



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES: LARVICIDA, ANTIMICROBIANA,  
ECOTOXICOLÓGICA E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO ÁCIDO  
CINÂMICO**

SARALINY BEZERRA FRANÇA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 – Maceió - AL

SARALINY BEZERRA FRANÇA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES: LARVICIDA, ANTIMICROBIANA,  
ECOTOXICOLÓGICA E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO ÁCIDO  
CINÂMICO**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima

Coorientador: Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva-Júnior

**Maceió-AL**

**2024**

**Catálogo na Fonte Universidade  
Federal de Alagoas Biblioteca  
Central**

**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

F837s França, Saraliny Bezerra.  
Síntese e avaliação das atividades : larvicida, antimicrobiana,  
ecotoxicológica e leishmanicida de derivados do ácido cinâmico / Saraliny  
Bezerra França. – 2024.  
[195] f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Dimas José da Paz Lima.

Co-orientador: Edeildo Ferreira da Silva-Júnior.

Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto  
de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação de Química e  
Biotecnologia. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 144-154.

Anexos: f. [157]-[195].

1. Síntese orgânica. 2. Avaliação biológica. 3. Ácido cinâmico. 4. Estudo *in  
sílico*. 5. Ecotoxicidade. I. Título.

CDU: 661.16.034.7:547.586.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: [ppqqb@iqb.ufal.br](mailto:ppqqb@iqb.ufal.br)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Saraliny Bezerra França** intitulada: **Síntese e avaliação das atividades: larvicida, antimicrobiana, ecotoxicológica e leishmanicida de derivados do ácido cinâmico**, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 05 de fevereiro de 2024, às 9h, na sala de reuniões do IQB.

Maceió, 05 de fevereiro de 2024.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **DIMAS JOSE DA PAZ LIMA**  
Data: 06/02/2024 18:39:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>  
Prof. Dr. Dimas José Paz Lima - Orientador  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
 **JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER**  
Data: 15/02/2024 14:58:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>  
Profa. Dra. Jadriane de Almeida Xavier  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
 **DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO**  
Data: 07/02/2024 09:59:12-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>  
Profa. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro  
(DQF/UFPE)

Documento assinado digitalmente  
 **EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR**  
Data: 20/02/2024 15:59:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>  
Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior -Coorientador  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
 **RUTH RUFINO DO NASCIMENTO**  
Data: 15/02/2024 14:28:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>  
Prof. Dra. Ruth Rufino do Nascimento  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
 **SILVIA HELENA CARDOSO**  
Data: 20/02/2024 14:39:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>  
Sílvia Helena Cardoso  
(NCEX /UFAL)

## **Dedicatória**

Dedico a realização deste trabalho inicialmente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por sempre iluminarem a minha vida;

A professora Lúcia Maria Conserva, pela dedicação e paciência em passar seus conhecimentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e sucessos conquistados.

Aos meus pais, Edinuzia e Jonas, pela compreensão, amor, participação e carinho fornecidos durante esta caminhada, e pela educação embasada no respeito e na valorização para com o outro. Aos meus irmãos pelo companheirismo, dedicação e estímulo.

Ao Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima pela oportunidade em trabalhar em seu grupo, por compartilhar seus conhecimentos, amizade, dedicação, confiança, orientação, e por sempre estar presente e segurar a minha mão nos momentos mais conturbados da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edeílto Ferreira da Silva-Júnior pela dedicação, paciência, orientação, e confiança em desenvolver o presente projeto.

À profa. Dra. Lúcia Maria Conserva que mesmo ausente da Ufal, deixou o seu legado e por meio dos seus ensinamentos sábios desde o período da pesquisa do mestrado, foi possível não chegar apenas no desenvolvimento desse trabalho, mas na minha evolução profissional, adquirida tanto pelos puxões de orelha quanto pelo carinho e atenção.

Às organizações de fomento (CNPq, CAPES e FAPEAL) pelo incentivo financeiro na execução do trabalho.

À pós-doc. Cenira Monteiro de Carvalho pela ajuda e contribuição no estudo ecotoxicológico.

Ao meu namorado e amigo Ari Guimarães, pela ajuda nos mais variados aspectos da química orgânica e analítica, principalmente com os dados estatísticos, por sua amizade, companheirismo e paciência

À Verônica Dinis pelas resenhas e por contribuir no desenvolvimento da síntese orgânica, a partir das discussões do chá da tarde.

Ao meu amigo Luís Paulo (Pato) pela dedicação, amizade, resenhas, contribuição nos mais variados aspectos relacionados à espectroscopia e à síntese orgânica, além do café das 15h para animar quando os experimentos davam errado e a única vontade era deixar tudo e ir embora com a lágrima nos olhos, mas nunca deixou isso acontecer. E diante mão, peço desculpas pelas vezes que danifiquei a bomba a vácuo, da qual já estava cansado em consertar (rsrsrsrs)

À família insetário, Adrielle, Jamilly, Cristian, Lucas, Ricardo, Paulo Ricardo e Natália por me ajudarem incondicionalmente no desenvolvimento do trabalho larvicida.

Ao meu amigo Marcone, por ajudar incondicionalmente nos mais variados aspectos da farmacologia e estudo *in Silico*.

Aos meus filhos acadêmicos, Natália, Cristian e Jamilly por sempre se dedicarem no desenvolvimento da pesquisa larvicida, sendo os meus olhos, ouvidos e braço direito em todos os aspectos da síntese orgânica e aplicação larvicida.

À Ledja Brittes pelo companheirismo, amizade, incentivo, conselhos e dedicação.

À Nilda pela paciência, amizade, dedicação e companheirismo.

Aos laboratórios parceiros pela dedicação e desenvoltura no desenvolvimento do presente trabalho.

## RESUMO

O ácido cinâmico e seus derivados advindos de origem natural ou sintética possuem inúmeras aplicações biológicas, como: antineoplásica, inibitória, antimicrobiana, leishmanicida, antioxidante, larvicida entre outros. A responsável por essas ações terapêuticas é a sua estrutura cinâmica por possuir vários sítios reativos que contribuem na interação com o alvo associado. Além disso, os DAC's possuem baixa toxicidade podendo ser utilizados na área de cosméticos e alimentos. Esses compostos são bons candidatos no combate às doenças negligenciadas, pois atuam em diferentes vias mecanísticas. Ademais, podem agir frente a artrópodes do Gênero *Aedes* e em microrganismos patogênicos multirresistentes, tornando-se uma estratégia para o controle desses organismos alvos. Assim, devido às diversas atividades biológicas e por serem oriundos de fontes naturais, o ácido cinâmico e seus derivados têm sido utilizados como modelo para a síntese de compostos com ação inseticida mais efetiva. Neste sentido, este trabalho reporta eficientes métodos de síntese dos DAC's, sejam elas: A reação de Olefinação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE), esterificação ácida, hidrólise alcalina e reação de Passerini (Multicomponente), respectivamente, obtendo compostos cinâmicos *n*-substituídos em bons rendimentos, em que seis  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas são inéditas na literatura. Os derivados cinamatos e as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas foram avaliados frente às larvas do quarto instar (L4) do *Aedes aegypti*, e aqueles que se mostraram com atividade de moderada a ativa pelo ensaio preliminar foram selecionados para a determinação da CL<sub>50</sub>. O estudo *in silico* realizado, mostrou que o *p*-clorocinamato de etila, da série dos cinamatos de etila, teve a melhor pontuação, corroborando com o seu resultado de atividade larvicida (CL<sub>50</sub> = 8,3  $\mu$ g/mL). Dessa forma, o *p*-clorocinamato de etila foi selecionado para identificar e quantificar o extrato larval por meio da análise de HPLC, bem como, uma análise morfológica da larva em estudo. A partir do estudo ecotoxicológico foi possível concluir que o *p*-clorocinamato de etila não se mostrou tóxico frente às espécies vegetais, e por meio da análise de HPLC foi observada a presença do ácido *p*-clorocinâmico, sugerindo uma metabolização enzimática. Esse estudo foi comprovado pela inibição enzimática da AChE presente no extrato larval do vetor *Aedes aegypti* dos ésteres cinâmicos *n*-substituídos que tiveram ação larvicida. Além disso, os ésteres e ácidos cinâmicos *n*-substituídos foram submetidos ao estudo antifúngico frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* se mostrando ativos com MICs entre 0,24mM a 2,26mM, com destaque o (2*E*,4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienoato de etila (0,24mM, SFD2) para a *Candida albicans* e o ácido *p*-clorocinâmico (0,27mM) frente à *Cryptococcus neoformans*. Ao passo que a maioria das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos peritoneal (CC<sub>50</sub> > 400 $\mu$ M), sendo de baixa toxicidade. Ademais, na análise em ambas as formas promastigotas e amastigotas foi verificada que a maioria apresentou atividade leishmanicida, destacando-se os compostos SFD4 (CI<sub>50</sub> > 31,83 $\mu$ M e CI<sub>50</sub> > 27,28 $\mu$ M) e SFD10 (CI<sub>50</sub> > 33,88 $\mu$ M e CI<sub>50</sub> > 38,31 $\mu$ M), respectivamente. Esses, por sua vez, apresentaram um bom índice de seletividade (IS) estando acima ao mínimo do que é permitido (IS > 10), com destaque ao composto SFD4 com IS > 14,66. Portanto, esses resultados sugerem que os DAC's são bons candidatos a inseticidas e seu andaime estrutural pode servir para o planejamento de candidatos antifúngicos e leishmanicidas.

**Palavras-chave:** Síntese orgânica, Avaliação biológica, ácido cinâmico e derivados, Estudo *in silico* e Ecotoxicidade.

## ABSTRACT

Cinnamic acid and its natural or synthetic derivatives have numerous biological applications, such as: antineoplastic, inhibitory, antimicrobial, leishmanicidal, antioxidant, larvicidal and others. Their cinnamic structure is responsible for these therapeutic actions, as it has several reactive sites that contribute to the interaction with the associated target. In addition, DACs have low toxicity and can be used in cosmetics and food. These compounds are good candidates for combating neglected diseases, as they act on different mechanistic pathways. In addition, they can act against arthropods of the *Aedes* genus and multidrug-resistant pathogenic microorganisms, making them a strategy for controlling these target organisms. Thus, due to their diverse biological activities and because they come from natural sources, cinnamic acid and its derivatives have been used as a model for the synthesis of compounds with more effective insecticidal action. In this sense, this work reports on efficient methods for synthesizing DACs: Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) olefination reaction, acid esterification, alkaline hydrolysis and Passerini (Multicomponent) reaction, respectively, obtaining *n*-substituted cinnamic compounds in good yields, in which six  $\alpha$ -acyloxycarboxyamides are new to the literature. The cinnamate derivatives and the  $\alpha$ -acyloxycarboxyamides were evaluated against the fourth instar larvae (L4) of *Aedes aegypti*, and those that showed moderate to active activity in the preliminary test were selected for LC<sub>50</sub> determination. The *in silico* study carried out showed that ethyl *p*-chlorocinnamate, from the ethyl cinnamate series, scored best, corroborating its larvicidal activity result (LC<sub>50</sub> = 8.3  $\mu$ g/mL). Thus, ethyl *p*-chlorocinnamate was selected to identify and quantify the larval extract by means of HPLC analysis, as well as a morphological analysis of the larva under study. From the ecotoxicological study, it was possible to conclude that ethyl *p*-chlorocinnamate was not toxic to the plant species, and through HPLC analysis, the presence of *p*-chlorocinnamic acid was observed, suggesting enzymatic metabolization. This study was confirmed by the enzymatic inhibition of AChE present in the larval extract of the *Aedes aegypti* vector by the *n*-substituted cinnamic esters, which had a larvicidal action. In addition, the esters and *n*-substituted cinnamic acids were subjected to an antifungal study against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, proving to be active with MIC's ranging from 0, 24mM to 2.26mM, with ethyl (2*E*,4*E*)-5-phenylpenta-2,4-dienoate (0.24mM, SFD2) standing out against *Candida albicans* and *p*-chlorocinnamic acid (0.27mM) against *Cryptococcus neoformans*. The majority of the  $\alpha$ -acyloxycarboxyamides showed low cytotoxicity in peritoneal macrophages (CC<sub>50</sub>> 400 $\mu$ M), making them of low toxicity. Furthermore, in the analysis of both promastigote and amastigote forms, it was found that the majority showed leishmanicidal activity, with the compounds SFD4 (CI<sub>50</sub>> 31.83 $\mu$ M and CI<sub>50</sub> >27.28 $\mu$ M) and SFD10 (CI<sub>50</sub>> 33.88 $\mu$ M and CI<sub>50</sub> >38.31 $\mu$ M) standing out, respectively. These, in turn, showed a good selectivity index (SI), being above the minimum allowed (SI>10), with SFD4 standing out with a SI > 14.66. Therefore, these results suggest that the DAC's are good insecticide candidates and their structural scaffold can be used to design antifungal and leishmanicidal candidates.

**Keywords:** Organic synthesis, Biological evaluation, cinnamic acid and derivatives, *In silico* study and Ecotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ácido cinâmico e seus derivados naturais. ....	24
<b>Figura 2:</b> Biossíntese do ácido chiquímico e seus derivados. ....	24
<b>Figura 3:</b> Sítios reativos da estrutura do ácido cinâmico. ....	25
<b>Figura 4:</b> Derivados do ácido cinâmico com ação inseticida oriundos de espécies vegetais. .	27
<b>Figura 5:</b> Concentração letal de 50% (CL <sub>50</sub> ) dos derivados cinamatos frente ao <i>Aedes aegypti</i> . .....	28
<b>Figura 6:</b> Concentração letal de 50% (CL <sub>50</sub> ) dos derivados do ácido cinâmico n-substituídos frente à larva do <i>Aedes aegypti</i> . <b>A.</b> Compostos aplicados ao ensaio larvicida. <b>B.</b> Representação das características presentes nos derivados cinamatos avaliados no ensaio larvicida.....	29
<b>Figura 7:</b> Atividade biológica dos derivados do ácido cinâmico frente aos vetores <i>Aedes aegypti</i> e <i>Anopheles gambiae</i> .....	29
<b>Figura 8:</b> Estrutura química dos inseticidas sintéticos utilizados no combate às larvas do <i>Aedes aegypti</i> . ....	30
<b>Figura 9:</b> Fórmula estrutural das espinosinas presentes no espinosade. ....	31
<b>Figura 10:</b> Fases do desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i> .....	33
<b>Figura 11:</b> Atividade antimicrobiana dos derivados do ácido cinâmico. ....	35
<b>Figura 12:</b> Atividade anfúngica dos ésteres cinâmicos n-substituídos.....	36
<b>Figura 13:</b> Atividade antifúngica dos derivados do ácido cinâmico. ....	37
<b>Figura 14:</b> Resultado da atividade antifúngica dos DAC's. ....	38
<b>Figura 15:</b> Antifúngicos comerciais utilizados no combate aos microrganismos. ....	39
<b>Figura 16:</b> Quimioterápicos utilizados no tratamento da Leishmaniose. ....	41
<b>Figura 17:</b> Atividade leishmanicida de derivados do ácido cinâmico.....	42
<b>Figura 18:</b> Atividade leishmanicida do ácido cinâmico e seus derivados.....	44
<b>Figura 19:</b> Derivados do ácido cinâmico com atividade leishmanicida. ....	45
<b>Figura 20:</b> Estruturas dos derivados cinamatos n-substituídos e álcool p-clorocinâmico avaliados. ....	83
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2,4-diclorocinamato de etila ( <b>SFD3</b> ). .....	87
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C – DEPTQ do 2,4-clorocinamato de etila ( <b>SFD3</b> ).....	88
<b>Figura 23:</b> Espectro de Infravermelho do álcool p-clorocinâmico ( <b>ACP</b> ). ....	89
<b>Figura 24:</b> Planejamento de larvicidas frente ao <i>Aedes aegypti</i> . ....	90
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do depsipeptídeo cinâmico n-substituído ( <b>SFD45</b> ).....	94

<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do depsipeptídeo cinâmico <i>n</i> -substituído ( <b>SFD45</b> ).....	94
<b>Figura 27:</b> Espectro do Infravermelho do híbrido cinâmico <i>n</i> -substituído. ....	96
<b>Figura 28:</b> Gráfico de Ramachandran do modelo de homologia molecular da AChE do <i>Aedes aegypti</i> . ....	106
<b>Figura 29:</b> Resultados da afinidade de interação dos cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos frente à AChE (AaAChE). ....	107
<b>Figura 30:</b> Cluster do composto <b>SF10</b> e interações inter e intramoleculares frente à AaChE. ....	108
<b>Figura 31:</b> Estimativa da constante de inibição e quantificação larvicida de ésteres cinâmicos <i>n</i> -substituídos.....	109
<b>Figura 32:</b> Resultados da quantificação proteica e atividade catalítica da AChE presente no extrato larval, ....	110
<b>Figura 33:</b> Resultados da Inibição enzimática dos ésteres cinâmico <i>p</i> -substituídos frente à AChE presente no extrato larval.....	111
<b>Figura 34:</b> Resultados do estudo cinético enzimático do cinamatos de etila ( <b>SF1</b> ) e <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ). ....	112
<b>Figura 35:</b> Cromatogramas do ácido <i>p</i> -clorocinâmico ( <b>Cin-4-Cl</b> ) e <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ) puros. ....	113
<b>Figura 36</b> Cromatogramas de CLAE -UV das amostras (Solução contendo o analito <b>SF10</b> (A) e extrato de larva (B)) após 24h de exposição.....	113
<b>Figura 37:</b> Morfologia externa das larvas expostas aos grupos tratados (Controle negativo, composto <b>SF10</b> ).....	116
<b>Figura 38:</b> Aplicação do MEV para análise morfológica das larvas expostas aos grupos tratados (Controle negativo, composto <b>SF10</b> e <b>Temefós</b> ). ....	117
<b>Figura 39:</b> Atividade antifúngica dos derivados do ácido cinâmico frente à <i>Candida albicans</i> . ....	129
<b>Figura 40:</b> Resultados da atividade antifúngica dos ácidos cinâmicos <i>n</i> -substituídos frente à <i>C. albicans</i> .....	131
<b>Figura 41:</b> Resultados da atividade antifúngica dos cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos contra à <i>C. neoformans</i> .....	132
<b>Figura 42:</b> Resultados da atividade antifúngica dos ácidos cinâmicos <i>n</i> -substituídos frente à <i>C. neoformans</i> . ....	133
<b>Figura 43:</b> Ligação do depsipeptídeo cinâmico <b>SFD4</b> na N-miristoíla transferase de <i>Leishmania</i> . ....	142

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Síntese dos cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos.....	50
<b>Esquema 2:</b> Síntese do <i>o</i> , <i>p</i> - diclorocinamato de etila ( <b>SFD3</b> ) e <i>p</i> -hidroxicinamato de etila.	57
<b>Esquema 3:</b> Síntese do álcool <i>p</i> -clorocinâmílico ( <b>ACP</b> ). .....	58
<b>Esquema 4:</b> Síntese dos ácidos cinâmicos <i>n</i> -substituídos e amido álcoois.....	59
<b>Esquema 5:</b> Preparação das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas por meio da reação de Passerini.....	62
<b>Esquema 6:</b> Síntese dos cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos a partir da reação de Olefinação de HWE. ....	84
<b>Esquema 7:</b> Síntese do 2,4-diclorocinamato de etila ( <b>SFD3</b> ) e <i>p</i> -hidroxicinamato de etila ( <b>SFD1</b> ) a partir da reação de esterificação ácida. ....	84
<b>Esquema 8:</b> Síntese do álcool <i>p</i> -clorocinâmílico a partir da reação de redução. ....	86
<b>Esquema 9:</b> Síntese dos ácidos cinâmicos <i>n</i> -substituídos ( <b>Cin (Cin, 4-OCF<sub>3</sub> e 4-Cl), sfd (6 e 9)</b> ). ....	91
<b>Esquema 10:</b> Síntese das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas a partir da Reação de Passerini. ....	92

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Propriedades farmacocinéticas dos derivados do ácido cinâmico. ....	101
<b>Gráfico 2:</b> Curvas analíticas dos derivados do ácido cinâmico.....	114
<b>Gráfico 3:</b> Análise de Viabilidade celular dos derivados cinamatos <i>n</i> -substituídos. ....	119
<b>Gráfico 4:</b> Período de ação do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ).....	120
<b>Gráfico 5:</b> Efeito da exposição do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ) no desenvolvimento da radícula e do hipocótilo da <i>Lactuca sativa</i> . ....	121
<b>Gráfico 6:</b> Resultados da exposição do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ) frente à <i>Allium cepa</i> . .....	123
<b>Gráfico 7</b> Resultados da exposição do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ) frente à <i>Solanum lycopersicum</i> .....	125
<b>Gráfico 8:</b> Resultado da correlação linear do índice de germinação do composto <b>SF10</b> , frente às hortaliças e leguminosas.....	126
<b>Gráfico 9:</b> Resultado da quantificação de toxicidade (Regressão não linear) do composto <b>SF10</b> frente ao <i>Oreochromis niloticus</i> . ....	127

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resultado da atividade antifúngica dos ácidos cinâmicos <i>n</i> -substituídos. ....	36
<b>Tabela 2:</b> Resultados da síntese dos ésteres cinâmicos <i>n</i> -substituídos. ....	85
<b>Tabela 3:</b> Dados do espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz), CDCl <sub>3</sub> ) do 2,4-diclorocinamato de etila (SFD3). ....	87
<b>Tabela 4:</b> Sinais obtidos do espectro de <sup>13</sup> C do <i>p</i> -clorocinamato de etila (SF10). ....	88
<b>Tabela 5:</b> Bandas de absorção do espectro de Infravermelho do composto ACP. ....	89
<b>Tabela 6:</b> Derivados do ácido cinâmicos obtidos por meio das reações de olefinação de HWE e hidrólise alcalina. ....	91
<b>Tabela 7:</b> Resultados da síntese das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas a partir da reação de multicomponentes (Passerini). ....	92
<b>Tabela 8:</b> Resultados obtidos do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da $\alpha$ -aciloxicarboxiamida (SFD45) 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> . ....	93
<b>Tabela 9:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C depsipeptídeo cinâmico <i>n</i> -substituído (SFD45). ....	95
<b>Tabela 10:</b> Bandas de absorção do espectro de Infravermelho do depsipeptídeo cinâmico <i>n</i> -substituído. ....	96
<b>Tabela 11:</b> Análise estatística da atividade preliminar larvicida dos cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos e álcool <i>p</i> -clorocinamílico. ....	98
<b>Tabela 12:</b> Análise larvicida de derivados cinamatos <i>n</i> -substituídos contra às larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 48h de exposição. ....	100
<b>Tabela 13:</b> Análise preliminar larvicida $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas <i>n</i> -substituídas. ....	103
<b>Tabela 14:</b> Propriedades Constitutivas das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas. ....	104
<b>Tabela 15:</b> Padrões estatísticos das curvas analíticas dos compostos SF10 e Cin-4-Cl. ....	114
<b>Tabela 16:</b> Quantificação dos compostos SF10 e Cin-4-Cl encontrados no extrato larval e na solução sobrenadante de <i>p</i> -clorocinamato de etila (SF10) após 24h de exposição. ....	115
<b>Tabela 17:</b> Resultado quantitativo de toxicidade do <i>p</i> -clorocinamato de etila (SF10). ....	122
<b>Tabela 18:</b> Análise de fitotoxicidade do <i>p</i> -clorocinamato de etila frente à <i>Lactuca sativa</i> . .	122
<b>Tabela 19:</b> Análise de fitotoxicidade do <i>p</i> -clorocinamato de etila frente à <i>Allium cepa</i> . ....	124
<b>Tabela 20:</b> Análise de fitotoxicidade do <i>p</i> -clorocinamato de etila frente à <i>Solanum lycopersicum</i> . ....	124
<b>Tabela 21:</b> Resultados da exposição do composto SF10 frente ao <i>Oreochromis niloticus</i> . ...	128
<b>Tabela 22:</b> Atividade contra formas promastigota e amastigota intracelular de <i>Leishmania amazonensis</i> e citotoxicidade após 24 horas de tratamento de $\alpha$ -acilocarboxiamidas. ....	137

**Tabela 23:** Resultados da triagem virtual de alvos biológicos presentes na *Leishmania* do composto **SFD4** a partir do Docking reverso. .... 139

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>DAC's</b> – Derivados do ácido cinâmico	<b>DDT</b> – Diclorodifeniltricloroetano
<b>HPLC</b> – High-performance liquid chromatography	<b>GTS</b> – Glutathione – S – Transferase
<b>MIC</b> – Concentração Inibitória Mínima	<b>GABA</b> – Ácidoaminobutírico
<b>IS</b> – Índice de Seletividade	<b>HWE</b> – Horner-Wadsworth- Emmons
<b>NADPH</b> – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina	<b>Hz</b> – Hertz
<b>NADP</b> – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	<b>ICH</b> – International Harmonization Conference
<b>CoA</b> – Coenzima A	<b>ICR</b> – Índice de Crescimento Radicular
<b>μ</b> – Micrômetro	<b>IG</b> – Índice de Germinação
<b>μM</b> – Micromolar	<b>Ile</b> – Isoleucina
<b>3-RMC</b> – Reação Tricomponente	<b>IRG</b> – Índice de Crescimento Relativo
<b>A549</b> – Células epiteliais das vias aéreas humanas	<b>IVTF</b> – Infravermelho com transformada de Fourier
<b>AaAChE</b> – Acetilcolinesterase do <i>Aedes aegypti</i>	<b>J</b> – Constante de acoplamento
<b>AC</b> – Ácido Cinâmico	<b>LCI</b> – Limite de Concentração Inferior
<b>AChE</b> – Acetilcolinesterase	<b>LCS</b> – Limite de Concentração Superior
<b>Ala</b> – Alanina	<b>Leu</b> – Leucina
<b>AnAChE</b> – Acetilcolinesterase do <i>Anopheles gambiae</i>	<b>LOD</b> – Limites de Detecção
<b>ANOVA</b> – Análise de Variância	<b>LOQ</b> – Limites de Quantificação
<b>Asn</b> – Asparagina	<b>LOX</b> –Lisil Oxidase
<b>Asp</b> – Aspartato	<b>LTA</b> – Leishmaniose Tergumentar Americana
<b>ATCC</b> – American Type Culture Collection	<b>m</b> – múltiplo
<b>ATR</b> – Attenuated Total Reflectance	<b>MCF – 7</b> – Células Epiteliais de Mama
<b>b</b> – Coeficiente linear	<b>MEOH</b> – Metanol
<b>Bti</b> – <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelenses</i>	<b>Met</b> – Metionina
<b>CC<sub>50</sub></b> – Concentração de Citotoxicidade de 50%	<b>MEV</b> – Microscopia Eletrônica de Varredura
	<b>MFC</b> – Concentração Fúngica Mínima
	<b>MHz</b> –Megahertz
	<b>MIC</b> – Concentração de Inibição Mínima

<b>CCDC</b> – Cambridge Structural Database	<b>nARB</b> – Número de Nigações Aromáticas
<b>CDC</b> – Centro de Prevenção e Controle de Doenças	<b>NFC – 60</b> – Células Epiteliais isoladas da leucemia mieloide
<b>CHIK</b> – Chikungunya	<b>NH<sub>4</sub>Cl</b> – Cloreto de Amônio
<b>CHIKV</b> – Vírus da Chikungunya	<b>NHC</b> – carbeno N-heterocíclico
<b>CE<sub>50</sub></b> – Concentração de Efeito máximo de 50%	<b>nROB</b> – Número de Ligações Rotativas
<b>CI<sub>50</sub></b> – Concentração de Inibição de 50% do organismo vivo	<b>OFM</b> – Oxidase de Função Mista
<b>CL<sub>50</sub></b> – Concentração Letal que mata 50% do organismo vivo	<b>OMS</b> – Organização Mundial da Saúde
<b>CLAE</b> – Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência	<b>P.A.</b> – Grau para análise
<b>ClogP</b> – Lipofilicidade	<b>PAHO</b> – Pan American Health Organization
<b>CPCD</b> – Centro de Prevenção de Controle de Doenças	<b>Phe</b> – Fenilalanina
<b>CYP53A15</b> – 4 – hidroxilase benzoato	<b>MM</b> – Massa Molecular
<b>d</b> – duplete	<b>ppm</b> – partes por milhão
<b>DAC's</b> – Derivados do Ácido Cinâmico	<b>Pro</b> – Prolina
<b>DC</b> – Dengue Clássica	<b>Py</b> – Piridina
<b>dd</b> – duplo duplete	<b>q</b> – quarteto
<b>DDT</b> – Difenil Tricloroetano	<b>r</b> – Coeficiente de Correlação
<b>DENV1</b> – Vírus dengue 1	<b>r<sup>2</sup></b> – Coeficiente de Determinação
<b>DENV2</b> – Vírus dengue 2	<b>RCIs</b> – Reguladores do Crescimento de Insetos
<b>DENV3</b> – Vírus dengue 3	<b>RMCI</b> – Reações Multicomponentes de isonitrilas
<b>DENV4</b> – Vírus dengue 4	<b>RMCs</b> – Reações de Multicomponentes
<b>DEPTQ</b> – Experimento de RMN <sup>13</sup> C de Distorção aumentada por transferência de polarização para carbonos primários, secundários, terciários e não hydrogenados.	<b>RMN <sup>13</sup>C</b> – Ressonância Magnética de Carbono 13
<b>DES</b> – Solvente Eutético Profundo	<b>RMN <sup>1</sup>H</b> – Ressonância Magnética de Hidrogênio
<b>GOLD</b> – Genetic Optimisation for Ligand Docking	<b>s</b> – simpleto
	<b>His</b> – Histidina
	<b>S. aureus</b> – <i>Staphylococcus aureus</i>
	<b>SE</b> – Semana Epidemiológica
	<b>Ser</b> – Serina

**DMAP** – Dimetil aminopiridina

**DMEM** – Dulbecco modification of Minimum Essential Media

**DMF** – Dimetilformamida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DTNs** – Doenças Tropicais Negligenciadas

***E. faecium*** – *Enterococcus faecium*

**EPA** – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

**ERV** – Enterococos Resistentes à Vancomicina

**ESKAPE** – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*

**EtO<sub>2</sub>** – Éter etílico

**EtOAc** – Acetato de etila

**EUA** – Estados Unidos da América

**FHD** – Febre Hemorrágica do Dengue

**FTIR** – Infravermelho com Transformada de Fourier

**GABA** – Ácidoaminobutírico

**Gln** – Glutamina

**Gly** – Glicina

**GRE's** – Grupos Eletroretiradores

**GST** – Glutathione S-transferase

**HBA** – Número de Aceitadores de Ligação de Hidrogênio

**HBD** – Número de Doadores de Ligação de Hidrogênio

**HCH** – Hexaclorociclohexano

**HepG-2** – Células Epiteliais isoladas do carcinoma hepatocelular

**SGB** – Síndrome de Guillan – Barré

**t** – tripleto

**TBAB** – Brometo de Tetrabutilamônio

**td** – triplo dubleto

**TFE/EtOH** – Trifluoroetano/etanol

**TCR** – Taxa de Crescimento Radial

**THF** – Tetrahydrofurano

**Thr** – Treonina

**TMS** – Tetrametilsilano

**Trp** – Triptofano

**Tyr** – Tirosina

**Val** – Valina

**vas** – banda de estiramento assimétrico

**vs** – banda de estiramento simétrico

**WHO** – World Health Organization

**Wi-38** – Fibroblastos Humanos Normais

**X<sup>2</sup>** – Grau de Validação

**ZIKV** – Vírus Zika

**$\alpha$**  – Coeficiente Angular

**$\delta$**  – banda de deformação

**$\delta$**  – deslocamento químico

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
<b>2.1. Aplicações dos derivados do ácido cinâmico</b> .....	24
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	47
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	47
<b>5. EXPERIMENTAL</b> .....	49
<b>5.1. Reagentes, Solventes e Condições</b> .....	49
<b>5.2. Métodos Cromatográficos</b> .....	49
<b>5.3. Métodos Espectroscópicos</b> .....	50
<b>5.4 Sínteses</b> .....	50
<b>5.5. Ensaio Larvicidas</b> .....	68
5.5.1. Criação e manutenção do <i>Aedes aegypti</i> .....	68
5.5.2. Ensaio para avaliação da atividade larvicida .....	68
5.5.3. Ensaio de Inibição enzimática frente à AChE presente no extrato larval .....	69
5.5.3.1. Preparo do Extrato Larval .....	69
5.5.3.2. Atividade de quantificação Proteica .....	69
5.5.3.3. Atividade Catalítica da AChE presente no extrato larval. ....	69
5.5.3.4. Ensaio de inibição enzimática dos cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos frente à AChE presente no extrato larval. ....	70
5.5.4. Estudo cinético de ação larvicida do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ). ....	70
5.5.5. Análise morfológica .....	70
5.5.5.1. Avaliação morfológica a partir da Microscopia Óptica. ....	70
5.5.5.2. Aplicação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na análise larval .....	71
5.5.6. Análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	71
<b>5.6. Estudos <i>In silico</i></b> .....	72
5.6.1. Homologia e docking molecular .....	72
5.6.2. Avaliação da interação do cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos frente à AChE a partir do docking covalente. ....	74
5.6.4. Estudo farmacocinético de derivados do ácido cinâmico. ....	75
<b>5.7. Análise Citotóxica e Ecotoxicológica dos Derivados Cinamatos com Propriedades Larvicidas</b> .....	75
5.7.1. Estudo da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT .....	76
5.7.2. <i>Lactuca sativa</i> L. var. betania .....	76

5.7.3. <i>Solanum lycopersicum</i> variedade cerasiforme.....	77
5.7.4. <i>Allium cepa</i> .....	77
<b>5.8. Análise Estatística</b> .....	<b>78</b>
5.9. Análise da Atividade antifúngica dos Derivados do ácido cinâmico. ....	78
5.10. Estudo da atividade Leishmanicida das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas frente à <i>Leishmania amazonensis</i> . ....	79
5.10.1. Criação do camundongo e parasitas.....	79
5.10.3. Ensaio de citotoxicidade. ....	81
6.2. Síntese e caracterização dos derivados cinamatos <i>n</i> -substituídos e álcool <i>p</i> -clorocinâmico. ....	83
6.4. Síntese e Caracterização dos ácidos cinâmicos <i>n</i> -substituídos e das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas <i>n</i> -substituídas. ....	89
6.5. Elucidação estrutural dos ácidos e depsipeptídeos cinâmicos <i>n</i> -substituídos.....	93
6.6. Atividade Larvicida dos Derivados do ácido cinâmico. ....	97
6.6.1. Atividade Larvicida dos derivados cinamatos <i>n</i> -substituídos e depsipeptídeos cinâmicos <i>n</i> -substituídos.....	97
6.7. Homologia e docking covalente dos derivados cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos. ....	105
6.8. Análise de inibição enzimática <i>in vitro</i> dos ésteres cinâmicos <i>n</i> -substituídos frente à AChE presente no extrato larval. ....	109
6.9. Determinação do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ) em amostras de testes larvicida em CLAE-UV. ....	112
6.10. Análise morfológica.....	115
6.11. Análise da Viabilidade celular dos derivados cinamatos de etila <i>n</i> -substituídos ( <b>SF1,SF3, SF10, SFD2 e SFD3</b> ) que mais se destacaram na atividade larvicida incluindo o composto padrão ( <b>SF1</b> ). ....	118
3.11. O tempo de ação larvicida do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ) no ambiente.....	120
6.12. Estudo de ecotoxicidade do <i>p</i> -clorocinamato de etila ( <b>SF10</b> ) frente às hortaliças e leguminosas .....	120
6.12.1. <i>Lactuca sativa</i> L. Var. Betania .....	120
6.12.2. <i>Allium cepa</i> L. E <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	123
6.12.3. Análise comparativa do Índice de germinação da <i>Lactuca sativa</i> , <i>Solanum lycopersium</i> e <i>Allium cepa</i> . ....	125
6.12.4. Análise da exposição do <i>p</i> -clorocinamato de etil ( <b>SF10</b> ) frente o <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia do Nilo). ....	127

6.13. Atividade Antifúngica dos Derivados do ácido cinâmico. ....	128
6.14. Avaliação da atividade Leishmanicida das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas derivadas do ácido cinâmico.....	134
6.14.1. Análise <i>in vitro</i> dos depsipeptídeos cinâmicos <i>n</i> -substituídos frente à <i>Leishmania amazonensis</i> . ....	134
6.14.2. Estudo de interação do composto <b>SFD4</b> a partir do docking reverso frente a receptores presentes na <i>Leishmania</i> .....	138
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	143
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	145
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	146
<b>10. ARTIGOS</b> .....	157
<b>10.1. Publicados</b> .....	157
<b>ANEXO: Espectros, Cromatogramas de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, IV-TF, CLAE-UV e MS dos Compostos Sintetizados e dados do estudo in silico</b> .....	159

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas têm origem na ação de agentes patogênicos, como vírus, fungos e protozoários. A resistência desses agentes aos antibióticos pode ser influenciada tanto por mudanças climáticas quanto pelo uso indiscriminado desses terapêuticos, contribuindo para o aumento no número de casos (Oliveira *et al.*, 2006; Paes-Gonçalves *et al.*, 2012). Além disso, é importante mencionar os potenciais efeitos adversos, exemplificados no caso da anfotericina B e dos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento antifúngico ou das diversas formas da Leishmaniose (Soares-Bezerra, Leon e Genestra, 2004). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço das causas de mortalidade global está associado a doenças infecciosas, classificando-as como um dos principais problemas de saúde pública (Ferreira-Júnior, 2015).

Além do mais, o vetor *Aedes aegypti* classificado como praga devido à sua capacidade de disseminar agentes patogênicos, desempenha um papel significativo nesse contexto, configurando-se um grande desafio para a saúde pública, já que vem apresentando resistência aos inseticidas, como temefós e piriproxifeno, os quais apresentam efeitos toxicológicos e carcinogênicos (Catão, 2011; França, 2019; Gubler, 2004).

Dessa forma, a busca por novos fármacos e larvicidas mais eficazes e de menor toxicidade é imprescindível. Os derivados do ácido cinâmico têm sido mencionados na literatura como promissores candidatos terapêuticos e larvicidas, demonstrando eficácia contra várias cepas patogênicas dos gêneros *Candida* e *Leishmania*, bem como contra pragas como o *Aedes aegypti*, respectivamente (Bezerra França *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2019; Zanetti *et al.*, 2021). A multifuncionalidade desses compostos estar associada à sua estrutura versátil, o que implica em interações com potenciais alvos macromoleculares presentes em vários patógenos. Além disso, essa classe de compostos possui baixa toxicidade e citotoxicidade (De *et al.*, 2011; Sharma, 2011).

Diante disso, o presente trabalho realizou o planejamento e avaliação biológica de derivados do ácido cinâmico sendo dividido em três partes. A primeira parte está voltada à síntese e estudo larvicida de cinamatos de etila *n*-substituídos (**SF1 – SF13**, **SFD1-SFD3** e **SFDD**), álcool *p*-clorocinâmico (**ACP**) e  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas (**SFD4-SFD10** e **SFD45**) frente ao *Aedes aegypti*.

Neste tópico uma investigação do mecanismo de ação foi conduzida para os compostos ativos por meio de abordagens *in silico* e *in vitro*, tendo como alvo a acetilcolinesterase (AChE), uma vez que essa enzima é alvo pontencial presente nas larvas do vetor. Além disso, foi

realizada uma avaliação de citotoxicidade para os cinco cinamatos de etila *n*-substituídos que tiveram ação larvicida, bem como o estudo de ecotoxicidade em espécies vegetais e mamíferos para o composto que se destacou na atividade larvicida (composto **SF10**).

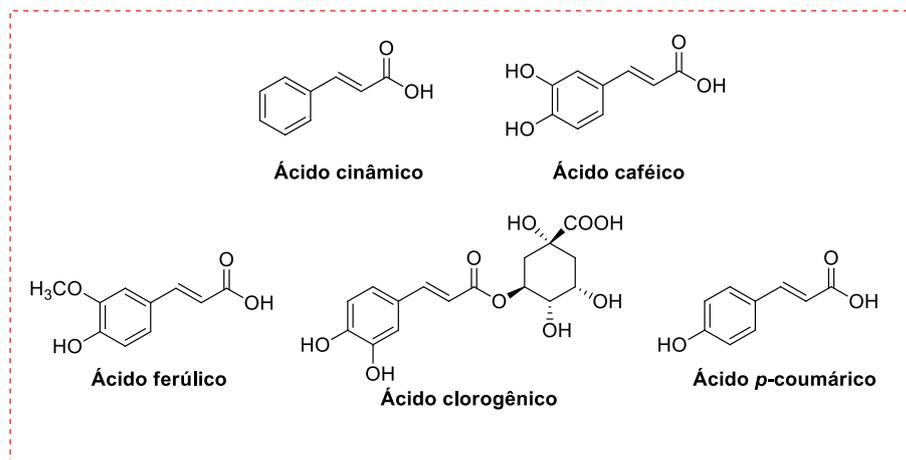
A segunda parte, explorou a atividade antifúngica de cinamatos de etila e ácido cinâmicos *n*-substituídos, respectivamente, frente às *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Por fim, na terceira parte, foi abordada a atividade Leishmanicida das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas contra as formas promastigota e amastigota da *Leishmania amazonensis*.

## 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aplicações dos derivados do ácido cinâmico

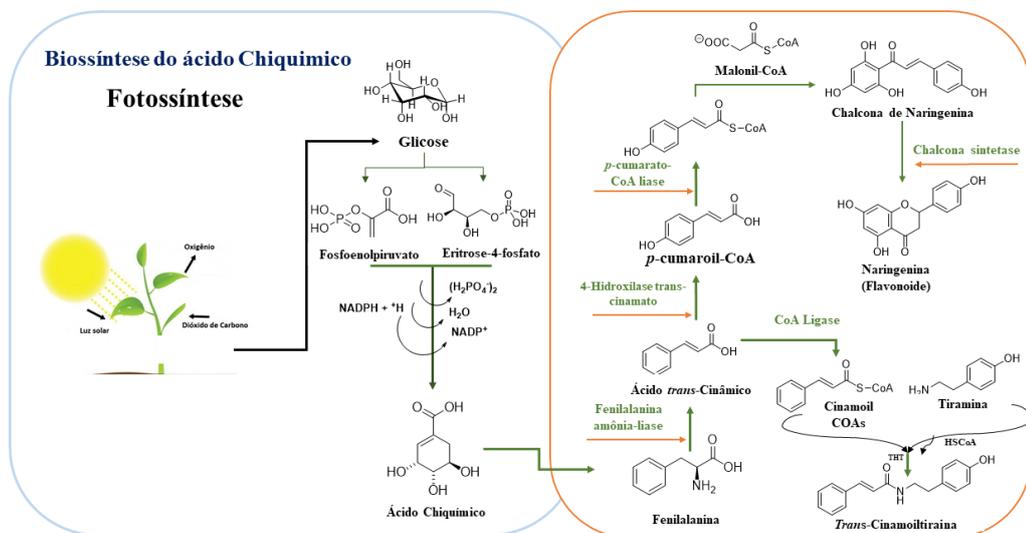
O ácido cinâmico e seus derivados (Figura 1), encontrados em espécies vegetais tal como a *Cinnamomum zeylanicum*, são oriundos da via biossintética do ácido chiquímico (Figura 2) e desempenham um importante papel no desenvolvimento e crescimento das plantas, assim com no sistema de defesa frente às ervas daninhas, além de beneficiar a saúde humana pelo seu potencial terapêutico (De et al., 2011; Zeng e Lai, 2019).

**Figura 1:** Ácido cinâmico e seus derivados naturais.



Fonte: (Gunia-Krzyżak et al., 2018; Jitareanu et al., 2013).

**Figura 2:** Biossintese do ácido chiquímico e seus derivados.

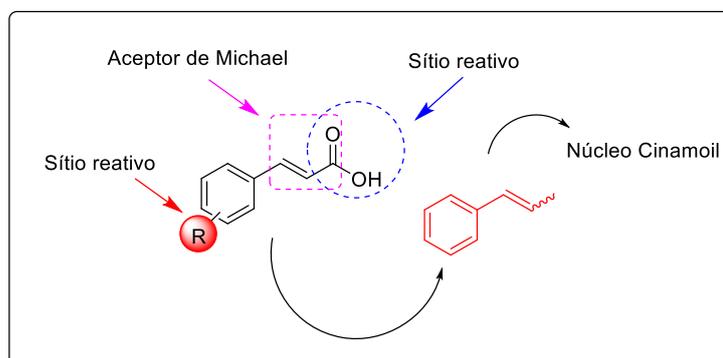


Fonte: Adaptado de França et al., 2021.

Os derivados do ácido cinâmico (DAC's) têm sido reportados na literatura por apresentarem diversas atividades biológicas ao considerar a interação entre estrutura e alvo molecular (De *et al.*, 2011; Guzman, 2014). Dentre elas, destacam-se anti-inflamatória, inibição enzimática, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, leishmanicida, inseticida e anticancerígena (Gunia-Krzyżak *et al.*, 2018; Jitareanu *et al.*, 2013; Martínez-Soriano *et al.*, 2015; Pontiki *et al.*, 2014).

Essas inúmeras propriedades terapêuticas estão associadas à sua estrutura que apesar de simples é versátil, pois possui vários sítios reativos tais como a presença do acceptor de Michael, a facilidade do grupo carboxílico em funcionalizar-se em outros grupos funcionais e alteração de grupos substituídos nas posições *orto*, *meta* e/ou *para* do anel aromático da porção cinamoila (Figura 3), o que faz atuarem em diversas vias mecánísticas. Além disso, esses compostos possuem baixa toxicidade frente a organismos não alvos (De *et al.*, 2011; Guzman, 2014; Sharma, 2011).

**Figura 3:** Sítios reativos da estrutura do ácido cinâmico.



**Fonte:** Adaptado de França *et al.*, 2023.

Embora sejam encontrados na natureza, a quantidade presente nas espécies é baixa, sendo preciso a aplicação da síntese orgânica para se ter quantidades apreciáveis e assim contribuir no campo medicinal e agroquímico (Augustine *et al.*, 2014; Pawar, Wagh e Lali, 2016). Com base nisso, pesquisas na área de química medicinal aliada à síntese orgânica e a estudos *in silico* contribuem para a descoberta e otimização de novos medicamentos e inseticidas (Augustine *et al.*, 2014; Pawar, Wagh e Lali, 2016).

### 2.1.1. Atividade Inseticida e larvicida dos derivados do ácido cinâmico.

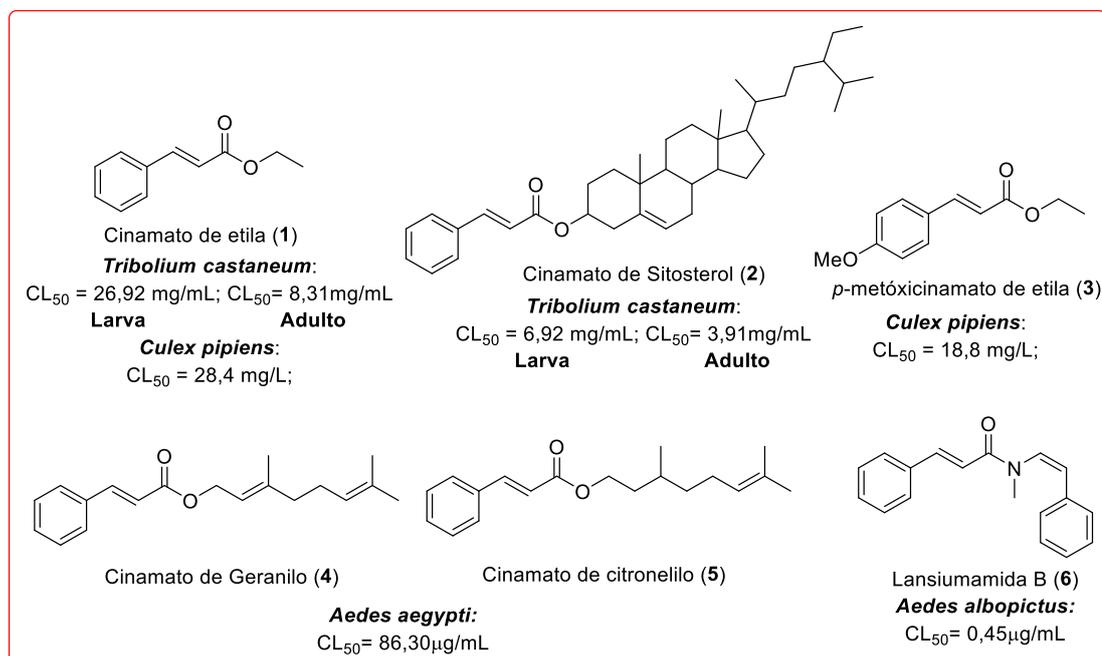
Os insetos são ameaças eminentes à saúde pública, sendo considerados um dos grandes problemas para a sociedade, dentre esses insetos, destacam-se: o *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles gambiae* e *Lutzomyia longipalpis* (Ahn *et al.*, 2008; França *et al.*, 2021). As metodologias utilizadas para o controle no manejo desses vetores, com destaque ao controle químico, apresentam em muitos casos tempo de validade devido à resistência adquirida pelos vetores. Além disso, são observados casos de toxicidade e carcinogenicidade em organismos não alvos (Ahn *et al.*, 2008; Bezerra França *et al.*, 2021).

Dessa forma, várias pesquisas acerca dos DAC's estão sendo realizadas, a fim de investigar os efeitos que essa classe de moléculas podem apresentar. Zeng e Lai (2019) e Procópio *et al.* (2015) já vêm estudando extratos naturais de espécies vegetais *Asplenium australasium* e *Schinus terebinthifolius* frente às espécies reativas de oxigênio e contra o *Aedes aegypti*. E foi evidenciado pelos pesquisadores que as atividades antioxidantes e larvicidas estavam associadas à presença de derivados do ácido cinâmico. Ainda nessa mesma vertente, Buxton *et al.* (2020) ao estudarem a espécie *Ocimum gratissimum* e *Vitellaria paradoxa* observaram a ação larvicida e inseticida frente ao *Tribolium castaneum* de dois compostos extraídos dessas espécies vegetais, o cinamato de etila (composto **1**, Figura **4**) com concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) para as larvas de 26,92 mg/mL e para o vetor adulto de 8,31 mg/mL, e o cinamato de sitosterol (composto **2**, Figura **4**) com uma CL<sub>50</sub> = 6,92 mg/mL para a larva e 3,91mg/mL para o vetor adulto (Figura **4**) (Procópio *et al.*, 2015; Zeng e Lai, 2019).

Ahn *et al.* (2008) também evidenciaram atividade inseticida frente à espécie *Culex pipiens* de extratos da *Kaempferia galangarhizome* contendo derivados cinamatos (composto **1** e composto **4**, Figura **4**). Além disso, os cinamatos de Geraniol (composto **4**) e citronelilo (composto **5**) presentes no óleo essencial da *Cymbopogon winterianus* (Citronela) também apresentaram ação larvicida frente ao *Aedes aegypti*, com CL<sub>50</sub> de 86,30µg/mL (Figura **4**) (Cansian *et al.*, 2023).

O Lansiumamida B (composto **6**, Figura **4**) extraído da *Clausena lansium* também apresentou ação larvicida frente ao vetor *Aedes albopictus* com CL<sub>50</sub> de 0,45 µg/mL, em que provavelmente a ligação dupla *cis* e a função amida podem ter contribuído para essa atividade.

**Figura 4:** Derivados do ácido cinâmico com ação inseticida oriundos de espécies vegetais.

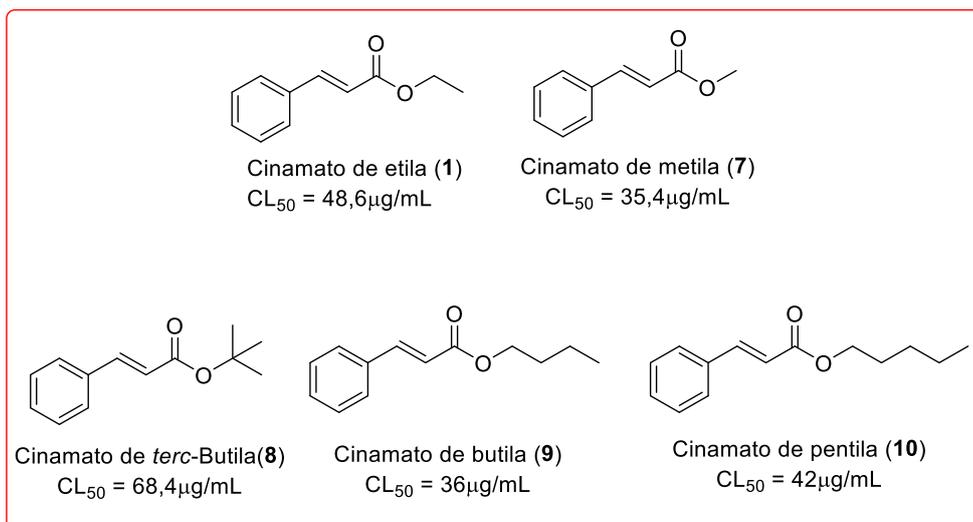


Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Assim, é possível notar que os sítios reativos, tal como a funcionalização do grupo carboxila com ou sem alteração da cadeia lateral, associada com a porção cinamoíla com/ou sem variação do substituinte no grupo fenila (anel aromático conjugado a ligação dupla com geometria *trans*) desempenham também um papel vital na atividade inseticida para essa classe.

Dessa forma, a comunidade científica tem desenvolvido metodologias sintéticas para a obtenção de derivados do ácido cinâmico em maiores quantidades para posterior verificação inseticida e larvicida. O cinamato de metila (composto 7, Figura 5) é um dos exemplos que foi estudado por Fujiwara *et al.* (2017). Eles observaram uma atividade larvicida relevante de 35,4 µg/mL frente ao *Aedes aegypti*. Outros pesquisadores também investigaram o mesmo derivado só que variando a cadeia lateral da função éster, e observaram uma diminuição ou aumento na atividade larvicida, dependendo da cadeia lateral associada. Nesses estudos tiveram como destaque cinamato de etila (composto 1, Figura 5), cinamato de *terc*-Butila (composto 8), cinamato de butila (composto 9) e pentila (composto 10) conforme segue na Figura 5 (Araújo *et al.*, 2021; Fujiwara *et al.*, 2017; Santos Correia, dos *et al.*, 2022).

**Figura 5:** Concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) dos derivados cinamatos frente ao *Aedes aegypti*.



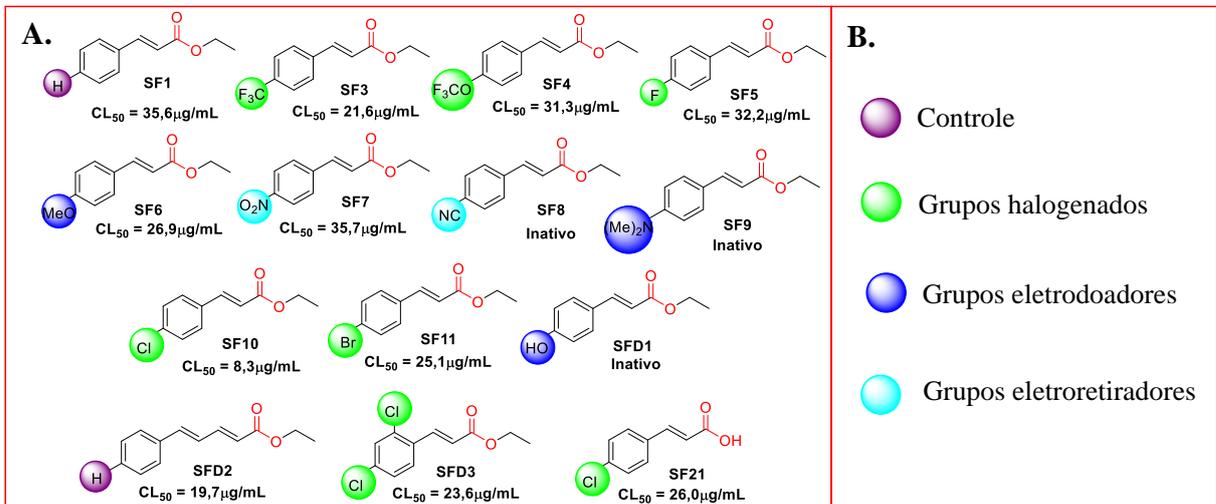
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Dessa forma, no estudo dos derivados cinamatos com variação na cadeia lateral, a lipofilicidade desses compostos induziu ao leve aumento na atividade larvicida. Assim, visando aumentar a atividade larvicida, Almeida *et al.* (2023) fizeram o encapsulamento do cinamato de pentila utilizando lectinas para aumentar a solubilidade do composto em meio aquoso. Nesse estudo, foi verificado uma redução da CL<sub>50</sub> de 42 μg/mL para 19,9 μg/mL, mostrando que esse artifício é viável para compostos que apresentam baixa solubilidade.

Assim, com a extensão da exploração dessa aplicação larvicida para os DAC's, nos últimos três anos, a comunidade científica continua a fazer modificações estruturais em seus sítios reativos levando a um aumento ou redução na atividade larvicida (Araújo *et al.*, 2021; Fujiwara *et al.*, 2017; Santos Correia, dos *et al.*, 2022). Nesse contexto, muitos exemplos podem ser discutidos com os derivados cinamatos e ácidos cinâmicos *n*-substituídos variando os substituintes (Figura 6).

Como observado na Figura 6, os ésteres cinâmicos *p*-substituídos e o ácido *p*-clorocinâmico (SF21) apresentaram uma pronunciada atividade larvicida, contudo em comparação à classe dos cinamatos de etila, os compostos com grupos eletroretiradores tiveram o melhor resultado larvicida, destacando-se o *p*-clorocinamato de etila (SF10) que apresentou uma CL<sub>50</sub> de 8,3 μg/mL. Esses estudos foram realizados por França *et al.* (2021), que também observaram modificações morfológicas na larva do *Aedes aegypti*, como redução da massa corporal, encurtamento do intestino e uma possível eliminação da matriz peritoneal.

**Figura 6:** Concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) dos derivados do ácido cinâmico *n*-substituídos frente à larva do *Aedes aegypti*. **A.** Compostos aplicados ao ensaio larvicida. **B.** Representação das características presentes nos derivados cinamatos avaliados no ensaio larvicida.

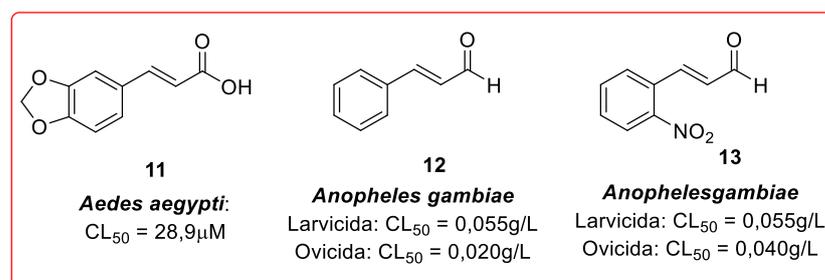


Fonte: Adaptado por França *et al.*, 2021.

Além do mais, vale ressaltar que as alterações observadas por França *et al.* (2021) são similares àquelas observada por Silva *et al.* (2024). Eles observaram variações morfológicas no trato digestivo, ruptura do intestino, escurecimento e eliminação do conteúdo intestinal. Nesse estudo, as larvas foram tratadas com ácidos cinâmicos derivados do piperonal que apresentaram CL<sub>50</sub> de 28,9 µg/mL (Figura 7).

Alterações morfológicas similares frente ao vetor *Anopheles gambiae* também foram observadas, ao utilizarem aldeídos cinâmicos *n*-substituídos como o cinamaldeído (composto **12**, Figura 7) e *o*-nitrocinamaldeído (composto **13**, Figura 7) que apresentaram uma atividade larvicida de 0,055g/L (CL<sub>50</sub>) e ovicida correspondente a 0,020 g/L e 0,040 g/L, respectivamente, como segue na Figura 7 (N'goka *et al.*, 2022).

**Figura 7:** Atividade biológica dos derivados do ácido cinâmico frente aos vetores *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*



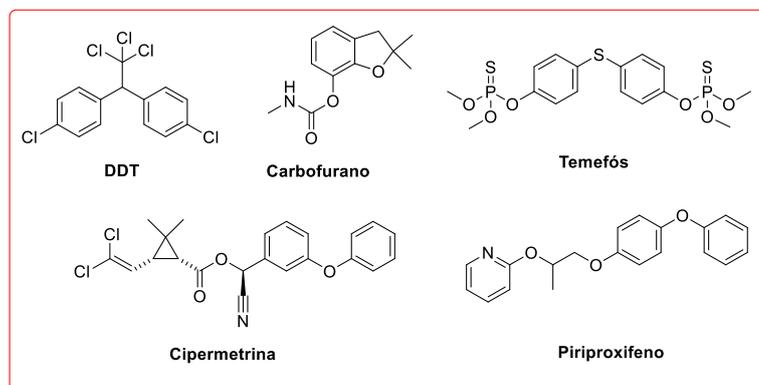
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Portanto, a atividade larvicida apresentada pelos DAC's de modo geral se deve a interações com macromoléculas presentes na larva desses vetores, principalmente as que se encontram na cabeça e no trato digestivo, importantes para o desenvolvimento dos artrópodes como o *Aedes aegypti*, *Culex pipens* e *Anopheles gambiae*. Dentre essas macromoléculas, destacam-se as esterases e serinas-proteases como a acetilcolinesterase (AChE), responsável por interromper a transmissão nervosa pela hidrólise da acetilcolina (neurotransmissor), as oxidases de função mista (OFM), responsável no metabolismo do hormônio juvenil dos insetos (compostos endógenos) e a glutationa- S-transferase (GST), considerada multifuncional, possuindo um papel vital na desintoxicação celular de uma variedade de compostos endógenos e exógenos (França *et al.*, 2021; Medeiros, 2011).

Essas proteínas são alvos biológicos de muitos inseticidas utilizados frente a vetores como o *Aedes aegypti*, eles atuam por vias metabólicas distintas, sendo uma delas à inibição enzimática (acetilcolinesterase, 3-hidroxiquinurenina transaminase, glutationa S-transferase (GST), entre outros). Embora outros possam atuar nas vias de canais de sódio e nas mudanças em sistemas hormonais (França *et al.*, 2021; Leong *et al.*, 2019).

Contudo, os inseticidas sintéticos, sejam eles: organoclorados (DDT), carbamatos (carbofurano) organofosforados (Temefós), piretróides (Cipermetrina) e reguladores de crescimentos de insetos (Piriproxifeno) (Figura 8), foram descredenciados pela a OMS, uma vez que não são seletivos, sua toxicidade ambiental é alta e há resistência desses pelas larvas. Tal resistência pelos vetores a essas classes químicas é devido à adaptação metabólica e/ou alterações em fragmentos presentes no sítio catalítico em que os compostos interagem (França *et al.*, 2021; Leong *et al.*, 2019).

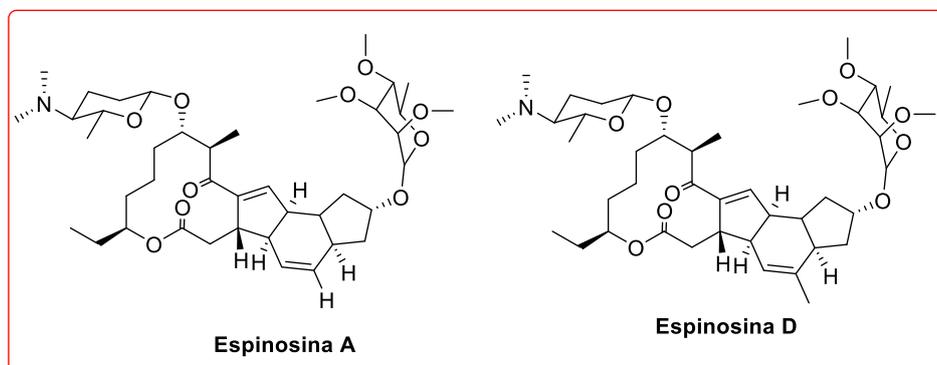
**Figura 8:** Estrutura química dos inseticidas sintéticos utilizados no combate às larvas do *Aedes aegypti*.



Fonte: Adaptado de França *et al.*, 2021.

Assim, o inseticida atualmente utilizado no Brasil é o espinosade (Macrolídeo, composto por duas espinosinas A e D) (Figura 9), de origem biológica advindo da fermentação aeróbica da actinobactéria, a *Saccharopolyspora spinosa*. Esse inseticida atua em dois tipos de receptores, os correspondentes a nicotínicos de acetilcolina e ao ácidoaminobutírico (GABA), ocasionando excitação do sistema nervoso do vetor, induzindo-o à paralisia e à morte (Dias *et al.*, 2017). Além disso, pode atuar de forma seletiva e efetiva contra várias cepas dos gêneros *Culex* spp, *Anopheles* spp e *Aedes* spp, e não agride o meio ambiente.

**Figura 9:** Fórmula estrutural das espinosinas presentes no espinosade.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

Dessa forma, o controle no manejo de vetores com ênfase ao *Aedes aegypti* é decorrente de uma combinação dos meios químicos, biológicos e ambiental, em que esse último tem o objetivo de eliminar os criadouros do vetor, por meio da conscientização da população local, em não deixar água parada, da instalação de telas de proteção em portas e janelas. Assim, como de ações governamentais como criação de saneamento básico (Braga e Valle, 2007; Esmeraldo, 2016).

Portanto, apesar das medidas profiláticas apresentadas, as doenças infecciosas transmitidas pelo vetor *Aedes aegypti* têm aumentado consideravelmente em todos os países da América, o que leva a esse vetor ser considerado um dos grandes problemas de saúde pública. Dentre essas doenças destacam-se: a Dengue, Chikungunya e Zika. Nessa categoria a Dengue se destaca, atingindo mais de 3 milhões de casos no período de 2019, dos quais 1,5 milhão foi registrado exclusivamente no Brasil (Paho, 2020).

As doenças infecciosas são ocasionadas por patógenos, como fungos, bactérias, helmintos e vírus. Eles invadem os hospedeiros para se reproduzirem, e assim serem transmitidos a milhões de pessoas anualmente (Ferreira-Júnior, 2015; Smolinski, 2003). Conforme a OMS (Organização mundial de Saúde), um terço das causas de mortalidade no

mundo estão relacionadas às doenças infecciosas, classificando-se como um dos problemas de saúde pública (Ferreira-Júnior, 2015).

Uma das formas de prevenir as arboviroses é por meio do uso de vacinas. Contudo, para algumas dessas, como a dengue, há vacinas contra alguns sorotipos, mas para o CHIKV e ZIKV, ainda não existem. Além disso, para o seu desenvolvimento requer tempo e investimentos elevados. Diante disso, a propagação desses vírus torna-se o motivo de preocupação para o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CPCD) tanto dos Estados Unidos (EUA), quanto do Brasil (Maciel *et al.*, 2020; Patterson, Sammon e Garg, 2016; Petersen *et al.*, 2016).

As condições climáticas e o fator socioeconômico também auxiliam na disseminação das doenças infecciosas, tanto a curto como a longo prazo, pois contribuem para a replicação, evolução e movimento dos vetores. Os países em desenvolvimento são os mais atingidos quanto à propagação das arboviroses, uma vez que possuem um sistema de saúde pública ineficaz, e problemas relacionados ao saneamento básico e educação (Maguiña-Vargas, 2015). Dentre os países, destacam-se os de clima tropical como o Brasil, pois apresentam condições de temperatura, índices pluviométricos e umidade relativa do ar que favorecem o desenvolvimento dos mosquitos (Lopes, Nozawa e Linhares, 2014; Maguiña-Vargas, 2015).

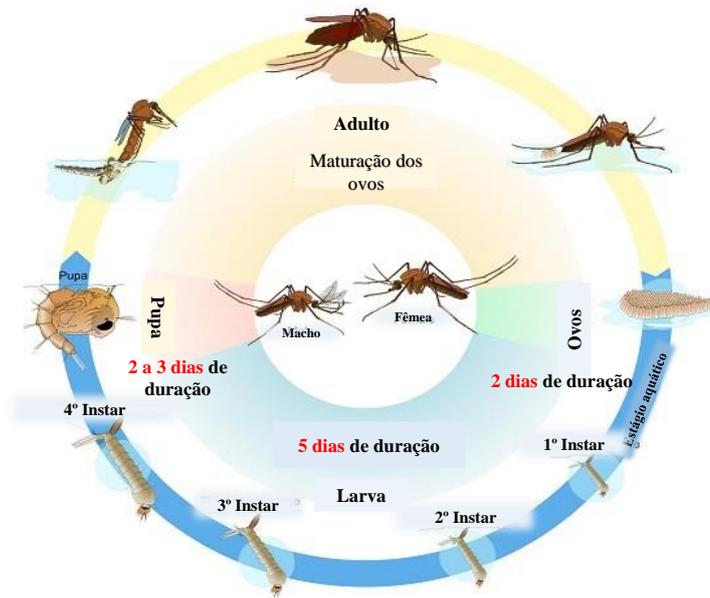
#### **2.1.1.1. Origem e Desenvolvimento do *Aedes aegypti***

O mosquito vetor *Aedes aegypti*, oriundo do continente africano, disseminou-se por toda a América por meio dos navios negreiros. Essa espécie que se alimenta e reproduz em florestas, passou também a se adaptar em climas de regiões desertas (Deserto do Saara) e mais habitadas como os locais urbanos, tornando-se uma espécie antropofílica (Catão, 2011; França, 2019; Gubler, 2004). Assim, esse mosquito atualmente possui dois ciclos de vida, um silvestre e outro urbano, caracterizados de acordo com o seu habitat.

O *Aedes aegypti* é responsável pela transmissão de uma série de arboviroses, dentre elas a Dengue, Febre amarela, Chikungunya e Zika, enquadrando-se na categoria dos artrópodes hematófagos. Além disso, adequam-se com facilidade às variações climáticas e ambientais, auxiliando na inoculação de patógenos, como alguns vírus da família Flaviviridae e Togaviridae (França, 2019; Smolinski, 2003).

O ciclo de vida desse artrópode é regido por quatro fases, sendo ovo, larva (apresentando quatro estágios, L1 a L4), pupa e adulto (Figura 10). O ciclo dura em média 10 dias, contudo o inseto adulto pode resistir por um período de 30 a 35 dias.

**Figura 10:** Fases do desenvolvimento do *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Adaptado de Biogents, 2021.

A maturação dos ovos ocorre com o repasto sanguíneo, que para serem fecundados, a fêmea precisa de apenas uma inseminação. Porém, a deposição dos ovos acontece de 4 a 6 ciclos, sendo categorizados como gonadotróficos (Ferreira-júnior, 2015; França, 2019). Assim, o *Aedes aegypti* é considerado um problema de saúde pública, já que o mosquito fêmea deposita de 600 a 1000 ovos. O vetor, hospedeiro de agentes microbianos como o vírus Dengue, ao picar uma pessoa infectada, contaminam os ovos por meio do processo transovariano, assim o vírus é passado de geração em geração (Catão, 2011; França, 2019).

O mosquito vetor fêmea quando infectado, pode contaminar o domicílio inteiro, uma vez que pode transmitir o vírus a várias pessoas no curto período de tempo. Além disso, o tempo de incubação do vírus em uma pessoa é de 3 a 15 dias, possibilitando infectar outros mosquitos de diferentes regiões. Dessa forma, gera ciclos de transmissão com alta densidade demográfica, ocasionando uma epidemia (Catão, 2011; França, 2019).

O desenvolvimento do *Aedes aegypti* é facilitado por algumas condições, dentre elas a qualidade da água, em que os ovos eclodem tanto em água limpa, quanto em águas poluídas e/ou contato direto com o solo. A exposição à luz e à temperatura, também contribuem no crescimento e reprodução do mosquito, em que durante o dia é comum o vetor se alimentar, mas já há relatos que esse pode alimentar-se a qualquer hora do dia, e temperaturas elevadas o tempo de incubação é reduzido, e a proliferação é acrescida (Catão, 2011).

Portanto, os DAC's por possuírem múltiplas ações mecanísticas e biológicas nos organismos vivos, são bons candidatos a inseticidas e/ou larvicidas frente ao *Aedes aegypti*,

pois pode ocorrer interações com alvos seletivos presentes nos estágios do vetor. Além disso, foi observado que a ação inseticida dos derivados do ácido cinâmico é intensificada por alterações na cadeia lateral, que o torna atrativo para o planejamento de inseticidas de melhor ação biológica e de menor toxicidade para organismos não-alvos (Guzman, 2014; Pontiki *et al.*, 2014; Sharma, 2011).

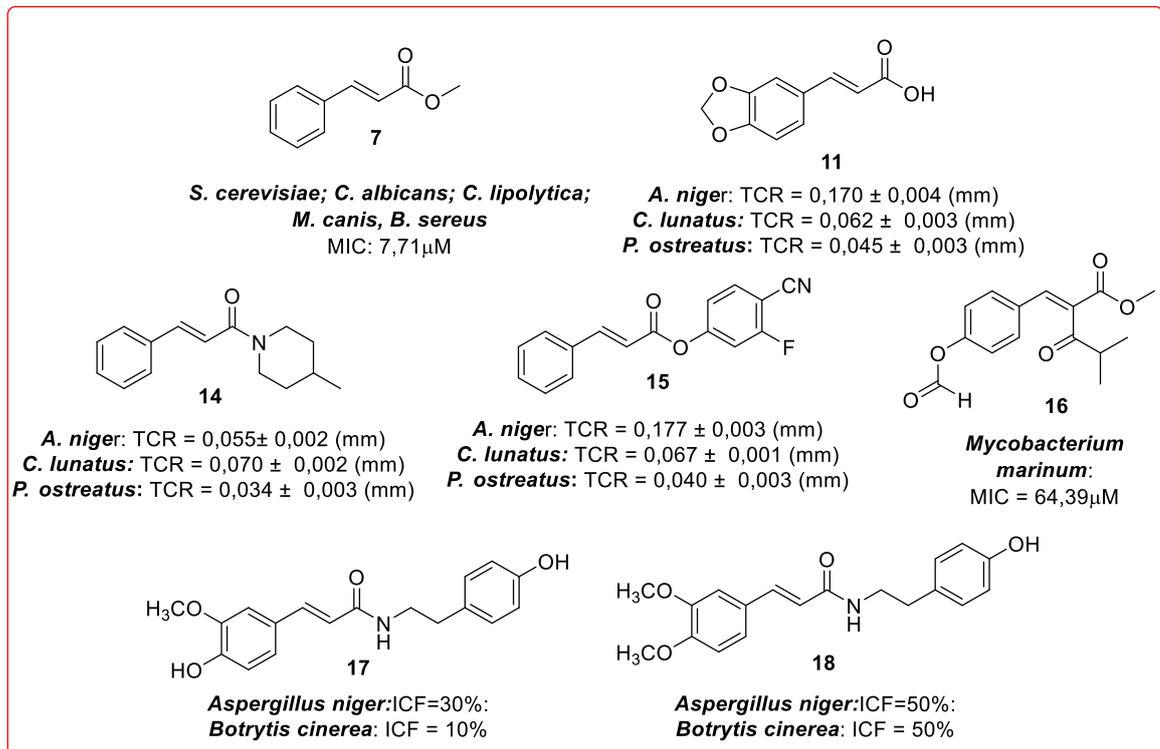
### 2.1.2. Atividade antimicrobiana dos derivados do ácido cinâmico.

Os derivados do ácido cinâmico além de possuir atividade larvicida e inseticida, também possuem atividade antimicrobiana, inibindo as enzimas presentes nos microrganismos (Fungos, bactérias e protozoários, por exemplo), como também afetando o desenvolvimento, levando à morte. Um exemplo foi a pesquisa realizada por Korošec *et al.* (2014), que ao explorar a atividade antifúngica dos ésteres e amidas cinâmicas *n*-substituídas, observaram uma taxa de crescimento radial fúngico entre 0,062 – 0,177 mm para as espécies *A. niger*, *C. lunatus* e *P. lunatus*, destacando-se as espécies *C. lunatus* e *P. ostreatus* para os compostos **11** e **14** com TCR de 0,062/0,045mm e 0,070/0,034mm, respectivamente (Figura **11**). Além disso, foi observado que esses compostos atuam possivelmente na inibição da enzima 4-hidroxilase benzoato CYP53A15 (enzima responsável pela desintoxicação aromática), e que pelo docking molecular o grupo fenila da porção cinamoila e as ligações de hidrogênio presentes no sítio ativo da respectiva enzima foram importantes na atividade antifúngica (Korošec *et al.*, 2014).

Os DAC's podem ser encontrados também em microrganismos como o fungo *Taxus maire*, microrganismo endofítico que está presente em todas as espécies de plantas. Embora colonize as plantas (hospedeira) esse tipo de fungo não as afeta, mas conferem-lhes uma maior resistência ao ataque de insetos, herbívoros e estresses abióticos e bióticos (Gonçalves, Freire e Lima, 2013; Meilawati, Saepudin e Ernawati, 2023).

Meilawati, Saepudin & Enawati (2023) ao estudarem a planta *Citrus junos* e o fungo *Taxus maire*, verificaram a presença do ácido *p*-cumárico (Figura **1**) e o Metil 2-{(E) – 2-[4-(formiloxy fenil)] etinil}-4-metil-3-oxopentanoato (composto **16**, Figura **11**), e observaram que esses derivados tinham ação antibactericida frente à *Mycobacterium marinum* (ATCCBAA-535) com MIC equivalente a 64,39µM. Os pesquisadores também ressaltaram a ação antimicrobiana de uma cinamamida (composto **17**) e do cinamato de metila (composto **7**, Figura **11**) extraído da *C. impressionicostatum* que apresentou ação anfúngica para as espécies *S. cereviciae*, *C. albicans*, *C. lipolytica*, *M. canis* e *B. sereus* com MIC de 7,71µM. (Figura **11**).

**Figura 11:** Atividade antimicrobiana dos derivados do ácido cinâmico.



**Fonte:** Elaboradora pela autora, 2023.

Nem sempre, os fungos são os vilões para a sociedade, eles desempenham papel importante na indústria alimentícia como, por exemplo, o fungo saprotrófico da espécie *Hypsizygus marmoreus*, muito popular na cultura asiática, que atualmente é utilizado como uma iguaria mundialmente. Mas pode ser afetado por outros microrganismos devido a sua alta metabolização, maior umidade e presença de infecção fúngica tal como o *Trichoderma harzianum*, um fungo parasita. Assim, He *et al.* (2023) ao estudarem a influência do ácido cinâmico (Figura 1) em ambos os fungos, observaram que o ácido cinâmico apresentou uma concentração de efeito máximo de 50% (CE<sub>50</sub>) de 2,64 mg/mL e sua taxa de germinação de 50% de esporos foi relativa a 0,128 mg/mL para o fungo *Trichoderma harzianum*. Além disso, comprovaram que o ácido cinâmico não afetou o *Hypsizygus marmoreus*, mas o conservou a mais tempo (He *et al.*, 2023).

Os DAC's encontrados na natureza (Figura 1) também se mostraram ativos contra o fungo *Aspergillus niger*, com destaque para o ácido *p*-cumárico (Tabela 1) (Bisogno *et al.*, 2007; Chochkova *et al.*, 2012). Assim como as amidas cinâmicas que apresentaram (compostos 17 e 18, Figura 11) atividade de inibição de crescimento fúngico frente às espécies *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea*, mostrando-se mais ativa para essa última espécie (Sadeghi *et al.*, 2013).

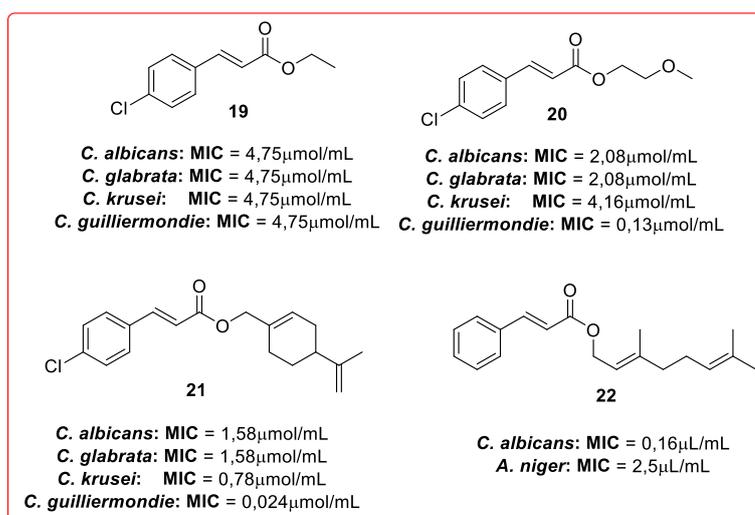
**Tabela 1:** Resultado da atividade antifúngica dos ácidos cinâmicos *n*-substituídos.

Compostos	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 11394 (MIC)
Ácido cinâmico	844 $\mu$ M
Ácido caféico	>1,39mM
Ácido ferúlico	>10mM
Ácido <i>p</i> -cumárico	761 $\mu$ M

**Fonte:** Adaptado de França *et al.*, 2021.

Os ácidos cinâmicos tornam-se precursores de outros derivados cinâmicos mostrando que a porção cinamoíla é crucial para a atividade antimicrobiana. Neste sentido, outra classe que requer destaque são os ésteres cinâmicos *n*-substituídos que já vêm apresentando atividade antimicrobiana (Ruwizhi e Aderibigbe, 2020).

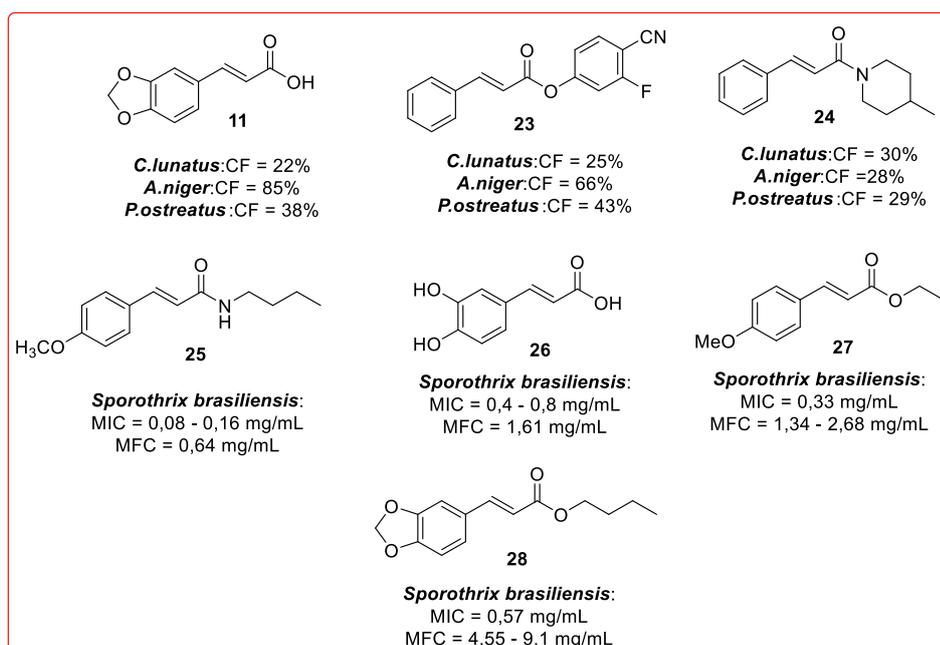
Silva *et al.* (2019) comprovaram esse estudo com os derivados *p*-clorocinamatos, sendo observado que tanto a função éster quanto o substituinte cloro na posição *para* do anel fenila aumentou a atividade antimicrobiana. Além disso, ficou evidente que a cadeia lateral da função éster com o anel cíclico insaturado e uma dupla alílica na posição *para* desse ciclo, intensificou ainda mais a atividade antifúngica em todas as cepas fúngicas, destacando-se o composto **21** principalmente para a *C. guilliermondie* com MIC de 0,024 $\mu$ mol/mL (Figura 12). O éster cinamato de gerânio (composto **22**) também se destacou na mesma atividade, apresentando o MIC de 2,5 $\mu$ L/mL frente à *Aspergillus niger* e 0,16  $\mu$ L/mL frente à *Candida albicans*, segundo pesquisas realizadas por Zanetti *et al.* (2021) (Figura 12).

**Figura 12:** Atividade antifúngica dos ésteres cinâmicos *n*-substituídos.

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Ruwizhi & Aderibigbe (2020) também observaram a influência da cadeia lateral não apenas de ésteres, mas de amidas cinâmicas e ácido metilendioxicinâmico (composto **11**, Figura **13**) para os fungos *C. lunatus*, *A. niger* e *P. ostreatus*. Dessa classe, o composto **24** se destacou apresentando o baixo crescimento fúngico de 30% para o *C. lunatus*, 28% para o *A. niger* e 29% para o *P. ostreatus* (Figura **13**). Ainda nessa vertente, Waller *et al.* (2022) ao trabalharem com múltiplos derivados do ácido cinâmico com grupos metoxilas e hidroxilas em posições variadas do anel fenila, observaram atividade fúngica pronunciada para a *Sporothrix brasiliensis* com MICs entre 0,08 – 0,57 mg/mL, conforme visto na Figura **13**. Nessa análise o composto **25** teve um melhor MIC (0,08 – 0,26mg/mL) e concentração fúngica mínima (MFC, 0,64mg/mL), além disso, ambos os compostos se apresentaram como fungicida (MFC  $\leq$  1mg/mL).

**Figura 13:** Atividade antifúngica dos derivados do ácido cinâmico.

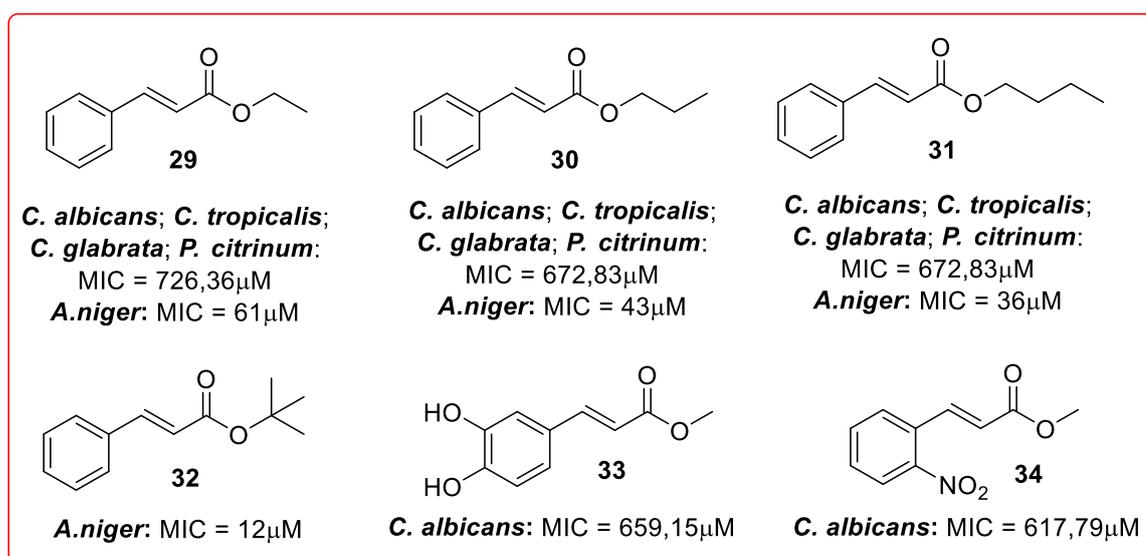


**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

De acordo com os pesquisadores, os DAC's podem atuar em diversas vias mecânicas, segundo Silva *et al.* (2019), os ésteres *p*-clorocinâmicos atuam na inibição da 14  $\alpha$ -demetilase, ao passo que o composto **22** atua na destruição da membrana citoplasmática e parede celular dos fungos, o que resulta no extravasamento do citoplasma e sua coagulação, contribuindo na inibição da respiração celular induzindo o microrganismo à morte (Silva *et al.*, 2019; Zanetti *et al.*, 2021).

De Moraes *et al.* (2023) também observaram alteração na membrana plasmática e, na parede celular do fungo, ao estudarem a atividade antimicrobiana de ésteres cinâmicos com variação na cadeia lateral. Eles observaram que os compostos atuam na interação direta com o ergosterol, um dos principais constituintes das células fúngicas que medula a fluidez da membrana, crescimento celular e proliferação. No presente estudo foram utilizadas as cepas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *P. citrinum*, em que ao aumentar a cadeia lateral, foi observado o aumento na atividade antifúngica, destacando-se o cinamato de butila (composto **31**). Esse fato foi observado por Narasimhan *et al.* (2004), que ao trabalharem com ésteres cinâmicos, observaram que o cinamato de *tert*-Butila (composto **32**) apresentou o melhor MIC de 12 $\mu$ M em comparação aos cinamatos de metila e etila com MIC de 61  $\mu$ M (Figura 14). Assim, à medida que a cadeia lateral passa até mais de 5 átomos de carbono uma pequena inibição do crescimento fúngico é observada (Cui *et al.*, 2017).

**Figura 14:** Resultado da atividade antifúngica dos DAC's.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

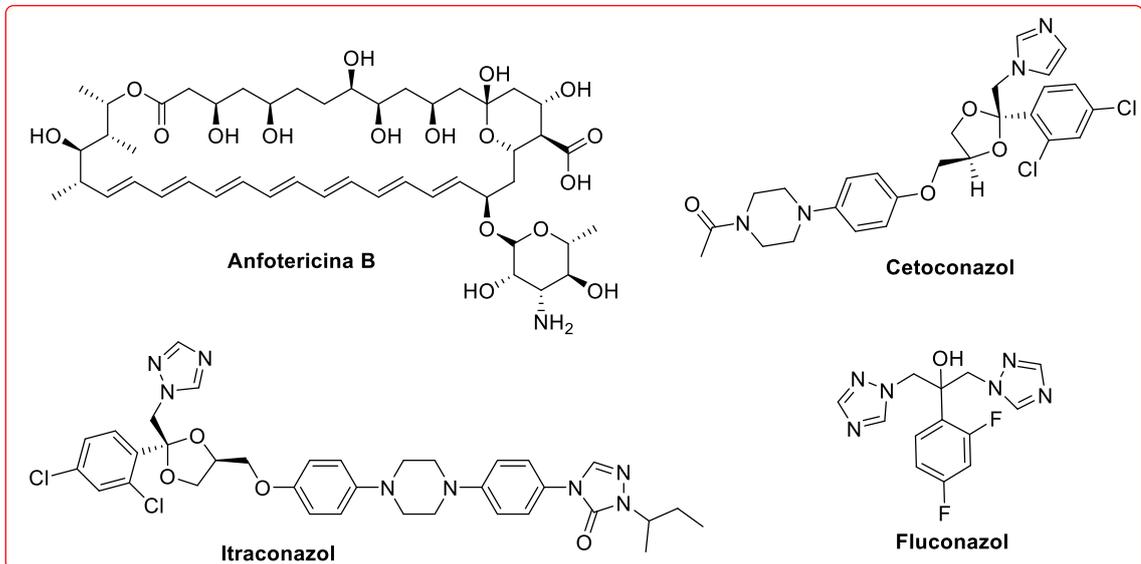
Lima *et al.* (2018), por sua vez, ao trabalharem com cinamatos de metila *n*-substituídos (compostos **33** e **34**) observaram um aumento no MIC quando comparado ao cinamato de metila (Composto **7**) que teve um MIC de 61 $\mu$ M (Lima *et al.*, 2018; Narasimhan *et al.*, 2004).

Assim os DAC's podem atuar em diferentes vias mecânicas do microrganismo, como na destruição da membrana citoplasmática e da parede celular ao inibir a síntese do ergosterol, ou ligando-se a esse esterol, tornando-se bons candidatos a antibióticos ou servir de modelo

para o planejamento de fármacos mais ativos e de baixa toxicidade (Ruwizhi e Aderibigbe, 2020; Zanetti *et al.*, 2021).

Dessa forma, faz-se necessária a busca de compostos mais ativos e de menor toxicidade, pois, atualmente, os antibióticos existentes no mercado não são eficazes devido às cepas fúngicas patogênicas apresentarem resistência. O uso indiscriminado dos antifúngicos para o tratamento de micoses sistêmicas levou a uma limitação, podendo destacar a anfotericina B e os azóis como o Cetoconazol, fluconazol e itraconazol que são os antibióticos mais utilizados para esse tratamento (Figura 15).

**Figura 15:** Antifúngicos comerciais utilizados no combate aos microrganismos.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Os azóis são fármacos utilizados no tratamento de micoses ocasionadas por várias espécies do gênero *Candida*. Essa classe se divide em duas categorias, os imidazóis, destacando-se o cetoconazol e os triazóis que incluem o fluconazol e itraconazol. Todos esses compostos atuam na inibição da biossíntese do ergosterol, levando à redução desse esterol e alteração na fluidez e permeabilidade da membrana celular fúngica. Além disso, acarreta danos celulares, resultando na necrose celular. Ao passo que a anfotericina B se classifica como um macrolídeo, utilizada no tratamento de infecções ocasionadas por fungos com destaque aos levedurados como a candidíase (Fernandes *et al.*, 2021).

Assim, a OMS classificou as doenças infecciosas ocasionadas por bactérias, vírus, protozoários e fungos como ameaças globais à saúde pública. Em 2019, foi observado mais de 4 milhões de mortes ocasionadas por doenças infecciosas advindas de microrganismos, que

estão associadas às cepas microbianas resistentes aos antibióticos, sejam por algumas modificações metabólicas ou variações climáticas. Portanto, a resistência emergente de certas espécies microbianas incetiva a investigação na busca de novos medicamentos antimicrobianos de maior eficácia e os DAC's tornam-se boas opções para candidatos a fármacos potencialmente ativos (Meilawati, Saepudin e Ernawati, 2023).

### **2.1.2. Atividade Leishmanicida dos derivados do ácido cinâmico.**

Os DAC's também já vêm sendo estudados frente a várias espécies de *Leishmania*, tendo em vista a sua multifuncionalidade decorrente de seus múltiplos sítios reativos. Essas espécies são protozoários, transmitidos pelo flebotomíneo (Phlebotominae) por meio de um repasto sanguíneo. As doenças advindas dessas espécies se distinguem, por exemplo, a *L. major* e a *L. amazonensis* ocasionam a leishmaniose cutânea ou terçenária americana (LTA), ao passo que a leishmaniose visceral é provocada pela *L. donovani*, a qual afeta órgãos internos, principalmente o fígado e o baço e se não tratada pode ser fatal ao indivíduo (Oliveira *et al.*, 2006; Paes-Gonçalves *et al.*, 2012).

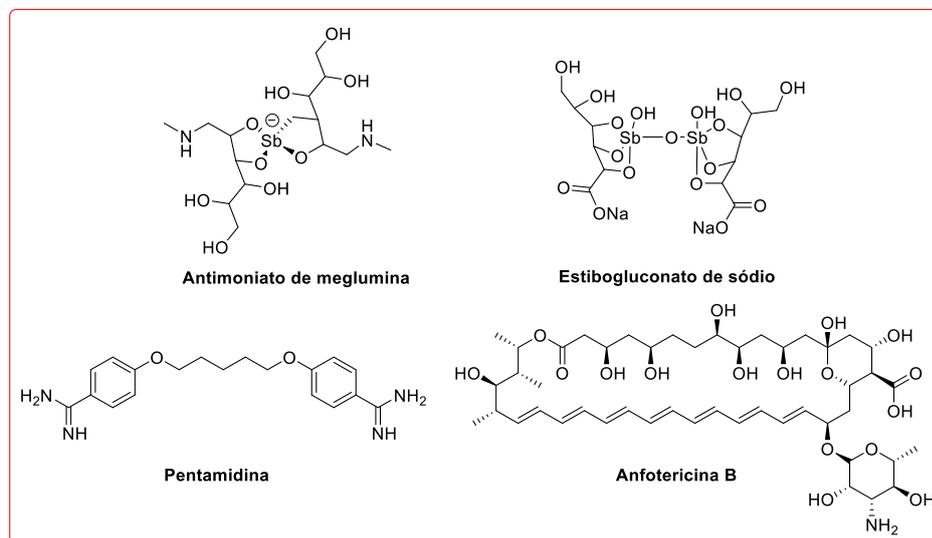
A forma que o parasita se encontra também influencia no modo em que os compostos, como os DAC's, atuam frente à *Leishmania*. Dessa maneira, deve ser analisada as formas que o protozoário do gênero *Leishmania* se apresentam, sendo duas formas evolutivas: a promastigota e a amastigota. A forma promastigota está presente no intestino dos vetores, composta por flagelos, que passa por um processo de metaciclogênese (essa forma deixa de se multiplicar e se torna infectante), ao passo que a amastigota é a forma evolutiva da promastigota que se modifica ao ser introduzida na pele, e ao encontrar células do sistema imune (macrófagos residentes e linfócitos T e B, por exemplo) pelo processo de fagocitose, ocorre a sua conversão (Ministério da Saúde, 2007).

A Leishmaniose também é considerada uma doença tropical negligenciada e faz parte do grupo das doenças parasitárias, sendo endêmica em quase 98 países, incluindo o Brasil, estando entre os sete países com taxas de leishmaniose cutânea e entre um dos cinco países que mais ocorre casos de leishmaniose visceral, tornando-se uma das endemias de maior pertinência para a saúde pública (Oliveira *et al.*, 2006; Paes-Gonçalves *et al.*, 2012). Essa doença tem um alto impacto na América do Sul, África e Ásia, consideradas regiões com alta pobreza e baixos padrões de cuidado à saúde (Glaser *et al.*, 2014). Além disso, a doença pode se manifestar de formas diferentes a depender da espécie de *Leishmania*, destacando-se: a leishmaniose cutânea,

leishmaniose mucocutânea (cutânea difusa) e a leishmaniose visceral, sendo essa última considerada a mais perigosa.

Embora haja tratamento, os quimioterápicos apresentam efeitos colaterais adversos graves, sejam no coração, rim, pâncreas e fígado, por exemplo. Além do mais, são altamente tóxicos e os pacientes vêm adquirindo resistência, dentre esses medicamentos, destacam-se: compostos antimônio pentavalente ( $Sb^{5+}$ ), como o antimônio de meglumina (Glucantime®), e o pentostan, amidinas com destaque à pentamidina e ao antibiótico macrolídeo anfotericina B (Figura 16).

**Figura 16:** Quimioterápicos utilizados no tratamento da Leishmaniose.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

As vias mecânicas dos quimioterápicos vistos anteriormente são distintas, e a ação dos antimoniais pentavalentes ainda é pouco compreendida. Estudos revelam que esses compostos atuam no metabolismo do parasita, e que alguns grupos presentes na estrutura dessas moléculas podem contribuir quanto aos efeitos farmacológicos, como exemplo tem-se o ácido glicônico presente no pentostan, que é capaz de formar complexos em meio aquoso com o átomo de antimônio, aumentando a distribuição desse fármaco para os macrófagos infectados (Soares-Bezerra, Leon e Genestra, 2004).

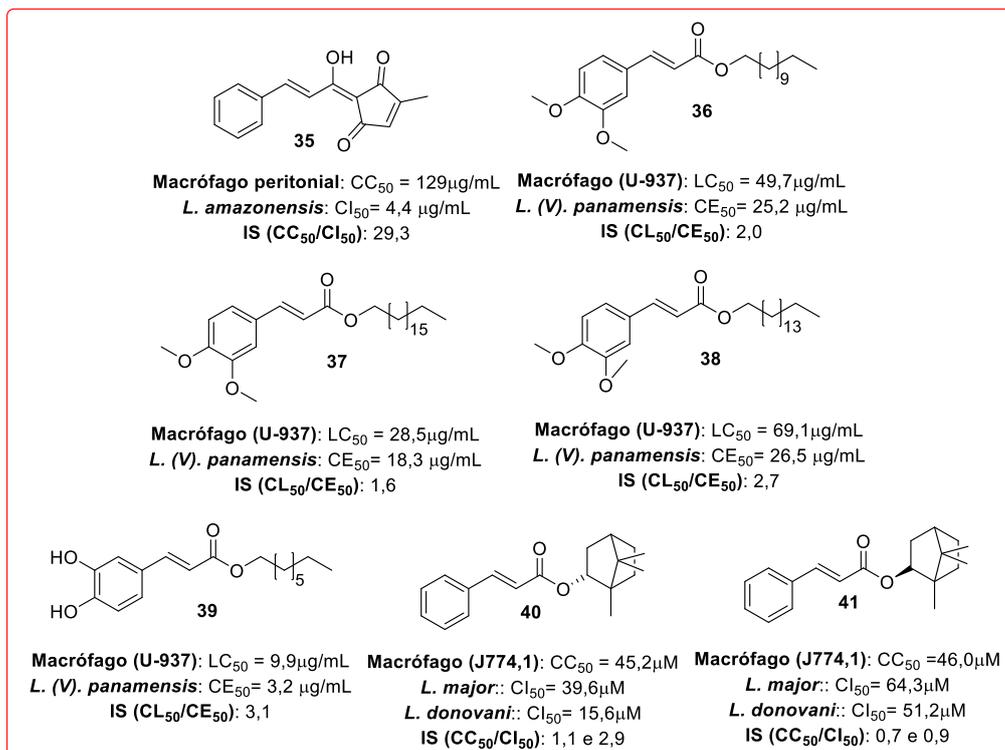
A pentamidina, por sua vez, apresenta grupos  $C=N$  e  $N-C$  e é utilizada como fármaco leishmanicida de segunda geração, aplicada em pacientes imunodeprimidos, apresentando bons resultados quando comparada aos antimoniais pentavalentes. O seu mecanismo de ação possivelmente está associado a uma redução do potencial da membrana mitocondrial com baixo

acúmulo desse fármaco em prolongadas terapias (Gil *et al.*, 2008). A anfotericina B também é dita como fármaco leishmanicida de segunda geração. É utilizada quando o tratamento envolvendo os antimoniais pentavalentes não estão sendo eficazes. O seu mecanismo de ação se associa à formação de poros artificiais na membrana celular do protozoário e do hospedeiro, modificando a permeabilidade seletiva a cátions e induzindo a morte celular, o que implica na anfotericina B também ser altamente tóxica (Gil *et al.*, 2008).

Dessa forma, os DAC's vêm sendo explorados para essa aplicação de modo a encontrar fármacos mais ativos ou de similar potencialidade terapêutica que os quimioterápicos utilizados no mercado, mas de baixa toxicidade para os organismos não-alvos como os pacientes infectados.

Um exemplo são os DAC's oriundos de fontes naturais tal como o derivado ciclopentenodiona (composto **35**, Figura 17) extraído da *Piper carniconnectivum* que apresentou atividade leishmanicida frente à forma promastigota ( $CI_{50} = 4,4\mu\text{g/mL}$ ) da *Leishmania amazonensis* após 96h de exposição, com citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) de  $129\mu\text{g/mL}$  e índice de seletividade maior que 29,3, sendo considerada de baixa toxicidade para macrófagos (Figura 17) (Paes-Gonçalves *et al.*, 2012).

**Figura 17:** Atividade leishmanicida de derivados do ácido cinâmico.



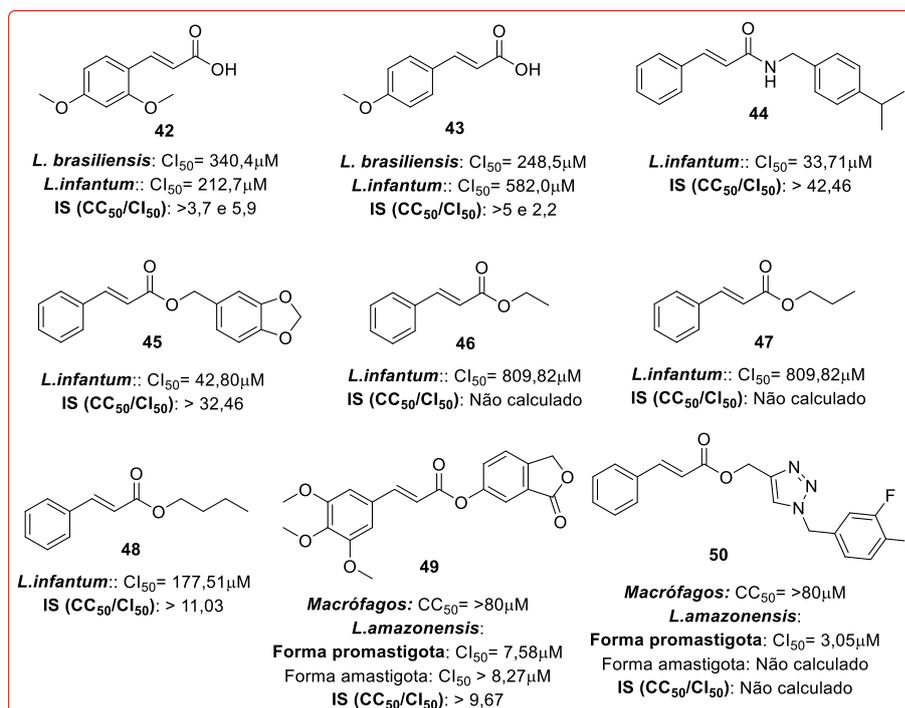
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Otero *et al.* (2014) também observaram a ação biológica dos ésteres cinâmicos *n*-substituídos (compostos **36** – **39**, Figura **17**) frente à *L. (V). panamensis* na sua forma amastigota, destacando-se o composto **39** com CE<sub>50</sub> de 3,2 µg/mL, embora tenha apresentado uma alta citotoxicidade em macrófagos (CL<sub>50</sub> = 9,9 µg/mL) e baixo índice de seletividade (IS = 3,1). Além disso, verificaram que a ligação dupla na cadeia lateral é crucial para a citotoxicidade e atividade leishmanicida (Otero *et al.*, 2014).

Nessa mesma vertente, Glaser *et al.* (2014) ao trabalharem com ésteres cinâmicos com cadeia lateral bornílica, observaram ação leishmanicida frente à *L. major* e *L. donovani* na sua forma promastigota (Compostos **40** e **41**, Figura **17**). Além disso, constataram que a configuração da cadeia bornílica influenciou drasticamente essa ação biológica, conforme apresentados na Figura **17**. Os pesquisadores também fizeram uma análise frente à forma amastigota da *L. major* para o éster cinâmico bornílico (composto **40**) que mais se destacou na análise anterior, apresentando uma boa atividade com CI<sub>50</sub> de 10,9µM, mas com alta citotoxicidade (CC<sub>50</sub>= 54,3 µM) com IS de 5,0.

Os ácidos *n*-metóxidos cinâmicos (compostos **42** e **43**, Figura **18**) também desempenharam uma leve ação leishmanicida frente à *L. brasiliensis* e *L. infantum*, contudo apresentaram um baixo índice de seletividade, sendo verificada que a posição do grupo metóxi é importante para essa atividade (Dos Santos *et al.*, 2018). A função amida ou éster presentes nos derivados do ácido cinâmico são cruciais para essa atividade biológica. De Moraes *et al.* (2023) ao estudarem ésteres e amidas cinâmicas monosubstituídos frente à forma promastigota da *Leishmania infantum* obtiveram resultados significantes com bons índices de seletividade (IS >32) para o *N*-(4-isopropilbenzilcinamamida (composto **44**) e cinamato de piperonila (composto **45**) com CI<sub>50</sub> de 33,71µM e 42,80µM, respectivamente (Figura **18**). É notório que o grupo *N*-benzil, contendo o substituinte isopropil na posição *para* do anel aromático, presente na amida foi importante na atividade quando comparado ao composto **45** que possui o grupo benzil catecol na função éster (Figura **18**). Essa análise corrobora com o estudo *in silico* em que a amida cinâmica teve uma melhor interação para o alvo aspartil aminopeptidase, seguido pelo aldeído desidrogenase (De Moraes *et al.*, 2023).

**Figura 18:** Atividade leishmanicida do ácido cinâmico e seus derivados.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Os pesquisadores também observaram que ao aumentar a cadeia lateral alifática da função éster levava a um acréscimo significativo na atividade biológica, sendo o mais ativo o cinamato de butila (composto **48**, Figura 18). Contudo o índice de seletividade reduziu com exceção para o cinamato de butila, tornando-se os compostos **46** e **47** tóxicos para a forma promastigota da *Leishmania infantum* (Figura 18) (De Moraes *et al.*, 2023).

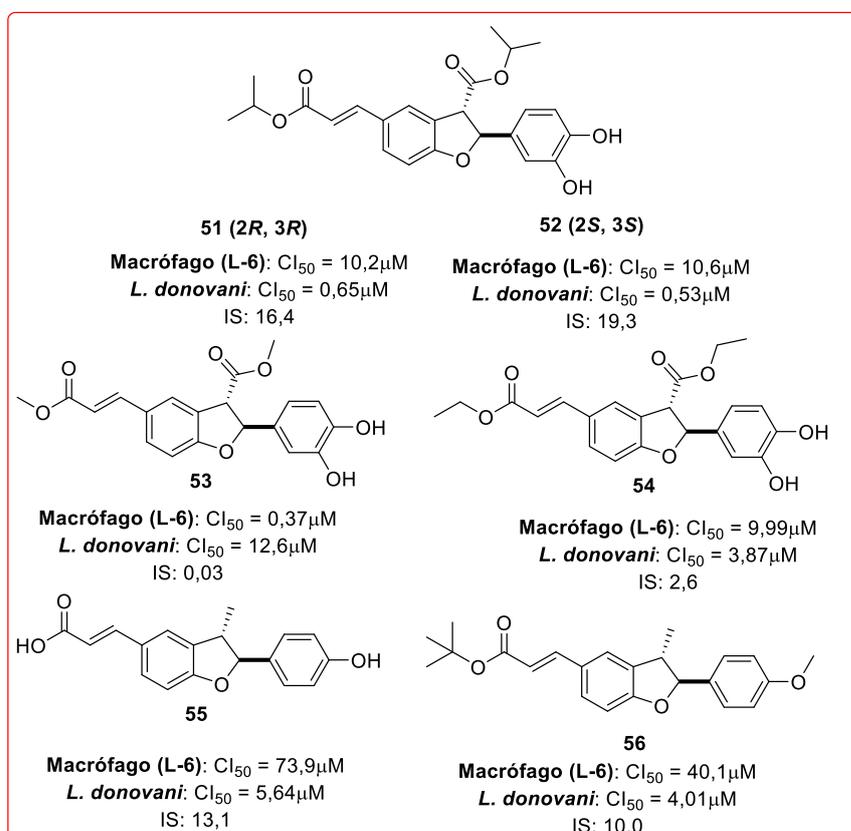
Embora os ésteres cinâmicos com destaque ao cinamato de piperonila (**45**) não tenham sido bons em relação a amida cinâmica (**44**), Rodrigues *et al.* (2019) vêm explorando essa classe de cinamatos, em que na cadeia lateral são introduzidos núcleos de isobenzofuranona ou 1,2,3-triazóis para a espécie *Leishmania amazonensis* na sua forma promastigota e amastigota. Eles observaram que após 48h de exposição, os ésteres se mostraram ativos para a forma promastigota com  $CI_{50}$  de 7,58  $\mu$ M e 3,05  $\mu$ M para os compostos **49** e **50**, respectivamente (Figura 18). Ao passo que na forma amastigota, o composto **50** não apresentou atividade enquanto que o composto **49** que apresenta o núcleo isobenzofuranona se mostrou ativo com  $CI_{50}$  acima de 8,27  $\mu$ M, citotoxicidade para macrófagos acima de 80  $\mu$ M ( $CC_{50}$ ) e IS acima de 9,67 (Figura 18) (Rodrigues *et al.*, 2019).

Assim, a porção cinamóila e a cadeia lateral da função carboxílica podem ser classificados como bioisósteros. Além do mais, modificações nesses sítios são importantes para aumentar a atividade biológica. No que tange à atividade leishmanicida, foi observada uma

intensificação da atividade quando se introduziu o núcleo isobenzofurano. Bernal *et al.* (2020) comprovaram esse efeito com os derivados do ácido cinâmico com núcleo isobenzofurano *n*-substituídos, observando uma maior atividade leishmanicida frente à forma amastigota da *Leishmania donovani*, como visto na Figura 19.

Os pesquisadores observaram uma leve variação na atividade leishmanicida de DAC's que apresentaram centros assimétricos, em que o composto **52** (Figura 19) com estereoquímica (2*S*, 3*S*) teve o melhor resultado com  $CI_{50}$  de 0,53 $\mu$ M e baixa citotoxicidade com IS de 19,3. Além disso, ao modificar a cadeia lateral isopropila presente no derivado cinamato e no substituinte ligado ao núcleo isobenzofurano (composto **52**), observou-se uma redução na atividade leishmanicida e um aumento da citotoxicidade. Isso pode ser verificado pelo valor do IS (compostos **53** e **54**, Figura 19), sendo possível observar que cadeias laterais mais volumosas levam a uma melhor atividade, sendo a cadeia isopropila e *tert*-Butila que conferem melhores resultados, conforme visto pelo o composto **56** a qual teve um IS relevante (IS > 10) (Bernal *et al.*, 2020).

**Figura 19:** Derivados do ácido cinâmico com atividade leishmanicida.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Além disso, foi possível observar que os ésteres cinâmicos possuem uma atividade leishmanicida mais pronunciada em relação aos ácidos cinâmicos derivados de isobenzofuranos (composto **55**, Figura **19**) (Bernal *et al.*, 2020). Portanto, a estrutura cinâmica presente nos derivados do ácido cinâmico podem servir para a elaboração de compostos líderes de maior potencialidade e menor toxicidade para organismos não alvos e assim desenvolver bons candidatos a agentes leishmanicidas.

### 3. JUSTIFICATIVA

Diante do que foi exposto em relação à problemática que é o vetor *Aedes aegypti* e os microrganismos responsáveis em disseminar doenças infecciosas de cunho grave, fica evidente a pertinência da pesquisa utilizando estratégias sintéticas para o controle no manejo deste vetor e a busca por terapêuticos mais eficazes que os encontrados no mercado. Assim, como explorar o estudo de moléculas oriundas de fontes naturais como designer para o planejamento de inseticidas e fármacos eficientes e com baixa toxicidade para o meio ambiente.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Geral

Planejar e sintetizar derivados do ácido cinâmico de forma eficiente e eficaz para, posteriormente, avaliar o potencial biológico (Larvicida, Antimicrobiano e Leishmanicida) visando à busca de inseticidas e fármacos eficazes e menos tóxicos para a saúde humana e meio ambiente.

#### 4.2. Específicos

❖ Elaborar o estudo *in silico* dos derivados do ácido cinâmico (derivados cinamatos *n*-substituídos e  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas) tanto os obtidos no período do mestrado quanto os sintetizados no presente trabalho.

❖ Sintetizar os derivados cinamatos *n*-substituídos por meio da reação de Olefinação de HWE e esterificação;

❖ Sintetizar os ácidos cinâmicos *n*-substituídos e  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas por meio das reações de hidrólise alcalina e reação de Passerini, respectivamente.

❖ Avaliar o potencial larvicida dos derivados cinamatos *n*-substituídos (**SFD1**, **SFD2**, **SFD3**, **SFDD**, **Ap-Cl**, **SAF3** e **SAF4**) e  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas (**SFD4-SFD10** e **SFD45**);

❖ Determinar o tempo de ação larvicida do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**);

❖ Fazer o estudo morfológico da larva submetida ao melhor composto larvicida, *p*-clorocinamato de etila (**SFD10**);

- ❖ Identificar e quantificar o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) no extrato larval via CLAE - UV;
- ❖ Avaliar a quantificação proteica e atividade catalítica da AChE presente no extrato larval do *Aedes aegypti*;
- ❖ Avaliar a via mecanística dos ésteres cinâmicos *n*-substituídos frente à larva do *Aedes aegypti* pelo estudo inibitório *in vitro* da AChE presente no extrato larval;
- ❖ Avaliar a viabilidade celular dos cinamatos de etila *n*-substituídos (**SF1**, **SF3**, **SF10**, **SF11** e **SFD2**);
- ❖ . Avaliar o grau de ecotoxicidade do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) frente à *Lactuca sativa*; *Allium cepa* e *Solanum lycopersicum* e *Oreochromis niloticus* (Tilápia do nilo).
- ❖ Explorar a atividade antifúngica dos derivados do ácido cinâmico (ácidos e ésteres cinâmicos *n*-substituídos) frente às *Candida albicans* e *Candida neoformans*;
- ❖ Explorar a atividade leishmanicida das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas frente à *Leishmania amazonensis*.

## 5. EXPERIMENTAL

Esta pesquisa se desenvolveu no Laboratório de Química Orgânica Aplicada a Materiais e Compostos Bioativos (LMC), do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em colaboração com o Laboratório de Química Medicinal (LQM); Biologia Molecular (LBM) e de Eletroquímica Avançada (LEAP). Na sua execução utilizou-se reagentes, solventes, equipamentos e técnicas espectroscópicas para a formação/caracterização dos derivados do ácido cinâmico e  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas. Todos serão descritos a seguir.

### 5.1. Reagentes, Solventes e Condições

Na elaboração da síntese, foram utilizados reagentes e solventes adquiridos da Sigma Aldrich/Merck, Vetec, Dinâmica e Synth (grau P.A.). O tetraidrofurano (THF) foi tratado com sódio metálico e benzofenona, e imediatamente foi destilado antes do uso, ao passo que o etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) foi tratado com iodo e magnésio metálico; clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) foram secos com pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Algumas reações foram conduzidas em condições anidras e sob atmosfera de argônio, à temperatura ambiente e/ou elevadas para os derivados cinamatos e  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas como descritas nas preparações.

### 5.2. Métodos Cromatográficos

As cromatografias por adsorção foram realizadas usando sílica-gel 60 (0,063-0,200 mm); já nas cromatografias em camada delgada foram usadas sílica-gel 60 PF<sub>254</sub> para cromatoplasmas de vidro com dimensões de 10 x 5 cm preparadas no laboratório, e sílica gel 60 F<sub>254</sub> para placas obtidas a partir de cromatofolhas de alumínio. Ambas as sílicas e cromatofolhas de alumínio foram adquiridas comercialmente pela Merck. Os eluentes empregados estão descritos nas respectivas preparações. A análise cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) foi feita no laboratório de Química Medicinal (LQM), o modelo CLAE - UV utilizado foi o SIL20AHT (Shimadzu ®, Japan, Tokyo). A separação ocorreu em coluna cromatográfica de sílica funcionalizada com C<sub>18</sub> Supelco Discovery ® (25 cm x 4.6 mm, 5 $\mu$ m) com detecção UV em 254 nm.

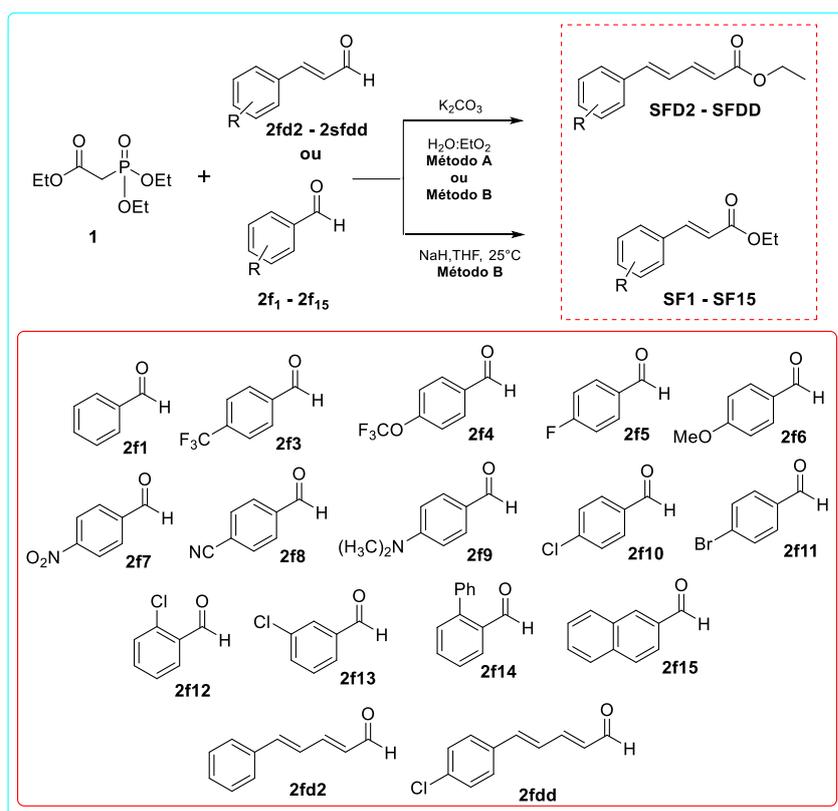
### 5.3. Métodos Espectroscópicos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) utilizando a técnica DEPTQ foram obtidos pelo Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) em equipamento Bruker com frequência de 600 e 400 MHz. Utilizou-se na preparação das amostras clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ) adquiridos comercialmente da *Cambridge Isotope Laboratories*. As multiplicidades dos sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: simpleto (s), dupletto (d), duplo dupletto (dd), triplo dupletto (td), tripleto (t), quarteto (q) e multipletto (m).

Os espectros no Infravermelho (IV) com transformada de Fourier foram obtidos em um aparelho Shimadzu IR PRESTINGE. Os cromatogramas de massa de alta resolução, por sua vez, foram obtidos pelo método tune\_ESI.m em um equipamento HcTultra PTM. E a análise de inibição enzimática foi realizada no espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu modelo UV – 19001.

### 5.4 Sínteses

**Esquema 1:** Síntese dos cinamatos de etila *n*-substituídos

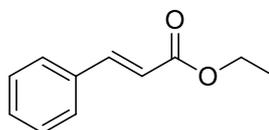


Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

**Método A:** Uma solução de 2-fosfonopropionato de trietila (4,0 mmol) foi adicionada a uma solução aquosa de  $K_2CO_3$  (8,3mmol). A mistura reacional foi resfriada a  $0^\circ C$ , e em seguida, foi adicionada uma solução de cinamaldeído (3,0 mmol) (**SFD2**) em éter etílico. A mistura reacional ficou sob agitação por 24h a  $25^\circ C$ .

**Método B:** Em uma suspensão sob agitação de NaH (3,0 mmol) em THF (7,8 mL) a  $0^\circ C$  em atmosfera de  $N_2$ , foi adicionada uma solução de 2-fosfonopropionato de trietila (3,0 mmol) em THF (15mL). A mistura resultante foi agitada durante o período de 1h. Logo após, foi adicionada na mistura uma solução de aldeído aromático *n*-substituído (**2f1-2f15**) ou *p*-clorocinamaldeído (**2SFDD**) em THF (7,8 mL) gota a gota. A mistura reacional foi aquecida a  $25^\circ C$  e agitada por 24h, em seguida foi adicionada uma solução saturada de  $NH_4Cl$ , conforme o método estabelecido por Bezerra França *et al.* (2021). A fase aquosa, em ambos os métodos, foi extraída com EtOAc (3 x 50 mL) e a fase orgânica foi seca com  $Na_2SO_4$ , filtrada e concentrada a pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (20% de EtOAc/hexano).

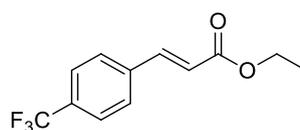
#### 5.4.1 Cinamato de etila (**SF1**):



**Cinamato de etila**

Óleo amarelo claro; rendimento: 80%. IV (ATR) ( $cm^{-1}$ ): 3028 ( $\nu_{s}C-H$  e  $\nu_{as}CH$ ); 2980 ( $\nu_{s}CH_2/CH_3$  e  $\nu_{as}CH_2/CH_3$ ); 1705 ( $\nu C = C-CO-O$ ); 1636 ( $\nu C = C$  dupla *trans*); 1573, 1496, 1447 ( $\nu C=C$  Aromático); 1305–1268 ( $\nu C-O$ ); 977 ( $\delta C-H$  dupla *trans*); 766–683 ( $\delta_{as}C-H$  Aromático). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,5 (m, 2H); 7,4 (m, 3H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 167,0 (C=O); 144,6 (CH); 134,5 (C); 130,2 (CH); 128,9 (CH); 128,1 (CH); 117,0 (CH); 60,5 ( $CH_2$ ); 14,3 ( $CH_3$ ).

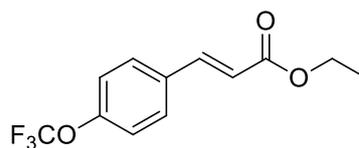
#### 5.4.2. *p*-trifluorometilcinamato de etila (**SF3**):



***p*-trifluorometilcinamato de etila**

Óleo verde; rendimento: 99%. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 16$  Hz, 1H); 7,7 (dd, 4H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,4 (C=O); 142,7 (CH); 137,9 (C); 131,6 (C); 131,6 (CH); 128,1 (CH); 125,8 (CH); 60,8 ( $\text{CH}_2$ ); 14,6 ( $\text{CH}_3$ ).

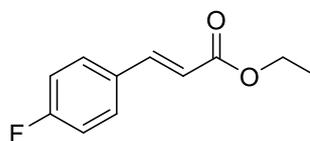
5.4.3. *p*-trifluorometoxicinamato de etila (**SF4**):



***p*-trifluorometoxicinamato de etila**

Óleo verde; rendimento: 62%. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 16,1$  Hz, 1H); 7,6 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H); 7,2 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 1,4 (t,  $J = 7,1$  Hz). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 167,0 (C=O); 143,1 (CH); 133,1 (C); 122,0 (C); 121,5 (CH); 119,6 (CH); 61,0 ( $\text{CH}_2$ ); 14,6 ( $\text{CH}_3$ ).

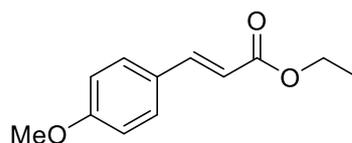
5.4.4. *p*-etil *p*-fluorocinamato (**SF5**):



***p*-fluorocinamato de etila**

Óleo verde claro, rendimento: 53%. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,5 (dd,  $J = 5,5$  Hz, 2H); 7,1 (t,  $J = 8,6$  Hz, 2H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,9 (C=O); 165,1 (C); 162,6 (C); 143,3 (CH); 130,8 (F); 129,9 (CH); 118,1 (CH); 116,1 (C); 115,9 (CH); 60,6 ( $\text{CH}_2$ ); 14,3 ( $\text{CH}_3$ ).

5.4.5. *p*-metoxicinamato de etila (**SF6**):

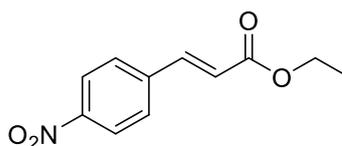


***p*-metóxicinamato de etila**

Óleo amarelo claro, rendimento: 60%. IR (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2979-2935 ( $\nu_{\text{CH}_2/\text{CH}_3}$  e  $\nu_{\text{CH}_2/\text{CH}_3}$ ); 1703 ( $\nu_{\text{C}} = \text{grupo éster conjugado com C-CO-O}$ ); 1628 ( $\nu_{\text{C}} = \text{C dupla trans}$ ); 1602, 1512, 1441 ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  Aromático); 1250 ( $\nu_{\text{CO}}$ ); 1169 (C-C); 978 ( $\delta_{\text{as C-H}}$  dupla *trans*);

828 ( $\delta$  asCH Aromático). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,6 (d,  $J = 16$  Hz, 1H); 7,5 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H); 6,9 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H); 6,3 (d,  $J = 16$  Hz, 1H); 4,25 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 3,8 (s, 3H); 1,33 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 167,4 (C=O); 161,4 (C); 144,3 (CH); 129,7 (CH); 127,2 (C); 115,8 (CH); 114,3 (CH); 60,3 ( $\text{CH}_2$ ); 55,4 (C); 14,3 ( $\text{CH}_3$ ).

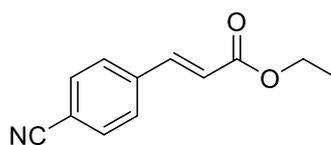
#### 5.4.6. *p*-nitrocinamato de etila (SF7):



***p*-nitrocinamato de etila**

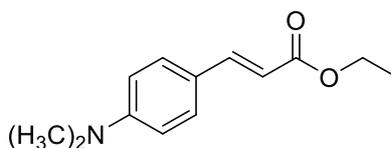
Pó amarelo, rendimento: 70%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3077 ( $\nu\text{C-H}$  e  $\nu\text{asC-H}$ ); 2918-2849 ( $\nu\text{sCH}_2/\text{CH}_3$  e  $\nu\text{asCH}_2/\text{CH}_3$ ); 1709 ( $\nu\text{C} = \text{grupo éster conjugado com C-CO-O}$ ); 1643 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  dupla *trans*); 1593, 1500 ( $\nu\text{C}=\text{C}$  Aromático); 1516-1512 (grupo  $\nu\text{sC-NO}_2$  Nitro); 1331-1300 ( $\nu\text{asC-NO}_2$  grupo Nitro); 976 ( $\delta\text{C-H}$  dupla *trans*); 842 ( $\delta\text{asCH}$  Aromático). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,2 (dd,  $J = 8,8$  Hz, 2H); 7,7 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H); 7,7 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H); 6,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,0 (C=O); 141,6 (CH); 140,6 (C); 124,2 (C); 124,2 (CH); 122,6 (CH); 60,9 ( $\text{CH}_2$ ); 14,2 ( $\text{CH}_3$ ).

#### 5.4.7. *p*-cianocinamato de etila (SF8).

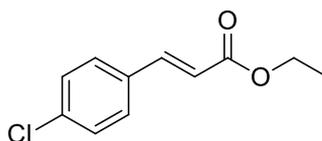


***p*-cianocinamato de etila**

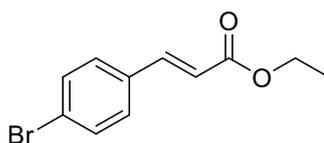
Creme em pó cristalino, rendimento: 66%. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (dd,  $J = 8,4$  Hz, 2H); 7,6 (d,  $J = 17,4$  Hz, 1H); 7,6 (dd,  $J = 8,4$  Hz, 2H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 165,8 (C=O); 141,8 (CH); 138,4 (C); 132,3 (CH); 128,0 (CH); 121,6 (CH); 118,0 (C); 60,6 ( $\text{CH}_2$ ); 13,9 ( $\text{CH}_3$ ).

5.4.8. *p*-dimetilaminocinamato de etila (SF9):***p*-dimetilaminocinamato de etila**

Pó amarelo, rendimento: 66%. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,6 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H); 7,4 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H); 6,7 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H); 6,2 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H); 4,2 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 3,0 (s, 6H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 167,9 (C=O); 151,7 (C); 145,1 (CH); 129,7 (CH); 112,6 (CH); 111,8 (CH); 60,1 ( $\text{CH}_2$ ); 40,1 ( $\text{CH}_3$ ); 14,4 ( $\text{CH}_3$ ).

5.4.9. *p*-clorocinamato de etila (SF10).***p*-clorocinamato de etila**

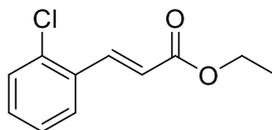
Óleo amarelo; rendimento: 83%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2981 ( $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2/\text{CH}_3$  e  $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2/\text{CH}_3$ ); 1709 ( $\nu_{\text{C}} = \text{C-CO-O-}$  grupo éster conjugado); 1637 ( $\nu_{\text{C}} = \text{C}$  dupla *trans*); 1592, 1489, 1450 ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  Aromático); 1267 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ); 1166 (C-C); 975 ( $\delta_{\text{C-H}}$  dupla *trans*); 820 ( $\delta_{\text{as}}\text{C-H}$  Aromático). 494 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ ). RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,4 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H); 7,3 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,8 (C=O); 143,1 (CH); 136,1 (C); 132,9 (C); 129,2 (CH); 129,1 (CH); 118,8 (CH); 60,6 ( $\text{CH}_2$ ); 14,3 ( $\text{CH}_3$ ).

5.4.11. *p*-bromocinamato de etila (SF11):***p*-bromocinamato de etila**

Óleo amarelo, rendimento: 75%. RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,5 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 7,4 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,1$

Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,7 (C=O); 143,2 (CH); 133,3 (C); 132,1 (CH); 129,4 (CH); 124,4 (C); 118,9 (CH); 60,6 ( $\text{CH}_2$ ); 14,3 ( $\text{CH}_3$ ).

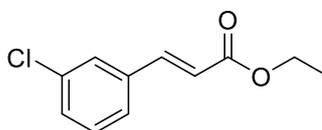
5.4.12. *o*-clorocinamato de etila (SF12):



***o*-clorocinamato de etila**

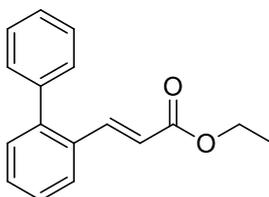
Óleo verde claro, rendimento: 81%. IR (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2978 ( $\nu\text{CH}_2/\text{CH}_3$  e  $\nu\text{asCH}_2/\text{CH}_3$ ); 1709,9 ( $\nu\text{C} = \text{grupo éster conjugado com C-CO-O}$ ); 1635,7 ( $\nu\text{C} = \text{C dupla trans}$ ); 1627,7, 1465,7, 1442,5 ( $\nu\text{C}=\text{C Aromático}$ ); 1258 ( $\nu\text{CO}$ ); 1166 (C-C); 979,3 ( $\delta\text{C-H dupla trans}$ ); 755,9 ( $\delta\text{asCH Aromático}$ ). 452,8 ( $\nu\text{C-Cl}$ ). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,1 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,6 (dd,  $J = 7,3$  Hz, 1H); 7,4 (dd,  $J = 7,4$  Hz, 1H); 7,3 (dd,  $J = 7,4$  Hz, 1H); 7,3 (dd,  $J = 7,0$  Hz, 1H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,5 (C=O); 140,4 (CH); 134,9 (C); 132,8 (C); 131,0 (CH); 130,2 (CH); 127,6 (CH); 127,1 (CH); 120,9 (CH); 60,7 ( $\text{CH}_2$ ); 14,3 ( $\text{CH}_3$ ).

5.4.13. *m*-clorocinamato de etila (SF13):

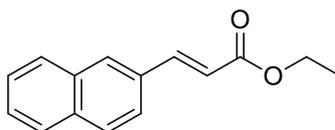


***m*-clorocinamato de etila**

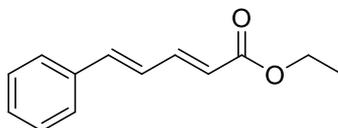
Óleo verde escuro, rendimento: 75%. IR (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2980,7 ( $\nu\text{CH}_2/\text{CH}_3$  e  $\nu\text{asCH}_2/\text{CH}_3$ ); 1702,8 ( $\nu\text{C} = \text{grupo éster conjugado com C-CO-O}$ ); 1639,7 ( $\nu\text{C} = \text{C dupla trans}$ ); 1568,2, 1476,8, 1421,9 ( $\nu\text{C}=\text{C Aromático}$ ); 1263,2 ( $\nu\text{CO}$ ); 1165,2 (C-C); 976,5 ( $\delta\text{C-H dupla trans}$ ); 781,2 – 664,9 ( $\delta\text{asCH Aromático}$ ). 433,0 ( $\nu\text{C-Cl}$ ). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,5 (s, 1H); 7,4 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 7,3 (m, 1H); 7,3 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,6 (C=O); 143,0 (CH); 136,3 (C); 134,9 (C); 130,1 (CH); 127,8 (CH); 126,2 (CH); 119,8 (CH); 60,7 ( $\text{CH}_2$ ); 14,3 ( $\text{CH}_3$ ).

5.4.14. *o*-fenil-cinamato de etila (SF14):***o*-fenil-cinamato de etila**

Óleo amarelo claro; rendimento: 83,4%. RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,7 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 7,4 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H), 7,3 (t,  $J = 7,6$  Hz, 3H); 7,3 (d,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 4,2 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).

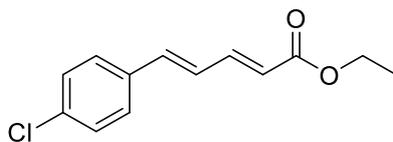
5.4.15. (*E*)-etil 3-(naftalen-2-il) acrilato (SF15):**(*E*)-etil 3-(naftalen-2-il) acrilato**

Sólido; rendimento: 53,0 %. RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,5 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H); 8,2 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H); 7,9 (t,  $J = 9,1$  Hz, 2H), 7,7 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H); 7,6 (t,  $J = 7,1$  Hz, 1H); 7,5 (t,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 7,5 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 6,5 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H); 4,3 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).

5.4.16. (*2E,4E*)-Etil-5-fenil-penta-2,4-dienoato (SFD2):**(*2E,4E*)-5-fenilpenta-2,4-dienoato de etila**

Óleo amarelo claro, rendimento: 26%. RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,5 (dd,  $J = 8,6$  Hz, 3H); 7,4 (td,  $J = 15,6$  Hz, 1H); 7,4 (td,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 7,3 (td,  $J = 15,8$  Hz, 1H); 6,9 (d,  $J = 15,0$  Hz, 1H); 6,0 (d,  $J = 15,3$  Hz, 1H); 4,2 (q,  $J = 7,1$ , 2H); 1,3 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 167,2 (C); 144,6 (CH); 140,5 (CH); 136,2 (C); 129,1 (CH); 128,9 (CH); 127,3 (CH); 126,4 (CH); 121,5 (CH); 60,4 ( $\text{CH}_2$ ); 14,4 ( $\text{CH}_3$ ).

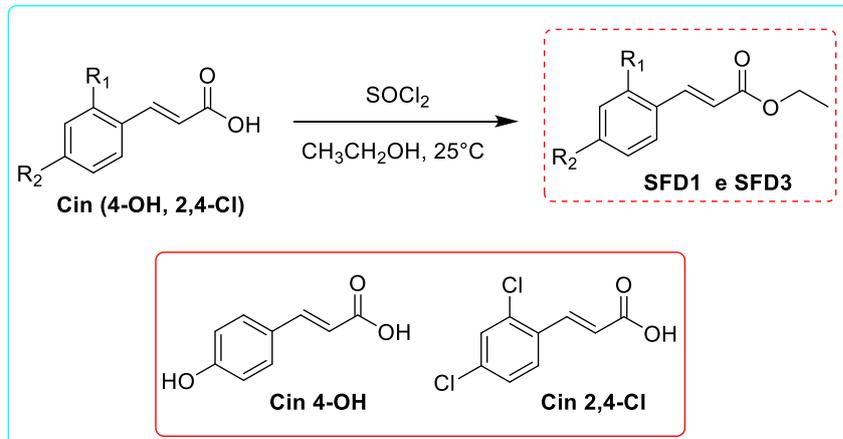
5.4.17. (2E,4E)-5-(4-clorofenil)penta-2,4-dienoato de etila (SFDD):



(2E,4E)-5-(4-clorofenil)penta-2,4-dienoato de etila

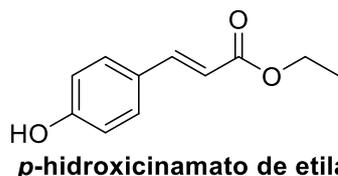
Sólido branco, rendimento: 80%. IR (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2971,0 – 2922,9 ( $\nu\text{sCH}_2/\text{CH}_3$  e  $\nu\text{asCH}_2/\text{CH}_3$ ); 1696,2 ( $\nu\text{C} = \text{grupo éster conjugado com C-CO-O}$ ); 1610,7 ( $\nu\text{C} = \text{C dupla trans}$ ); 1574,1, 1476,8, 1446 ( $\nu\text{C}=\text{C Aromático}$ ); 1232,5 ( $\nu\text{CO}$ ); 1128,6 (C-C); 842 ( $\delta$  C-H dupla *trans*); 799,5 ( $\delta\text{asCH Aromático}$ ). 513,0 ( $\nu\text{C-Cl}$ ). RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,41 (d,  $J = 15,1$ , 1H); 7,3 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H); 7,3 (d,  $J = 8,5$ , 2H); 6,8 (s, 2H); 6,0 (d,  $J = 15,2$  Hz, 1H); 4,2 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 1,3 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,9 (C=O); 144,1 (CH); 138,8 (CH); 134,7 (C); 134,6 (C); 129,0 (CH); 128,3 (CH); 126,8 (CH); 121,9 (CH); 60,4 ( $\text{CH}_2$ ); 14,3 ( $\text{CH}_3$ ).

**Esquema 2:** Síntese do *o*, *p*- diclorocinamato de etila (SFD3) e *p*-hidroxicinamato de etila.

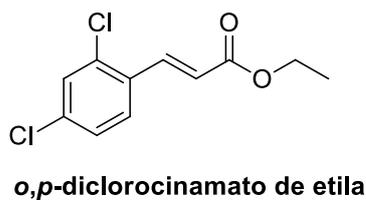


Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

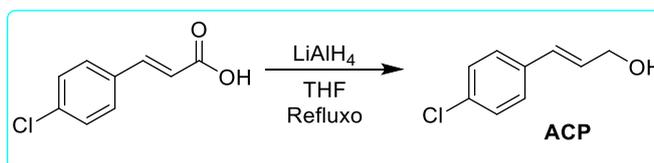
A uma solução de ácido 2,4 -diclorocinâmico (0,61 mmol, **Cin (4-OH, 2,4-Cl)**) em etanol anidro (10 mL) sob agitação vigorosa, adicionou-se cloreto de tionila (8,4 mmol) a 0 °C. A mistura reacional foi agitada durante 48 h a 25 °C e então foi diluída com água e extraída com EtOAc (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , em seguida filtrada e concentrada.

5.4.18. *p*-hidroxicinamato de etila (SFD1):

Pó amarelo, rendimento: 70%. RMN<sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,6 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H); 7,4 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 6,9 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 6,3 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H); 4,3 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,3 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 168,0 (C); 158,2 (C); 144,8 (CH); 131,1 (CH); 127,2 (CH); 116,0 (CH); 115,6 (CH); 60,7 (CH<sub>2</sub>); 14,4 (CH<sub>3</sub>).

5.4.19. *o,p*-diclorocinamato de etila (SFD3):

Óleo verde claro, rendimento: 83%. RMN<sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8,0 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H); 7,5 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 7,4 (s, 1H); 7,3 (dd, *J* = 8,4, 1H); 6,4 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H); 4,3 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,3 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). RMN<sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 166,4 (C); 139,3 (CH); 136,4 (C); 135,7 (C); 131,6 (C); 130,2 (CH); 128,6 (CH); 127,7 (CH); 121,6 (CH); 60,9 (CH<sub>2</sub>); 14,4 (CH<sub>3</sub>).

**Esquema 3:** Síntese do álcool *p*-clorocinâmico (ACP).

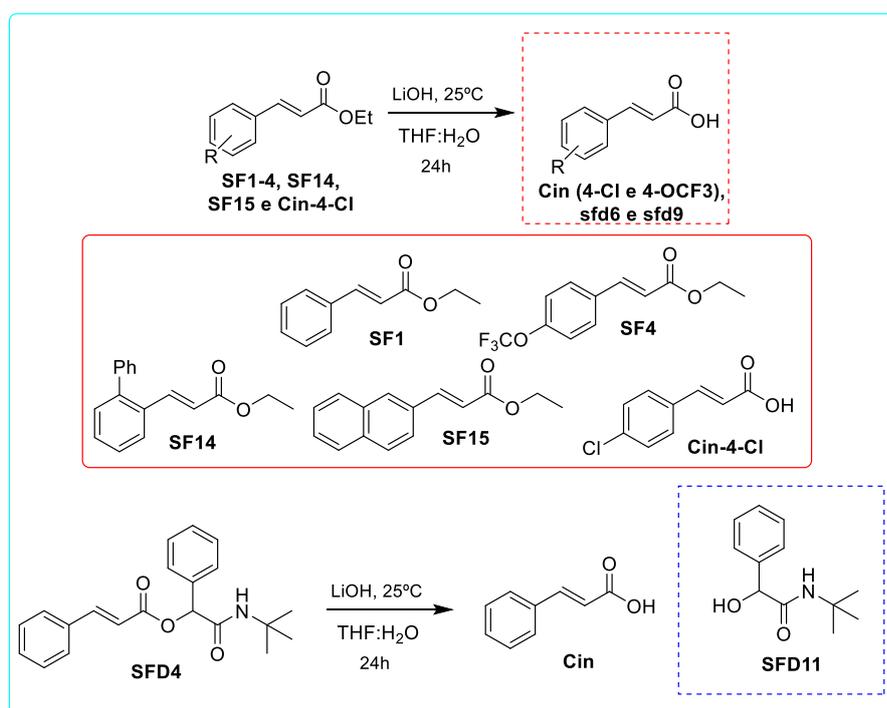
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

Uma solução de 6,53 mL de ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**, 1,5 mmol em THF) foi adicionada gota a gota em uma solução suspensa de hidreto de lítio alumínio (LiAlH<sub>4</sub>, 6 mmol em THF) sob agitação vigorosa e em atmosfera inerte. Logo após, a reação foi deixada sob refluxo por o período de 24h, e posteriormente adicionada na mistura reacional água destilada

(3,27 mL) a 0°C e deixada sob agitação por mais 2h. Em seguida, a mistura reacional foi transferida gota a gota para um balão contendo EtOAc (10mL), ficando sob agitação por 15 minutos. Decorrido esse período, a mistura reacional foi extraída duas vezes com EtOAc, e a fase orgânica foi reunida, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à pressão reduzida.

Sólido branco, rendimento: 99%. IR (ATR) (cm<sup>-1</sup>): 3552-2407 (ν-OH); 1673 (νC = C dupla *trans*); 1623, 1579, 1547 e 1482 (ν C=C Aromático); 1391 (ν C-O); 1094 (ν C-C); 819 (δ <sub>as</sub>C-H); 977 ((δ C-H); 610 (νC-Cl).

#### Esquema 4: Síntese dos ácidos cinâmicos *n*-substituídos e amido álcoois.



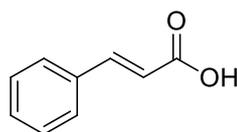
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

A uma solução de éster cinâmico *n*-substituído (SF1-4, SF14-15 e Cin-4-Cl) /  $\alpha$ -aciloxicarboxiamida (SFD4) (1,33 mmol) em THF:H<sub>2</sub>O (2:1) foi acrescentado LiOH (5,33 mmol). A mistura reacional ficou sob agitação por um período de 24h, à temperatura ambiente (25 °C). A mistura bruta foi neutralizada com uma solução de HCl (1 M), e a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x10 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica (10% de EtOAc/hexano).

A maioria dos ácidos cinâmicos *p*-substituídos (Cin-4Br, Cin-4CN, Cin-4-F, Cin-4-OMe, Cin-4-CF<sub>3</sub>, Cin-4-NO<sub>2</sub> e Cin-2,4-Cl) foram obtidos e caracterizados no período do mestrado (França, 2019). Ao passo que os demais ácidos cinâmicos *n*-substituídos (Cin-2-Cl,

**Cin-3-Cl, Cin-2-OMe, Cin-3,4-Cl, Cin-3,4-OCH<sub>3</sub>, Cin-4-Ph e Cin-3-OH-4-OCH<sub>3</sub>** foram sintetizados pelo Grupo de Pesquisa em Química Biológica e Molecular (GPQBioMol) do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

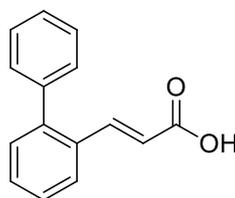
#### 5.4.20. Ácido cinâmico (**Cin**):



**Ácido cinâmico**

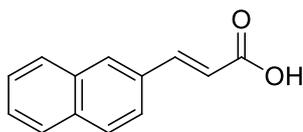
Pó cristalino branco; rendimento: 98%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3066-2883 ( $\nu$ -OH); 1673 (C=O); 1667 ( $\nu$ C = C); 1628, 1508, 1448 ( $\nu$  C=C Aromático); 1273 ( $\nu$  C-O); 977 ( $\delta$  C-H); 709-682 ( $\delta_{\text{as}}$ C-H). RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,8 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,6 (m, 2H); 7,4 (m, 3H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 171,2 (C=O); 147,0 (CH); 134,0 (C); 134,0 (CH); 130,7 (CH); 129,0 (CH); 128,3 (CH); 117,1 (CH).

#### 5.4.21. Ácido *o*-fenilcinâmico (**sfd6**):

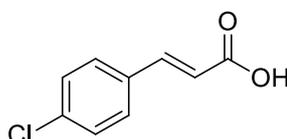


**Ácido *o*-fenilcinâmico**

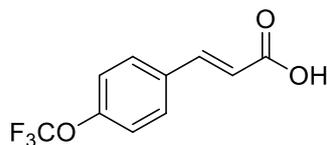
Pó cristalino creme; rendimento: 56%. RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,7 (s, 1H); 7,4 (t,  $J = 8,1$  Hz, 3H); 7,4 (s, 1H), 7,4 (s, 2H), 7,3 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 6,4 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 169,1 (C=O); 144,4 (CH); 142,9 (C); 139,9 (C); 132,5 (C); 130,5 (CH); 129,9 (CH); 129,8 (CH); 128,2 (CH); 127,6 (CH); 127,5 (CH); 126,8 (CH); 119,1 (CH).

5.4.22. (*E*)-3-(naftalen-2-il) ácido acrílico (**sfd9**):**(E)-3-(naftalen-2-il) ácido acrílico**

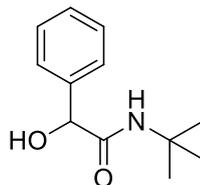
Pó branco; rendimento: 99%. RMN  $^1\text{H}$  (600MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 8,2 (s, 1H); 7,9 (m, 3H); 7,8 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 7,7 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,6 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H); 6,7 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H).

5.4.23. Ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**):**Ácido *p*-clorocinâmico**

Cristal incolor; rendimento: 81%. RMN  $^1\text{H}$  (600MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 7,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,5 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 167,4 (C=O); 142,5 (CH); 133,5 (C); 134,7 (C); 133,2 (C); 129,9 (CH); 128,9 (CH); 120,2 (CH).

5.4.24. Ácido *p*-trifluorometoxicinâmico (**Cin-4-OCF<sub>3</sub>**):**Ácido *p*-trifluorometoxicinâmico**

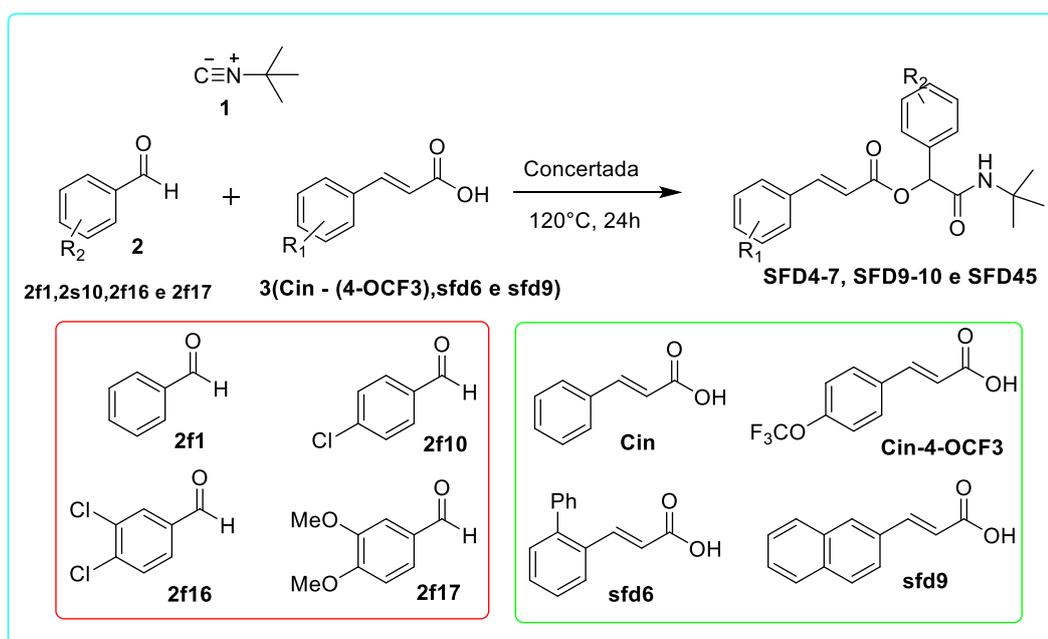
Pó branco; rendimento: 98%. RMN  $^1\text{H}$  (600MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,8 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H); 7,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,4 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H); 6,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 167,4 (C); 149,3 (C); 142,2 (CH); 133,6 (C); 130,2 (CH); 121,3 (CH); 120,6 (CH).

5.4.25. *N*-(*terc*-butil)-2-hidroxi-2-fenilacetamida (**sfd11**):

**N-(*terc*-butil)-2-hidroxi-  
2 fenilacetamida**

Pó branco; rendimento: 90%. RMN  $^1\text{H}$  (600MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,4 (s, 4H); 7,3 (m, 1H); 5,8 (s, 1H); 4,9 (s, 1H); 1,3 (s, 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 171,3 (C=O); 139,9 (C); 128,9 (CH); 128,6 (CH); 126,8 (CH); 74,3 (CH); 51,5 (C); 128,6 ( $\text{CH}_3$ ).

**Esquema 5:** Preparação das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas por meio da reação de Passerini.

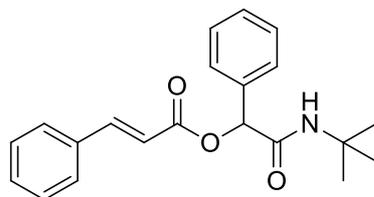


**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

**Método A:** Em um balão/tubo de centrífuga, foram adicionados o ácido cinâmico *n*-substituído (1,1 mmol) (**3(Cin-(4-OCF<sub>3</sub>), sfd6-9)**), aldeído aromático *n*-substituído (1 mmol) (**2f (1,10,16 e 17)**) e isocianeto de *terc*-butila (1 mmol), respectivamente, em seguida, a mistura reacional ficou sob agitação a uma temperatura de 120 °C livre de solvente por um período de 24h (Bousquet *et al.*, 2012). O produto bruto foi lavado com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , em seguida a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 30mL), e a fase orgânica seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada e concentrada à pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica (20% de EtOAc/hexano).

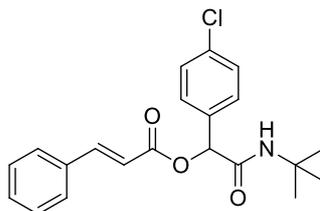
**Método B:** A uma solução de aldeído aromático *n*-substituído (1,0 mmol) em solvente orgânico ((CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CHCl<sub>3</sub>/DMF) (1,5 mL)), foi adicionado o ácido cinâmico *n*-substituído (1,1 mmol) que ficou sob agitação por 10 minutos, seguida da adição de uma solução de isocianeto de *tert*-Butila (1 mmol) em solvente orgânico selecionado ((CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CHCl<sub>3</sub>/DMF) (0,5 mL)). A mistura reacional foi levada a uma temperatura de 25°C, ao utilizar o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e para os demais solventes a reação ficou sob refluxo. Ambos os métodos ficaram sob agitação por um período de 24h. Logo depois, a mistura foi lavada com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, em seguida a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 30mL), e a fase orgânica seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica (20% de EtOAc/hexano).

5.4.26. 2-(*tert*-butilamino)-2-oxo-1-feniletil cinamato (**SFD4**):



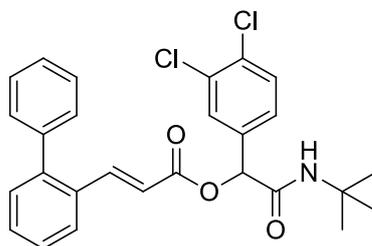
**2-(*tert*-butilamino)-2-oxo-1-feniletil cinamato**

Pó creme; rendimento: 43%. IV (ATR) (cm<sup>-1</sup>): 3280,9 (νN-H); 3078,4 (νN-H no plano dobrado); 2968,4 – 2922,2 (νC-H e νCH<sub>3</sub>); 1712,8 (νC=C-CO-O- grupo éster conjugado); 1651,1 (νC=O-N-H- Grupo amida); 1651,1 (νC = C *dupla trans*); 1556,6 (νC = C aromático); 1496,8 (νC = C aromático); 1450,5 (νC = C aromático); 1361,7 (νC-N); 1263,3 – 1251,8 (ν(H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>C- *tert*-Butila); 972,1 (δC-H fora do plano); 705,9 – 696,3 (δ<sub>as</sub>C-H Aromático monossubstituído). RMN <sup>1</sup>H (600MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8,1 (s, 1H); 7,8 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H); 7,5 (td, *J* = 9,4 Hz, 2H); 7,5 (td, *J* = 9,4 Hz, 3H); 7,4 (m, 5H); 6,5 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H); 6,1 (s, 1H); 1,4 (s, 9H). RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 167,4 (C); 165,2 (C); 146,5 (CH); 136,1 (C); 134,1 (C); 130,7 (CH); 129,8 (CH); 129,0 (CH); 128,8 (CH); 128,7 (CH); 128,3 (CH); 127,5 (CH); 116,9 (CH); 75,7 (CH); 51,6 (C); 28,7 (CH<sub>3</sub>). HRMN (ESI-TOF) *m/z*: calcd. para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 337,42; encontrada: 359,9.

5.4.27. 2-(*terc*-butilamino)-1-(4-clorofenil)-2-oxoetil cinamato (SFD5):

**2-(*terc*-butilamino)-1-(4-clorofenil)-  
2-oxoetil cinamato**

Pó Amarelo claro; rendimento: 59%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3277,0 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3072,6 ( $\nu\text{N-H}$  no plano dobrado); 2970,4 – 2914,4 ( $\nu\text{C-H}$  e  $\nu\text{CH}_3$ ); 1708,9 ( $\nu\text{C}=\text{C}-\text{CO}-\text{O}$ - grupo éster conjugado); 1653,0 ( $\nu\text{C}=\text{O}-\text{N}-\text{H}$ - grupo amida); 1629,8, ( $\nu\text{C} = \text{C}$  dupla *trans*); 1597,0 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1550,8 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1494,8 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1246,0 – 1222,9 ( $\nu(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$ - *terc*-Butila); 972,1 ( $\delta\text{C-H}$  fora do plano); 828,3 ( $\delta_{\text{as}}\text{C-H}$  Aromático 1,4 dissustituído); 792,7 – 773,5 ( $\delta_{\text{as}}\text{C-H}$  Aromático monossustituído). RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,8 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,6 (dd,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 7,4 (m, 4H); 7,3 (d,  $J = 8,5$ , 2H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 6,1 (s, 1H); 1,4 (s, 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 167,2 (C); 165,3 (C); 1147,1 (CH); 135,1 (C); 134,9 (C); 134,2 (C); 131,1(CH); 129,2 (CH); 129,1 (CH); 129,0 (CH); 128,5 (CH); 116,9 (CH); 75,2 (CH); 51,9 (C); 28,9 ( $\text{CH}_3$ ). HRMN (ESI-TOF)  $m/z$ : calcd. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{ClNO}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 371,86; encontrada: 393,9.

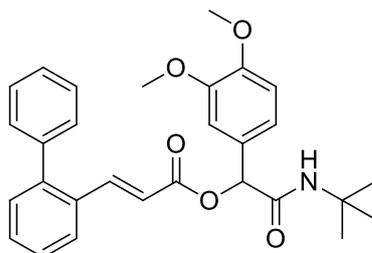
5.4.28. (*E*)-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-diclorofenil)-2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil]-2-il)acrilato (SFD6):

**(*E*)-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-diclorofenil)-  
2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil]-2-il)acrilato**

Pó Branco; rendimento: 30%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3298,3 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3064,9 ( $\nu\text{N-H}$  no plano dobrado); 2974 ( $\nu\text{C-H}$  e  $\nu\text{CH}_3$ ); 1718,6 ( $\nu\text{C}=\text{C}-\text{CO}-\text{O}$ - grupo éster conjugado); 1662,6 ( $\nu\text{C}=\text{O}-\text{N}-\text{H}$ - grupo amida); 1633,7, ( $\nu\text{C} = \text{C}$  dupla *trans*); 1597,0 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1546,9 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1467,8 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1257,0 – 1219,0 ( $\nu(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$ - *terc*-Butila); 987,6 ( $\delta\text{C-H}$

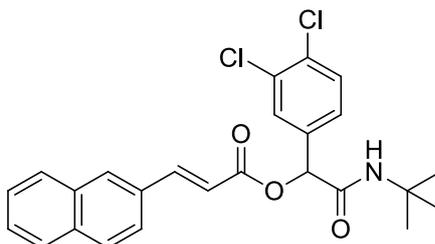
fora do plano); 804,0; 765,7 – 742,3 ( $\delta_{as}$ C-H Aromático 1,3,4-trissubstituído e 1,2-dissubstituído). RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,8 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,7 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 7,5 (m, 4H); 7,4 (m, 5H); 7,3 (dd,  $J = 8,3$  Hz, 2H); 7,2 (s, 1H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 6,0 (s, 1H); 5,9 (s, 1H); 1,3 (s, 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,5 (C); 164,5 (C); 146,0 (CH); 143,5 (C); 139,7 (C); 136,4 (C); 133,0 (C); 132,8 (C); 131,9 (CH); 130,7 (CH); 130,6 (CH); 130,5 (CH); 129,8 (CH); 129,0 (CH); 128,4 (CH); 127,8 (CH); 127,7 (CH); 126,8 (CH); 126,6 (CH); 117,1 (CH); 74,2 (CH); 51,6 (C); 28,6 ( $\text{CH}_3$ ). HRMN (ESI-TOF) m/z: calcd. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 482,40; encontrada: 503,9.

5.4.29. (*E*)-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil]-2-il)acrilato (SDF7):



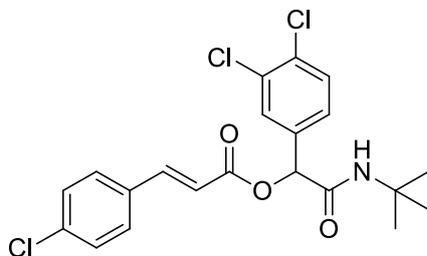
**(*E*)-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil]-2-il)acrilato**

Óleo verde claro; rendimento: 16,1%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3334,9 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3051,3 ( $\nu\text{N-H}$  no plano dobrado); 2953,1 – 2920,2 ( $\nu\text{C-H}$  e  $\nu\text{CH}_3$ ); 2848,9 ( $\nu\text{O-CH}_3$ ); 1707,0 ( $\nu\text{C}=\text{C-CO-O}$ -grupo éster conjugado); 1668,4 ( $\nu\text{C}=\text{O-N-H}$ - grupo amida); 1633,7, ( $\nu\text{C} = \text{C}$  dupla *trans*); 1599,0 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1516,0 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1448,5 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1255,7 – 1220,9 ( $\nu(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$ - *terc*-Butila); 985,6 ( $\delta\text{C-H}$  fora do plano); 852,6 ( $\delta_{as}$ C-H Aromático 1,3,4 trissubstituído); 783,0 ( $\delta_{as}$ C-H Aromático 1,2- dissubstituído); 767,7- 748,4 ( $\delta_{as}$ C-H Aromático 1,3,4 trissubstituído). RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,8 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,7 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H); 7,4 (m, 4H); 7,4 (m, 7H); 7,3 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H); 7,0 (s, 2H); 6,8 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 6,0 (s, 1H); 5,9 (s, 1H); 3,9 (d,  $J = 9,0$  Hz, 6H); 1,3 (s, 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 167,9 (C); 165,2 (C); 149,8 (C); 149,4 (C); 145,6 (CH); 143,5 (C); 140,0 (C); 132,4 (C); 130,8 (CH); 130,5 (CH); 130,0 (CH); 128,9 (C); 128,5 (CH); 127,9 (CH); 127,9 (CH); 127,0 (CH); 120,3 (CH); 118,1 (CH); 111,5 (CH); 111,1 (CH); 75,7 (CH); 56,1 ( $\text{CH}_3$ ); 51,7 (C); 28,9 ( $\text{CH}_3$ ).

5.4.30. *(E)*-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-diclorofenil)-2-oxoetil 3-(naftalen-2-il)acrilato (**SFD9**):

**(E)**-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-diclorofenil)-  
2-oxoetil 3-(naftalen-2-il)acrilato

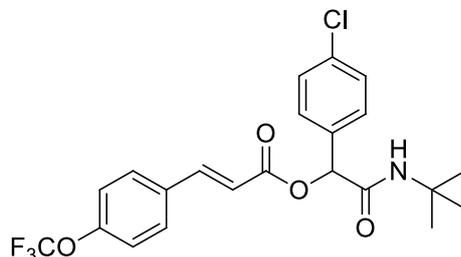
Pó Branco; rendimento: 43,5%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3277,1 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ); 3047,6 ( $\nu_{\text{N-H}}$  no plano dobrado); 2958,8 – 2914,4 ( $\nu_{\text{C-H}}$  e  $\nu_{\text{CH}_3}$ ); 1705,1 ( $\nu_{\text{C=C-CO-O}}$  grupo éster conjugado); 1660,7 ( $\nu_{\text{C=O-N-H}}$  grupo amida); 1626,0, ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  dupla *trans*); 1554,6 ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  aromático); 1473,6 ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  aromático); 1452,4 ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  aromático); 1253,7 – 1220,9 ( $\nu_{(\text{H}_3\text{C})_3\text{C-terc-Butila}}$ ); 979,8 ( $\delta_{\text{C-H}}$  fora do plano); 848,7 ( $\delta_{\text{asC-H}}$  Aromático 1,3,4 trissubstituído); 808,2-788,9 ( $\delta_{\text{asC-H}}$  Aromático 1,3,4 trissubstituído); 746,0 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ ). RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8,0 (s, 1H); 7,9 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,8 (q,  $J = 8,5$  Hz, 4H); 7,7 (dd,  $J = 8,6$  Hz, 1H); 7,6 (s, 1H); 7,5 (m, 2H); 7,4 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H); 7,3 (dd,  $J = 8,4$  Hz, 2H); 6,6 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 6,1 (s, 1H); 1,4 (s, 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,8 (C); 165,2 (C); 147,5 (CH); 136,5 (C); 134,8 (C); 133,5 (C); 133,3 (C); 133,1 (C); 130,9 (CH); 130,8 (CH); 129,5 (CH); 129,1 (CH); 128,9 (CH); 128,1 (CH); 127,9 (CH); 127,2 (CH); 127,0 (CH); 123,6 (CH); 116,6 (CH); 74,6 (CH); 52,0 (C); 28,9 ( $\text{CH}_3$ ). HRMN (ESI-TOF)  $m/z$ : calcd. para  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 456,36; encontrada: 477,9.

5.4.31. *(E)*-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-diclorofenil)-2-oxoetil 3-(4-clorofenil)acrilato (**SFD10**):

**(E)**-2-(*terc*-butilamino)-1-(3,4-diclorofenil)-  
2-oxoetil 3-(4-clorofenil)acrilato

Pó Branco; rendimento: 36,5%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3259,7 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3064,9 ( $\nu\text{N-H}$  no plano dobrado); 2958,8 ( $\nu\text{C-H}$  e  $\nu\text{CH}_3$ ); 1724,4 ( $\nu\text{C=C-CO-O-}$  grupo éster conjugado); 1701,2 ( $\nu\text{C=O-N-H-}$  grupo amida); 1651,1 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  dupla *trans*); 1593,2 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1554,6 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1473,6 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1241,8 ( $\nu(\text{H}_3\text{C})_3\text{C-}$  *terc*-Butila); 976,0 ( $\delta\text{C-H}$  fora do plano); 821,7 ( $\delta_{as}\text{C-H}$  Aromático 1,4 dissustituído); 794,7- 783,1 ( $\delta_{as}\text{C-H}$  Aromático 1,3,4 trissustituído). RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,6 (s, 1H); 7,5 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H); 7,5 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H); 7,4 (d,  $J = 8,4$ , 2H); 7,3 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 6,02 (s, 1H); 6,01 (s, 1H); 1,4 (s, 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 165,4 (C); 163,7 (C); 144,7 (CH); 136,0 (C); 135,1 (C); 132,2 (C); 131,9 (C); 131,4 (C); 129,7 (CH); 128,5 (CH); 128,35 (CH); 128,28 (CH); 125,8 (CH); 115,9 (CH); 73,4 (CH); 50,8 (C); 27,7 ( $\text{CH}_3$ ). HRMN (ESI-TOF)  $m/z$ : calcd. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 440,75; encontrada: 461,8.

5.4.32.(*E*)-2-(*terc*-butilamino)-1-(4-clorofenil)-2 oxoetil 3-(4-(trifluorometoxi)fenil)acrilato (SFD45):



**(*E*)-2-(*terc*-butilamino)-1-(4-clorofenil)-2 oxoetil 3-(4-(trifluorometoxi)fenil)acrilato**

Pó Amarelo claro; rendimento: 41,7%. IV (ATR) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3280,4 ( $\nu\text{N-H}$ ); 3073,2 ( $\nu\text{N-H}$  no plano dobrado); 2971,0 – 2920,0 ( $\nu\text{C-H}$  e  $\nu\text{CH}_3$ ); 1712,6 ( $\nu\text{C=C-CO-O-}$  grupo éster conjugado); 1660,7 ( $\nu\text{C=O-N-H-}$  grupo amida); 1639,5 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  dupla *trans*); 1546,9 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1510,3 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1494,8 ( $\nu\text{C} = \text{C}$  aromático); 1365,6 – 1328 ( $\nu_s\text{CF}_3$ ); 1250 – 1215,1 ( $\nu(\text{H}_3\text{C})_3\text{C-}$  *terc*-Butila); 981,8 ( $\delta\text{C-H}$  fora do plano); 839,0 ( $\delta_{as}\text{C-H}$  Aromático 1,4 dissustituído). RMN  $^1\text{H}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,7 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 7,6 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H); 7,4 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H); 7,36 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H); 7,2 (d,  $J = 8,4$ , 2H); 6,5 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H); 6,1 (s, 1H); 6,0 (s, 1H); 1,4 (s, 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166,9 (C); 164,8 (C); 150,9 (C); 145,0 (CH); 135, (C); 134,6 (C); 132,6 (C); 129,8 (CH); 129,0 (CH); 128,9 (CH); 121,2 (CH); 119,5 (C); 117,7 (CH); 75,2 (CH); 51,8 (C); 28,7 ( $\text{CH}_3$ ).  $\text{cm}^{-1}$ .

## 5.5. Ensaio Larvicidas

A cepa do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) utilizada no presente estudo foi proveniente do laboratório de Química Orgânica Aplicada a Materiais e Compostos Bioativos do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. O preparo das amostras e do ensaio biológico seguiram os critérios de Fujiwara *et al.* (2017) e da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2005) com algumas modificações.

### 5.5.1. Criação e manutenção do *Aedes aegypti*

As larvas do *Aedes aegypti* foram obtidas por meio de ovos depositados em papéis de filtro; que foram adicionados em bacias com água da torneira em repouso, por um período de 48 h, para o processo de eclosão. O repasto sanguíneo com o mosquito fêmea foi necessário, por um período de 1h para a maturação dos ovos, em que utilizou sangue de ave. As larvas foram alimentadas com ração para gatos (Friskies), em prol de seu desenvolvimento em diferentes estágios (L1-L4). Ademais, foram mantidas a uma temperatura média de  $28 \pm 2$  °C e umidade relativa do ar de  $80 \pm 4$ %, com fotoperíodo de aproximadamente 12h. Após o seu desenvolvimento para pupa, essa foi transferida para gaiolas teladas com Nylon (15 x 25 cm), até completar seu desenvolvimento a mosquito adulto, sendo alimentados com uma solução de glicose anidra (Amresco) 10% em chumaços de algodão, trocados diariamente.

### 5.5.2. Ensaio para avaliação da atividade larvicida

Para a realização dos ensaios, foram selecionadas larvas jovens do quarto instar (L4). Os testes foram feitos em triplicata, adicionando-se 20 larvas em copos descartáveis de 50 mL contendo a solução teste (20 mL), em concentrações de 100, 50 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A solução estoque (100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi elaborada solubilizando 0,01 g de derivados cinamatos (**SF1-SF13**, **SFD1-SFD3** e **SFDD**),  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas (**SFD4** – **SFD10** e **SFD45**) ou amido álcoois (**sfd11**) em 0,33% v/v de DMSO ou Tween-80 (0,1% v/v).

O teste larvicida consistiu de uma análise preliminar, que considerou o percentual médio de mortalidade (%M) para classificar a ação larvicida dos compostos, conforme o grau de atividade em: ativa (> 75%), moderada (entre 50 e 75%), fraca (entre 25 e 50%) e inativa (< 25%) (World Health Organization, 2005; França *et al.*, 2021). A equação de Abbott foi utilizada quando houve mortalidade do controle, mas inferior a 5% (Abbott, 1925).

Os compostos considerados ativos ou moderadamente ativos foram sujeitos a uma análise quantitativa para a determinação das CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, assim como os controles positivos. Em todos os ensaios realizados foram utilizados como controles positivos o espinosade (4,0 µg/mL), piriproxifeno (76,15 µg/mL) e temefós (10,4 µg/mL); e negativo o DMSO (0,33% v/v) ou tween-80 (0,1% v/v), mantidos nas mesmas condições das soluções teste.

### 5.5.3. Ensaio de Inibição enzimática frente à AChE presente no extrato larval

#### 5.5.3.1. Preparo do Extrato Larval

Vinte e cinco (25) larvas do quarto instar foram coletadas e adicionadas em um tubo Falcon a 0°C, contendo uma solução tampão fosfato de potássio (pH: 8,0). Em seguida, o extrato foi homogeneizado em um homogeneizador Potter de vidro mantido no banho de gelo. Logo após, os homogenatos foram submetidos à sonicação (três ciclos de 15s cada) utilizando o desmembrador sônico ThermoFisher Scientific (Waltham, MA USA) modelo D100 e posteriormente centrifugados a 6000 rpm por 2:30 segundos a 3°C. Em seguida, o homogenato foi filtrado (microfiltro de 0,22µm) e armazenado a 0°C (Silva *et al.*, 2015).

#### 5.5.3.2. Atividade de quantificação Proteica

Os teores de proteínas totais do extrato larval foram determinados em triplicata de acordo com o método de Bradford (1976) e estimados usando uma curva de calibração construída com a proteína padrão ASB (Albumina Sérica Bovina). A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidroxilação de 1 µmol de substrato por minuto ( $U = \mu\text{mol min}^{-1}$ ), enquanto a atividade específica foi expressa como atividade por mg de proteína total ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) (Leong *et al.*, 2018).

#### 5.5.3.3. Atividade Catalítica da AChE presente no extrato larval.

A atividade catalítica da acetilcolinesterase no extrato larval do vetor *Aedes aegypti* foi determinada à temperatura ambiente (intervalo de 25 - 28 °C), conforme o método descrito por Ellman *et al.* (1961). A acetiltiocolina (ATChE) foi empregada como substrato da acetilcolinesterase (AChE), e a reação foi monitorada em 420 nm utilizando um

espectrofotômetro. A mistura reacional foi realizada utilizando a solução tampão de fosfato 0,1 M (pH 8,0), 0,34 mM de DTNB, 0,5 mM do substrato e 100µL do extrato larval diluído (1/50;1/100 ou 1/200 de diluição). Nos ensaios de controle, o substrato foi substituído por água deionizada. O tempo reacional foi de 5 min e todos os ensaios foram realizados em triplicata (Silva *et al.*, 2015).

#### 5.5.3.4. Ensaio de inibição enzimática dos cinamatos de etila *n*-substituídos frente à AChE presente no extrato larval.

O ensaio de inibição da AChE utilizando os derivados do ácido cinâmico como inibidores foi realizado pelo método de Silva *et al.* (2015) e Tortelli *et al.* (2006) com algumas modificações. O temefós foi utilizado como controle positivo. As soluções estoques de cada inibidor foi preparada em 0,1% de DMSO. As soluções dos DAC's (2,5µM - 100µM) foram adicionadas em alíquotas do extrato larval diluído e incubadas pôr o período de 20 minutos. Em seguida, a atividade de inibição enzimática foi avaliada utilizando um comprimento de onda de 420 nm. Logo após, o cálculo da cinética de inibição enzimática foi realizado utilizando o software Origin 6.0 (Silva *et al.*, 2015; Tortelli *et al.*, 2006).

#### 5.5.4. Estudo cinético de ação larvicida do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**).

O ensaio larvicida foi repetido para o comportamento **SF10** a fim de quantificar o número de ciclos de sua duração no ambiente, utilizando a concentração que obteve 100% de mortalidade (45 µg/mL) (Bezerra França *et al.*, 2021). Após o período de 24 h de exposição, as larvas mortas foram retiradas da solução teste e outra remessa de larvas em perfeito estado (20 larvas do quarto instar) foi adicionada na respectiva solução. Esse procedimento durou vários dias, até observar a inativação do composto.

#### 5.5.5. Análise morfológica.

##### 5.5.5.1. Avaliação morfológica a partir da Microscopia Óptica.

As larvas do quarto instar do mosquito *Aedes aegypti* foram submetidas à solução do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) (50 µg/mL), com duração de 24 h, logo após, foram recolhidos três indivíduos de ambos os tratamentos (solução do composto **SF10** e controle negativo

(DMSO, 0,33% v/v)) e colocados em um tubo de polietileno na presença de 1,0 mL de etanol (EtOH) (King & Porter, 2004). A análise morfológica dos tratamentos foi realizada com o uso de um microscópio trinocular estéreo com rácio de zoom de 1:7 (amplificação de 0,65 x a 4,5x) combinado a uma câmera digital móvel Motorola g8 Power LITE, de acordo com os critérios estabelecidos por Toledo, Simurro & Balatti (2013).

#### 5.5.5.2. Aplicação da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na análise larval.

As larvas do quarto instar após 24h de exposição ao *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), controle positivo (Temefós) ou negativo (0,025% v/v de Tween – 80) foram coletadas e tratadas pôr um período de 2h em uma solução de 2,5% (v/v) de glutaraldeído em 0,1 M de solução tampão de cacodilato (pH = 7,4) (Correia *et al.*, 2023). Logo após, as amostras foram desidratadas pôr um período de 10 minutos utilizando uma série ascendente de concentrações de etanol (15%, 30%, 60%, 90% e 100%). As amostras desidratadas, por sua vez, foram colocadas em stubs de MEV usando fita dupla adesiva de grafite, metalizada em ouro (Quorum Technology, modo Q150R ES, East Sussex, Reino Unido) e analisadas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão de campo (XL30S FEG, Philips Electron Optics B.V., Holanda) ligado a um sistema EDXS (espectroscopia de raios X por dispersão de energia, Oxford INCA x-act, Oxford Instruments) (Correia *et al.*, 2023).

#### 5.5.6. Análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As soluções empregadas no ensaio larvicida foram preparadas com metanol grau HPLC Merck. O teste larvicida foi elaborado em duplicata para o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) na concentração de 50 µg/mL. Os controles positivo e negativo utilizados foram o temefós e DMSO a 4,6 µg/mL e 0,33% v/v respectivamente (Barros *et al.*, 2015; Fujiwara *et al.*, 2017; World Health Organization, 2005). Antes das larvas serem adicionadas, foi retirada uma alíquota (5 mL) da solução do analito, e após 24 h de exposição larval, seguiu-se para a fase de coleta das larvas (10 larvas) de cada réplica, em que foram lavadas com solução de etanol a 50%, e transferidas para o papel filtro, para secagem durante 24 h. As larvas já secas foram submetidas à maceração mecânica com posterior adição de MEOH (extrato larval). O extrato larval foi sonificado por 15 minutos, filtrado com filtro de 0,45 µm e transferido para um *vial*, para posterior análise cromatográfica.

A análise ocorreu no modo isocrático, utilizando como fase móvel metanol, a uma vazão de 1 mL/min. O volume de amostra injetado no equipamento foi 5 µL com tempo total de corrida de 15 min. Os cromatogramas foram obtidos utilizando o software LabSolutions. Para a quantificação dos compostos nos extratos e solução teste, foi empregado o método de calibração externa com padrões de 2,5 a 60 µg/mL para o éster cinâmico *n*-substituído (**SF10**) e 1.0 a 10 µg/mL para o seu precursor (**Cin – 4 - CI**). Além disso, os cálculos foram realizados com base na altura integrada de cada pico.

O método foi validado de acordo com os parâmetros definidos pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) e Kazusaki *et al.* (2012), em que foram determinados os padrões cromatográficos, como seletividade, linearidade, exatidão e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). As determinações do LOD e LOQ ocorreram pela redução das concentrações consecutivas das soluções padrão, até o menor pico detectável, com relação sinal-ruído maior que 3 para o LOD e igual a 5 para o LOQ, de acordo com Nascimento *et al.* (2009).

## 5.6. Estudos *In silico*

Os estudos *in silico* foram realizados em uma plataforma Windows 10 e executados em um notebook Dell Inspiron, com processador Intel® Core i7-8565U de 1,99 GHz [Core 2] e 8,0 GB de memória RAM. No total 215 moléculas derivadas do ácido cinâmico (4 derivados cinamatos *n*-substituídos e 211 α-aciloxicarboxiamidas) foram projetadas utilizando o software gratuito Discovery Studio Visualizer (DSV/versão: 20.1.0), e otimizadas com o método PM7 semiempírico no software MOPAC gratuito (versão 2016) utilizando o Mercury CSD como interface (5.8.1), incluído no pacote computacional CCDC GOLD Suite (Okada-Junior *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2019).

O processo de otimização ocorreu com a utilização dos seguintes comandos: MMOK, XYZ, CHARGE = 0, para ambas as séries cinâmicas. As estruturas 3D otimizadas dos DAC's e temefós foram salvas em arquivos formato \*.mol2 (Okada- junior *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2019).

### 5.6.1. Homologia e docking molecular

O modelo de homologia molecular da enzima acetilcolinesterase (AChE) do *Aedes aegypti* foi elaborado, utilizando a AChE do vetor *Anopheles gambiae* (AnAChE) (PDB ID:

6ARY) como modelo (identidade: 92,58%) (Batista & Nascimento-Júnior, 2018; Elfiky, 2020). A AChE completa do *Aedes aegypti* foi escolhida utilizando o servidor UniProt (Código de entrada: Q6A2E2) (disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9DDE3>). Como segue a baixo:

```
>sp|Q9DDE3|ACES_DANRE Acetylcholinesterase OS=Danio rerio OX=7955
GN=ache PE=3 SV=1
MKTSDILLLLPTVLLTFLFHNCFAQAEPDLVVATRLGRVQGTRLVVPDRSHVIAFLGIPYAEPPIGKRR
FKRAEPKPKPWNVFEAKEFSNACYQFVDTSPGFPGIEMWNPNRVMSDCLYLNWVWPPTPRPQNLTV
MVWIYGGGFYSGSSLDVYDGRYLAYTEKVVVSMNYRVGAFGFLALNGSSDAPGNVGLYDQRLALQW
VQENIHFFGGNPKQVTIFGESAGAASVGMHVLSPDSRPLFTRAILQSGVPNTPWATVTFDEARRRRTK
LGKLVGCTWGNDELIDCLRKHPQELI
DQEWQVLPWSSLFRFSFVPVVDGVFFPDTPDAMISSGNFKYTQILLGVNQDEGSYFLLYGAPGFSKDN
ESLISREDFLESVKMGVPHANDIGLEAVILQYTDWMDENNGQKNRDAMDDIVGDQNVICPLQHFAKSY
AQYAALHAQSSAAAPGTLGWGNSGPTGYNSGNSHGAVYLYLFDHRASNLAWPEWGMVHGYEIEFVFG
LPLEKRLNYTAEKLSRRIMRYWANFARTGNPNVNTDGTMDSRRRWPQFSANEQKHVGLNTEPMKVH
KGLRTQFCALWNRFLPRLNITDNIDDV
ERQWKVEFHRWSSYMMHWKSQFDHYSKQERCTDL
```

A construção do modelo tridimensional da AChE se deu pelo servidor Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Em seguida, todos os hidrogênios foram adicionados na estrutura da enzima utilizando a interface gráfica do Gold® versão 5.4.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre - CCDC, <https://www.ccdc.cam.ac.uk>), que também foi usada para realizar as simulações de docking molecular.

As simulações foram realizadas utilizando as coordenadas do sítio catalítico da AChE (x: 4,015, y: 135,03, e z: 149,763), com o propósito de explorar a afinidade molecular entre os compostos e o alvo molecular, avaliando possíveis efeitos estéricos e interações de van der Waals e/ou ligações de hidrogênio.

Todos os doadores/aceitadores de ligações H foram autorizados a serem tratados como acessíveis a solventes. O temefós, um inibidor da AChE, foi empregado como controle positivo para simulações de docking. A função GoldScore foi empregada como algoritmo de busca em todas as simulações de encaixe usando o software Gold.

Após os complexos ligante – receptor serem obtidos, as interações foram analisadas utilizando o software Discovery Studio. Por fim, o Pymol versão 2.3.1 (Schrödinger, <https://pymol.org/2/>) foi utilizado para calcular as distâncias dos átomos e mostrar todas as ilustrações do presente estudo (Batista & Nascimento-Júnior, 2018; Santana *et al.*, 2019).

5.6.2. Avaliação da interação do cinamatos de etila *n*-substituídos frente à AChE a partir do docking covalente.

O docking covalente foi realizado com a preparação dos ligantes e dos resíduos de SER195 utilizando o AutoDock Tools software. Esse processo englobou a execução dos scripts `prepare_flexreceptor4.py` e `prepare_receptor4.py`, que configurou devidamente as estruturas. Posteriormente, o docking covalente foi conduzido por meio do software AutoDock, empregando o método de ponto atrator de dois pontos e a abordagem de cadeia lateral flexível. O primeiro método permitiu uma representação eficaz das interações covalentes, enquanto o segundo considerou a flexibilidade das cadeias laterais, oferecendo maior precisão na predição das conformações moleculares e dá energia de ligação (Bianco *et al.*, 2016; Kumalo, Bhakat & Soliman, 2015).

5.6.3. Aplicação do Docking Reverso para análise da atividade Leishmanicida da  $\alpha$ -aciloxicarboxiamida (**SFD4**)

Todas simulações de docking foram realizados em um notebook Dell<sup>®</sup>, modelo 5500U, Intel<sup>®</sup> coreTM 5<sup>a</sup> geração, processador i-7, CPU 2.4 GHz, 16GB de memória RAM, rodando em uma plataforma Windwos<sup>®</sup> 8.1. Para identificar um potencial alvo para o composto **SFD4**, foi utilizada uma estratégia baseada em docking reverso analisando 59 macromoléculas de *Leishmania*. Assim, o software AutoDock Vina<sup>®</sup> foi utilizado para determinar os valores de energia de afinidade (Eberhardt *et al.*, 2021; Trott e Olson, 2010), usando a interface do PyRX<sup>®</sup> (Dallakyan e Olson, 2015). Dessa forma, o composto **SFD4** foi desenhado e convertido em estrutura 3D usando o software ArgusLab v.4.0.1 (Thompson, 2004; Thompson e Software, [s.d.]), e minimizado pelo método PM3 (método semi-empírico baseado de aproximação integral descrito no *Neglect of Differential Diatomic Overlap (NDDO)*) (Stewart, 1989). No total, 59 estruturas de macromoléculas foram selecionadas e obtidas a partir dos bancos de dados RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Em seguida, no PyRX<sup>®</sup>, todas as estruturas das proteínas foram previamente tratadas usando o módulo *make macromolecule* para adicionar todos os átomos de hidrogênio e cargas atômicas. Para as macromoléculas contendo inibidores co-cristalizados, as mesmas coordenadas *x*, *y* e *z* foram utilizadas na caixa de busca para o depsipeptídeo **SFD4**. Já com relação às macromoléculas sem inibidores co-cristalizados, uma caixa de busca maximizada (*blind docking*) para envolver toda a macromolécula foi utilizada. Usando o módulo *make ligand*, o

PyRX<sup>®</sup> considerou o depsipeptídeo **SFD4** como o potencial inibidor das estruturas. Posteriormente, todos os resultados foram ranqueados em função das energias de afinidade obtidas. Para o melhor complexo ligante-enzima com a melhor afinidade, as interações foram reveladas usando o software AutoDock Tools v. 1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/>). Por fim, para a elaboração das figuras finais, o software PyMol v.0.99 (<https://pymol.org/>) foi utilizado. Todos os procedimentos descritos nesta seção estão de acordo com trabalhos anteriores publicados pelo grupo de pesquisa (Albuquerque et al., 2022; França et al., 2021; Silva, da et al., 2023). Essa análise foi realizada pelo o Grupo de Pesquisa em Química Biológica e Molecular (GPQBioMol), no Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

#### 5.6.4. Estudo farmacocinético de derivados do ácido cinâmico.

As propriedades farmacocinéticas inseticidas de todos os derivados do ácido cinâmico foram avaliadas a partir da plataforma web InsectiPAD (Insecticide Physicochemical properties Analysis Database), disponível ao público (<http://chemyang.ccnu.edu.cn/ccb/database/InsectiPAD/index.php/home/index>), a qual abrange mais de 495 inseticidas aprovados e 22,200 propriedades físico-químicas relacionadas. Estas propriedades foram previstas conforme os critérios de semelhança de pesticidas, descritos por Hao, Dong & Yang. 2011, dentre eles: massa molecular (MM); ClogP, número de aceitadores de ligação de hidrogênio (HBA); número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD); número de ligações rotativas (nROB) e número de ligações aromáticas (nARB), respectivamente (Hao, Dong & Yang, 2011).

### 5.7. Análise Citotóxica e Ecotoxicológica dos Derivados Cinamatos com Propriedades Larvicidas

O estudo de citotoxicidade foi elaborado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas. A pesquisa foi realizada utilizando o método colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), usando células epiteliais das vias aéreas humanas, da linhagem A549. Cinco derivados cinamatos (**SF1**, **SF3**, **SF10**, **SFD2** e **SFD3**) que apresentaram melhor potencial larvicida, observada por França (2019) e na presente pesquisa, foram submetidos a este estudo de viabilidade celular.

Ao passo que o estudo de ecotoxicidade foi realizado com o melhor composto larvicida (*p*-clorocinamato de etila (**SF10**)) frente à várias hortaliças, como a *Lactuca sativa* (alface);

*Solanum lycopersicum* (tomate) e *Allium cepa* (cebola). Todos os ensaios ecotoxicológicos foram realizados em colaboração com a Pós-doc. Cenira Monteiro de Carvalho, no Laboratório de Eletroquímica Aplicada (LEAp). As sementes *Lactuca sativa* L. variedade “betania” foi adquirida da Empresa Feltrin, Brasil, ao passo que a *Solanum lycopersicum* variedade cerasiforme foi obtida da empresa Isla, Brasil. A *Allium cepa* (cebola), por sua vez foi adquirida comercialmente.

#### 5.7.1. Estudo da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT.

A linhagem celular pulmonar humana (A549) de origem epitelial foi adquirida da ATCC (ATCC CCL-185). Essa foi cultivada em condições estéreis em DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media), sob uma temperatura de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Todo o manuseio das células foi feito numa estufa de fluxo laminar, de acordo com Khalil *et al.* (2021).

O efeito das amostras sobre a viabilidade das células A549 foi avaliado por meio do teste de MTT. Após o tratamento das células por 24 h com diferentes concentrações das amostras (5, 50 e 100 µg/mL) o MTT foi adicionado ao meio de cultura a uma concentração final de 5 mg/mL, sendo a cultura mantida a 37 °C por 3 h em estufa úmida de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, foi adicionado o dimetilsulfóxido (DMSO) e a densidade óptica (OD) foi mensurada por espectrofotômetro a 570 nm, utilizando o DMSO como branco. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação às células não tratadas (controle, 100 %) (Ilboudo *et al.*, 2014; Khalil *et al.*, 2021; Pedrete *et al.*, 2021).

#### 5.7.2. *Lactuca sativa* L. var. betania

Uma solução estoque (150 µg/mL) do composto **SF10** foi preparada em 0,33% v/v de CH<sub>3</sub>CN, conforme os protocolos padronizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Pedrete *et al.*, 2021). O bioensaio foi feito em três réplicas de 12 sementes, em que foram adicionadas em placas de petri (90 x 15 mm) com papel filtro de 11 cm de diâmetro, saturado com 5 mL da solução teste em concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, respectivamente (Marques, Oliveira e Lacerda, 2015). O ensaio ficou por 168 h (7 dias) a uma temperatura de 24 ± 1 °C. A inspeção visual foi utilizada para a contagem das sementes germinadas, e posterior medição da raiz (índice de toxicidade) com o uso de um paquímetro digital (Young *et al.*, 2012).

A fitotoxicidade aguda foi calculada por meio dos parâmetros estabelecidos por Young *et al.* (2012), como o índice de crescimento relativo (IRG) e índice de germinação (IG). O IRG foi utilizado como padrão de inibição, sendo classificado em inibição do crescimento radicular ( $0,0 < ICR < 0,80$ ); sem efeito significativo ( $0,80 \leq ICR \leq 1,20$ ) e estimulação do crescimento radicular ( $ICR > 1,20$ ). O controle negativo utilizado foi acetonitrila ( $CH_3CN$ ) em 0,33% v/v.

#### 5.7.3. *Solanum lycopersicum* variedade cerasiforme

O bioensaio foi realizado em triplicata em uma caixa de 64 orifícios, adicionando-se 20g do substrato para plantas variedade “Carolina Soil Garden”, duas sementes da *Solanum lycopersicum* e 2 mL diária da solução teste em cada orifício, conforme os critérios estabelecidos por Gonçalves (2019). O teste foi submetido a uma temperatura entre 23-27 °C, no fotoperíodo de 360 h por o período de 15 dias. A solução estoque (400 µg/mL) do *p*-clorocinamato de etila foi preparada em 0,33% v/v de  $CH_3CN$ , seguida das diluições em 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, respectivamente. Após o período de incubação, foi realizada a contagem e medição das raízes, utilizando o paquímetro digital (Golçalves, 2019). E logo após, o padrão de inibição foi calculado.

#### 5.7.4. *Allium cepa*

Neste ensaio, foram utilizadas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL do composto **SF10** em 0,33% v/v de DMSO. O ensaio foi feito em triplicata e 100 mL da solução teste foram transferidos para o recipiente de plástico tampado. Para cada tampa foi realizada uma abertura central de 3,5-4 cm de diâmetro, que foi adicionado um bulbo, e a região radicular estava em contato com a solução que continha a amostra (Fiskesjo, 1993; Dizdari & Koplíku, 2013). O teste durou 7 dias, e logo após, o comprimento das raízes foi mensurado com o paquímetro digital, como índice de toxicidade, usando como referência padrão três raízes para cada bulbo. O controle negativo utilizado foi 0,33% v/v de DMSO (Dizdari & Koplíku, 2013). E logo após, o padrão de inibição foi calculado.

#### 5.7.5. *Oreochromis niloticus*

O *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) foram adquiridos na Fazenda de Piscicultura no município de Propriá (SE) e transportados para o Laboratório de Aquicultura do Campus de

Engenharia e Ciências Agrárias (CECA-UFAL). Logo após, passaram por um processo de adaptação (aclimatização) em aquários de vidro de 40L pôr o período de 15 dias. Após a climatização os peixes foram submetidos ao ensaio toxicológico com o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) (EPA, 1996; Franco-Bernardes *et al.*, 2015). A concentração Letal que mata 50% do organismo vivo ( $CL_{50}$ ) foi determinada utilizando o GraphPadPrism nos períodos de 24h, 48h e 96h. O estudo foi realizado em triplicata e em cada réplica foi adicionada 6 peixes para as concentrações de 2,5µg/mL, 6,5µg/mL, 7µg/mL, 8µg/mL e 10µg/mL, respectivamente. A falta de movimentos e nenhuma reação a estímulos táteis foram adotadas como critério de avaliação da mortalidade (El-Hack *et al.*, 2022). Essa análise foi realizada em colaboração com o Laboratório de Aquicultura (LAQUA), no Centro de Ciências Agrárias -UFAL, sob aprovação da comissão de ética da UFAL com registro de nº 40/2020.

### 5.8. Análise Estatística

Os ensaios biológicos (larvicida, citotoxicidade e ecotoxicidade) foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em função da média e desvio padrão das medidas realizadas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) associada ao método de Dunnett para comparações múltiplas (Chukwujekwu e Staden, Van, 2014; Srinivasan *et al.*, 2015). O software GraphPad Prism<sup>®</sup> foi utilizado para este método estatístico, ao passo que para a análise quantitativa larvicida o método probit foi empregado (Finney, 1972; De Carvalho, Pratisoli e Vianna, 2017). O tratamento da quantificação por CLAD por sua vez, foi realizado por meio do software Origin Pro 9 (Northampton, MA, EUA), empregando a regressão linear com o uso do método dos mínimos quadrados para obter alguns parâmetros, como o coeficiente angular ( $\alpha$ ), linear (b) e de determinação ( $r^2$ ) e de correlação (r), respectivamente (ICH, 2005; Kazusaki *et al.*, 2012).

### 5.9. Análise da Atividade antifúngica dos Derivados do ácido cinâmico.

A atividade antifúngica contra as leveduras patogênicas *Candida albicans* ATCC<sup>®</sup> 90028 e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC<sup>®</sup> 208821 foi avaliada por meio do método de microdiluição em caldo, seguindo o protocolo de referência M27 4<sup>a</sup> ed. (CLSI, 2017). Os inóculos das leveduras foram preparados a partir de um pré-cultivo em meio YEPD (0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 2% de dextrose e 2% de ágar), seguido de incubação a 28

°C por 24-48h. A densidade celular foi ajustada em solução salina para uma escala de McFarland de 0,5 com um espectrômetro UV/Vis 1600 (Pro-Tools) com valores de absorvância variando de 0,11-0,15 a 530 nm. Posteriormente, os inóculos foram diluídos a 1:50, seguido de uma segunda diluição 1:20 em meio RPMI 1640 para obter uma concentração celular final entre  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  cfu/mL.

Diluições seriadas foram preparadas em microplacas de 96 poços, contendo 96 µL de meio RPMI 1640 (HiMedia™) em cada poço, 4 µL da amostra a ser testada diluída em DMSO para uma concentração final de 2%, e 100 µL do inóculo da levedura a ser testada e preparado conforme parágrafo anterior. Sendo assim, no primeiro poço o volume inicial continha 200 µL. A primeira concentração avaliada foi de 400 µg/mL. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL do primeiro poço foi transferida e realizadas as diluições seriadas até o poço 10, em concentrações finais entre 400 e 0,781 µg/mL (100 µL). As faixas de concentração de antifúngicos controles testados foram 64–0,03 µg/mL (anfotericina B) e 64–0,125 µg/mL (fluconazol). No poço 11 foi usado como controle positivo (100 µL) do inóculo contendo só o microrganismo e o 12 como controle negativo contendo unicamente meio estéril. Após, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 – 48 h. Passado o período de incubação, foi avaliado o crescimento por meio de turbidez, e a concentração mínima sem crescimento visível foi tomada como concentração inibitória mínima. Para cada concentração e cada microrganismo testado o ensaio foi realizado em triplicata. Esse estudo foi realizado pelo Laboratório de Diversidade e Biotecnologia Microbiana – ICBS/UFAL.

## 5.10. Estudo da atividade leishmanicida das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas frente à *Leishmania amazonensis*.

### 5.10.1. Criação do camundongo e parasitas.

#### ❖ Animais.

Camundongos homozigotos machos e fêmeas BALB/c com 4-6 semanas de vida foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fiocruz e mantidos em biotério experimental sob temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libitum*, licença CEUA L53/2016-A3.

#### ❖ Parasita.

O parasita *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) foi mantido no Laboratório de Protozoologia por infecção experimental em camundongos BALB/c após inoculação de fragmentos de lesão no coxim plantar de camundongos. Periodicamente, após eutanásia dos animais, fragmentos de tecido da lesão contendo formas amastigotas foram removidas assepticamente e macerados em homogeneizador tipo Potter. Uma alíquota foi utilizada para inoculação no coxim plantar de camundongos, enquanto outra alíquota foi mantida em meio bifásico NNN, composto por ágar sangue de coelho a 15% e meio Schneider Insect suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL), a 26°C em estufa BOD para a obtenção de formas promastigotas. As formas promastigotas foram mantidas por sucessivas passagens em meio Schneider Insect suplementado como descrito anteriormente, até a 10ª passagem em meio líquido, a fim de se manter as características de infectividade das formas promastigotas.

#### 5.10.2. Atividade contra as formas promastigotas.

Cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase de crescimento, na concentração de  $10^6$  parasitos/mL em volume de 50  $\mu$ L, foram plaqueadas em placa de 96-poços com 50  $\mu$ L de diferentes concentrações dos compostos derivados de  $\alpha$ -acilocarboxiamidas diluídos em meio Schneider. As concentrações no intervalo de 200 a 6,25  $\mu$ M foram obtidas por diluição seriada 1:2 a partir de uma solução estoque dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 40 mM. Poços com parasita tratados com DMSO 1%, e poços somente com meio sem parasita, foram utilizados como controle e branco respectivamente. A Anfotericina B, nas concentrações de 5 a 0,156  $\mu$ M, foi utilizada como droga de referência. Após incubação da placa, com volume final de 100  $\mu$ L, em estufa BOD a 26°C por 24 horas, foi realizada a verificação da viabilidade das formas promastigotas por meio de ensaio colorimétrico baseado na redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT), seguindo o método descrito por Mosmann com modificações (Mosmann, 1983). Resumidamente, foram adicionados 10  $\mu$ L de solução de MTT a 5 mg/mL em cada poço, e após 5 horas foi adicionado 100  $\mu$ L de DMSO. As placas foram mantidas em agitador de placas por 15 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram normalizados e expressos como concentração inibitória de crescimento do parasita em 50% (CI<sub>50</sub>), obtida a partir da curva de regressão não-linear da resposta normalizada pelo log da concentração com o uso do software GraphPad Prism versão 8.2.1.

### 5.10.3. Ensaio de citotoxicidade.

#### ❖ Obtenção de macrófagos peritoneais.

Camundongos BALB/c foram inoculados via intraperitoneal com 3 mL de tioglicolato de sódio a 3%. Após 72 horas, os animais foram sacrificados com injeção intraperitoneal de 250 µL de uma mistura 1:1 de ketamina (100 mg/mL) e xilazina (20 mg/mL) e posterior deslocamento cervical. Os macrófagos foram colhidos da cavidade peritoneal com PBS, centrifugados a 4.000 rpm e ressuspensos em meio RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### ❖ Ensaio de citotoxicidade.

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram cultivados em placa de 96-poços ( $5 \times 10^5$  células/mL), no volume de 100 µL por poço, com diferentes concentrações dos compostos derivados de  $\alpha$ -acilocarboxiamidas (400 a 12,5 µM) ou anfotericina B (50 a 1,562 µM) em meio RPMI 1640, diluídos como descrito anteriormente. Poços sem células foram usados como branco e poços com células tratadas com 1% de DMSO foram usados como controle. Após 24 h de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico com MTT (Mosmann, 1983). Os dados de absorbância a 570 nm foram normalizados e utilizados para o cálculo da concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>).

### 5.10.4. Atividade contra amastigota intracelular.

Os macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de 24 poços, contendo lamínulas, numa densidade de  $10^5$  células/poço em meio RPMI-1640 por duas horas para adesão celular. As células aderidas foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase exponencial na proporção 10:1 (parasita/macrófago) e incubadas a 35 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> overnight. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para remoção dos parasitas não internalizados. Posteriormente, foram adicionadas diferentes concentrações dos derivados de  $\alpha$ -acilocarboxiamidas (100 a 6,25 µM) ou anfotericina B (25 a 1,562 µM), e a placa foi incubada por 24 horas. Um grupo de células infectadas tratadas somente com DMSO 1%. Ao término do tratamento, as lamínulas com as células aderidas foram fixadas em solução de Bouin por 5 minutos, coradas com Giemsa, montadas e examinadas no microscópio de luz. Foram contadas amastigotas intracelulares em 100 macrófagos por poço, e os dados normalizados para o cálculo do CI<sub>50</sub>. O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir a relação

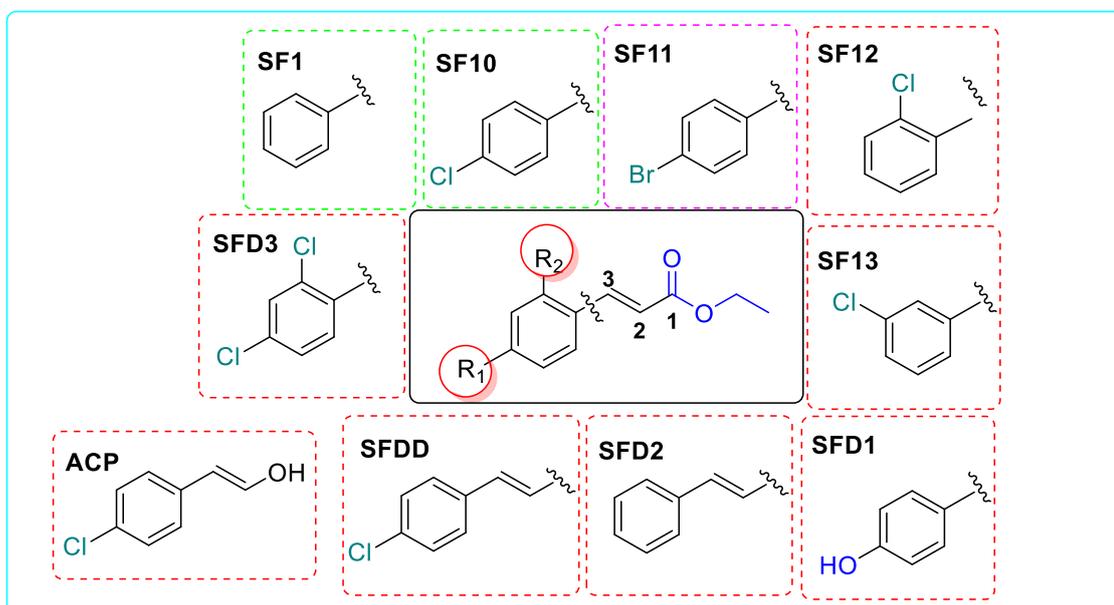
do  $CC_{50}$  e o  $CI_{50}$  para amastigota intracelular. Esse estudo foi realizado pelo Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia na Fundação Oswaldo Cruz.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Planejamento e síntese dos cinamatos de etila *n*-substituídos.

O Cinamato de etila (**SF1**) (Composto padrão da série cinâmica) e *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), obtidos no período do mestrado foram utilizados como modelos estruturais para o designer de ésteres cinâmicos *n*-substituídos, com modificações nas posições **2** (Composto **SF12**), **3** (Composto **SF13**), **4** (Composto **SFD1**), **2** e **4** (Composto **SFD3**) do anel fenila da porção cinamoil (Figura 20), e adição de mais uma dupla *trans* na estrutura acrílica (Composto **SFD2** e **SFDD**, Figura 20) com o intuito de aumentar a atividade dessa série. Além disso, foi realizada a redução da função éster para álcool do melhor larvicida (**SF10**) a fim de verificar a influência do grupo funcional (**ACP**). Embora apenas sete compostos foram avaliados frente as larvas do *Aedes aegypti*, todos foram submetidos ao estudo *in silico* e sintetizados para a continuidade dos estudos larvicidas, citotóxicos e ecotoxicológicos, respectivamente.

**Figura 20:** Estruturas dos derivados cinamatos *n*-substituídos e álcool *p*-clorocinâmico avaliados.



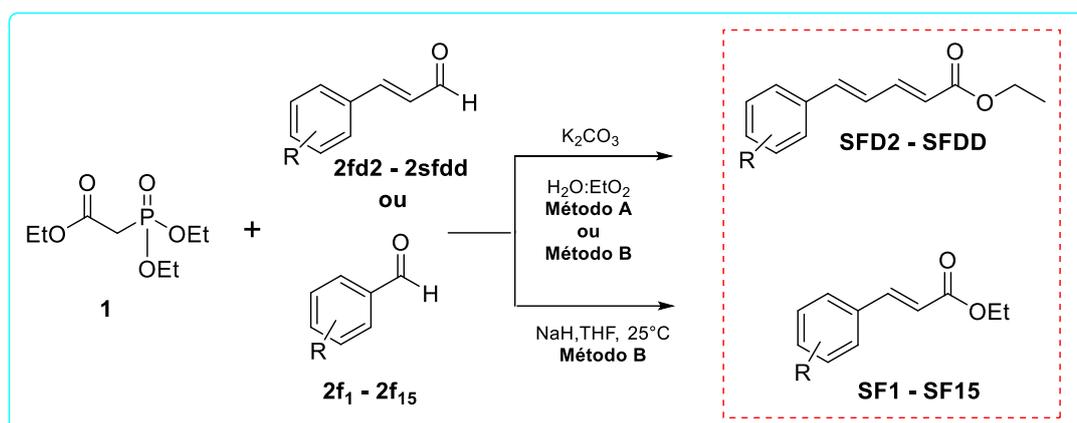
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

### 6.2. Síntese e caracterização dos derivados cinamatos *n*-substituídos e álcool *p*-clorocinâmico.

A síntese dos derivados cinamatos de etila *n*-substituídos ocorreu por meio da reação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) (Esquema 6) e esterificação em meio ácido (Esquema 7), obtendo bons rendimentos, com exceção do composto **SFD2** (Tabela 2). Os reagentes utilizados

na reação de HWE foram aldeídos aromáticos *n*-substituídos (**2f<sub>1</sub>-15**, **2fd2-sfdd**) e o 2-fosfonopropionato de trietila (**1**) na presença de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ou hidreto de sódio (NaH) (Esquema 6).

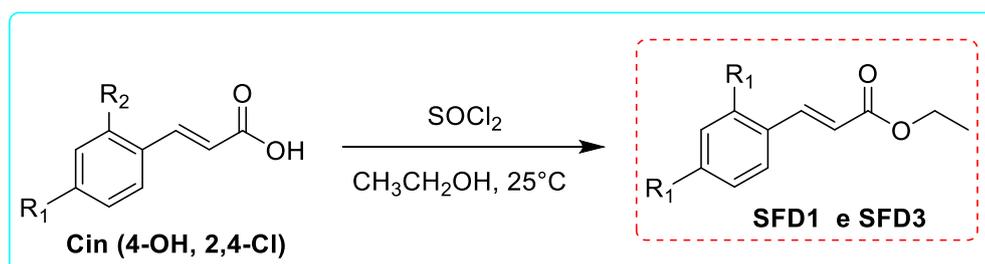
**Esquema 6:** Síntese dos cinamatos de etila *n*-substituídos a partir da reação de Olefinação de HWE.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

Os compostos **SFD1** e **SFD3**, por sua vez, foram sintetizados a partir de uma reação de substituição nucleofílica acílica (esterificação em meio ácido), que consistiu na adição do ácido 2,4-diclorocinâmico ou ácido *p*-cumárico em etanol e cloreto de tionila como catalisador (Esquema 7), obtendo bons rendimentos, conforme visto na Tabela 2.

**Esquema 7:** Síntese do 2,4-diclorocinamato de etila (**SFD3**) e *p*-hidroxicinamato de etila (**SFD1**) a partir da reação de esterificação ácida.

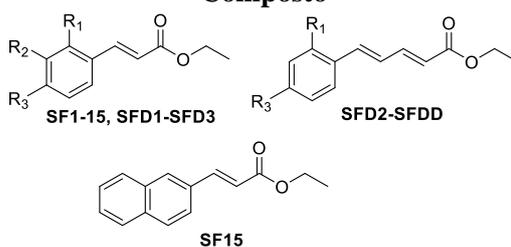


**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

Com base nos dados da Tabela 2, é possível observar que os rendimentos dos ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados podem estar relacionados aos grupos que se encontram na posição *para* do anel aromático do composto carbonílico (aldeído), uma vez que influencia a sua reatividade. França (2019) observou esse efeito a partir de substituintes eletroretiradores (CF<sub>3</sub> e Cl) presentes no anel aromático de aldeído que levou a rendimentos de moderados a bons para ésteres e ácidos

cinâmicos *p*-substituídos, pelo fato de aumentar a carga positiva da carbonila estando mais suscetível ao ataque nucleofílico (Carey e Sundberg, 2007). Entretanto outros fatores podem influenciar o rendimento da reação, como estabilidade do composto carbonílico, condições reacionais, extração e purificação (Carey e Sundberg, 2007; Solomos *et al.*, 2014).

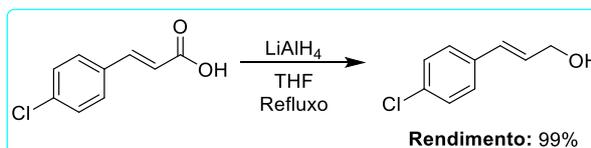
**Tabela 2:** Resultados da síntese dos ésteres cinâmicos *n*-substituídos.

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Rendimento (%)
				
SF1	H	H	H	80
SF3	H	H	CF <sub>3</sub>	99
SF4	H	H	OCF <sub>3</sub>	62
SF5	H	H	F	53
SF6	H	H	OMe	60
SF7	H	H	NO <sub>2</sub>	70
SF8	H	H	CN	62
SF9	H	H	N(Me) <sub>2</sub>	66
SF10	H	H	Cl	83
SF11	H	H	Br	75
SF12	Cl	H	H	81
SF13	H	Cl	H	75
SF14	Ph	H	H	83
SF15	-	-	-	53
SFD1	H	H	OH	70
SFD2	H	H	H	26
SFD3	Cl	H	Cl	83
SFDD	H	H	Cl	80

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

O álcool *p*-clorocinâmico (**ACP**), por sua vez, foi sintetizado a partir da reação de redução do ácido *p*-clorocinâmico utilizando como agente redutor hidreto de lítio alumínio, obtendo um excelente rendimento equivalente a 99%, condizente com os resultados descritos na literatura (Wang *et al.*, 2009). (Esquema 8).

**Esquema 8:** Síntese do álcool *p*-clorocinâmico a partir da reação de redução.

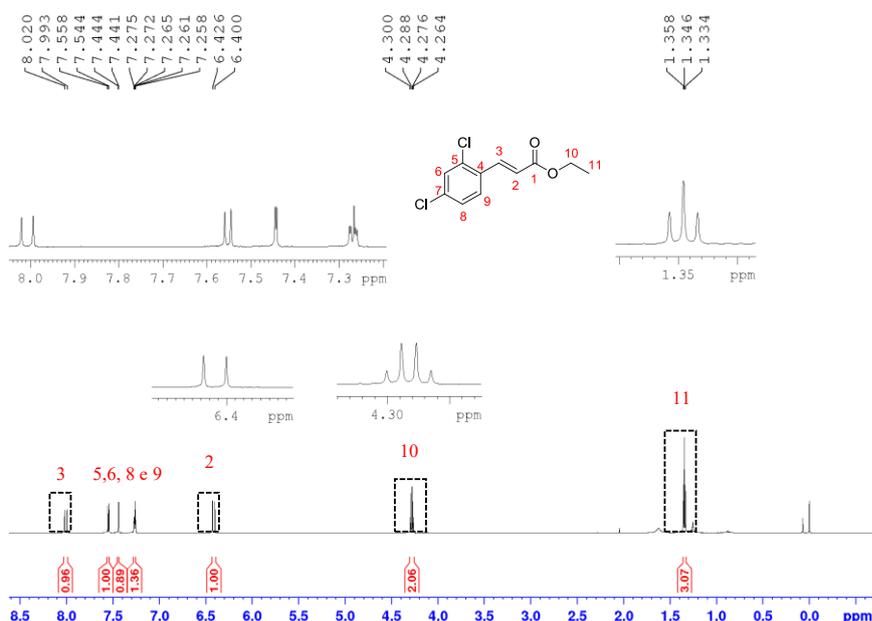


**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

6.3. Caracterização dos derivados cinamatos *n*-substituídos e álcool *p*-clorocinâmico sintetizados.

A caracterização dos compostos foi realizada por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio <sup>1</sup>H e carbono <sup>13</sup>C. Os derivados cinamatos *n*-substituídos possuem estruturas similares, assim foi selecionado o 2,4-diclorocinamato de etila (composto **SFD3**) para análise de sua caracterização. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 21) e os dados de deslocamento, constante de acoplamento, integração e multiplicidade (Tabela 3) são condizentes ao do composto sintetizado.

Conforme espectro representado na Figura 21 e os dados da Tabela 3, são observados duplo dupletos com deslocamento químico de 6,4 ppm e 8,0 ppm e constante de acoplamento de  $J = 16,0$  Hz referentes aos hidrogênios H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> característicos de ligação dupla com geometria *trans*. Os sinais entre 7,3-7,5 ppm (H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub> e H<sub>9</sub>) são equivalentes aos hidrogênios do anel aromático 1, 2 e 4 trissubstituído; o quarteto em 4,3 ppm (H<sub>10</sub>) e o tripleto em 1,3 ppm (H<sub>11</sub>) são referentes ao grupo etoxila. Os dados obtidos são condizentes aos dados da literatura (Cao *et al.*, 2007).

**Figura 21:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2,4-diclorocinamato de etila (**SFD3**).

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

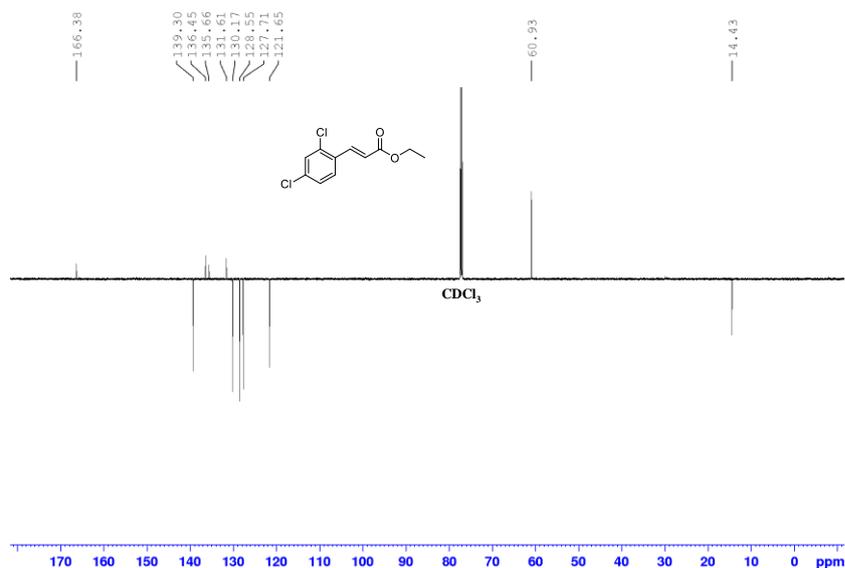
**Tabela 3:** Dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ) do 2,4-diclorocinamato de etila (**SFD3**).

Atribuição do sinal	$\delta$ (ppm)	Constante de acoplamento J (Hz)	Multiplicidade	Integração do sinal
2	6,4	16,0	Dupleto	1H
3	8,0	15,0	Dupleto	1H
6	7,5	8,5	Dupleto	1H
8	7,4	-	Simpleto	1H
9	7,3	8,4	duplodupleto	1H
10	4,3	7,1	Quarteto	2H
11	1,3	7,1	Tripleto	3H

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido pela técnica DEPTQ 135 (Figura 22) mostra que os sinais de fase positiva (voltado para cima) são os carbonos não hidrogenados (C) e o grupo  $\text{CH}_2$ , ao passo que os sinais de fase negativa (voltado para baixo) são referentes aos carbonos CH e  $\text{CH}_3$ , conforme observado na Figura 22.

A análise desses dados mostra os sinais em 130,2 a 127,7ppm característicos do anel aromático 1,2,4 trissubstituído. Além disso, foi observada a presença dos carbonos CH da olefina em 139,3 e 121,6 ppm. O sinal da carbonila conjugada em 166,4 ppm e dos demais carbonos não hidrogenados em 136,4 a 131,6 ppm, respectivamente (Figura 22, Tabela 4). Os carbonos equivalentes à etoxila, por sua vez, apareceram em 60,9 ppm ( $\text{CH}_2$ ) e 14,4 ( $\text{CH}_3$ ) (Figura 22, Tabela 4).

**Figura 22:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  – DEPTQ do 2,4-clorocinamato de etila (**SFD3**).

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

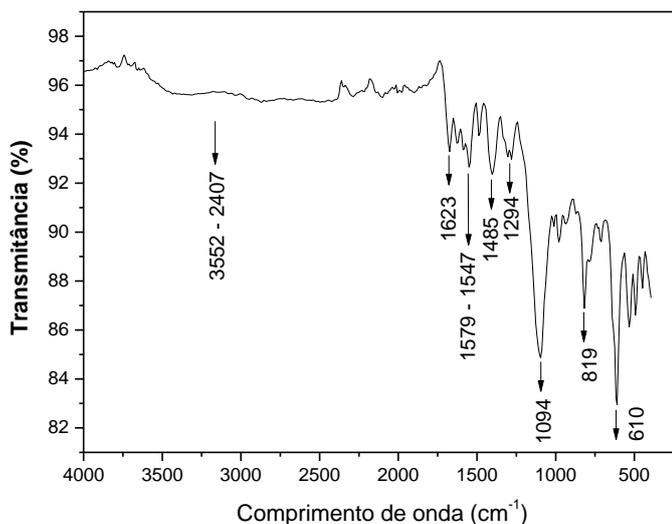
**Tabela 4:** Sinais obtidos do espectro de  $^{13}\text{C}$  do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**).

Atribuição do sinal	$\delta(\text{ppm})$
Aromáticos	130,2
	128,6
	127,7
1	166,4
2	121,6
3	139,3
4	131,6
5	135,7
7	136,4
10	60,9
11	14,4

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

A caracterização do álcool *p*-clorocinâmico (**ACP**) por espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permitiu identificar as principais bandas de absorção características desse composto, conforme Figura 23.

Figura 23: Espectro de Infravermelho do álcool *p*-clorocinâmico (ACP).



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

A análise do espectro (Figura 23) mostra que as bandas de absorções em  $3552\text{ cm}^{-1}$  a  $2407\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao grupo hidroxila (-OH) de um álcool primário. Ainda nessa mesma vertente, observam-se bandas em  $1623\text{ cm}^{-1}$  e  $1094\text{ cm}^{-1}$  equivalentes à olefina *trans*, e as bandas em  $819\text{ cm}^{-1}$  e  $610\text{ cm}^{-1}$  são características do anel aromático 1,4 dissubstituído e do grupo cloro (-Cl) ligado ao carbono (Tabela 5).

Tabela 5: Bandas de absorção do espectro de Infravermelho do composto ACP.

Atribuição	Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )
3552 - 2407	$\nu_s$ -OH
1673	$\nu\text{C}=\text{C}$ dupla <i>trans</i>
1623	$\nu\text{C}=\text{C}$ Aromático
1579	$\nu\text{C}=\text{C}$ Aromático
1547	$\nu\text{C}=\text{C}$ Aromático
1294	$\nu_s\text{C}-\text{O}$
819	$\delta_{as}$ C-H Aromático
977	$\delta$ C-H fora do plano
610	$\nu\text{C}-\text{Cl}$

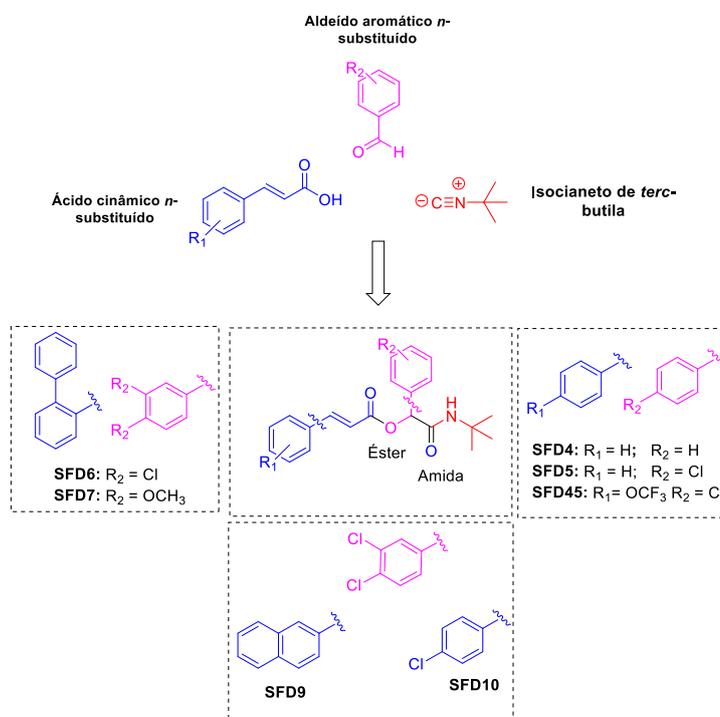
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

#### 6.4. Síntese e Caracterização dos ácidos cinâmicos *n*-substituídos e das $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas *n*-substituídas.

As  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas *n*-substituídas foram selecionadas a partir de uma triagem virtual, realizada para 211 estruturas possíveis dessa série, utilizando a homologia molecular da AChE do vetor *Aedes aegypti*, construída por França *et al.* (2021). O resultado do Docking

molecular se encontra em anexo. Dessa série, foram selecionadas para a síntese sete  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas *n*-substituídas (Figura 24).

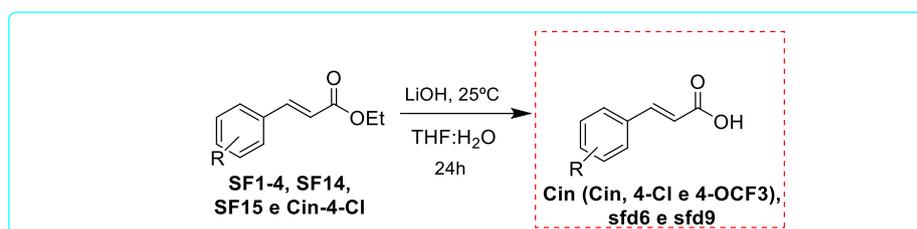
**Figura 24:** Planejamento de larvicidas frente ao *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Elabora pela autora, 2023.

A síntese das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas *n*-substituídas ocorreu em três etapas, a primeira consistiu na reação de olefinação de HWE (Esquema 6), fornecendo os ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados *n*-substituídos (SF(1,4, 10, 14-15)) em bons rendimentos (Tabela 6). Logo após, uma hidrólise alcalina foi realizada com os cinamatos de etila *n*-substituídos (SF (1,4, 10, 14-15)) na presença de hidróxido de lítio em THF e água (2:1) à temperatura ambiente, obtendo os ácidos cinâmicos *n*-substituídos (Cin (Cin, 4-OCF<sub>3</sub> e 4-Cl), sfd (6 e 9)) (Esquema 9) em bons rendimentos (Tabela 6).

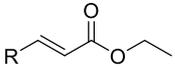
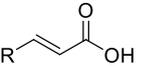
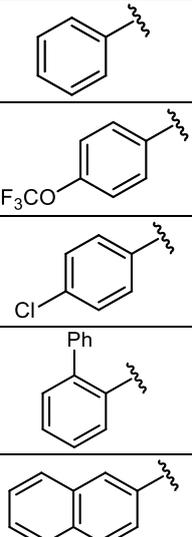
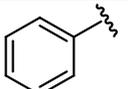
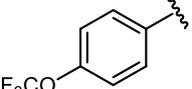
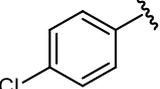
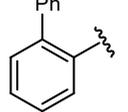
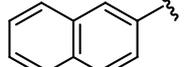
**Esquema 9:** Síntese dos ácidos cinâmicos *n*-substituídos (**Cin** (**Cin**, **4-OCF<sub>3</sub>** e **4-Cl**), **sfd** (**6** e **9**)).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Com os ácidos cinâmicos em mãos, foi realizada a reação de Passerini para a formação dos híbridos cinâmicos. Para isso, foram utilizados aldeído aromático *n*-substituído (**2f** (**1,10,16-17**)), os ácidos cinâmicos sintetizados (**Cin** (**Cin**, **4-OCF<sub>3</sub>** e **4-Cl**), **sfd** (**6** e **9**)) e a isonitrila (**1**) (Esquema **10**). As  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas sintetizadas foram obtidas em bons rendimentos (Tabela **7**), sendo seis delas inéditas, exceto a **SFD4** (Young *et al.*, 2019).

**Tabela 6:** Derivados do ácido cinâmicos obtidos por meio das reações de olefinação de HWE e hidrólise alcalina.

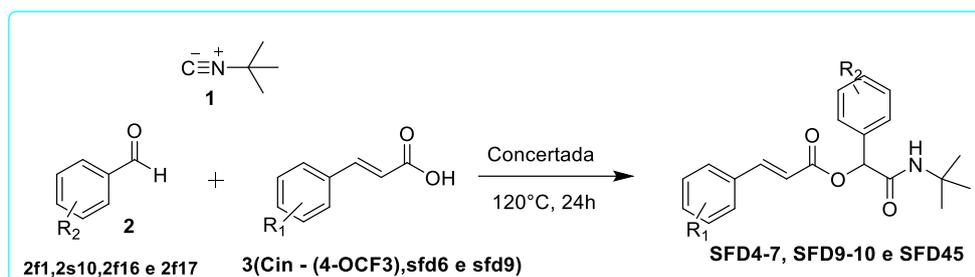
Composto  SF(1,4, 10, 14-15)	Rendimento (%)	Composto  Cin (Cin, 4-OCF <sub>3</sub> e 4-Cl), sfd (6 e 9))	Rendimento (%)	R 
<b>SF1</b>	80	<b>Cin</b>	98	
<b>SF4</b>	62	<b>Cin-4-OCH<sub>3</sub></b>	56	
<b>SF10</b>	83,0	<b>Cin-4-Cl</b>	99	
<b>SF14</b>	83,4	<b>sfd6</b>	81	
<b>SF15</b>	53,0	<b>sfd9</b>	98	

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A metodologia empregada no presente estudo foi livre de solvente, sob altas temperaturas, conforme o protocolo estabelecido por Bousquet *et al.* (2012). Outras condições metodológicas também foram testadas, como o uso de solventes orgânicos, entretanto os

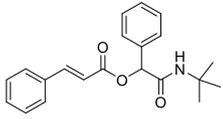
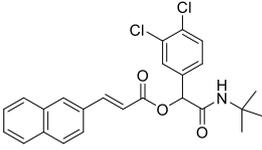
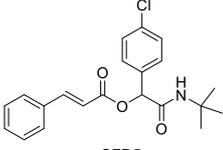
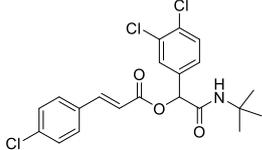
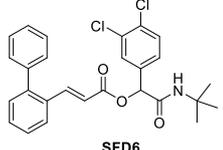
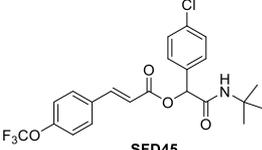
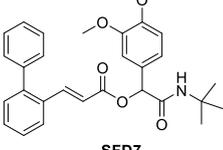
melhores resultados foram obtidos na ausência de solvente, que possivelmente esteja relacionado às maiores colisões das moléculas provocadas pelo aumento da temperatura (Tabela 7). Além disso, todas as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas sintetizadas foram obtidas como uma mistura racêmica, visto que não se fez uso de catalisador nem de reagentes quirais na reação (Takada, 2006).

**Esquema 10:** Síntese das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas a partir da Reação de Passerini.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

**Tabela 7:** Resultados da síntese das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas a partir da reação de multicomponentes (Passerini).

Composto	Rendimento (%)	Composto	Rendimento (%)
 SFD4	43,0 <sup>a</sup>	 SFD9	43,5 <sup>a</sup>
 SFD5	59,0 <sup>a</sup> 44,0 <sup>b</sup> 12,6 <sup>c</sup> 10,0 <sup>d</sup>	 SFD10	36,5 <sup>a</sup>
 SFD6	30,0 <sup>a</sup>	 SFD45	41,7 <sup>a</sup>
 SFD7	16,1 <sup>a</sup>		

Legenda: <sup>a</sup> – Método livre de solvente; <sup>b</sup> – Método clássico modificado (CHCl<sub>3</sub>, 70°C); <sup>c</sup> – Método clássico (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25 °C); <sup>d</sup> - Método clássico (DMF, 80°C).

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

### 6.5. Elucidação estrutural dos ácidos e depsipeptídeos cinâmicos *n*-substituídos.

A elucidação dos compostos foi realizada por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), Carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os ésteres cinâmicos *n*-substituídos sintetizados já foram caracterizados anteriormente, ao passo que dos ácidos cinâmicos estão dispostas no anexo. Sendo assim, as caracterizações abordadas serão relacionadas as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas *n*-substituídas.

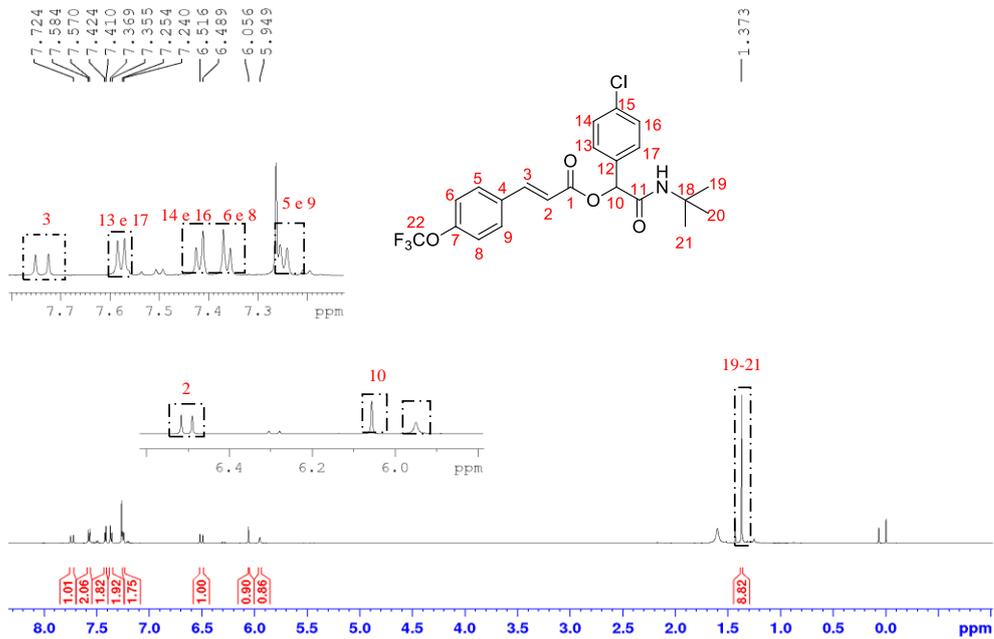
A  $\alpha$ -aciloxicarboxiamida **SFD45** foi escolhida como padrão para as análises espectroscópicas, uma vez que sua estrutura química é similar à dos demais compostos. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 25) e os dados de deslocamento químico, constante de acoplamento, multiplicidade e integração (Tabela 8) são concordantes ao composto formado.

**Tabela 8:** Resultados obtidos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\alpha$ -aciloxicarboxiamida (**SFD45**) 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

Atribuição do sinal	$\delta$ (ppm)	Constante de acoplamento $J(\text{Hz})$	Multiplicidade	Integração do sinal
<b>2</b>	6,5	16,0	Dupleto	1H
<b>3</b>	7,7	16,0	Dupleto	1H
<b>5 e 9</b>	7,3	8,4	Dupleto	2H
<b>6 e 8</b>	7,4	8,6	Dupleto	2H
<b>10</b>	6,1	-	Simpleto	1H
<b>13 e 17</b>	7,6	8,6	Dupleto	2H
<b>14 e 16</b>	7,4	8,6	Dupleto	2H
<b>19, 20 e 21</b>	1,4	-	Simpleto	9H

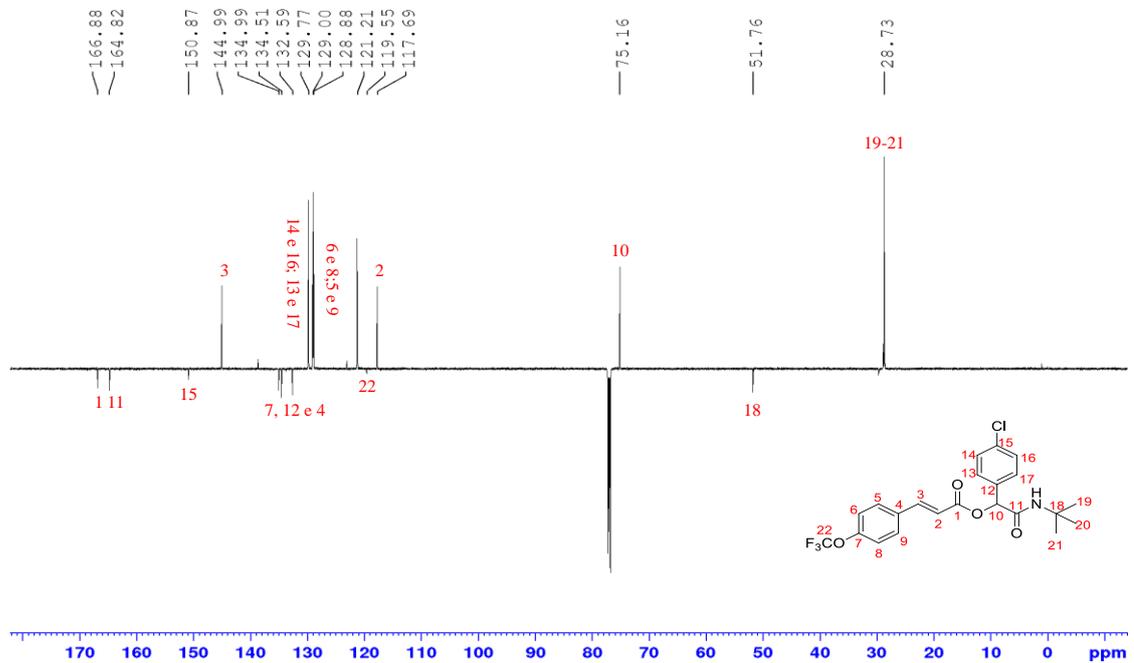
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

**Figura 25:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do depsipeptídeo cinâmico *n*-substituído (**SFD45**).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

**Figura 26:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do depsipeptídeo cinâmico *n*-substituído (**SFD45**).



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

De acordo com o espectro da Figura 25 e os dados da Tabela 8, observam-se os dupletos em 6,5 ppm e 7,7 ppm (H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>), com constante de acoplamento de  $J = 16,0$  Hz, característica

da ligação dupla *trans*. Os sinais em 7,3 a 7,6ppm (H<sub>5</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>14</sub> e H<sub>16</sub>) são referentes aos hidrogênios dois anéis aromáticos 1,4 dissustituídos, e os simpletos em 6,1 ppm (H<sub>10</sub>) e 6,0 ppm (-CO-NH) são referentes ao hidrogênio metino do centro assimétrico e ao hidrogênio ligado ao grupo amida, respectivamente.

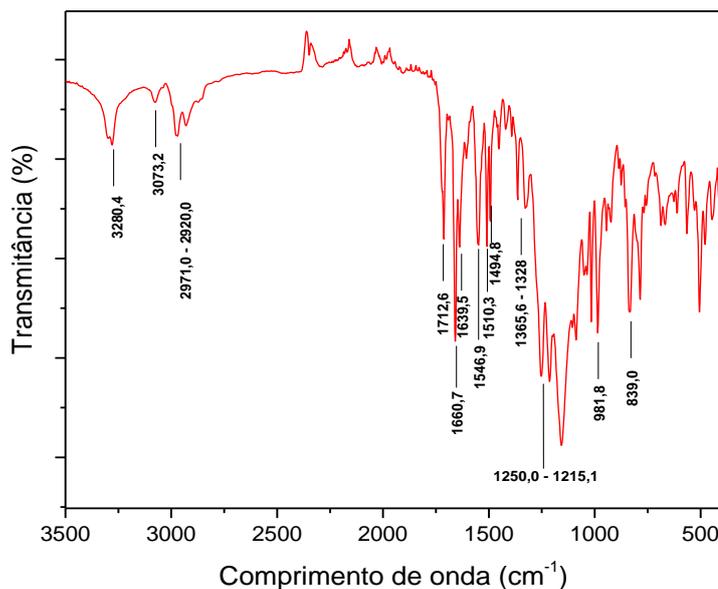
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 26, Tabela 9) mostra os sinais correspondentes ao composto **SFD45**, destacando-se os carbonos das carbonilas do grupo éster e amida em 166,9 e 164,8 ppm, respectivamente; ao passo que os sinais em 145 e 117,7 ppm são referentes aos carbonos olefínicos, os de 121,3; 128,9, 129,0 e 129,8 ppm aos carbonos CH do anel aromático, o carbono quiral, por sua vez, encontra-se com o deslocamento químico em 75,16 ppm, e os sinais em 51,8 e 28,7 ppm são os correspondentes aos carbonos do grupo *terc*-Butila.

**Tabela 9:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C depsipeptídeo cinâmico *n*-substituído (**SFD45**).

Atribuição do sinal	δ(ppm)
Aromáticos	129,8
	129,0
	128,9
	121,2
1	166,9
2	117,7
3	145,0
4	132,6
7	134,7
10	75,16
11	164,8
12	134,5
18	51,8
19 - 21	28,7
22	119,5

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

A caracterização da  $\alpha$ -aciloxicarboxiamida (**SFD45**) por espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIF) permitiu determinar as bandas principais de absorção características, de acordo com a Figura 27.

**Figura 27:** Espectro do Infravermelho do híbrido cinâmico *n*-substituído.

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

A análise espectral (Figura 27) mostra que as bandas de absorções intensas em 1712,6 e 1660,7  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às carbonilas dos grupos ésteres e amidas, respectivamente, ao passo que a banda em 3280,4  $\text{cm}^{-1}$  e o overtone em 3043,2  $\text{cm}^{-1}$ , confirmam a presença do grupo amida secundária. As bandas em 1639,5 e 981,8  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à ligação dupla *trans*, ao passo que nos comprimentos de onda em 1250 e 1215,1  $\text{cm}^{-1}$  são características do grupo *terc*-Butila, e a banda em 839  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos anéis aromáticos 1,4 dissustituídos (Tabela 10).

**Tabela 10:** Bandas de absorção do espectro de Infravermelho do depsipeptídeo cinâmico *n*-substituído.

Atribuição	Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )
3028,4	$\nu_s\text{NH}$
2971,0 – 2920,0	$\nu_s\text{CH}_2/\text{CH}_3$ e $\nu_{as}\text{CH}_2/\text{CH}_3$
1712,6	$\nu$ -C=C-CO-O- do grupo éster
1660,7	$\nu$ -C=C-CO-N- do grupo amida
1639,5	$\nu\text{C}=\text{C}$ dupla <i>trans</i>
1546,9	$\nu\text{C}=\text{C}$ Aromático
1510,3	$\nu\text{C}=\text{C}$ Aromático
1494,8	$\nu\text{C}=\text{C}$ Aromático
1250,0 – 1215,1	$\nu\text{C}(\text{CH}_3)_3$
981,8	$\delta$ C-H fora do plano
839,0	$\delta_{as}$ C-H Aromático

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

## 6.6. Atividade Larvicida dos Derivados do ácido cinâmico.

As atividades biológicas dos derivados do ácido cinâmico incluindo a ação larvicida estão associadas às inúmeras possibilidades de interações com macromoléculas que essa série pode se ligar, conforme a literatura (Araújo *et al.*, 2021 e Fujiwara *et al.*, 2017). Assim, na primeira parte desse item, serão explanados os resultados larvicidas dos derivados cinamatos de etila *n*-substituídos bem como das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas frente à larva do vetor *Aedes aegypti*.

A segunda parte, por sua vez, abordará o estudo *in silico* e de inibição enzimática *in vitro* frente à AChE (alvo biológico presente na larva) a fim de verificar o possível mecanismo de ação dos DAC's que se destacaram na atividade larvicida. Em consonância com esses dados, uma análise morfológica e de HPLC do composto que teve destaque nessa aplicação (Composto **SF10**) será enfatizada. Nessa mesma vertente, será ainda explorada a citotoxicidade, em células de mamíferos, dos derivados cinamatos mais ativos na ação larvicida, bem como um estudo ecotoxicológico do composto **SF10**, com o intuito de verificar a seletividade dos DAC's em outros organismos não alvos.

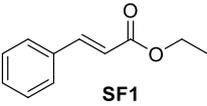
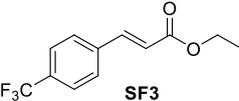
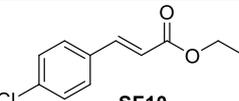
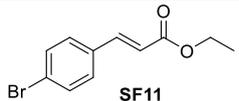
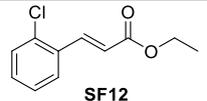
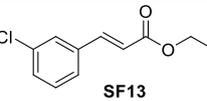
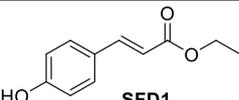
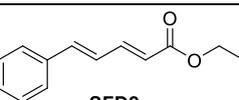
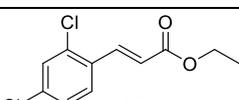
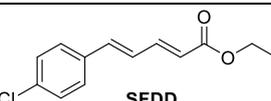
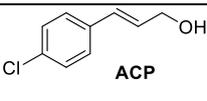
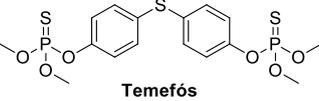
### 6.6.1. Atividade Larvicida dos derivados cinamatos *n*-substituídos e depsipeptídeos cinâmicos *n*-substituídos.

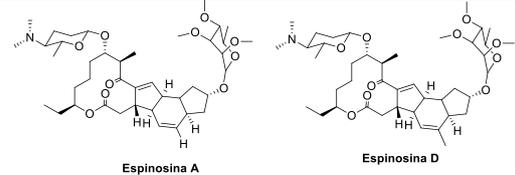
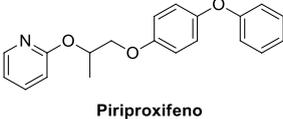
No estudo larvicida foi possível avaliar as CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> dos compostos obtidos no período do mestrado (compostos modelo) com melhores resultados larvicidas, incluindo o cinamato de etila (composto **SF1**), *p*-clorocinamato de etila (composto **SF10**), *p*-trifluorometilcinamato de etila (composto **SF3**) e *p*-bromocinamato de etila (**SF11**), sendo esse último otimizado em relação à sua solubilidade em meio aquoso (Tabela **11**). Ademais, foram realizadas a avaliação larvicida dos compostos **ACP**, **SF12**, **SF13**, **SFD1**, **SFD3** e **SFDD** sintetizados na presente pesquisa, bem como compreender o possível mecanismo de ação desses compostos.

Inicialmente, os compostos foram submetidos a uma análise preliminar larvicida a partir das concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$  e 45  $\mu\text{g/mL}$ , em que apresentaram resultados promissores após 48h de exposição larval (Tabela **11**), com exceção dos compostos **SFD1** e **ACP**, conforme os critérios estabelecidos pela OMS (2005). O controle negativo utilizado nestes ensaios foi o Tween-80 (<0,5 % v/v). O temefós, o espinosade e o piriproxifeno foram usados como

substâncias de referências, destacando-se o espinosade, que em 3,1 µg/mL apresentou uma atividade larvicida pronunciada (Tabela 11).

**Tabela 11:** Análise estatística da atividade preliminar larvicida dos cinamatos de etila *n*-substituídos e álcool *p*-clorocinâmico.

Composto	(%) de Mortalidade	Grau de Atividade	Ref.
 SF1	95,0 ± 0,0 <sup>2a</sup>	Ativo	FRANÇA, 2019.
 SF3	98,3 ± 0,5 <sup>2a</sup>	Ativo	FRANÇA, 2019.
 SF10	95,0 ± 0,0 <sup>2a</sup>	Ativo	FRANÇA, 2019.
 SF11	93,3 ± 0,5 <sup>2a</sup>	Ativo	FRANÇA, 2019.
 SF12	66,7 ± 2,9 <sup>1a</sup>	Moderadamente ativo	Novo
 SF13	99,0 ± 0,0 <sup>1a</sup> 68,3 ± 0,9 <sup>2a</sup>	Ativo Moderadamente ativo	Novo
 SFD1	0,0 ± 0,0 <sup>1b</sup>	Inativo	Novo
 SFD2	93,3 ± 0,9 <sup>2a</sup>	Ativo	Novo
 SFD3	86,7 ± 0,5 <sup>2a</sup>	Ativo	Novo
 SFDD	93,3 ± 1,1 <sup>2a</sup>	Ativo	Novo
 ACP	18,3 ± 1,1 <sup>1a</sup>	Inativo	Novo
 Temefós	100,0 ± 0,0 <sup>#1a</sup>	Ativo	Novo

 <p>Espinosina A                      Espinosina D</p>	100,0 ± 0,0 #2a	Ativo	Novo
 <p>Piriproxifeno</p>	76,7 ± 0,5 #3a	Ativo	Novo

Legenda: Média das três réplicas com ( $\pm$ ) desvio padrão (média  $\pm$ , n = 3) DV; <sup>1</sup> 100 $\mu$ g/mL foi a concentração utilizada; <sup>2</sup> 45 $\mu$ g/mL foi a concentração utilizada #a A média com a mesma letra do composto padrão não difere pelo método de comparação múltipla de Dunnett; <sup>b</sup> As médias que diferem apresentaram baixa diferença significativa (p < 0,05); #1 1 – Composto de Referência (10  $\mu$ g/mL); #2 2 – Composto de Referência (3,1  $\mu$ g/mL); #3 3 – Composto de Referência (50,0  $\mu$ g/mL);

**Fonte:** elaborado pela autora, 2023.

Embora no estudo preliminar larvicida (Tabela 11) a maioria dos derivados cinamatos com grupos eletroretiradores na posição *para* do anel fenila tenham sido ativos, o *p*-clorocinamato de etila (SF10) ainda se destaca no presente estudo, ao passo que o *p*-hidroxicinamato de etila (SFD1) apesar da boa solubilidade foi inativo assim como o álcool *p*-clorocinamílico (ACP). Dessa forma, conclui-se que o grupo éster é crucial para a atividade larvicida.

A partir dos resultados qualitativos (Tabela 11), os compostos com atividade de moderada à promissora foram submetidos à análise quantitativa (determinação de CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) (Tabela 12), que envolve a variação das concentrações dos compostos em que as larvas são expostas (confirmação da atividade larvicida). Portanto, quanto menor a concentração que estiver associada a um maior índice de mortalidade, melhor será a atividade do composto testado.

Inicialmente, determinou-se as CLs das substâncias de referências (temefós, espinosade e piriproxifeno) (Tabela 12). O espinosade (Bioinseticida) se destacou em relação aos controles positivos, obtendo uma CL<sub>50</sub> de 0,9  $\mu$ g/mL, ao passo que os demais controles, como o temefós e piriproxifeno tiveram uma CL<sub>50</sub> de 4,4 e 16,7  $\mu$ g/mL, respectivamente (Tabela 12).

**Tabela 12:** Análise larvicida de derivados cinamatos *n*-substituídos contra às larvas do *Aedes aegypti* após 48h de exposição.

Composto	Larvicida [IC 95%, (LCL-LCS)] (µg/mL)			$\chi^2$
	CL <sub>10</sub>	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>	
<b>SF1</b>	30,4 (28,6 – 31,6)	35,6 (34,7 – 36,6)	41,7 (40,1 – 44,4)	2,9
<b>SF10</b>	3,5 (1,6 – 5,1)	8,3 (5,9 – 10,1)	19,7 (16,6 – 25,9)	3,7
<b>SF3</b>	11,1 (8,0 – 13,6)	21,6 (18,9 – 24,1)	42,2 (36,7 – 52,1)	8,2
<b>SF11</b>	12,6 (10,4 – 14,2)	17,6 (16,0 – 19,1)	24,6 (22,6 – 27,9)	9,9
<b>SF12</b>	42,6 (35,7 – 47,9)	63,1 (59,0 – 67,0)	93,5 (85,4 – 107,9)	2,3
<b>SF13</b>	24,3 (18,3 – 28,8)	42,0 (37,6 – 45,9)	72,8 (64,9 – 87,2)	2,9
<b>SFD2</b>	10,0 (6,0 – 13,3)	19,7 (15,4 – 22,9)	38,8 (34,3 – 45,7)	5,9
<b>SFD3</b>	10,2 (7,2 – 12,7)	23,6 (20,6 – 26,7)	54,8 (45,4 – 73,4)	8,3
<b>SFDD</b>	11,6 (8,8 – 13,9)	24,4 (21,7 – 27,2)	51,5 (44,3 – 64,0)	13,9
<b>Temefós*</b>	1,8 (1,3 – 2,3)	4,4 (3,8 – 4,9)	10,4 (8,6 – 13,6)	27,1
<b>Espinosade*</b>	0,6 (0,4 – 0,8)	1,3 (1,0 – 1,5)	2,8 (2,3 – 3,6)	5,4
<b>Piriproxifeno*</b>	3,6 (2,3 – 4,9)	16,7 (13,4 – 21,3)	76,1 (51,5 – 137,9)	17,9

Legenda: IC – Intervalo de Confiança de 95%; LCL – Limite de Concentração Inferior; LCS – Limite de Concentração Superior; CL – Concentração Letal;  $\chi^2$  (Chi) – Grau de Validação; \* - Substância de referência.

**Fonte:** elaborado pela autora, 2023.

O cinamato de etila (substância padrão da série cinâmica) apresentou uma CL<sub>50</sub> de 35,6 µg/mL, conforme observado por França (2019). Nessa mesma vertente, o pesquisador evidenciou que a presença de grupos eletroretirados como o trifluorometil (-CF<sub>3</sub>) ou cloro (-Cl) na posição *para* do anel fenila aumentavam a atividade larvicida com valores de CL<sub>50</sub> de 21,6 e 8,3 µg/mL, respectivamente (França, 2019). A presença do grupo trifluorometil (-CF<sub>3</sub>) na posição *para* (**SF3**) pode ter induzido a uma maior afinidade de ligação deste ao alvo molecular devido ao efeito de polarização. Em relação ao *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), a maior CL<sub>50</sub> (8,3 µg/mL) está relacionada ao efeito da polaridade do átomo de cloro no anel aromático da porção cinamoíla e ao produto que é metabolizado pela larva. Esses dados são consistentes com os derivados mono e dissubstituídos de tiossemicarbazona, oxadiazóis e isooxidiazóis descritos na literatura (Maciel *et al.*, 2020; Silva, da *et al.*, 2015; Silva-Alves, da *et al.*, 2013).

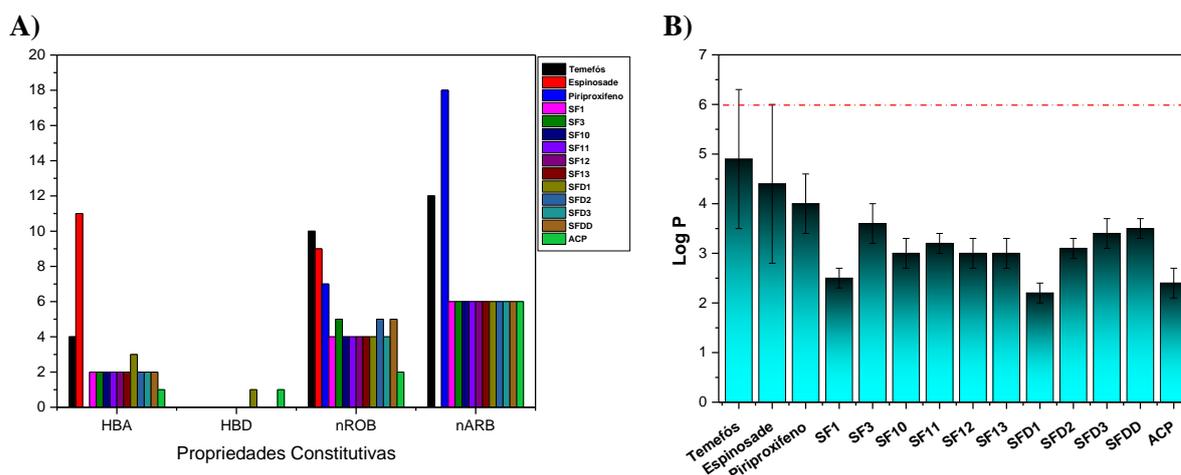
Os grupos halogênios contribuem tanto para a ação larvicida como nas propriedades farmacológicas, devido a sua tendência a ocupar sítios receptores e interagir por meio de ligações halogênicas (Hernandes *et al.*, 2010). Embora a presença de um segundo átomo de cloro na posição *orto*, composto **SFD3**, apresentou menor atividade (CL<sub>50</sub> = 23,6 µg/mL) quando comparado ao composto **SF10** (CL<sub>50</sub> = 8,3 µg/mL), isso pode estar associado ao impedimento estérico e modificações conformacionais no complexo ligante-receptor (Da Silva *et al.*, 2015). Da mesma forma, a presença do átomo de cloro (-Cl) na posição *orto* (composto **SF12**, CL<sub>50</sub> = 63,1 µg/mL) ou *meta* (composto **SF13**, CL<sub>50</sub> = 42,0 µg/mL) levou à uma redução da atividade larvicida quando comparada ao composto **SF10**, possivelmente a posição *orto* haja

um maior impedimento estérico e a interação da ligação de halogênio seja menos efetiva em relação à posição *para* e *meta*, respectivamente.

Por fim, a introdução de um grupo eno (**SFD2**) aumentou a distância interatômica (8,46 Å) entre o anel aromático e a função éster, levando a um composto mais ativo ( $CL_{50} = 19,7 \mu\text{g/mL}$ ). Esses dados são condizentes com os dados reportados na literatura para o estudo da atividade larvicida de derivados da piperlongumina frente ao vetor *Aedes aegypti* (Maleck *et al.*, 2014). Contudo, a presença de um átomo de cloro na posição *para* da porção cinamoil contendo o grupo eno (composto **SFDD**), levou a um aumento na lipofilicidade (Gráfico 1 – **B**) quando comparado ao composto padrão (**SF1**), mas uma leve redução na atividade larvicida ( $CL_{50} = 24,4 \mu\text{g/mL}$ ).

Esses resultados obtidos, com exceção dos compostos **SFD1** e **ACP**, estão em consonância com os critérios de semelhança inseticida estabelecidos por Tice (2005) e Hao *et al.* (2011), em que os compostos se adequam aos respectivos critérios, como visto no Gráfico 1 – **A/B**, sendo eles: Massa molecular  $\leq 435$  Da, coeficiente de partição octanol-água ( $ClogP$ )  $\leq 6$ , número de aceptores de ligações de H (HBA)  $\leq 6$ , número de doadores de ligações de H (HBD)  $\leq 2$ ; número de ligações rotativas (nROB)  $\leq 9$  e número de ligações aromáticas (nARB)  $\leq 17$  (Hao *et al.*, 2018).

**Gráfico 1:** Propriedades farmacocinéticas dos derivados do ácido cinâmico.



Legenda: **A** – Propriedades constitutivas dos DAC's; **B** – Limpofilicidade dos DAC's

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

De acordo com o Gráfico 1A esses compostos tiveram em comum a quantidade de doadores (HBD) e aceptores de hidrogênio (HBA), assim como a quantidade de ligações aromáticas (nARB), essa última está relacionada à fotoestabilidade. Em contrapartida, a

quantidade de ligações rotativas variaram para os compostos **SF3**, **SF10**, **SF12** e **SF13**, respectivamente. Esse parâmetro está associado à flexibilidade molecular, sendo o fator chave no controle da biodisponibilidade (Hao *et al.*, 2011).

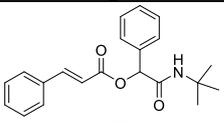
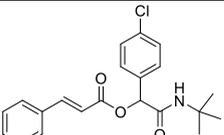
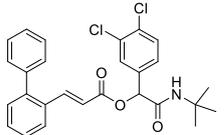
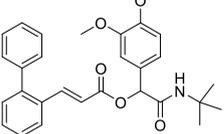
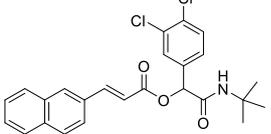
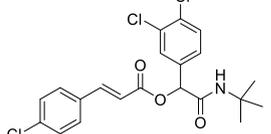
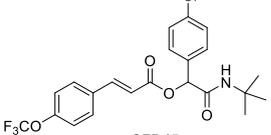
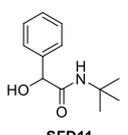
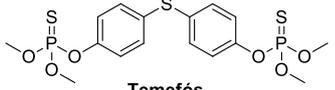
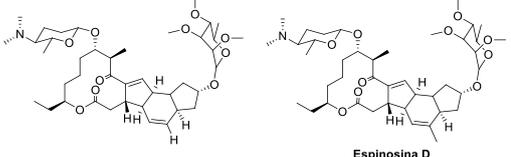
Dessa forma, mediante os dados expostos acima, presume-se que os DAC's possuem uma fotoestabilidade adequada, dada pelas ligações aromáticas para ações biológicas, incluindo larvicida, herbicida e fungicida. A lipofilicidade, representada por ClogP, é outro parâmetro pertinente no estudo de interação molecular dos inseticidas, e pela análise farmacocinética estabelecida no Gráfico **1 -B**, todos os compostos têm hidrofobicidade distinta, sendo os mais hidrofóbicos as moléculas **SF3** e **SFDD**, com valores de 3,6 e 3,5, respectivamente. Tal efeito é condizente com os resultados larvicidas, que apresentaram uma  $CL_{50}$  de 21,6  $\mu\text{g/mL}$  e 24,4  $\mu\text{g/mL}$ , nesta ordem. A hidrofobicidade potencializa a atividade biológica, uma vez que a cutícula do inseto é composta por quitina, um polissacarídeo que possui alta hidrofobicidade, assim, é necessário manter o equilíbrio entre a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade (Silva-Alves, *et al.*, 2013; Webb e Green, 1945). Já o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), que se destacou na atividade larvicida ( $CL_{50} = 8,3 \mu\text{g/mL}$ ), apresentou baixa lipofilicidade, mas o seu efeito biológico foi mais intenso devido ao precursor formado quando metabolizado pela larva do *Aedes aegypti*, que também apresentou atividade larvicida ( $CL_{50} = 25,4 \mu\text{g/mL}$ ), de acordo com França *et al.* (2021).

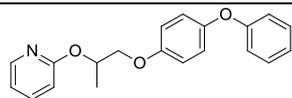
Os controles positivos, por sua vez, apresentaram alguns parâmetros físico-químicos que não condizem com o critério de semelhança de inseticida, como a massa molecular do temefós (MM = 466 Da) e espinosade (731,5 Da) e o HBA, que apresentaram valores de 4 e 11, nesta ordem. Entretanto, é possível observar que os demais parâmetros estão de acordo, inclusive o ClogP, destacando-se o espinosade que corresponde a um dos melhores inseticidas utilizados atualmente, com uma  $CL_{50}$  larvicida de 1,3  $\mu\text{g/mL}$ .

Em contrapartida, as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas *n*-substituídas submetidas à análise preliminar larvicida não apresentaram atividade pronunciada (Tabela **13**). Embora o composto **SFD4** tenha tido o percentual de mortalidade de 28,3% (Fracamente ativo), esse regrediu à medida que a concentração foi reduzindo.

Esses resultados *in vivo* divergiram dos dados virtuais de docking molecular (Anexo, Pag, 201), sugerindo que o docking molecular forneceu um falso positivo. Esse efeito pode estar associado à estrutura dos decapeptídeos, por ser grande e possuir uma alta hidrofobicidade (Tabela **14**) o programa Gold pode ter criado interações inexistentes entre o ligante e alvo biológico.

**Tabela 13:** Análise preliminar larvicida  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas *n*-substituídas.

Composto	(%) de Mortalidade	Grau de Atividade
 SFD4	$28,3 \pm 1,1^{mb}$ $23,3 \pm 2,2^{nb}$ $8,3 \pm 1,1^{ob}$	Fracamente Ativo <sup>m</sup> Inativo <sup>n-o</sup>
 SFD5	$5,0 \pm 0,7^{mb}$ $3,3 \pm 0,9^{nb}$ $1,7 \pm 0,4^{ob}$	Inativo <sup>m-o</sup>
 SFD6	$5,0 \pm 0,7^{mb}$ $10,0 \pm 2,0^{nb}$ $3,3 \pm 0,4^{ob}$	Inativo <sup>m-o</sup>
 SFD7	$8,3 \pm 0,4^{mb}$ $8,3 \pm 0,9^{nb}$ $1,7 \pm 0,4^{ob}$	Inativo <sup>m-o</sup>
 SFD9	$8,3 \pm 0,9^{mb}$ $3,3 \pm 0,9^{nb}$ $0,0 \pm 0,0^{ob}$	Inativo <sup>m-o</sup>
 SFD10	$6,7 \pm 0,4^{mb}$ $0,0 \pm 0,0^{nb}$ $1,6 \pm 0,4^{ob}$	Inativo <sup>m-o</sup>
 SFD45	$0,0 \pm 0,0^{mb}$ $3,3 \pm 0,4^{nb}$ $1,6 \pm 0,4^{ob}$	Inativo <sup>m-o</sup>
 SFD11	$0,7 \pm 0,4^{mb}$ $3,3 \pm 0,6^{nb}$ $1,6 \pm 0,4^{ob}$	Inativo <sup>m-o</sup>
 Temefós	$100,0 \pm 0,0^{#1a}$	Ativo
 Espinosina A      Espinosina D	$100,0 \pm 0,0^{#2a}$	Ativo



Piriproxifeno

76,7 ± 0.5 #3a

Ativo

Legenda: Média das três réplicas com (±) desvio padrão (média ±, n = 3) DV; #a A média com a mesma letra do composto padrão não difere pelo método de comparação múltipla de Dunnett; b As médias que diferem apresentaram baixa diferença significativa (p < 0,05); #1 1 - Composto de Referência (10 µg/mL); #2 2 - Composto de Referência (3,1 µg/mL); #2 3 - Composto de Referência (50,0 µg/mL); m - 100 µg/mL; n - 50 µg/mL; o - 5 µg/mL (Concentrações preliminares dos compostos). **Fonte:** elaborado pela autora, 2023.

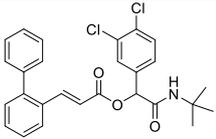
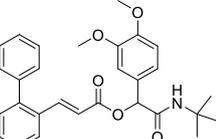
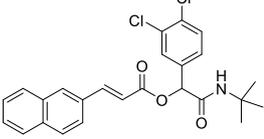
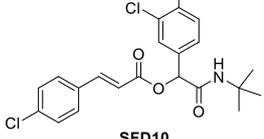
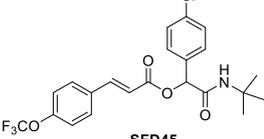
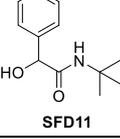
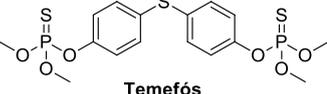
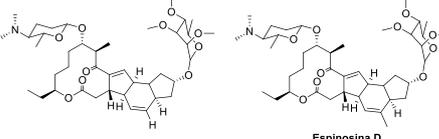
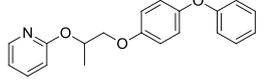
Portanto, as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas para esta aplicação biológica são inativas, e a porção amida formada na reação de Passerini pode ter inativado o fragmento farmacofórico dos derivados do ácido cinâmico (Araújo *et al.*, 2021; França *et al.*, 2021). Essa hipótese pode ser evidenciada pelo teste larvida do amido álcool (**SFD11**) obtido após hidrólise básica da  $\alpha$ -aciloxicarboxiamida (**SFD4**) que se mostrou inativo (Tabela 13).

Além disso, estudos reportados por Bisel, Al-Momani e Müller (2008) comprovam que o grupo *tert*-Butila reduz o processo de hidrólise, devido ao seu efeito estérico, inativando a função amida, bem como com o éster cinâmico. Para corroborar com o estudo larvicida, foi realizada uma análise das propriedades constitutivas dessa classe de moléculas, conforme a Tabela 14.

De acordo com os critérios de semelhança de inseticida e ao comparar com os inseticidas utilizados no mercado, os depsipeptídeos possuem alta hidrofobicidade, e poucos estão de acordo com os critérios estabelecidos por Hao *et al.* (2018) (ClogP ≤ 6), assim como outros parâmetros, sendo eles HBA ≤ 6; HBD ≤ 2; nROB ≤ 9; nARB ≤ 17. Portanto, as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas não são boas candidatas a inseticidas, pois outros parâmetros como o número de ligações aromáticas e ligações de aceptores de hidrogênio passaram do limite, assim como as ligações rotativas, contribuindo para a sua inatividade mediante à larva do *Aedes aegypti*.

**Tabela 14:** Propriedades Constitutivas das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas.

Composto	MM	ClogP	HBA	HBD	nROB	nARB
 SFD4	337,4	3,7 ± 0,3	3	1	8	12
 SFD5	371,9	4,1 ± 0,5	3	1	8	12

 SFD6	482,4	6,0± 0,9	3	1	9	18
 SFD7	473,6	5,0± 0,8	5	1	11	18
 SFD9	456,3	5,7± 0,8	3	1	8	16
 SFD10	440,7	5,3± 0,7	3	1	8	12
 SFD45	455,8	5,1± 0,9	7	1	10	12
 SFD11	207,1	0,9	3	2	4	7
 Temefós	466,0*	4,7*	4*	0*	10*	12*
 Espinosina A      Espinosina D	731,5*	4,2*	11*	0*	9*	0*
 Piriproxifeno	320,1*	3,7*	0*	0*	7*	18*

Legenda: MM – Massa Molecular; ClogP – Lipofilicidade; HBA – N° de aceitadores de ligações de H; HBD – N° de doadores de ligações de H; ROB – N° de ligações rotativas; ARB – N° de ligações aromáticas; \* Substâncias de referências.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

### 6.7. Homologia e docking covalente dos derivados cinamatos de etila *n*-substituídos.

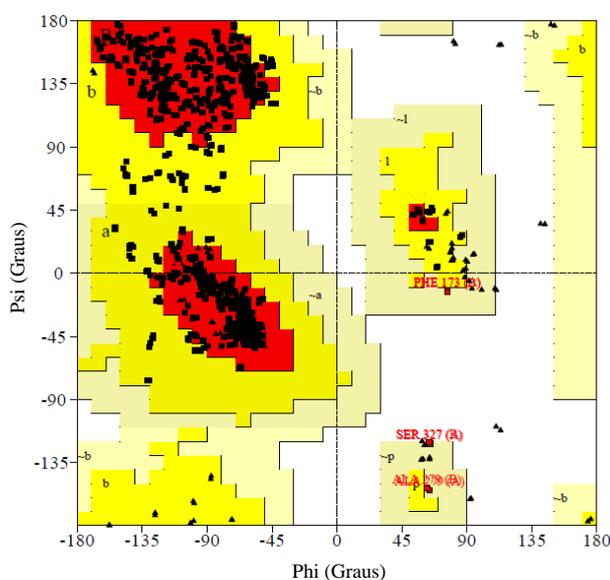
O estudo de homologia e docking molecular foi desenvolvido para estimar o possível mecanismo de ação de derivados do ácido cinâmico, com destaque para o *p*-clorocinamato de etila (SF10) que apresentou o melhor resultado nos ensaios larvicidas. O modelo de homologia

molecular foi obtido a partir da enzima colinérgica acetilcolinesterase (AChE) do *Aedes aegypti*.

Um estudo proteína-proteína Blast (NCBI) foi realizado para identificar estruturas homólogas de proteínas PDB cristalizadas. O modelo 6ARY (AChE co-cristalizada do vetor *Anopheles gambiae*) foi um dos mais favoráveis, pois apresentou 92,41% de identidade de sequência, quando alinhada. Portanto, é o modelo que mais se aproxima da sequência de resíduos de aminoácidos da AChE do *Aedes aegypti* (AaAChE).

O modelo AaAChE foi construído por modelagem de homologia automatizada, servidor web Swiss Model, utilizando 6ARY como template, que possui alta qualidade (92,58% de identidade de sequência), sendo comprovado pelo gráfico de Ramachandran, no qual 99,3% dos resíduos de aminoácidos estão nas regiões mais favoráveis (89,5%) e favoráveis (9,8%), respectivamente (Figura 28) (Elfiky, 2020; Taban *et al.*, 2017).

**Figura 28:** Gráfico de Ramachandran do modelo de homologia molecular da AChE do *Aedes aegypti*.

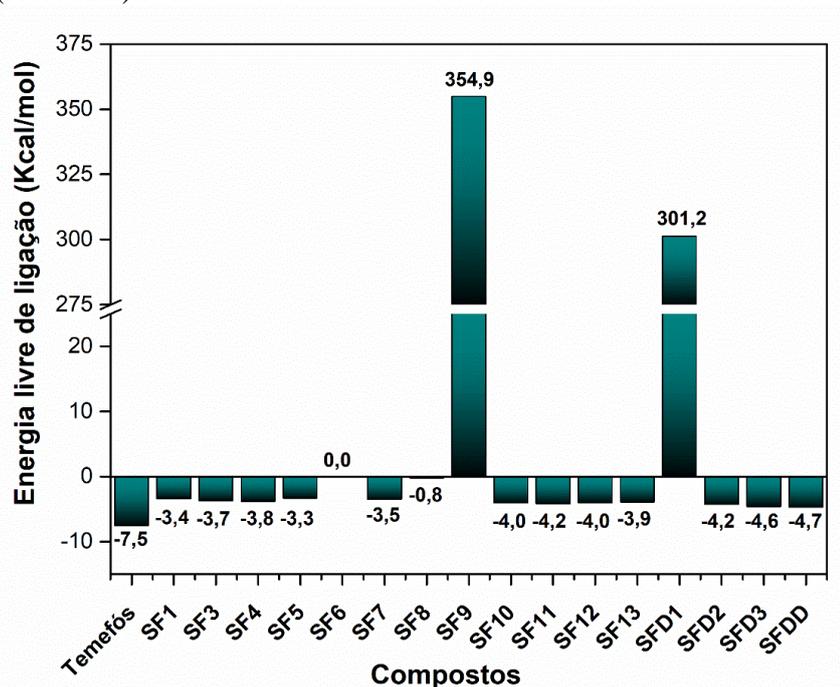


**Fonte:** Elaborado pela autora, 2021.

Além disso, 80,0% dos resíduos de aminoácidos obtiveram uma pontuação média 3D-1D  $\leq 0,2$  de acordo com o software Verify 3D, enquanto o fator de qualidade geral ERRAT foi de 92,88% (Batista & Nascimento-Júnior, 2018; Petronilho e Figueroa-Villar, 2014). Após a validação do modelo AaAChE, foi realizado o docking covalente para ser observado a afinidade dos derivados cinamatos obtidos no período do mestrado e do presente trabalho e comparar com o temefós (Substância de referência).

Os dados da triagem virtual mostraram que a série cinâmica que teve uma melhor interação intramolecular fornecida por meio da energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) foram os ésteres cinâmicos com substituintes eletroretiradores, destacando-se os compostos que possuem grupos halogêneos nas posições 2, 3 e ou 4, conforme observado na Figura 29, em que quanto mais negativa for o  $\Delta G$  melhor é a interação.

**Figura 29:** Resultados da afinidade de interação dos cinamatos de etila *n*-substituídos frente à AChE (AaAChE).

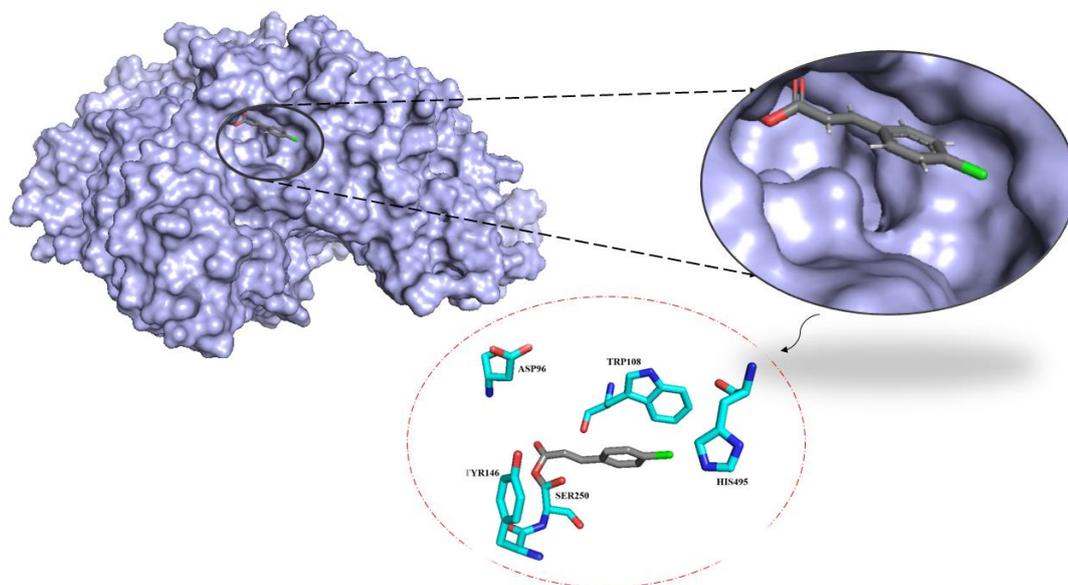


**Fonte:** Alcântara & França (2024).

Esses resultados corroboraram com o estudo larvicida, em que esses compostos tiveram um melhor resultado larvicida, destacando-se o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) que apresentou  $CL_{50}$  de 8,3 $\mu$ g/mL (39,4 $\mu$ M) e  $\Delta G$  equivalente a -4,0kcal/mol. As interações vistas na Figura 30, bem como o cluster do melhor larvicida mostram a região (cavidade) onde possivelmente o composto **SF10** interage no sítio catiônico (catalítico) da AaAChE. Assim, faz parte dessa tríade catalítica a SER250, TYR146, ASP96, TRP108 e HIS495. O temefós foi utilizado como substância de referência uma vez que já é reportada na literatura a sua interação irreversível com a AChE, e pelo estudo *in silico* foi verificado uma baixa energia livre de ligação, formando um complexo mais estável e mais ativo segundo o estudo larvicida ( $CL_{50} = 4,4 \mu\text{g/mL}$ ) (Figura 30) (Verdín-Betancourt *et al.*, 2019). Apesar do estudo de docking molecular covalente do composto **SFD3** tenha apresentado uma menor energia livre de ligação com mais um átomo de -Cl na posição *orto* do anel cinamoil, no resultado larvicida não foi observado o mesmo efeito.

Esse fato pode estar associado possivelmente ao aumento do impedimento estérico e às modificações espaciais decorrentes da adição de outro grupo em posições menos favorecidas, reduzindo a afinidade com o sítio de ação analisado do receptor que o docking possa não ter observado ou pela formação do subproduto da hidrólise que tem ação larvicida menor em relação ao subproduto gerado a partir do composto **SF10** (França *et al.*, 2021; Monte *et al.*, 2020).

**Figura 30:** Cluster do composto **SF10** e interações inter e intramoleculares frente à AaChE.



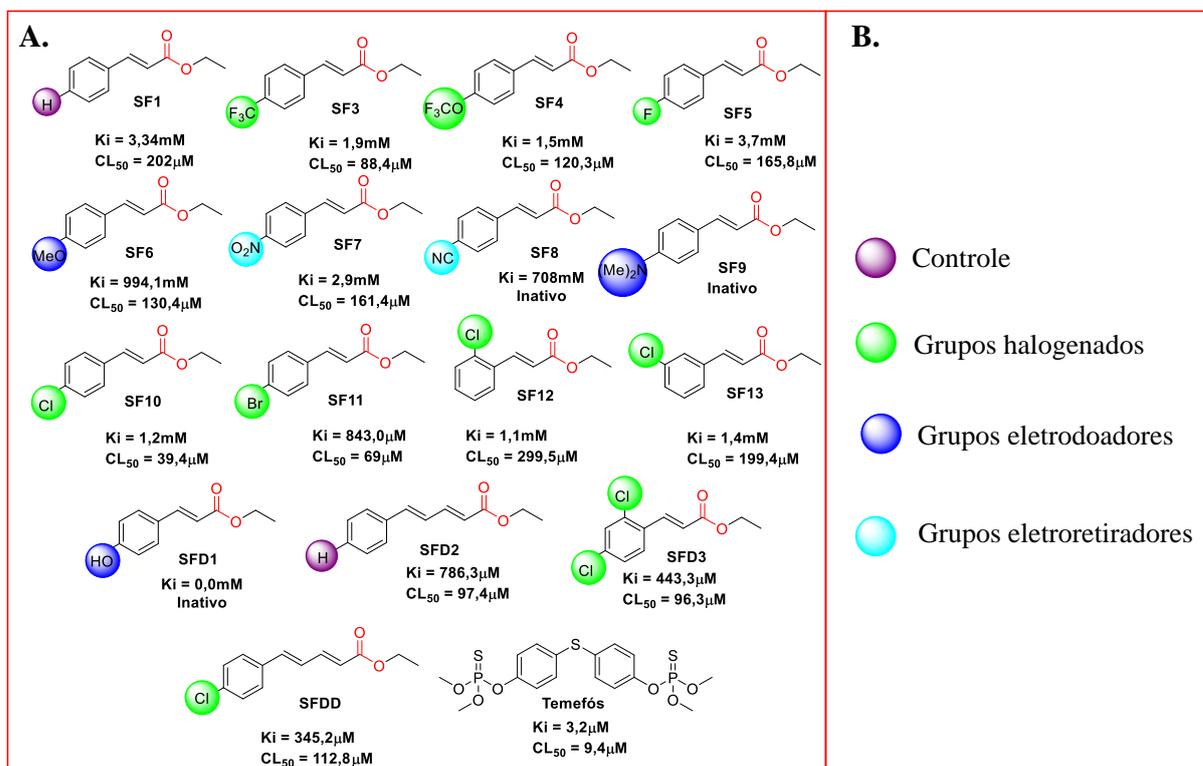
**Fonte:** Alcântara & França (2024).

Embora a maioria dos cinamatos de etila *n*-substituídos tenham apresentados bons resultados larvicidas, os derivados cinamatos com grupos eletrodoadores ( $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{OH}$ ) não tiveram resultados relevantes, com exceção do *p*-metoxicinamato de etila (**SF6**). Possivelmente, isso está associado à outra via mecanística, tendo em vista que na literatura é comprovada a ação inseticida de DAC's que apresentam grupos metoxilas como o ácido ferúlico e *p*-metoxicinamato de etila para a espécie *Culex pipiens*, por exemplo (Kim *et al.*, 2008). Os resultados larvicidas desses compostos são condizentes com o estudo do docking molecular covalente, em que foi observado uma alta energia de ligação livre, não sendo favorável a formação do complexo entre proteína e ligante, o que condiz no estudo larvicida.

Contudo, a predição da constante de inibição, fornecida pelo docking molecular covalente (Figura 31), diverge dos resultados larvicidas, provavelmente pelo fato de não haver interferentes no estudo *in silico* que possam estar presentes na larva do vetor *Aedes aegypti*. Os interferentes podem ser alvos biológicos utilizados no processo de desintoxicação dessa espécie

que podem também interagirem com os ésteres cinâmicos, além de fatores como o pH e presença de água no meio que possam influenciar a análise mecanística.

**Figura 31:** Estimativa da constante de inibição e quantificação larvicida de ésteres cinâmicos *n*-substituídos.



**Fonte:** Alcântara & França, 2024.

Dessa forma, com base no estudo do docking molecular covalente, a AChE, pertencente à classe das carboxilesterases (hidrolase), é um alvo responsável pela hidrólise enzimática de ésteres cinâmicos *n*-substituídos, que tem papel crucial no desenvolvimento de diversos organismos vivos, especialmente vetores como o *Aedes aegypti*. No entanto, quando inibida, causa um maior acúmulo de acetilcolina, causando colapso sináptico, perda do controle muscular, convulsões e parada respiratória levando à morte (Araújo, Santos e Gonsalves, 2016; Petronilho e Figueroa-Villar, 2014).

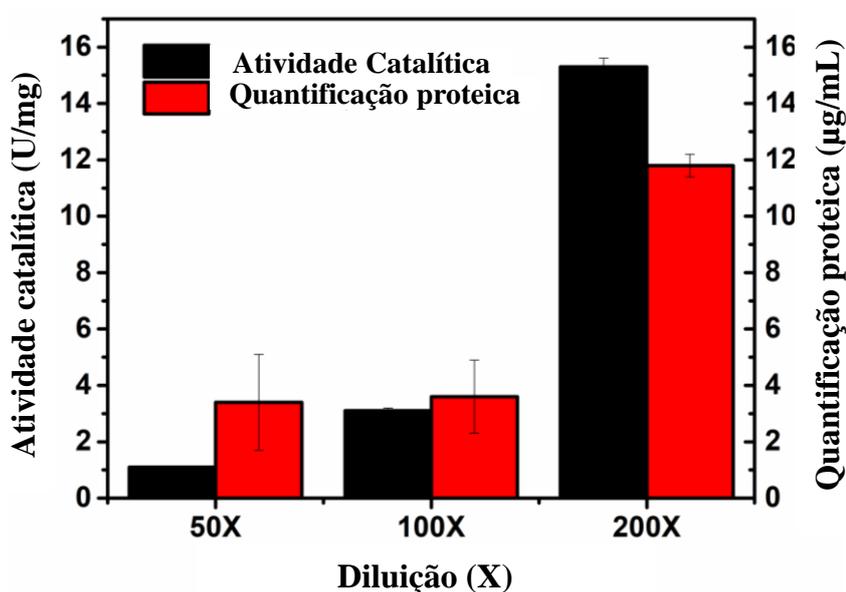
6.8. Análise de inibição enzimática *in vitro* dos ésteres cinâmicos *n*-substituídos frente à AChE presente no extrato larval.

A princípio foi realizada uma quantificação proteica do extrato larval em três diluições (50 vezes, 100 vezes e 200 vezes) (Figura 32), em que ocorreu a partir da elaboração de uma

curva analítica (ver anexo) utilizando a Albumina Serina Bovina (ASB, proteína de referência), obtendo a seguinte equação da reta:  $Y = 0,0151x + 0,1155$ , com um bom  $R^2 > 0,995$ .

Conforme a Figura 32, o melhor resultado de quantificação proteica foi para a maior diluição com o valor de 11,8  $\mu\text{g/mL}$ , tal fato possivelmente esteja associado ao método empregado de quantificação proteica (Método de Bradford) em que para a diluição de 200 tiveram menores interferentes advindos do extrato, uma vez que é uma matriz complexa, dentre esses interferentes se encontram os pigmentos da larva.

**Figura 32:** Resultados da quantificação proteica e atividade catalítica da AChE presente no extrato larval,



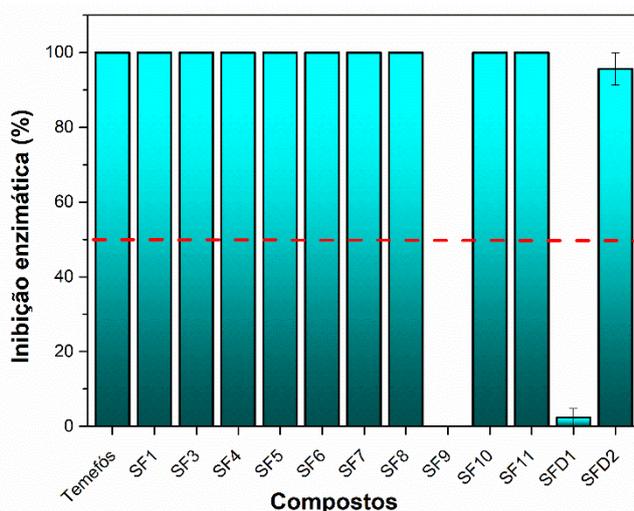
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

A atividade catalítica da AChE presente no extrato larval também seguiu a mesma tendência nas diluições, o melhor resultado ocorreu para a diluição de 200, apresentando o resultado de 15,3 U/mg (Figura 32), o que está de acordo, uma vez que a AChE estará mais livre no meio aquoso, em pH e temperatura ideais para realizar a metabolização (atividade catalítica) do substrato (Acetilcolina) de forma mais eficiente.

De posse desses resultados, deu-se sequência ao estudo de inibição enzimática dos cinamatos de etila *p*-substituídos (SF1-SF11, SFD1-SFD3) a fim de verificar se o alvo biológico associado à via mecanística de hidrolize enzimática (ver item 3.8) seria a AChE. Os resultados de inibição enzimática mostram que a AChE pode ser o alvo ou um dos alvos biológicos que os ésteres cinâmicos *n*-substituídos interagem, uma vez que na concentração de

100 $\mu$ M todos os ésteres cinâmicos com grupos eletroretiradores *p*-substituídos inibiram em 100% a AChE presente no extrato larval (Figura 33).

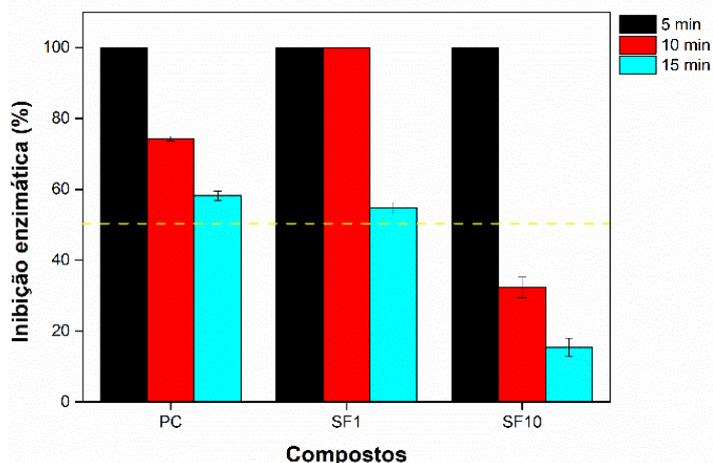
**Figura 33:** Resultados da Inibição enzimática dos ésteres cinâmico *p*-substituídos frente à AChE presente no extrato larval.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Em contrapartida, os cinamatos de etila *p*-substituídos que apresentam grupos eletrodoadores ( $-N(CH_3)_2$  (**SF9**) e  $-OH$  (**SFD1**) na estrutura cinâmica não inibiram a AChE, Esses resultados são condizente com o estudo larvicida e de docking molecular covalente (Figura 29 e Figura 31), com exceção do *p*-metoxicinamato de etila (**SF6**) que apesar do resultado no docking molecular não ter sido bom, no estudo *in vitro* inibiu 100% a AChE, sendo o único composto com grupo doador de elétrons a apresentar um bom resultado larvicida com  $CL_{50}$  de 130,4  $\mu$ M (Figura 31). Ainda nessa mesma vertente, foi realizado o estudo de cinética enzimática nas concentrações de 15 $\mu$ M para o composto padrão monossustituído (**SF1**), *p*-cloro-cinamato de etila (**SF10**) e o controle positivo (**Temefós**), conforme a Figura 34.

**Figura 34:** Resultados do estudo cinético enzimático do cinamatos de etila (**SF1**) e *p*-clorocinamato de etila (**SF10**).



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

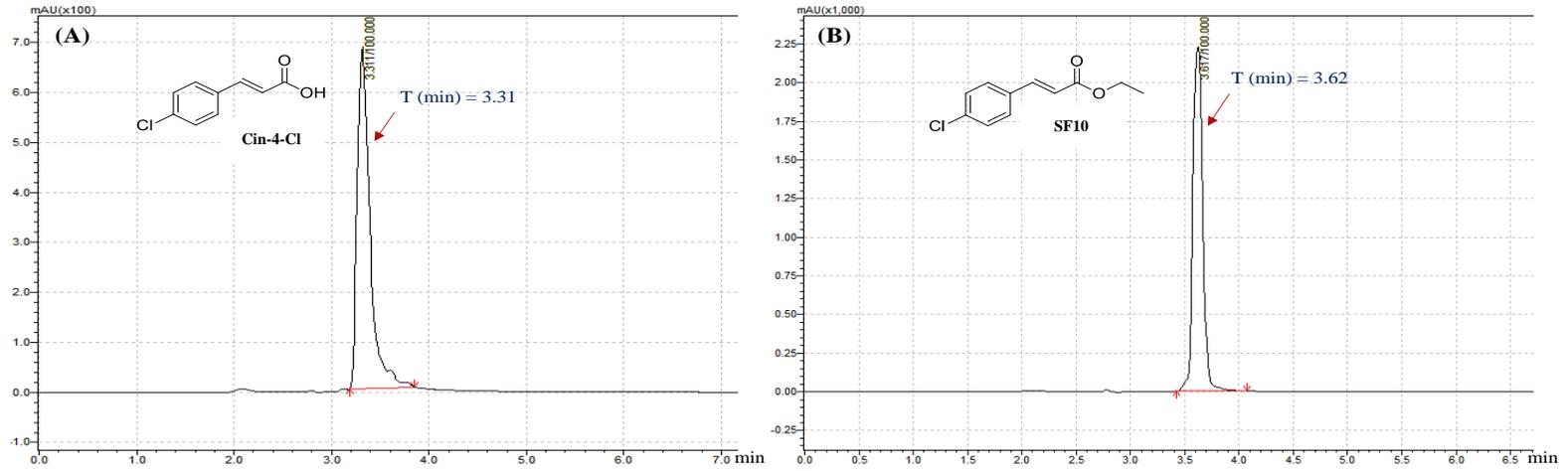
Os resultados mostraram que há uma hidrólise enzimática, e a AChE pode estar associada a essa metabolização, uma vez que é uma serina protease (hidrolase). À medida que tempo vai passando, a inibição enzimática dos compostos com destaque ao melhor larvicida (composto **SF10**) vai sendo reduzida, isso mostra que o complexo ligante (cinâmico) – receptor (AChE) vai se separando, e o receptor volta a sua forma ativada (catálise enzimática) hidrolisando a acetilcolina, por exemplo.

#### 6.9. Determinação do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) em amostras de testes larvicida em CLAE-UV.

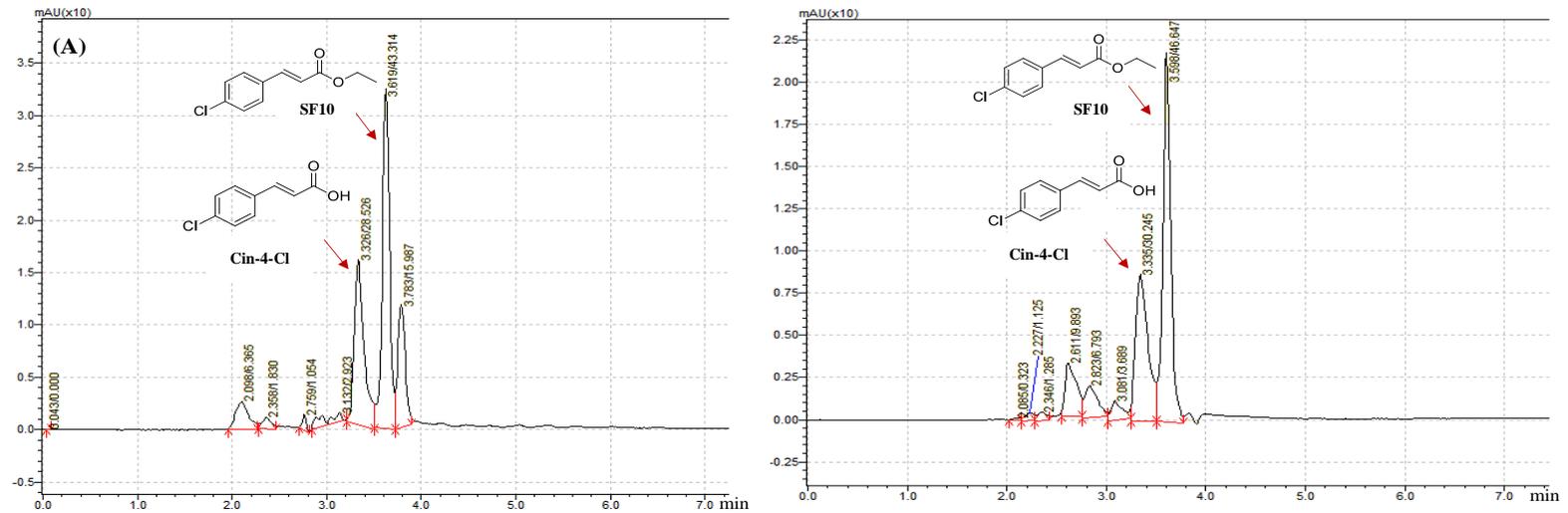
O ensaio larvicida foi repetido com *p*-clorocinamato de etila (melhor composto larvicida), a fim de identificar e quantificar a solução contendo o analito (**SF10**) e o extrato larval, após 24 horas de exposição larval. Entretanto, foi observada a presença de seu precursor (ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**)).

Assim, o *p*-clorocinamato de etila e seu precursor (ácido *p*-clorocinâmico), formado a partir da hidrólise enzimática, foram determinados por CLAE, e comparados com o tempo de retenção de ambos os compostos puros (3,3 min para o ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**) e 3,6 min para o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**)), conforme observado na Figura 35 (A-B). Os compostos foram identificados nos cromatogramas da solução contendo as amostras de analito **SF10** e extrato larval (Figura 36A-B). O extrato do controle negativo (0,33% v/v de DMSO) também foi submetido ao estudo (Consultar o Anexo para o cromatograma da solução do controle negativo).

**Figura 35:** Cromatogramas do ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**) e *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) puros.



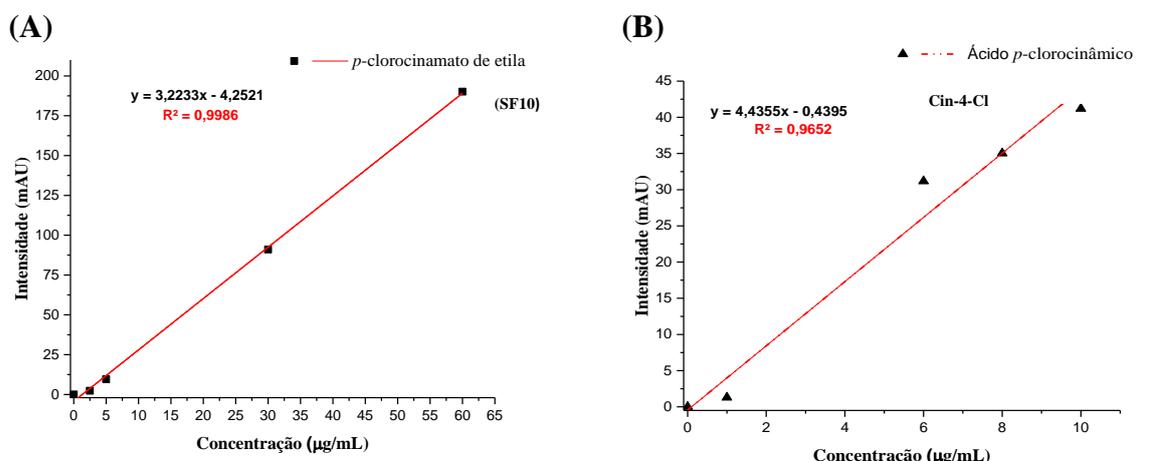
**Figura 36** Cromatogramas de CLAE -UV das amostras (Solução contendo o analito **SF10** (A) e extrato de larva (B)) após 24h de exposição.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2021.

Duas curvas analíticas referentes ao precursor (**Cin-4-Cl**) e o composto **SF10** foram elaboradas utilizando o método de calibração externa, de acordo com o Gráfico 2A-B. A linearidade obtida em ambas as curvas é condizente aos critérios analíticos estabelecidos na literatura (ICH, 2005; Kazusaki *et al.*, 2012). A Tabela 15 mostra alguns desses parâmetros, como o coeficiente linear ( $R^2 > 0.96$ ) de ambos os compostos analisados, a significância apresentada abaixo de 0,05, assim como as equações das curvas de calibração.

**Gráfico 2:** Curvas analíticas dos derivados do ácido cinâmico.



Legenda: (A) – *p*-clorocinamato de etila (**SF10**); (B) – ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**).

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

**Tabela 15:** Padrões estatísticos das curvas analíticas dos compostos **SF10** e **Cin-4-Cl**.

Composto	Equação Linear	Alcance Linear (µg/mL)	$R^2$	$t_r$ (min)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
<b>SF10</b>	$y = 3,2233x - 4,2521$	3,00 – 60,00	0,9986	3,61	0,0097	0,0195
<b>Cin-4-Cl</b>	$y = 4,4355x - 0,4395$	1,65 – 10,00	0,9652	3,32	0,0078	0,0156

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

De posse das equações lineares, foram calculadas as massas presentes na solução contendo o analito **SF10** e o extrato larval, com base na altura integrada de cada pico. As concentrações dos analitos **SF10** e **Cin-4-Cl** presentes nas amostras do ensaio larvicida são apresentadas na Tabela 16.

**Tabela 16:** Quantificação dos compostos **SF10** e **Cin-4-Cl** encontrados no extrato larval e na solução sobrenadante de *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) após 24h de exposição.

Composto	Amostras	
	Extrato Larval [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Solução sobrenadante do 36d [ $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )]
<b>SF10</b>	8,2531 $\pm$ 0,2413	10,8746 $\pm$ 0,7458
<b>Cin-4-Cl</b>	2,7143 $\pm$ 0,2869	3,8191 $\pm$ 1,1159

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Após avaliação dos dados obtidos, constatou-se que no extrato larval foi recuperado um percentual de 16,51% (8,25  $\mu\text{g/mL}$ ) de *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), em conformidade com a  $CL_{50}$  estabelecida para o referido composto. Além disso, aproximadamente 5,43% (2,71  $\mu\text{g/mL}$ ) do composto **SF10** foi convertido em ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**) por meio de uma reação de hidrólise enzimática. Após 24 h de exposição, a solução sobrenadante foi analisada e as recuperações foram cerca de 21,75% (10,87  $\mu\text{g/mL}$ ) do composto **SF10** e 7,64% (3,81  $\mu\text{g/mL}$ ) do composto **Cin-4-Cl** (Tabela 16).

#### 6.10. Análise morfológica

A análise morfológica das larvas expostas à solução do composto **SF10** (50  $\mu\text{g/mL}$ ) evidenciou variações no intestino, tórax, sifão e papila anal em relação ao controle (0,33% v/v de DMSO). Esse estudo foi realizado por dois métodos, a Microscopia Óptica (MO) e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Em ambas as técnicas, as larvas do controle negativo tinham aspecto vermiforme, com cabeça, tórax e abdome (Intestino médio e posterior), sendo esse último composto por oito segmentos, seguido do sifão (amparato respiratório) e papilas anais (responsáveis em regular o sistema osmótico além da secreção de substâncias tóxicas a espécie) (Figura 37A-C e Figura 37A - E).

Para algumas larvas submetidas ao composto **SF10**, foi possível observar o exoesqueleto rígido e alongado (Figura 37D) com redução da massa corporal (manchas escuras), tanto no tórax quanto nas regiões do intestino e sifão, conforme visto na Figura 37 (D-F). Além disso, foi evidenciado para outras larvas a curvatura do abdome e a presença de manchas pretas na mesma região do intestino e sifão (Figura 37G-I), além de modificações nas papilas anais, ficando mais translúcidas, que possivelmente estão relacionadas à eliminação da matriz peritrófica ou substâncias tóxicas (Figura 37I) (Dalarmi *et al.*, 2015; Fujiwara *et al.*, 2017; Procópio *et al.*, 2015; Vogt, 2010).

**Figura 37:** Morfologia externa das larvas expostas aos grupos tratados (Controle negativo, composto SF10).



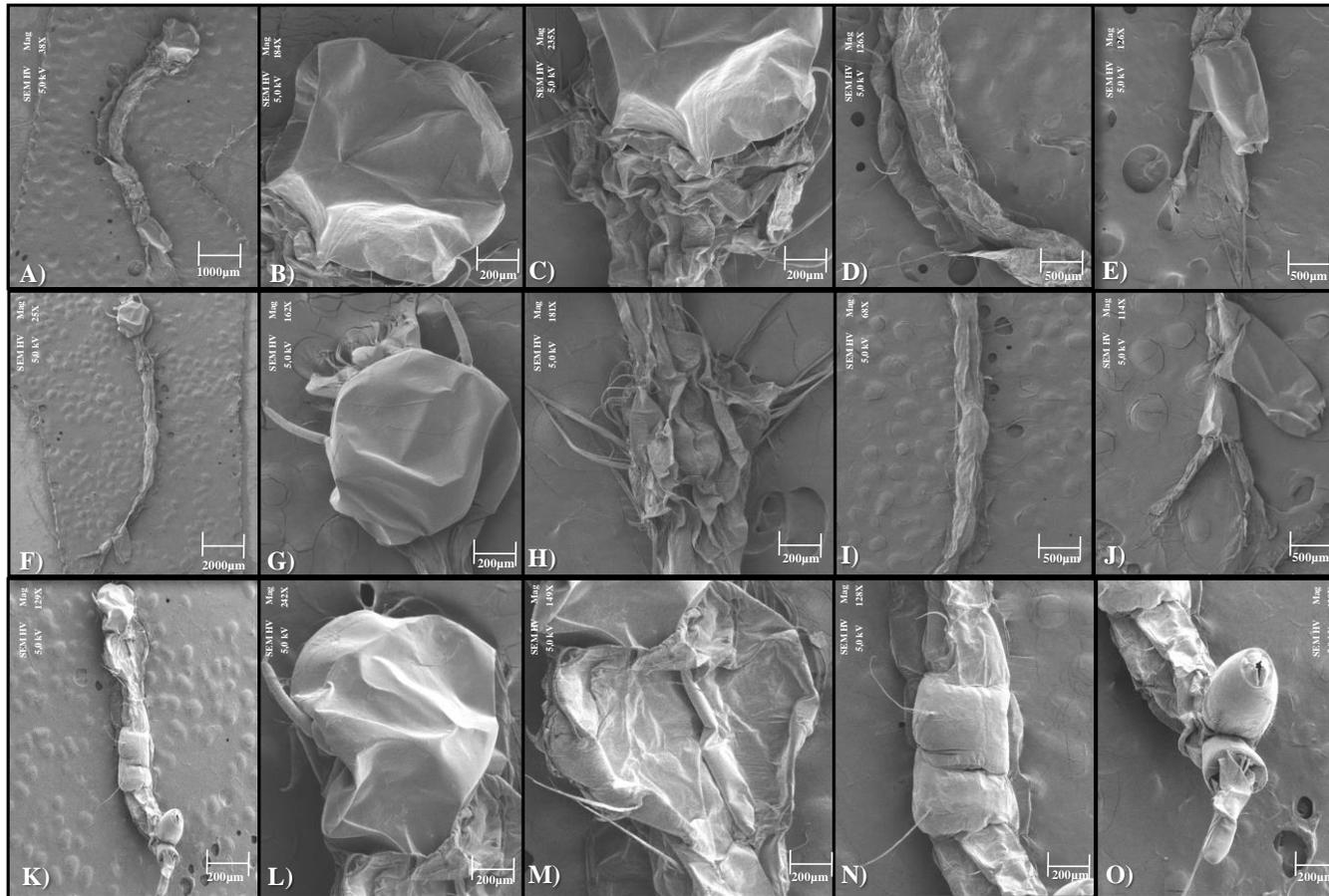
Legenda: (A – C) – Larvas tratadas do grupo controle; (D – I) – Larvas expostas ao *p*-clorocinamato de etila (SF10); (E) – Tórax e abdome rígidos, apresentando manchas escuras; (F) – Papilas anais danificadas; (G – H) – Larva exibindo intestino curto com manchas pretas; (I) – Sifão e papilas anais translúcidas.

**Fonte:** elaborado pela autora, 2024.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) proporcionou uma visualização mais detalhada da total destruição do tórax em larvas expostas ao composto SF10 (38H), além de revelar danos nos intestinos médio e posterior, onde está localizada a matriz peritrófica (38I). Esses resultados estão em concordância com os estudos anteriores, os quais indicam que o *p*-clorocinamato de etila (SF10) atua provavelmente inibindo de modo reversível algumas serina-proteases como a AChE. Além disso, a hidrólise enzimática que ocorre na larva provoca a destruição da matriz peritrófica que é secretada em conjunto com o precursor do *p*-clorocinamato de etila (SF10). Esse processo desencadeia uma desregulação osmótica, culminando na destruição total das papilas anais, assim como do sifão (Figura 38I-J).

Em contraste, o controle positivo não ocasionou danos ao intestino posterior, nem ao sistema respiratório e de regulação osmótica de íons. Isso ocorre porque o processo de metabolização de organofosforado em larvas de insetos, como o *Aedes aegypti*, difere da via mecanística dos cinamatos de etila *n*-substituídos. Porém, observou-se modificações e destruição completa tanto nas regiões onde se concentram os sucos gástricos quanto no intestino médio onde há uma maior quantidade de enzimas digestivas (38K – O).

**Figura 38:** Aplicação do MEV para análise morfológica das larvas expostas aos grupos tratados (Controle negativo, composto SF10 e Temefós).



Legenda: (A – E) – Larvas tratadas do grupo controle negativo; (F – J) – Larvas expostas ao *p*-clorocinamato de etila (SF10); (K – O) – Larvas tratadas com o Temefós; (B,G e L) – Cabeça da larva; (C, H e M) – Tórax; (D, I e N) – Abdome; (E, J e O) – Papilas Anais e sifão.

**Fonte:** elaborado pela autora, 2024.

Estudos reportados na literatura evidenciam que os larvicidas naturais podem atuar por ações combinadas, toxicidade química, destruição ou deformação das células epiteliais intestinais, causando a eliminação da matriz peritrófica ou de substâncias tóxicas (Corbet *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2017). Fujiwara *et al.* (2017) e Procópio *et al.* (2015), ao estudarem a atividade larvicida de derivados do ácido cinâmico, comprovaram a deformação e hipertrofia das células epiteliais intestinais, o que provocou a redução da massa corporal, abdômen curvo ou alongado, eliminação da matriz peritrófica e de substâncias tóxicas, causando disfunção nas papilas anais responsáveis pela regulação dos eletrólitos (Chaithong *et al.*, 2006).

Portanto, sugere-se que o composto **SF10** atua no intestino larval, possivelmente, interagindo com enzimas digestivas, como as hidrolases. Ao ser metabolizado por um processo de hidrólise o ácido **Cin-4-Cl** formado possivelmente desencadeou a atividade larvicida, promovendo um efeito de toxicidade sinérgica que se intensificou contra as larvas de *Aedes aegypti* ao tentar eliminar o metabólito produzido (França *et al.*, 2021).

6.11. Análise da Viabilidade celular dos derivados cinamatos de etila *n*-substituídos (**SF1**,**SF3**, **SF10**, **SFD2** e **SFD3**) que mais se destacaram na atividade larvicida incluindo o composto padrão (**SF1**).

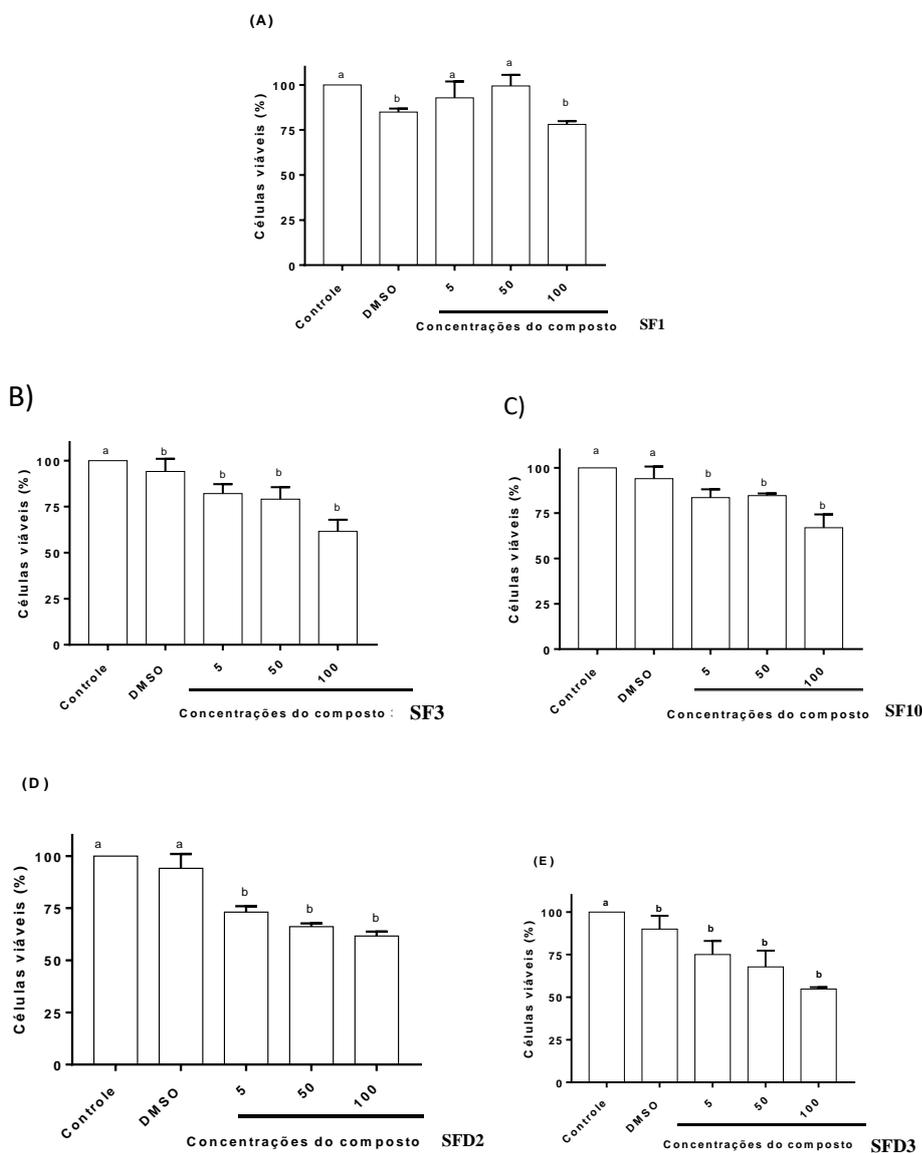
Os cinco derivados cinamatos *n*-substituídos (**SF1**,**SF3**, **SF10**, **SFD2** e **SFD3**), que apresentaram atividade larvicida foram submetidos ao teste de citotoxicidade, utilizando a linhagem da célula tumoral A549 (células de câncer de pulmão humano). No bioensaio, foi observado que o composto **SF1** não apresentou alteração na viabilidade celular, em nenhuma das faixas de concentrações testadas (5-100 µg/mL), conforme representado no Gráfico **3A**. Assim, como não houve diferença significativa para a maioria das concentrações (Gráfico **3A**).

O compostos **SF10** (*p*-clorocinamato de etila) que apresentou melhor atividade larvicida ( $CL_{50} = 8,3 \mu\text{g/mL}$ ) e o composto **SF3** mostraram uma redução no desenvolvimento celular na concentração de 100 µg/mL, ao passo que nas demais concentrações a viabilidade celular foi acima de 75%, não afetando de forma direta o meio de cultura celular (Gráfico **3 B-C**).

Entretanto, os compostos **SFD2** e **SFD3** se mostraram um pouco mais tóxicos, reduzindo em quase 45% a viabilidade celular na mais alta concentração, enquanto que nas concentrações de 5 e 50 µg/mL a redução foi em torno de 35% (Gráfico **3D-E**). Assim, os derivados cinamatos podem ser bons candidatos a larvicidas com destaque ao *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), exceção para os compostos **SFD2** e **SFD3**, respectivamente.

Os resultados corroboram com os estudos feito por Behar *et al.* 2018, que ao estudarem o efeito citotóxico do cigarro eletrônico em células pulmonares, observaram que o cinamato de etila presente nos fluidos da recarga do cigarro não alterava a viabilidade celular da linhagem A549. Além disso, já é reportado na literatura a baixa toxicidade dessa classe cinâmica, comprovada pela sua aplicação na industria de cosméticos e na química medicinal (Pontiki *et al.*, 2014).

**Gráfico 3:** Análise de Viabilidade celular dos derivados cinamatos *n*-substituídos.



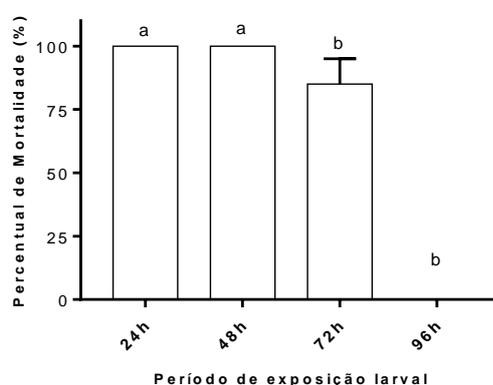
Legenda: a - Média com a mesma letra do composto padrão não difere pelo método de comparação múltipla de Dunnett; b- Médias que diferem apresentaram baixa diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** Adaptado de Lima & Barreto, 2021.

### 3.11. O tempo de ação larvicida do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) no ambiente.

O *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) foi selecionado para o estudo cinético de ação larvicida, por ser o composto mais promissor até o momento. O composto apresentou ação por um período de 24 a 72 h, com o percentual decrescente de mortalidade de 100, 85 e 0%, respectivamente, para uma concentração inicial de 50 µg/mL, conforme especificado na Gráfico 4.

**Gráfico 4:** Período de ação do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**).



Legenda: a – Média com a mesma letra do composto padrão não difere pelo método de comparação múltipla de Dunnett; b- Médias que diferem apresentaram baixa diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

Esses dados corroboram com o resultado de quantificação da solução do sobrenadante na análise de CLAE-UV (Ver Seção: 3.8), em que foi possível observar após 24 h de exposição larval uma recuperação de 10,87 µg/mL do composto **SF10** e 3,82 µg/mL do produto de derivatização (composto **Cin- 4-Cl**), que conseqüentemente seria metabolizado por o novo ciclo de larvas do quarto ínstar (L4). Além disso, foi observado que em 96h não houve mortalidade, e isso pode estar associado ao consumo quase total do composto **SF10**, impossibilitando a morte do novo ciclo de larvas do vetor *Aedes aegypti*.

### 6.12. Estudo de ecotoxicidade do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) frente às hortaliças e leguminosas

#### 6.12.1. *Lactuca sativa* L. Var. Betania

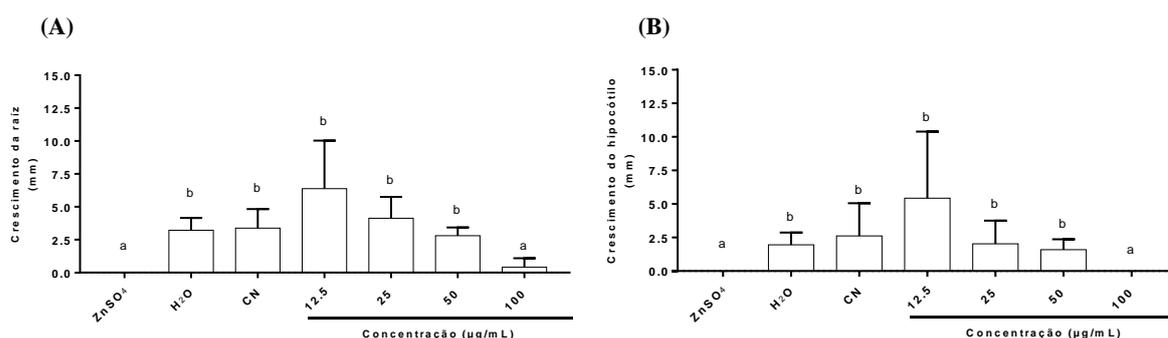
O *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) foi selecionado para o estudo ecotoxicológico com o objetivo de verificar sua seletividade frente a outros organismos vivos que não seja o mosquito

*Aedes aegypti*. Dentre as espécies utilizadas, a *Lactuca sativa* foi escolhida para o início dos estudos, pois é uma das hortaliças mais suscetível às substâncias perigosas do que outras do mesmo gênero (Campagna-Fernandes, Marin e Penha, 2016; Lyu *et al.*, 2018; Young *et al.*, 2012). Além disso, por ela apresentar germinação rápida e homogênea, facilita a determinação da toxicidade de compostos utilizados no meio ambiente (Campagna – Fernandes; Castro, 2013).

O método utilizado na verificação da toxicidade do composto **SF10** é sensível, pois, levou-se em consideração tanto o percentual de germinação, como o desenvolvimento radicular e alongamento do hipocótilo (Priac, Badot e Crini, 2017; Young *et al.*, 2012).

Assim, o composto **SF10** se mostrou tóxico para a concentração de 100 µg/mL, ao passo que nas demais concentrações todas as sementes germinaram com bom crescimento radicular, quando comparado ao controle negativo (Gráfico **5A**). Embora no Gráfico **5B** o alongamento hipocótilo teve uma redução em relação ao crescimento da raiz, em ambos os gráficos (**5A-B**) na concentração de 12,5 µg/mL o crescimento radicular e hipocótilo foi melhor do que nos dois controles negativos (água e 0,33% v/v de CH<sub>3</sub>CN). Os dados observados tiveram diferença significativa em relação ao controle positivo, com exceção da concentração de 100 µg/mL (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (100 µg/mL)), porém essa diferença foi abaixo de 0,05.

**Gráfico 5:** Efeito da exposição do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) no desenvolvimento da radícula e do hipocótilo da *Lactuca sativa*.



Legenda: a - Média com a mesma letra do composto padrão não difere pelo método de comparação múltipla de Dunnett; b- Médias que diferem apresentaram baixa diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

A concentração de inibição de 50% (CI<sub>50</sub>) da germinação da *Lactuca sativa* foi calculada para o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) (Tabela **17**), encontrando o valor de 88,45 µg/mL, alta quando comparada ao controle positivo (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CI<sub>50</sub> = 33,88 µg/mL) e a CL<sub>50</sub> larvicida (CL<sub>50</sub> = 8,3 µg/mL), respectivamente. Portanto, para essa espécie o composto **SF10** possui baixa

toxicidade, sendo constatado pelo índice de germinação após 168h de exposição, como observado na Tabela 17, em que o controle negativo (água destilada) teve uma germinação de 100%.

**Tabela 17:** Resultado quantitativo de toxicidade do *p*-clorocinamato de etila (SF10).

Composto	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC 95% (LCI-LCS)	X <sup>2</sup>	Ref.
SF10	88,45	79,69 – 98,29	2,0	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	33,88	24,99 – 42,77	< 1	(Diaz, Campos & Oron, 2018)

Legenda: CL<sub>50</sub> -Concentração Letal de 50%; IC – Intervalo de confiança e X<sup>2</sup> -Grau de validação Fonte: **Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

A Tabela 18 mostra que o composto SF10 estimulou o crescimento radicular (ICR > 1,2) e a germinação (IG > 120 %) nas concentrações de 12,5 µg/mL (ICR =1,89 mm; IG = 188,59%) e 25 µg/mL (ICR = 1,22 mm; IG = 122%), respectivamente. Assim como na concentração de 50 µg/mL (IGR = 0,83 mm; IG = 82,5%), que não afetou significativamente o crescimento radicular ( $0,80 \leq IGR \leq 0,8$ ) e a germinação (80% > IG < 120%), mas na concentração de 100 µg/mL ocorreu inibição da germinação (IG < 80%) e do crescimento radicular (ICR <0,80) (Tabela 18). Embora na mais alta concentração tenha mostrado inibição do crescimento da raiz embrionária (radícula), pelo o período de 7 dias de exposição, não ocorreu efeitos subletais que geralmente acontece sob concentrações muito baixas, em que a semente passa a absorver, ocasionando seu efeito letal (Young *et al.*, 2011).

**Tabela 18:** Análise de fitotoxicidade do *p*-clorocinamato de etila frente à *Lactuca sativa*.

Concentração (µg/mL)	ICR [IC 95%, (LI – LS)] (mm)	IG (%)	Categoria de Toxicidade
12,5	1,89 (1,78 – 1,96)	188,59	ECR
25	1,22 (1,21 – 1,23)	122,00	ECR
50	0,83 (0,78 – 0,89)	82,8	SES
100	0,12 (0,07 – 0,17)	12,48	ICR

Legenda: ICR – Índice de Crescimento Radicular; IC – Intervalo de confiança de 95%; LI – Limite Inferior; LS – Limite Superior; IG – Índice de Germinação; ECR – Estimulação do Crescimento Radicular; SES – Sem Efeito Significativo; ICR – Inibição do Crescimento Radicular.

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

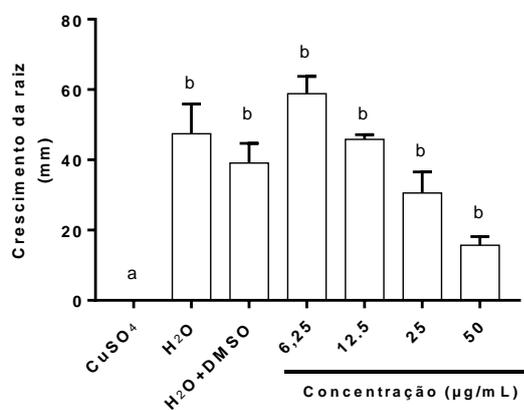
Esses resultados são condizentes com os reportados por Lorenzo *et al.*, (2019), que ao avaliar a toxicidade de alguns derivados do ácido cinâmico, como o cinamato de metila, foi observado que em maiores concentrações há diminuição na atividade dos catalisadores glutaciona

peroxidase e alfa-amilase, responsáveis pelo desenvolvimento embrionário da semente, contribuindo para a redução e/ou inibição do crescimento radicular (Lorenzo *et al.*, 2019).

#### 6.12.2. *Allium cepa* L. E *Solanum lycopersicum* L.

O *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) foi submetido ao teste macroscópico da *Allium cepa*, conforme representado no Gráfico 6, não apresentando inibição da germinação nas concentrações (5 -50 µg/mL) que a espécie foi exposta. Contudo, assim como no teste envolvendo a *Lactuca sativa*, houve redução no crescimento da raiz com o aumento da concentração. A diferença significativa foi presente em todas as concentrações, quando comparada ao controle positivo (10% v/v de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), porém com  $p < 0,05$ . Além disso, foi possível observar que o composto **SF10** estimulou o crescimento radicular a partir da concentração de 25 µg/mL, sendo mais intenso na concentração de 6,25 µg/mL e com melhor desenvolvimento radicular quando comparado ao controle negativo (água destilada) (Gráfico 6; Tabela 19).

**Gráfico 6:** Resultados da exposição do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) frente à *Allium cepa*.



Legenda: a – Média com a mesma letra do composto padrão não difere pelo método de comparação múltipla de Dunnett; b- Médias que diferem apresentaram baixa diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

Pelo estudo do índice de crescimento radicular e de germinação em maiores concentrações, o composto inibiu o desenvolvimento radicular e germinativo (Tabela 19), ao passo que nas menores concentrações (6,25 e 12,5 µg/mL), houve o estímulo de ambos os parâmetros de toxicidade ou não afetou significativamente a germinação, nesta ordem (Tabela 19).

**Tabela 19:** Análise de fitotoxicidade do *p*-clorocinamato de etila frente à *Allium cepa*.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	ICR [IC 95%, (LI – LS)] (mm)	IG (%)	Categoria de Toxicidade
<b>6,25</b>	1,51 (1,45 – 1,57)	150,56	ECR
<b>12,5</b>	1,17 (1,09 – 1,27)	117,29	SES
<b>25</b>	0,78 (0,75 – 0,81)	78,16	ICR
<b>50</b>	0,40 (0,39 – 0,40)	40,12	ICR

Legenda: ICR – Índice de Crescimento Radicular; IC – Intervalo de confiança de 95%; LI – Limite Inferior; LS – Limite Superior; IG – Índice de Germinação; ECR – Estimulação do Crescimento Radicular; SES – Sem Efeito Significativo; ICR – Inibição do Crescimento Radicular.

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

O composto **SF10** também foi avaliado para a *Solanum lycopersicum* em diferentes concentrações, uma vez que o método é rápido, confiável e simples. Além disso, esse método assim como o método da *Allium cepa* têm sido utilizados como ferramentas de monitoramento de ecotoxicidade em pesticidas e impacto de estresse salino no solo (Bacha *et al.*, 2017; Ozcan, 2016).

O Gráfico 7 mostra a variação do crescimento da raiz, que teve uma leve redução quando comparado ao controle negativo, sendo inversamente proporcional as concentrações, assim como nos estudos vistos anteriormente. Os dados da Tabela 20 mostram que nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  o composto inibiu o crescimento radicular, já em 12,5  $\mu\text{g/mL}$  não teve significância de estímulo.

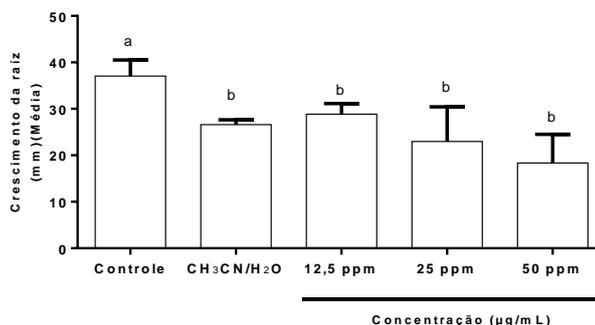
**Tabela 20:** Análise de fitotoxicidade do *p*-clorocinamato de etila frente à *Solanum lycopersicum*.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	ICR [IC 95%, (LI – LS)] (mm)	IG (%)	Categoria de Toxicidade
<b>12,5</b>	1,10 (1,05 – 1,11)	108,53	SES
<b>25</b>	0,86 (0,66 – 1,06)	86,46	ICR
<b>50</b>	0,69 (0,52 – 0,85)	69,09	ICR

Legenda: ICR – Índice de Crescimento Radicular; IC – Intervalo de confiança de 95%; LI – Limite Inferior; LS – Limite Superior; IG – Índice de Germinação; ECR – Estimulação do Crescimento Radicular; SES – Sem Efeito Significativo; ICR – Inibição do Crescimento Radicular.

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2022.

**Gráfico 7** Resultados da exposição do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) frente à *Solanum lycopersicum*.



Legenda - Média com a mesma letra do composto padrão não difere pelo método de comparação múltipla de Dunnett; b- Médias que diferem apresentaram baixa diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

### 6.12.3. Análise comparativa do Índice de germinação da *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersium* e *Allium cepa*.

O percentual de germinação do controle negativo (água destilada) foi de 100%, ao passo que em 0,33% v/v de CH<sub>3</sub>CN e DMSO das espécies *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* e *Allium cepa* foram de 105%, 72,53% e 82,4%, respectivamente. O controle negativo (0,33% de CH<sub>3</sub>CN) da *Lactuca sativa* estimulou em 5% a germinação, embora ao comparar com as concentrações em 25 e 12,5 µg/mL do composto **SF10**, o aumento observado no índice de germinação foi de 17 e 83% (Tabela 18), ou seja, a mais do que o acréscimo do controle negativo (0,33% de CH<sub>3</sub>CN).

O efeito de estimular a germinação na *Lactuca sativa* pode estar associado à ocorrência de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico na rota biossintética do ácido chiquímico, presente no Alface (Figura 2) (El-Seedi *et al.*, 2012; Sova e Saso, 2020). Narukawa *et al.* (2009) ao estudarem a *Lactuca sativa*, observaram que derivados cinâmicos como o ácido clorogênico, estimulava o crescimento estrutural das radículas secundárias, distribuindo-se em toda a extensão radicular e inclusive no hipocótilo (Narukawa *et al.*, 2009).

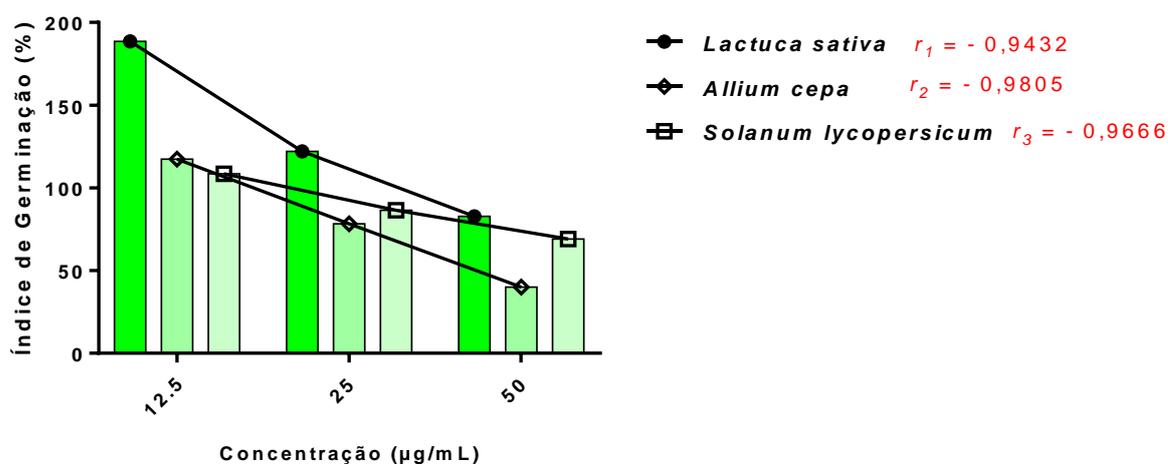
As outras espécies não teve o estímulo de germinação tão pronunciado quanto à *Lactuca sativa*, mas tal efeito pode estar associado à sensibilidade das espécies no controle negativo, como a *Solanum lycopersicum* que foi mais sensível para o mesmo controle negativo em que a *Lactuca sativa* foi exposta. A *Solanum lycopersicum* teve uma redução na germinação de 27,47% quando associado ao controle da água destilada (IG = 100%). Entretanto, a relação das

concentrações de 25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  do composto **SF10** e o controle negativo (0,33% de  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), teve o acréscimo de mais de 10 e 30%, respectivamente (Gráfico 8, Tabela 20). Da mesma forma para a espécie *Allium cepa*, na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , teve o aumento de 34,84%, em relação ao DMSO (0,33% v/v, controle negativo), porém na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , foi observado uma inibição do crescimento radicular de 4,24%.

Os controles negativos utilizados no presente estudo são usados na literatura, e efeitos de estimulação na germinação foram observados para alguns solventes orgânicos como o DMSO nas espécies do gênero *Solanaceae* (Sciuchett e Iturrian, 1965). Embora para a *Allium cepa* o efeito tenha sido inverso, é possível que esteja relacionado à facilidade de permeabilização que o solvente fornece para que a espécie orgânica entre na membrana e em barreiras celulares da planta (Jacob, Bischel e Herschler, 1964; Kocsis, Harkaway e Snyder, 1975; Yu e Quinn, 1994).

O Gráfico 8 mostra a relação entre as concentrações de 12,5; 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  das três espécies estudadas, sendo possível observar que a *Solanum lycopersicum* foi mais suscetível na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  em relação as demais espécies, ao passo que a *Allium cepa* se mostrou mais sensível nas duas maiores concentrações (25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ). A *Lactuca sativa*, apesar da alta sensibilidade reportada na literatura, mostrou-se mais resistente ao composto **SF10** quando comparada à *Solanum lycopersicum* e à *Allium cepa*, respectivamente.

**Gráfico 8:** Resultado da correlação linear do índice de germinação do composto **SF10**, frente às hortaliças e leguminosas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Além do mais, foi observada uma correlação linear decrescente forte ( $r \geq -0,7$ ) da concentração *versus* o índice de germinação, sendo representada pelo coeficiente de correlação

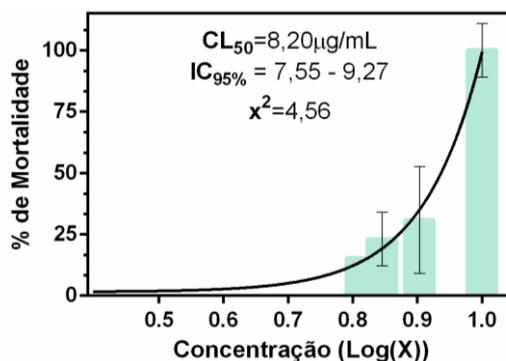
de Pearson ( $r$ ), em que para as espécies da *Allium cepa*, *Solanum lycopersicum* e *Lactuca sativa* tiveram os valores de  $-0,9805$ ,  $-0,9666$  e  $-0,9432$ , respectivamente, tendo uma melhor relação linear decrescente a *Allium cepa* (Gráfico 8) (Paranhos *et al.*, 2014).

#### 6.12.4. Análise da exposição do *p*-clorocinamato de etil (SF10) frente o *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo).

O *p*-clorocinamato de etila (SF10) já se mostrou de baixa toxicidade em espécies vegetais, podendo ser explorado no estudo de regulação de crescimento vegetal, uma vez que estimulou em determinadas concentrações o seu crescimento. Assim, para corroborar com o estudo ecotoxicológico do composto SF10, foi realizado o ensaio de toxicidade frente ao *Oreochromis niloticus* a fim de verificar se em mamíferos aquáticos de água doce o composto SF10 pode ser considerado de baixo risco para os rios e lagos, por exemplo. Dessa forma, a seleção do *Oreochromis niloticus* ocorreu pelo fato de ser uma espécie resistente, encontra-se em abundância no Brasil com destaque para região Nordeste, e muito utilizado em análises ambientais de compostos orgânicos e inorgânicos.

Os resultados evidenciados no presente estudo mostram que o composto SF10 é tóxico para a espécie *Oreochromis niloticus* na concentração letal de 50% após o período de 48h de exposição (Gráficos 9), similar a  $CL_{50}$  ( $8,3 \mu\text{g/mL}$ ) frente ao vetor *Aedes aegypti*, constatando que para organismos aquáticos de água doce o comportamento de toxicidade é provalmente similar, bem como o possível mecanismo de ação, tendo em vista que serinas proteases com destaque a AChE se encontram no sistema de metabolização de peixes tal como a Tilápia do Nilo.

**Gráfico 9:** Resultado da quantificação de toxicidade (Regressão não linear) do composto SF10 frente ao *Oreochromis niloticus*.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

Além disso, a nível de comparação, a  $CL_{50}$  de toxicidade frente ao *Oreochromis niloticus* foi realizada sob diversos períodos (24h – 96h) (Tabela 21) e ficou evidente o aumento da toxicidade quando se aumenta o período de exposição. Embora o composto **SF10** seja tóxico na concentração em 8,20 $\mu$ g/mL para a Tilápia do Nilo, esse pode servir de modelo para a síntese de outros DAC's, visando bons candidatos a inseticidas, uma vez que na literatura já é reportado a baixa toxicidade do ácido cinâmico frente à *Carassius auratus* (Peixe dourado) apresentando uma  $CL_{50}$  de 60  $\mu$ g/mL, de acordo com Ling *et al.* (2015).

**Tabela 21:** Resultados da exposição do composto **SF10** frente ao *Oreochromis niloticus*.

Período de exposição (h)	$CL_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	IC (95%)	$X^2$
24	9,15	8,19 – 12,58	5,15
48	8,20	7,55 – 9,27	4,56
72	8,02	7,46 – 8,88	5,89
96	7,93	7,38 – 8,75	3,70

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2023.

### 6.13. Atividade Antifúngica dos Derivados do ácido cinâmico.

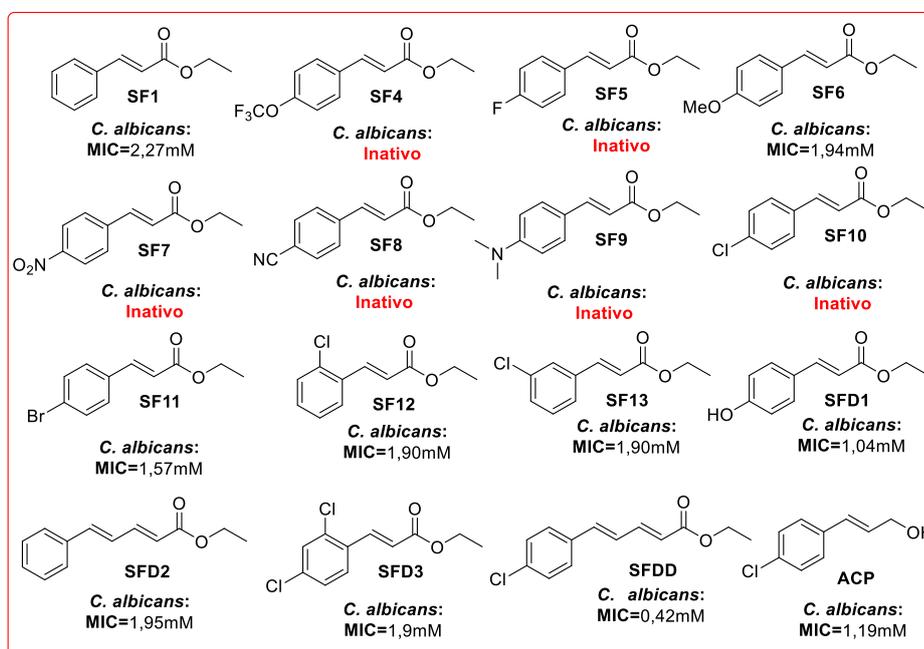
Cerca de 31 derivados do ácido cinâmico foram utilizados na análise antifúngica frente às leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, sendo eles ésteres e ácidos cinâmicos (Figura 39 – 40). Nessa análise fica evidente que para a *C. albicans* a presença do substituinte no núcleo básico cinamoil (**SF1**, **SF4**, **SF5** – **SF13**, **SFD1** – **SFD3**, **SFDD** e **ACP**), atrelado à cadeia lateral pôde levar a uma maior ou menor atividade frente a esse fungo. Para a série dos cinamatos de etila, foi observado que o composto padrão **SF1** teve ação antifúngica (MIC = 2,27mM), condizente com o resultado de Perez-Castillo *et al.* (2020) para o cinamato de metila com MIC de 1,54 mM. Dessa forma, fica evidente que a cadeia lateral também influencia nessa atividade.

Em contrapartida, a presença de grupos eletroretiradores (-OCF<sub>3</sub>, -F, -NO<sub>2</sub>, -NC e -Cl) na posição *p* do grupo cinamoil quando comparado ao composto padrão (**SF1**) houve a inativação das moléculas, com exceção dos compostos **SF11** e **SFDD** com MICs de 1,57 mM e 0,42 mM. Entretanto, o composto **SFDD** apresentou o melhor resultado para essa classe, o que pode estar associado a uma maior distribuição na densidade eletrônica, promovida pelo efeito de ressonância com a adição do grupo eno no núcleo cinamoil (Figura 39) (Vita, De *et al.*, 2016). Esse efeito ficou evidente no composto **SFD2** monossustituído, que em comparação ao composto **SF1** teve uma atividade mais pronunciada (MIC = 1,95mM), e a presença do

átomo cloro (-Cl) na posição *para* dessa molécula (composto **SFDD**) levou à intensificação dessa atividade (Figura 39).

A posição do substituinte também altera a atividade antifúngica, isso pode ser observado para os compostos **SF12**, **SF13** e **SF10**, em que um decréscimo da atividade seguiu no sentido de *orto* = *meta* > *para* com MIC de 1,9 mM. Embora para a posição *p* não se observou efeito inibitório para a cepa *C. albicans*, a presença de mais um átomo de cloro (-Cl) na posição *orto* (Composto **SFD3**) levou a uma atividade com MIC igual ao dos compostos **SF12** e **SF13** (Figura 39).

**Figura 39:** Atividade antifúngica dos derivados do ácido cinâmico frente à *Candida albicans*.



**Fonte:** Petra, Silva & França, 2024.

Perez – Catillo *et al.* (2020) também evidenciaram o efeito da posição na porção cinamoil para os grupos retiradores e doadores de elétrons e observaram que na posição *para* o efeito antifúngico foi reduzido, ao passo que para substituintes eletrodoadores como a hidroxila (-OH) ou o grupo metóxido (-OCH<sub>3</sub>), a posição *orto* implicou numa melhor ação, seguida da *meta* e *para*, respectivamente (*orto*>*meta*>*para*). Esse efeito também foi observado para o *p*-hidroxicinamato de etila (composto **SFD1**) e *p*-metoxicinamato de etila (**SF6**) que apresentaram MIC's de 1,0mM e 1,94 mM, respectivamente (Figura 39). Esses resultados são condizentes aos reportados na literatura, em que derivados do ácido cafeico e ferúlico tiveram ação frente à *C. albicans* e que os grupos hidroxilas tendem a aumentar tal atividade.

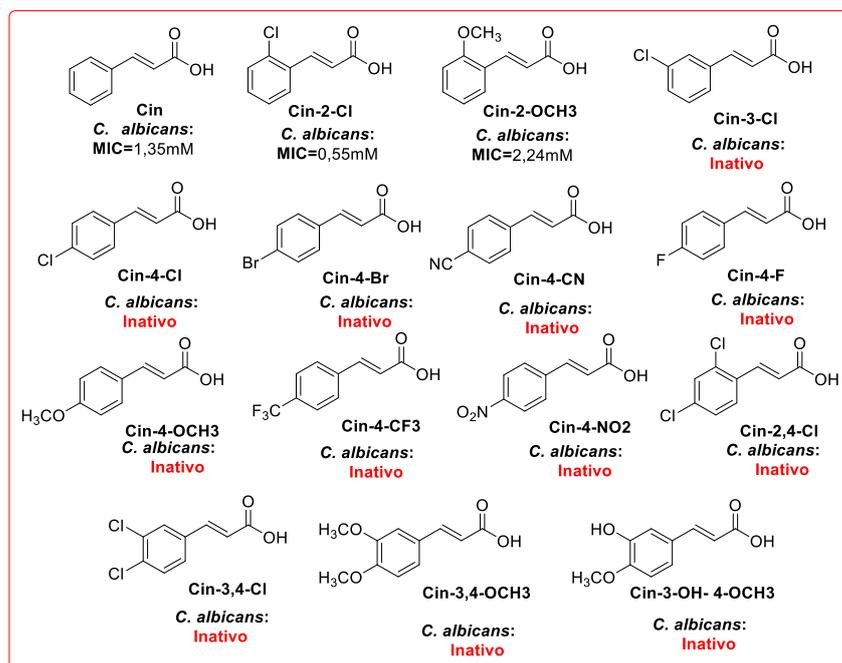
Embora, o *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) não apresentou atividade antifúngica, a redução deste ao álcool *p*-clorocinamato levou a uma atividade antifúngica (MIC = 1,2 mM) (Figura **39**), que, possivelmente, possa estar associada a uma melhor interação do grupo hidroxila com os alvos biológicos presentes na levedura.

Em relação aos ácidos, foi observado que o ácido cinâmico (composto **Cin**) se mostrou mais ativo (MIC = 1,35 mM) frente à *C. Albicans* quando comparado ao composto **SF1** (Figura **40**). Esse efeito pode estar associado provavelmente a uma maior hidrofiliabilidade do ácido cinâmico, o que aumenta a interação por meio de ligações de hidrogênio entre os constituintes da membrana plasmática e o composto **Cin**. De Moraes *et al.* (2023) ao estudarem os ácidos cinâmicos frente à *Candida albicans*, observaram que esses compostos agem pela inibição da síntese do ergosterol ou pela interação direta com esse colesterol.

Embora o composto **Cin** tenha apresentado atividade biológica frente à essa cepa, os demais ácidos cinâmicos com grupos eletroretiradores no anel aromático (-Cl, -Br, -CN, -F, -CF<sub>3</sub> e -NO<sub>2</sub>) na posição *para*, não apresentaram atividade fungicida, assim como nos cinamatos de etila *n*-substituídos (Figura **39 -40**). Dois efeitos podem ter contribuído para a inatividade desses compostos em relação à *Candida albicans*: I) a posição em que o substituinte está localizado e, II) o efeito push-pull associado à presença de grupos eletroretiradores. Esses efeitos podem ter comprometido a possível interação com o ergosterol ou a inibição de sua produção. Por outro lado, os ácidos que mais se destacaram, quanto à atividade fungicida, foram o ácido 3,4 diclocinâmico (**Cin – 3,4-Cl**), o ácido 2-clorocinâmico (**Cin – 2-Cl**) com MIC's de 0,23mM e 0,55 mM, respectivamente.

Para os ácidos com grupos eletrodoadores no anel aromático, compostos **Cin-4-OCH<sub>3</sub>**, **Cin 3 -OH-4-OCH<sub>3</sub>** e **Cin-2-OCH<sub>3</sub>**, foram obtidos MIC de 2,2mM que são baixos quando comparados com os valores do ácido cinâmico (Composto **Cin**) e dos ésteres cinâmicos. (Figura **40**). De modo geral, os DAC's tiveram uma leve atividade antifúngica quando comparada à anfotericina B por exemplo, que apresentou um MIC menor que 1µg/mL.

**Figura 40:** Resultados da atividade antifúngica dos ácidos cinâmicos *n*-substituídos frente à *C. albicans*.



**Fonte:** Petra, Silva & França, 2024.

No estudo de inibição de crescimento antifúngico para a cepa *C. neoformans*, os cinamatos de etila *n*-substituídos apresentaram melhores resultados quando comparado aos resultados frente à *C. albicans*. Nessa análise, o composto **SF1** teve o mesmo MIC em relação à *C. albicans* equivalente a 2,3 mM, porém, a presença de substituintes eletroretiradores na posição *para* no grupo cinamoil, observou-se o aumento na atividade a partir da seguinte seqüência de substituintes -H<-F<-OCF<sub>3</sub><-Cl<-CN<-Br (**SF1**<**SF5**<**SF4**<**SF10**<**SF8**<**SF11**), destacando-se o *p*-bromocinamato de etila (**SF11**) com MIC de 0,39 mM (Figura 41). O efeito de ressonância combinado ao indutivo (Polaridade) pode estar associado com essa ação biológica, induzindo a um maior aumento da lipofilicidade, além da melhor interação de ligação de halogênio frente a algum receptor biológico.

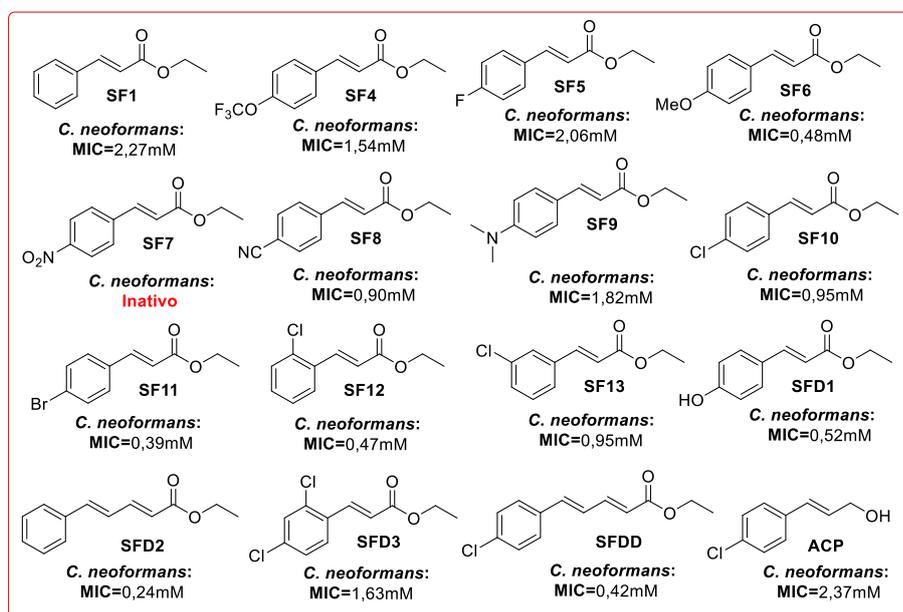
Com base na posição do substituinte, a *orto* prevalece na atividade antifúngica, destacando-se o *o*-clorocinamato de etila (**SF12**) com MIC de 0,74mM, ao passo que o *m*-clorocinamato de etila (**SF13**) e *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) apresentaram MIC de 0,95mM. Contudo, a presença de mais um átomo de cloro na posição *orto* do composto **SF10** (composto **SFD3**), observou-se um aumento no MIC e uma redução na atividade, possivelmente o efeito estérico pode levar a uma redução na ação biológica, no entanto é necessário mais estudo para confirmar esse feito.

Além disso, a adição do grupo eno na estrutura cinâmica (composto **SFD2**) possibilitou uma melhor ação antifúngica entre todos os compostos com MIC de 0,24 mM ao comparar com

o composto padrão (**SF1**). Da mesma maneira, observou-se para o composto **SF10**, que a adição do grupo eno levou a um aumento da atividade antifúngica de 0,42mM. A extensão da conjugação em **SF10** (Composto **SFDD**), possivelmente, aumentou a lipofilicidade, sendo essa provavelmente responsável pela ação biológica (Figura 41).

Os cinamatos de etila com substituintes doadores de elétrons tiveram também o bom efeito antifúngico com MIC de 0,48mM e 0,52 mM para os compostos **SF6** e **SFD1**, respectivamente. Esses compostos foram mais ativos que os cinamatos de etila com substituintes eletroretiradores na posição *para* do anel fenila (Figura 41). O álcool *p*-clorocinâmico (**ACP**), advindo da reação de redução do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), levou à uma atividade fungicida para *C. neoformans* de 2,37mM maior que a do seu precursor (Figura 41). Apesar desse fato, a literatura reporta que álcoois e aminas alifáticos não possuem efeito antifúngico para ambas as cepas em estudo, entretanto para os derivados do ácido cinâmico uma leve ação antifúngica foi observada (Peres – Castillo *et al.*, 2020).

**Figura 41:** Resultados da atividade antifúngica dos cinamatos de etila *n*-substituídos contra à *C. neoformans*.



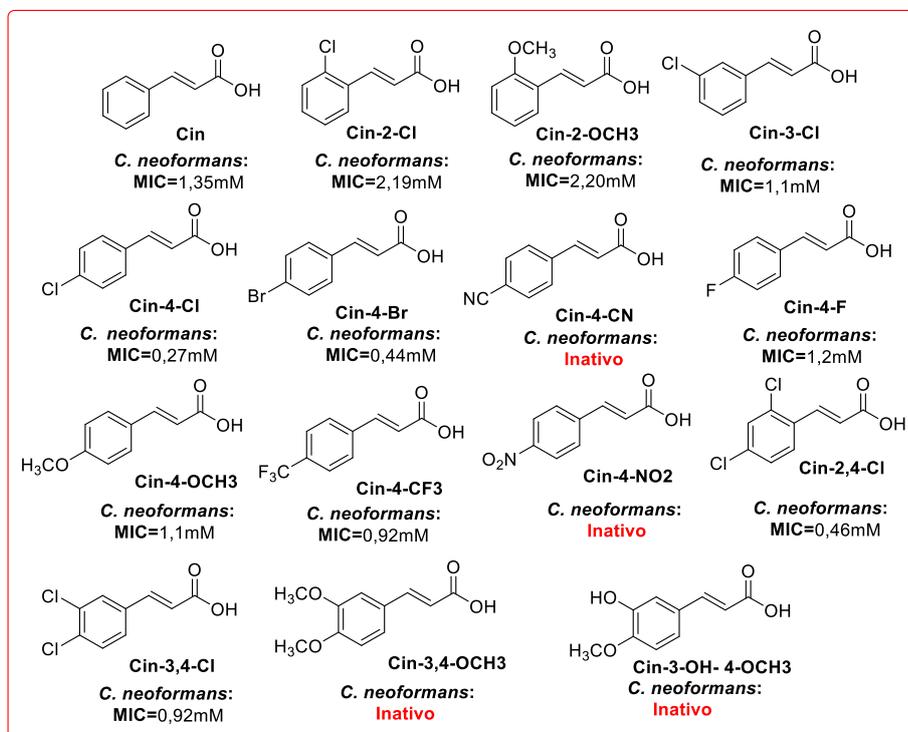
Fonte: Petra, Silva & França, 2024.

Os ácidos cinâmicos *n*-substituídos foram avaliados frente à *C. neoformans* e ficou evidente que o ácido cinâmico (**Cin**) apresentou o melhor resultado em relação ao composto **SF1** com MIC de 1,35mM. Em contrapartida, a presença do átomo de cloro na posição *orto* levou a uma redução da atividade (MIC = 2,19mM), no entanto nas posições *meta* e *para* bons resultados foram obtidos com MIC's de 1,1 mM e 0,27mM, respectivamente. Dessa forma,

nessa análise o composto **Cin – 4-Cl** se destacou entre todos os compostos dessa série cinâmica (Figura 42). Além disso, a presença de mais um átomo de cloro na posição *orto*, composto **Cin-2,4-Cl**, levou à redução da atividade antifúngica quando comparado ao composto **Cin-4-Cl**, apresentando o MIC de 0,46 mM, entretanto, o composto **Cin-3,4-Cl** levou a uma menor atividade fungicida (MIC de 0,92 mM) quando comparado ao seu isômero **Cin-2,4-Cl** (MIC = 0,46 mM), que pode estar atrelado à mudança da posição do átomo de -Cl de *orto* para a *meta* (Figura 42).

Assim, foi possível observar que a posição *para* no núcleo cinamoil para essa cepa contribuiu para a inibição do seu crescimento, Ademais, os resultados com os grupos eletroretiradores como o -Br, -F, e CF<sub>3</sub> (Compostos **Cin-4-Br**, **Cin-4-F** e **Cin-4-CF<sub>3</sub>**) foram mais significativos em relação à *C. albicans* (Figura 40) com MIC's de 0,44 mM, 1,2 mM e 0,92 mM, respectivamente (Figura 42), com exceção do ácido *p*-nitrocinâmico (composto **Cin-4-NO<sub>2</sub>**) que se mostrou inativo.

**Figura 42:** Resultados da atividade antifúngica dos ácidos cinâmicos *n*-substituídos frente à *C. neoformans*.



Fonte: Petra, Silva & França, 2024.

Os ácidos cinâmicos contendo grupos metoxidos (-OCH<sub>3</sub>, doador de elétrons) na posição *para* e *orto* do núcleo cinamoil apresentaram MIC's de 1,1mM e 2,19mM, respectivamente. Esses resultados indicam que, em relação ao ácido cinâmico (MIC = 1,35mM) o composto **Cin-4-OCH<sub>3</sub>** apresentou uma leve atividade antifúngica, enquanto o composto **Cin-2-OCH<sub>3</sub>** exibiu baixa atividade (Figura 42). Da mesma forma, os compostos **Cin-3-OH-4-OCH<sub>3</sub>** e **Cin-3,4-OCH<sub>3</sub>** foram inativos frente à essa cepa. Esse efeito pode estar associado a menor suscetibilidade da carbonila ao ataque nucleofílico de algum alvo biológico em decorrência do aumento da conjugação (efeito mesomérico (+M)), levando à inativação dessas moléculas.

6.14. Avaliação da atividade leishmanicida das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas derivadas do ácido cinâmico.

6.14.1. Análise *in vitro* dos depsipeptídeos cinâmicos *n*-substituídos frente à *Leishmania amazonensis*.

Os depsipeptídeos cinâmicos ( $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas) (Compostos **SFD4 – SFD10 e SFD45**) foram avaliados frente às formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*, bem como o nível de citotoxicidade contra macrófagos peritoneais a partir da concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>), conforme observado na Tabela 22. Os resultados de citotoxicidade mostram que a maioria das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas foram atóxicas frente a macrófagos peritoneais, apresentando uma CC<sub>50</sub> acima de 400 $\mu$ M, ao passo que o controle positivo (anfotericina B) apresentou uma CC<sub>50</sub> de 50 $\mu$ M (Tabela 22), em contrapartida, o composto **SD5** foi altamente tóxico com uma CC<sub>50</sub> de 19,45 $\mu$ M não sendo um candidato relevante para o estudo leishmanicida (Tabela 22).

De posse dos dados de citotoxicidade, foi realizada a análise da atividade leishmanicida das  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas. Dentre todas as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas testadas, o composto **SDF4** se destacou tanto na forma promastigota (forma evolutiva que se encontra na saliva do hospedeiro) quanto na amastigota intracelular, (forma evolutiva infecciosa), apresentando uma concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) de 31,83  $\mu$ M e 27,28  $\mu$ M, respectivamente. Entretanto, a presença de grupos doadores ou retiradores de elétrons no anel aromático dos depsipeptídeos influenciaram ora na atividade promastigota ora na amastigota. Para o composto **SFD5**, contendo o átomo de cloro na posição *para* do anel aromático em R<sub>2</sub>, foi observada uma redução da atividade promastigota (CI<sub>50</sub> > 200  $\mu$ M) e inativação para a forma amastigota. No entanto, para o composto **SFD45** com os grupos retiradores de elétrons nas posições *para* (-Cl e -OCF<sub>3</sub>),

a atividade promastigota foi maior em relação ao composto **SFD5** com  $CI_{50}$  de 62,67  $\mu\text{M}$  e inativo para a forma evolutiva infecciosa.

Além disso, os compostos **SFD6** e **SFD9** que apresentam o grupo fenila na posição *orto* da porção cinamoila ou o núcleo naftil cinâmico não se mostraram ativos ( $CI_{50} > 200 \mu\text{M}$ ) frente à forma promastigota, possivelmente devido à alta rigidez das estruturas, o que dificultou a interação de modo efetiva frente aos receptores presente no protozoário. Contudo, ao substituir o grupo fenila pelo átomo de cloro (-Cl) na posição *para* do núcleo cinamoil (composto **SFD10**), a atividade aumentou para a forma promastigota ( $CI_{50} = 33,88 \mu\text{M}$ ), e teve uma leve ação frente à forma amastigota com  $CI_{50}$  de 38,31  $\mu\text{M}$  (composto **SFD10**, Tabela 22).

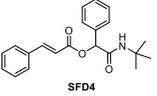
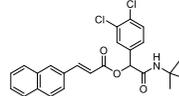
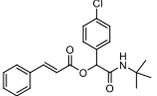
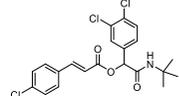
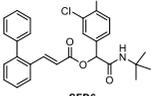
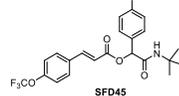
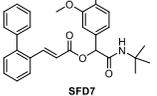
O composto **SFD7**, estruturalmente semelhante ao **SFD6** apresentou uma relevante ação leishmanicida na forma promastigota ( $CI_{50}$ ) com  $CI_{50}$  de 64,41  $\mu\text{M}$ . Esse resultado está associado à presença de grupos metoxidos na posição *orto* e *meta* do grupo fenila do carbono assimétrico. (Tabela 22). Pandey *et al.* (2016), confirmaram o efeito desse grupo ao estudarem carboxiamidas derivadas de indóis frente à *Leishmania donovani*.

Segundo Otero *et al.* (2014) ao explorarem a atividade de derivados do ácido cinâmico frente à *Leishmania panamensis*, observaram que a estrutura cinâmica e a cadeia lateral são importantes para a citotoxicidade e a atividade leishmanicida. Além do mais, o grupo *terc*-Butil na cadeia lateral pode intensificar o efeito leishmanicida, segundo Pandey *et al.* (2016). Nesta mesma linha, Moraes *et al.* (2015) observaram que amidas e ésteres cinâmicos foram ativos frente à forma promastigota da *Leishmania infantum*, indicando que esses grupos funcionais são relevantes para a atividade leishmanicida. Além disso, Pandey *et al.* (2016), comprovaram pelo estudo de Relação Estrutura-Atividade (REA) em carboxiamidas derivadas de indóis, que o grupo  $R_2$  tem forte influência na atividade leishmanicida.

Embora os compostos apresentados nesse estudo, com ênfase no **SFD4**, não sejam tão ativos em relação à anfotericina B, que apresentou um  $CI_{50}$  de 2,39  $\mu\text{M}$  e 4,82  $\mu\text{M}$ , (Tabela 22) eles podem servir como bons modelos para o planejamento de candidatos frente à *Leishmania amazonensis*. Além disso, o composto **SFD4** exibiu um índice de seletividade ( $IS > 14$ ) superior ao resultado da anfotericina B, que apresentou um  $IS$  acima de 10. Ademais, a maioria desses compostos possui parâmetros farmacocinéticos em conformidade com a regra de Lipinski (Tabela 14). Essa regra determina se uma molécula pode ser considerada um bom candidato terapêutico, a partir da avaliação de absorção ou permeação, realizada por meio de cinco parâmetros, sendo eles: o  $ClogP \geq 5$ ,  $HBA \leq 10$ ;  $HBD \leq 5$  e  $MM \leq 500$  (Santos, Gonsalves & Araújo, 2017).

Essas moléculas possuem boa lipofilicidade ( $\text{ClogP} \leq 6$ , Tabela **14**), de acordo com os parâmetros da regra de Lipinski. Além disso, é provável que a lipofilicidade seja a força motriz para a atividade leishmanicida dos DAC's, como assim afirma Papadopoulou *et al.* (2015).

**Tabela 22:** Atividade contra formas promastigota e amastigota intracelular de *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade após 24 horas de tratamento de  $\alpha$ -acilocarboxiamidas.

Composto	Macrófago peritoneal CC <sub>50</sub> (μM)	IS	<i>Leishmania amazonensis</i> CI <sub>50</sub> (μM)		Composto	Macrófago peritoneal CC <sub>50</sub> (μM)	<i>Leishmania amazonensis</i> CI <sub>50</sub> (μM)		IS
			promastigota	amastigota intracelular			promastigota	amastigota intracelular	
	>400	>14,66	31,83 ± 1,161	27,28 ± 1,150		>400	>200	–	–
	19,45 ± 0,109	–	>200	–		>400	33,88 ± 1,161	38,31 ± 1,158	>10,44
	>400	–	>200	–		>400	62,67 ± 1,196	–	–
	>400	–	65,41 ± 1,202	–	Anfotericina B	>50	2,378 ± 0,154	4,825 ± 1,033	>10,36

Legenda: Dados representam média ± desvio padrão de ao menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. CI<sub>50</sub>: concentração inibitória de 50% de parasitas; CC<sub>50</sub>: concentração citotóxica para 50% de células; IS: índice de seletividade calculado a partir da razão CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub> contra forma amastigota intracelular. –: não determinado.

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2024.

6.14.2. Estudo de interação do composto **SFD4** a partir do docking reverso frente a receptores presentes na *Leishmania*.

Considerando os resultados biológicos observados para o composto **SFD4** obtidos na avaliação biológica frente às formas evolutivas de *Leishmania*, o potencial alvo biológico foi identificado para o composto **SFD4**, corroborando a sua atividade. Dessa forma, uma estratégia *in silico* utilizando docking reverso foi adotada para tal finalidade. Em geral, diferentes estratégias de docking reverso têm sido utilizadas durante o processo de planejamento ou reposicionamento de fármacos (Kharkar, Warriar e Gaud, 2014; Lee, Lee e Kim, 2016; Ruiz-Moreno, Dömling e Velasco-Velázquez, 2021). Assim, 59 macromoléculas foram investigadas como potenciais alvos para o composto **SFD4**, conforme observado na Tabela **23**.

**Tabela 23:** Resultados da triagem virtual de alvos biológicos presentes na *Leishmania* do composto **SFD4** a partir do Docking reverso.

Alvos chaves	Nome do alvo (gene)	Código no UniProt	Descrição	Energia livre de ligação (kcal/mol)
O93874_COCLU	17HSDc1	93874	17beta-hidroxiesteróide desidrogenase	<b>-7.361</b>
Q8ILP4_PLAF7		Q8ILP4	Pantotenato quinase, putativo	<b>-7.873</b>
ACER2_HUMAN	ACER2	Q5QJU3	Ceramidase alcalina 2	<b>-8.099</b>
STXA_SHIDY	stxA	Q9FBI2	Subunidade A da toxina Shiga	<b>-8.597</b>
PPAP_HUMAN	ACP3	P15309	Fosfatase ácida prostática	<b>-7.480</b>
AMD_HUMAN	PAM	P19021	Peptidil-glicina alfa-amidante monooxigenase	<b>-7.667</b>
CA2D1_RAT	Cacna2d1	P54290	Subunidade alfa-2/delta-1 do canal de cálcio dependente de voltagem	<b>-7.200</b>
AK1BA_HUMAN	AKR1B10	60218	Família Aldo-ceto redutase 1 membro B10	<b>-7.622</b>
MALX3_YEAST	IMA1	P53051	Oligo-1,6- glicosidase IMA1	<b>-8.044</b>
KCNQ2_MOUSE	Kcnq2	Q9Z351	Subfamília de canais dependentes de voltagem de potássio, membro 2 do KQT	<b>-7.923</b>
CACB1_RAT	Cacnb1	P54283	Subunidade beta-1 do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem	<b>-7.412</b>
VMAT2_HUMAN	SLC18A2	Q05940	Transportador sináptico de amina vesicular	<b>-8.525</b>
RBBP9_HUMAN	RBBP9	75884	Serina hidrolase RBBP9	<b>-8.246</b>
A0A060INS8_CAPHI	CTSH	A0A060INS8	Catepsina H	<b>-8.179</b>
CP24A_HUMAN	CYP24A1	Q07973	1,25-di-hidroxitamina D(3) 24-hidroxilase, mitocondrial	<b>-7.758</b>
MMP1_HUMAN	MMP1	P03956	Colagenase intersticial	<b>-7.697</b>
MMP9_HUMAN	MMP9	P14780	Metaloproteinase de matriz-9	<b>-7.399</b>
CP27B_MOUSE	Cyp27b1	35084	25-hidroxitamina D-1 alfa hidroxilase, mitocondrial	<b>-8.381</b>
MMP2_HUMAN	MMP2	P08253	Colagenase tipo IV de 72 kDa	<b>-8.155</b>
C3TDZ2_ECOLX	fabH	C3TDZ2	3-oxoacil-[acil-proteína transportadora] sintase 3	<b>-8.287</b>
AMPL_PIG	LAP3	P28839	Citosol aminopeptidase	<b>-8.608</b>

Fonte: Silva & Silva-Júnior, 2023.

Alvos chaves	Nome do alvo (gene)	Código no UniProt	Descrição	Energia livre de ligação (kcal/mol)
NR1H4_HUMAN	NR1H4	Q96RI1	Receptor de ácido biliar	<b>-7.217</b>
Q94F81_MAIZE	hda106	Q94F81	Histona desacetilase tipo HD2 HDA106	<b>-7.971</b>
HDAC7_HUMAN	HDAC7	Q8WUI4	Histona desacetilase 7	<b>-7.538</b>
CAC1B_RAT	Cacna1b	Q02294	Subunidade alfa-1B do canal de cálcio tipo N dependente de voltagem	<b>-7.312</b>
H9B8T9_CAPHI	CTSB	H9B8T9	Catepsina B	<b>-7.014</b>
Q72874_9HIV1	pol		Pol poliproteína	<b>-8.120</b>
Q7ZJM1_9HIV1	pol		Integrase	<b>-7.560</b>
LPXC_PSEAE	lpxC	P47205	UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina desacetilase	<b>-7.380</b>
DHB3_RAT	Hsd17b3	54939	Testosterona 17-beta-desidrogenase 3	<b>-7.298</b>
TLR4_MOUSE	Tlr4	Q9QUK6	Receptor tipo Toll 4	<b>-7.661</b>
PSA_HUMAN	NPEPPS	P55786	Aminopectidase sensível à puromicina	<b>-8.284</b>
AK1C4_HUMAN	AKR1C4	P17516	Família Aldo-ceto redutase 1 membro C4	<b>-7.959</b>
HDAC5_HUMAN	HDAC5	Q9UQL6	Histona desacetilase 5	<b>-7.100</b>
S12A2_HUMAN	SLC12A2	P55011	Família de portadores de soluto 12 membro 2	<b>-7.700</b>
TTHY_HUMAN	TTR	P02766	Transtirretina	<b>-7.617</b>
FOS_HUMAN	FOS	P01100	Proto-oncogene c-Fos	<b>-7.153</b>
KCNQ3_HUMAN	KCNQ3	43525	Subfamília de canais dependentes de voltagem de potássio, membro 3 do KQT	<b>-7.800</b>
GABT_RAT	Abat	P50554	4-aminobutirato aminotransferase mitocondrial	<b>-7.134</b>
ALDR_HUMAN	AKR1B1	P15121	Família Aldo-ceto redutase 1 membro B1	<b>-7.059</b>
AGP1_YEAST	AGP1	P25376	Aminoácido geral permease AGP1	<b>-7.937</b>
HDAC1_MOUSE	Hdac1	9106	Histona desacetilase 1	<b>-7.104</b>
P96830_MYCTO		P96830	Proteína contendo domínio TYR_PHOSPHATASE_2	<b>-8.293</b>
CAH13_MOUSE	Ca13	Q9D6N1	Anidrase carbônica 13	<b>-8.732</b>

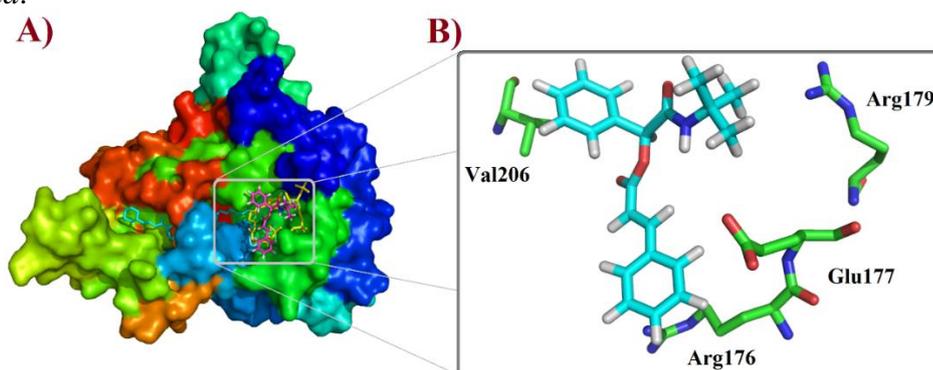
Fonte: Silva & Silva-Júnior, 2023.

Alvos chaves	Nome do alvo (gene)	Código no UniProt	Descrição	Energia livre de ligação (kcal/mol)
HDAC9_HUMAN	HDAC9	Q9UKV0	Histona desacetilase 9	-7.790
	PDB: 2JK6		Tripanotona redutase	-8.092
	-		Pantotenato quinase, putativo	-7.200
	3UIB		Proteína Quinase A	-7.865
	PDB: 4JZX		Ceramida sintase	-8.180
	PDB: 4C7H		N-miristoiltransferase	-8.980
	PDB: 5OEY		Frutose-1,6-bifosfatase	-7.510
	-		Fosfatase ácida secretada	-8.208
	-		Serina hidrolase	-7.784
	Homologia		Aspartil aminopeptidase	-7.989
	Homologia		Aldeído desidrogenase	-8.281
	Homologia		Mitocondrial	-7.708
			Cinetoplastídeos (KMP-11)	-7.999
			Glicoproteína – gp46/M-2	-7.767
	Leishmanolisina (GP63)		Glicoproteínas - gp63	-7.681

Fonte: Silva & Silva-Júnior, 2023.

Na presente análise, a *N*-miristoíla transferase (PDB id 4C7H) se destacou como o potencial alvo para o composto **SFD4** apresentando uma energia livre de ligação de -8,98 kcal/mol, cujo resultado do cluster exibiu o mesmo local de ligação no alvo, bem como energia de afinidade similar ao do peptidomimético co-cristalizado na estrutura (redocking = -9,4 kcal/mol), reportado por Olaleye *et al.* (2014) (Tabela 21, Figura 42).

**Figura 43:** Ligação do depsipeptídeo cinâmico **SFD4** na *N*-miristoíla transferase de *Leishmania*.



Legenda: Em (A), cluster de ligantes mostrando o sítio de ligação do composto **SFD4** (magenta) sobreposto com os inibidores reportados (ciano e amarelo) por Olaleye *et al.* 2014. Em (B), interações do composto **SFD4** em complexo com a *N*-miristoíla transferase.

Fonte: Silva & Silva-Júnior, 2023.

Ao avaliar as interações do composto **SFD4** frente à *N*-miristoíla transferase (Figura 42), verificou-se que o depsipeptídeo apresenta apenas interações via contatos hidrofóbicos com os resíduos Arg<sup>176</sup>, Glu<sup>177</sup>, Arg<sup>179</sup> e Val<sup>206</sup>, os quais também estão envolvidos na interação do peptidomimético co-cristalizado na estrutura da enzima (Olaleye *et al.* 2014). Assim, é possível inferir que a estratégia *in silico* utilizando docking reverso produziu um resultado muito significativo, uma vez que identificou um alvo biológico potencial que possui um peptidomimético co-cristalizado, contendo certa similaridade estrutural.

Nessa mesma ventente, Olaleye *et al.* (2014) também exploraram outros peptidomiméticos que possuem similaridade estrutural com o composto **SFD4**, mostrando serem efetivos frente à *Leishmania donovani*. Os pesquisadores observaram que as interações hidrofóbicas desempenharam um papel crucial na inibição da *N*-miristoiltransferase, uma enzima cistólica. Ao ser inibida, a catálise da ligação do ácido graxo saturado (miristato) ao resíduo do grupo amino-terminal da glicina é impedida, resultando na interrupção da formação de complexos proteicos estáveis, seja entre proteínas ou entre proteínas e membrana plasmática (Olaleye *et al.* 2014).

## 7. CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou explorar a atividade larvicida, ecotoxicológica, antifúngica e leishmanicida de derivados de ácido cinâmico. As modificações estruturais específicas na porção cinamoíla, foi realizada, bem como estudar o possível mecanismo de ação biológica dessa classe por meio do estudo *in sílico*. Adicionalmente, foi conduzido o estudo de inibição *in vitro* da AChE para identificar o alvo biológico associado à atividade larvicida, no qual o extrato larval foi quantificado e atividade catalítica da AChE foi avaliada.

O *p*-clorocinamato de etila (**SF10**), destacou-se como o larvicida mais eficaz ( $CL_{50} = 8,3\mu\text{g/mL}$ ) na série cinâmica. Diante disso, uma análise de CLAE-UV foi realizada a partir do extrato larval tratado com esse, sendo possível identificar uma hidrólise enzimática por meio da identificação do seu precursor (**Cin – 4-Cl**). Além disso, a avaliação morfológica das larvas expostas ao composto **SF10** revelou alterações no intestino médio e tardio, bem como a completa destruição do sifão e das papilas anais, indicando a possível secreção da matriz peritrófica presente na larva.

O ensaio de viabilidade celular mostrou principalmente, para os compostos **SF1** e **SF10** baixa toxicidade frente às células A549. Além disso, o composto **SF10** apresentou baixa toxicidade, para as espécies *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* e *Allum cepa*, sendo o bom candidato a inseticida frente ao *Aedes aegypti*, embora tenha apresentado toxicidade para a Tilápia do Nilo.

Os derivados do ácido cinâmico se mostraram com atividade antifúngica frente às *C. albicans* e *C. neoformans* tendo o efeito mais pronunciado para essa última espécie, destacando-se o composto **Cin-4-Cl** com MIC de 0,27mM. Por outro lado, os demais compostos tiveram uma leve ação antifúngica, sendo ela alterada pela variação e posição do substituinte. Na posição *orto*, os grupos eletrodoadores tiveram o resultado mais significativo frente à cepa *C. albicans*, ao passo que para a *C. neoformans*, os compostos com grupos eletroretiradores se destacaram.

Com o estudo de docking molecular e dados da literatura foi planejada uma série de depsipeptídeos cinâmicos inéditos, que foram sintetizados via reação racêmica de Passerini. Os rendimentos foram moderados, dado o caráter inédito das moléculas envolvidas no processo. Embora no estudo larvicida não tenham apresentado atividade, o que pode estar associado ao grupo *ter*-Butila e à amida, que inativaram o fragmento farmacofórico cinamoíla (importante na ação larvicida), alguns compostos como o **SFD4** e **SFD10**, exibiram atividade significativa frente à *Leishmania amazonensis* em ambas as formas evolutivas. Além disso, esses compostos

se destacaram em termos de índice de seletividade, estando acima ao que é recomendado (IS>10), e apresentaram baixa citotoxicidade contra macrófagos peritoneais ( $CC_{50} > 400\mu\text{M}$ ).

Suas estruturas, podem, portanto, servir como modelos para o planejamento de candidatos terapêuticos leishmanicidas. Além disso, pelo estudo de docking reverso ficou evidente que o alvo potencial que o composto **SFD4** possivelmente atua seja a *N*-miristoiltransferase por contatos hidrofóbicos, sendo um alvo importante para o planejamento de compostos frente as mais variadas formas da *Leishmania*.

De forma geral, os resultados indicam que a hidrólise enzimática desempenha um papel crucial na ação larvicida dos cinamatos de etila *n*-substituídos. Esses compostos podem ser usados como modelos para o planejamento de larvicidas eficazes e seletivos frente ao *Aedes aegypti*. Além disso, os derivados do ácido cinâmico incluindo as  $\alpha$ -aciloxicarboxiamidas, apresentam potencial para serem considerados candidatos promissores a fármacos e/ou inseticidas, justificando a necessidade de uma exploração mais aprofundada por parte da comunidade científica.

## 8. PERSPECTIVAS

- a) Quantificar o estudo de inibição enzimática dos derivados cinamatos de etila *n*-substituídos frente à AChE presente no extrato larval;
- b) Dar continuidade ao estudo antifúngico dos ésteres e ácidos cinâmicos *n*-substituídos que se apresentaram ativos frente à *C. albicans* e *C. neoformans* e fazer o estudo *in sílico* a fim de explorar o possível mecanismo de ação identificando o alvo potencial.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265–267, 1 abr. 1925.
- ABD EL-HACK, M. E. *et al.* Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, p. 101696, abr. 2022.
- AHN, Y. *et al.* Larvicidal activity of *Kaempferia galanga* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. **Pest Management Science**, v. 64, n. 8, p. 857–862, 6 ago. 2008.
- ALBUQUERQUE, B. N. DE L. *et al.* Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of  $\beta$ -germacrene-D-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 182, p. 114830, ago. 2022.
- ALMEIDA, A. R. *et al.* Nanoemulsions and Solid Microparticles Containing Pentyl Cinnamate to Control *Aedes aegypti* and contaminate surface water sources [ 10 , 11 ]. Exploring new larvicidal compounds offers a promising solu lenges posed by the resistance to existing larvicides. 2023.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- 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. 1–21, 2021.
- AUGUSTINE, J. K. *et al.* TiCl<sub>4</sub>-mediated olefination of aldehydes with acetic acid and alkyl acetates: a stereoselective approach to (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic acids and esters. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 24, p. 3503–3506, jun. 2014.
- BACHA, H. *et al.* Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. Microtom leaves. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 364–369, jan. 2017.
- BARROS, M. E. S. B. *et al.* Effects of  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactones on larval survival and gut trypsin as well as oviposition response of *Aedes aegypti*. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 37–41, set. 2015.
- BATISTA, V. S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. **Medicinal & Analytical Chemistry International Journal Molecular Docking: Considerations of a Low Cost and Suitable Methodology and Some Successful Applications Molecular Docking: Considerations of a Low Cost and Suitable Methodology and Some Successful Applications**. [s.l: s.n.].
- BERNAL, F. A. *et al.* ( $\pm$ )-trans-2-phenyl-2,3-dihydrobenzofurans as leishmanicidal agents: Synthesis, in vitro evaluation and SAR analysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 205, p. 112493, 2020.
- BIANCO, G. *et al.* Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. **Protein Science**, v. 25, n. 1, p. 295–301, 7 jan. 2016.

- BISEL, P.; AL-MOMANI, L.; MÜLLER, M. The tert-butyl group in chemistry and biology. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 15, p. 2655, 2008.
- BISOGNO, F. *et al.* Structure–Antifungal Activity Relationship of Cinnamic Acid Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10635–10640, 1 dez. 2007.
- BOUSQUET, T. *et al.* Fast and efficient solvent-free Passerini reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 3, p. 306–308, jan. 2012.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, dez. 2007.
- BUXTON, T. *et al.* Insecticidal activities of cinnamic acid esters isolated from *Ocimum gratissimum* L. and *Vitellaria paradoxa* Gaertn leaves against *Tribolium castaneum* Hebst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 257–267, 2020.
- CAMPAGNA-FERNANDES, A. F.; MARIN, E. B.; PENHA, T. H. L. L. Application of root growth endpoint in toxicity tests with lettuce (*Lactuca sativa*). **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 11, n. 1, p. 27–32, 12 ago. 2016.
- CANSIAN, R. L. *et al.* Toxicity and larvicidal activity on *Aedes aegypti* of citronella essential oil submitted to enzymatic esterification. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. 1–5, 2023.
- CAO, P. *et al.* As-Catalyzed Wittig-Type Olefination of Aldehydes with Diazoacetate in the Presence of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 17, p. 6628–6630, 1 ago. 2007.
- CARVALHO, J. R. DE; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U. R. **ANÁLISE DE PROBIT APLICADA A BIOENSAIOS COM INSETOS**. Colatina: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/317994149>>.
- CATÃO, R. DE C. **Dengue no Brasil: abordagem geográfica na escala nacional**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2011.
- CHAITHONG, U. *et al.* Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology**, v. 31, n. 1, p. 138–44, jun. 2006.
- CHOCHKOVA, M. B. *et al.* **Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/230785748>>.
- CHUKWUJEKWU, J. C.; STADEN, J. VAN. Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 147–150, maio 2014.
- CORBET, S. A. *et al.* Surface films as mosquito larvicides: partitioning the mode of action. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 94, n. 3, p. 295–307, 7 mar. 2000.
- CORREIA, P. R. S. *et al.* Discovery and structure-activity relationship of Morita-Baylis-Hillman adducts as larvicides against dengue mosquito vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 90, n. February, 2023.

- CUI, Y. *et al.* Inhibition kinetics and molecular simulation of p-substituted cinnamic acid derivatives on tyrosinase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1289–1297, fev. 2017.
- DALARMI, L. *et al.* Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae - Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 35, p. 881–885, 22 set. 2015.
- DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 243–250.
- DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents- A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1672–1703, 1 abr. 2011.
- DIAZ, L. M. C.; CAMPOS, C.; ORON, G. Toxicity Effects of Selected Heavy Metals on *Lactuca sativa* and *Hydra viridissima* used for Sustainable Crop Production. **Environmental Management and Sustainable Development**, v. 7, n. 3, p. 82, 30 jul. 2018.
- (DIZDARI), A. M.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**, v. 8, p. 19–26, 2013.
- EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 23 ago. 2021.
- ELFIKY, A. A. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. **Life Sciences**, v. 248, 1 maio 2020.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.
- EL-SEEDI, H. R. *et al.* Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 10877–10895, 7 nov. 2012.
- EPA. Ecological Effects Test Guidelines (OPPTS 850.1075). Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine. **Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101)**, p. 96–118, 1996.
- ESMERALDO, M. A. **REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-RENORBIO MILENA ALENCAR ESMERALDO BIOPRODUTOS DERIVADOS DE BIOMASSA VEGETAL NO COMBATE AO MOSQUITO TRANSMISSOR DA DENGUE-Aedes aegypti**. Fortaleza: [s.n.].
- FERNANDES, K. M. *et al.* Avaliação Da Atividade De Antimicrobianos Comumente Utilizados Na Rede Hospitalar De Manaus Frente a Patógenos Humanos / Evaluation of the Activity of Antimicrobials Commonly Used in the Hospital Network in Manaus Against Human Pathogens. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 19932–19952, 2021.
- FERREIRA-JÚNIOR, J. C. **Estudo químico monitorado pelas atividades larvicida antibacteriana e anti-inflamatória de duas espécies de Bignoniaceae (*Tabebuia elliptica* (A. DC) Sandwith e *T. róseo-alba* Ridi.)**. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2015.

FRANÇA, S. B. **Síntese e avaliação da atividade larvicida de derivados do ácido cinâmico no combate ao *aedes aegypti***. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2019.

FRANÇA, S. *et al.* Larvicidal activity and in silico studies of cinnamic acid derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 44, n. June, 2021.

FRANCO-BERNARDES, M. F. *et al.* The use of biomarkers to study the effects of the mixture of diuron and hexazinone on small and large *O. niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 83–92, 16 dez. 2015.

FUJIWARA, G. M. *et al.* Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, n. January, p. 238–244, 2017.

GIL, E. S. *et al.* Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, p. 223–230, 2008.

GLASER, J. *et al.* Antileishmanial lead structures from nature: Analysis of structure-activity relationships of a compound library derived from caffeic acid bornyl ester. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1394–1410, 2014.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, J. S. **FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL COMO PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS**. [s.l: s.n.].

GUBLER, D. J. COMMENTARY: Ashburn PM, Craig CF. Experimental Investigations Regarding the Etiology of Dengue. *J Infect Dis* 1907; 4:440–75. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 1744–1783, maio 2004a.

\_\_\_\_\_. COMMENTARY: Ashburn PM, Craig CF. Experimental Investigations Regarding the Etiology of Dengue. *J Infect Dis* 1907; 4:440–75. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 1744–1783, maio 2004b.

GUNIA-KRZYŻAK, A. *et al.* Cinnamic acid derivatives in cosmetics: current use and future prospects. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 4, p. 356–366, 24 ago. 2018.

GUZMAN, J. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292–19349, 25 nov. 2014.

HAO, G.; DONG, Q.; YANG, G. A Comparative Study on the Constitutive Properties of Marketed Pesticides. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 6–7, p. 614–622, 5 jun. 2011.

HE, X. *et al.* Antifungal effect of cinnamic acid and induced resistance of cinnamic acid-protocatechuic acid-CaCl<sub>2</sub>-NaCl-pullulan composite preservative to *Trichoderma harzianum* in postharvest *Hypsizygus marmoreus*. **LWT**, v. 184, p. 115108, jul. 2023.

HERNANDES, M. *et al.* Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 303–314, 1 mar. 2010.

ICH - CONFERENCE, I.; HARMONISATION. **ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES :2005**

ILBOUDO, S. *et al.* In vitro impact of five pesticides alone or in combination on human intestinal cell line Caco-2. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 474–489, 2014.

JACOB, S. W.; BISCHEL, M.; HERSCHLER, R. J. DIMETHYL SULFOXIDE: EFFECTS ON THE PERMEABILITY OF BIOLOGIC MEMBRANES (PRELIMINARY REPORT). **Current therapeutic research, clinical and experimental**, v. 6, p. 193–8, mar. 1964.

JITAREANU, A. *et al.* **Cinnamic acid Derivatives and 4-Aminoantipyrine Amides-Synthesis and Evaluation of Biological Properties**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.isca.in>.

KAZUSAKI, M.; UEDA, S.; TAKEUCHI, N.; OHGAMI, Y. **Validation of analytical procedures** *Farmaceutski Glasnik*, 2012.

KHALIL, C. *et al.* E-cigarette aerosol induced cytotoxicity, DNA damages and late apoptosis in dynamically exposed A549 cells. **Chemosphere**, v. 263, p. 127874, jan. 2021.

KHARKAR, P. S.; WARRIER, S.; GAUD, R. S. Reverse docking: a powerful tool for drug repositioning and drug rescue. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 333–342, mar. 2014.

KIM, S. *et al.* Inheritance and field performance of transgenic Korean Bt rice lines resistant to rice yellow stem borer. **Euphytica**, v. 164, n. 3, p. 829–839, 6 dez. 2008.

KING, J. R.; PORTER, S. D. Recommendations on the use of alcohols for preservation of ant specimens (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 51, n. 2, p. 197–202, 1 maio 2004.

KOCSIS, J. J.; HARKAWAY, S.; SNYDER, R. BIOLOGICAL EFFECTS OF THE METABOLITES OF DIMETHYL SULFOXIDE\*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 243, n. 1, p. 104–109, 16 jan. 1975.

KOROŠEC, B. *et al.* Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 955–966, abr. 2014.

KUMALO, H.; BHAKAT, S.; SOLIMAN, M. Theory and Applications of Covalent Docking in Drug Discovery: Merits and Pitfalls. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1984–2000, 27 jan. 2015.

LEE, A.; LEE, K.; KIM, D. Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 7, p. 707–715, 2 jul. 2016.

LEONG, C. S. *et al.* *Aedes aegypti*(Linnaeus) larvae from dengue outbreak areas in Selangor showing resistance to pyrethroids but susceptible to organophosphates. **Acta Tropica**, v. 185, p. 115–126, set. 2018.

LEONG, C.-S. *et al.* Enzymatic and molecular characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* from Selangor, Malaysia. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 236, 16 dez. 2019.

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, 2018.

LING, F. *et al.* Anthelmintic efficacy of cinnamaldehyde and cinnamic acid from cortex cinnamon essential oil against *Dactylogyrus intermedius*. **Parasitology**, v. 142, n. 14, p. 1744–1750, 2015.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, ago. 2014.

- LORENZO, P. *et al.* Herbicidal properties of the commercial formulation of methyl cinnamate, a natural compound in the invasive silver wattle ( *Acacia dealbata* ). **Weed Science**, p. 1–10, 28 nov. 2019.
- LYU, J. *et al.* Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 225–232, mar. 2018.
- MACIEL, L. G. *et al.* Discovery of 1,2,4-oxadiazole derivatives as a novel class of noncompetitive inhibitors of 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT) from *Aedes aegypti*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 115252, jan. 2020.
- MAGUIÑA-VARGAS C. **REVISIÓN DE TEMAS / REVIEW**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.>>.
- MALECK, M. *et al.* Cytotoxicity of Piperamides Towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 2, p. 458–463, 1 mar. 2014.
- MARQUES, J. O.; OLIVEIRA, M. F. F.; LACERDA, G. A. Efeito alelopático e análise dos rótulos de garrafadas comercializadas no Mercado Municipal de Montes Claros – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1134–1141, 2015.
- MARTÍNEZ-SORIANO, P. A. *et al.* Solvent-Free Synthesis of Carboxylic Acids and Amide Analogs of CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester) under Infrared Irradiation Conditions. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 05, n. 02, p. 81–91, 2015.
- MEDEIROS, P. F. V. **Ministério da Saúde**. [s.l: s.n.].
- MEILAWATI, L.; SAEPUDIN, E.; ERNAWATI, T. Antimicrobial Activities of Natural Cinnamic Acid and Synthetic Derivatives: Review. **AIP Conference Proceedings**, v. 2902, n. 1, 2023.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tergumentar Americana**. 2º ed. Brasília: [s.n.].
- MONTE, Z. *et al.* Pyrimidine Derivatives: QSAR Studies of Larvicidal Activity against *Aedes aegypti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.
- MORAIS, M. C. DE; OLIVEIRA LIMA, E. DE; *et al.* Synthetic Cinnamides and Cinnamates: Antimicrobial Activity, Mechanism of Action, and In Silico Study. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1–23, 2023.
- MORAIS, M. C. DE; MEDEIROS, G. A.; *et al.* Antileishmanial Activity of Cinnamic Acid Derivatives against *Leishmania infantum*. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 1–17, 2023.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- NARASIMHAN, B. *et al.* Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 827–834, out. 2004.

- NARUKAWA, M. *et al.* Chlorogenic Acid Facilitates Root Hair Formation in Lettuce Seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 3, p. 504–514, 19 jan. 2009.
- NASCIMENTO, T. G. DO *et al.* Validation of a method for determination of ampicillin in human plasma using LC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 749–755, 2009.
- N'GOKA, V. *et al.* ISSN 0975-413X CODEN (USA): PCHHAX Larvicidal and Ovicidal Activities of Some Cinnamaldehyde Derivatives Against Anopheles Gambiae, Malaria Vector Agent. v. 2022, n. 11, p. 25–33, [s.d.].
- OKADA-JUNIOR, C. Y. *et al.* Phthalimide Derivatives with Bioactivity against *Plasmodium falciparum*: Synthesis, Evaluation, and Computational Studies Involving *bc*<sub>1</sub> Cytochrome Inhibition. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9424–9430, 31 ago. 2018.
- OLALEYE, T. O. *et al.* Peptidomimetic inhibitors of *N*-myristoyltransferase from human malaria and leishmaniasis parasites. **Org. Biomol. Chem.**, v. 12, n. 41, p. 8132–8137, 2014.
- OLIVEIRA, A. G. DE *et al.* Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 869–874, dez. 2006.
- OTERO, E. *et al.* Synthesis and leishmanicidal activity of cinnamic acid esters: Structure-activity relationship. **Vitae**, v. 21, p. S89–S90, 2014.
- OZCAN, C. Determination of Organochlorine Pesticides in Some Vegetable Samples Using GC-MS. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 25, n. 3, p. 1141–1147, 2016.
- PAES-GONÇALVES, H. *et al.* The leishmanicidal activity of a cyclopentenedione derivative isolated from the roots of a native Amazonian pepper (*Piper carniconnectivum*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1018–1023, 2012.
- PANDEY, S. *et al.* Identification of a diverse indole-2-carboxamides as a potent antileishmanial chemotypes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 237–245, mar. 2016.
- PAPADOPOULOU, M. V. *et al.* 3-Nitrotriazole-based piperazides as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 325–334, 2015.
- PARANHOS, R. *et al.* Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson: o Retorno. **Leviathan (São Paulo)**, n. 8, p. 66, 13 ago. 2014.
- PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 1 nov. 2016.
- PAWAR, H. S.; WAGH, A. S.; LALI, A. M. Triethylamine: a potential N-base surrogate for pyridine in Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes and malonic acid. **New Journal of Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 4962–4968, 2016.
- PEDRETE, T. DE A. *et al.* A preliminary study of the cytotoxicity of the protein extract of abajerú commercialized in markets. **Revista Fitos**, v. 15, n. 1, p. 11–21, 31 mar. 2021.

PEREZ-CASTILLO, Y. *et al.* Bioactivity and Molecular Docking Studies of Derivatives from Cinnamic and Benzoic Acids. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

PETERSEN, E. *et al.* Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 11–15, mar. 2016.

PETRONILHO, E. DA C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Agents for Defense Against Chemical Warfare: Reactivators of the Inhibited Acetylcholinesterase with Organophosphorus Neurotoxic Compounds. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, 2014.

PONTIKI, E. *et al.* Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Modeling Studies. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9655–9674, 7 jul. 2014.

PRIAC, A.; BADOT, P.-M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, mar. 2017.

PROCÓPIO, T. F. *et al.* *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larva. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 14 maio 2015.

ROCHA, F. V. *et al.* Computational studies, design and synthesis of Pd(II)-based complexes: Allosteric inhibitors of the Human Topoisomerase-II $\alpha$ . **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 199, p. 110725, out. 2019.

RODRIGUES, M. P. *et al.* Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, 2019.

RUIZ-MORENO, A. J.; DÖMLING, A.; VELASCO-VELÁZQUEZ, M. A. Reverse Docking for the Identification of Molecular Targets of Anticancer Compounds. *Em: [s.l.: s.n.]*. p. 31–43.

RUWIZHI, N.; ADERIBIGBE, B. A. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–36, 2020.

SADEGHI, M. *et al.* Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian leek (*Allium ampeloprasum* Subsp. *Persicum*). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 360–363, 2013.

SANTANA, C. C. *et al.* Evaluation of guanlylhydrazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 169–180, jun. 2019.

SANTOS, A. P. DE A. DOS *et al.* Antiprotozoal action of synthetic cinnamic acid analogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 6, p. 849–853, 2018.

SANTOS CORREIA, P. R. DOS *et al.* Synthesis of Esters Containing Cinnamoyl Motif with Potential Larvicide Action: A Computational, Ecotoxicity and in Vitro Cytotoxicity Assessments. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 11, 2022.

SANTOS DIAS, L. DOS *et al.* Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173689, 16 mar. 2017.

SANTOS, V.; GONSALVES, A.; ARAÚJO, C. ABORDAGEM DIDÁTICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS: REGRA DOS CINCO DE

LIPINSKI E PREPARAÇÃO DE HETEROCICLO 1,3,4-OXADIAZOL EM FORNO DE MICRO-ONDAS DOMÉSTICO. **Química Nova**, v. 23, p. 110–115, 2017.

SCIUCHETT, L. A.; ITURRIAN, R. C. Effects of Dimethylsulfoxide (DMSO) and B995 on Growth and Metabolic Products of *Datura innoxia*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 10, p. 1477–1480, out. 1965.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities . **J. Chem. Pharm. Res**, v. 3, n. 2, p. 403–423, 2011.

SILVA, A. C. DA *et al.* Larvicidal activity, enzyme inhibitory effect, and molecular docking by essential oil, hydrolate, aqueous extract, and major compounds from the leaves of *Eugenia uniflora* against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 204, p. 117380, nov. 2023.

SILVA, J. B. P. DA *et al.* Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 162–175, jul. 2015.

SILVA, J. M. *et al.* In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 23–30, 30 jun. 2015.

SILVA, M. S. DE L. *et al.* Biological evaluation of 1,3-benzodioxole acids points to 3,4-(methylenedioxy) cinnamic acid as a potential larvicide against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 256, p. 108657, 2024.

SILVA, R. H. N. *et al.* Antimicrobial Activity of 4-Chlorocinnamic Acid Derivatives. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

SILVA-ALVES, D. C. B. DA *et al.* Larvicidal isoxazoles: Synthesis and their effective susceptibility towards *Aedes aegypti* larva *Aedes*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 940–947, fev. 2013.

SMOLINSKI, M. S. H. M. A. & L. J. **Microbial Threats to Health**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2003.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: Moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.

SOVA, M.; SASO, L. Natural Sources, Pharmacokinetics, Biological Activities and Health Benefits of Hydroxycinnamic Acids and Their Metabolites. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2190, 23 jul. 2020.

SRINIVASAN, R. *et al.* Bioassay guided isolation of mosquito larvicidal compound from acetone leaf extract of *Elaeagnus indica* Servett Bull and its in-silico study. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 394–401, dez. 2015.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 209–220, mar. 1989a.

\_\_\_\_\_. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 221–264, mar. 1989b.

TABAN, I. M. *et al.* Analysis of the binding sites of vitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) and vitamin D 24-hydroxylase (CYP24A1) for the design of selective CYP24A1 inhibitors: Homology modelling, molecular dynamics simulations and identification of key binding requirements. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 20, p. 5629–5636, out. 2017.

THOMPSON, M. **Molecular Docking Using ArgusLab: An efficient shape-based search algorithm and an enhanced XScore scoring function**The 228th ACS National Meeting. **Anais...**Philadelphia: Planaria Software LLC, 2004

THOMPSON, M.; SOFTWARE, P. **ArgusLab Program version 4.0.1**, [s.d.].

TOLEDO, A. V.; SIMURRO, M. E.; BALATTI, P. A. Morphological and molecular characterization of a fungus, *Hirsutella* sp., isolated from planthoppers and psocids in Argentina. **Journal of Insect Science**, v. 13, n. 18, p. 1–11, 2013.

TORTELLI, V. *et al.* Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 560–566, out. 2006.

TROTT, O.; OLSON, A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

VERDÍN-BETANCOURT, F. A. *et al.* In vitro inhibition of human red blood cell acetylcholinesterase (AChE) by temephos-oxidized products. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

VITA, D. DE *et al.* Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 24, p. 5931–5935, 2016.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, jan. 2010.

WALLER, S. B. *et al.* **Chem Biol Drug Des - 2021 - Waller - Bioisosteric modification on benzylidene-carbonyl compounds improved the drug-likeness.pdf**Chem Biol Drug Des, 2022.

WANG, X. *et al.* A novel and efficient procedure for the preparation of allylic alcohols from  $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters using LiAlH<sub>4</sub>/BnCl. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 4, p. 413–415, jan. 2009.

WEBB, J. E.; GREEN, R. A. On the Penetration of Insecticides Through the Insect Cuticle. **Journal of Experimental Biology**, v. 22, n. 1–2, p. 8–20, 1 dez. 1945.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GUIDELINES FOR LABORATORY AND FIELD TESTING OF MOSQUITO LARVICIDES**. [s.l: s.n.].

YOUNG, B. J. *et al.* Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182–186, fev. 2012.

YU, Z.-W.; QUINN, P. J. Dimethyl sulphoxide: A review of its applications in cell biology. **Bioscience Reports**, v. 14, n. 6, p. 259–281, 1 dez. 1994.

ZANETTI, M. *et al.* Antifungal Activity and Acute and Repeated-Dose Toxicity Study of Geranyl Cinnamate Ester in Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

ZENG, W.-W.; LAI, L.-S. Multiple-physiological benefits of bird's nest fern ( *Asplenium australasicum* ) frond extract for dermatological applications. **Natural Product Research**, v. 33, n. 5, p. 736–741, 4 mar. 2019a.

\_\_\_\_. Multiple-physiological benefits of bird's nest fern ( *Asplenium australasicum* ) frond extract for dermatological applications. **Natural Product Research**, v. 33, n. 5, p. 736–741, 4 mar. 2019b.

## 10. ARTIGOS

### 10.1. Publicados

Research, Society and Development, v. 10, n. 1, e28010111691, 2021  
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11691>

---

#### **Synthesis, applications and Structure-Activity Relationship (SAR) of cinnamic acid derivatives: a review**

Síntese, aplicações e Relação Estrutura-Atividade (REA) de derivados de ácido cinâmico: uma revisão

Síntesis, aplicaciones y Relación Estructura-Actividad (REA) de los derivados del ácido cinámico: una revisión

Received: 01/05/2021 | Reviewed: 01/06/2021 | Accept: 01/12/2021 | Published: 01/13/2021

**Saraliny Bezerra França**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7138-0598>  
Universidade Federal de Alagoas, Brazil  
E-mail: [sara.liny15@hotmail.com](mailto:sara.liny15@hotmail.com)

**Paulo Ricardo dos Santos Correia**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2474-2370>  
Universidade Federal de Alagoas, Brazil  
E-mail: [pauloricardolife@hotmail.com](mailto:pauloricardolife@hotmail.com)

**Ilton Barros Daltro de Castro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5599-1898>  
Universidade Federal de Alagoas, Brazil  
E-mail: [idalto@gmail.com](mailto:idalto@gmail.com)

**Edeildo Ferreira da Silva Júnior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1527-4501>  
Universidade Federal de Alagoas, Brazil  
E-mail: [edeildo.junior@iqb.ufal.br](mailto:edeildo.junior@iqb.ufal.br)

**Maria Ester de Sá Barreto Barros**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7197-461X>  
Universidade Federal de Alagoas, Brazil  
E-mail: [maria.barros@iqb.ufal.br](mailto:maria.barros@iqb.ufal.br)

**Dimas José da Paz Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7379-0291>  
Universidade Federal de Alagoas, Brazil  
E-mail: [dimas.lima@iqb.ufal.br](mailto:dimas.lima@iqb.ufal.br)



## Larvicidal activity and *in silico* studies of cinnamic acid derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Saraliny Bezerra França, Luana Carine Barros de Lima, Cristhyan Rychard da Silva Cunha, Daniela Santos Anuniação, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior, Maria Ester de Sá Barreto Barros, Dimas José da Paz Lima\*

Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Avenida Lourival Melo Mota, 57072-970 Maceió, AL, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

3-phenylacrylic acid derivatives  
Mosquitoes  
Insecticide  
High-Performance Liquid Chromatography  
Molecular Docking

### ABSTRACT

Cinnamic acid derivatives (CAD's) represent a great alternative in the search for insecticides against *Aedes aegypti* mosquitoes since they have antimicrobial and insecticide properties. *Ae. aegypti* is responsible for transmitting Dengue, Chikungunya, and Zika viruses, among other arboviruses associated with morbimortality, especially in developing countries. In view of this, *in vitro* analyses of *n*-substituted cinnamic acids and esters were performed upon 4th instar larvae (L4) of *Ae. aegypti*, as well as, molecular docking studies to propose a potential biological target towards this mosquito species. The larvicide assays proved that *n*-substituted ethyl cinnamates showed a more pronounced activity than their corresponding acids, in which *p*-chlorocinnamate (3j) presented a LC<sub>50</sub> value of 8.3 µg/mL. Thusly, external morphologic alterations (rigid and elongated body, curved bowel, and translucent or darkened anal papillae) of mosquitoes' group exposed to compound 3j, were observed by microscopy. In addition, an analytical method was developed for the quantification of the most promising analog by using high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV). Molecular docking studies suggested that the larvicide action is associated with inhibition of acetylcholinesterase (AChE) enzyme. Therefore, expanding the larvicidal study with the cinnamic acid derivatives against the vector *Ae. aegypti* is important for finding search for more effective larvicides and with lower toxicity, since they have already shown good larvicidal properties against *Ae. aegypti*.

### 1. Introduction

*Aedes aegypti* mosquitoes (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) have a high-rate of dissemination which is related to their adaptation to urban life. These mosquitoes act as vectors of Tropical Neglected Diseases (NTDs), more specifically arboviruses (also known as arthropod-borne viruses), such as Dengue (DENV), Yellow Fever (YFV), Chikungunya (CHIKV), and Zika (ZIKV), which represent public health problems in Sub- and Tropical countries. In addition, ZIKV fever has been associated with cases of microcephaly and neurological disorders in neonates, sexual transmission and Guillain-Barré syndrome in adults.<sup>1-5</sup>

In recent years, the incidence of these arboviruses has been increased throughout American countries, especially Dengue fever, with more than 3 million cases in 2019, being reported more than 1.5 million only in Brazil.<sup>6</sup> This historical achievement represented the highest incidence in American continent.<sup>7,8</sup> However, no territory is safe from an epidemic

of these arboviruses. In the last few decades, the spread of these diseases in other countries has been of concerning by Center for Disease Prevention and Control (CDC) in the United States of America (USA) and Brazilian government.<sup>9,10</sup> In several countries, the arbovirus control occurs through vaccinations, providing protection within a period of one or two weeks, with 95% reliability.<sup>11</sup>

Although, in the case of infectious diseases such as DENV, there are vaccines for some serotypes, for CHIKV and ZIKV, there is no vaccine, so that it requires high investments in time and scientific research for its development.<sup>5</sup>

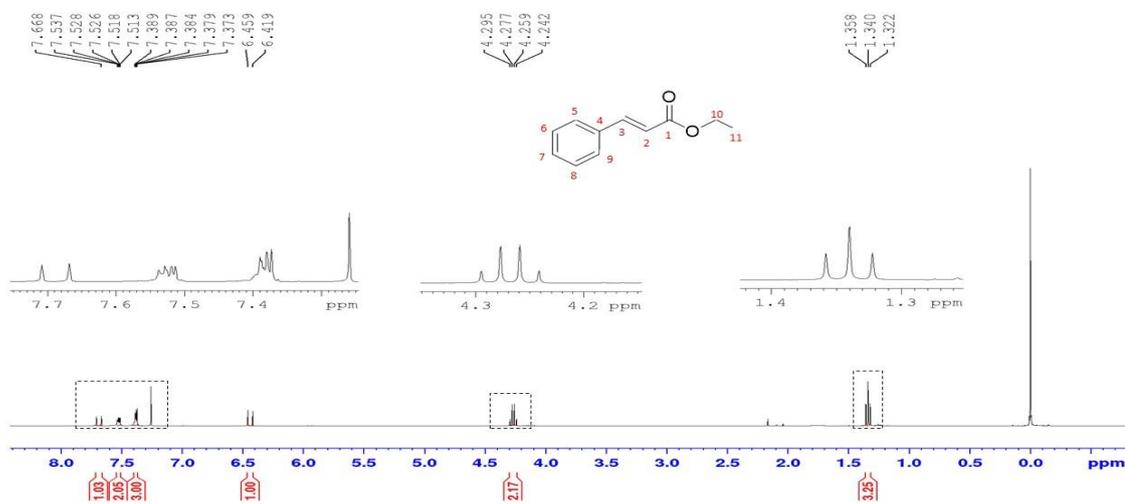
Deeming the absence of vaccines to avoid most arboviruses, an attractive alternative for the reduction of these infectious diseases is the control of the vector population by providing educational and basic sanitation actions, in parallel to biologic controls and utilizing synthetic larvicides. Among these latter, organophosphates (i.e. malathion and temephos), carbamates (i.e. carbofuran and propoxur), organochlorines

\* Corresponding author.

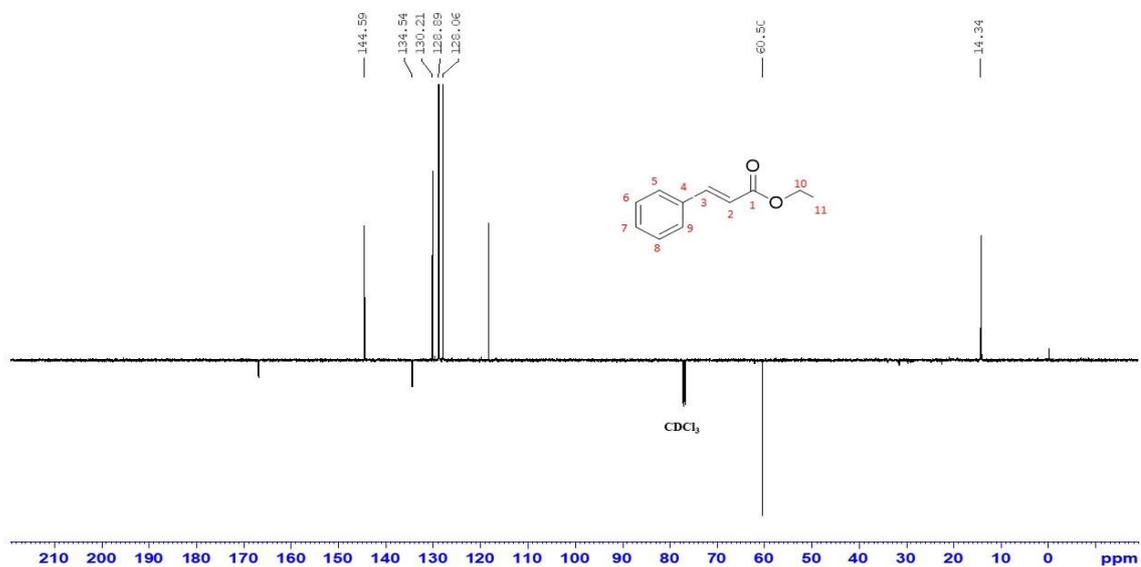
E-mail address: [dimas.lima@iqb.ufal.br](mailto:dimas.lima@iqb.ufal.br) (D. José da Paz Lima).

**ANEXO: Espectros, Cromatogramas de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , IV-TF, CLAE-UV e  
MS dos Compostos Sintetizados e dados do estudo *in silico***

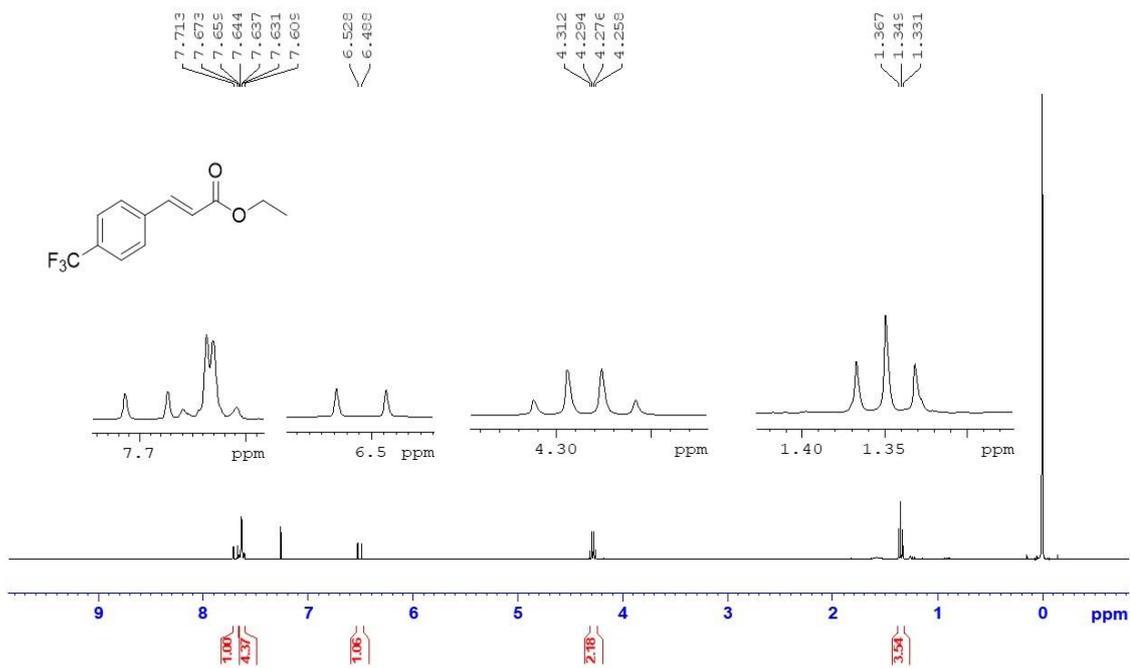
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do cinamato de etila (**SF1**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



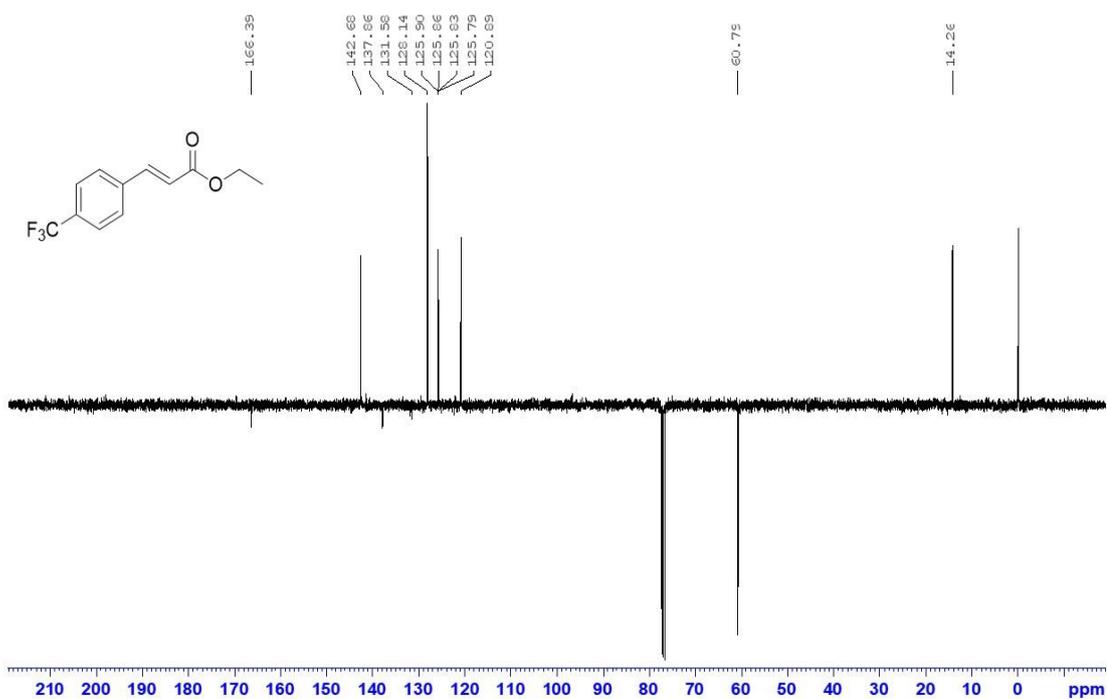
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do cinamato de etila (**SF1**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



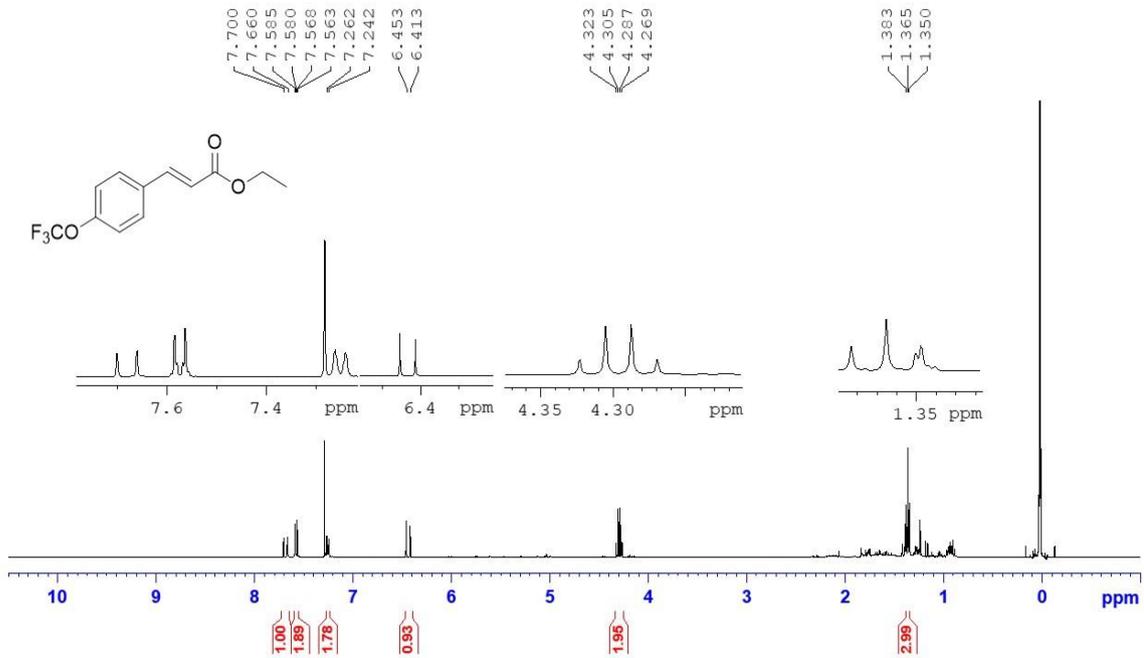
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do cinamato de etila (**SF3**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



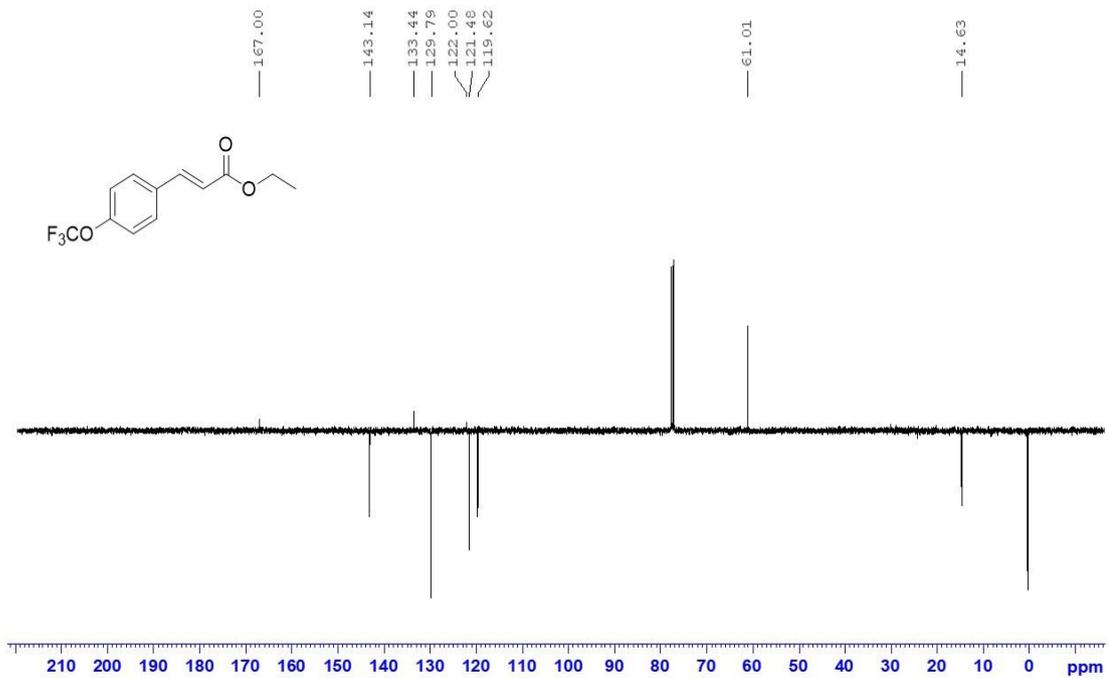
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-trifluorometilcinamato de etila (**SF3**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



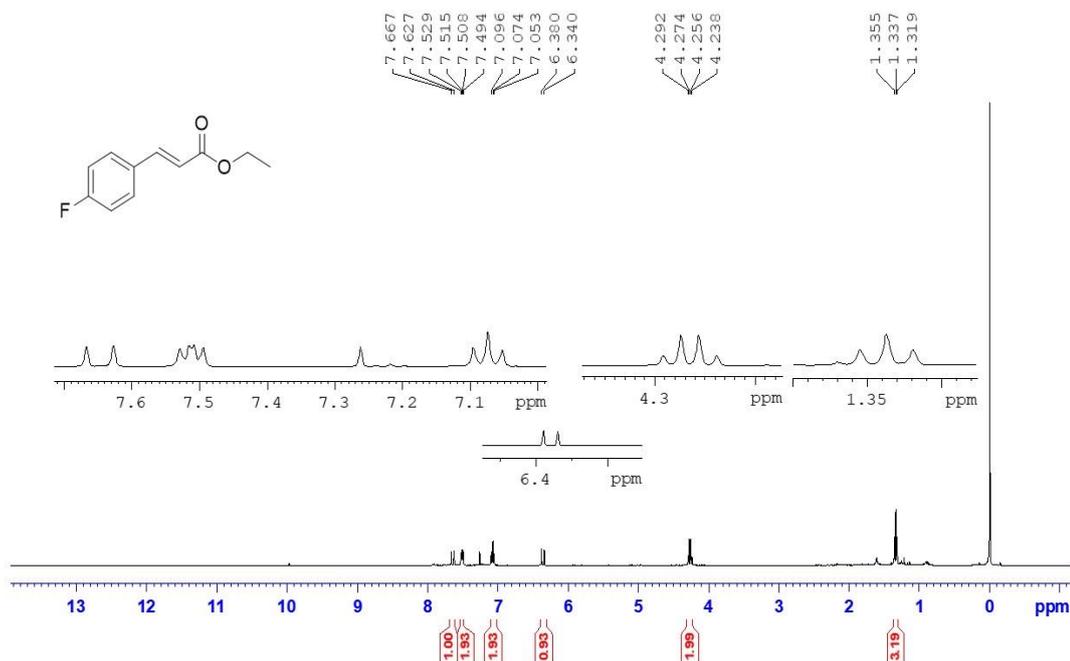
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-trifluorometoxicinamato de etila (**SF4**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



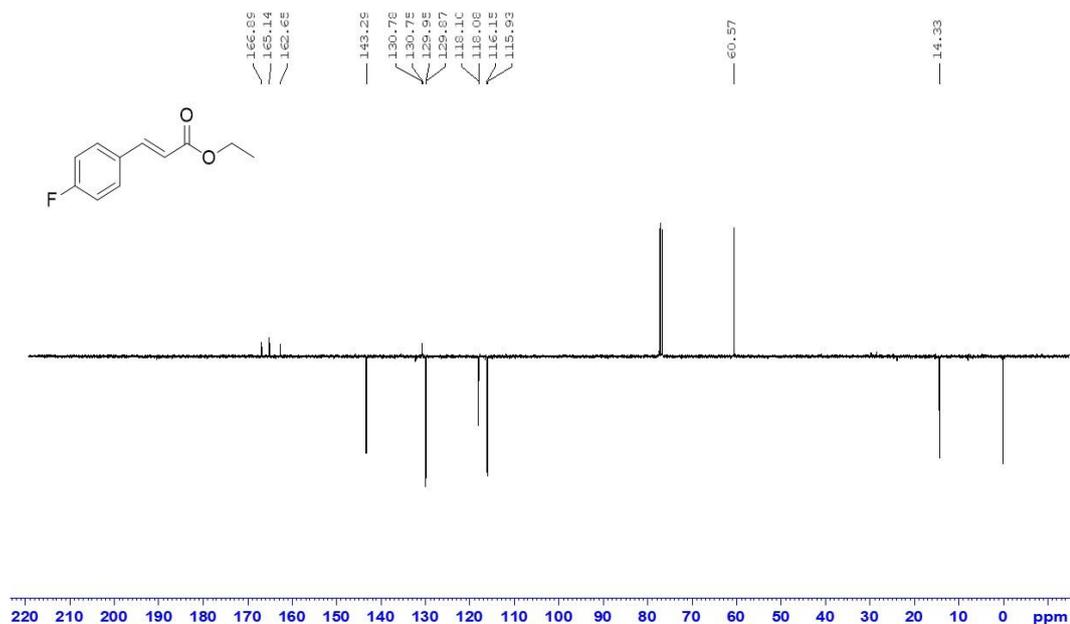
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-trifluorometoxicinamato de etila (**SF4**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



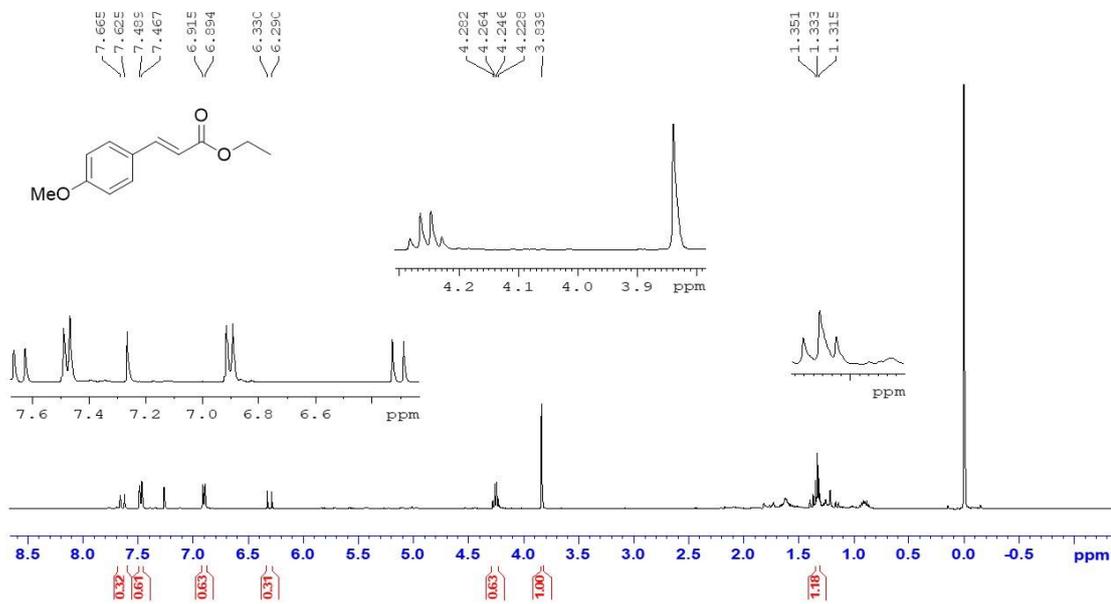
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-fluorocinamato de etila (**SF5**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



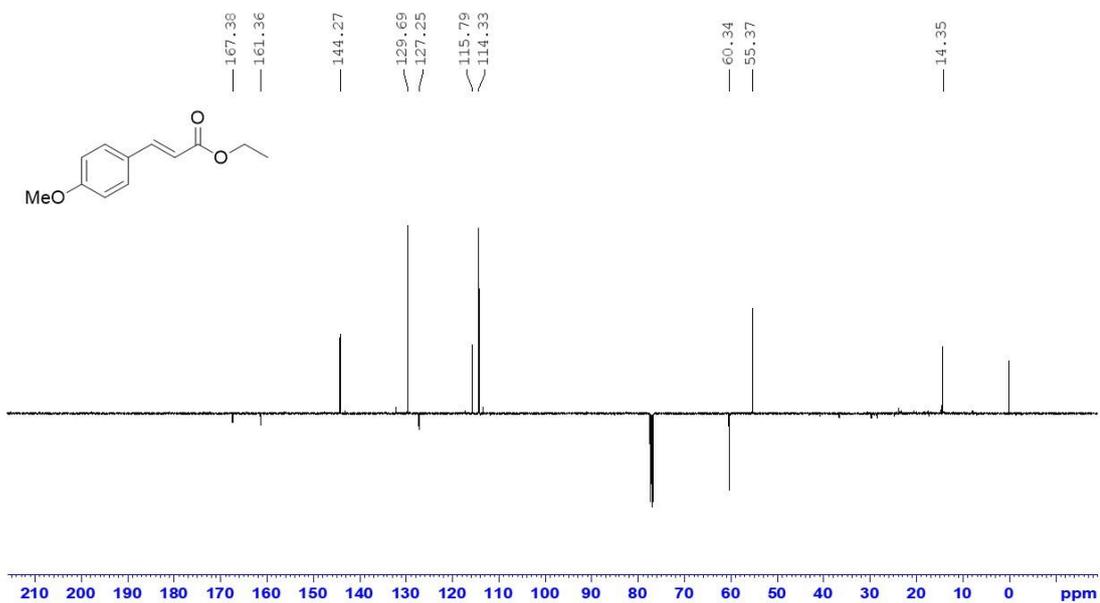
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-fluorocinamato de etila (**SF5**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



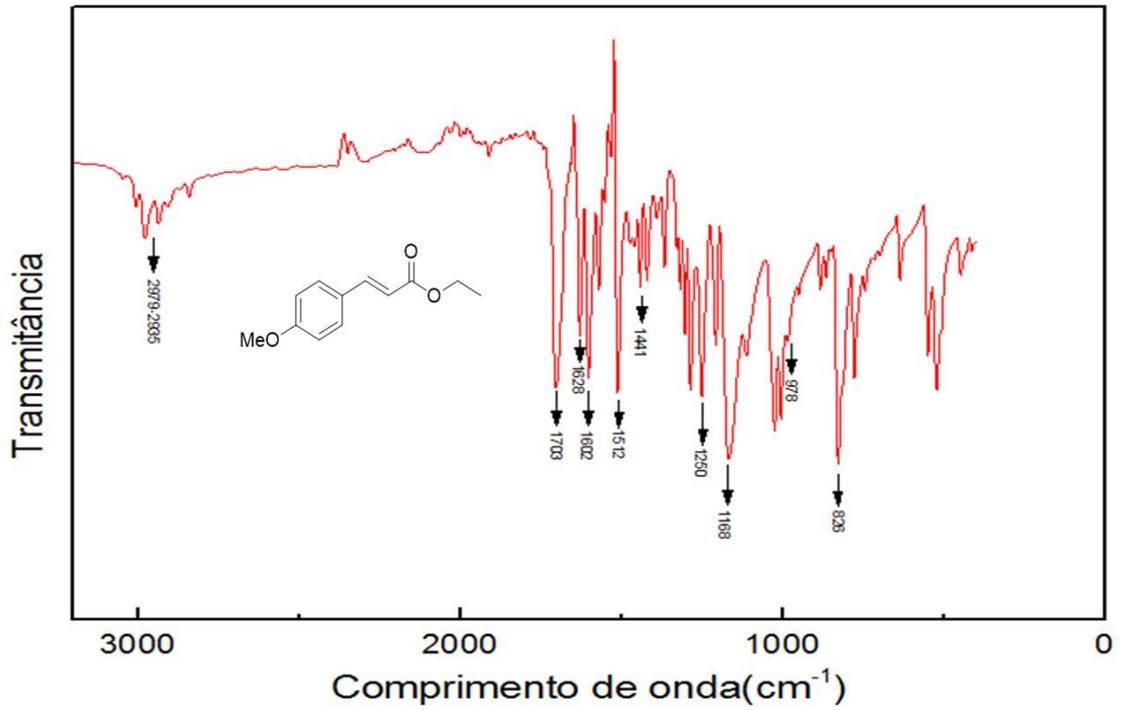
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-metoxicinamato de etila (**SF6**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



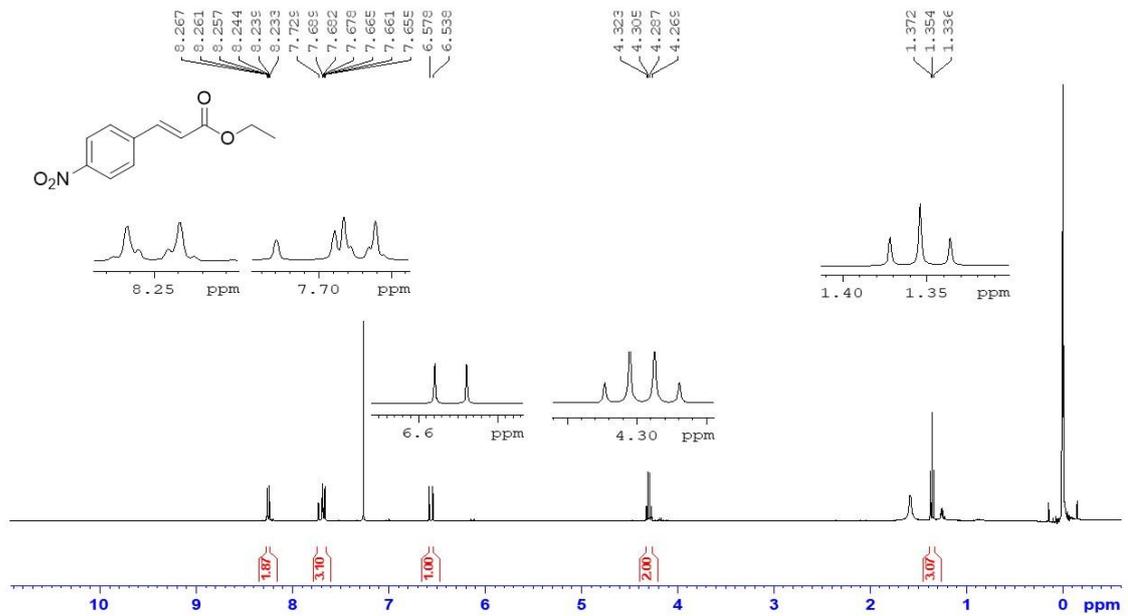
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-metoxicinamato de etila (**SF6**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



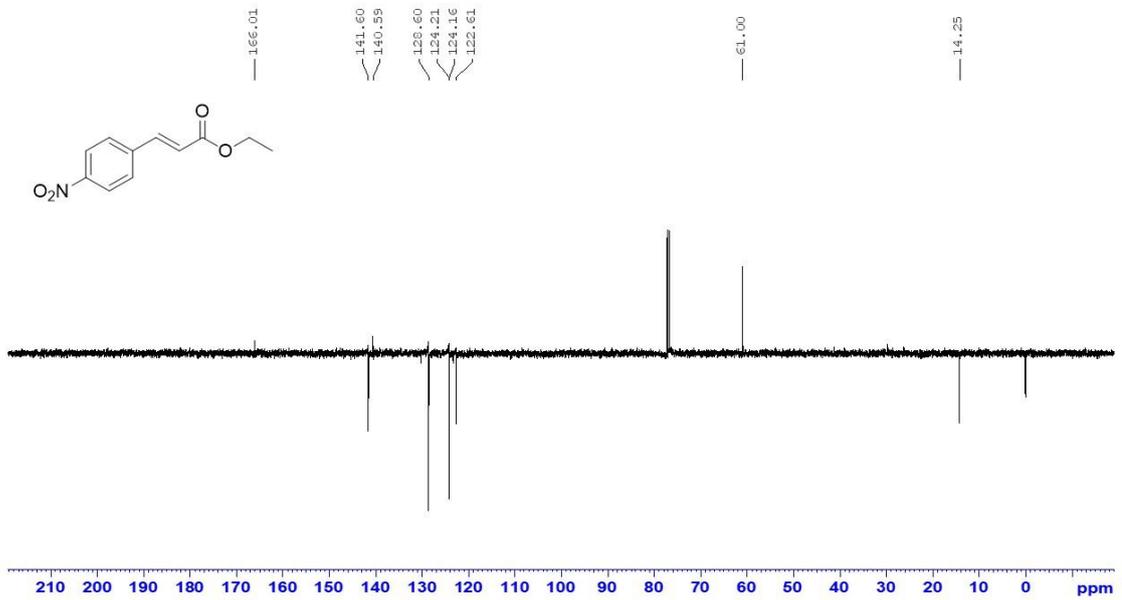
Espectro de I.V *p*-metoxicinamato de etila (SF6).



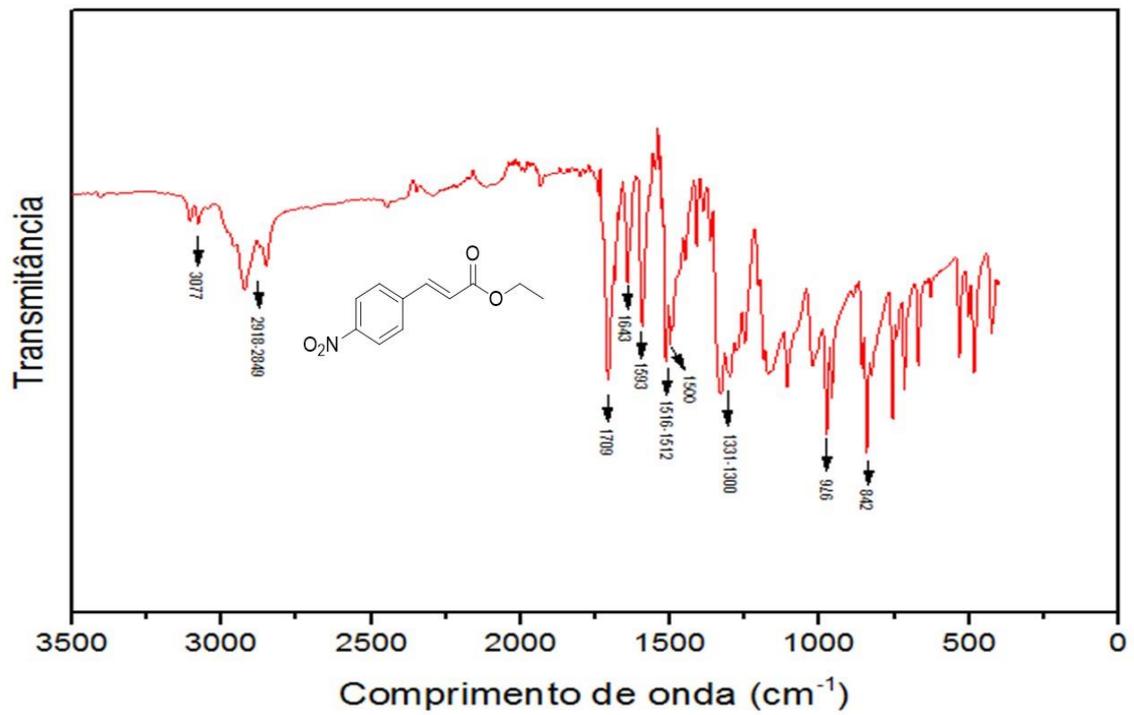
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do *p*-nitrocinnamato de etila (SF7) (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>).



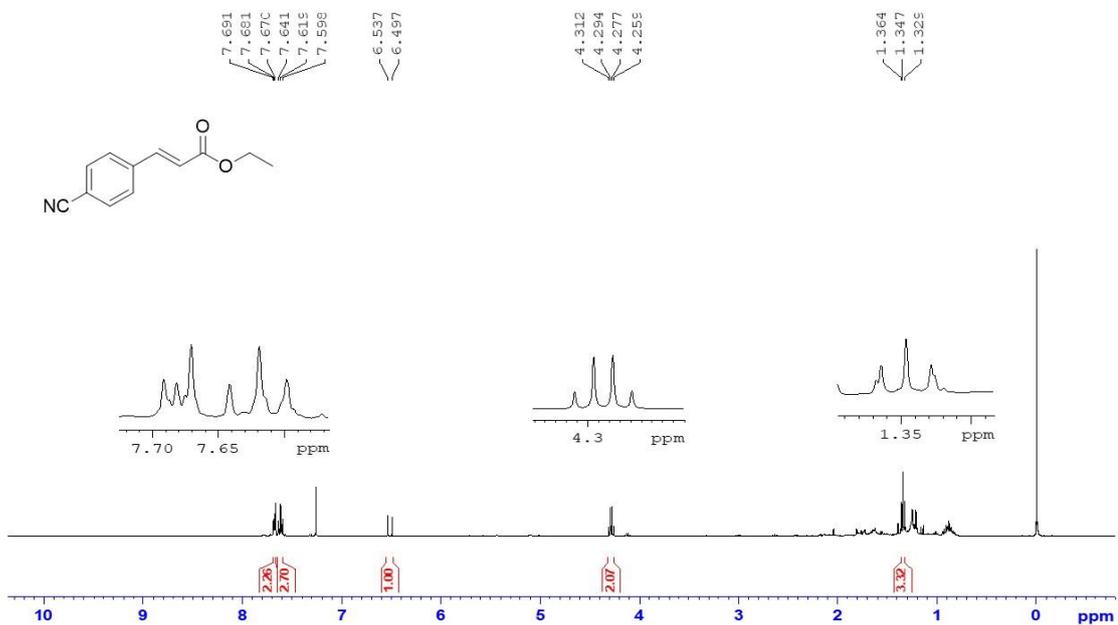
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-nitrocinnamato de etila (**SF7**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



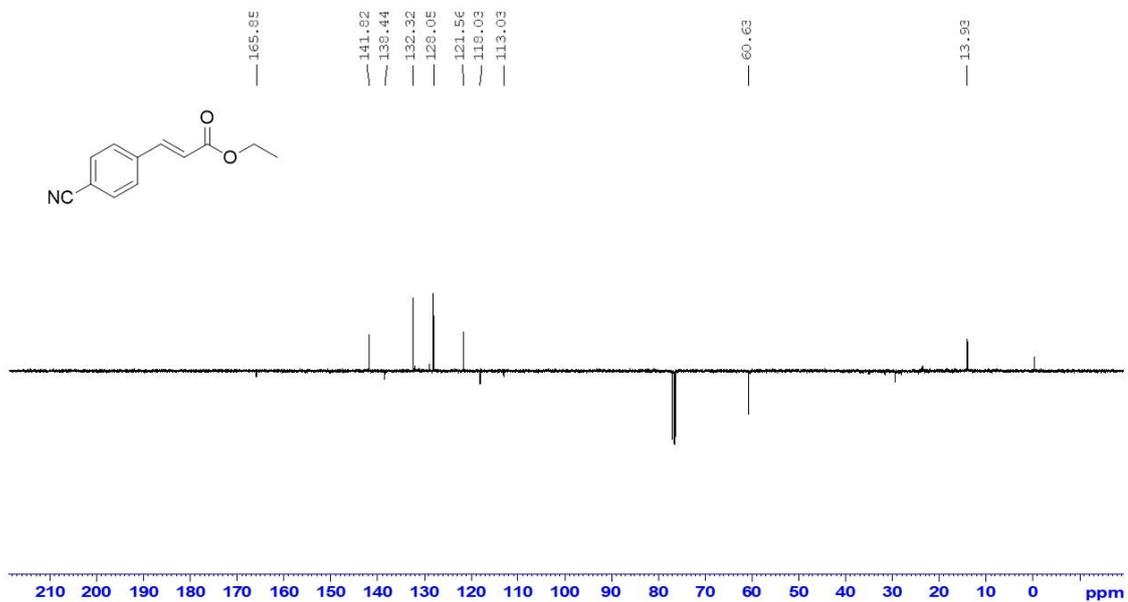
Espectro de I.V *p*-nitrocinnamato de etila (**SF7**).



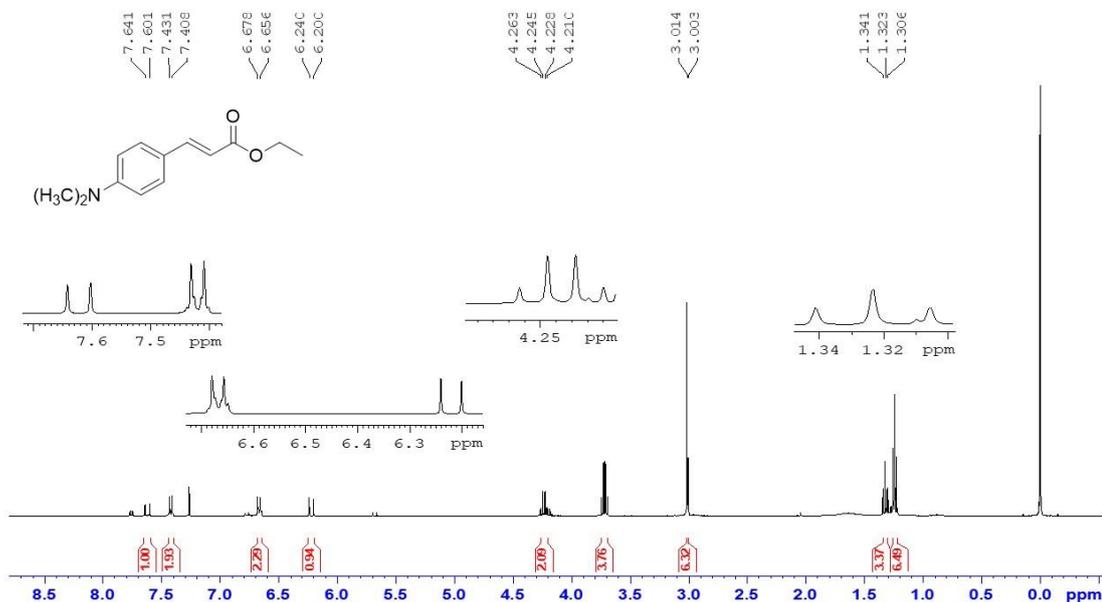
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-cianocinamato de etila (**SF8**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



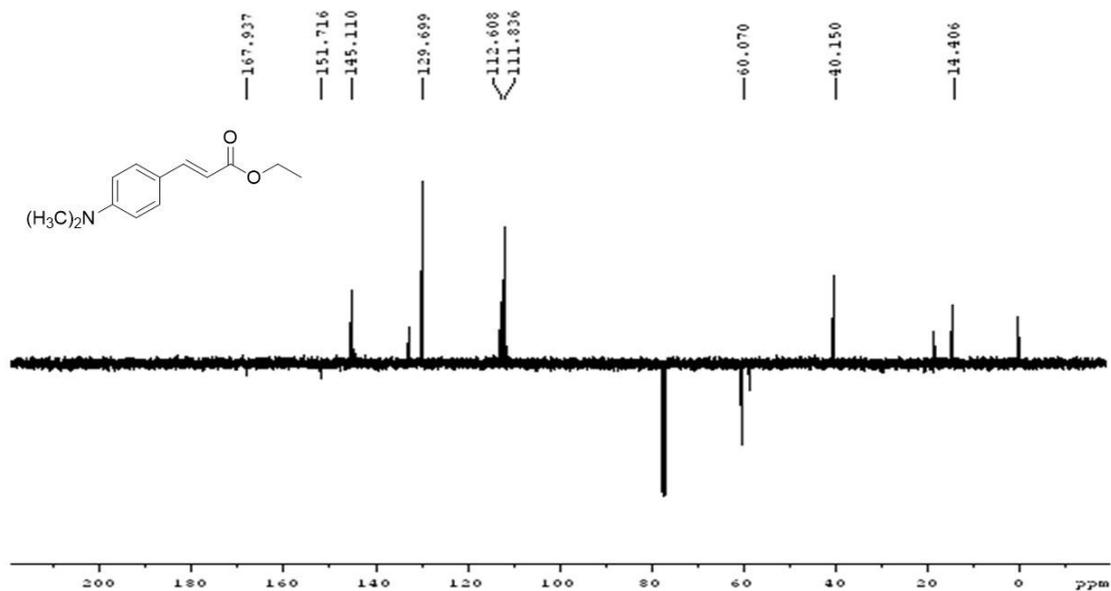
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-cianocinamato de etila (**SF8**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



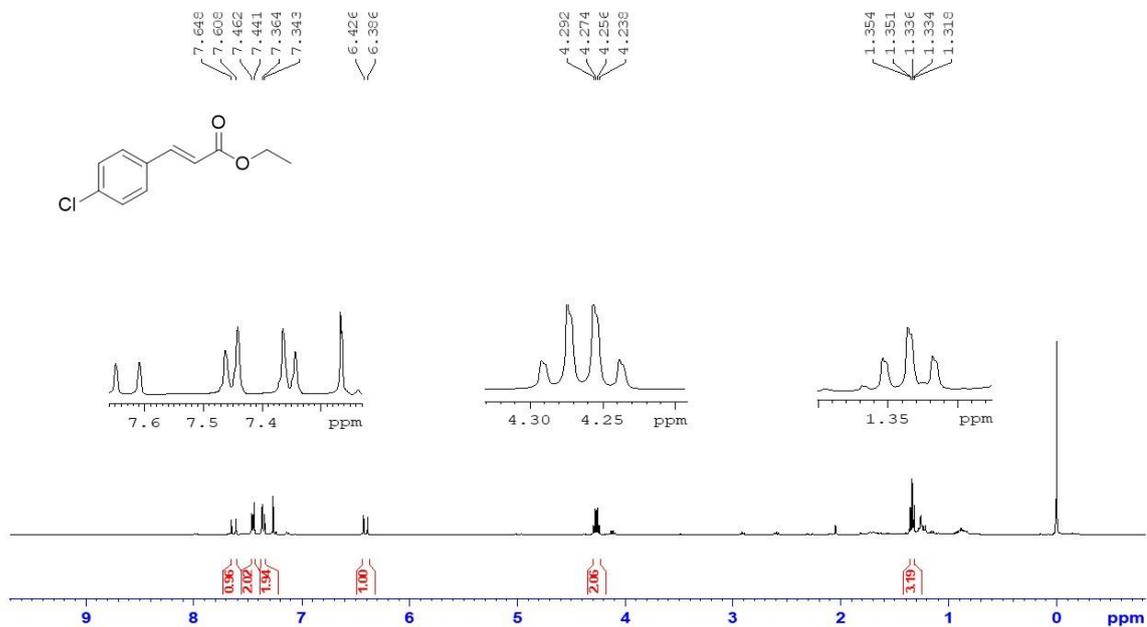
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-dimetilaminocinamato de etila (**SF9**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



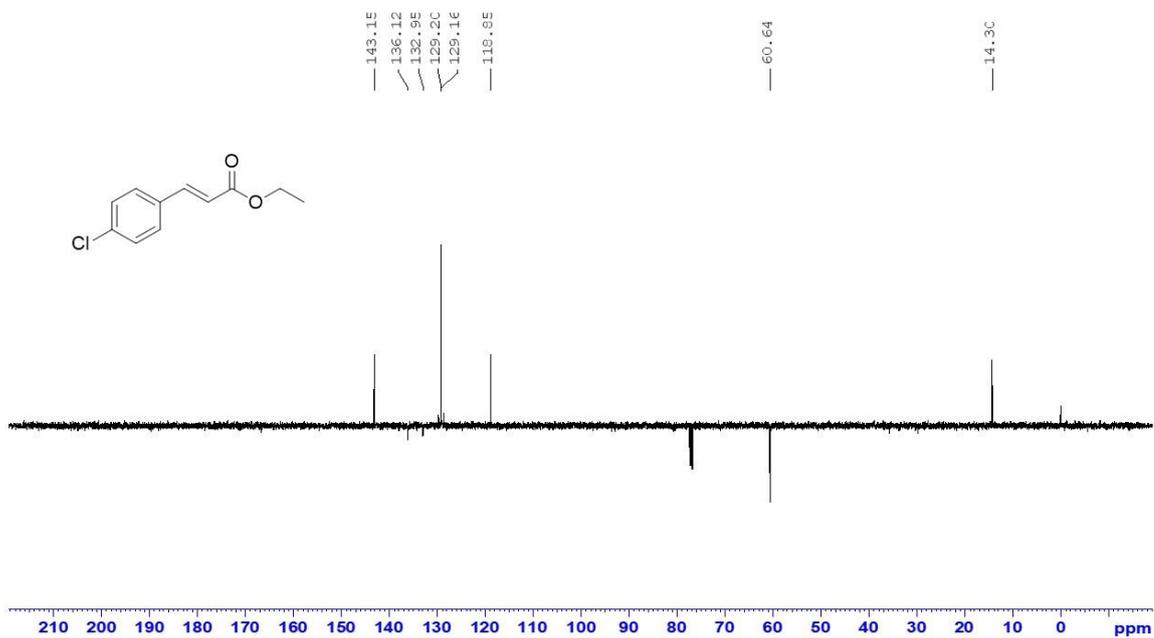
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-dimetilaminocinamato de etila (**SF9**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



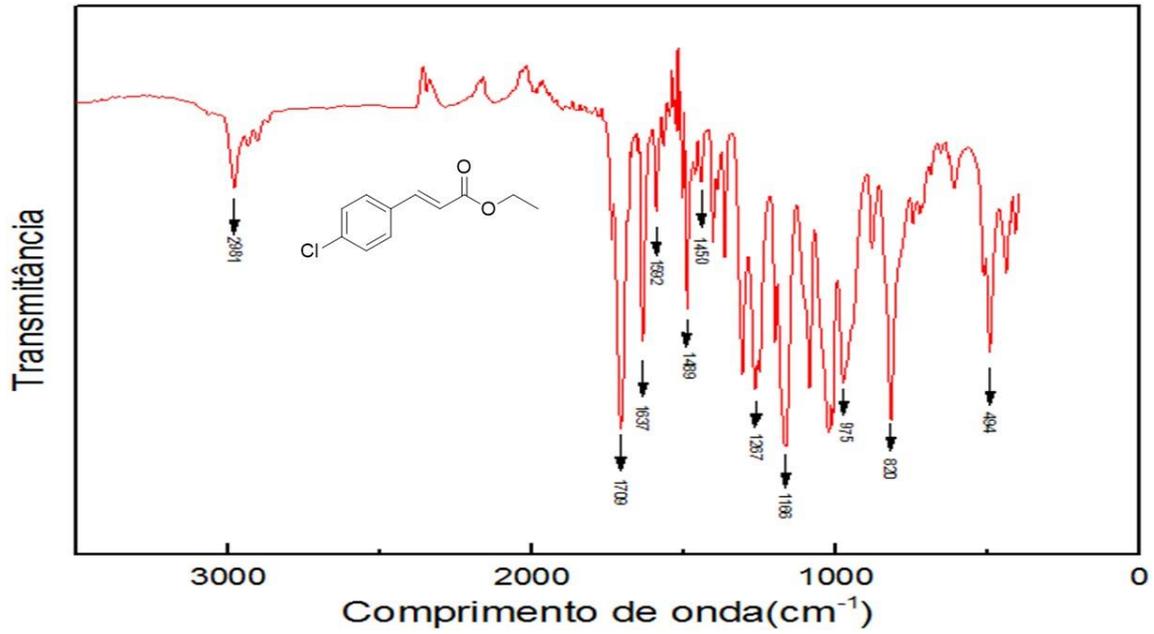
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



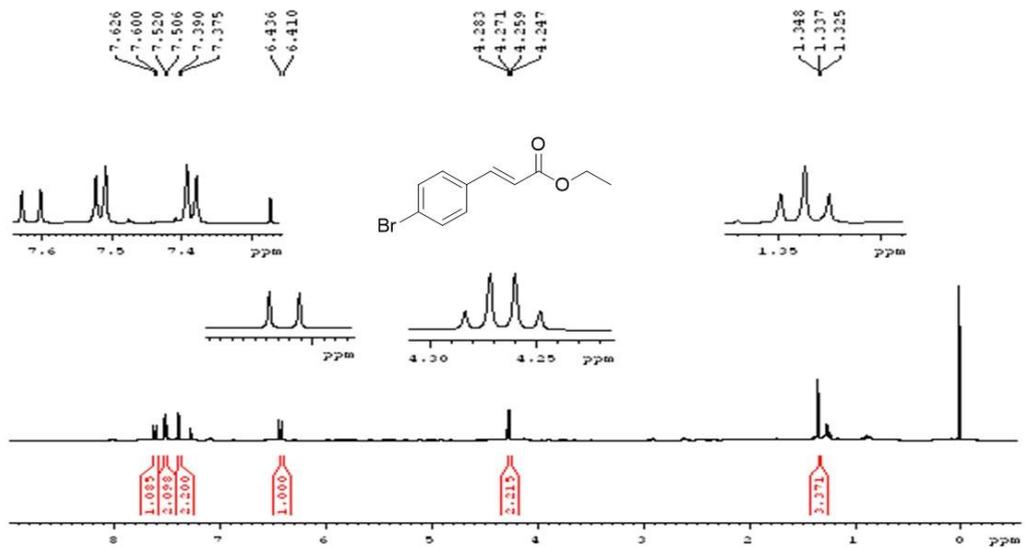
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-clorocinamato de etila (**SF10**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



Espectro de I.V *p*-clorocinamato de etila (**SF10**).

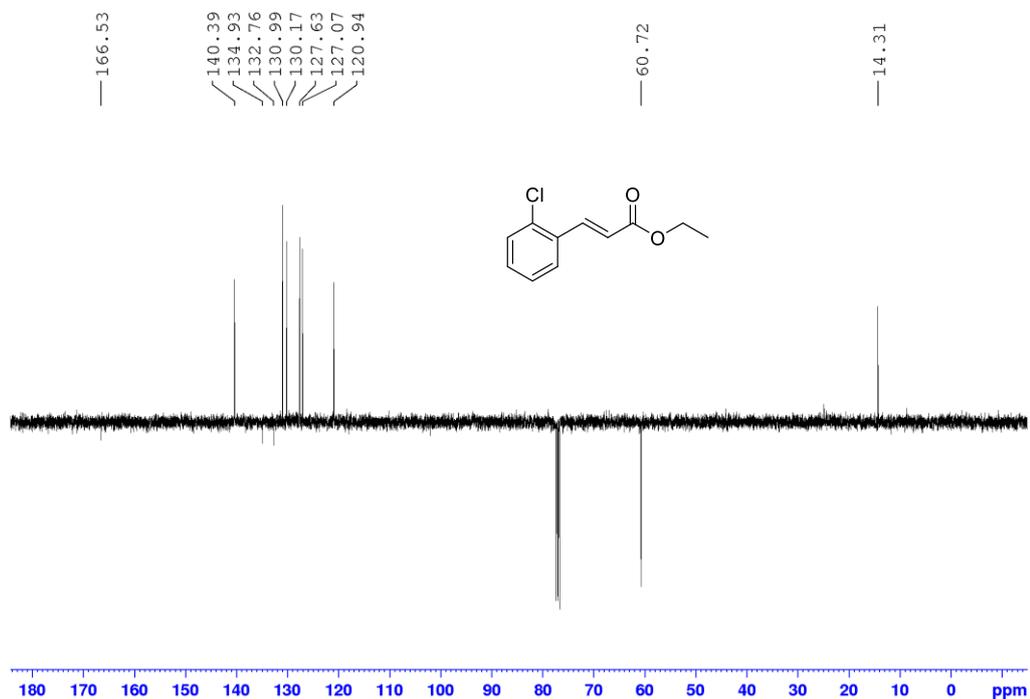


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-bromocinamato de etila (**SF11**) (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).

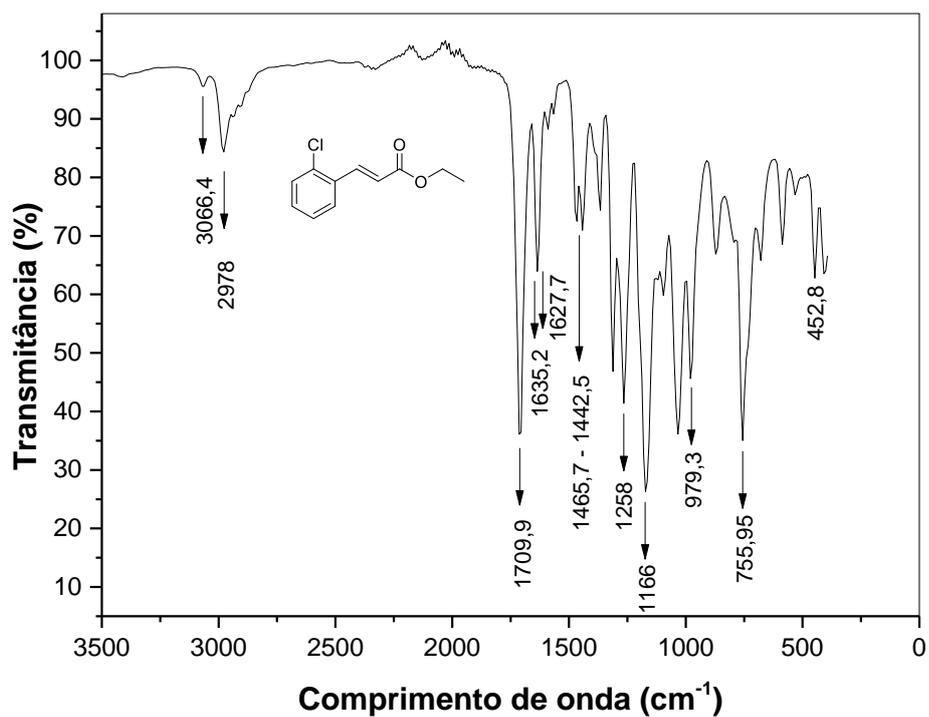




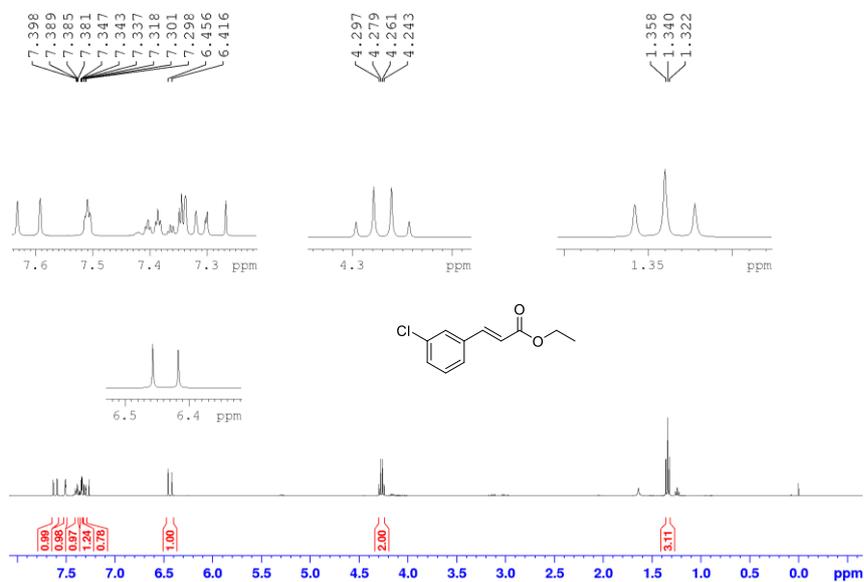
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *o*-clorocinamato de etila (**SF12**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



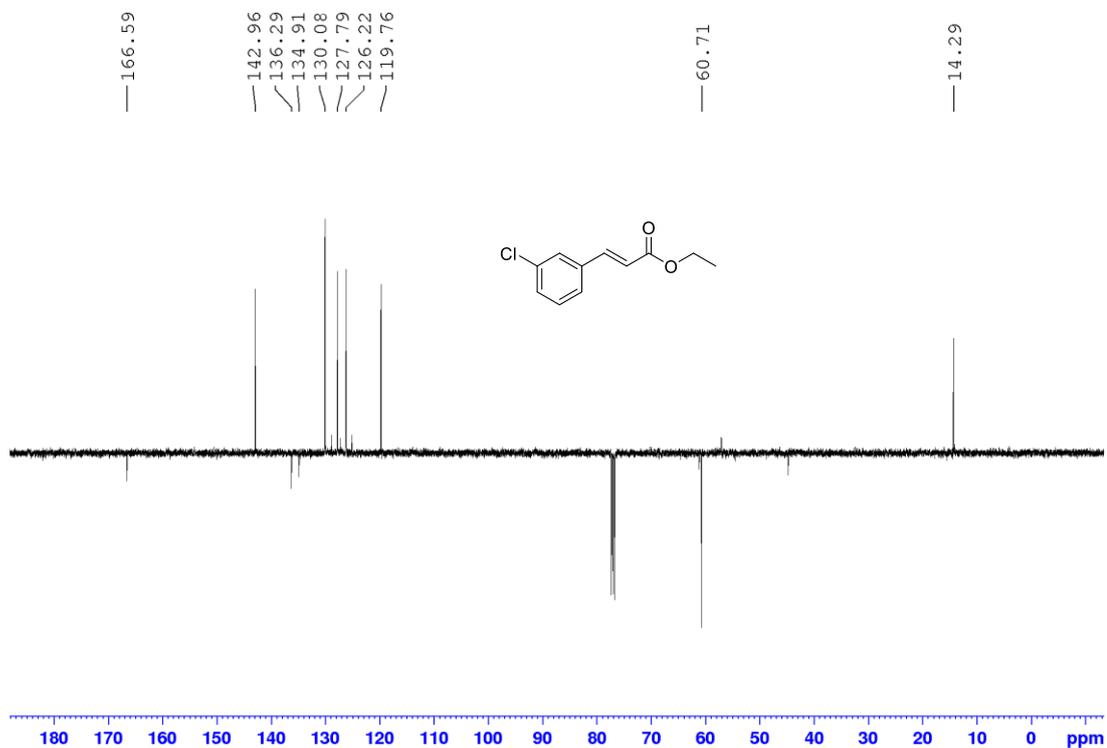
Espectro de I.V. *o*-clorocinamato de etila (**SF12**).



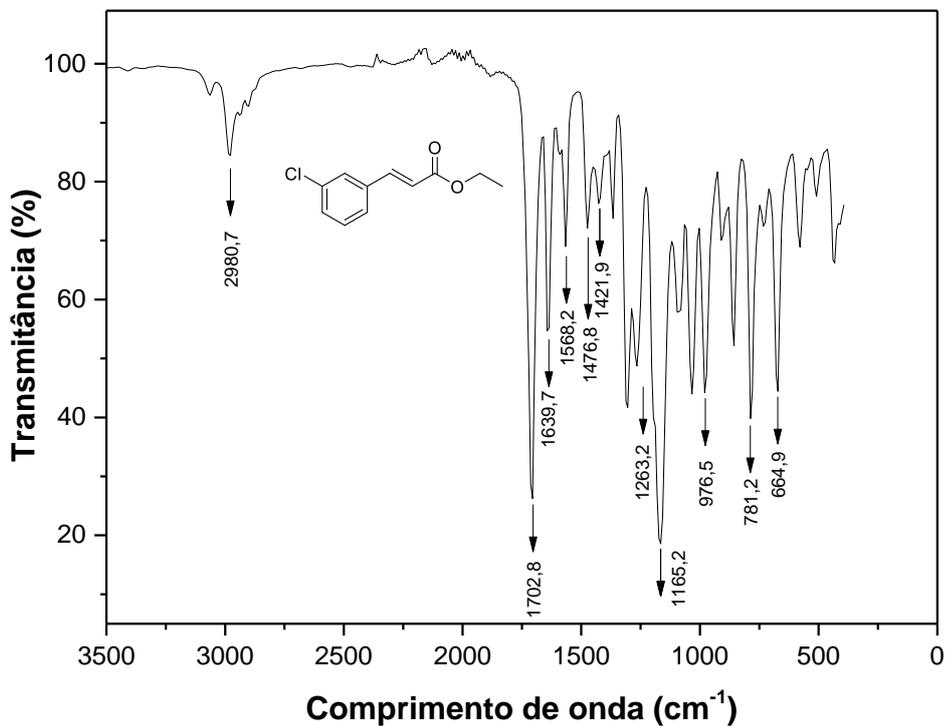
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *m*-clorocinamato de etila (**SF13**) (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



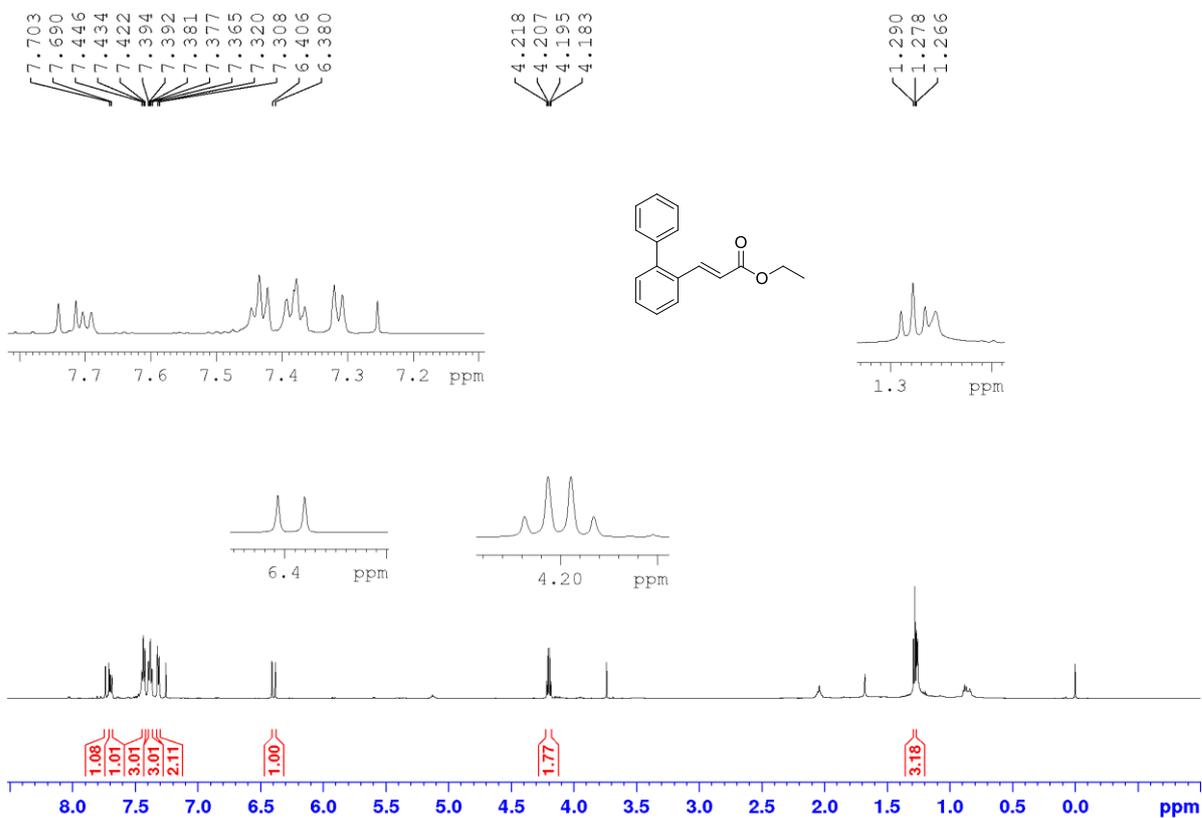
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *m*-clorocinamato de etila (**SF13**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



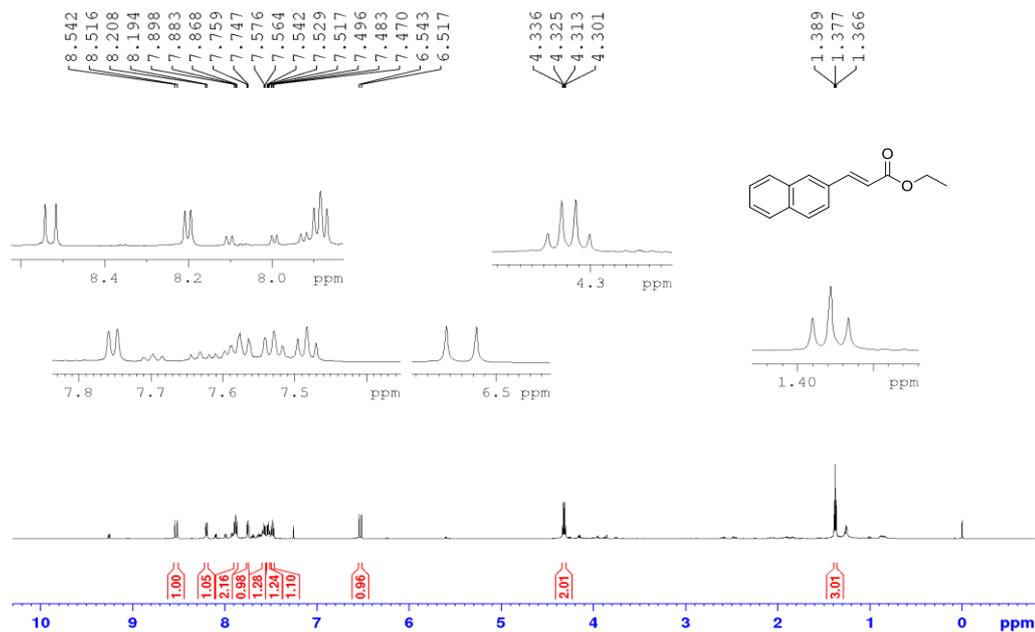
Espectro de I.V *m*-clorocinamato de etila (**SF13**).



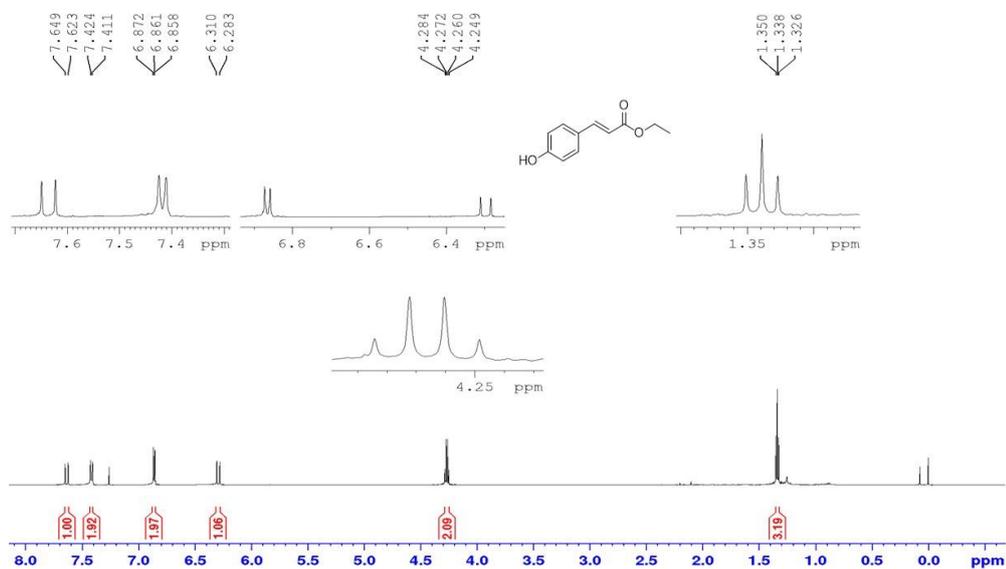
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do *orto*-fenilcinamato de etila (**SF14**) (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>).



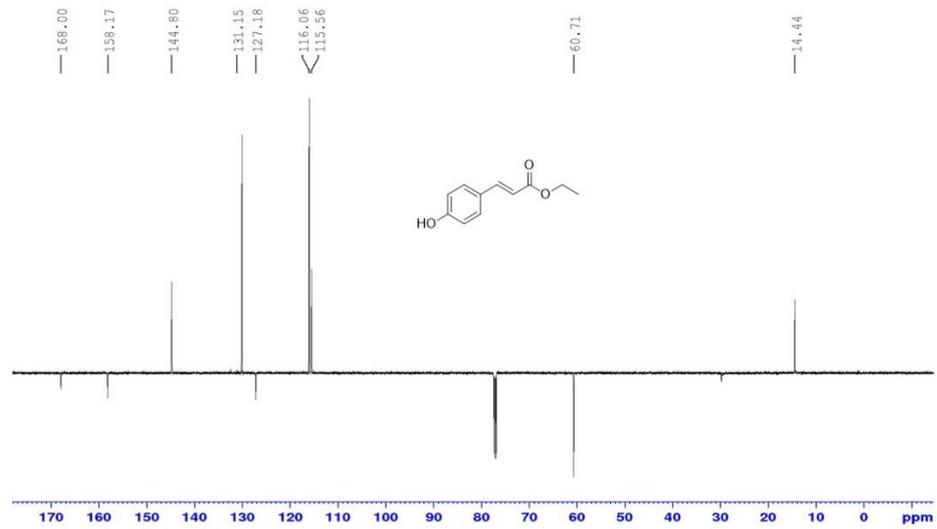
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (*E*)-etil 3-(naftalen-2-il) acrilato (**SF15**) (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



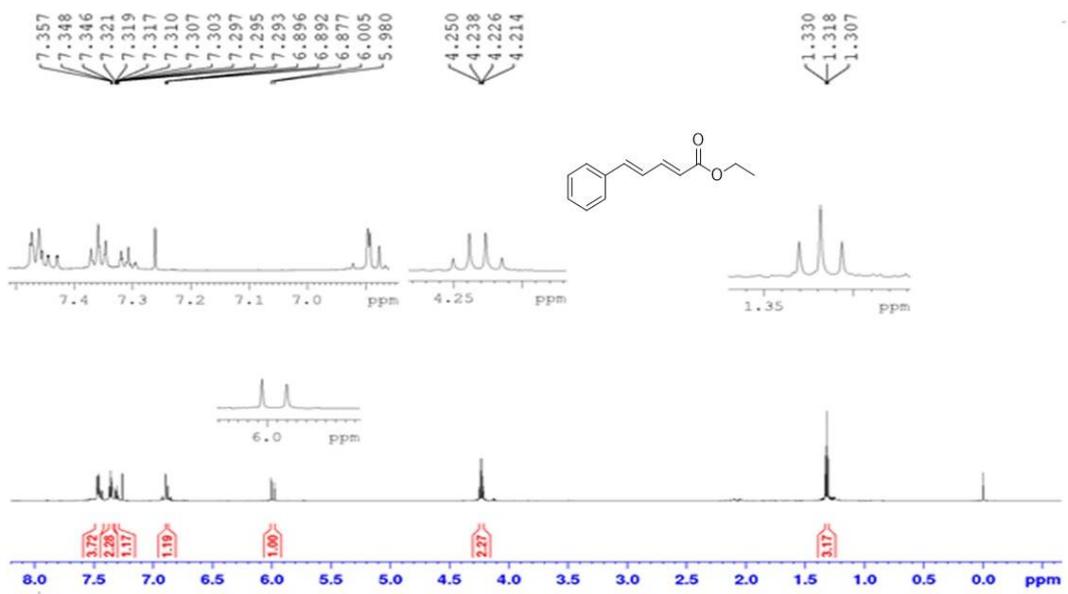
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *p*-hidroxicinamato de etila (**SFD1**) (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



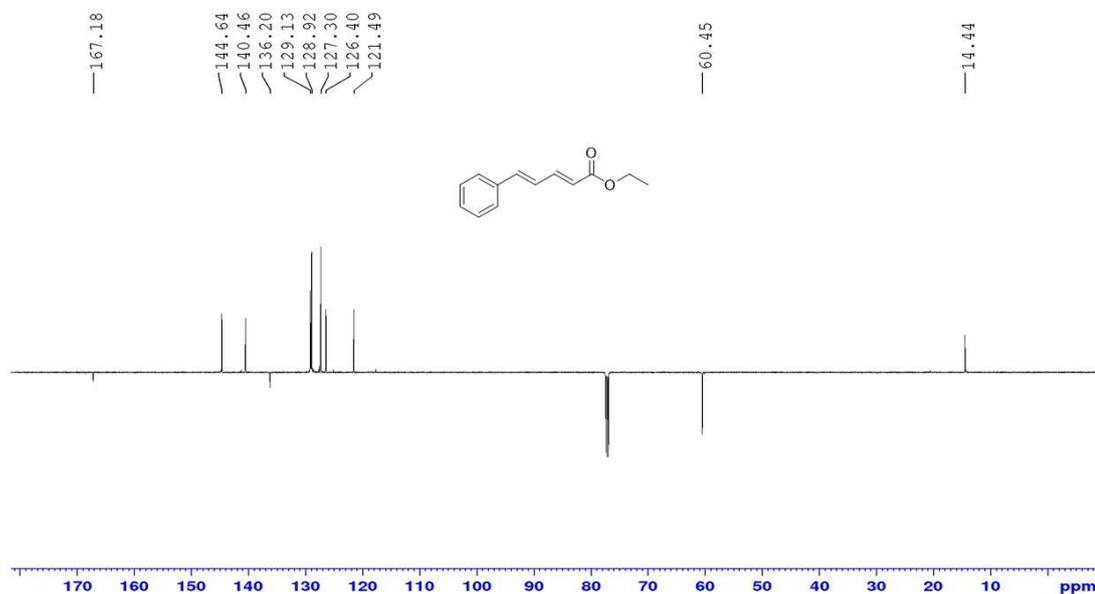
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *p*-hidroxicinamato de etila (**SFD1**) (150 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



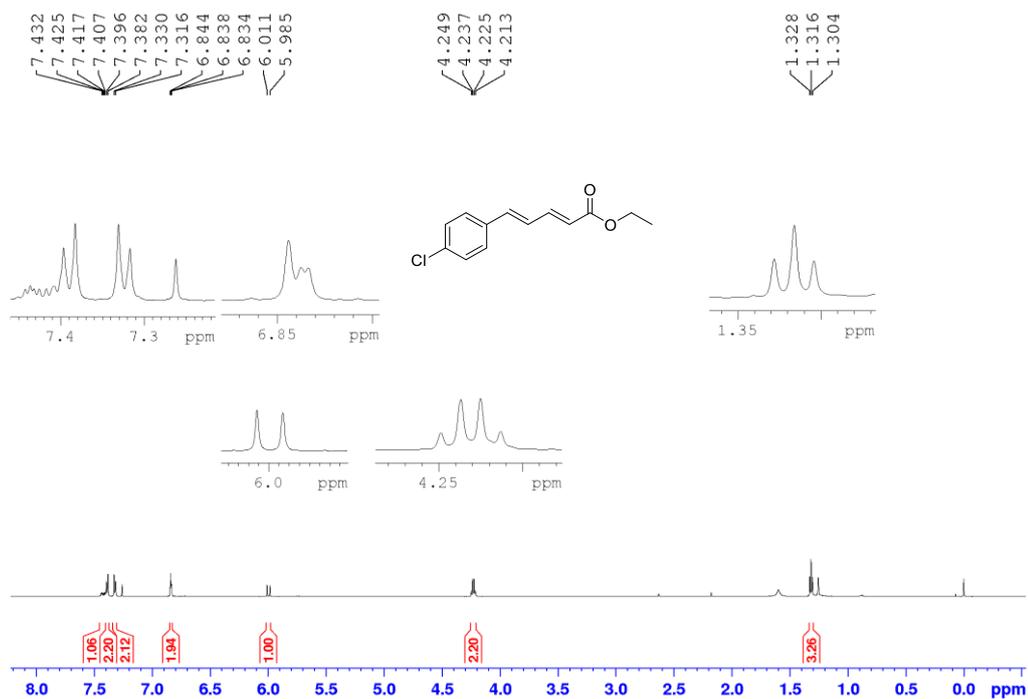
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (2*E*,4*E*)-Etil-5-fenil-penta-2,4-dienoato (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (**SFD2**).



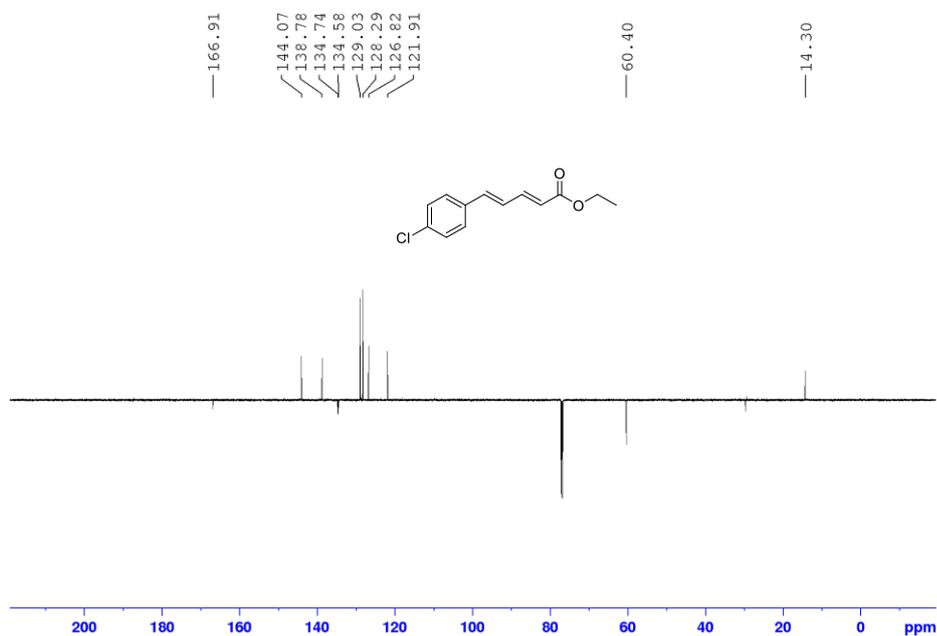
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do (2*E*,4*E*)-Etil-5-fenil-penta-2,4-dienoato (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (SFD2).



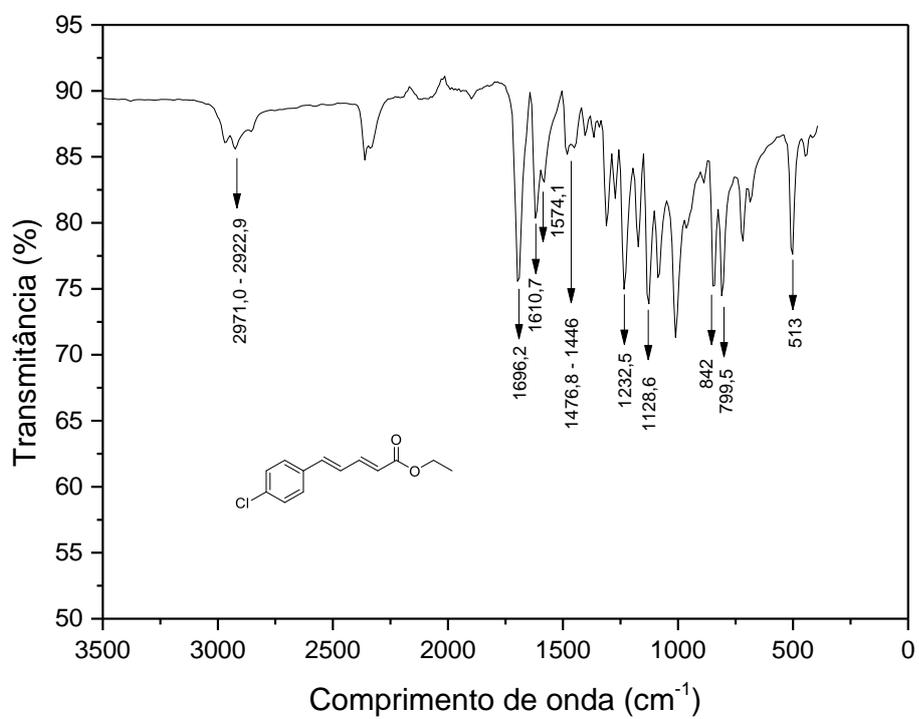
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (2*E*,4*E*)-5-(4-clorofenil)penta-2,4-dienoato de etila (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (SFDD).



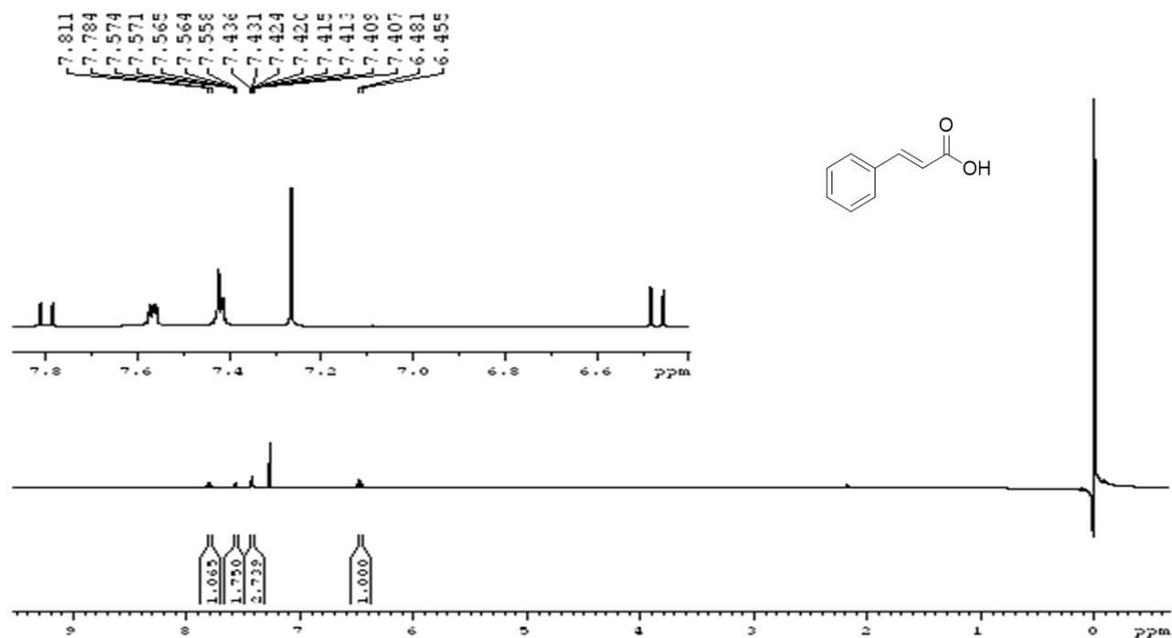
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do (2*E*,4*E*)-5-(4-clorofenil)penta-2,4-dienoato de etila (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (SFDD).



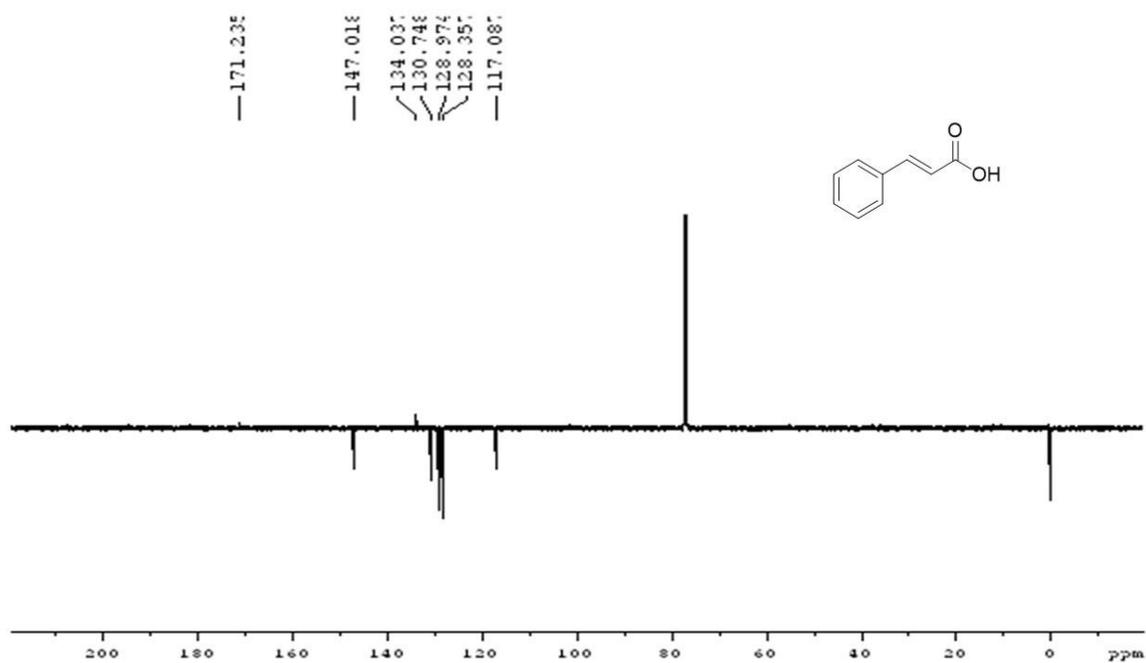
Espectro de I.V do (2*E*,4*E*)-5-(4-clorofenil)penta-2,4-dienoato de etila (SFDD).



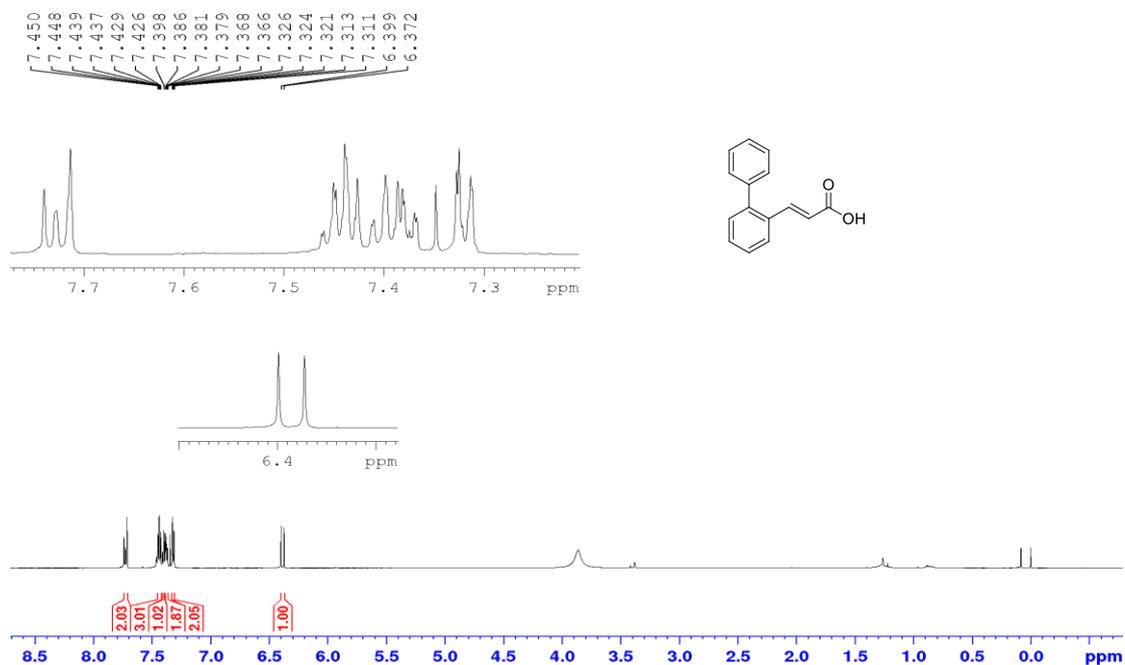
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Ácido Cinâmico (**Cin**) (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



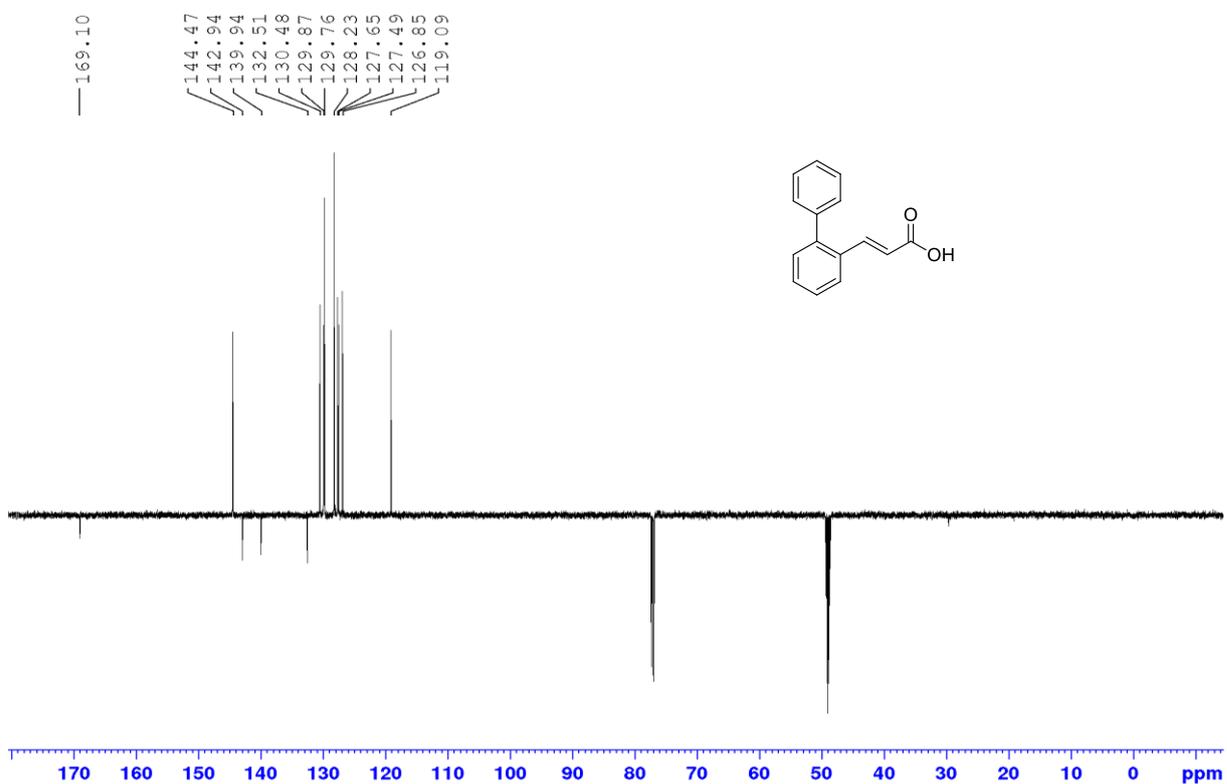
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Ácido Cinâmico (**Cin**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



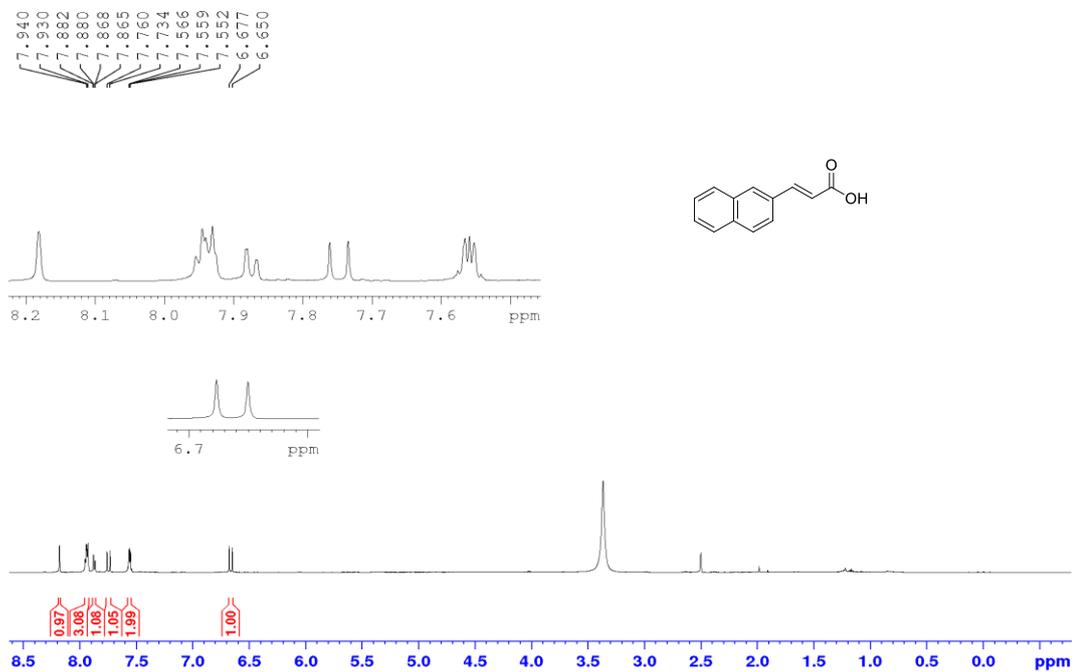
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Ácido *orto*-fenilcinâmico (**sfd6**) (600 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ).



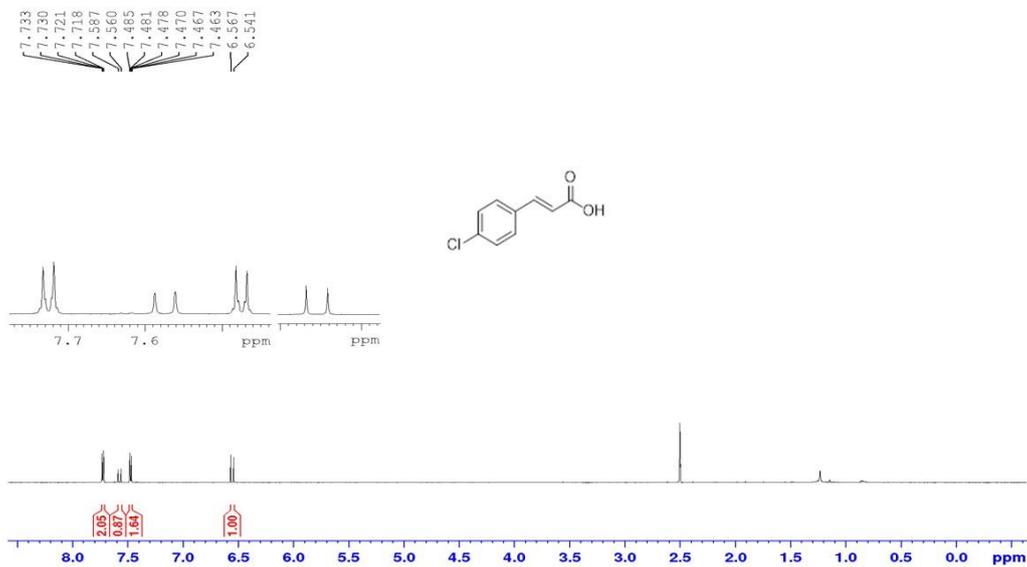
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Ácido *orto*-fenilcinâmico (**sfd6**) (100 MHz;  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ).



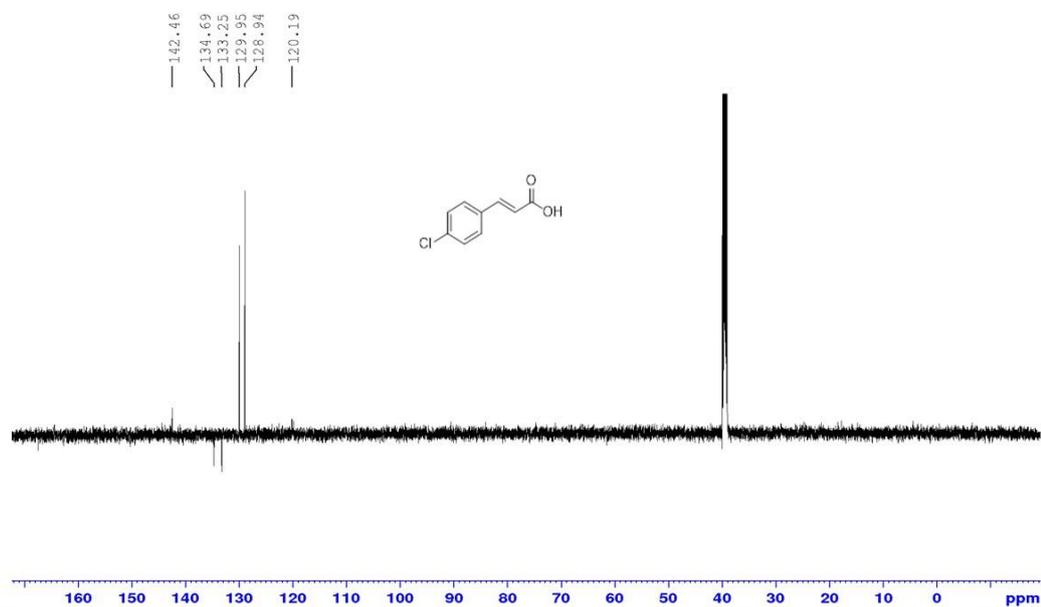
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (*E*)-3-(naftalen-2-il) ácido acrílico (**sfd9**) (600 MHz; DMSO- $\text{d}_6$ ).



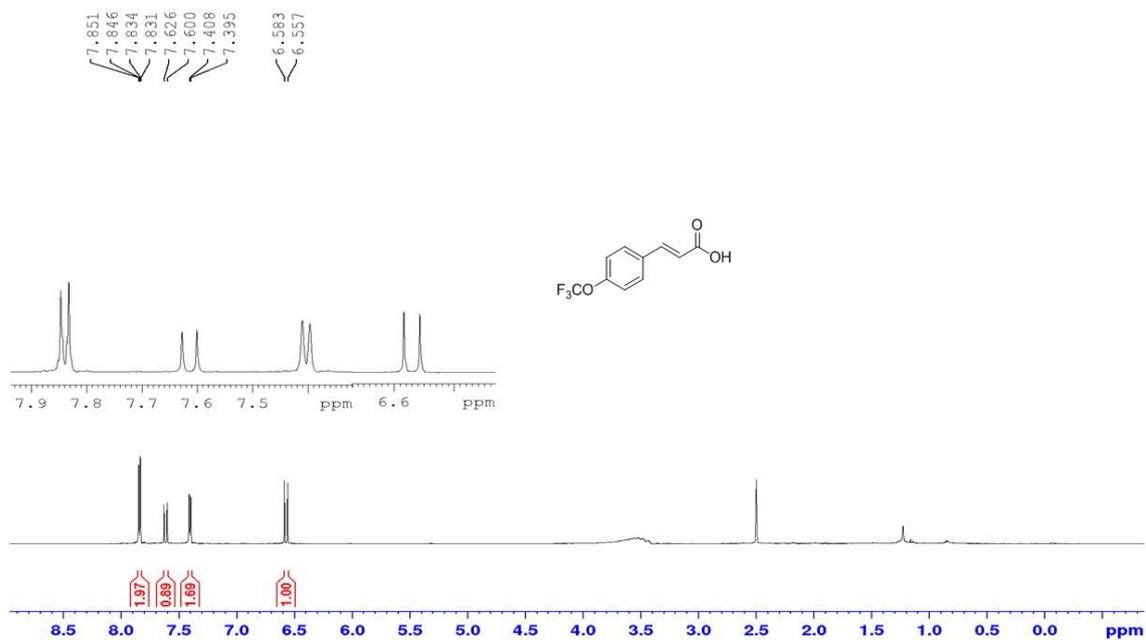
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**) (600 MHz; DMSO- $\text{d}_6$ ).



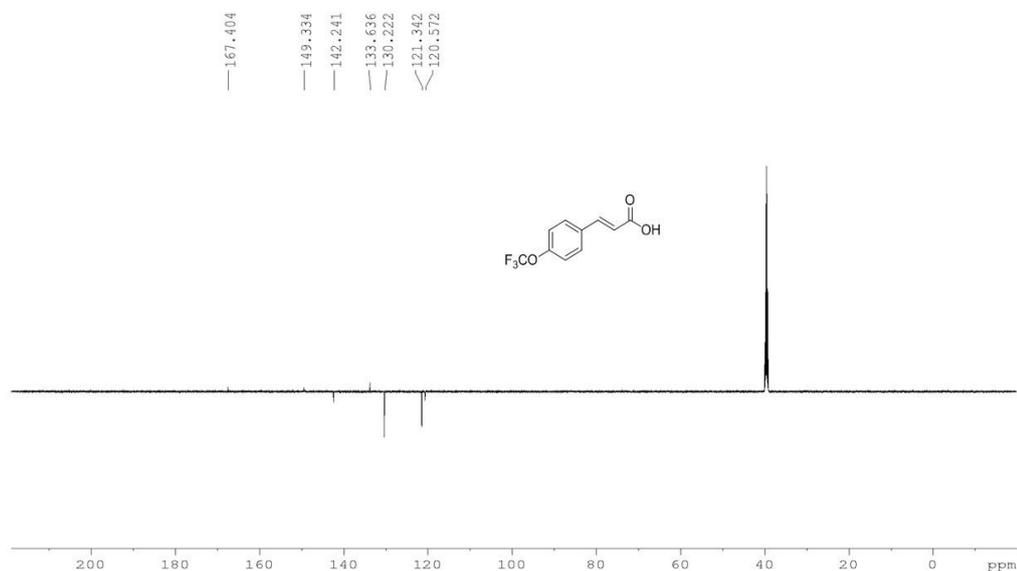
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Ácido *p*-clorocinâmico (**Cin-4-Cl**) (150 MHz; DMSO- $\text{d}_6$ ).



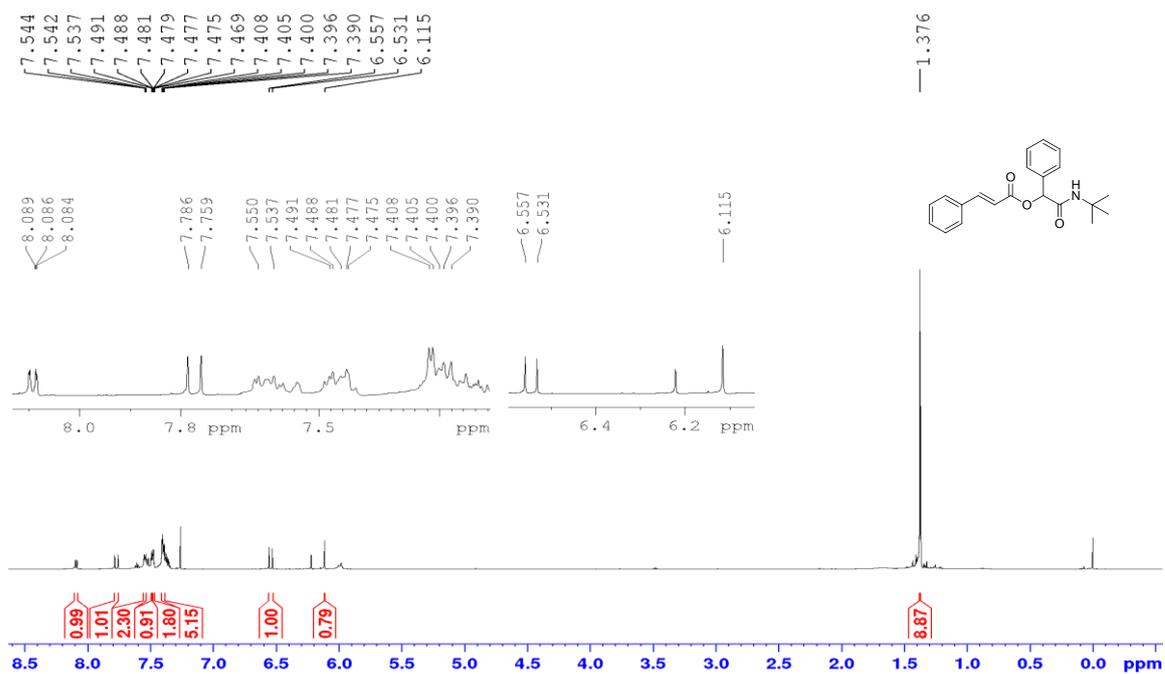
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Ácido *p*-trifluorometoxicinâmico (**Cin-4-OCF<sub>3</sub>**) (600 MHz; DMSO- $\text{d}_6$ ).



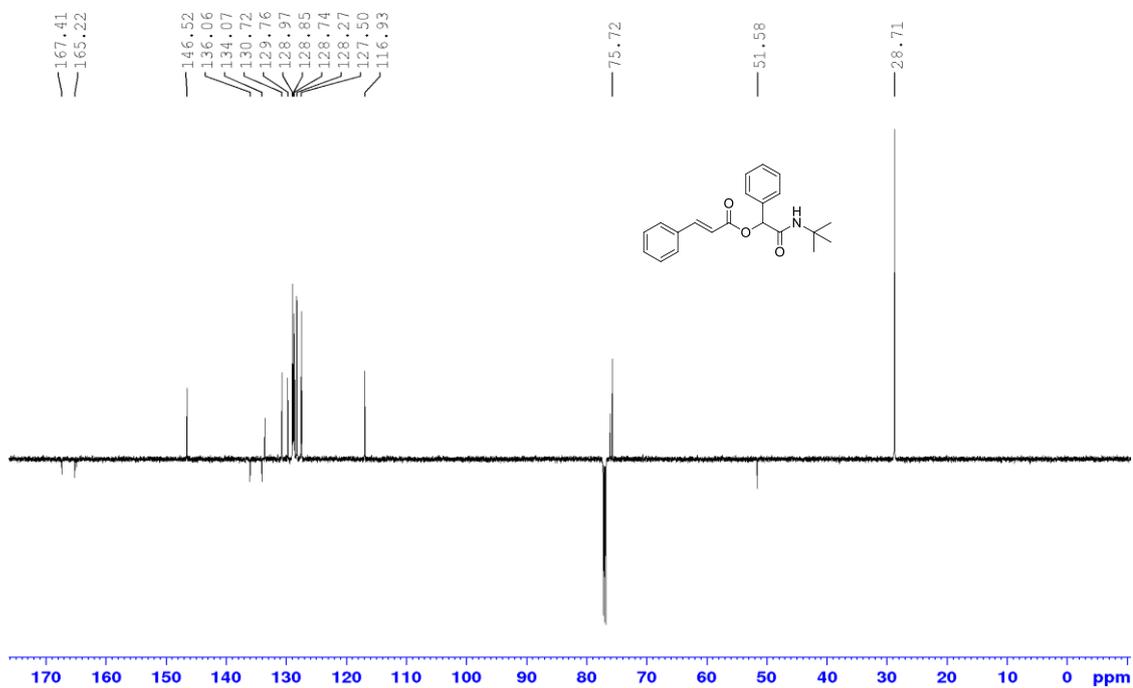
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do Ácido *p*-trifluorometoxicinâmico (**Cin-4-OCF<sub>3</sub>**) (150 MHz; DMSO- $d_6$ ).



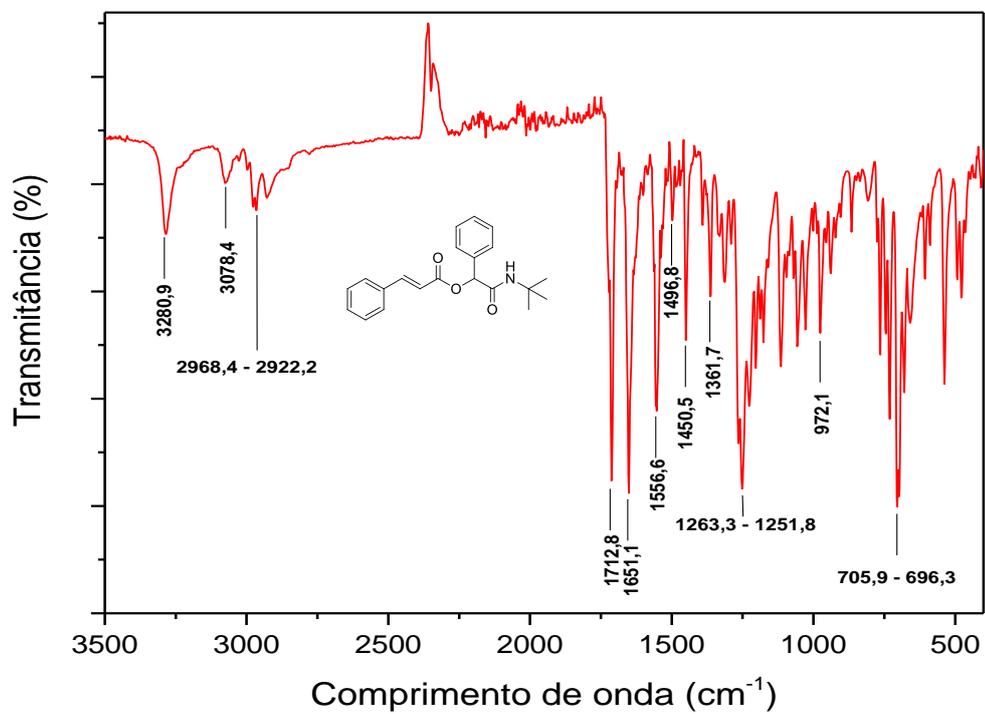
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 2-(*tert*-butilamino)-2-oxo-1-feniletil cinamato (**SFD4**) (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



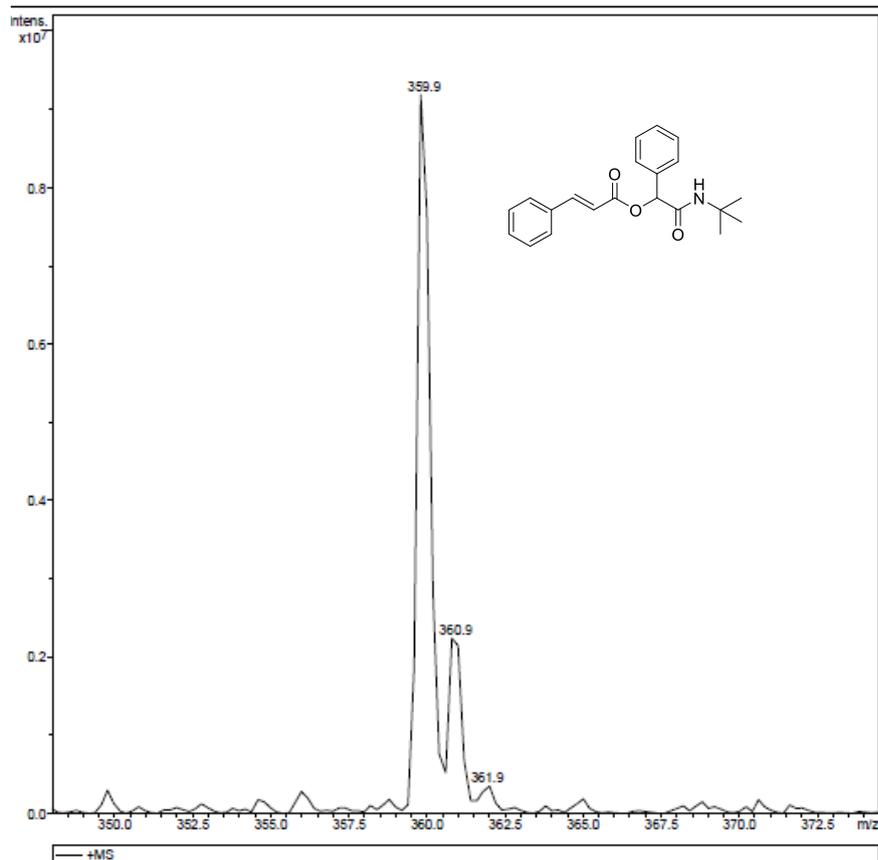
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 2-(*terc*-butilamino)-2-oxo-1-feniletil cinamato (**SFD4**) (150 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



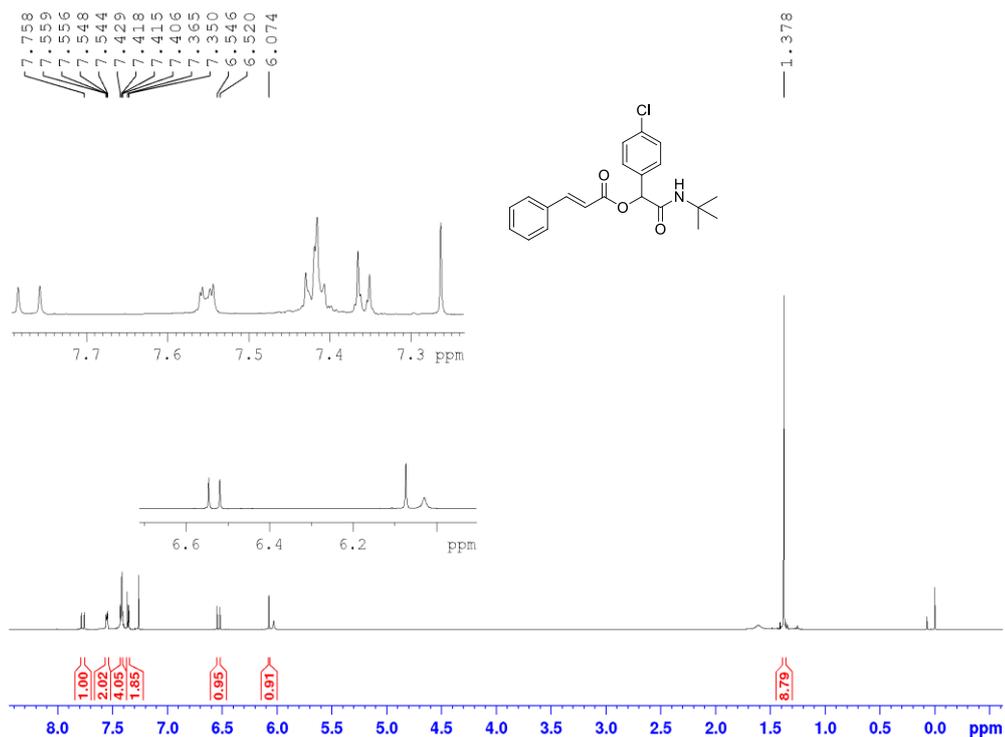
Espectro de IV do 2-(*terc*-butilamino)-2-oxo-1-feniletil cinamato (**SFD4**)



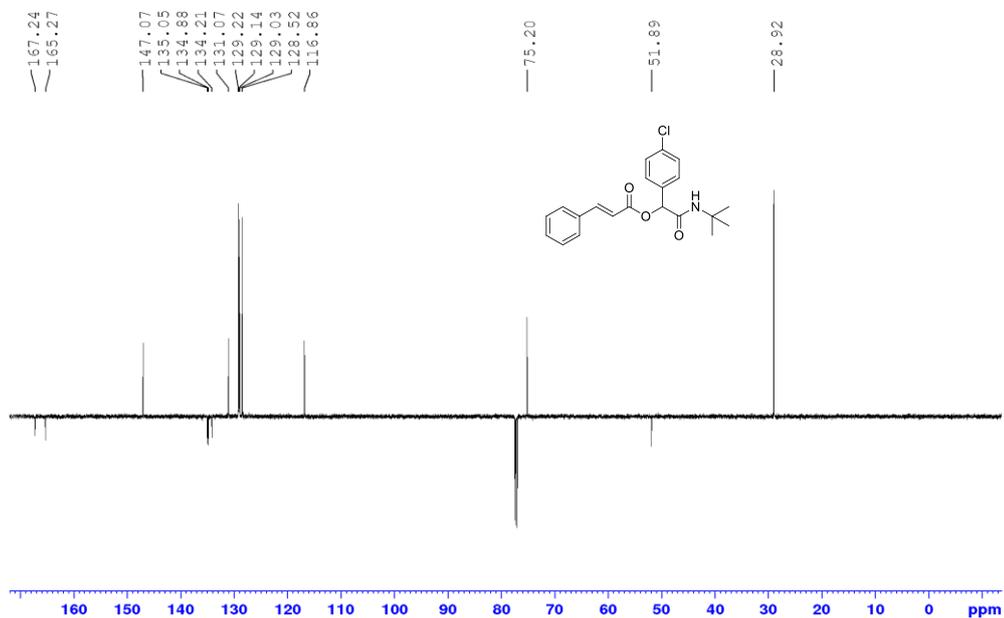
Cromatograma de ESI-TOF) m/z - [M+Na]<sup>+</sup> do composto **SFD4**:



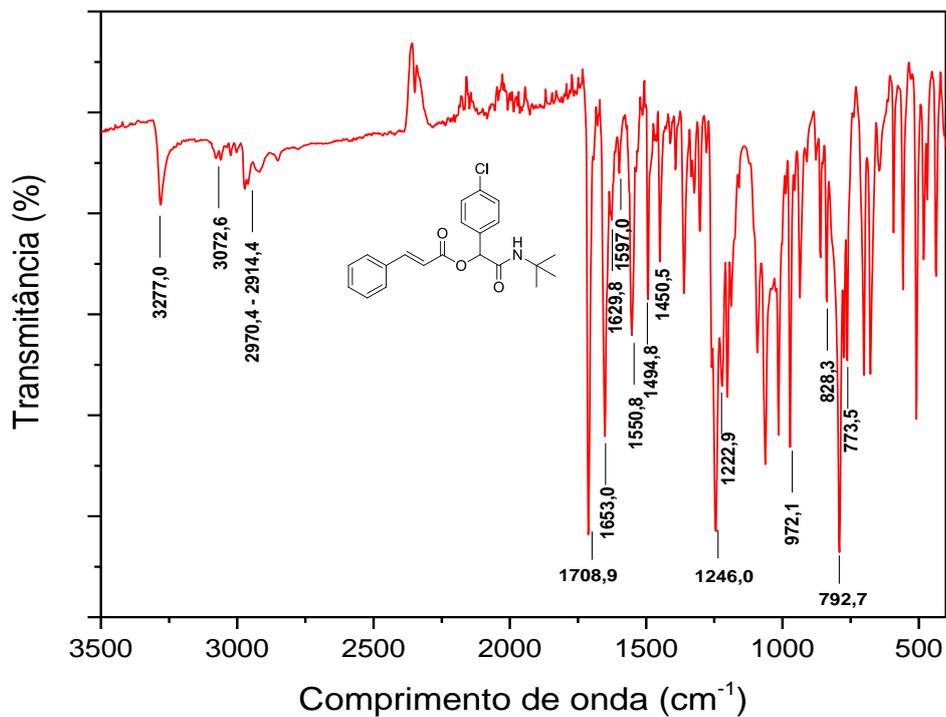
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do 2-(*terc*-butilamino) -1-(4-clorofenil) -2-oxoetil cinamato (**SFD5**) (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>).



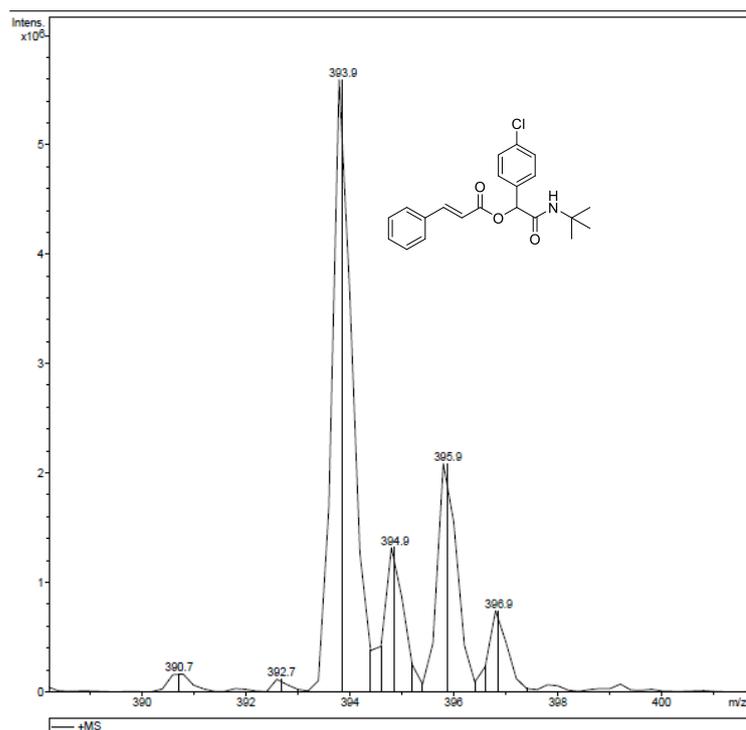
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 2-(*terc*-butilamino) -1-(4-clorofenil) -2-oxoetil cinamato (**SFD5**)  
(150MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



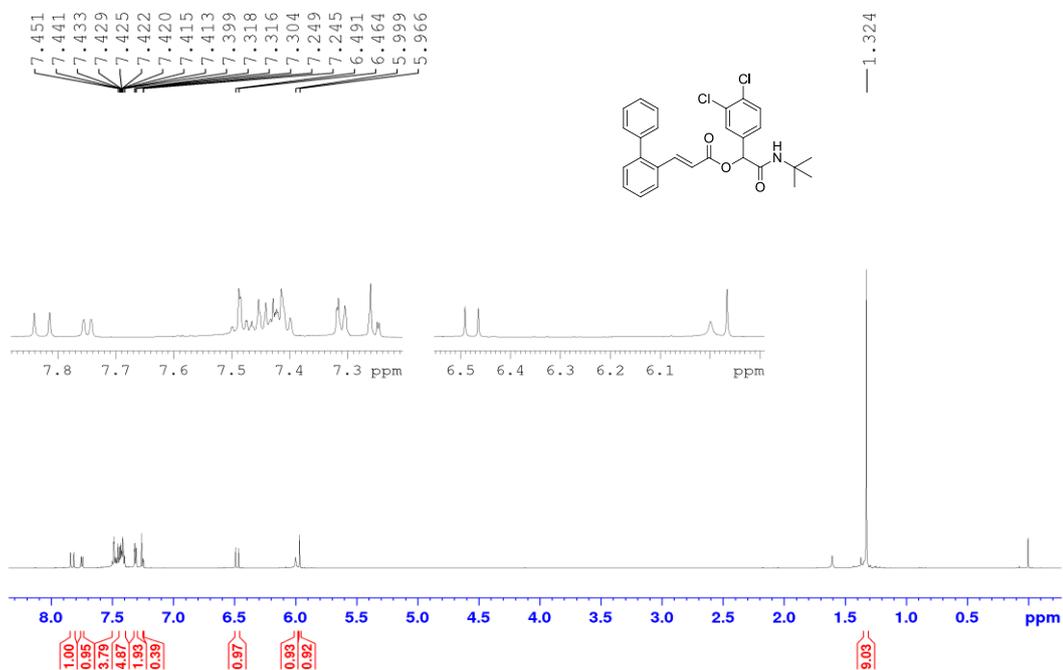
Espectro de IV do 2-(*terc*-butilamino) -1-(4-clorofenil) -2-oxoetil cinamato (**SFD5**)



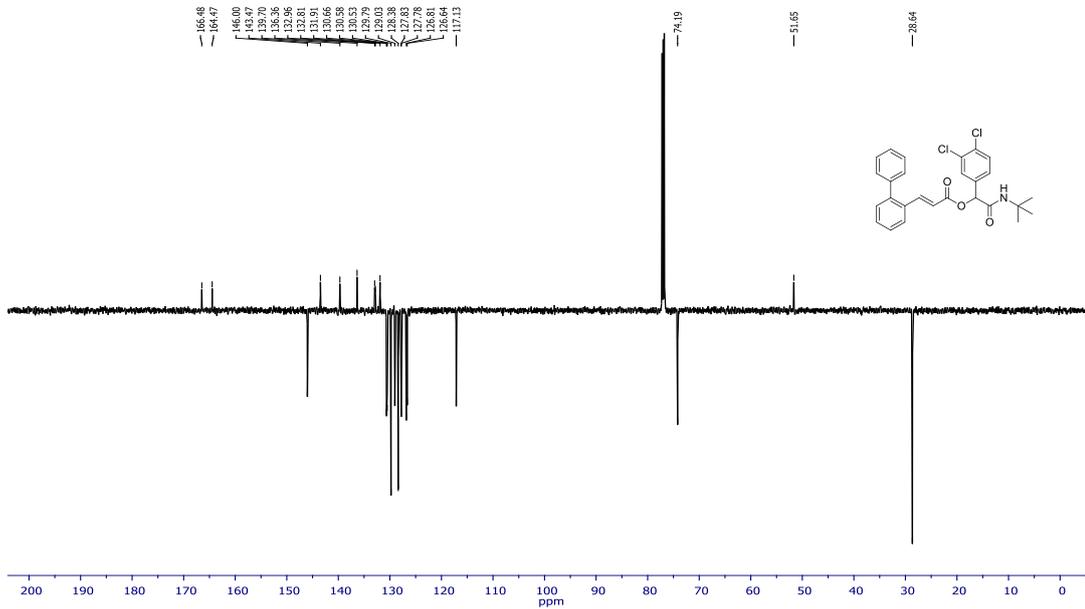
Cromatograma de ESI-TOF) m/z - [M+Na]<sup>+</sup> do composto **SFD5**:



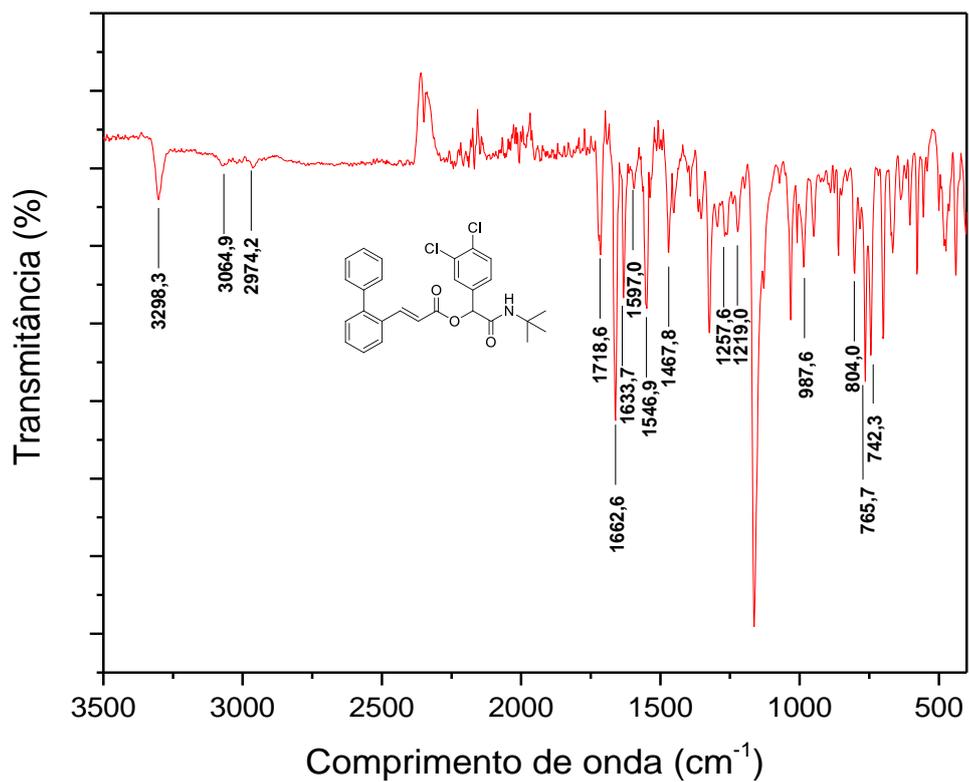
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do (*E*)-2-(*tert*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil] -2-il) acrilato (**SFD6**) (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>).



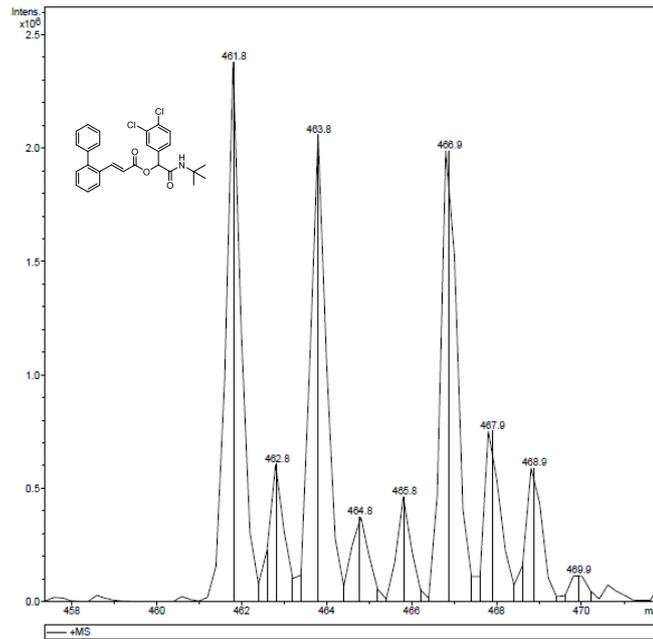
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do (*E*)-2-(*terc*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil] -2-il) acrilato (**SFD6**) (150MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



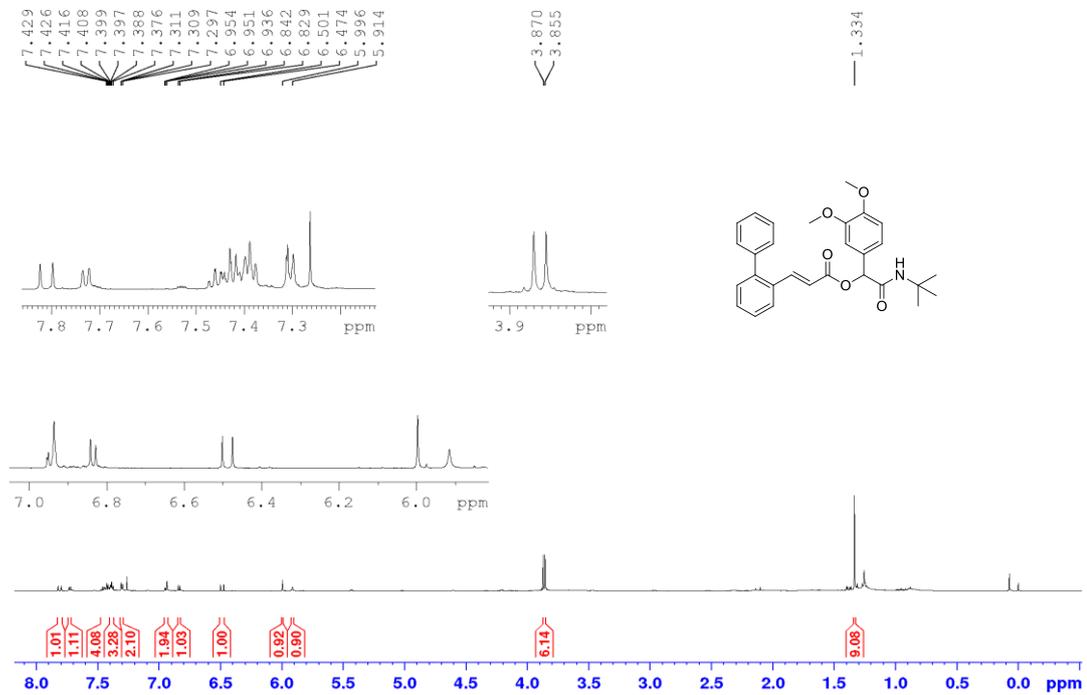
Espectro de IV do (*E*)-2-(*terc*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil] -2-il) acrilato (**SFD6**)



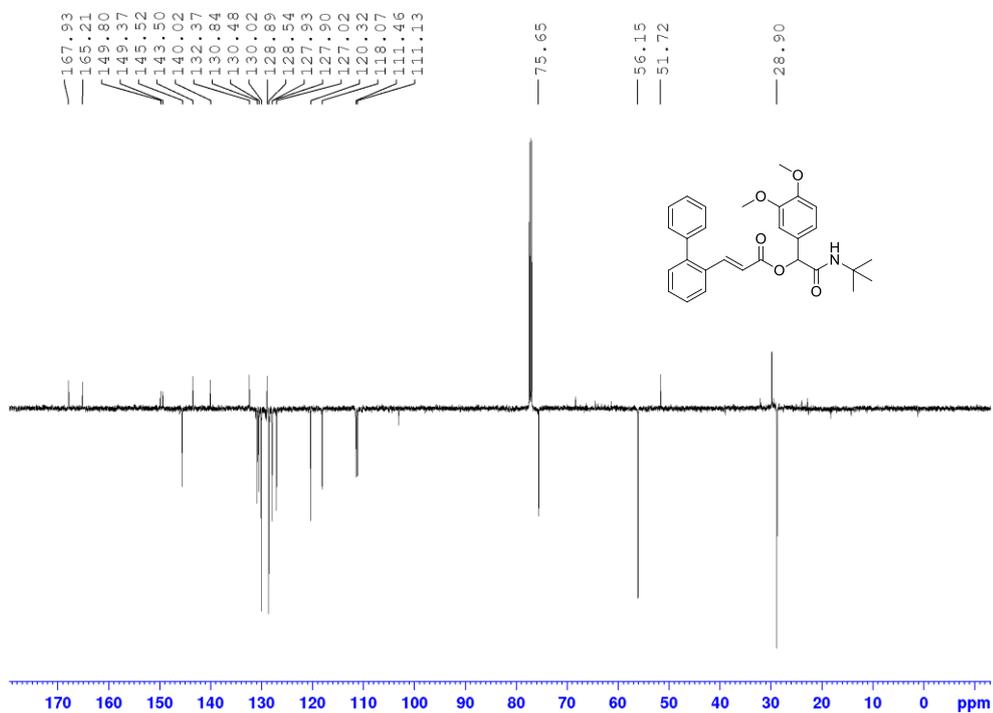
Cromatograma de ESI-TOF) m/z - [M+Na]<sup>+</sup> do composto **SFD6**:



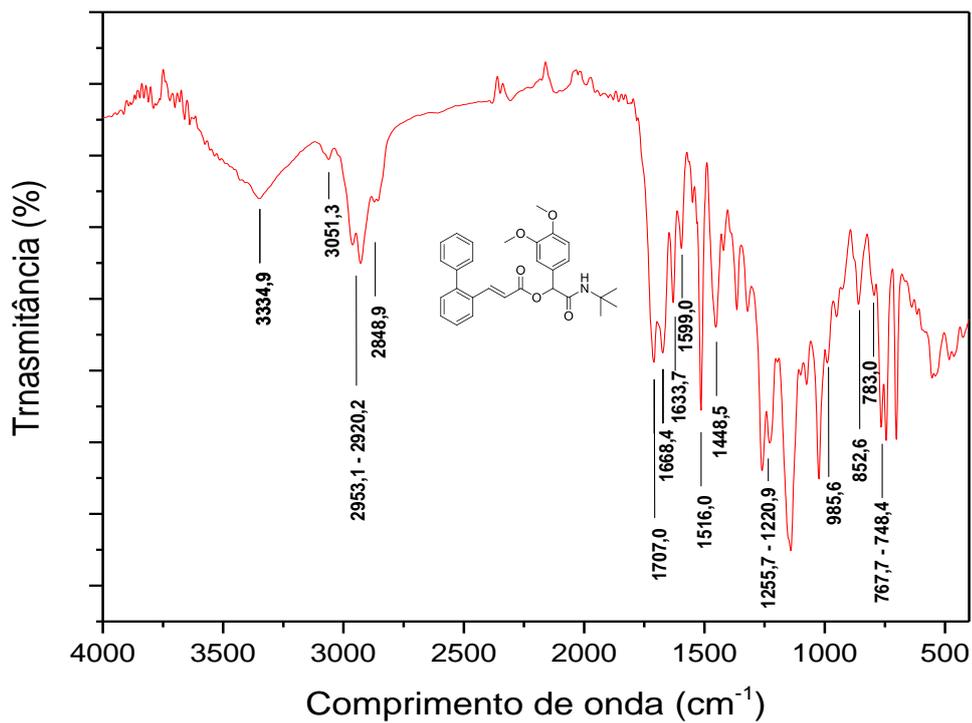
Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do (*E*)-2-(*tert*-butilamino) -1-(3,4-dimetoxifenil) -2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil] -2-il) acrilato (**SFD7**)



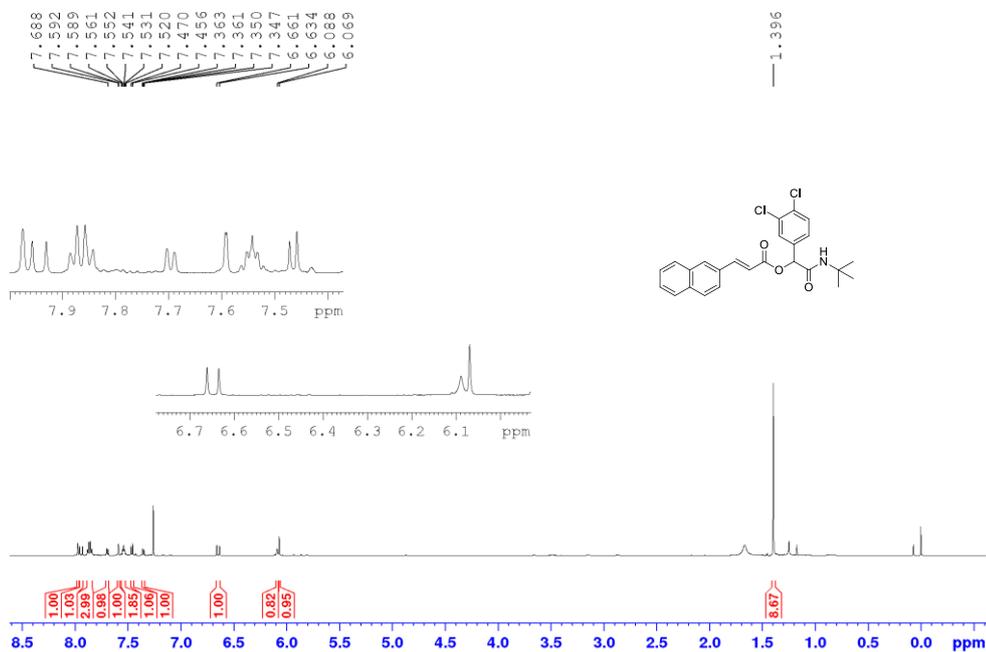
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do (*E*)-2-(*tert*-butilamino) -1-(3,4-dimetoxifenil) -2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil] -2-il) acrilato (**SFD7**)



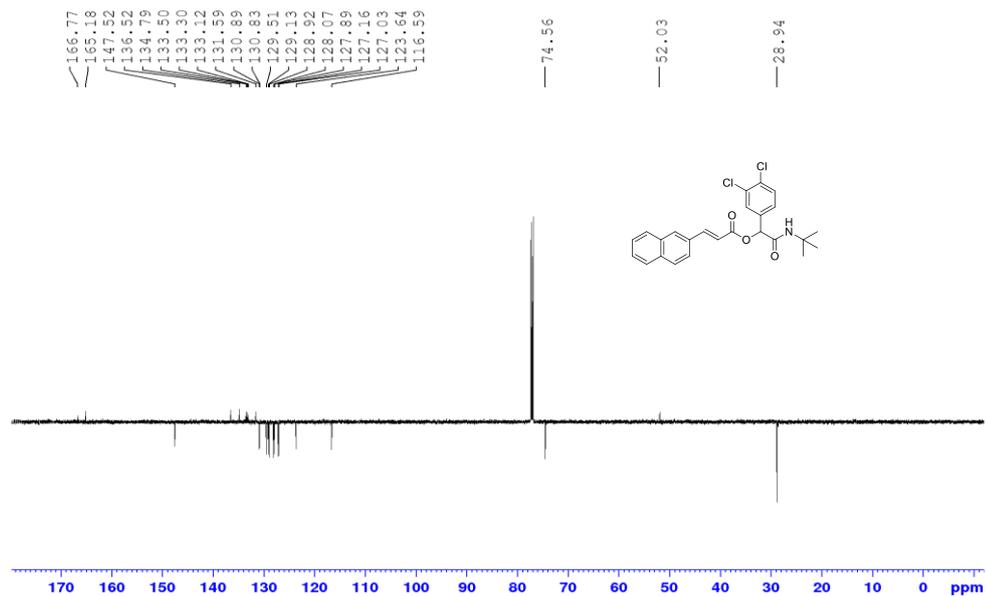
Espectro de IV do (*E*)-2-(*tert*-butilamino) -1-(3,4-dimetoxifenil) -2-oxoetil 3-([1,1'-bifenil] -2-il) acrilato (**SFD7**)



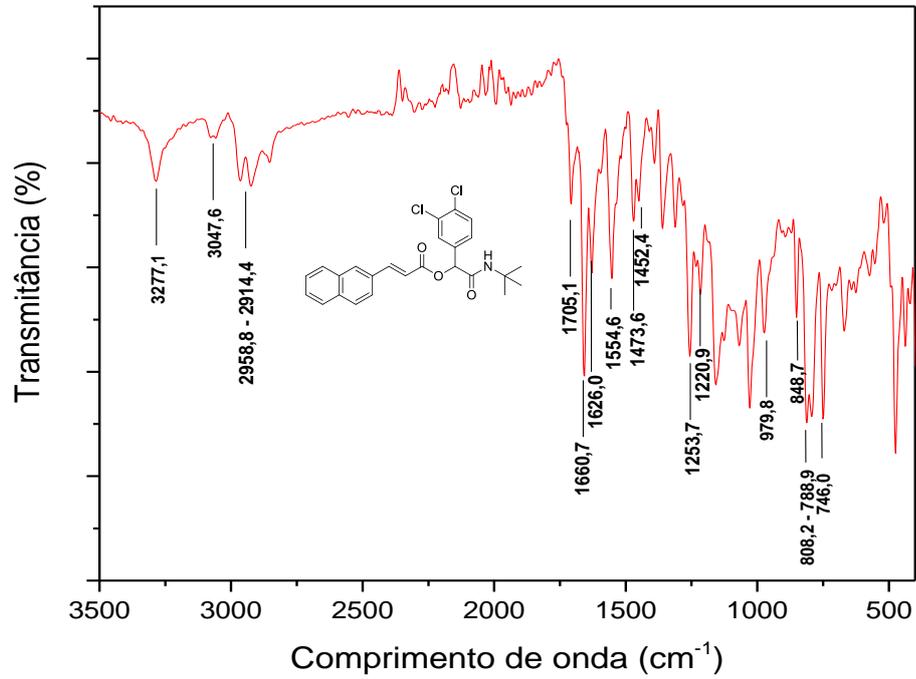
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (*E*)-2-(*terc*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-(naftalen-2-il) acrilato **SFD9**



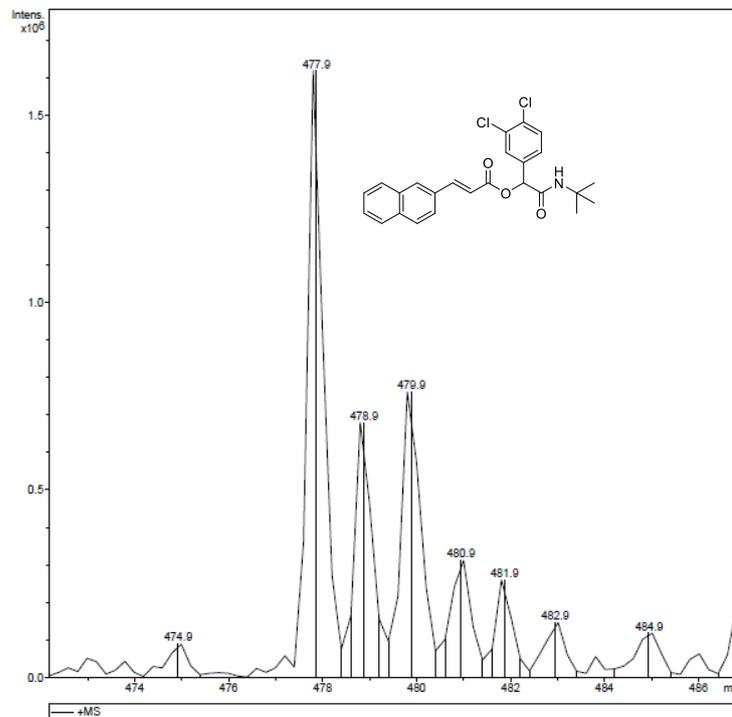
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do (*E*)-2-(*terc*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-(naftalen-2-il) acrilato (**SFD9**)



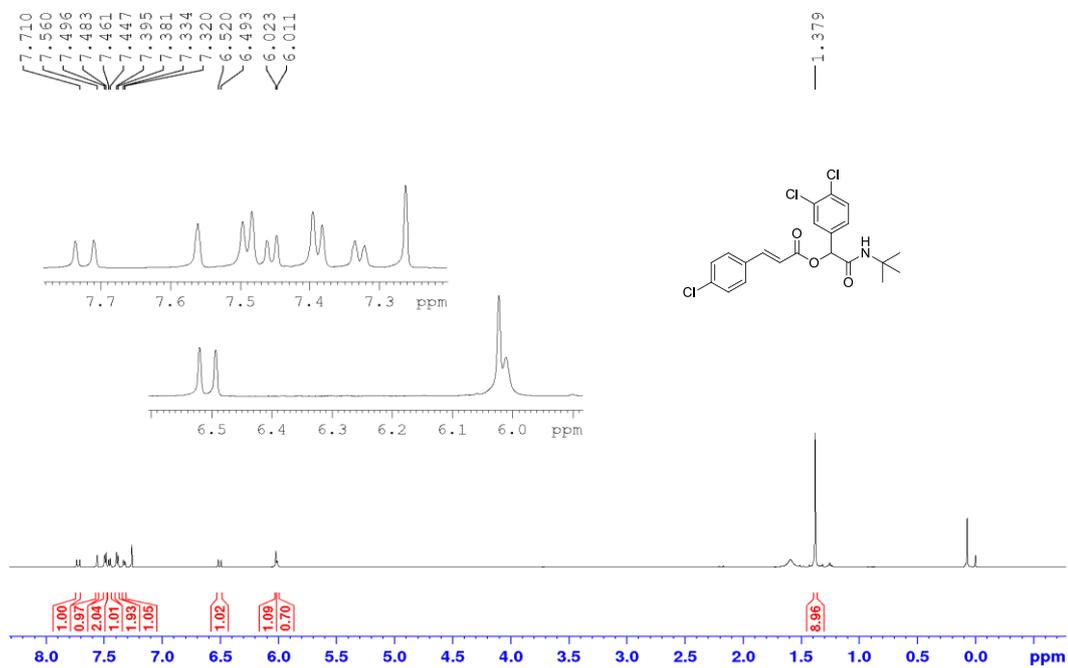
Espectro de IV do (E)-2-(*terc*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-(naftalen-2-il) acrilato (**SFD9**)



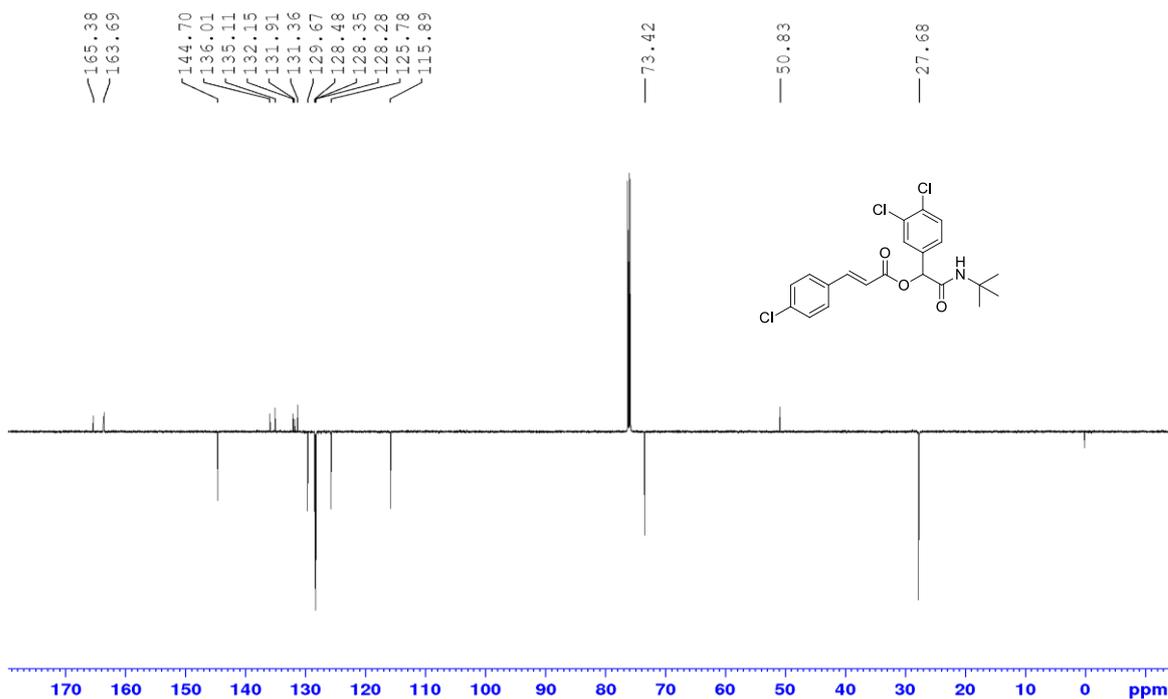
Cromatograma de ESI-TOF) m/z - [M+Na]<sup>+</sup> do composto **SFD9**:



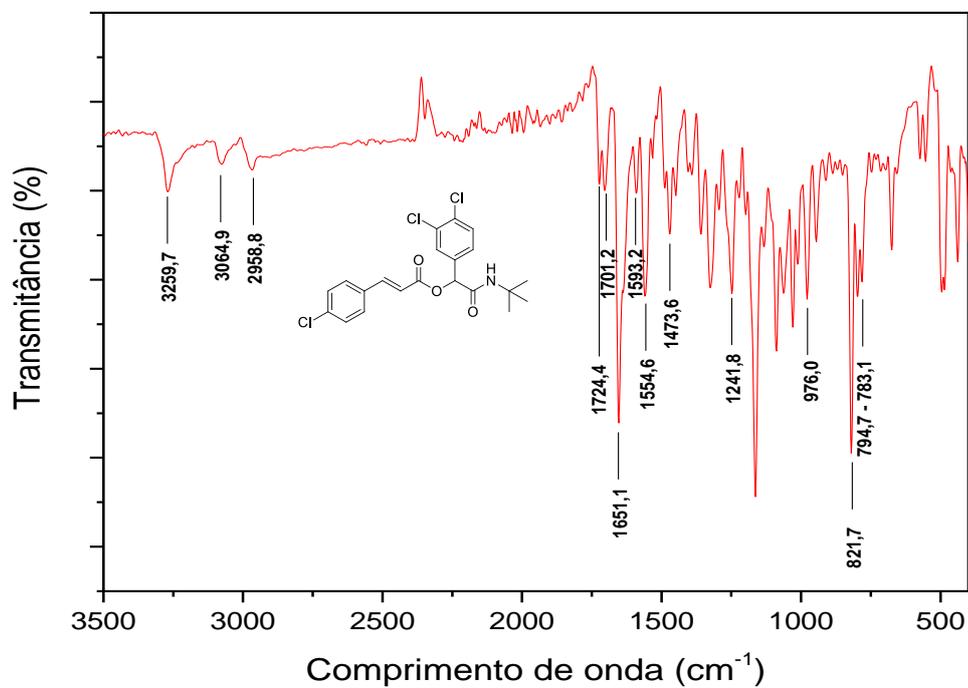
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do (*E*)-2-(*tert*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-(4-clorofenil) acrilato (**SFD10**)



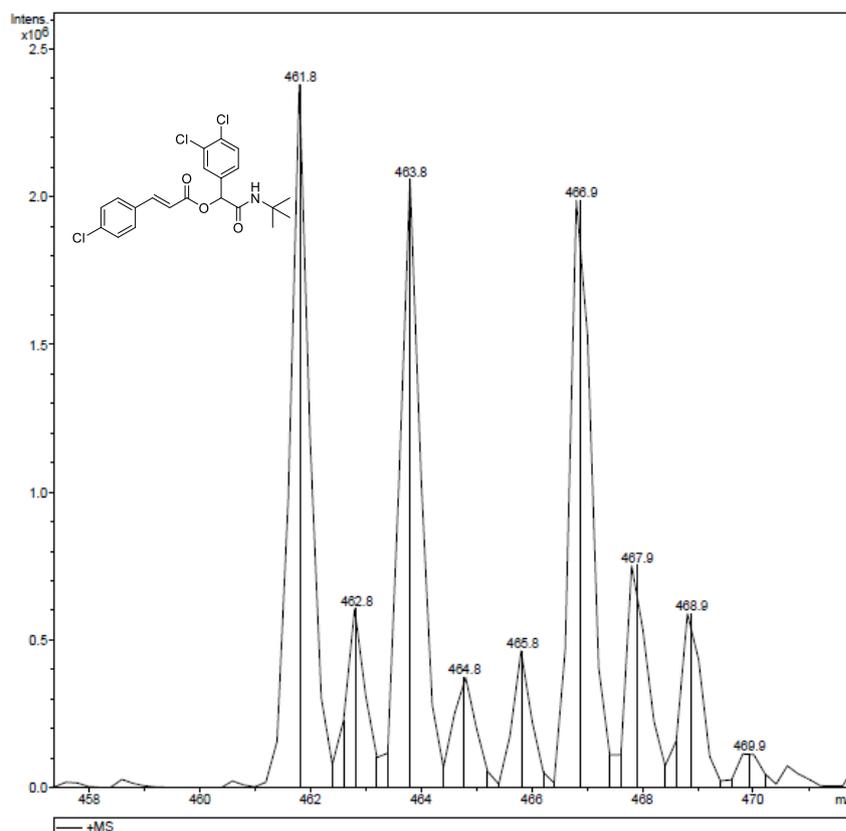
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do (*E*)-2-(*tert*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-(4-clorofenil) acrilato (**SFD10**)



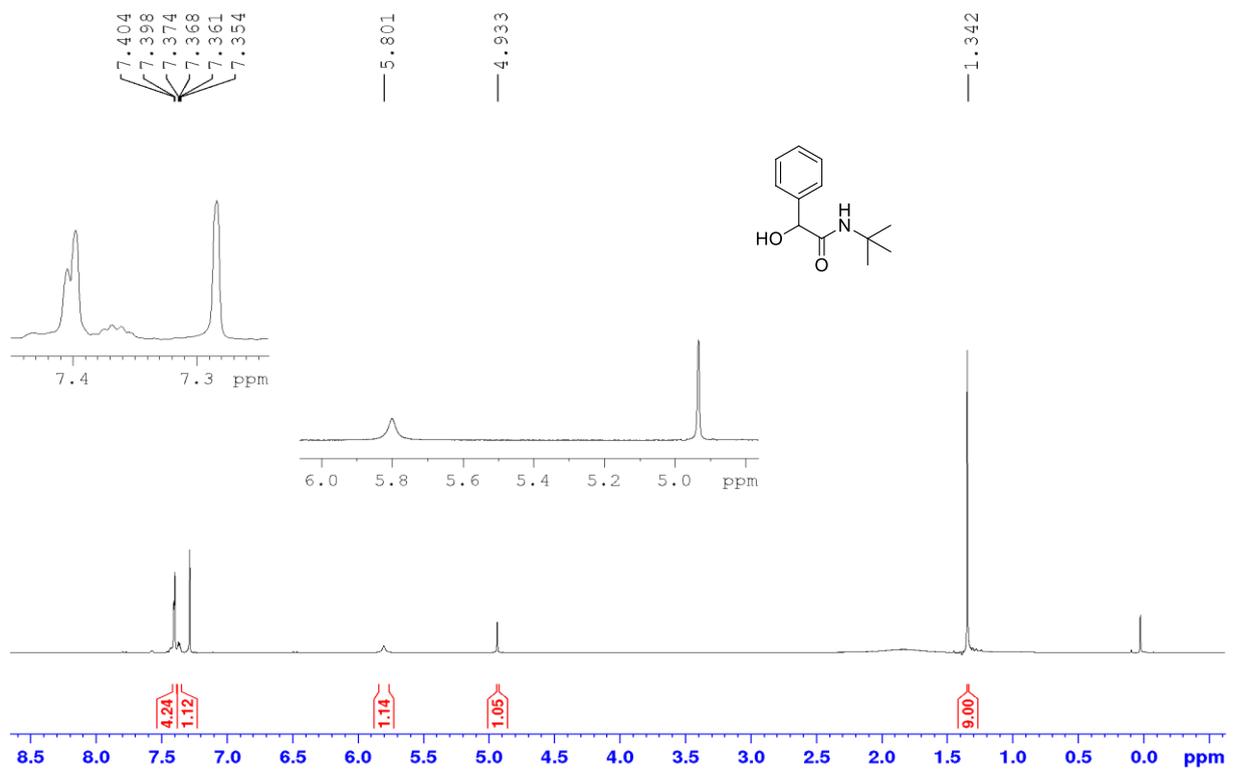
Espectro de IV do (E)-2-(*terc*-butilamino) -1-(3,4-diclorofenil) -2-oxoetil 3-(4-clorofenil) acrilato (**SFD10**)



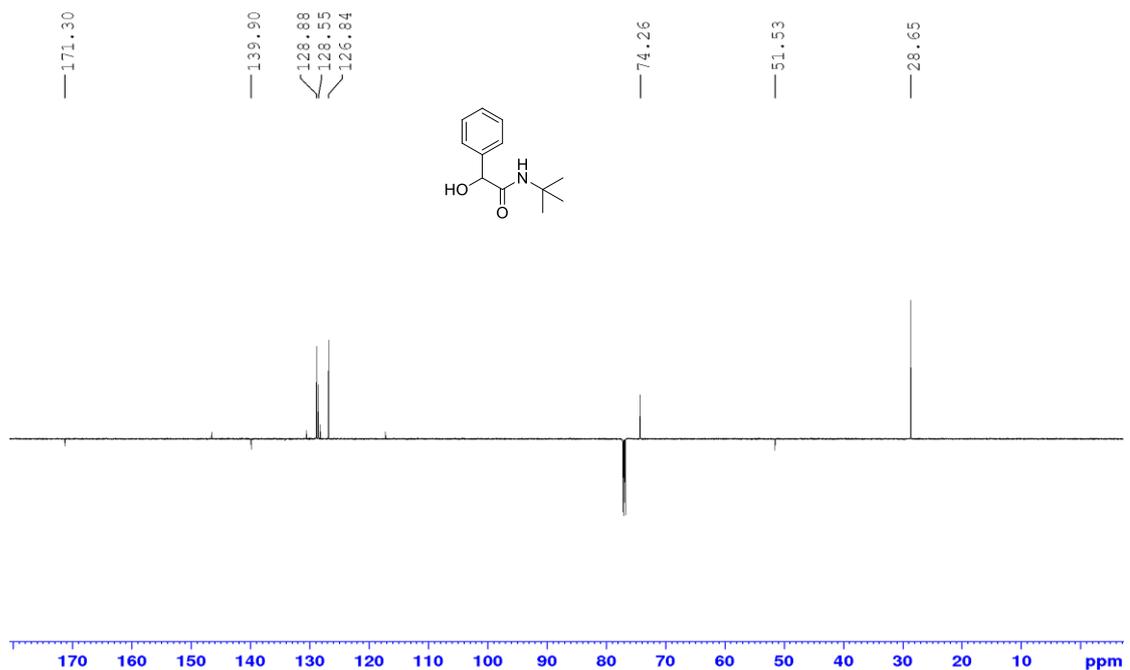
Cromatograma de ESI-TOF) m/z - [M+Na]<sup>+</sup> do composto **SFD10**:



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *N*-(*terc*-butil) -2-hidroxi-2-fenilacetamida (**sfd1**)



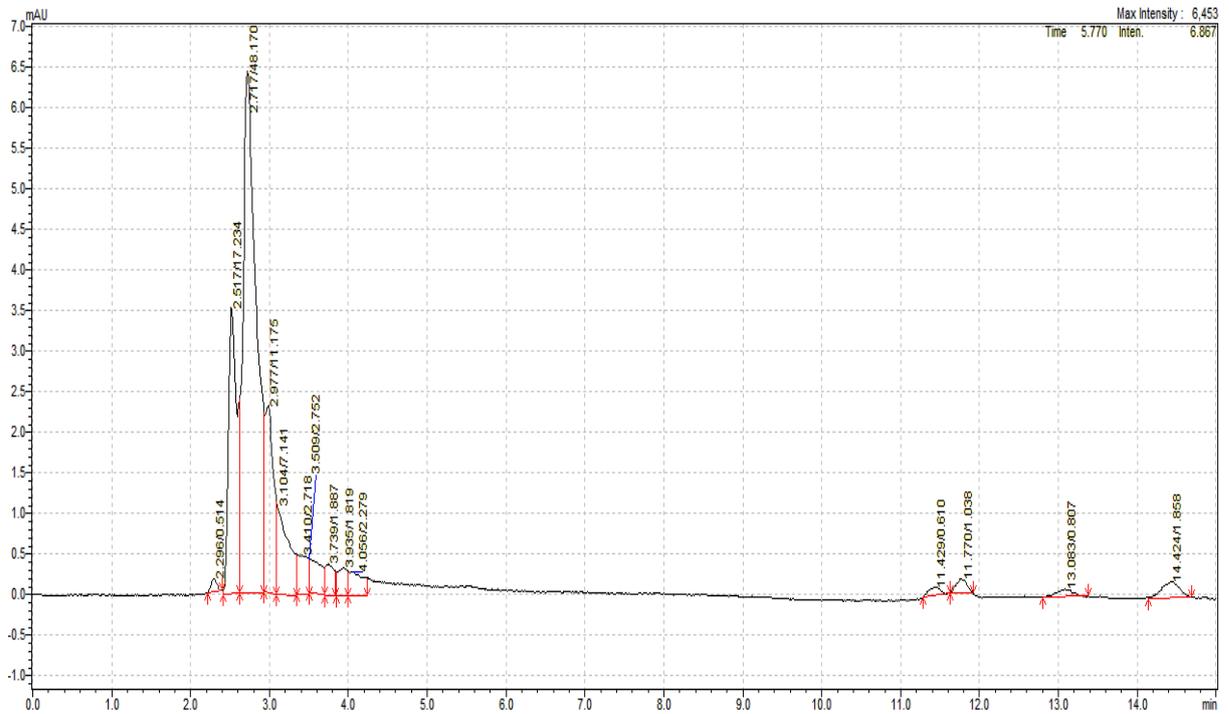
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do *N*-(*terc*-butil) -2-hidroxi-2-fenilacetamida (**sfd1**)



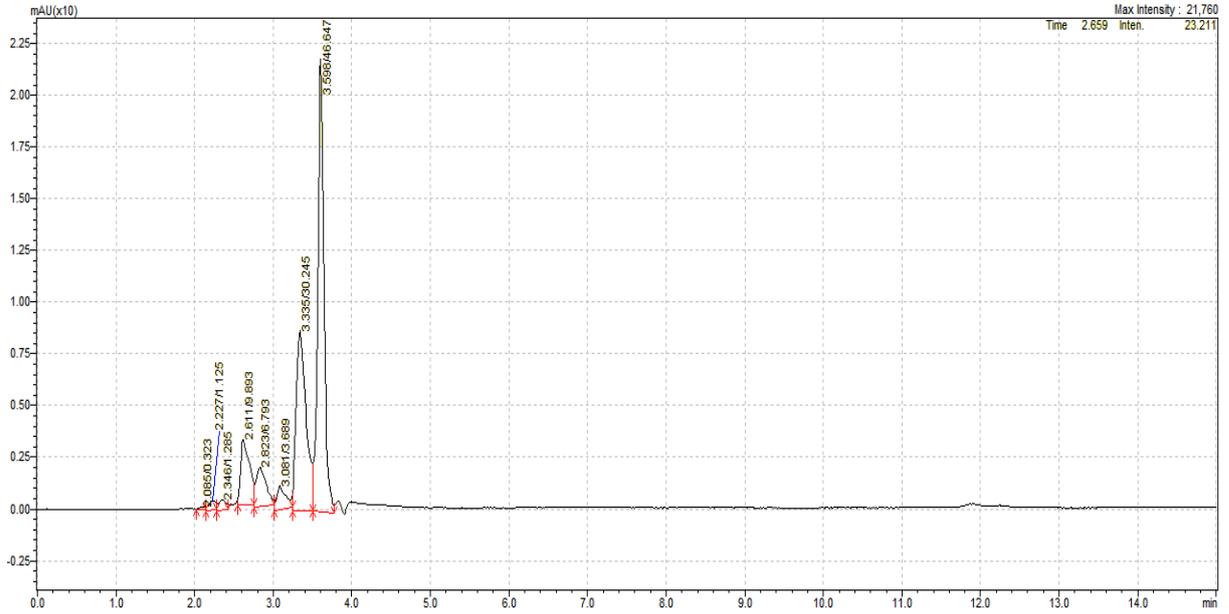
Resultados do screening virtual de alguns depsi-peptídeos cinâmicos utilizando a AChE como potencial alvo.

Composto	Score	Composto	Score
SFD4	60.39	SFD9	70.42
SFD5	63.59	SFD10	58.28
SFD6	76.51	SFD45	70.58
SFD7	80.02	Temefós	84.94

Caracterização do extrato larval por HPLC após a exposição das larvas a solução aquosa de DMSO (controle negativo).



Caracterização do extrato larval (EL1) por HPLC após a exposição das larvas a solução do *p*-clorocinamato de etila (**36d**) (50µg/mL).



Caracterização do extrato larval (EL2) por HPLC após a exposição das larvas a solução do *p*-clorocinamato de etila (**36d**) (50µg/mL).

