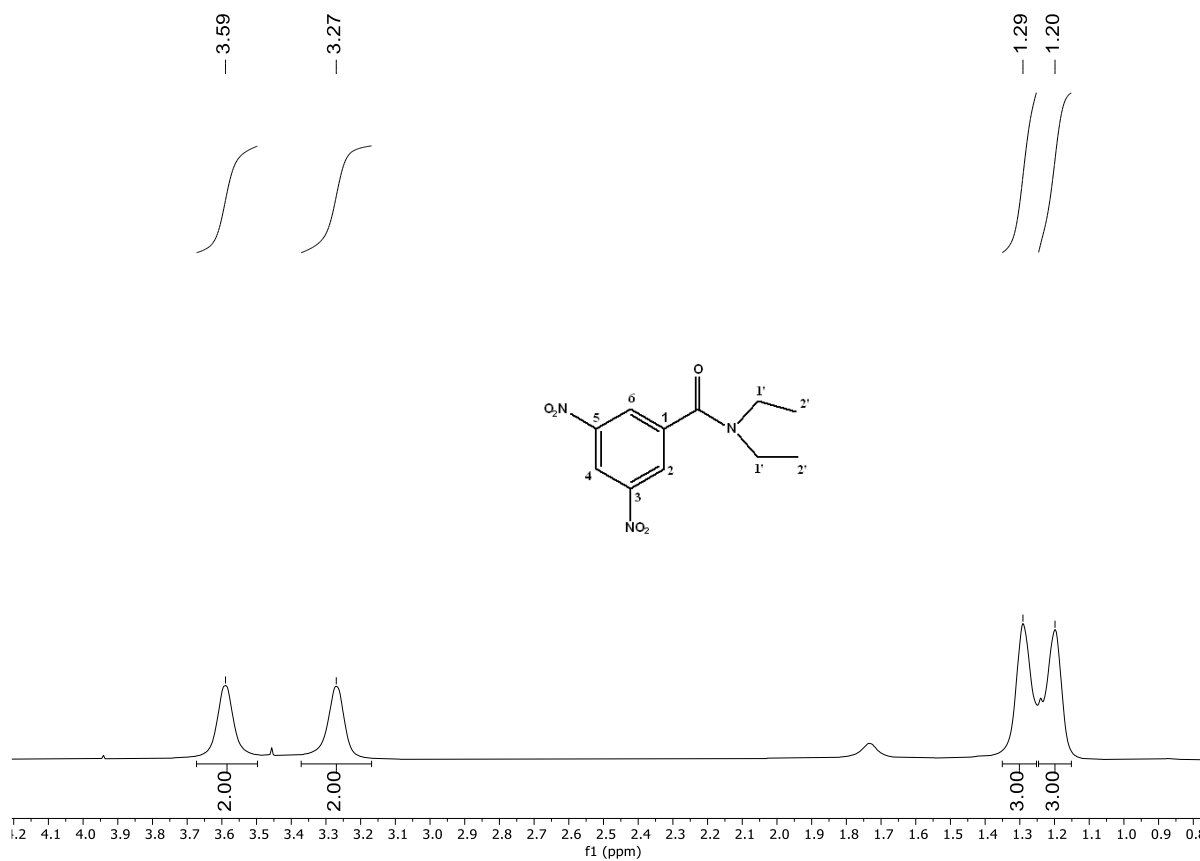


Figura 86: Expansão do espectro de RMN ^1H de *N,N*-dietil-3,5-dinitrobenzamida (**16**), (CDCl_3 , 500 MHz).

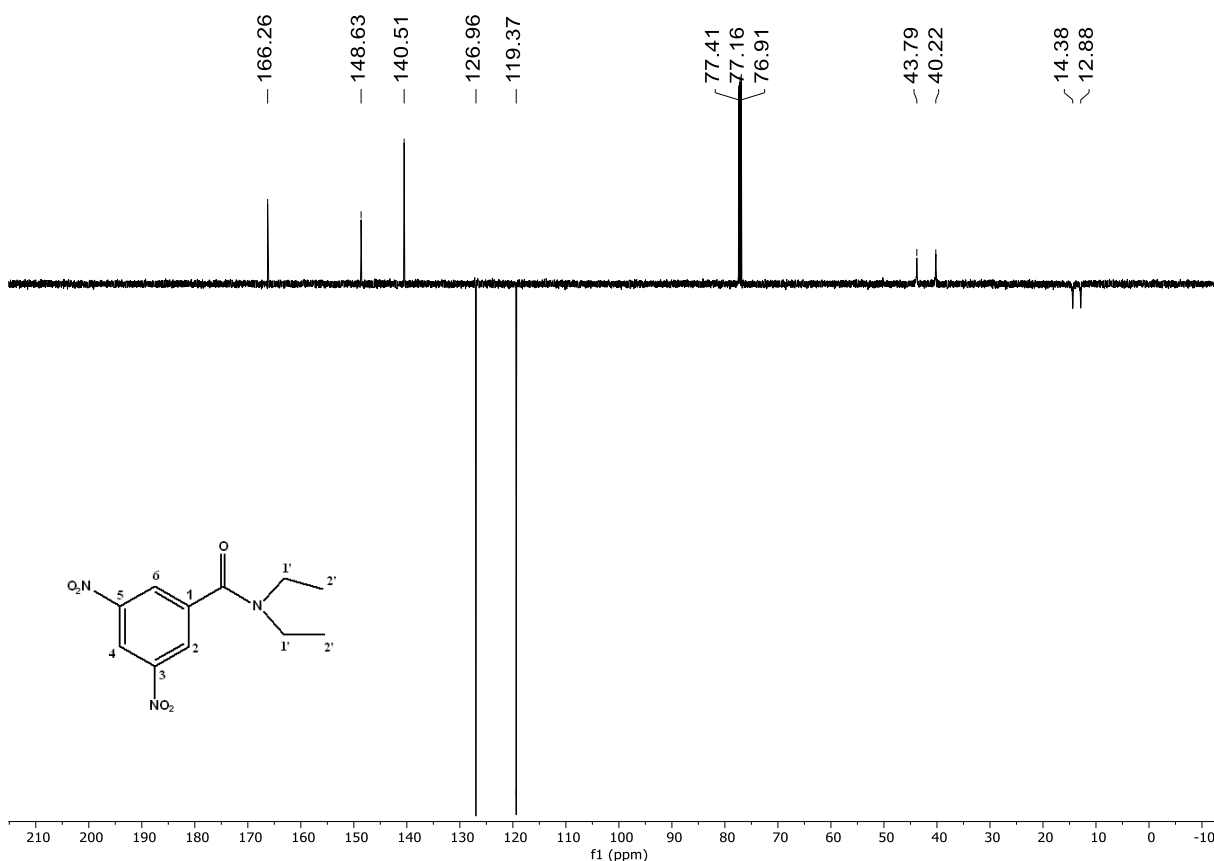
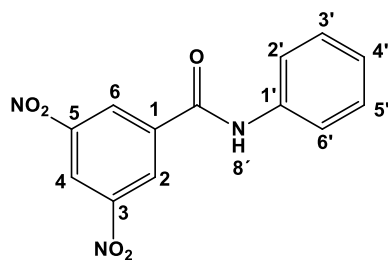


Figura 87: Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N,N*-dietil-3,5-dinitrobenzamida (**16**), (CDCl_3 , 125 MHz).

11.10.3. 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida (**17**)



Aspecto: Sólido cristalino âmbar

Rendimento: 59,08%

Ponto de Fusão: 233,1-233.6 °C (lit. 226°C, HASSAN et al., 2015)

Fator de Retenção: 0,64 (7:3 Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3284 (estiramento N-H); 3105 (C-H, sp^2); 1659 (estiramento C=O); 1545 e 1334 (estiramento NO_2)

RMN ^1H de (500 MHz, DMSO- d_6): δH 10,83 (s, 1H, N-H); 9,17 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 9,00 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4); 7,78 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,41 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7,17 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H-4')

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): δC 161,24 (C=O); 148,11 (C-3, C-5); 138,25 (C-1'); 137,43 (C-1); 128,75 (C-2, C-6); 127,99 (C-3', C-5'); 124,54 (C-4'); 121,06 (C-2', C-6); 120,72 (C-4) (HASSAN et al., 2015).

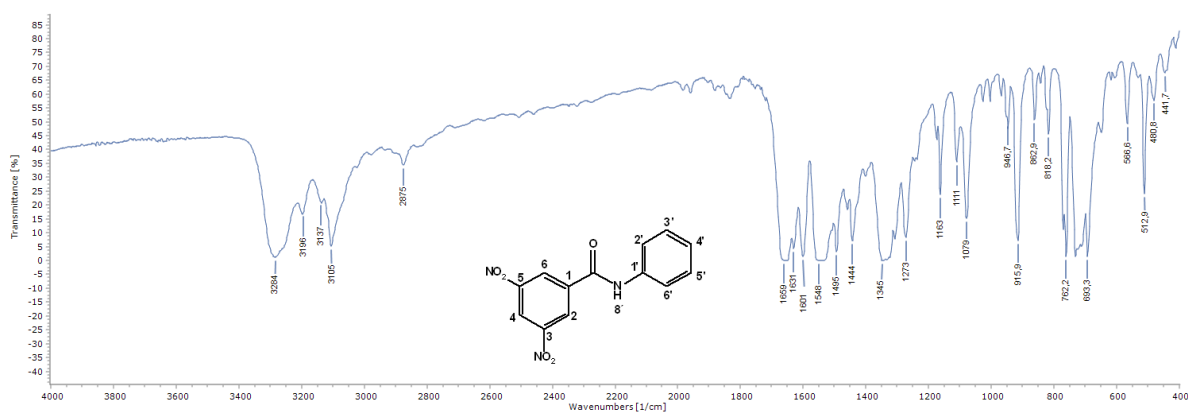


Figura 88: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida (**17**).

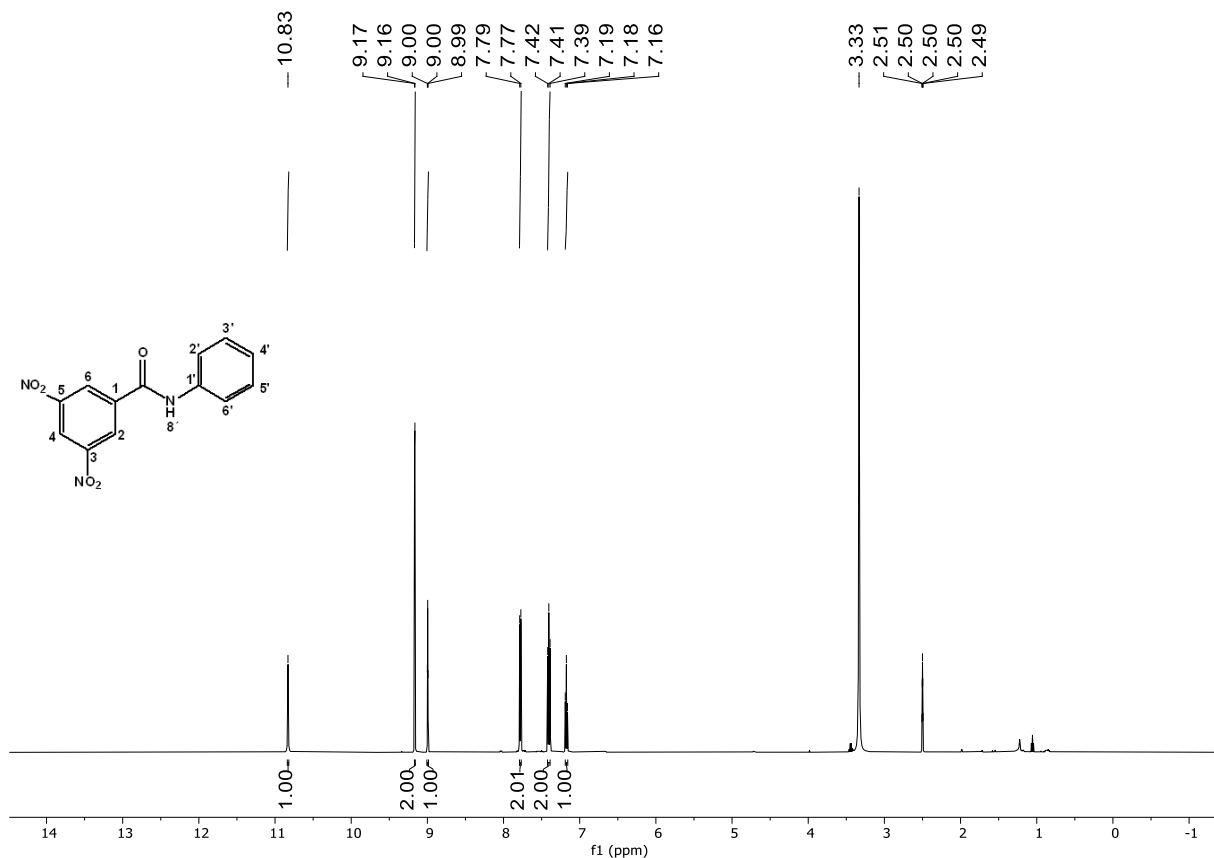


Figura 89: Espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida (**17**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

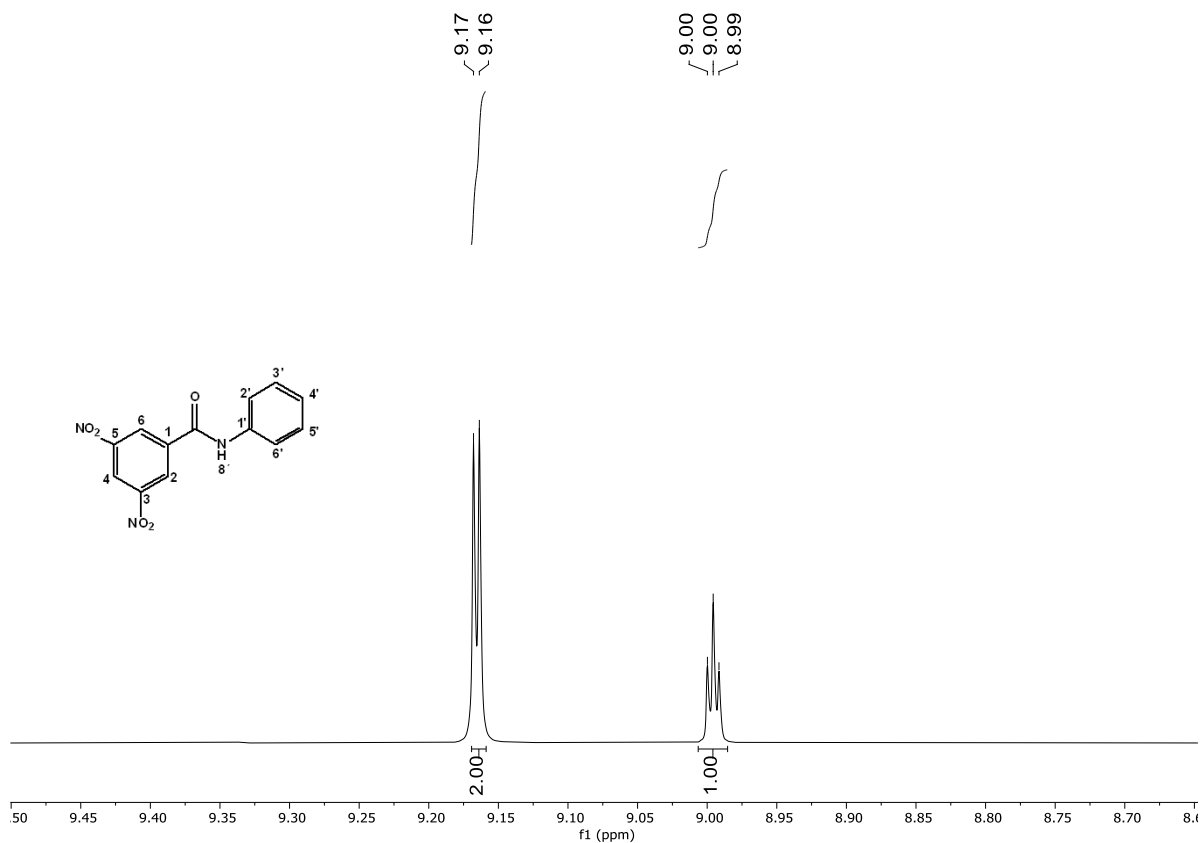


Figura 90: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida (**17**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

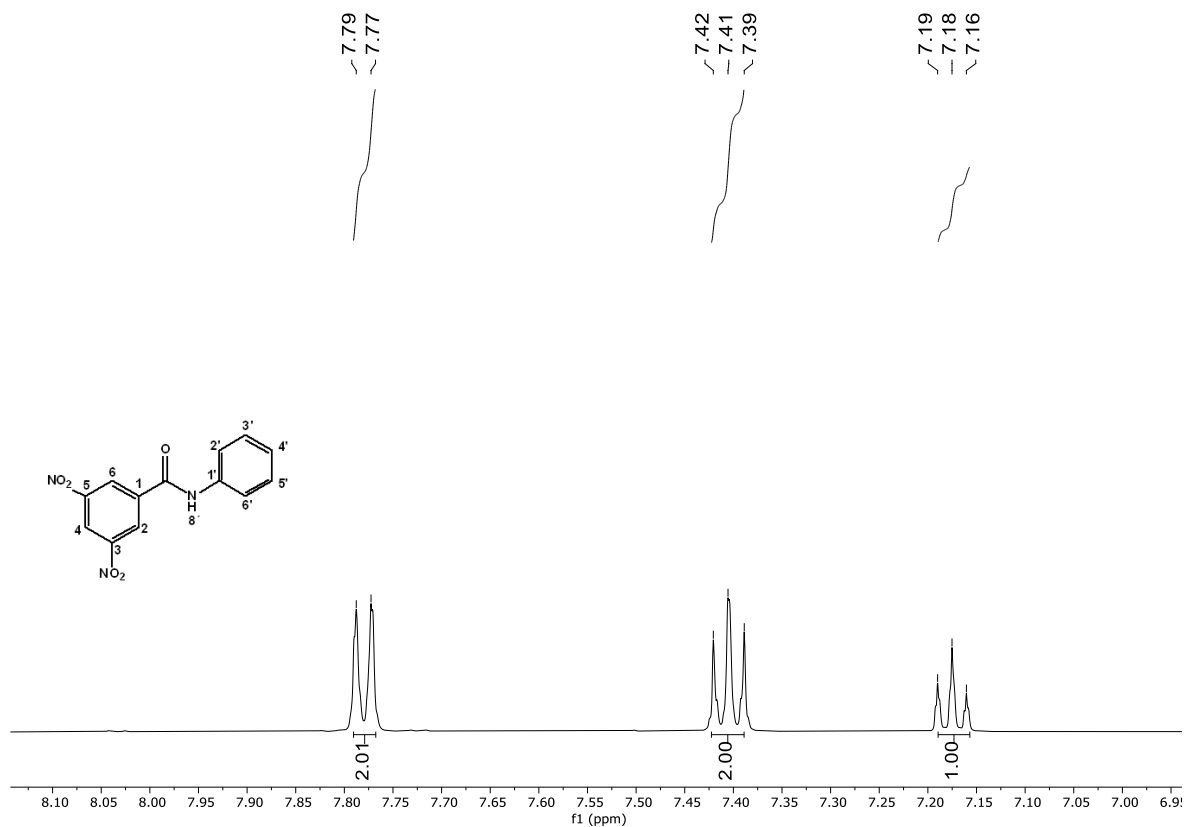


Figura 91: Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida (**17**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

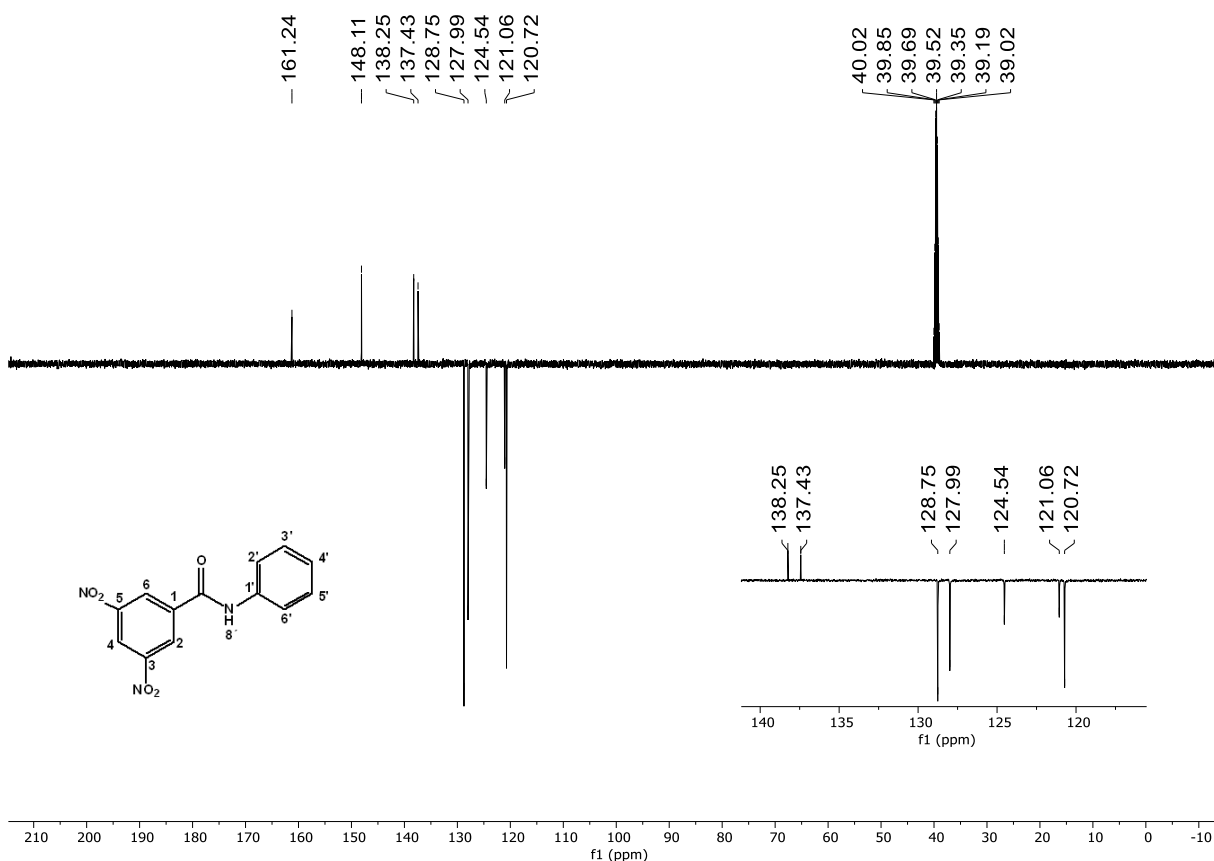
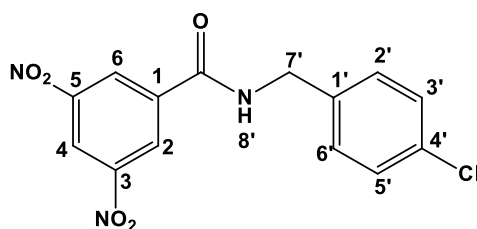


Figura 92: Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,5-dinitro-*N*-fenilbenzamida (**17**), (DMSO- d_6 , 125MHz).

11.10.4. *N*-(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**18**)



Aspecto: Sólido cristalino âmbar

Rendimento: 46,12%

Ponto de Fusão: 190,4-190,7°C

Fator de Retenção: 0,48 (7:3 Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3303 (estiramento N-H); 3099 (C-H, sp^2); 2926 (C-H, sp^3); 1644 (estiramento C=O); 1535 e 1344 (estiramento NO_2)

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 9,77 (*t*, $J = 5,8$ Hz, 1H, N-H), 9,09 (*d*, $J = 2,1$

Hz, 2H, H-2, H-6); 8,96 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4); 7,42 – 7,37 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'); 4,54 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-7')

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δC 162,24 (C=O); 148,26 (C-3, C-5); 137,81 (C-1); 136,68 (C-1'); 131,70 (C-4'); 129,47 (C-2', C-6'); 128,38 (C-2, C-6); 127,63 (C-3', C-5'); 121,00 (C-4); 42,56 (C-7') (NEMECEK et al., 2017).

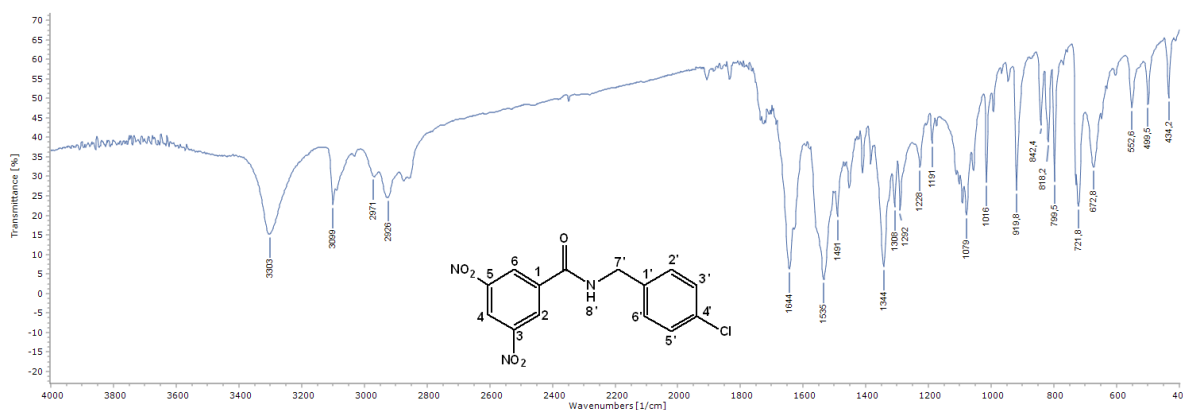


Figura 93: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**18**).

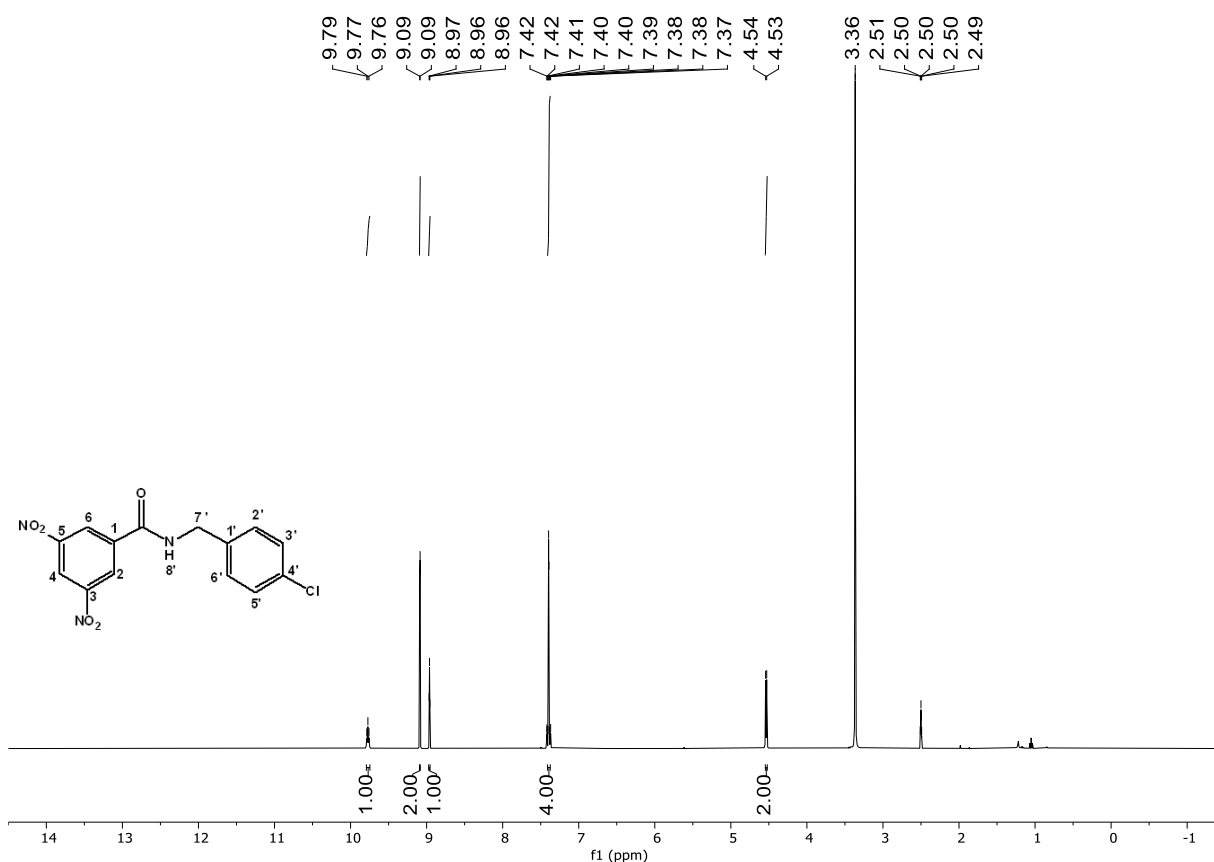


Figura 94: Espectro de RMN ^1H de *N*-(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**18**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

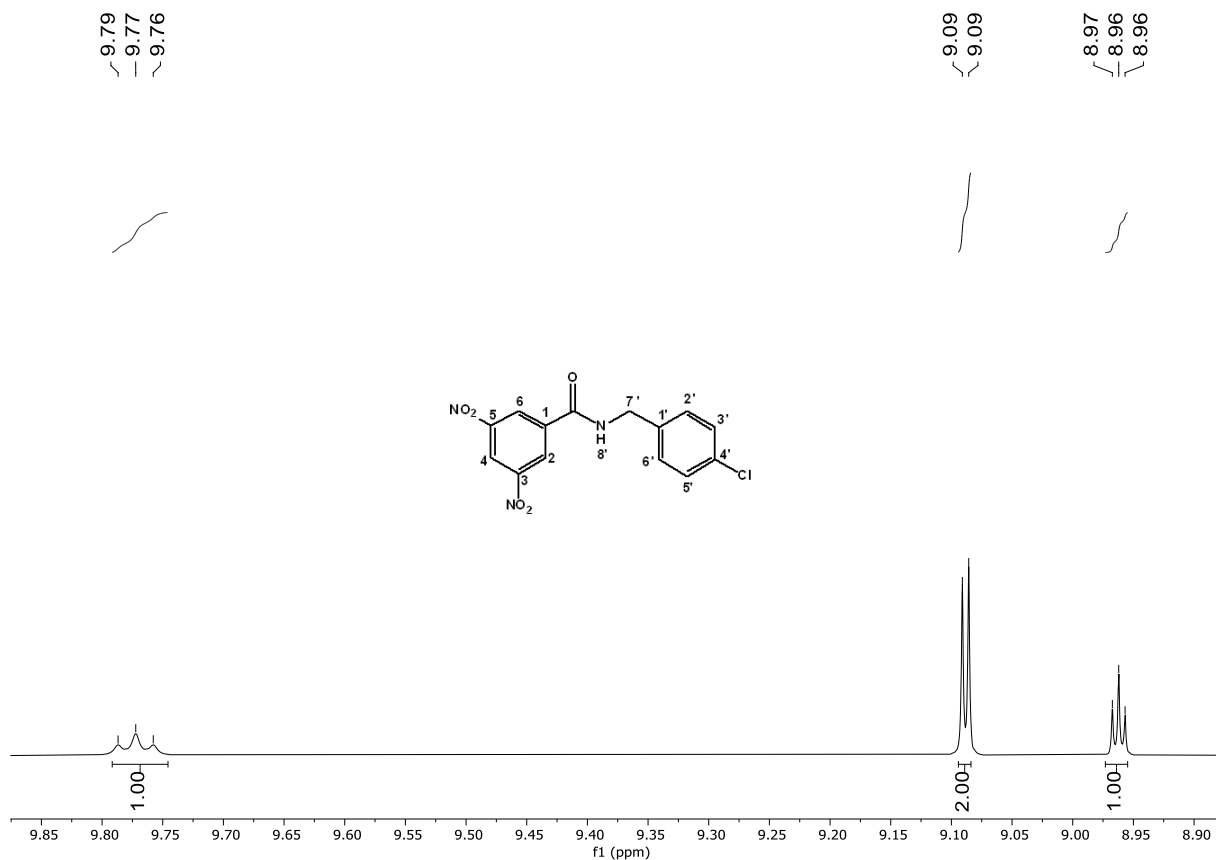


Figura 95: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**18**), (DMSO-d₆, 400 MHz).

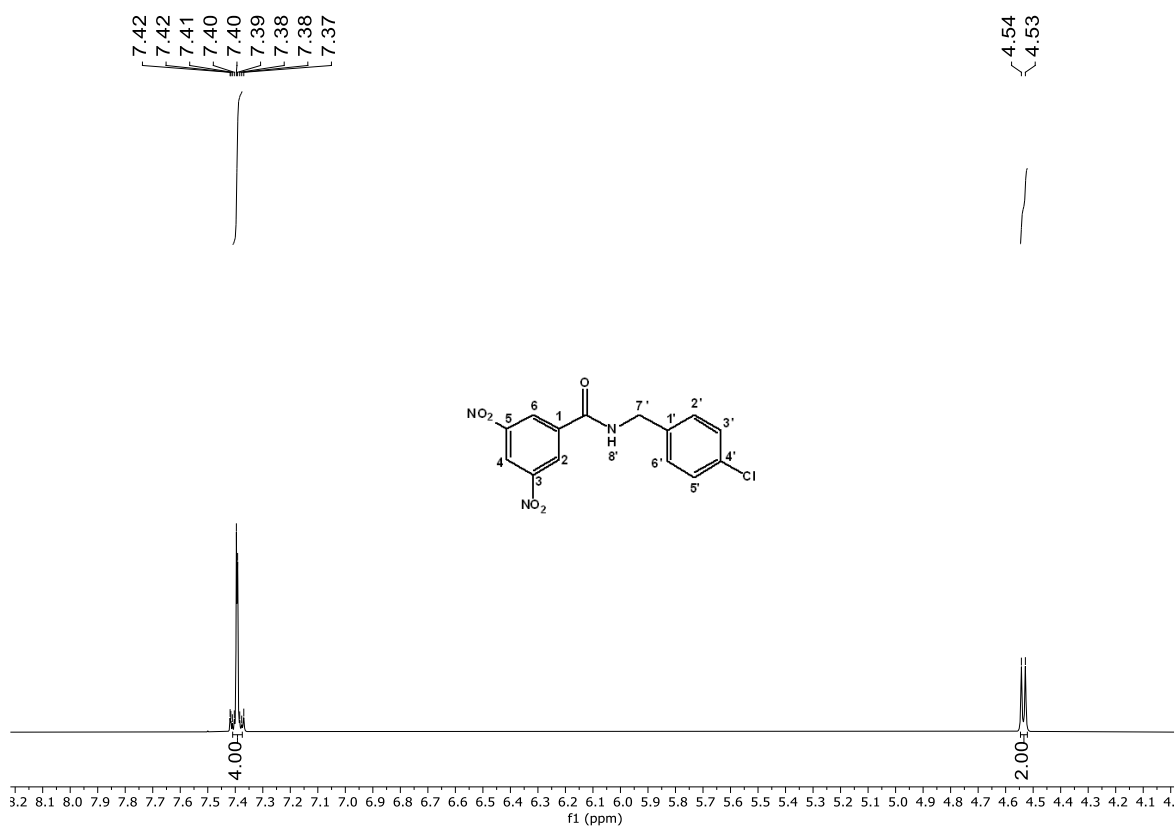


Figura 96: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-(4-clorobenzil)-3,5 dinitrobenzamida (**18**), (DMSO-d₆, 400 MHz).

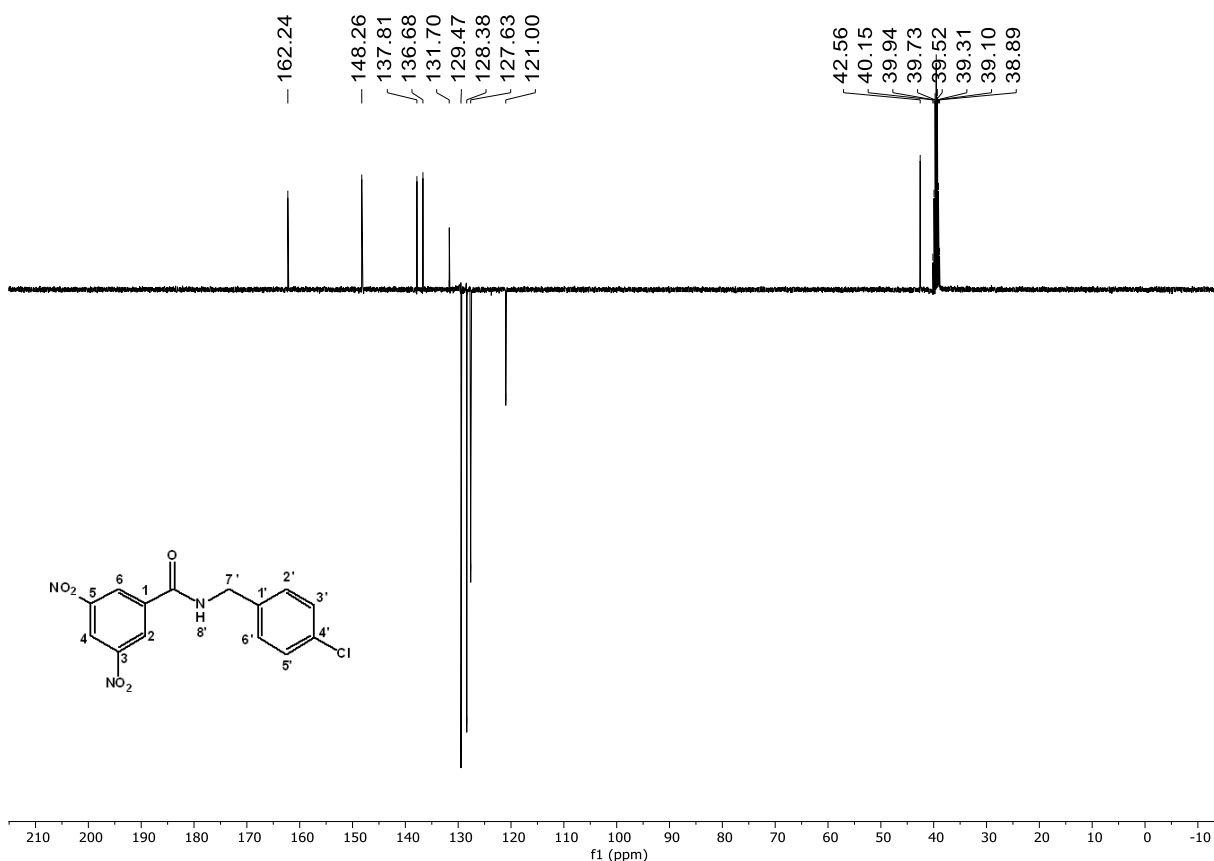
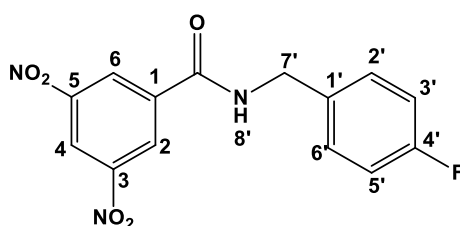


Figura 97: Espectro de RMN ¹³C-APT de 3,5-dinitrobenzoato de *N*-(4-clorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**18**), (DMSO-d₆, 100 MHz).

11.10.5. *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**)



Aspecto: Sólido amorfo âmbar

Rendimento: 63,38%

Ponto de Fusão: 197,3-198,0 (lit. 204-206, WANG et al., 2019)

Fator de Retenção: 0,48 (7:3 Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3302 (estiramento N-H); 3099 (C-H, sp²); 2939 (C-H, sp³); 1642 (estiramento C=O); 1534 e 1342 (estiramento NO₂)

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ H 9,72 (t, *J*=5,7 Hz 1H, N-H); 9,09 (d, *J* = 2,1

Hz, 2H, H-2, H-6), 8,96 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4); 7,42 – 7,39(m, 2H, H=2', H-6'); 7,17 (t, $J = 8,9$ Hz, 2H H-3', H-5'); 4,53 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-7')

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): δC 162,19 (d, $J_{\text{C-F}} = 20$ Hz, C-4'-F); 160,34 (C=O); 148,19 (C-3,C-5); 136,73 (C-1), 134,87 (C-1'); 129,61 (C-2); 129,54 (C-6); 127,55 (C-2', C-6'); 120,87 (C-4); 115,16 (C-3'); 114,99 (C-5') 42,48 (C-7') (WANG et al., 2019).

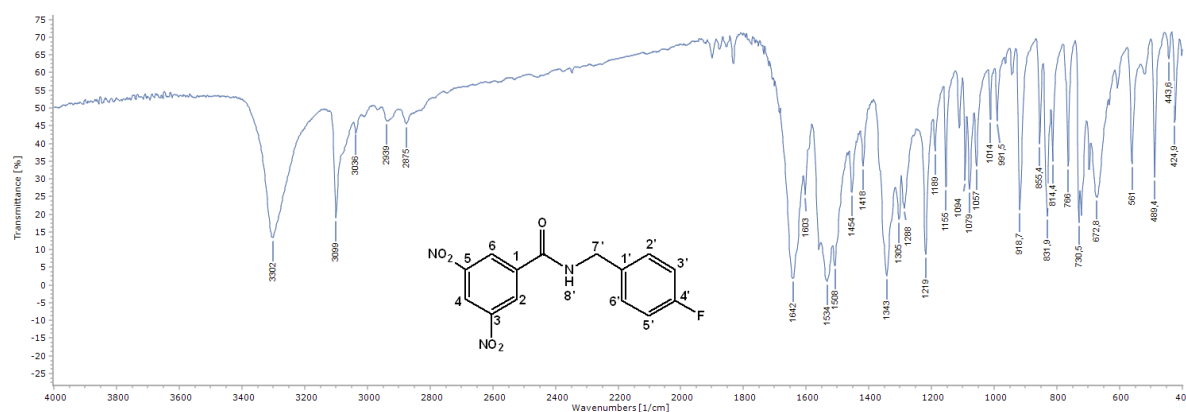


Figura 98: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**).

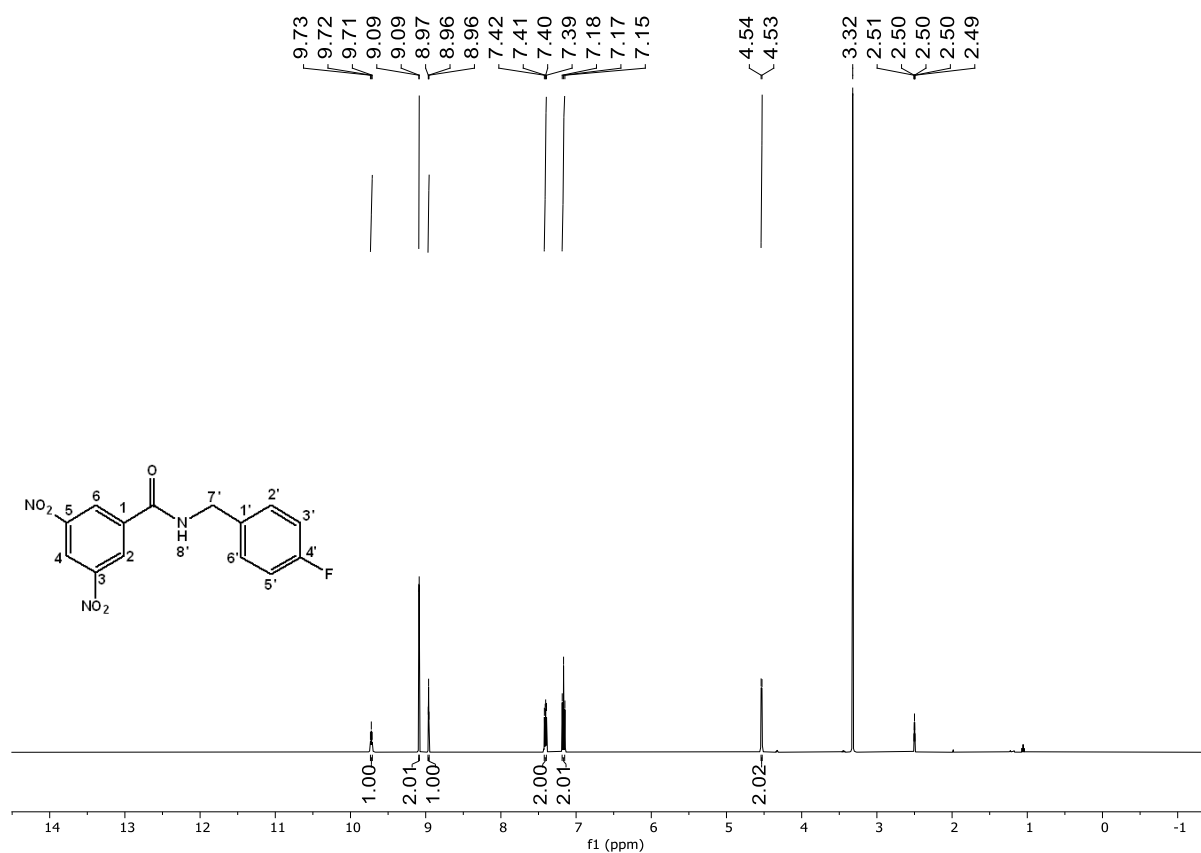


Figura 99: Espectro de RMN ^1H de *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

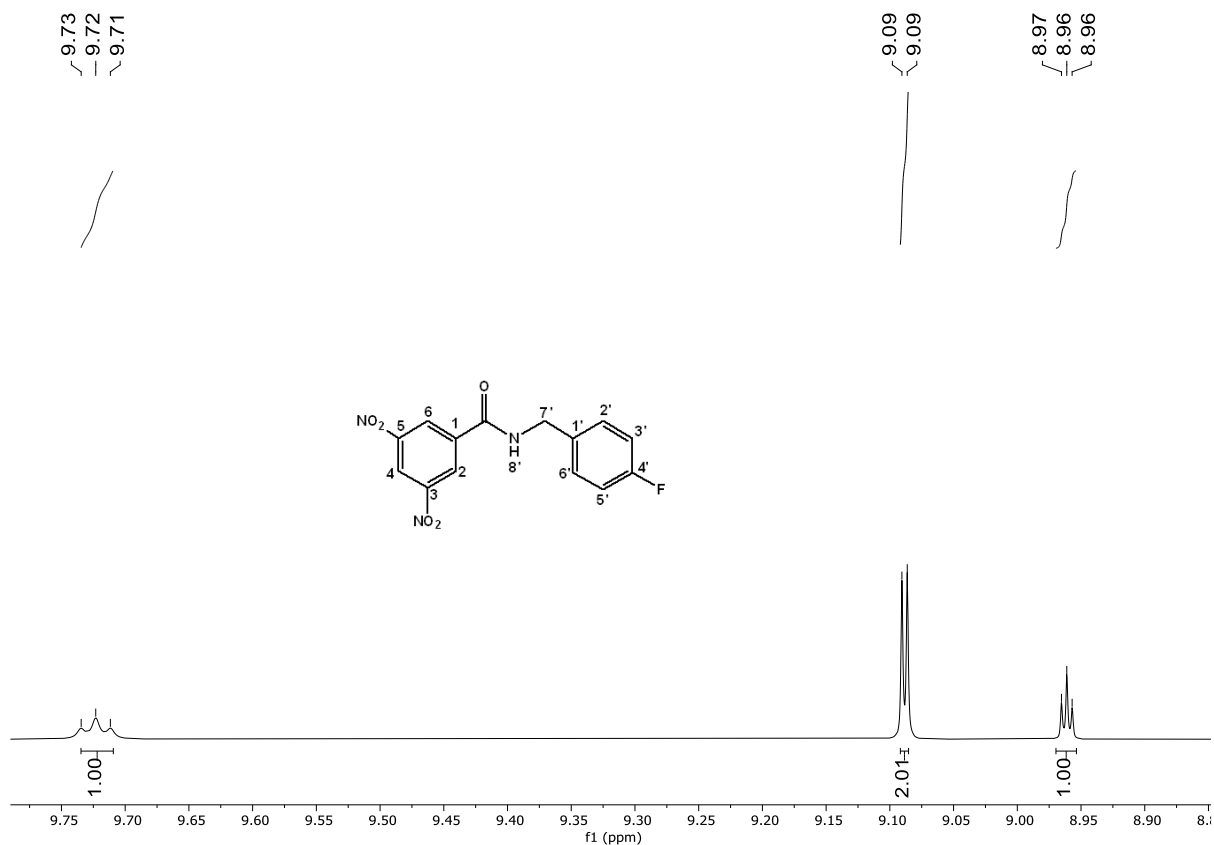


Figura 100: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), (DMSO-d₆, 500 MHz).

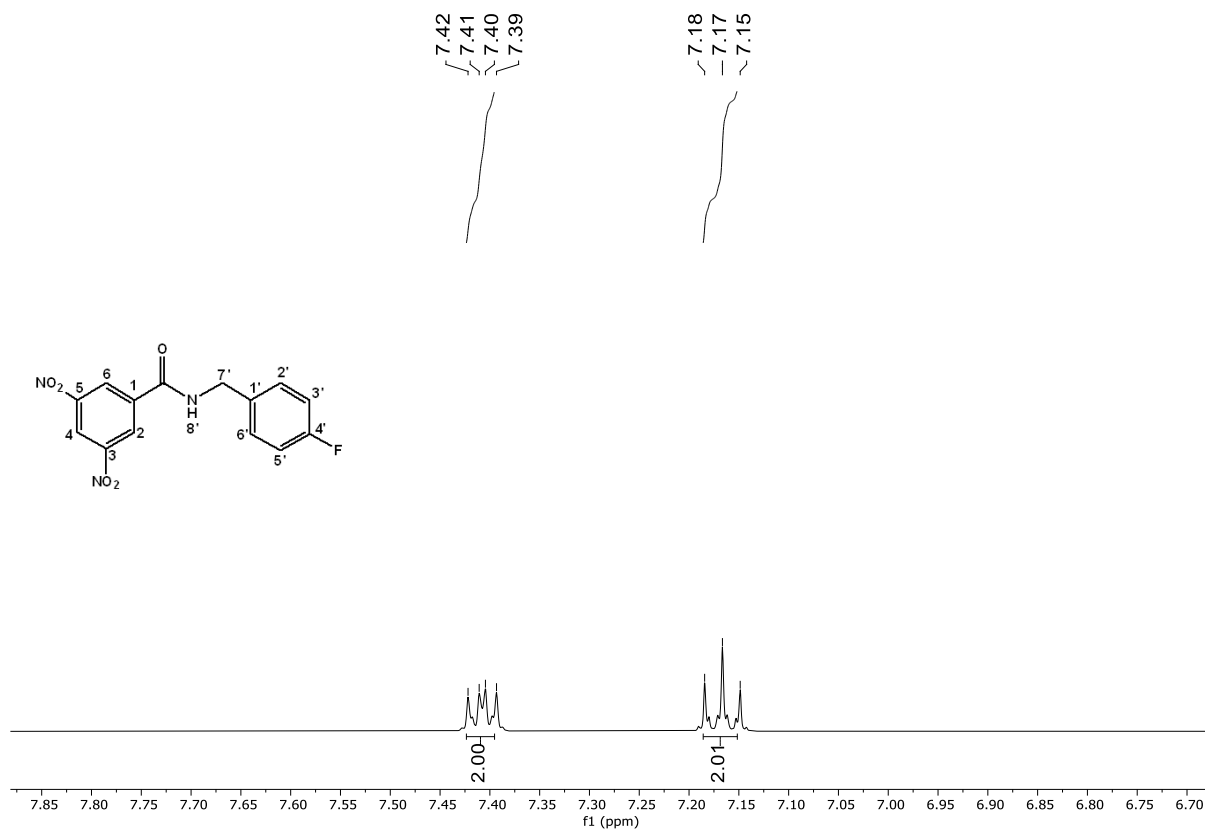


Figura 101: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), (DMSO-d₆, 500 MHz).

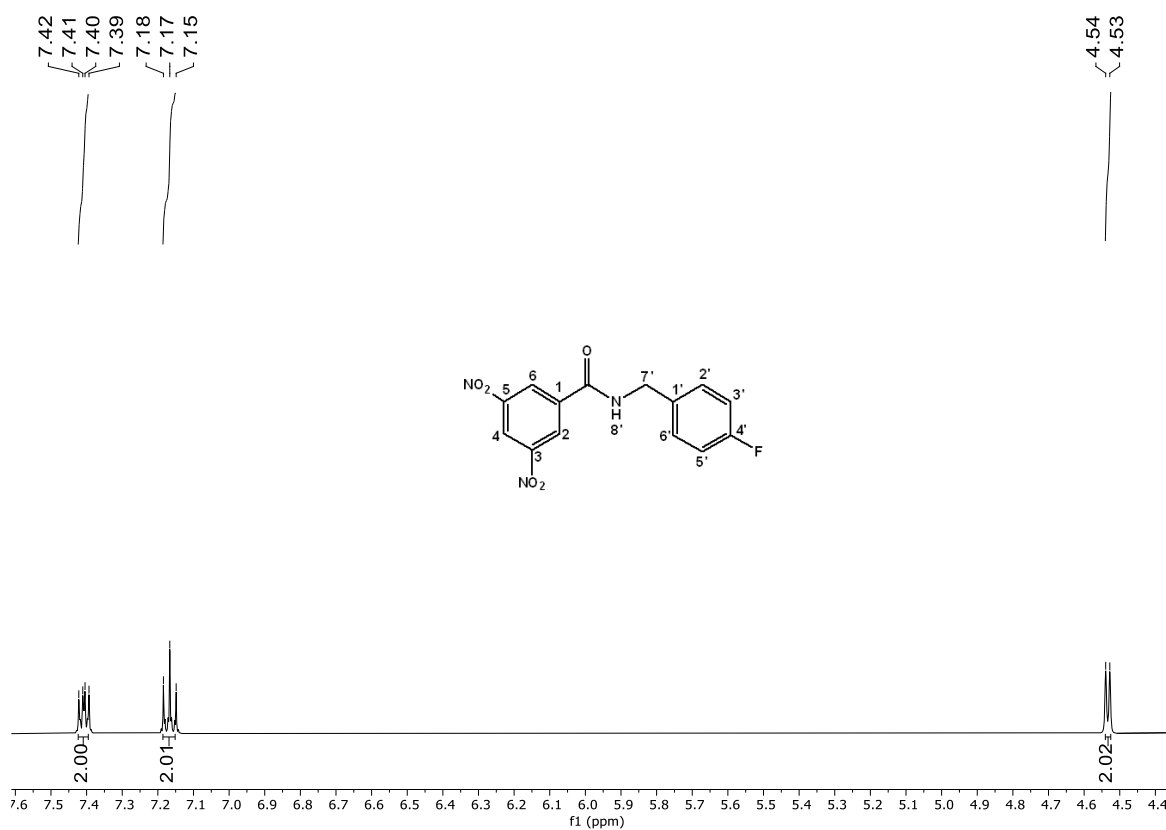


Figura 102: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), (DMSO-d₆, 500 MHz).

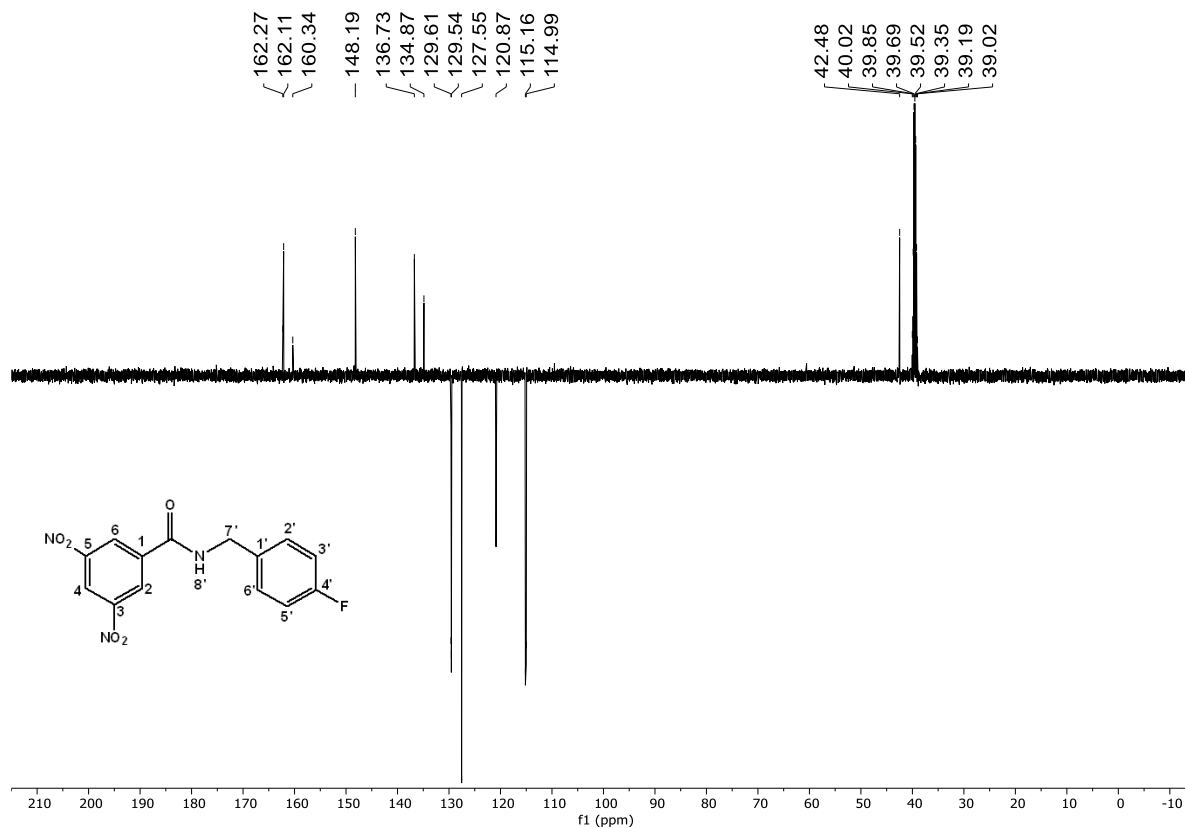


Figura 103: Espectro de RMN ¹³C-APT de *N*-(4-fluorbenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), (DMSO-d₆, 125 MHz).

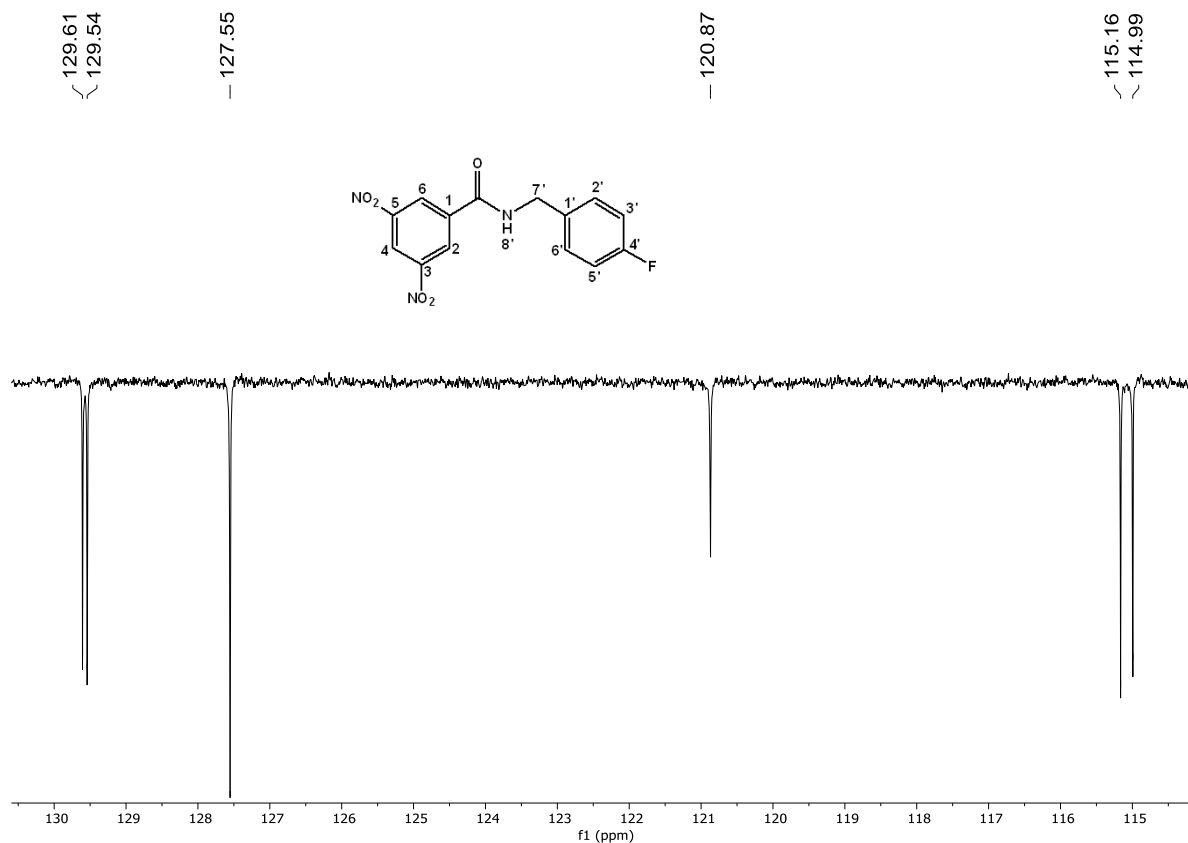


Figura 104: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 125 MHz).

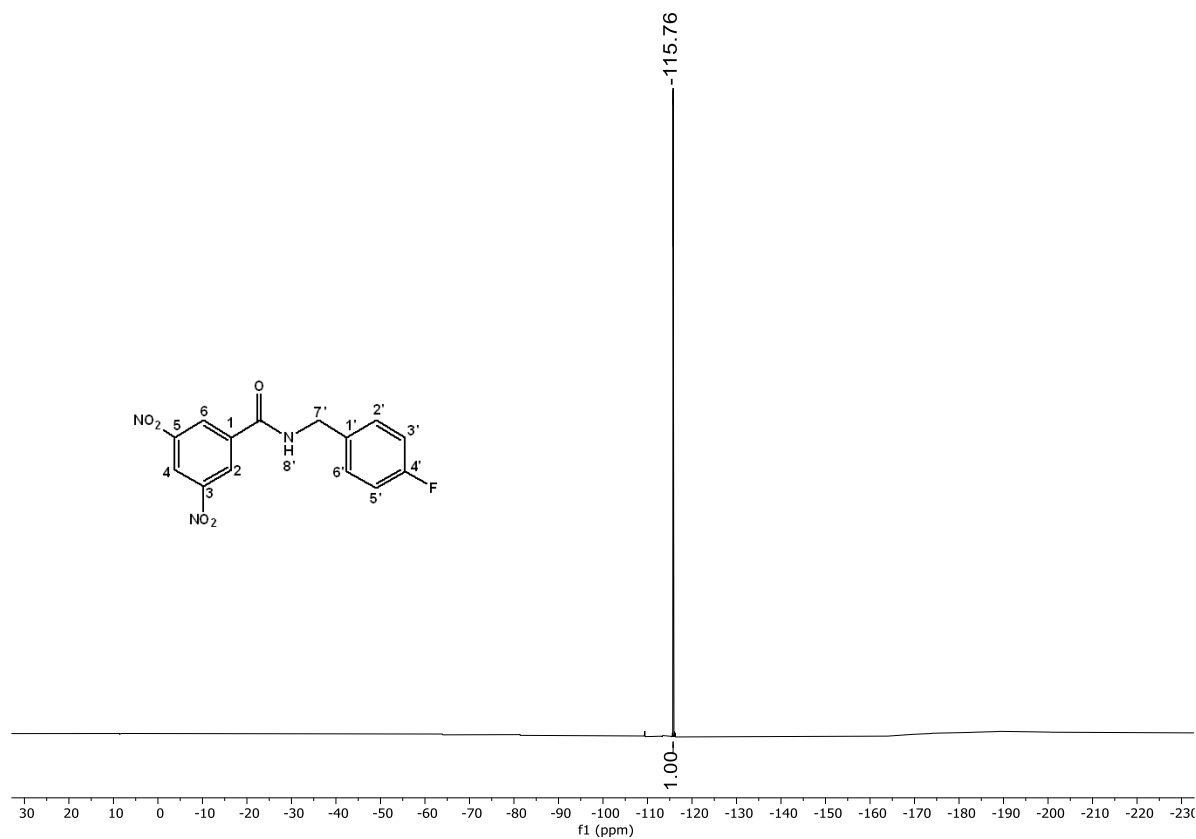
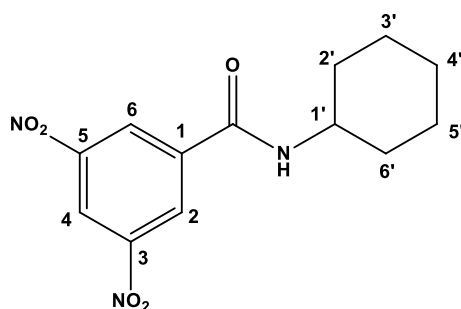


Figura 105: Espectro de RMN ^{19}F de *N*-(4-fluorobenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

11.10.6. *N*-ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (**20**)

Aspecto: Sólido amorfo branco

Rendimento: 54,22%

Ponto de Fusão: 205,1-205,8 °C (lit. 212-213°C WANGNGAE et al., 2015)

Fator de Retenção: 0,66 (7:3 Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3297 (estiramento N-H); 3109 (C-H, sp^2); 2941 (C-H, sp^3); 1646 (estiramento C=O); 1542 e 1345 (estiramento NO_2)

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): δ_{H} 9,05 (*d*, $J = 2,1$ Hz, 2H, H-2, H-6); 8,94 (*t*, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4), 3,81 (*quint*, $J = 3,6$ Hz, 1H, H-1'); 1,87 – 1,61 (*m*, 6H, H-2', H-4', H-6'); 1,39-1,31 (*m*, 4H, H-3', H-5')

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ_{C} 161,18 (C=O); 148,17 (C-3, C-5); 137,31 (C-1); 127,59 (C-2, C-6); 120,71 (C-4); 49,18 (C-1'); 32,25 (C-2', C-6'); 25,25 (C-4'); 24,91 (C-3', C-5') (PÉREZ et al., 2019).

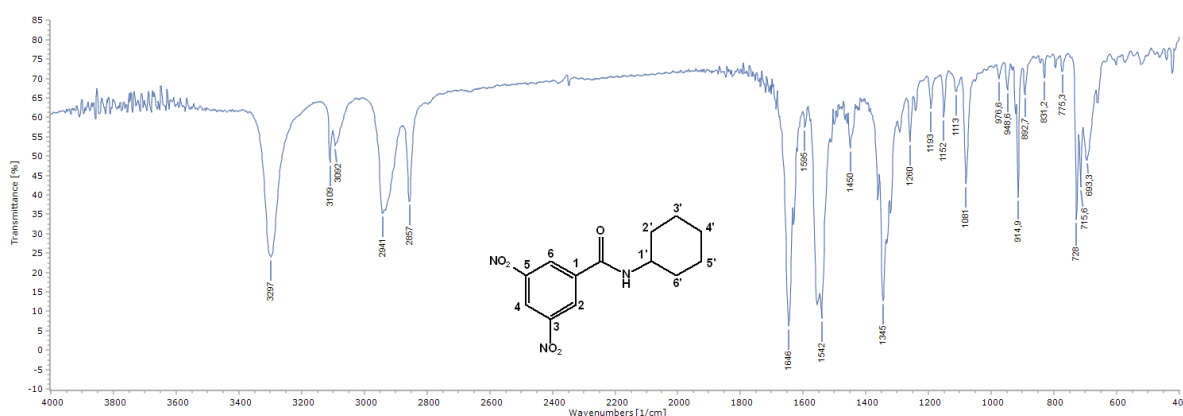


Figura 106: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (**20**).

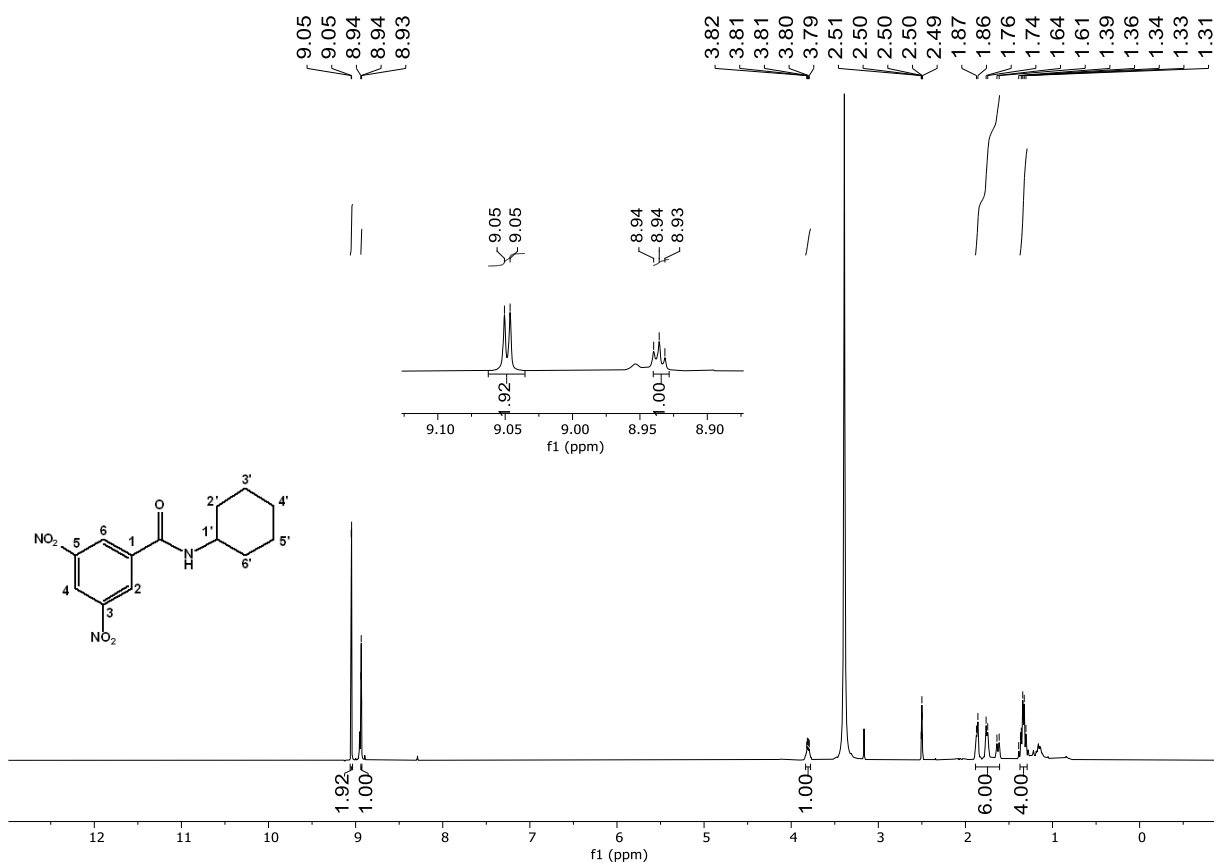


Figura 107: Espectro de RMN ¹H de *N*-ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (**20**), (DMSO-d₆, 500 MHz).

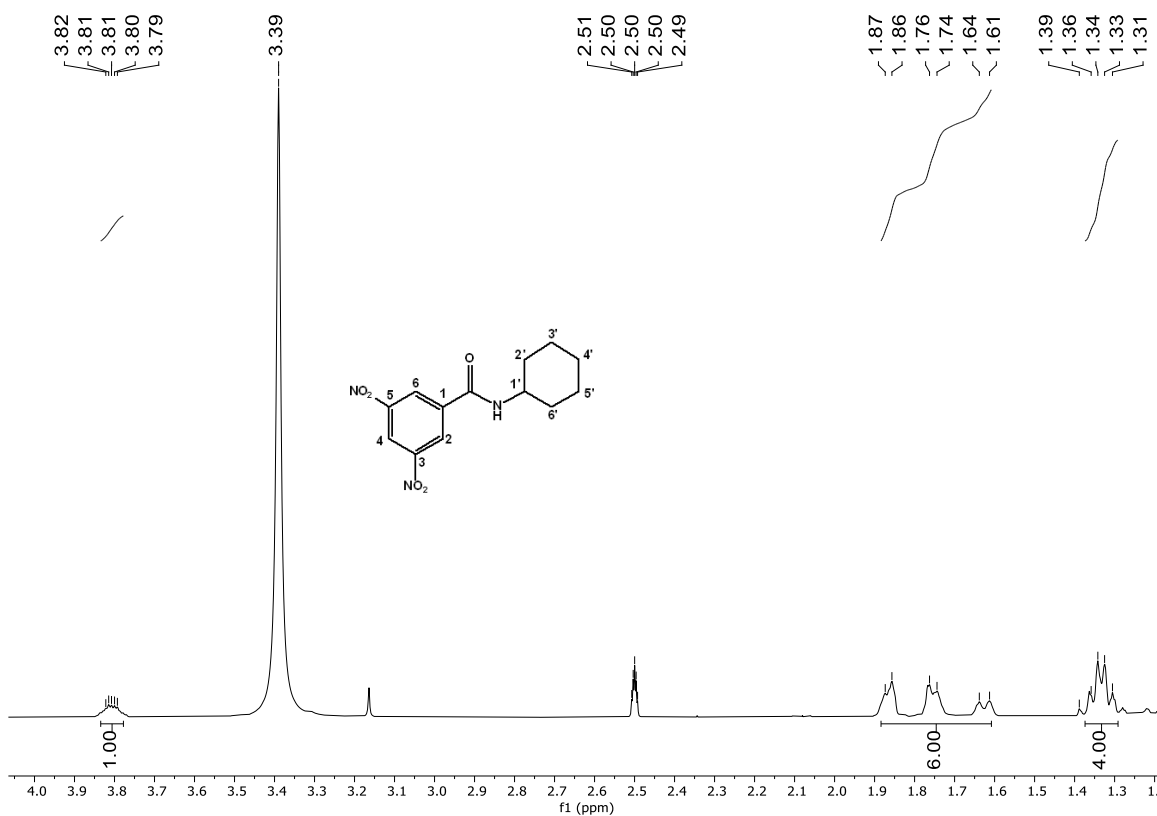


Figura 108: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (**20**), (DMSO-d₆, 500MHz).

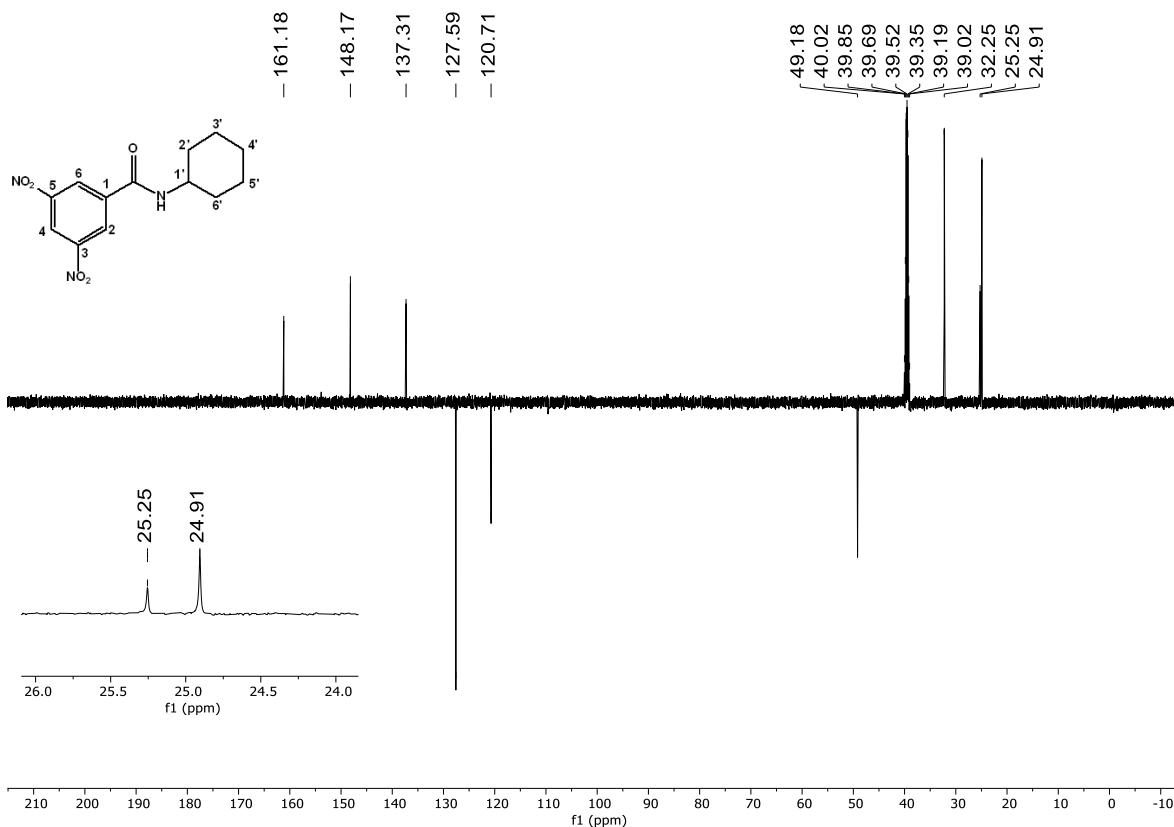
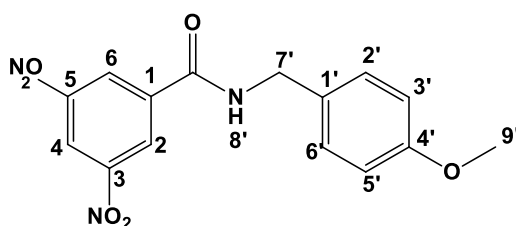


Figura 109: Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-ciclo-hexil-3,5-dinitrobenzamida (20), (DMSO-D6, 500 MHz).

11.10.7. *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (21)



Aspecto: Sólido cristalino amarelo

Rendimento: 63,58%;

Ponto de Fusão: 142,4-143,1 °C (lit. 155-157 °C, WANG et al., 2019)

Fator de Retenção: 0,46 (7:3 Hexano/EtOAc)

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3303 (estiramento N-H); 3095 (C-H, sp^2); 2934 (C-H, sp^3); 1643 (estiramento C=O); 1541 e 1344 (estiramento NO_2)

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 9,66 (*t*, $J = 5,7$ Hz, 1H, N-H); 9,08 (*d*, $J = 2,1$

Hz, 2H, H-2, H-6); 8,95 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-4); 7,29 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 4,47 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-7'), 3,73 (s, 3H, H-9')

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6): δC 162,03 (C=O); 158,46 (C-4'); 148,24 (C-3, C-5); 136,91 (C-1); 130,67 (C-1'); 129,02 (C-2', C-6'); 127,59 (C-2, C-6); 120,87 (C-4); 113,82 (C-3', C-5'); 55,12 (C-9'); 42,71 (C-7') (WANG et al., 2019).

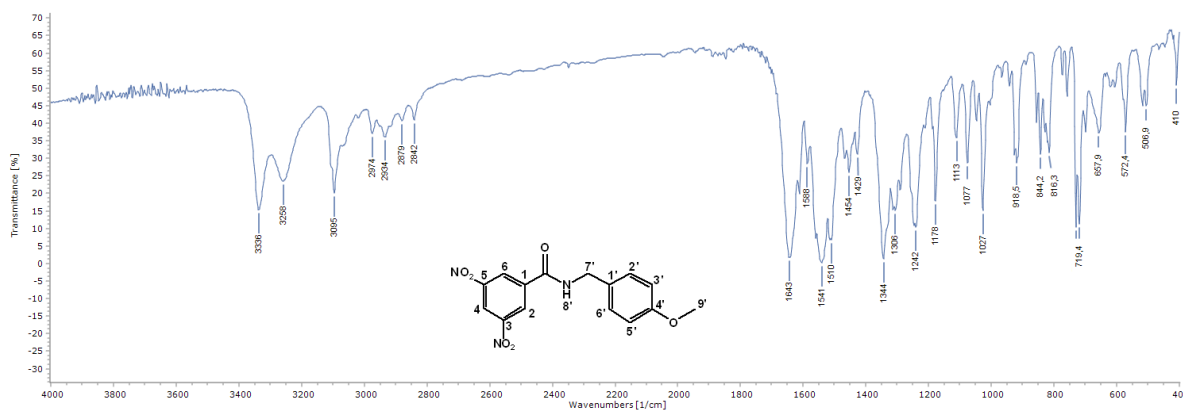


Figura 110: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**21**).

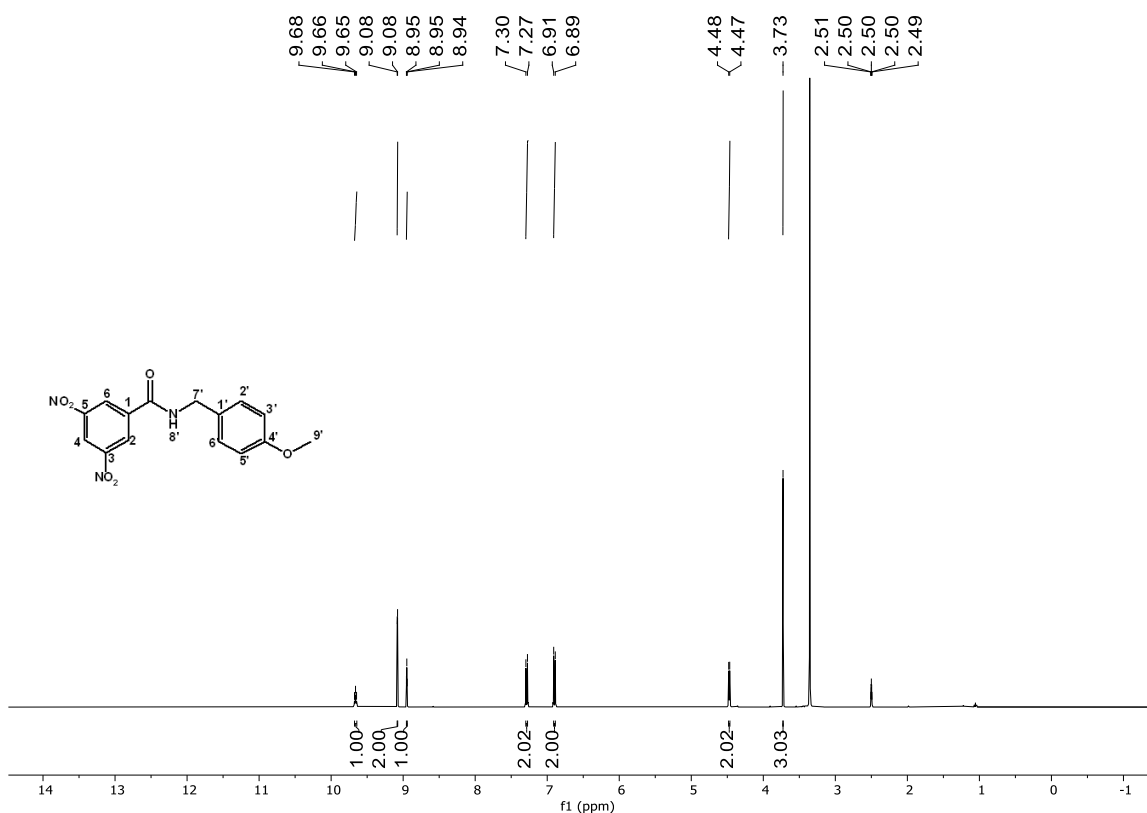


Figura 111: Espectro de RMN ^1H de *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**21**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

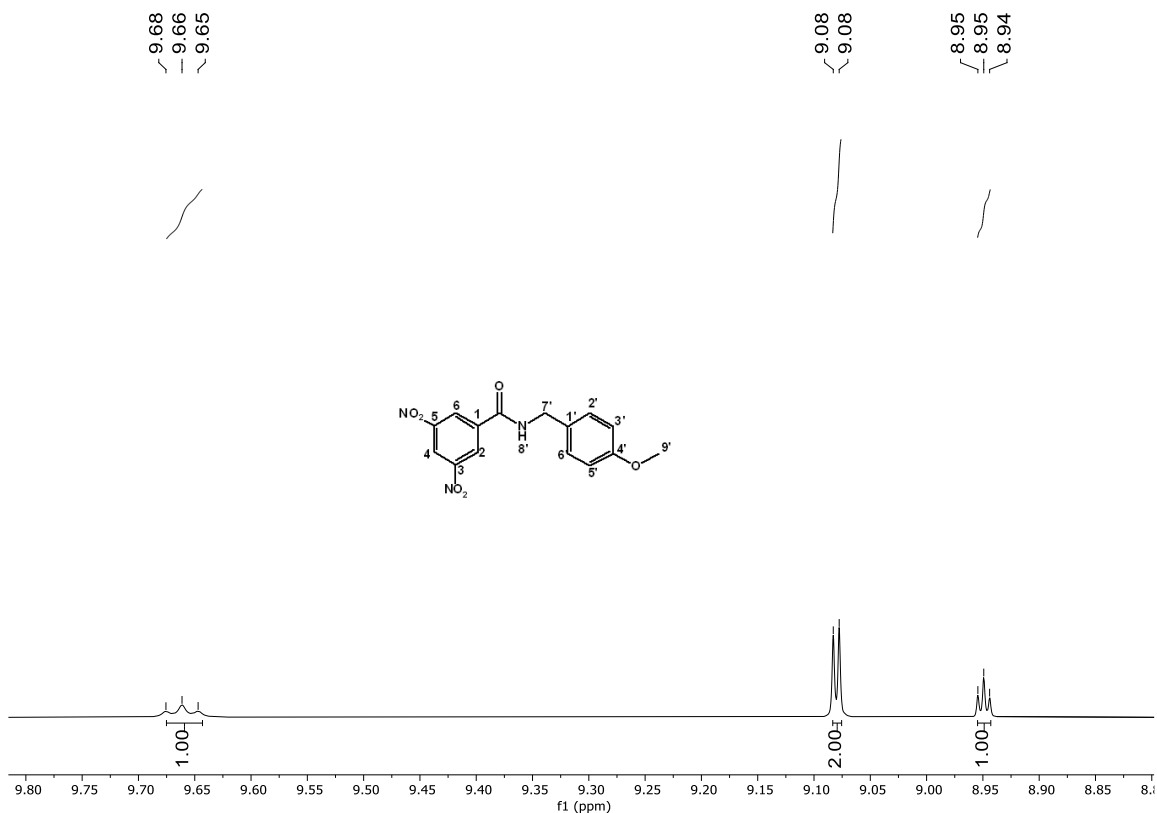


Figura 112: Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**21**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

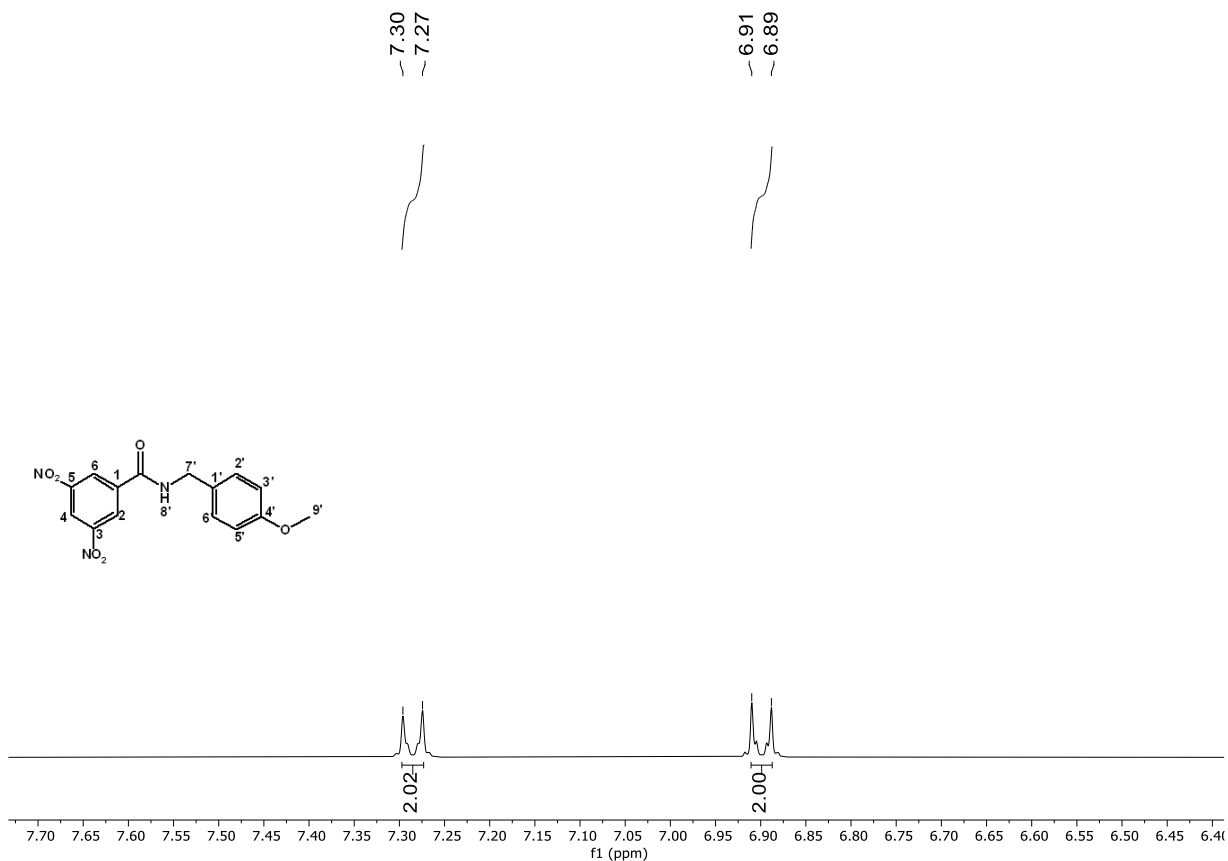


Figura 113: Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**21**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

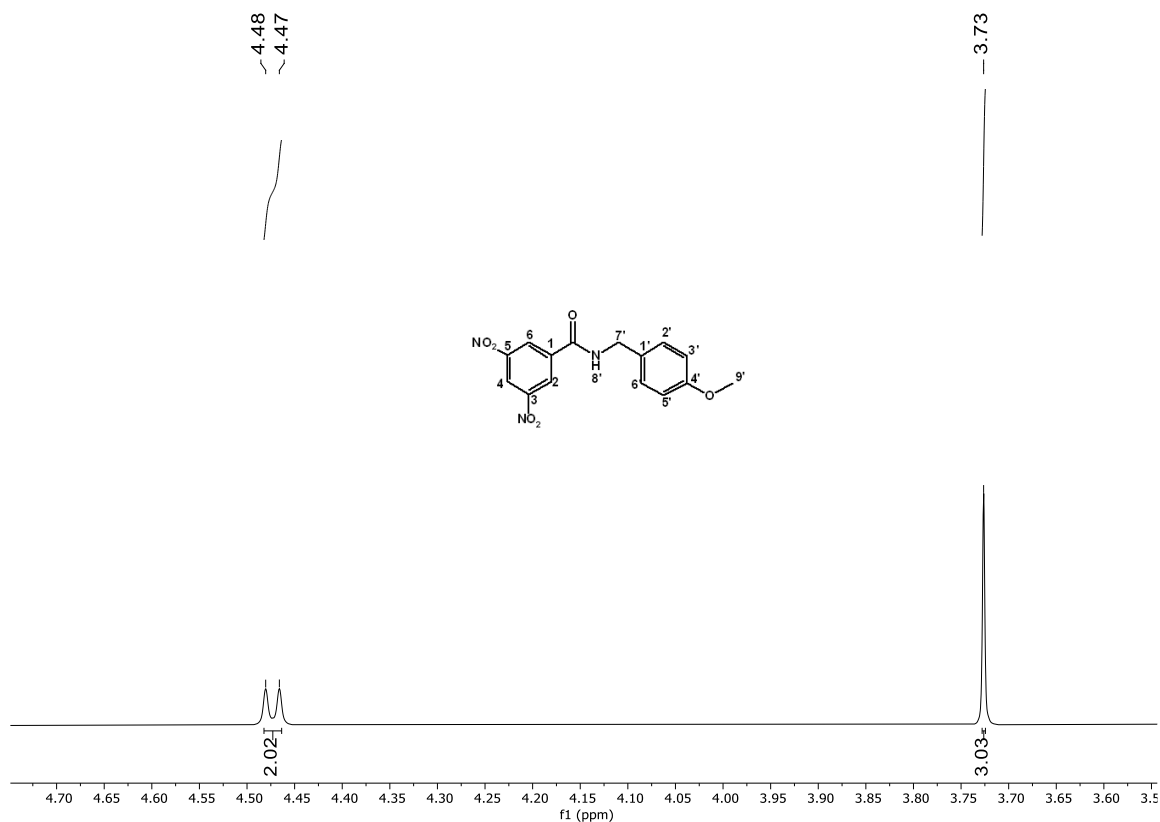


Figura 114: Expansão do espectro de RMN ¹H de *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**21**), (DMSO-d₆, 400 MHz).

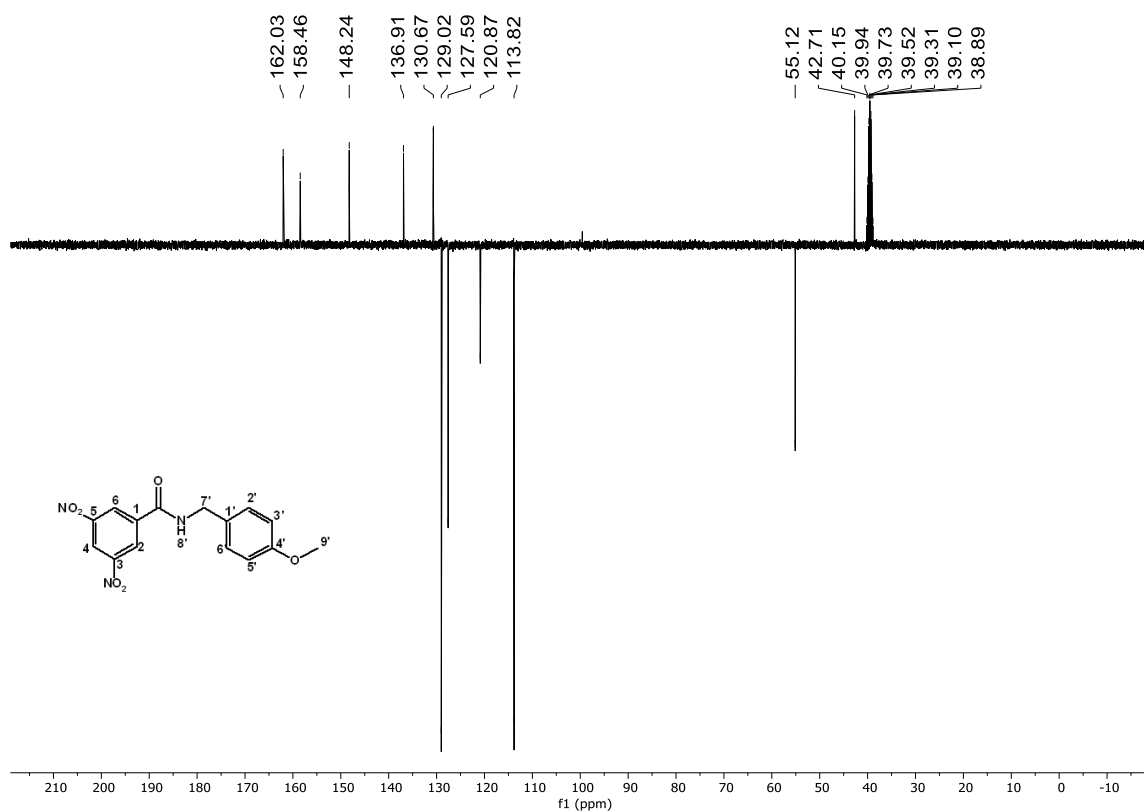


Figura 115: Espectro de RMN ¹³C-APT de *N*-(4-metoxibenzil)-3,5-dinitrobenzamida (**21**), (DMSO-d₆, 100 MHz).

REFERÊNCIAS

- ABRANTES et al., Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não *albicans*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3. p. 227-233, 2013.
- AHMADI, M.; MORADI, L.; SADEGHZADEH, M. Synthesis of benzamides through direct condensation of carboxylic acids and amines in the presence of diatomite earth@ IL/ZrCl₄ under ultrasonic irradiation. **Research on Chemical Intermediates**, v. 44, n.12, p. 7873-7889, 2018.
- ALCÂNTARA, A. F. C.; BARROSO, H. S.; PILÓ-VELOSO, D. Reduction of amides by boranes. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 300-311, 2002.
- ALNUFAIE, R. et al. Design and synthesis of 4-[4-formyl-3-(2-naphthyl) pyrazol-1-yl] benzoic acid derivatives as potent growth inhibitors of drug-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 12, p. 818-827, 2020.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.A.; GREARY, J.E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, D. N. et al. Breakpoints for the classification of anti-*Candida* compounds in antifungal screening. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.
- ALVES, D.N. et al. Docking prediction, antifungal activity, anti-biofilm effects on *Candida* spp., and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5969, 2020.
- AMIN, J.E.P.; CUCA, L.E.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Antifungal and phytotoxic activity of benzoic acid derivatives from inflorescences of *Piper cumanense*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 16, p. 2763-2771, 2021.
- AMYES, T. L.; RICHARD, J. P. Reações de substituição simultânea e concertada de derivados de 4-metoxibenzil e a vida útil do carbocátion de 4-metoxibenzil. **Journal of American Chemical Society**, v.112, n.26, p. 9507-9512, 1990.
- ANDRADE, J. T. et al. Pharmacologic potential of new nitro-compounds as antimicrobial agents against nosocomial pathogens: design, synthesis, and *in vitro* effectiveness. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 2, p. 393-405, 2020.
- ANDRADE, L.F.; APOLINÁRIO, A.C.; RANGEL-YAGUI, C.O.; STEPHANO, M.A.; TAVARES, L.C. Chitosan nanoparticles for the delivery of a new compound active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101363, 2019.

ANUAR, N.; SABRI, A.H.; BUSTAMI EFFENDI, T.J.; Abdul Hamid, K. Development and characterisation of ibuprofen-loaded nanoemulsion with enhanced oral bioavailability. **Heliyon**, v.6, n.7, p. e04570, 2020.

ARAÚJO, M.O. et al. Larvicidal activity of cinnamic acid derivatives: investigating alternative products for *Aedes Aegypti* L. control. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 61, 2020b.

ARAÚJO, V.H.S. et al. Nanosystems against candidiasis: a review of studies performed over the last two decades. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 508-547, 2020a.

ARENDROP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n.3, p. S445-S451, 2017.

BALACHANDAR, K. G.; THANGAMANI, A. A few insensitive energetic nitrogen rich compounds composed of substituted azoles and 3, 5-dinitrobenzoic acid: Synthesis, characterization, physicochemical, detonation properties and pyrolytic products. **Journal of Molecular Structure**, v. 1216, p. 128249, 2020.

BARAK, D.S.; BATRA, S. Direct Access to Amides from Nitro-Compounds via Aminocarbonylation and Amidation Reactions: A Minireview. **The Chemical Record**, v. 21, n. 12, p. 4059-4087, 2021.

BECKER, J.M. et al. Pathway analysis of *Candida albicans* survival and virulence determinants in a murine infection model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 51, p. 22044-22049, 2010.

BERGOLD, A.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BHATTACHARYA, S.; ESQUIVEL, B.D.; WHITE, T. C. Overexpression or deletion of ergosterol biosynthesis genes alters doubling time, response to stress agents, and drug susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **MBio**, v. 9, n. 4, p. e01291-18, 2018.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B.C. *Candidiasis* and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BIENERT, S. et al. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D313-D319, 2017.

BOECK, P.; SÁ, M. M.; DE SOUZA, B. S.; CERCENÁ, R.; ESCALANTE, A. M.; ZACHINO, S. A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1360-1366, 2005.

BÖER, T.M. et al. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 73, p. 18-23, 2013.

BRUICE, P.Y. Substâncias Carboniladas I. Substituição nucleofílica acídica. In: BRUICE, P.Y. **Química Orgânica**. 6 ed. São Paulo: Pearson, 2006, Cap.17, p. 98.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BURNS, G.R. The reaction of labeled methanol with carbon monoxide and hydrogen¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 24, p. 6615-6616, 1955.

BUT, T.Y.S.; LU, J.; TOY, P.H. Organocatalytic Mitsunobu reactions with 3,5-dinitrobenzoic acid. **Synlett**, v. 2010, n. 07, p. 1115-1117, 2010.

CALVALCANTE, P.M.M. et al. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, n. 4, p. 319-329, 2015.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CAROLUS, H. et al. Amphotericin B and other polyenes-discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CASE, D.A. et al. AMBER 2021. University of California, San Francisco, **2021**.

CASE, D.A. et al. AMBER 2021. University of California, San Francisco, **2018**.

CAVALCANTI, I.D.L.; NOGUEIRA, M.C.B.L. Pharmaceutical nanotechnology: which products are been designed against COVID-19?. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 22, n. 9, p. 1-11, 2020.

CHAKRABORTY, S., et al. Solid-phase benzoylation of phenols and alcohols in microwave reactor: an ecofriendly protocol. **Synthetic Communications**, v. 45, n. 20, p. 2331-2343, 2015.

DAELE, R.V. et al. Antifungal drugs: what brings the future?. **Medical Mycology**, v. 57, n. Supplement_3, p. S328-S343, 2019.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DANTAS, A.G.B. et al. Development, characterization, and immunomodulatory

evaluation of carvacrol-loaded nanoemulsion. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3899, 2021.

DAVIS, K.; ROVER, M.R.; SALVACHÚA, D.; SMITH, R.G.; BECKHAM, G.T.; WEN, Z.; BROWN, R.C.; JARBOE, L.R. Promoting microbial utilization of phenolic substrates from bio-oil. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 11, p. 1531-1545, 2019.

DEGHIEDY, N.M.; ELKENAWY, N. M.; ABD EL-REHIM, H.A. Gamma radiation-assisted fabrication of bioactive-coated thyme nanoemulsion: A novel approach to improve stability, antimicrobial and antibiofilm efficacy. **Journal of Food Engineering**, v. 304, p. 110600, 2021.

DHIVYA, C.; VANDARKUZHALI, S. A.A.; RADHA, N. Antimicrobial activities of nanostructured polyanilines doped with aromatic nitro compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3785-3798, 2019.

DUBEY, A.K.; SINGLA, R.K. Perspectives on anti-*Candida* drug development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 26, p. 2375-2376, 2019.

ESCALANTE A, GATTUSO M, PÉREZ P, ZACCHINO S. Evidence of the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, p. 1720-1725, 2008.

FABIAN, L., et al. Efficient microwave-assisted esterification reaction employing methanesulfonic acid supported on alumina as catalyst. **Synthetic Communications**, v. 44, n.16, p. 2386-2392, 2014.

FELÍCIO, I.M.; de SOUZA, R.L.; MELO, C.O.; LIMA, K.Y.G.; VASCONCELOS, U.; de MOURA, R.O.; OLIVEIRA, E.E. Development and characterization of a carvacrol nanoemulsion and evaluation of its antimicrobial activity against selected food-related pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 299-306, 2021.

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

FREIRES, I. A. et al. *Coriandrum sativum* L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **PLoS One**, v. 9, n. 6, 2014.

FRIES, A. et al. A Ribonucleotide Reductase-Like Electron Transfer System in the Nitroaryl-Forming N-Oxygenase AurF. **ChemBioChem**, v. 12, n. 12, p. 1832-1835, 2011.

FROST D.J. et al. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995.

GARBE, E.; VYLKOVA, S. Role of amino acid metabolism in the virulence of human pathogenic fungi. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 6, n. 3, p. 108-119, 2019.

GARCIA, A. et al. Nanoemulsion as an effective treatment against human-pathogenic fungi. **MSphere**, v. 4, n. 6, p. e00729-19, 2019.

GARCIA, T.; ARRIETA, A.; PALOMO, C. Reagents and synthetic methods 15. Phenyl dichlorophos-phate-dimethylfuramide complex. A modified one-pot procedure for esterification of carboxylic acids. **Synthetic Communications**, v. 12, n.9, p. 681-690, 1982.

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.

GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ, B. et al. Biologically active compounds of plants: Structure-related antioxidant, microbiological and cytotoxic activity of selected carboxylic acids. **Materials**, v. 13, n. 19, p. 4454, 2020.

GUTERRES, H.; IM, W. Improving protein-ligand docking results with high-throughput molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 4, p. 2189-2198, 2020.

HANDIQUE, J. G. et al. Synthesis and Electrochemical Behavior of Some Dendritic Polyphenols as Antioxidants. **Letters in Organic Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 53-59, 2013.

HASSAN, H.H.A.M, et al. Synthesis and biological evaluation of new nanosized aromatic polyamides containing amido-and sulfonamidopyrimidines pendant structures. **Chemistry Central Journal**, v.9, n. 44, p. 1-23, 2015.

HAUWENHUYSE, F. V.; FIORI, A.; VAN DIJCK, P. Ascorbic acid inhibition of *Candida albicans* Hsp90-mediated morphogenesis occurs via the transcriptional regulator Upc2. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 10, p. 1278-1289, 2014.

HAWKINS, P.C.D et al. Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 4, p. 572-584, 2010.

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>

HERRERA-RODRÍGUEZ, S.E. et al. Mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type on the antifungal activity of *Candida albicans*. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 441-448, 2019.

HILL, J. A.; O'MEARA, T.R.; COWEN, L. E. Fitness trade-offs associated with the evolution of resistance to antifungal drug combinations. **Cell Reports**, v. 10, n. 5, p. 809-819, 2015.

HOLLINGSWORTH, C.A.; SEYBOLD, P.G.; HADAD, C.M. Substituent effects on the electronic structure and pKa of benzoic acid. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 90, n. 4-5, p. 1396-1403, 2002.

HÜTTEL, W. Echinocandins: structural diversity, biosynthesis, and development of antimycotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 1, p. 55-66, 2021.

JAYATILAKE, J.A.M.S. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 4, p. 235-250, 2011.

JI, X.Y., et al. Synthesis and antiviral activity of N-phenylbenzamide derivatives, a novel class of enterovirus 71 inhibitors. **Molecules**, v.18, n.3, p. 3630-3640, 2013.

JO, S. et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859-1865, 2008.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

KALAYCI, M. et al. Novel benzoic acid derivatives: Synthesis and biological evaluation as multitarget acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. **Archiv der Pharmazie**, v. 354, n. 3, p. 2000282, 2021.

KARABACAK, M. et al. The spectroscopic (FT-Raman, FT-IR, UV and NMR), molecular electrostatic potential, polarizability and hyperpolarizability, NBO and HOMO–LUMO analysis of monomeric and dimeric structures of 4-chloro-3, 5-dinitrobenzoic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 93, p. 33-46, 2012.

KEISER, M.J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 197-206, 2007.

KHANI, S. et al. Use of artificial neural networks for analysis of the factors affecting particle size in mebudipine nanoemulsion. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 12, p. 3162-3167, 2019.

KLANG, V. et al. Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 153-161, 2010.

KOTTA, S. et al. Coconut oil-based resveratrol nanoemulsion: Optimization using response surface methodology, stability assessment and pharmacokinetic evaluation. **Food chemistry**, v. 357, p. 129721, 2021.

KUMAR, N.; VERMA, A.; MANDAL, A. Formation, characteristics and oil industry applications of nanoemulsions: A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 206, p. 109042, 2021.

LANDA, P. et al. *In vitro* anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 1, p. 75-78, 2009.

LASKOWSKI, R.A.; SWINDELLS, M.B. LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. 2011.

LEE, J. et al. CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 1, p. 405-413, 2016.

LEE, Y. et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LEGOUIN, B. et al. Molecular Tweezers: Synthesis and Formation of Host–Guest Complexes. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 28, p. 5503-5508, 2010.

LI, W. et al. Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085-608, 2012.

LI, X.; DU, C.; ZHAO, H. Determination and modeling of binary and ternary solid-liquid phase equilibrium for the systems formed by 3, 5-dinitrobenzoic acid, m-nitrobenzoic acid and acetone. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 105, p. 21-29, 2017.

LI, Z. et al. Synthesis and antimicrobial activity of the hybrid molecules between amoxicillin and derivatives of benzoic acid. **Drug Development Research**, v. 82, n. 2, p. 198-206, 2021.

LIMA, I. O. et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **Journal of essential oil research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.

LIMA, T. C. et al. Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. **Natural Product Research**, v. 32, n. 5, p. 572-575, 2018a.

Lima, T.C. et al. Antimicrobial Activity of Cinnamic and Benzoic Methyl Esters. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 37, p. 1011-1016, 2018b.

LIU, K.; KOKUBO, H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations: a cross-docking study. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 10, p. 2514-2522, 2017.

LOPES, S.P. et al. Alkyl and aryl derivatives based on P-coumaric acid modification and inhibitory action against *Leishmania braziliensis* and *Plasmodium falciparum*. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3178, 2020.

LOPES, S.P. et al. 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.

MALONE, G. B.; REID, E. Emmet. the regularities in the melting points of some crystalline derivatives of various aliphatic ALCOHOLS¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 51, n. 11, p. 3424-3427, 1929.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1797-1819, 2020.

MCCARTHY, M.W.; WALSH, T.J. Amino acid metabolism and transport mechanisms as potential antifungal targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 909, 2018.

MCCLEMENTS, D.J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011.

MILLER, B.R. et al. 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.

MOHAMMADPOOR, I.B.; MEMARIAN, H.R.; BAHRAMI, K. Efficient and convenient deprotection of thiocarbonyl to carbonyl compounds using 3-carboxypyridinium and 2, 2'-bipyridinium chlorochromates in solution, dry media, and under microwave irradiation. **Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly**, v.135, n.4, p. 411-418, 2004.

MOHD NARAWI, M. et al. Biocompatible nutmeg oil-loaded nanoemulsion as phyto-repellent. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 214, 2020.

MONROY-PÉREZ, E. et al. Marked virulence and azole resistance in *Candida albicans* isolated from patients with periodontal disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104436, 2020.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.

MORAIS, M.C. et al. Cytotoxic and Antifungal Amides Derived from Ferulic Acid: Molecular Docking and Mechanism of Action. **BioMed Research International**, v.

2021, 2021.

MOU, F., et al. Reusable ionic liquid-catalyzed oxidative esterification of carboxylic acids with benzylic hydrocarbons via benzylic Csp³-H bond activation under metal-free conditions. **Royal Society of Chemistry Advances**, v.7, n.37, p. 23041-23045, 2017.

MOZINGO, R.; FOLKERS, K. Hydrogenolysis of aromatic esters to alcohols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, n.1, p. 229-231, 1948.

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

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

NAKAYAMA, H. et al. Growth defects resulting from inhibiting ERG20 and RAM2 in *Candida glabrata*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 317, n. 1, p. 27-33, 2011.

NASCIMENTO, L. G. **Preparação de ésteres nitrocinâmicos e avaliação da sua atividade antimicrobiana**. 2017.115p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

NEMECEK, J. et al. Structure-activity relationship studies on 3, 5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 419-432, 2017.

NEPPELENBROEK, K. H. et al. 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.

NEVES, W. W. et al. Incorporation of 2-amino-thiophene derivative in nanoparticles: enhancement of antifungal activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 647-655, 2020.

NIRMALA, M. J. et al. Preparation of celery essential oil-based nanoemulsion by ultrasonication and evaluation of its potential anticancer and antibacterial activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 7651, 2020.

NISHIMOTO, A.T.; SHARMA, C.; ROGERS, P. D. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 2, p. 257-270, 2020.

NORMAN, A.B.; WILSON; READ, J. Optically active diphenylhydroxyethylamines and isohydrobenzoins. VI. The di-o-methoxyphenylhydroxyethylamines and related substances. **Journal of the Chemical Society**, p. 1120-1123, 1935.

O'MEARA, T.R.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. The Hsp90 chaperone network modulates *Candida* virulence traits. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 809-819, 2017.

OELSCHLAGER, H.; FRITSCH, H. Identification of mono-valent alcohols with 3, 5-dinitrobenzoic anhydride. **ARCHIV DER PHARMAZIE**, v. 318, n.8, p. 759-763, 1985.

OLEA, A. F. et al. Antifungal activity of eugenol derivatives against *Botrytis Cinerea*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1239, 2019.

OLIVEIRA, A.J.M.S. et al. Amides derived from Vanillic acid: coupling reactions, antimicrobial evaluation, and molecular docking. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

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

OLIVEIRA, E.E.; BARENDJI, M.; VAUTHIER, C. Understanding Nanomedicine Size and Biological Response Dependency: What Is the Relevance of Previous Relationships Established on Only Batch-Mode DLS-Measured Sizes?. **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 8, p. 1-16, 2020.

OLMO, A.D.; CALZADA, J.; NUÑEZ, M.. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 3084-3103, 2017.

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

PÁEZ-HERNÁNDEZ, G.; MONDRAGÓN-CORTEZ, P.; ESPINOSA-ANDREWS, H. Developing curcumin nanoemulsions by high-intensity methods: Impact of ultrasonication and microfluidization parameters. **Lwt**, v. 111, p. 291-300, 2019.

PANDEY, P. et al. Nanoemulsion: a novel drug delivery approach for enhancement of bioavailability. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 14, n. 4, p. 276-293, 2020.

PARRY, R.; NISHINO S.; SPAIN J. Naturally-occurring nitro compounds. **Natural Product Reports**. v. 28. p. 152–167, 2011.

PASRIJA, R. et al. Squalene epoxidase encoded by ERG1 affects morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 905-913, 2005.

PATTABIRAMAN, V. R.; BODE, J. W. Rethinking amide bond synthesis. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 471-479, 2011.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020,

2009.

PEIXOTO, L.R. et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of oral biology**, v. 73, p. 179-185, 2017.

PENSADO, A.; FERNANDEZ-PIÑEIRO, I.; SEIJO, B.; SANCHEZ, A. Anionic nanoparticles based on Span 80 as low-cost, simple and efficient non-viral gene-transfection systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 476, n. 1-2, p. 23-30, 2014.

PEREIRA, R. et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PÉREZ, A. et al. Synthesis and characterization of processable fluorinated aromatic poly(benzamide imide)s derived from cycloalkane substituted diamines, and their application in a computationally driven synthesis methodology. **Polymer**, v. 162, p. 121-129, 2019.

PEREZ-CASTILLO, Y. et al. Antifungal activity of *N*-(4-Halobenzyl) amides against *Candida* spp. and Molecular Modeling Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 419, 2021.

PEREZ-CASTILLO, Y. et al. Bioactivity and molecular docking studies of derivatives from cinnamic and benzoic acids. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 441-457, 2011.

PERLIN, D.S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. 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. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PHAKHODEE, W. et al. Acid anhydrides and the unexpected N, N-diethylamides derived from the reaction of carboxylic acids with Ph₃P/I₂/Et₃N. **Tetrahedron Letters**, v.57, n.3, p. 325-328, 2016.

PIERCE, C.G. et al. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 726-730, 2013.

PIRES, D.E.V; BLUNDELL, T.L.; ASCHER, D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I.D. *Candida* survival strategies. **Advances in**

Applied Microbiology, v. 91, p. 139-235, 2015.

POPIOLEK, L. et al. New 3-hydroxy-2-naphthoic hydrazide derivatives: thiosemicarbazides and 1, 2, 4-triazole-3-thiones, their synthesis and *in vitro* antimicrobial evaluation. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 13, n. 10, p. 1945-1951, 2016.

POSTA, M.; SOÓS, V.; BEIER, P. Design of photoaffinity labeling probes derived from 3, 4, 5-trimethylfuran-2 (5H)-one for mode of action elucidation. **Tetrahedron**, v.72, p. 3809-3817, 2016.

POTADAR, S.M., et al. Repurposing n-butyl stannous acid as highly efficient catalyst for direct amidation of carboxylic acids with amines. **Tetrahedron Letters**, v.59, n. 52, p. 4582-4586, 2018.

PUEL, A. Human inborn errors of immunity underlying superficial or invasive candidiasis. **Human Genetics**, v. 139, n. 6, p. 1011-1022, 2020.

RAGHUNANAN, L.; NARINE, S.S. Influence of structure on chemical and thermal stability of aliphatic diesters. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 47, p. 14754-14762, 2013.

REZENDE, D.V.A. et al. Preparação e caracterização de ésteres e amidas aromáticas seguindo alguns dos princípios da Química Verde. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 22, n. 1, p. 55-66, 2021.

RIBEIRO, R.F. et al. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 875-884. 2016.

RODRIGUES, M. L. The multifunctional fungal ergosterol. **MBio**, v. 9, n. 5, p. e01755-18, 2018.

RUTHERFORD, J.C. et al. Nutrient and stress sensing in pathogenic yeasts. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 442, 2019.

RYU, V. et al. Impact of ripening inhibitors on molecular transport of antimicrobial components from essential oil nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 556, p. 568-576, 2019.

SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 221-226, 2015.

SANDERSON, J. T. Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 7182–7193, 2013.

SARDI, J. C. O. et al. *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.

SASTHAV, J.R; HARRIS, F.W. Internal plasticization of polyimides with alkyl 3,5-diaminobenzoate compounds. **Polymer**, v.36, n.26, p. 4911-4917, 1995.

SATHE, P. A. et al. Tandem synthesis of aromatic amides from styrenes in water. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 29, p. 2820-2823, 2018.

SHAH, P.; WU, W.S.; CHEN, C.S. Systematical Analysis of the Protein Targets of Lactoferricin B and Histatin-5 Using Yeast Proteome Microarrays. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4218, 2019.

SHAKER, D.S. et al. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, p. 17, 2019.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

SILVA, A.; JUNIOR, J. M.; BATALINI, C. Síntese e caracterização de derivados da L-fenilalanina e L-tirosina alinhada à “Química Verde” e avaliação da toxicidade. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 1614-1631, 2021.

SILVA, I.F.J. et al. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 422-428, 2010.

SILVA, R.H.N.; SILVA, D.F.; da NÓBREGA, F.R.; OLIVEIRA, A.J.M.S.; LIMA, E.O.; de SOUSA, D.P. Biphenyl-4-Carboxylic Acid Derived Esters with Antifungal Activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.9, 89-94, 2017.

SKORONSKI, E. et al. Estudo cinético da obtenção de ésteres utilizando enzima lipozyme TL IM como catalisador. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 897-902, 2010.

SKRZYPEK, M.S. et al. The *Candida* Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. **Nucleic Acids Research**, p. gkw924, 2017.

SOLOMONS, G.; FRYLE, G.B.; SNYDER, S.A. Ácidos Carboxílicos e seus Derivados. Adição-Eliminação Nucleofílica do Carbono Acílico. In: SOLOMONS, G.; FRYLE, G.B.; SNYDER, S.A. **Química Orgânica**. 12 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018, Cap. 17, 190-218.

SPIVAK, E.S.; HANSON, K.E. *Candida auris*: an emerging fungal pathogen. **Journal**

of clinical microbiology, v. 56, n. 2, p. e01588-17, 2018.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; RAMASUBRAMANIAN, A.K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 65-71, 2014.

STANISZEWSKA, M. et al. Antifungal effect of novel 2-bromo-2-chloro-2-(4-chlorophenylsulfonyl)-1-phenylethanone against *Candida* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1309, 2016.

SUN, L.; LIAO, K. The effect of honokiol on ergosterol biosynthesis and vacuole function in *Candida albicans*. 2020. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30, 1835-1842, 2020.

SUN, Sheng; HOY, M.J.; HEITMAN, J. Fungal pathogens. **Current Biology**, v. 30, n. 19, p. R1163-R1169, 2020.

TSUDA, Y.; KOJIMA, M.; OH, J. M. Soluble polyimides based on diaminobenzoic acid alkylester. **Polymer Journal**, v. 38, n.10, p. 1043-1054, 2006.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, 2016.

TURKEZ, H. et al. NFBTA: a potent cytotoxic agent against glioblastoma. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2411, 2019.

UNO, J.; SHIGEMATSU, M.L.; ARAI, T. Primary site of action of ketoconazole on *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, n. 6, p. 912-918, 1982.

VOLKOVA, M. et al. Cation Transporters of *Candida albicans*—New Targets to Fight Candidiasis?. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 584, 2021.

WANG, H., et al. Design, synthesis and antimycobacterial activity of novel nitrobenzamide derivatives. **Chinese Chemical Letters**, v.30, n. 2, p. 413-416, 2019.

WANGNGAE, S. et al. Significance of reagent addition sequence in the amidation of carboxylic acids mediated by PPh₃ and I₂. **RSC Advances**, v. 5, n. 33, p. 25789-25793, 2015.

WHITESELL, L. et al. Structural basis for species-selective targeting of Hsp90 in a pathogenic fungus. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2019.

WILSON, R. J. et al. Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, v.64, p.85-97, 2021.

WINN, M. et al. Harnessing and engineering amide bond forming ligases for the synthesis of amides. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 55, p. 77-85, 2020.

WU, E.L. et al. CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v.35, n.27, p.1997- 2004, 2014.

WU, W.H. et al. New insights into the mechanisms of ultrasonic emulsification in the oil–water system and the role of gas bubbles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 73, p. 105501, 2021.

YE, Y. et al. Two new benzoic acid derivatives from endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2020.

YOSHINO, T.; IMORI, S.; TOGO, H. Efficient esterification of carboxylic acids and phosphonic acids with trialkyl orthoacetate in ionic liquid. **Tetrahedron**, v. 62, n. 6, p. 1309-1317, 2006.

ANEXOS

Anexo 1- Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CEP/CCS)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - CCS/UFPB													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP													
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: ABORDAGEM QUÍMICA E TECNOLÓGICA NO DESENVOLVIMENTO DE UM CREME VAGINAL ANTIFÚNGICO À BASE DE UM DERIVADO BENZÍLICO Pesquisador: ALLANA BRUNNA SUCUPIRA DUARTE Área Temática: Versão: 2 CAAE: 51751621.5.0000.5188 Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde Patrocinador Principal: Financiamento Próprio													
DADOS DA NOTIFICAÇÃO Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final Detalhe: Justificativa: Segue em anexo o relatório final. Data do Envio: 11/04/2022 Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido													
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 5.821.002 Apresentação da Notificação: A presente Notificação prende-se ao fato da requerente ALLANA BRUNNA SUCUPIRA DUARTE, pesquisadora responsável, ter concluído a pesquisa intitulada "ABORDAGEM QUÍMICA E TECNOLÓGICA NO DESENVOLVIMENTO DE UM CREME VAGINAL ANTIFÚNGICO À BASE DE UM DERIVADO BENZÍLICO". Objetivo da Notificação: A presente Notificação tem como objetivo comunicar a conclusão do estudo e solicitar a Certidão Definitiva. Avaliação dos Riscos e Benefícios: O presente estudo cumpriu o que determina a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, no que diz respeito aos riscos e benefícios proporcionados aos sujeitos participantes do mesmo.													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar</td> <td>CEP: 58.051-900</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Bairro: Cidade Universitária</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: PB</td> <td colspan="2">Município: JOAO PESSOA</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (83)3216-7791</td> <td>Fax: (83)3216-7791</td> <td>E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br</td> </tr> </table>		Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar		CEP: 58.051-900	Bairro: Cidade Universitária			UF: PB	Município: JOAO PESSOA		Telefone: (83)3216-7791	Fax: (83)3216-7791	E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br
Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar		CEP: 58.051-900											
Bairro: Cidade Universitária													
UF: PB	Município: JOAO PESSOA												
Telefone: (83)3216-7791	Fax: (83)3216-7791	E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br											

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 5.821.002

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A presente notificação foi instruída levando-se em consideração ao disciplinado na Resolução 466/12 e na Norma Operacional 001/13, ambas do Conselho Nacional de Saúde e demais legislação pertinente a matéria, em vigor.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de Apresentação Obrigatória foram anexados tempestivamente.

Recomendações:

Sem recomendações a fazer.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista o cumprimento de todas as formalidades éticas e legais, somos de parecer favorável a aprovação da presente Notificação, assim como a emissão da Certidão Definitiva, como requerida.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatoriofinal.pdf	11/04/2022 21:28:51	ALLANA BRUNNA SUCUPIRA DUARTE	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 16 de Dezembro de 2022

Assinado por:

**Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))**

Endereço: Prédio da Reitoria da UFPB, 1º Andar
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedetica@ccs.ufpb.br