



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

**O-ALQUILAÇÃO DE UM COMPOSTO FENÓLICO E
ENSAIOS DE TOXICIDADE FRENTE A LARVAS DE
Artemia salina LEACH E TESTE DE ANTIVIDADE
ANTIFÚGICA CONTRA CEPAS DO GÊNERO *Candida*
spp.**

CARLOS EDUARDO RODRIGUES AGUIAR

CUITÉ – PB

2021

CARLOS EDUARDO RODRIGUES AGUIAR

**O-ALQUILAÇÃO DE UM COMPOSTO FENÓLICO E
ENSAIOS DE TOXICIDADE FRENTE A LARVAS DE
Artemia salina LEACH E TESTE DE ANTIVIDADE
ANTIFÚGICA CONTRA CEPAS DO GÊNERO *Candida*
spp.**

Projeto de TCC apresentado à
Coordenação de Bacharelado em
Farmácia do Centro de Educação e
Saúde de Universidade Federal de
Campina Grande – *Campus* Cuité,
como requisito obrigatório da
disciplina de Trabalho de Conclusão
de Curso.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas

*Bolsista de Iniciação Científica do CNPq

CUITÉ - PB

2021

A282o Aguiar, Carlos Eduardo Rodrigues.

O-alquilação de um composto fenólico e ensaios de toxicidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach e teste de atividade antifúngica contra cepas do gênero *Candida* spp. / Carlos Eduardo Rodrigues Aguiar. - Cuité, 2021.

48 fl. Il.: color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2021.

"Orientação: Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas".

Referências.

1. Atividade antifúngica. 2. Composto fenólico. 3. *Artemia salina* Leach. 4. *Candida* spp. 5. O-alquilação. 6. Medicamentos-produtos naturais. 7. Bioensaio toxicológico. I. Freitas, Juliano Carlo Rufino de. II. Título.

CDU 635.8(043)

CARLOS EDUARDO RODRIGUES AGUIAR

**O-ALQUILAÇÃO DE UM COMPOSTO FENÓLICO E
ENSAIOS DE TOXICIDADE FRENTE A LARVAS DE
Artemia salina LEACH E TESTE DE ANTIVIDADE
ANTIFÚGICA CONTRA CEPAS DO GÊNERO *Candida*
spp.**

Aprovado em 14/ 05 / 2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas
Orientador - UFCG/CES/UABQ

Prof.^a Dra. Maria Emília da Silva Menezes
Examinadora I - UFCG/CES/ UAS

Prof.^a Dra. Josefa Aqueline da Cunha Lima
Examinadora II – UFRPE/DQ

CUITÉ – PB

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me fazer perseverar ao longo de minha vida, tanto pessoal e acadêmica, me dando determinação e força para não desanimar durante este período.

Aos meus pais, Celeide Rodrigues e Everaldo Aguiar que sempre estiveram comigo e por maior que fossem as dificuldades, nunca mediram esforços para me ajudar a supera-las. Eles são meu porto seguro, minha inspiração de ser humano, minha vida, meu orgulho e meu tudo. Com eles aprendi a ser quem sou, muito obrigado mãe e pai, amo vocês.

Aos meus irmãos, Carlos Alan Aguiar e Rayla Larissa Aguiar por me apoiarem em toda minha vida, cujo esses tenho um amor infinito.

A minha tia, Claudia Albuquerque que sempre me incentivou, apoiou e me deu suporte, para enfrentar todas as adversidades da vida.

Aos meus grandes amigos de Cuité, Amanda Batista, Beatriz Azevedo, Talita de Alencar, Paula Gabriela, Fernanda Iranir, Othon Lucena, Maria Jaíne Dantas, Maria Jamilly Caetano, Ana Aparecida de Oliveira, Iarley Kaynã, Nilton Sousa, Laura Romeu, Suzana Queiroz, Danielle Barreto, Isla Araújo, Antonio Raimundo, Janine Siqueira, Bruna Barbosa e Yasmim Alves. Todos estes com suas peculiaridades foram fundamentais para minha estadia na universidade, me trazendo alegrias, conforto, força e muitas outras coisas boas. Sou muito grato por ter vocês em minha vida.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório de Síntese Orgânica, Cosme Silva, Romário Jonas, Jadson Farias e Tatiana Almeida, os quais me ensinaram e me ajudaram em minha pesquisa e me divertiram em momentos tensos.

Ao meu orientador, Dr. Juliano Carlo Rufino Freitas, por toda paciência, dedicação, orientação e empatia comigo.

A banca examinadora, Dra. Maria Emília da Silva Menezes e a Dra. Josefa Aqueline da Cunha Lima, por aceitarem o convite para participar do presente trabalho e pelas valiosas contribuições, que visam enriquecer ainda mais este trabalho.

Ao Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos, durante a graduação, que foram necessárias na minha formação profissional.

A todo corpo docente e outros profissionais da UFCG que fizeram parte da minha história na universidade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

RESUMO

O setor farmacêutico dispõe de um arsenal de medicamentos utilizados no tratamento de várias doenças. Porém, alguns desses medicamentos apenas aliviam os sintomas, apresentam alto custo e efeitos colaterais. Uma alternativa é a utilização de produtos naturais. E uma classe de produtos naturais que vem chamando a atenção de vários grupos de pesquisa, devido a sua abundância na natureza e variadas ações farmacológicas, são os compostos fenólicos. Diante disso, faz-se necessário avaliar a toxicidade e atividade desses compostos fenólicos através do bioensaio toxicológico com larvas de *Artemia salina*, visando uma aplicação contra espécies patogênicas de fungos. Esta preocupação é devido ao crescimento dos casos de infecções causadas no mundo associada à elevada resistência de alguns fungos frente à ação de alguns antifúngicos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi estudar as condições reacionais da reação de alquilação de um composto fenólico, além de realizar bioensaios toxicológicos desses compostos frente a larvas de *A. salina* e avaliar sua atividade antifúngica. Foi utilizada a reação de *O*-alquilação, na qual foram usados os compostos 1a e 1b como agentes alquilantes levando a formação de 2 derivados do composto fenólico, que foram purificados e caracterizados por técnicas espectroscópicas. Em seguida, foi realizado o bioensaio toxicológico frente a larvas de *A. salina* visando encontrar a CL₅₀. E com relação aos ensaios de atividade antifúngica foi feito pela técnica de microdiluição em poços, o qual teve objetivo de determinar a CIM frente a fungos do gênero *Candida* spp. Ao final das reações os compostos foram obtidos em bons rendimentos, que variaram de 85 a 95 % e os dados espectroscópicos corroboram a obtenção desses compostos. As CL₅₀ foram inferiores a 100 µg/mL, apresentando elevada toxicidade. Os testes de atividade antifúngica, revelaram que os compostos apresentam atividade antifúngica contra algumas cepas do gênero *Candida* spp., em especial o composto 3a. Com isso, é notória a importância de mais estudos que visem dar continuidade à descoberta das atividades que estas moléculas e seus derivados possam vir expressar, afim da busca de novos candidatos a fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos Fenólicos, *Artemia salina*, *Candida* spp., Atividade Antifúngica, *O*-Alquilação

ABSTRACT

The pharmaceutical industry has an arsenal of drugs used in the treatment of various diseases. However, some of these drugs only relieve symptoms, have high costs and side effects. One alternative is the use of natural products. And a class of natural products that has been drawing the attention of several research groups, due to its abundance in nature and varied pharmacological actions, are the phenolic compounds. Therefore, it is necessary to evaluate the toxicity and activity of these phenolic compounds through toxicological bioassay with *Artemia salina* larvae, aiming an application against pathogenic fungal species. This concern is due to the growth of the cases of infections caused in the world associated with the high resistance of some fungi against the action of some antifungal drugs. Therefore, the objective of the present work was to study the reaction conditions of the alkylation reaction of a phenolic compound, besides carrying out toxicological bioassays of these compounds against *A. salina* larvae and to evaluate its antifungal activity. The O-alkylation reaction was used, in which compounds 1a and 1b were used as alkylating agents leading to the formation of 2 derivatives of the phenolic compound, which were purified and characterized by spectroscopic techniques. Then, the toxicological bioassay was performed against *A. salina* larvae aiming to find the LC50. The antifungal activity assays were done by the microdilution technique in wells, which aimed to determine the MIC against fungi of the genus *Candida* spp. At the end of the reactions the compounds were obtained in good yields, ranging from 85 to 95% and the spectroscopic data corroborate the obtaining of these compounds. The LC50 were less than 100 µg/mL, showing high toxicity. The antifungal activity tests revealed that the compounds present antifungal activity against some strains of the *Candida* spp. genus, especially compound 3a. Thus, it is notorious the importance of further studies that aim to continue the discovery of the activities that these molecules and their derivatives may express, in order to search for new drug candidates.

KEY WORDS: Phenolic compounds, *Artemia salina*, *Cadida* spp., Antifungal activity, O-alkylation

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estruturas moleculares de substâncias naturais que se consagraram princípios ativos.....	19
Figura 02: Salicilatos que revolucionaram o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais.....	20
Figura 03: Estrutura molecular de um fenol	21
Figura 04: Exemplos de compostos fenólicos.	21
Figura 05: Imagem do náuplio de <i>A. salina</i> LEACH.	24
Figura 06: Medidor de pH PHTEK model: Phs-3B	30
Figura 07: Placa com 96 poços.	31
Figura 08: Teste do complexo fenol-ferro.....	33
Figura 09: Espectro de RMN ¹ H do composto 3a.	34
Figura 10: Espectro de RMN ¹³ C do composto 3a.	35
Figura 11: Espectro de RMN ¹ H do composto 3b.	36
Figura 12: Espectro de RMN ¹³ C do composto 3b.	36

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Biossíntese dos compostos fenólicos.....	22
Esquema 02: Reação de alquilação do composto fenólico.	28
Esquema 03: Síntese do obovatol.....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Tipos de fungos e sua classificação ATCC.	30
Quadro 02: Parâmetros analisados dos produtos finais.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Valores de CL ₅₀ dos compostos.	37
Tabela 02: Valores de CIM dados em µg/mL.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
®	Medicamento de referência
°C	Temperatura em Celsius
a.C.	Antes de Cristo
AAS	Ácido Acetilssalicílico
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CDS	Caldo Sabouraud Dextrose
CIM	Concentração inibitória mínima
CL₅₀	Concentração letal que mata 50% dos indivíduos
cm	Centímetros
DMSO	Dimetil sulfóxido
FDA	Food And Drug
Fe (III)	Ferro ³⁺
FeCl₃	Tricloreto férrico
g	Gramas
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Hz	Hertz
K₂CO₃	Carbonato de potássio
K₂Cr₂O₇	Dicromato de potássio
L	Litros
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
mmols	Milimols
NaOH	Hidróxido de sódio
NCEs	New Chemical Entities
NH₄Cl	Cloreto de amônio
ppm	Parte por milhão

RMN¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
spp.	Espécies
t. a.	Temperatura ambiente
TMS	Trimetilsilano
UFC/mL	Unidade formadora de colônias por mililitros
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
σ	Sigma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	Produto Naturais	18
3.2	Compostos Fenólicos	21
3.3	<i>Artemia salina</i> LEACH	23
3.4	<i>Candida</i> spp.	25
4	MATERIAIS E MÉTODO	27
4.1	Local da pesquisa	27
4.2	Modificação estrutural	27
4.3	Teste do complexo fenol-ferro	28
4.4	Caracterização	28
4.5	Bioensaios toxicológicos com <i>Artemia salina</i> Leach	29
4.6	Ensaio de atividade antifúngica	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O setor farmacêutico dispõe de um enorme arsenal de medicamentos utilizados no tratamento de praticamente todas as doenças conhecidas. No entanto, na maioria dos casos, esses medicamentos apenas aliviam os sintomas da doença. Associado a isso, o elevado custo de alguns medicamentos inviabiliza o seu acesso, bem como os efeitos colaterais indesejados (NGUYEN *et al.*, 2019).

Uma alternativa para esses pontos salientados, é o emprego de produtos naturais. O uso de plantas no tratamento de enfermidades se tornou bastante comum, resultando no acúmulo milenar de conhecimentos empíricos sobre o potencial terapêutico e a toxicidade das plantas, através de sucessivas gerações, sendo uma prática generalizada na medicina popular em todas as culturas desde as civilizações mais imemórias (MENDES *et al.*, 2018; JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

Com o avanço da tecnologia, aprimorou-se a pesquisa na área de produtos naturais bioativos, permitindo identificar novos compostos, caracterizar quimicamente essas substâncias, desvendar mecanismos de ação, como também propõe novas estruturas moleculares para serem utilizadas como modelos para novos fármacos (JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BERLINCK *et al.*, 2017; JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

Dessa forma o desenvolvimento dos fármacos se divide em três períodos. O primeiro compreende os séculos XVIII e XIX, marcado pela descoberta de substâncias presentes em diferentes plantas, a citar, a morfina isolada da *Papaver somniferum* em 1804, a qual apresenta ação analgésica e sedativa (ANDRADE; KÜMMERLE; GUIDO, 2018). O segundo período, compreende o começo e meio do século XX, o qual teve como marco o descobrimento de antibiótico a partir de fungos, a citar a penicilina isolada do *Penicillium notatum* em 1928 (PEREIRA; PITA, 2005). Já o terceiro período ocorreu no final do século XX e se estende até os dias atuais, o qual retorna a busca de substâncias vegetais e desenvolvimento de novos fármacos com base na química sintética, como exemplo a artemisinina um antimalárico extraído da *Artemisia annua* (HUSSAIN *et al.*, 2017).

O mercado para produtos farmacêuticos oriundos de plantas medicinais, tem como enfoque a identificação de princípios ativos e sua utilização para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos (BALDISSERA *et al.*, 2014). Além disso, com aumento no número de doenças, a atenção de muitos pesquisadores vem sendo direcionada ao estudo de fitoquímicos, na busca de novos fármacos, como exemplo os compostos fenólicos, abundantes na natureza e amplamente estudados (ARNOSO; COSTA; SCHMIDT, 2019).

No geral, essa classe apresentam um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). E estes são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, que atuam impedindo a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios. Além disso, sua ação antioxidante está relacionada a outras ações farmacológicas como a prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, anticancerígenas, anti-inflamatória e entre outras mais (SILVA *et al.*, 2010).

Dessa forma, as modificações estruturais em produtos naturais vêm tornando-se uma das principais ferramentas na prospecção de novos candidatos a fármacos, bem como na otimização das atividades, mecanismo de ação, melhorias nas propriedades físico-químicas e diminuição dos efeitos adversos, de forma a propiciar melhor absorção, distribuição, biodisponibilidade e metabolismo. Esses atributos são de extrema importância no desenvolvimento de um novo medicamento (RAUTIO *et al.*, 2018).

Esses aspectos salientados, justificam o interesse da comunidade acadêmica pelos produtos naturais e seus respectivos derivados, uma vez que são potenciais candidatos a novos agentes terapêuticos (BENDRE *et al.* 2016). No entanto, o processo de desenvolvimento de fármacos é longo e requer diversas etapas a citar ensaios biológicos, bem como os toxicológicos. Os quais tem como objetivo avaliar a toxicidade desses produtos naturais ou de seus derivados, a citar o bioensaio toxicológico com larvas de *Artemia salina* (*A. salina*).

A *A. salina*, é um microcrustáceo zooplanctônico que podem ser utilizados no monitoramento da citotoxicidade de produtos, devido a semelhança estrutural com células humanas, além de ser um método barato, rápido, simples e sensível a substâncias tóxicas (MERINO *et al.*, 2015).

Meyer e colaboradores, em 1982, utilizaram as larvas de artêmias em ensaios de toxicidade aguda para uma pesquisa preliminar de atividade biológica de extratos e frações obtidos a partir de produtos naturais.

Paralelamente, nos últimos anos, os principais órgãos reguladores de doenças infecciosas no mundo vêm constatando o aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos comerciais. Embora a resistência aos antifúngicos não pareça ser tão problemática do ponto de vista epidemiológico, quando comparada a resistência aos agentes antibacterianos nas bactérias, é uma preocupação a longo prazo, já que o número de tipos fundamentalmente diferentes de agentes antifúngicos disponíveis para tratamento continua a ser extremamente limitado. Isto porque os fungos são organismos eucarióticos com uma estrutura e um metabolismo semelhantes aos outros hospedeiros eucarióticos (KIM *et al.*, 2008). Além disso, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência frente à ação de alguns antifúngicos convencionais (KIM *et al.*, 2008; GUERRA *et al.*, 2018; ALI; ABDALLAH, 2020).

Nos últimos anos, infecções causadas por fungos vêm crescendo de forma significativa, acometendo principalmente, indivíduos que estão imunocomprometidos, como pacientes transplantados e portadores do vírus HIV (PILMIS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018; GUERRA *et al.*, 2018). Sendo considerados, atualmente, um problema de saúde pública devido à alta prevalência e aumento da incidência nas últimas décadas (FARJADO *et al.*, 2017). Dentre esses fungos, cabe destacar, fungos do gênero *Candida* spp., que são os principais responsáveis pelas infecções hospitalares, de origem fúngica, e representam de 50 a 70% das infecções fúngicas sistêmicas (SANTOS *et al.*, 2018). Por essas razões, a busca por novos antifúngicos é tão importante (GUERRA *et al.*, 2018).

Cientes da importância dos compostos fenólicos, o presente trabalho visa estudar as condições reacionais da reação de alquilação de um composto fenólico, além de realizar bioensaios toxicológicos dos compostos obtidos frente a larvas *A. salina* LEACH e avaliar a atividade antifúngica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar modificações estruturais em um composto fenólico, por meio da reação de *O*-alquilação e avaliar sua toxicidade frente a larvas *Artemia salina* Leach e identificar seu potencial antifúngico.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a reação de *O*-alquilação do composto fenólico utilizando dois ésteres;
- ✓ Caracterizar os compostos sintetizados pelas técnicas espectroscópicas usuais, por Ressonância Magnética de Próton e Carbono (RMN ¹H e RMN ¹³C)
- ✓ Avaliar a toxicidade dos compostos sintetizados frente a larvas de *A. salina* Leach;
- ✓ Determinar a CL₅₀ dos compostos sintetizados
- ✓ Avaliar a atividade antifúngica dos compostos sintetizados frente a cepas de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*;
- ✓ Determinar a CIM dos compostos sintetizados.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Produto Naturais

A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de componentes da planta, tem sido uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais (RIBEIRO, 2018). Os primeiros registros da utilização de plantas como fontes medicinais, datam de 2600 a.C., na Mesopotâmia, visando a alimentação, abrigo, e tratamentos medicinais (GURIB-FAKIM, 2006).

As plantas medicinais constituem a base do sofisticado sistema da medicina tradicional, o qual existe há milhares de anos, e ainda, nos dias atuais, fornecem novos compostos que podem ser utilizados como possíveis fármacos no tratamento de doenças (GURIB-FAKIM, 2006).

Muitos dos fármacos comercializados possuem derivação fitoterápica, ou seja, se baseia na premissa de que as plantas contêm substâncias naturais que auxiliam na manutenção da saúde, bem como na cura de patologias. Dessa forma, os produtos naturais são uma fonte rica e bastante explorada na busca por novos agentes terapêuticos, tais como as ervas medicinais, tradicionais e as sintéticas, além disso, e ainda são o principal sistema de cuidados da saúde, por terem a sua eficácia farmacologicamente comprovada (PONUGOTI, 2018).

Dessa forma, os primeiros registros com bases científica, sobre o estudo de plantas medicinais foi feito no século XIX. Desde então algumas substâncias se consagraram ativos eficazes, até os dias atuais, como exemplo a morfina, a cânfora, a quinina e a cocaína (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Contudo, devido à ampla diversidade estrutural e funcional dos produtos naturais, muitos compostos de origem natural são usados como princípio ativo no tratamento de diversas enfermidades. Durante anos, a maioria dos fármacos disponíveis no mercado eram produtos naturais ou mesmo análogos inspirados neles, contudo, a necessidade de novos fármacos estimulou pesquisadores à realizarem modificações estruturais em produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013).

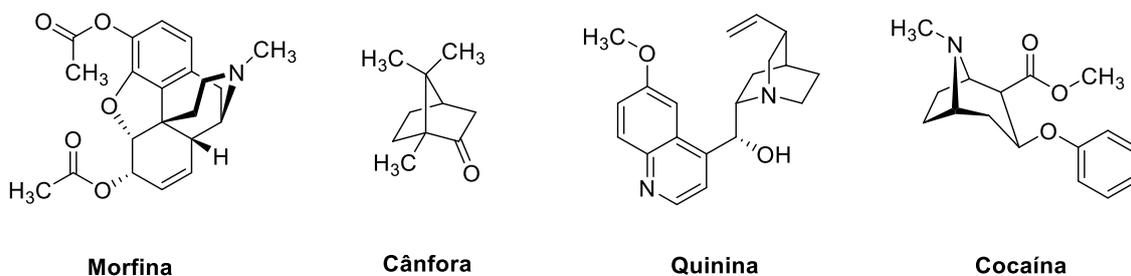


Figura 01: Estruturas moleculares de substâncias naturais que se consagraram princípios ativos.

Fonte: Próprio autor, 2021.

Cabe destacar, que apenas em 2006, um quarto das prescrições médicas formuladas foram baseadas em substâncias ou análogos sintéticos derivados de plantas, mostrando a enorme influência que esse tipo de fonte promove. Com os avanços tecnológicos foi possível compreender mais sobre o funcionamento do

organismo humano, e, portanto, elucidar os mecanismos de ação das plantas (GURIB-FAKIM, 2006).

Nos últimos anos, inúmeras evidências foram coletadas sobre o potencial das plantas medicinais, bem como foi possível isolar princípios ativos, caracterizar quimicamente as substâncias e desvendar o mecanismo de ação das mesmas, além de ser possível produzir novos derivados, através da química sintética (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018; JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos, ocorreu no primeiro período, a partir de produtos naturais, tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos da *Salix alba*, que apresentavam, principalmente, propriedades analgésica e antipirética. Esse fato culminou, alguns anos depois, no isolamento e na preparação de três moléculas com as atividades intensificadas, sendo elas a salicina, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico (AAS), mostrado na figura 02 (SILVA; MENDONÇA; PARTATA, 2014). O AAS foi sintetizado em 1897 por Felix Hoffman, tendo como precursor o ácido salicílico, esse foi lançado no mercado com o nome de Aspirina® pela empresa alemã Bayer e possui atividade analgésica e anti-inflamatória (JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).



Figura 02: Salicilatos que revolucionaram o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais.

Fonte: Próprio autor, 2021.

Vale destacar que o estudo fitoquímico tem permitido a descoberta de novos princípios ativos e, atividades biológicas de extratos, frações e moléculas, oferecendo melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse

terapêutico. No período entre 1981 e 2010, das 1.073 novas entidades químicas (*New Chemical Entities* - NCEs) aprovadas como medicamento pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, 64% são moléculas naturais, derivadas ou sintetizadas com base em compostos naturais (SILVA *et al.*, 2016).

3.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são biomoléculas que possuem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel benzênico. A figura 03 mostra a estrutura de um fenol simples, e embora contenha uma hidroxila, esta classe de compostos possui propriedades especiais, são compostos mais ácidos quando comparado aos álcoois, o que justifica sua atividade antioxidante acentuada (ARCHELA; DALL'ANTONIA, 2013).

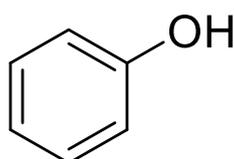


Figura 03: Estrutura molecular de um fenol

Fonte: Próprio autor, 2021.

Os compostos fenólicos vegetais são classificados como fenóis simples ou polifenóis com base no número de unidades de fenol na molécula. Assim, os fenóis vegetais compreendem os fenóis simples, cumarinas, ligninas, lignanos, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides, na figura 04 ilustra a estrutura de alguns compostos fenólicos (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

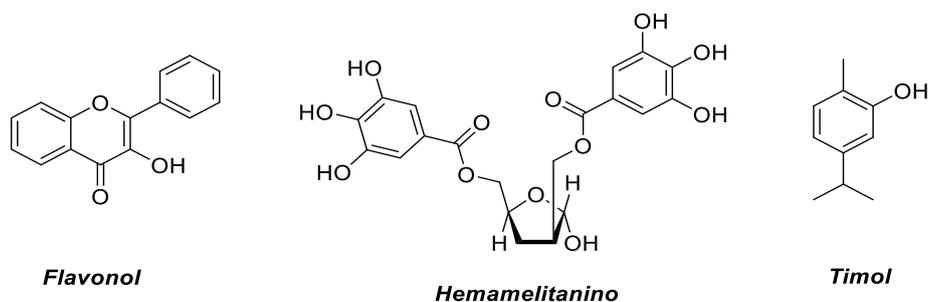
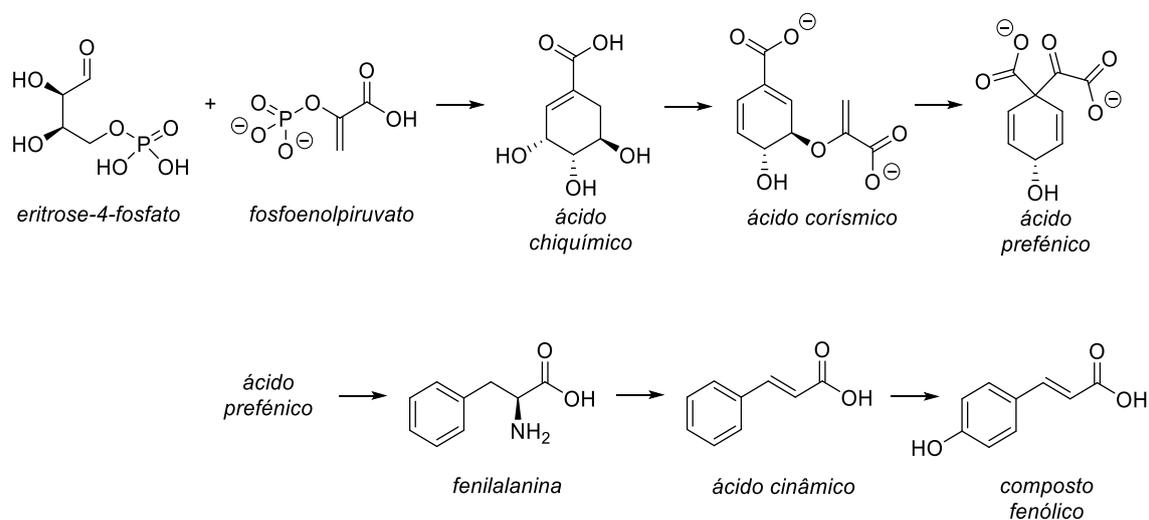


Figura 04: Exemplos de compostos fenólicos.

Fonte: Próprio autor, 2021.

Os compostos fenólicos, são moléculas provenientes do metabolismo secundário das plantas, em parte, como resposta às pressões ecológicas e fisiológicas, tais como ataque de patógenos e insetos, radiação UV, ferimentos e outras condições adversas (ARNOSO; COSTA; SCHMIDT, 2019; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). São produzidos principalmente a partir da via do ácido chiquímico de plantas (esquema 01), além da via do fosfato pentose e através da metabolização de fenilpropanóides (LIN *et al.*, 2016; REZENDE *et al.*, 2016).



Esquema 01: Biossíntese dos compostos fenólicos.

Fonte: Adaptado de Rezende et al. (2016), 2021.

Já foram identificados milhares de compostos fenólicos em plantas, e centenas desses compostos são encontrados em plantas comestíveis. Além disso esses compostos estão disponíveis em uma ampla variedade de frutas, como limão, laranja, tangerina, uva, cereja, ameixa, pera e tomate (ANGELO; JORGE, 2007). A composição dos compostos fenólicos nos alimentos de origem vegetal pode variar conforme a região de plantio, tipo de solo, exposição solar, índice pluviométrico, estágio de maturação e variedade do cultivo (MARTINS *et al.*, 2011).

Outras propriedades biológicas foram relatadas para esta classe, a citar proteção contra a aterosclerose, anti-inflamatório (SILVA *et al.*, 2010; SALEEM *et al.*, 2018), anticarcinogênico (SILVA *et al.*, 2010), anti-hipertensivo

(FIGUEIREDO *et al.*, 2017), antimicrobiano e principalmente a atividade antioxidante (AKBAR; KHAN; ALI, 2019).

Sua ação antioxidante está associada ao fato de que os compostos fenólicos atuam interrompendo a cadeia de reação radicalar, reagindo com radicais, doando hidrogênio ou elétrons, para formarem produtos termodinamicamente estáveis ou complexos mais estáveis que o radical livre precursor (SILVA *et al.*, 2010; ARCHELA; DALL'ANTONIA, 2013).

3.3 *Artemia salina* LEACH

Na ciência a toxicologia estuda os desequilíbrios homeostáticos causados por determinadas substâncias em organismos vivos. Os testes de toxicidade são desenvolvidos com o objetivo de identificar ou avaliar os efeitos de substâncias nos sistemas biológicos, certificando-se sobre a toxicidade relativa dessa substância (COSTA *et al.*, 2008).

Um ramo da toxicologia, que estuda a influência de substâncias tóxicas sobre o meio ambiente, é a ecotoxicologia, que consiste na obtenção de dados para as matrizes contaminadas, como exemplos os solos ou a água, através da realização de ensaios laboratoriais, usando espécies padrões ou habitantes do local de estudo, os bioindicadores, ocorrendo assim a caracterização do potencial tóxico de substâncias químicas ou meio contaminado (NIVA, 2019).

Dessa forma, devido ao seu habitat natural e sua sensibilidade, a *A. salina* (figura 05) é um organismo que representa um importante indicador biológico para ambientes com alta concentração de sais (MERINO *et al.*, 2015). Além disso, este é um microcrustáceo capaz de viver em ambientes extremamente salinos e com pouca concentração de oxigênio (RUIZ *et al.*, 2005). E, por serem um organismo muito sensível, são frequentemente utilizadas para ensaios de toxicidade (LIBRALATO *et al.*, 2016).

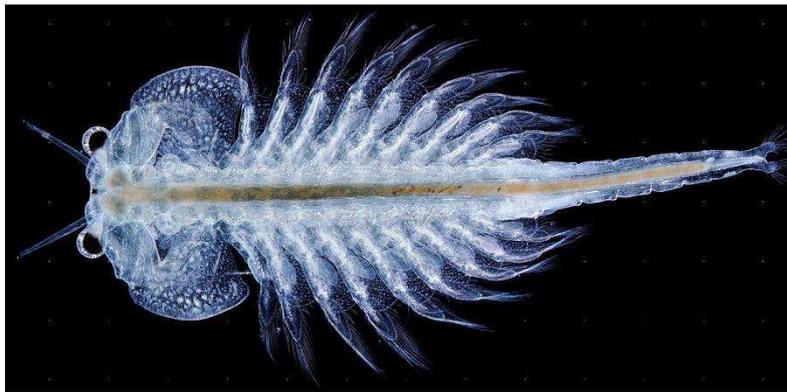


Figura 05: Imagem do náuplio de *A. salina* LEACH.

Fonte: <https://www.dicyt.com/data/44/37244.jpg>

A *A. salina* é um zooplâncton invertebrado de água salgada e ecossistemas marinhos, que desempenham um papel fundamental no fluxo da cadeia alimentar marinha (ZHU *et al.*, 2017). Elas se alimentam principalmente de fitoplâncton, sendo assim importantes consumidores primário da base da cadeia alimentar marinha (LIBRALATO *et al.*, 2016). Estes microcrustáceo, que também é conhecido como camarão salmoura, é pertencente à família *Artemiidae*, da ordem *Anostraca* e do gênero *Artemia* (ASEM; RASTEGAR-POUYANI; RÍOS-ESCALANTE, 2010).

Os náuplios de artêmia têm se destacado pela facilidade de sua produção em laboratório, mostrando-se, assim, ótima alternativa para a alimentação de peixes, na piscicultura, quando fornecida no estágio de larva, além de apresentar tecnologia de cultivo conhecida. Como se trata de organismo de origem marinha, a sobrevivência deste microcrustáceo é drasticamente reduzida quando houver a diminuição da salinidade na água de cultivo (BEUX; FILHO, 2006).

Os cistos de *A. salinas* são de baixo custo e de fácil acesso no comércio, além de permanecerem estáveis e resistentes por meses, quando não eclodidos. Essas vantagens contribuem de forma significativa para a incorporação desses nos bioensaios toxicológicos (PALÁCIO *et al.*, 2012). Ademais, devido ao bioensaio envolvendo a *A. salina* ser utilizado como indicador de toxicidade aguda, este se torna essencial para estudos de substâncias que possam prever uma possível atividade biológica, como em extratos e frações advindos de produtos naturais, sendo essencial para a descoberta de novos fármacos

(POMPILHO; MARCONDES; OLIVEIRA, 2014; LIMA *et al.*, 2019). Esses organismos são utilizados para o monitoramento da citotoxicidade de produtos, devido a semelhança estrutural com células humanas, além de ser um método barato, rápido, simples e sensível a substâncias tóxicas (MEYER *et al.*, 1982).

O parâmetro envolvido no bioensaio é a contagem de náuplios mortos e vivos dos microcrustáceos em contato com o material analisado, os dados obtidos são facilmente tratados e colocados em bases estatísticas (CALVACANTE *et al.*, 2000).

Desse modo, os resultados do teste de *Artemia salina*, obtém-se valores de Concentração Letal necessária para matar 50% dos indivíduos (CL₅₀) inferiores a 100 µg/mL são considerados altamente tóxicas, valores entre 100 e 500 µg/mL são moderadamente tóxicas, entre 500 e 1000 µg/mL são levemente tóxicas e acima de 1000 µg/mL possuem baixa toxicidade ou são atóxicas (MERINO *et al.*, 2015).

Existem relatos na literatura que descrevem a utilização das artêmias para avaliação do efeito citotóxico de vegetais mais especificamente de plantas medicinais (MEYER *et al.*, 1982; Santos, 2017). Esse ensaio é utilizado para detecção de compostos bioativos em extratos vegetais, assim como expressar a sua toxicidade, também é utilizado em teste de letalidade em algas e óleos essenciais, e outros estudos fitoquímico (SANTOS, 2017).

Como exemplo, o experimento realizado por Cansian e colaboradores, em 2017, o qual utilizaram o método de toxicidade frente a *A. salina* para determinar a CL₅₀ do óleo essencial da *Caryophyllus aromaticus* e o resultado obtido foi de $0,5993 \pm 0,0464$ µg/mL, sendo considerado um óleo altamente tóxico.

3.4 *Candida* spp.

Os fungos são microrganismos unicelulares ou pluricelulares e heterótrofos. Dentre eles, cabe destacar o gênero *Candida*, o qual pertence ao reino *Fungi*, filo *Ascomyotota*, classe *Hemiascomycetes*, ordem *Saccharomyces* (DIEZMANN *et al.*, 2014). Estes compreendem mais de 150 espécies, e são

normalmente encontrados vivendo em condições saprófitas, os quais se nutrem de matéria orgânica (YPAR, 2014).

Candida spp. são leveduras comensais, ou seja, que fazem parte da microbiota normal humana, sendo detectado em cerca de 40-60% dos indivíduos saudáveis (PILMS *et al.*, 2016; PAPPAS *et al.*, 2018). Estas espécies de microrganismos são consideradas patógenos oportunistas, por serem uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo e, portanto, representam uma séria ameaça à saúde pública (SANTOS *et al.*, 2018).

Dentre as espécies, as consideradas mais prevalentes, nas infecções causadas pelo gênero *Candida* spp., são a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. auris*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (SANTOS *et al.*, 2018; MBA; NWEZE, 2020). Entre essas, a *C. albicans* é responsável por cerca de 50% das infecções causadas por este gênero (MBA; NWEZE, 2020).

A patogenicidade destes fungos está relacionada, principalmente com a sua mudança entre a forma de levedura e hifas, também chamada de polimorfismo (JACOBSEN; HUBE, 2017; ALI; ABDALLAH, 2020). Enquanto a forma de leveduras está associada a disseminação e resistência do fungo, a forma de hifas está envolvida na invasão de tecidos (SEMAN *et al.*, 2018).

Além do polimorfismo, existe também outros mecanismos de patogenicidade, a cita aderência, variabilidade fenotípica e a produção de enzimas extracelulares, toxinas e biofilme, estes constituem os principais fatores de virulência que conferem a habilidade de colonizar e posteriormente causar a infecção. A infecção, ela é facilitada, quando há uma ruptura do equilíbrio hospedeiro-parasita (SANTANA *et al.*, 2013; ALI; ABDALLAH, 2020).

As manifestações clínicas na candidíase apresentam grande diversidade de quadros clínicos, a citar a candidíase cutâneo-mucosa e candidíase invasiva ou sistêmica. Enquanto a candidíase cutâneo-mucosa consiste em manifestações superficiais, a candidíase invasiva ou sistêmica se caracteriza por apresentar infecções profundas, podendo se localizar em um órgão ou disseminar pela corrente sanguínea, ou seja, a candidemia (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Ao decorrer da última década, houve uma mudança na epidemiologia de *Candida* spp., com um aumento de espécies não-*albicans* em pacientes admitidos em UTI's, provavelmente devido ao uso irracional de antifúngico que ocasiona uma resistência dessas cepas a esta classe de fármacos (GABARDI *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2017). Por esta razão, há uma busca por novos agentes antimicrobianos, que sejam eficientes contra estas cepas de fungos (TAVARES *et al.*, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Local da pesquisa

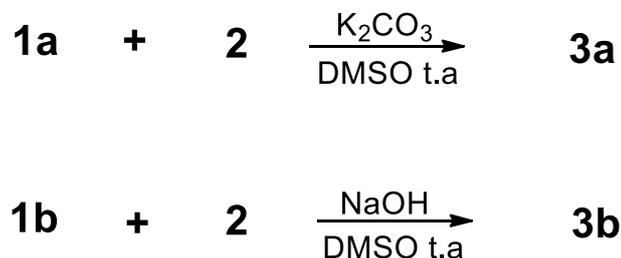
A pesquisa foi realizada no Laboratório de Síntese Orgânica, localizado no Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – *campus* Cuité, enquanto que os bioensaios toxicológicos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, já os ensaios antifúngicos no Laboratório de Microbiologia do CES. A caracterização por ressonância magnética de carbono e hidrogênio, foi realizada na Central Analítica da Universidade Federal de Pernambuco – Recife/PE.

4.2 Modificação estrutural

A reação de alquilação e formação de acetal, foram realizadas com interesse na síntese dos compostos **3a-b**, estas com o substrato **1a** em presença de carbonato de potássio (K_2CO_3) e como o substrato **1b** em presença de hidróxido de sódio (NaOH), entretanto ambos utilizarão dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente, como pode ser observado no Esquema 01.

Para a síntese do composto **3a**, foram pesados 5,0 mmols (0,82g) do substrato **2** e transferidos para um balão de fundo redondo contendo 10 mL de DMSO. Sequentemente adicionou-se ao balão 5,0 mmols (0,691g) de K_2CO_3 em pó. À mistura reacional foram adicionados rapidamente 5,5 mmols (0,92g) de **1a**. A reação foi submetida a agitação, em uma chapa agitadora, à temperatura ambiente durante o tempo requerido, que foi verificado por cromatografia de camada delgada (CCD). Com relação ao composto **3b**, foi-se pesado 5,5 mmol

(1,08g) do substrato **1b** e 8mmol de NaOH (0,32g), e efetuado o mesmo procedimento mencionado anteriormente.



Esquema 02: Reação de alquilação do composto fenólico.

Fonte: Próprio autor, 2021.

Após o termino das reações os produtos foram submetidos a separação de fases, que consiste na separação da fase aquosa da fase orgânica. A mistura reacional foi transferida do balão para um funil de separação e foram adicionados 25 mL de solução supersaturada de cloreto de amônio (NH₄Cl). A fase orgânica foi separada com acetato de etila (3 x 25 mL). Posteriormente à separação, foi adicionado sulfato de sódio anidro na fase orgânica para retirar qualquer resquício de água, e em seguida a mesma fase foi filtrada o solvente foi removido em evaporador rotativo à pressão reduzida para obtenção do produto seco. O produto final foi purificado por cromatografia líquida em coluna de sílica utilizando 15 cm (altura da quantidade da fase estacionária) de sílica-gel 60, eluída com hexano e acetato de etila como solventes da fase móvel. Os solventes utilizados na purificação foram destilados conforme a metodologia de Armarego e Perrin (1996).

4.3 Teste do complexo fenol-ferro

Os compostos **3a-b** foram submetidos ao teste com a solução de tricloreto férrico (FeCl₃) a 1%. A formação do complexo fenol-ferro com o Fe (III), apresenta uma coloração entre vermelho e roxo, portanto, a não observação dessa coloração caracteriza a perca da porção fenólica. O teste seguiu o procedimento descrito por Pazinato e colaboradores (2012).

4.4 Caracterização

Os compostos **3a-b** foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas usuais, ou seja, Ressonância Magnética de Próton e Carbono (RMN ^1H e RMN ^{13}C). A caracterização foi realizada por em um espectrômetro *models Unitty Plus* (400 MHz e 300 MHz) utilizando trimetilsilano (TMS) como padrão interno e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente.

4.5 Bioensaios toxicológicos com *Artemia salina* Leach

A partir da interpretação dos dados da caracterização e respectiva confirmação das estruturas dos produtos objetivados, foi realizado o ensaio biológico dos mesmos frente a *Artemia salina* Leach baseado no estudo de Meyer e colaboradores (1982). Para cada composto testado, utilizarão 20 mg e foi adicionado 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, a solução será homogeneizada e o volume completado para 20 mL com água salinizada filtrada (preparada a partir de 38 g de sal marinho Marinex® em 1 L de água destilada) em pH = 8,32, para isso utilizando o medidor de pH (PHTEK model: Phs-3B), como mostrado na figura 06. Desta solução serão retiradas alíquotas de 125, 250, 500, 750, 1000, 1125 1250 e 1875 μL e transferidas para tubos de ensaios de 5 mL e os volumes completados com o mesmo solvente, o qual obterão as concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 450, 500 e 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a solução da amostra. O teste será acompanhado por controle positivo, com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e controle negativo com água salinizada e DMSO. Os cistos da *Artemia salina* (20 mg) irão ser incubados sob iluminação artificial 24 a 48 horas para que haja a eclosão das larvas e estas serão separadas em dez grupos com 10 artêmias cada. O primeiro e o segundo grupo receberão a solução controle positivo e controle negativo e as oito seguintes receberam a solução aquosa do composto em diferentes concentrações. As amostras serão submetidas à iluminação artificial durante 24 horas. Após este período, se contabilizará as larvas vivas e mortas. O experimento irá ser realizado em triplicata para cada substância-teste.



Figura 06: Medidor de pH PHTEK model: Phs-3B

Fonte: Próprio autor, 2021.

4.6 Ensaios de atividade antifúngica

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi realizado através do método da microdiluição em poços. Serão utilizadas cepas de levedura padrão da American Type Culture Collection (ATCC), o quadro 01 mostra as espécies de fungos e sua ATCC, as culturas de fungos a serem utilizadas do gênero *Candida spp.* e inoculadas em poços com meio caldo Sabouraud Dextrose (CSD). As colônias destas culturas foram suspensas em NaCl 0,85% estéril e o inócuo será padronizado com a escala de McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL) (LIMA *et al.*, 2020).

Espécie de Fungo	Codificação
<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030
<i>C. albicans</i>	ATCC 76485
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 13803

Quadro 01: Tipos de fungos e sua classificação ATCC.

Fonte: Próprio autor, 2021.

Posteriormente, em uma placa com 96 cavidades (figura 07) foram adicionados 150 μ L do CSD e 150 μ L dos compostos **3a-b**, com concentração inicial de 512 μ g/mL após isso, foram retirados 150 μ L da primeira linha para a

segunda linha (1:2) com diluições seriadas sucessivamente, até uma concentração final de 8 µg/mL. Os poços foram incubados a 37 °C por 24 horas. Posterior a esse período, é realizada leitura para a identificação da CIM. A CIM é considerada como a menor concentração dos compostos que inibiu o crescimento dos microrganismos, através das leituras das placas. Foram utilizados anfotericina B e DMSO como controles positivo e negativo respectivamente (OLIVEIRA, 2011; LIMA *et al.*, 2020).

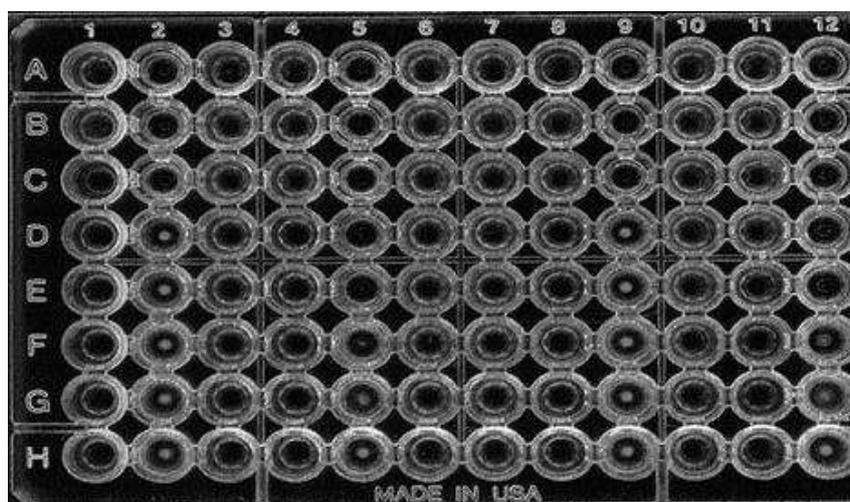


Figura 07: Placa com 96 poços.

Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.1.htm

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Adicionalmente, as estruturas dos compostos 1a-b, 2 e 3a-b não foram esboçadas, pois devido aos bons resultados biológicos, suas atividades foram patenteadas, e deve-se esperar a carência de um período de 18 meses de sigilo.

As reações foram acompanhadas por CCD, a fim de verificar o tempo necessário para o seu término. Concluída a reação, cada produto foi purificado e posteriormente pesado, afim de determinar o rendimento reacional. Os valores do tempo e rendimento reacional estão descritos na Quadro 02.

SUBSTRATO	TEMPO (H)	RENDIMENTOS (%)	ASPECTO FÍSICO
3a	1	86,84	Óleo
3b	1,6	93,16	Óleo

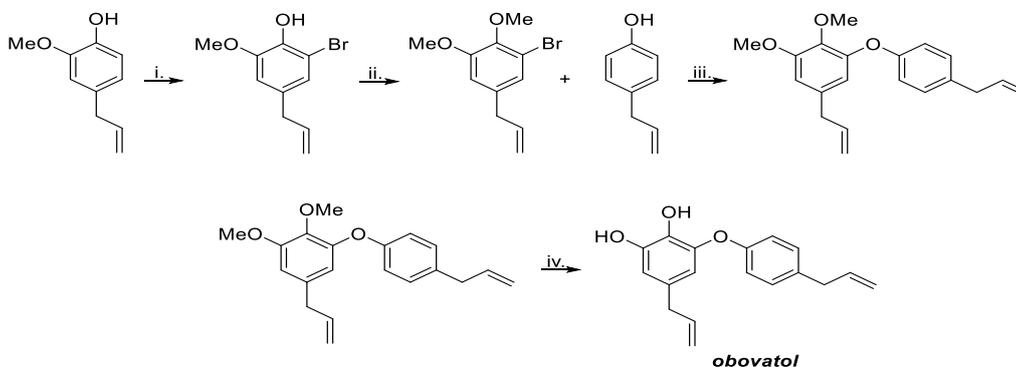
Quadro 02: Parâmetros analisados dos produtos finais.

Fonte: Próprio autor, 2021.

Em 2019, Lima e colaboradores relataram a síntese do composto **3a** utilizando os praticamente os mesmos componentes, com exceção do solvente, no entanto, eles obtiveram um rendimento de apenas 60% após um tempo reacional de 18 horas. Indicando que o tipo de solvente empregado nesta reação afeta diretamente o tempo reacional, uma vez que o tempo obtido em nossa pesquisa foi 18 vezes menor quando comparado ao tempo obtido por Lima e colaboradores (2019).

O obovatol é outro produto fenólico que apresenta atividade farmacológica. Este composto, segundo Choi e colaboradores (2012), foi extraído da *Magnolia sp.*, no entanto, ele pode ser obtido sinteticamente.

Kaufman, em 2015, relatou sua síntese do obovatol em 4 etapas reacionais, a primeira foi a *orto*-bromação seletiva do fenol, a metilação, o acoplado com o *p*-alilfenol e pôr fim a desmetilação, conforme descrito no esquema 03.



Condições reacionais: (i.) etapa 1: *i*-PrMgCl, THF, 30 min, -78 °C; etapa 2: 1,3-dibromo-5,5-dimetil-hidantoína, 3 h, -78 °C (78%); (ii.) MeI, K₂CO₃, DMF, 2 h, t.a. (90%); (iii.) Cs₂CO₃, CuI, cloridrato de *N,N*-dimetilglicina, dioxane, 90 °C, 48 h (75%); (iv.) BBr₃, CH₂Cl₂, 30 min, -78 °C, t.a, 2 h (75%).

Esquema 03: Síntese do obovatol.

Fonte: Adaptado de Kaufman (2015).

Adicionalmente, o obovatol apresenta atividade anti-inflamatória, além de atuar como antitumoral, inibindo o fator de transcrição NF- κ B, em células de câncer de pele (KAUFMAN, 2015).

Com relação ao teste de formação do complexo fenol-ferro, observa-se na figura 08, que as soluções dos compostos **1a** e **1b** mudaram de coloração, ficando no tom de vermelho a roxo, ao entrar em contato com a solução de FeCl_3 . No entanto, as soluções dos compostos **3a** e **3b**, quando expostas a solução de FeCl_3 , não se constatou mudança de coloração, ou seja, não ficaram em tom roxo, sendo isto o primeiro indicativo que a reação de *O*-alquilação levou a formação dos produtos desejados os quais apresentam a ausência da porção fenólica.

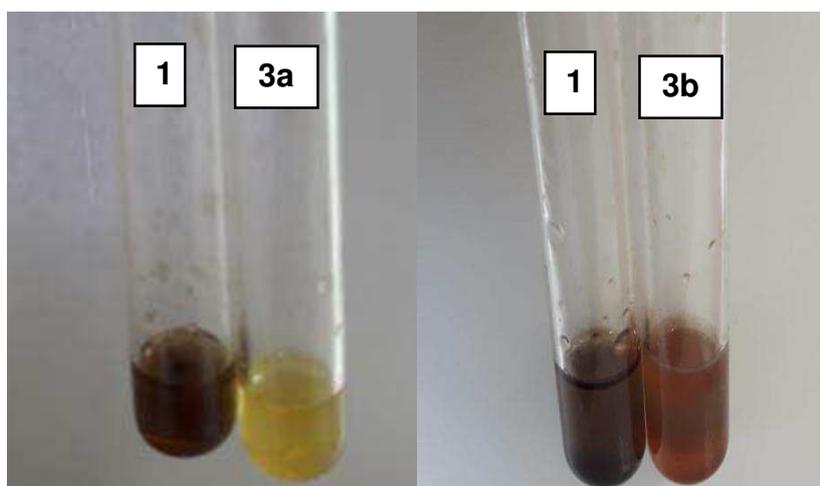


Figura 08: Teste do complexo fenol-ferro.

Fonte: Próprio autor, 2021.

As Figuras 09 e 10 mostram, respectivamente os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3a**, obtido na forma de um óleo parcialmente turvo com rendimento de 86,84%. De acordo com a análise do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3a**, constata-se que o somatório da área das integrais sob cada sinal é aproximado igual a 18, número esse equivalente à quantidade de hidrogênios presente na estrutura desse composto. Detalhadamente, o deslocamento químico de cada conjunto de hidrogênios quimicamente equivalentes foram 1,29 ppm (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 3,34 ppm (d, $J = 7,2$ Hz, 2H),

3,87 ppm (s, 3H), 4,25 ppm (q, J = 7,2 Hz, 2H), 4,65 ppm (s, 2H), 5,05-5,11 ppm (m, 2H), 5,89-6,02 ppm (m, 1H), 6,68-6,80 ppm (m, 3H). Em relação ao espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3a**, constatou-se a presença de 14 sinais de carbonos quimicamente diferentes, número equivalente a estrutura proposta para esse composto. Detalhadamente, o deslocamento químico de cada sinal de carbonos quimicamente diferentes foram 14,1 ppm, 39,8 ppm, 55,8 ppm, 61,1 ppm, 66,8 ppm, 112,5 ppm, 114,6 ppm, 115,7 ppm, 120,3 ppm, 134,4 ppm, 137,4 ppm, 145,6 ppm, 149,6 ppm e 169,1 ppm. Os respectivos dados espectroscópicos corroboram com os valores obtidos por Labarrios e colaboradores (1999), comprovando a formação e pureza do produto desejado.

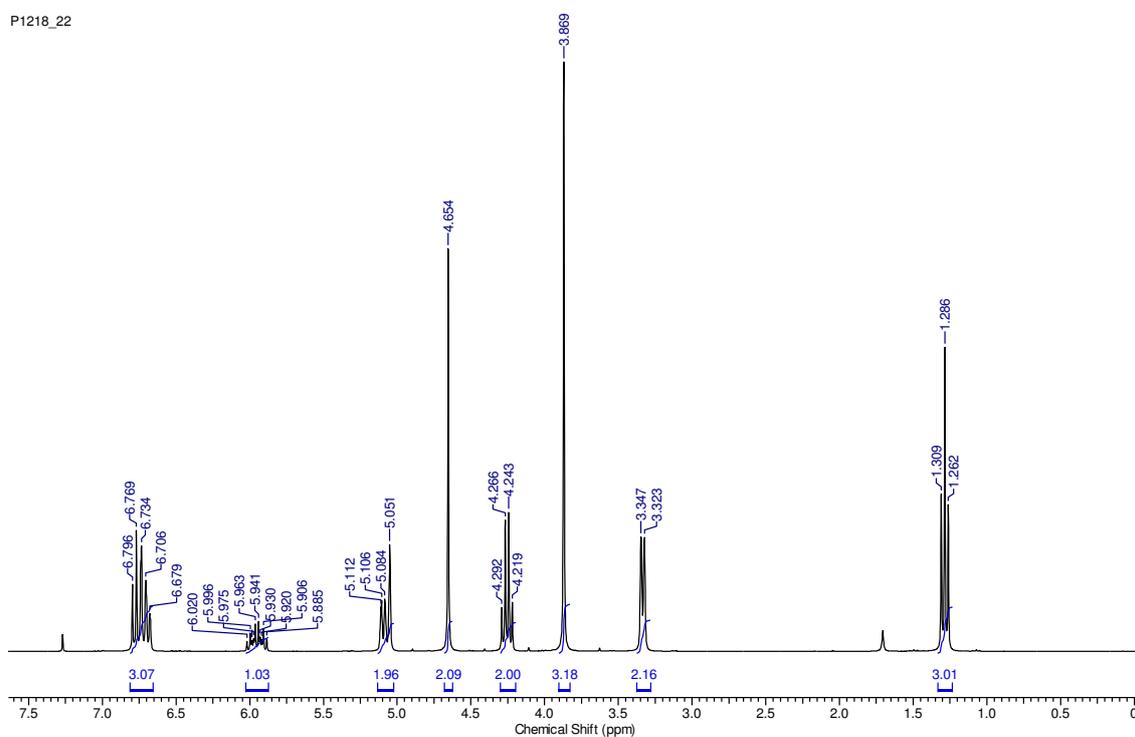


Figura 09: Espectro de RMN ^1H do composto **3a**.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

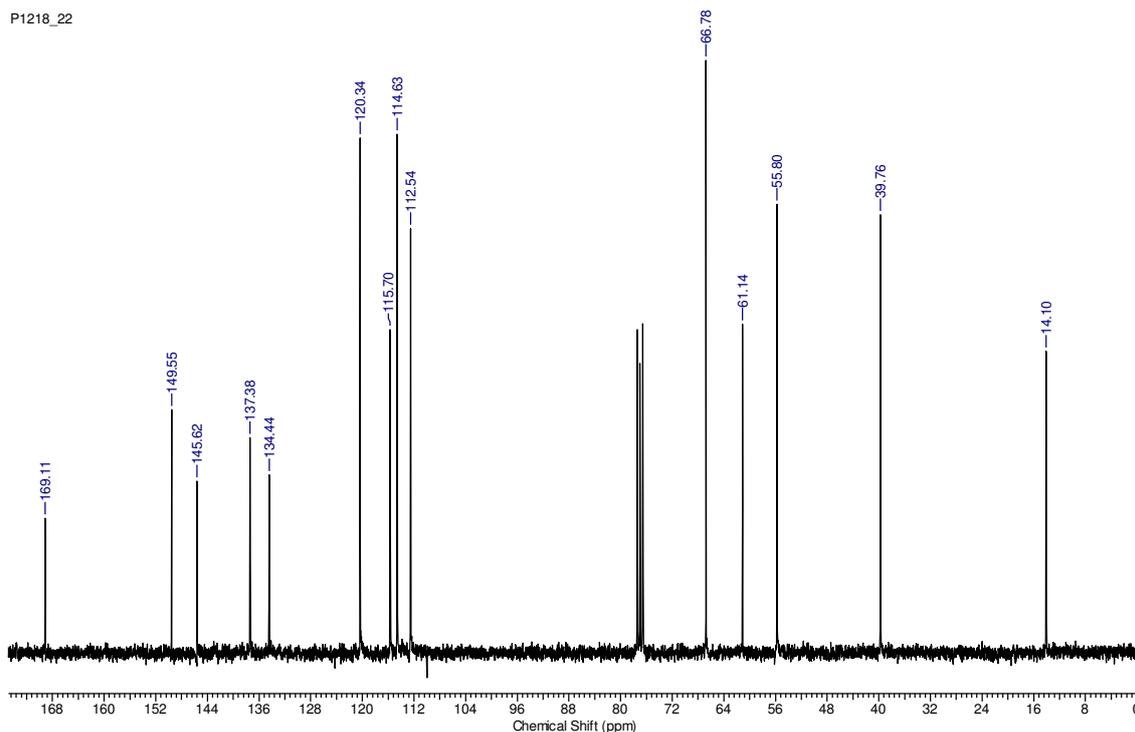


Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C do composto **3a**.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

As Figuras 11 e 12 mostram, respectivamente os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3b**, obtido na forma de um óleo parcialmente turvo amarelado com rendimento de 93,16 %. De acordo com a análise do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3a**, constata-se que o somatório da área das integrais sob cada sinal é aproximado igual a 24, número esse equivalente à quantidade de hidrogênios presente na estrutura desse composto. Em relação ao espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3b**, constatou-se a presença de 13 sinais de carbonos quimicamente diferentes, número equivalente a estrutura proposta para esse composto. Detalhadamente, os deslocamentos químicos de cada sinal de carbonos quimicamente diferentes foram 15,2 ppm, 31,8 ppm, 39,9 ppm, 55,8 ppm, 62,4 ppm, 101,4 ppm, 111,1 ppm, 114,2 ppm, 115,5 ppm, 121,1 ppm, 137,8 ppm, 143,9 ppm e 146,4 ppm.

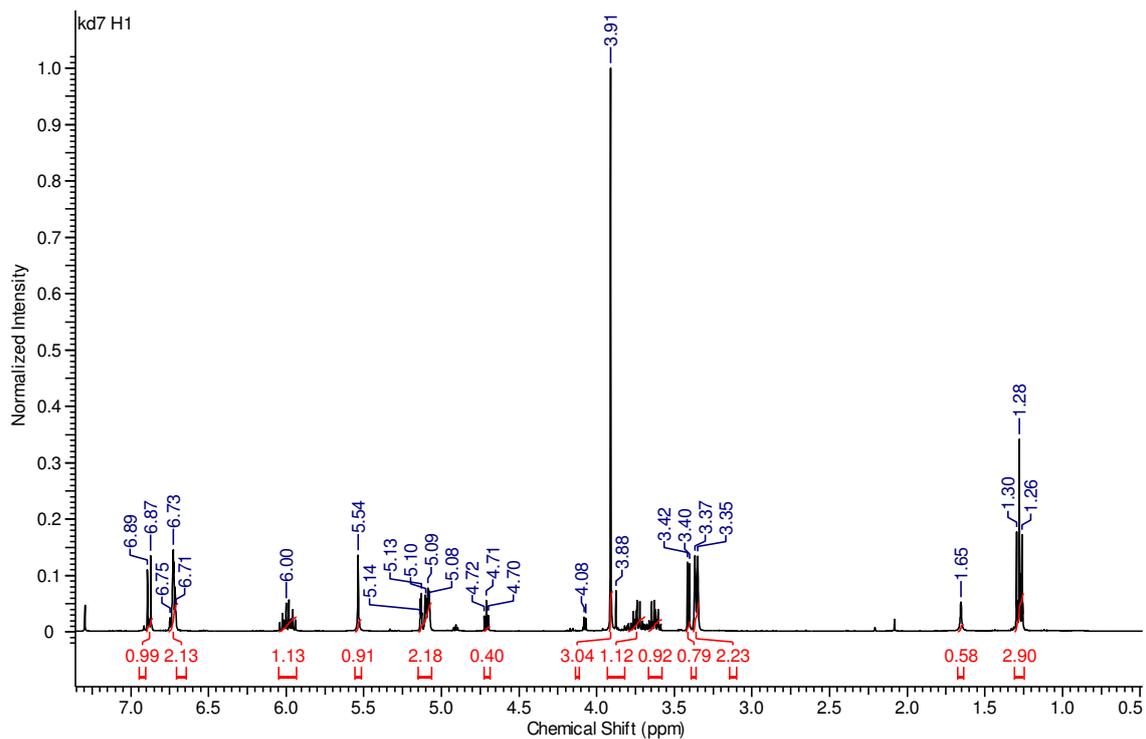


Figura 11: Espectro de RMN ¹H do composto 3b.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

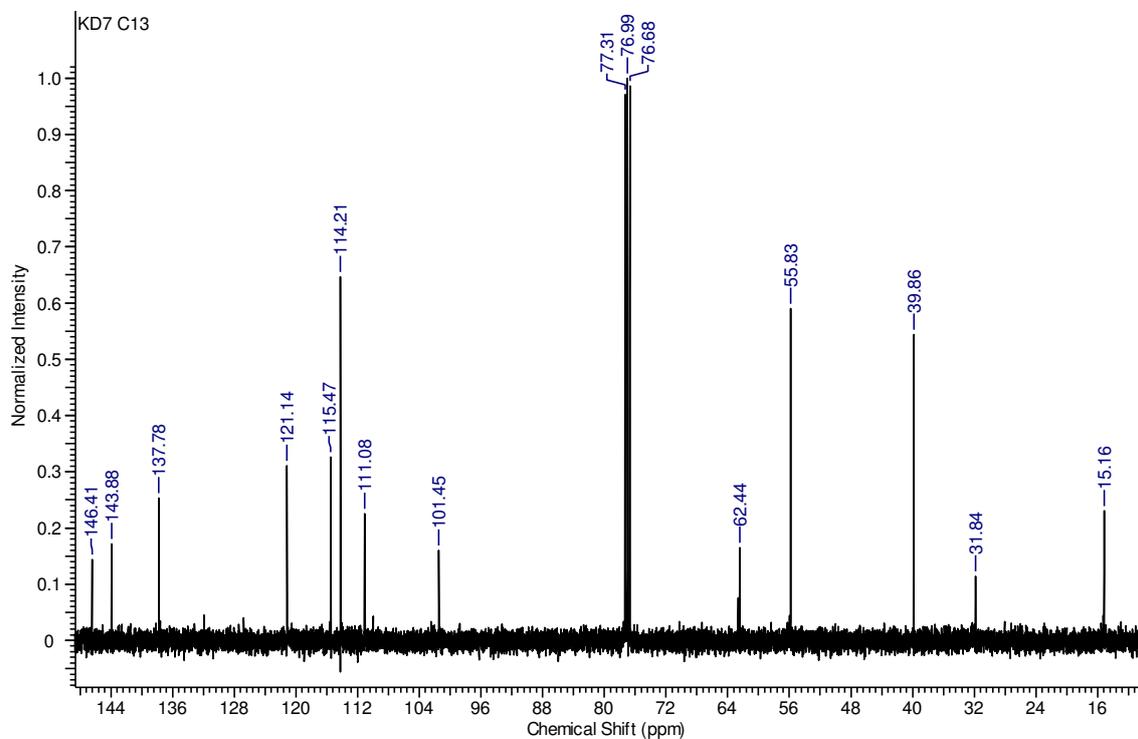


Figura 12: Espectro de RMN ¹³C do composto 3b.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Vale ressaltar que a adição de um grupo alquil foi planejada de modo que a toxicidade dos compostos fosse atenuada, uma vez que na literatura, há histórico de fármacos que possuem uma porção éster, como por exemplo o ácido acetilsalicílico (AAS), que quando comparado ao ácido salicílico, seu precursor que não possui a função éster, é menos tóxico e menos irritante (LIMA *et al.*, 2019).

A avaliação da toxicidade dos compostos foi testada frente a larva de *A. salina* Leach, no qual o valor da taxa de mortalidade das soluções contendo **3a** e **3b** variou entre 0 e 100 %, planejando determinar a concentração letal para matar metade da população de larvas (CL₅₀) conforme a Tabela 01. Deste modo, a CL₅₀ foi encontrada através do *software* POLO-PC, com 95% de confiança. Portanto, de acordo com Merino e colaboradores (2015), valores de CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL são considerados altamente tóxicas e 100-500 µg/mL são ditos como moderadamente tóxicos, mostrando potencial para atividade biológica desses compostos.

COMPOSTOS	CL ₅₀ (µg/mL) ± DP
2	29,5 ± 0,538
3a	54,3 ± 0,831
3b	43,7 ± 0,745

DP: Desvio Padrão.

Tabela 01: Valores de CL₅₀ dos compostos.

Fonte: Próprios autores, 2021.

Dessa forma, é constatado que os dois compostos sintetizados **3a** e **3b** apresentam CL₅₀ inferior a 100 µg/mL, portanto, ambos, sendo considerados tóxicos para as larvas de *A. salina*. E suas CL₅₀ podem ser equiparadas a do seu precursor de 29,5 µg/mL, sendo um indicativo que os compostos possam vir a apresentar atividade.

Leite e colaboradores (2009), também avaliaram a atividade larvicida de alguns óleos essenciais e fitoconstituintes a base de compostos fenólicos, de plantas medicinais. E entre esses fitoconstituintes estava o eugenol, que se constatou que a CL₅₀ é de 47,16 µg/mL, o qual mostrou comportamento tóxico frente as larvas de *A. salina*.

Ribeiro e colaboradores, em 2020, pesquisaram a CL₅₀ do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, cujo o produto majoritário, faz parte dos compostos fenólicos, o ácido tânico. Esses, encontraram uma CL₅₀ de 280,4 µg/mL, desse modo, sendo considerados moderadamente tóxicos. Isto mostra, que os compostos fenólicos apresentam diferentes graus de toxicidade.

por último foi realizado a avaliação da atividade antifúngica dos compostos **3a-b**, realizada através do método de microdiluição em poços frente a cinco espécies do gênero *Candida* spp., a citar, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A seleção desse gênero de fungo foi devido à sua prevalência na epidemiologia de infecções fúngicas hospitalares e comunitárias, principalmente a *C. albicans* (BARBOSA *et al.*, 2017). Portanto, as CIM dos compostos são mostradas na tabela 02.

	3a	3b	Anfotericina
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	512	512	2 (Galle; Gianinn, 2004)
<i>Candida albicans</i> ATCC 76485	64	512	0,5 (Fontenelle <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	32	512	0,5 (Fontenelle <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	32	128	2 (Fontenelle <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	128	512	1 (Fontenelle <i>et al.</i> , 2011)

Tabela 02: Valores de CIM dados em µg/mL.

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Portanto, observou-se que o composto 3a apresentou melhores CIM, em relação ao composto 3b. Cabendo destacar, que se obteve melhores resultados, para 3a, contra as cepas de *C. krusei* e *C. parapsilosis* com uma CIM de 32 µg/mL.

Fontenelle *et al.*, 2011, constataram que os valores de CIM do timol um, composto fenólico presente nos óleos essenciais, frente a cepas de *Candida*, que variaram entre 39 µg/mL, para *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, a 150 µg/mL, para *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

Em estudo realizado por Ahmad e colaboradores, em 2011, os quais relataram a faixa da CIM do timol e do cravacol, ambos produtos fenólicos extraídos de plantas, frente a *Candida albicans*, que são respectivamente, 100-125 mg/L e 75 a 90 mg/L, demonstrando atividade fungicida.

Adicionalmente, as estruturas dos compostos 1a-b, 2 e 3a-b não foram esboçadas, pois devido aos bons resultados biológicos, suas atividades foram patenteadas, e deve-se esperar a carência de um período de 18 meses de sigilo.

6 CONCLUSÃO

A reação *O*-alquilação dos substratos empregados na reação, se mostrou rápida fácil e robusta, apresentando excelentes rendimentos para os compostos. Além do mais, a adição do grupamento alquil, foi planejada, de maneira a diminuir a toxicidade dos compostos segundo a literatura e como revelam os resultados obtidos. De acordo com o teste de formação do complexo fenol-ferro, confirma que todas as reações ocorreram conforme o planejado, ou seja, perdendo a função fenol e ganhando a função éster.

A caracterização do composto 3a alquilado por RMN de ¹H e ¹³C estão de acordo com os dados descritos na literatura. E a caracterização de ambos compostos por RMN de ¹H e ¹³C, estão de acordo com suas estruturas moleculares. Os resultados do teste de toxicidade frente a larvas de *A. salina*, revelou-se que ambos produtos derivados das reações são altamente tóxicos, o que é indicativo de possíveis atividades farmacológicas.

A avaliação da atividade antifúngica revelou que os compostos apresentaram atividade contra espécies do gênero *Candida*, em especial o composto 3a, que só não apresentou atividade contra a *Candida glabrata*, para as demais espécies sua CIM variou de 32 a 128 µg/mL, além desse, o composto 3b apresentou boa atividade apenas contra a espécie *Candida parapsilosis*, com CIM de 128 µg/mL. Essas informações revelam a importância de mais estudos que visem dar continuidade à descoberta das atividades que estas moléculas e seus derivados possam a vir expressar, afim da busca de novos candidatos a fármacos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 30, n. 1, p. 41–50, 2011.

AKBAR, A.; KHAN, S. A.; ALI, I. Functional, antioxidant, antimicrobial potential and food safety applications of curcuma longa and cuminum cyminum. **Pakistan Journal of Botany**. v. 51, n. 3, p. 1129–1135, 2019.

ALI, E. M.; ABDALLAH, B. M. Effective Inhibition of Candidiasis Using an Eco-Friendly Leaf Extract of *Calotropis-gigantea*-Mediated Silver Nanoparticles. **Nanomaterials**. v.10, n. 3, 2020.

ANDRADE, C. H.; KÜMMERLE, A. E.; GUIDO, R. V. C. Perspectivas da química medicinal para o século XXI: desafios e oportunidades. **Química Nova**. v. 41, n. 4, p. 476-483, 2018.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1 p. 232-240, 2007.

ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.

ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. Purification of Laboratory Chemicals: 4^a ed., Oxford: Butterworth-Heinemann, 1996.

ARNOSO, B. J. M.; COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutrição Brasil**. v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.

ASEM, A.; RASTEGAR-POUYANI, N.; RÍOS-ESCALANTE, P. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. **Latin American Journal of Aquatic Research**. v. 38, n. 3, p. 501-506, 2010.

BALDISSERA, M. D.; COPETTI, P. M.; OLIVEIRA, P. S. B.; SAGRILLO, M. R. Efeito genotóxico in vitro do extrato aquoso de *luffa operculata* sobre células mononucleares de sangue periférico. **Disciplinarum Scientia**. v. 15, n. 1, p. 1-10, 2014.

BARBOSA, C. S.; PEREIRA, R. F.; FORTUNA, J. L. Atividade antifúngica do óleo essencial de erva-cidreira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) sobre *Candida albicans*. **Revista Biociências**. v. 23, n. 1, p. 53-60, 2017.

BENDRE, R. S.; RAJPUT, J. D.; BAGUL, S. D.; KARANDIKAR, P. S. Outlooks on medicinal properties of eugenol and its synthetic derivatives. **Natural Products**. v. 4, n. 3, p. 1-6, 2016.

BERLINCK, R. G.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**. v. 40, n. 6, p. 707-710, 2017.

BEUX, L. F.; FILHO, E. Z. The effect of different low salinity levels on *Artemia* sp. nauplii survival. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 32, n. 1, p. 73-77, 2006.

CANSIAN, R. L.; VANIN, A. B.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S. P.; PUTON, B. M. S.; CARDOSO, R. I.; GONÇALVES, I. L.; HONAISSERA, T. C.; PAROUL, N.; OLIVEIRA, D. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**. v. 77, n. 1, p. 155–161, 2017.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* LEACH. **Química Nova**. v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CHOI, D. Y.; LEE, J. W.; LIN, G.; LEE, Y. K.; LEE, Y. H.; CHOI, I. S.; HAN, S. B.; JUNG, J. .; KIM, Y. H.; KIM, K. H.; OH, K. W.; HONG, J. T.; LEE, M. S. Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF- κ B signaling pathway. **Neurochemistry International**. v. 60, n. 1, p. 68-77, 2012.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1820- 1830, 2008.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

DIEZMANN, S.; COX, C. J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R. J.; MITCHELL, T. G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 12, p. 5624—5635, 2004.

FAJARDO, A. D.; SILVA, R. R.; COSTA, A. P. M.; ROSSETTO, A. L.; CRUZ, R. C. B. Estudo epidemiológico das infecções fúngicas superficiais em Itajaí, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 49, n. 4, p. 396-400, 2017.

FIGUEIREDO, E. A. D.; ALVES, N. F. B.; MONTEIRO, M. M. D. O.; CAVALCANTI, C. D. O.; SILVA, T. M. S. D.; SILVA, T. M. G. D.; BRAGA, V. D. A.; OLIVEIRA, E. D. J. Antioxidant and Antihypertensive Effects of a Chemically Defined Fraction of Syrah Red Wine on Spontaneously Hypertensive Rats. **Nutrients**. v. 9, n. 6, p. 1-15, 2017.

FONTENELLE, R. O.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; LIMA, Y. C.; BRASIL, N. V.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Alkylphenol Activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: A Focus on the Antifungal Activity of Thymol, Eugenol and O-Methyl Derivatives. **Molecules**. v. 16, n. 1, p. 6422-6431,2011.

GALLE, L. C.; GIANINN, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 40, n. 4, p. 229-236, 2004.

GABARDI, S.; MARTIN, S.; SUR, M.; MOHAMMED, A.; GOLAN Y. Micafungin treatment and eradication of candiduria among hospitalized patients. **International urology and nephrology**. v. 48, n. 11, p. 1881-1885, 2016.

GUERRA, F. Q. S.; ARAÚJO, R. S. A.; SOUSA, J. P.; SILVA, V. A.; PEREIRA, F. O.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PEREIRA, J. A.; LIMA, E. O. A new coumarin derivative, 4-acetatecoumarin, with antifungal activity and association study against *Aspergillus* spp. **Revista Brasileira de Microbiologia**. v. 49, n. 2, p. 407-413, 2018.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HUSSAIN, A.; HAYAT, M. Q.; SAHREEN, S.; AIN, Q.; BOKHARI, S. A. I. Pharmacological Promises of Genus *Artemisia* (Asteraceae): a Review. **Pakistan Academy of Sciences**. v. 54, n. 4, p. 265-287, 2017.

JACOBSEN, I. D.; HUBE, B. *Candida albicans* morphology: still in focus. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 15, n. 4, p. 327–330, 2017.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmed Pharmacology**. v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

KAUFMAN, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, n. 6, p. 1055-1085, 2015.

KIM, K.-J.; SUNG, W. S.; SUH, B. K.; MOON, S.-K.; CHOI, J.-S.; KIM, J. G.; LEE, D. G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **BioMetals**. v. 22, n. 2, p. 235–242, 2008.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.; ROBERTS, T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**. v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

LABARRIOS, F.; GARDUÑO, L.; VIDAL, M. D. R.; GARCIA, R.; SALAZAR, M.; MARTINEZ, E.; DIAZ, F.; CHAMORRO, G.; TAMARIZ, J. Synthesis and Hypolipidaemic Evaluation of a Series of α -Asarone Analogues Related to Clofibrate in Mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 51, n. 1, p.1-7, 1999.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. FFM; LEITE, S. P.; XAVIER, A. L.; MEDEIROS, I. A. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 4, p. 842 - 846, 2009.

LIBRALATO, G.; PRATO, E.; MIGLIORE, L.; CÍCERO, A. M. E.; MANFRA, L. Uma revisão dos protocolos e parâmetros de teste de toxicidade com *Artemia* spp. **Indicadores Ecológicos**, v. 69, n. 1, p. 35–49, 2016.

LIMA, J. A. C.; MEDEIROS, H. I. R.; FARIAS, L. S.; OLIVEIRA, R. J.; SANTOS, C. S.; FREITAS, J. C. R. Modificação estrutural no eugenol: síntese, caracterização e atividade toxicológica frente à *Artemia salina* LEACH. Bases Conceituais da Saúde 6. 6ed.: Antonella Carvalho de Oliveira, Ponta Grossa: Atena, p. 174-183, 2019.

LIMA, J. A. C.; SILVA, J. F.; CAIANA, R. R. A.; JÚNIOR, J. P. S.; OLIVEIRA, W. A.; FREITAS, J. C. R. Síntese, atividade antifúngica e docking molecular de derivados do eugenol. **Scientia Plena**. v. 16, n. 5, p. 1-22, 2020.

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; KONG, M.; LI, L.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; CHEN, H.; QIN, W.; WU, H.; CHEN, S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374-1392, 2016.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. **Biotechnology Advances**. v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

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

MENDES, V. A.; STOCCO, P.; LARA, A. C.; OLIVEIRA, C. M.; LISBOA, H. C. F. Avaliação do uso de produtos naturais na prática do profissional de saúde. **Revista Saúde (Sta. Maria)**. v. 40, n. 1, p. 1-8, 2018.

MERINO, F.; OLIVEIRA, V.; PAULA, C.; CANSIAN, F.; SOUZA, A.; ZUCHETTO, M.; HIROTA, B.; DUARTE A.; KULIK J.; MIGUEL M.; MIGUEL O. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1031-1040, 2015.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassays for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, L. S.; DORIA, A. C. O. C.; SANTOS, T. B.; FIGUEIRA, F. R. SORGE, C. P. C.; DA SILVA, A. M.; KHOURI, S. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. **Revista Univap**, v. 23, n. 43, p. 44-52, 2017.

NGUYEN, T.; TALBI, H.; HILALI, A.; ANTHONISSEN, R.; MAES, A.; VERSCHAEVE, L. In vitro toxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of *Nigella sativa* extracts from different geographic locations. **South African Journal of Botany**. p. 1-10, 2019.

NIVA, C. C. Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas / Cintia Carla Niva, George Gardner Brown, editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019.

OLIVEIRA, W. A. *Atividade do óleo essencial de Cymbopogon winterianus* Jowitt *ex Bor contra Candida albicans, Aspergillus flavus e Aspergillus fumigatus*. 2011. 162 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais

e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde. Universidade federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

PALÁCIO, S. M.; NOGUEIRA, D. A.; MANENTI, D. R.; MÓDENES, A. N.; QUIÑONES, F. R. E.; BORBA, F. H. Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *lactuca sativa* e *artemia salina*. **Engevista**. v. 14, n. 2, p. 127-134, 2012.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 4, n. 18026, 2018.

PAZINATO, M. S.; BRAIBANTE, H. T. S.; BRAIBANTE, M. E. F.; TREVISAN, M. C.; SILVA, G. S. Uma Abordagem Diferenciada para o Ensino de Funções Orgânicas através da Temática Medicamentos. **Química Nova na Escola**. v. 34, n. 1, p. 21-25, 2012.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**. v. 6, p. 129-151, 2005.

PILMIS, B.; PUEL, A.; LORTHOLARY, O.; LANTERNIER, F. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 681 – 687, 2016.

POMPILHO, W. M.; MARCONDES, H. C.; OLIVEIRA, T. T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 473-480, 2014.

PONUGOTI, M. A pharmacological and toxicological review of *Lawsonia inermis*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 9, n. 3, p. 902-915, 2018.

RAUTIO, J.; MEANWELL, N. A.; LI, D.; HAGEMAN, M. J. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 17, n. 8, p. 559-587, 2018.

REZENDE, F.M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F.A.; CARVALHO, W.R. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: VI Botânica no Inverno. Org. FURLAN, C.M. [et al.]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016.

RIBEIRO, S. S. L. *Estudo etnobotânico de plantas medicinais em uma área de caatinga na Paraíba*. 2018. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização - Gestão em Recursos Ambientais do Semiárido – GRAS). Instituto Federal de Educação Tecnológica da Paraíba (IFPB). Picuí, 2018.

RIBEIRO, M. S.; EVERTON, G. O.; ROSA, P. V. S.; PIMENTA, E. R. N.; NETO, A. P. A.; DIAS, A. A. S.; PEREIRA, A. P. M.; NASCIMENTO, D. P.; CARVALHO, A. M. A. S.; SILVEIRA, L. S.; SOUSA, I. T. P.; FILHO, V. E. M. Fenólicos totais, toxicidade e atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. **Research, Society and Development**. v. 9, n. 7, p. 1-21, 2020.

RUIZ, A. L. T.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; MAGALHÃES, E. M. Z.; MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; HUSSAIN, H.; TOUSIF, M. I.; ELSEBAI, M. F.; RIAZ, N.; AKHTAR, N. Natural Phenolics as Inhibitors of the Human Neutrophil Elastase (HNE) Release: An Overview of Natural Anti-inflammatory Discoveries during Recent Years. **Antiinflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**. v. 17, n. 2, p. 70–94, 2018.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; NAVES, P. L. F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v.12, n.2, p.229-233, 2013.

SANTOS, G. C. O.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J. O.; CARTÁGENES, M. S. S.; FILHO, A. K. D. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RAMOS, R. M.; PIRES, R. R. B. E.; ANDRADE, M. S.; ROCHA, F. M. G.; MONTEIRO, C. A. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n. 1, p. 1-23, 2018.

SANTOS, A. R. S. Aplicação de diferentes argilas na síntese do 6-*O*-acetil-1,2:3,4-DI-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose e avaliação toxicológica frente às larvas da *Artemia salina* LEACH. 2017. 55 f. Monografia (Curso de Licenciatura em Química) – Centro de Educação e Saúde. Universidade Federal de Campina Grande. Cuité. 2017.

SEMAN, B. G.; MOORE, J. L.; SCHERER, A. K.; BLAIR, B. A.; MANANDHAR, S.; JONES, J. M.; WHEELER, R. T. Yeast and filaments have specialized, independent activities in a zebrafish model of *Candida albicans* infection. **Infection Immunity**. v. 86, n. 10, p. 1-16, 2018.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

SILVA, J. M.; MENDONÇA, P. P.; PARTATA A. K. Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais. **Revista Científica do ITPAC**. v.7, n.4, 2014.

SILVA, J. N.; DRUMOND, R. R.; MONÇÃO, N. B. N.; PERON, A. P.; SOUSA, J. M. C.; CITÓ, A. M. G. L.; FERREIRA, P. M. P. Estudo prospectivo sobre propriedades antineoplásicas de plantas da família fabaceae: ênfase em *Mimosa caesalpiniiifolia*. **Revista GEINTEC**. v. 6, n. 3, p.3304-3318, 2016.

TAVARES, N. N. O.; LEMOS, A. S. O.; PEREIRA, A. P. O.; FABRI, R. L.; CHEDIER, L. M. Atividade Antifúngica do Látex de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae) e de Lupenona isolada de suas Folhas. **Revista Virtual de Química**. v. 11 n. 5, p. 1579-1590, 2019.

VIERA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 49, n. 3, p. 235- 239, 2017.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v.10, n.1, p. 95-105, 2014.

ZHU, S.; LUO, F.; CHEN, W.; ZHU, B.; WANG, G. Toxicity evaluation of graphene oxide on cysts and three larval stages of *Artemia salina*. **Science of The Total Environment**. v. 595, n. 1, p. 101–109, 2017.