

**UENF - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**SÍNTESE DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO COMO
POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS**

Tese de Doutorado

GRAZIELA RANGEL SILVEIRA

MAIO – 2018

GRAZIELA RANGEL SILVEIRA

**SÍNTESE DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO COMO
POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Ciências Naturais, na área de Biorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Edmilson José Maria

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO- UENF**

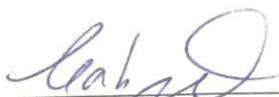
**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO – 2018**

GRAZIELA RANGEL SILVEIRA

SÍNTESE DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO COMO
POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Ciências Naturais, na área de Biorgânica.

Aprovada em 18/05/2018



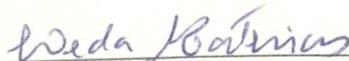
Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos – CCT/UENF – Laboratório de Ciências Químicas



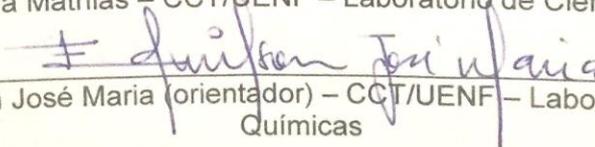
Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira – CCT/UENF – Laboratório de Ciências Químicas



Prof.^a. Dr.^a. Lara Fonseca Barbosa Siqueira – IFF/Campus Centro



Prof.^a. Dr.^a. Leda Mathias – CCT/UENF – Laboratório de Ciências Químicas



Prof. Dr. Edmilson José Maria (orientador) – CCT/UENF – Laboratório de Ciências Químicas

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO- UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**

50/2018

Silveira, Graziela Rangel

Síntese de amidas derivadas do ácido cinâmico como potenciais agentes biológicos / Graziela Rangel Silveira. – Campos dos Goytacazes, 2018. xv, 110 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2018.

Orientador: Edmilson José Maria.

Área de concentração: Biorgânica.

Bibliografia: f. 104-109.

1. ACRILAMIDAS 2. REAÇÃO DE ACOPLAMENTO 3. ANTIBIÓTICOS 4. ANTIPARASITÁRIO 5. CÉLULAS LLC-MK2 I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título

CDD 547.2

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus pais Marly Siqueira Rangel Silveira e José Antônio Silveira

Que sempre reconheceram o valor de uma boa educação. Dedico a vocês também parte de meu futuro, pois vocês renunciaram muitas coisas para reservar a minha irmã e a mim uma educação e um futuro digno! Esta conquista pertence a vocês acima de tudo.

Às minhas irmãs Gleice Rangel Silveira Lima e Karoline Azerêdo Campelo

Seja de sangue ou de coração: irmãs, nossa amizade e amor é inestimável! Agradeço a ajuda para a execução deste trabalho. Obrigada acima de tudo por tornar meus caminhos mais alegres, dedico a vocês também este trabalho.

Ao meu marido Leonardo Chaves Alvarenga

Ofereço a você meu amor, por todo carinho, apoio, incentivo e compreensão, que sempre me acompanhou em busca dos meus sonhos sem nenhuma cobrança, aceitou e apoiou minhas decisões. É por minha gratidão e amor que dedico a você esta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao professor, Doutor Edmilson José Maria, minha gratidão pela oportunidade proporcionada e por toda sabedoria que pacientemente me transmitiu.

Ao professor, Doutor Olney Vieira-da-Motta e Doutora Solange Silva Samarão, pela contribuição nos experimentos e na análise bacteriológica.

Ao professor, Doutor Edesio Tenório Melo e sua aluna Lais, pelas contribuições com ideias e na parte experimental anti *Toxoplasma*.

Aos professores, Doutor Carlos Matos, Doutor Ivo José Curcino e Doutora Leda Mathias pelas valiosas sugestões.

A Doutora Lara Fonseca Barbosa Siqueira por aceitar fazer parte da banca examinadora.

Aos técnicos do LSA: Lourdes e Gina que contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório que tornaram esta caminhada mais facilitada: Lorena, Noemi, Ana, Andrea.

À CAPES pelo patrocínio do projeto.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
SUMÁRIO.....	III
ÍNDICE DE ESQUEMAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE ESPECTROS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. SÍNTESE DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO	5
1.2. SÍNTESE DE AMIDAS COM CLORETOS DE ACILA.....	6
1.3. SÍNTESE DE AMIDAS JUNTO A REAGENTES DE ACOPLAMENTO	9
1.4. OUTRAS SÍNTESES DE AMIDAS.....	14
1.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO	18
1.6. ATIVIDADE ANTITOXOPLASMA DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. GERAL.....	20
2.2. ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. SÍNTESE.....	21
3.1.1. Materiais.....	21
3.1.2. Métodos	22
3.1.2.1. Procedimento sintético geral	22
3.1.2.2. Procedimento sintético geral para os substâncias C1-C5 e C8	23
3.1.2.3. Procedimento sintético para os substâncias C6 e C7	23
3.1.2.4. Dados experimentais.....	23
3.2. ENSAIO ANTIMICROBIANO.....	27
3.2.1. Ensaio para obtenção concentração mínima inibitória (CMI)	27

3.2.2. Antibiograma	30
3.3. ENSAIO ANTITOXOPLASMA	30
3.3.1. Célula hospedeira (LLC-MK2).....	30
3.3.2. Parasito Toxoplasma gondii	31
3.3.3. Toxicidade das substâncias em células LLC-MK2	31
3.3.4. Interação Toxoplasma gondii - células LLC-MK2	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. SÍNTESE.....	33
4.1.1. Determinação estrutural da N-[2-(4-metoxifenil)-etil]-3-fenilacrilamida (C1)	36
4.1.2. Determinação estrutural da 3-fenil-N-(2-m-toliletil)-acrilamida (C2)	42
4.1.3. Determinação estrutural da N-[2-(4-clorofenil)etil]-3-fenilacrilamida (C3)	49
4.1.4. Determinação estrutural da N-[2-(4-nitrofenil)etil]-3-fenilacrilamida (C4).....	56
4.1.5. Determinação estrutural da N-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-3-fenilacrilamida (C5).....	63
4.1.6. Determinação estrutural da N-[2-(4-bromofenil)etil]-3-(4-nitrofenil)-acrilamida (C6).....	70
4.1.7. Determinação estrutural da 3-(4-nitrofenil)-N-[2-(4-nitrofenil)etil]-acrilamida (C7)	77
4.1.8. Determinação estrutural de 3-(4-bromofenil)-N-[2-(4-clorofenil)etil]- propionamida (C8).....	84
4.2. ENSAIO ANTIMICROBIANO.....	92
4.3. ENSAIO ANTITOXOPLASMA	99
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO.....	110

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formação do carboxilato de amônio. A temperatura ambiente, a ausência de um agente de acoplamento uma amina e um ácido carboxílico não formam a função amida. Sob aquecimento ocorre desidratação do sal carboxilato e a formação de uma amida.	5
Esquema 2. Um método convencional para formação de amidas que envolve a ativação de um ácido carboxílico por um grupo ativador (A*), seguido de ataque nucleofílico pela amina para gerar a ligação amida. Adaptado de Pattabiraman e Bode [32].	6
Esquema 3. Mecanismo geral da formação de um cloreto de acila usando cloreto de tionila (7) ou cloreto de oxalila (8).	6
Esquema 4. Formação de um sal de amônio não reativo a partir da amina.	7
Esquema 5. Síntese para formação do cloreto de acila e síntese proposta por Boudreau e colaboradores [8].	7
Esquema 6. Síntese de cinamamidas proposta por Chan e colaboradores [9].	8
Esquema 7. Reagentes e condições das reações executadas por Daí et. al [14]: (a) cloreto de oxalila, TEA, CH ₂ Cl ₂ , 3-6 h.	8
Esquema 8. Proposta de mecanismo da reação de amidação [40] executada por Shi et. al [10].	10
Esquema 9. Estrutura química do DCC e EDC. Mecanismo de síntese de amidas com DCC [35].	10
Esquema 10. Reação de amidas proposta por Georgiev et. al [26].	11
Esquema 11. Formação de um éster ativado a partir do HOBT. Note que há menos impedimento para o ataque nucleofílico com a substituição do EDC.	11
Esquema 12. Reagentes e condições executadas no trabalho de Daí et. al [14]: DCC, tetrahidrofurano (THF), refluxo por 3-6 h.	12
Esquema 13. Reação proposta por Sheikh et. al para síntese de amida com DCC [38].	12
Esquema 14. Método para a formação de carboxamidas com uso de DMT-MM com seus respectivos rendimentos [34].	13
Esquema 15. Mecanismo de formação de amida catalisada por DMT-MM.	13
Esquema 16. Reação de amidação com nanozeólitos. Supõe-se que a amida é adsorvida sobre os sítios ácidos de Bronsted de zeólito, que, subsequentemente, reage com a amina seguido por eliminação do amoníaco produzindo a amida desejada. [42].	14

Esquema 17. Reação proposta por Cheung e Buchwald. Reagentes e condições: o halogeneto de vinila e N, N'-dimetiletilenodiamina (DMEDA) foram adicionados a um tubo, seguido por THF anidro através de uma seringa. A reação ocorreu sob agitação a 80 ° C por 12 h.	15
Esquema 18. Procedimento geral de síntese com DCC.....	23
Esquema 19. Procedimento geral de síntese com cloreto de p-nitrocinaoila.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácidos cinâmicos e seus análogos fenólicos.....	3
Figura 2. Biossíntese do ácido cinâmico e do ácido p-cumárico.....	4
Figura 3. Estrutura química do Zileuton.....	7
Figura 4. Esquema do ensaio microbiológico.....	28
Figura 5. Procedimento experimental do ensaio microbiológico.....	29
Figura 6. Estrutura química das substâncias C1-C8.....	33
Figura 7. Proposta de fragmentação de C1 para os principais sinais do Espectro 2.	37
Figura 8. Proposta de fragmentação de C2 para os principais sinais do Espectro 9.	44
Figura 9. Proposta de fragmentação de C3 para os principais sinais do Espectro 16.	51
Figura 10. Proposta de fragmentação de C4 para os principais sinais do Espectro 23.	58
Figura 11. Proposta de fragmentação de C5 para os principais sinais do Espectro 30.	65
Figura 12. Proposta de fragmentação de C6 para os principais sinais do Espectro 37.	72
Figura 13. Proposta de fragmentação de C7 para os principais sinais do Espectro 44.	79
Figura 14. Proposta de fragmentação de C8 para os principais sinais do Espectro 51.	86
Figura 15. Ensaio para obtenção da Concentração Mínima Inibitória (CMI) para a substância C2 (C 02) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 na concentração de 250 ppm. Gentamicina (10 µL/mL)- indica controle positivo. Controle – indica controle negativo (crescimento bacteriano normal).....	92
Figura 16. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. A concentração testada foi de 250 ppm.	93
Figura 17. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442. A concentração testada foi de 250 ppm.....	93
Figura 18. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591. A concentração testada foi de 250 ppm.....	94
Figura 19. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. A concentração testada foi de 250 ppm.....	94
Figura 20. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> LSA 88. A concentração máxima testada foi de 250 ppm.....	94

- Figura 21.** Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. A concentração máxima testada foi de 250 ppm. 95
- Figura 22.** Resultados do antibiograma para C2 frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na concentração mínima inibitória (250 ppm). 97
- Figura 23.** Resultados do antibiograma para C5 frente à bactéria *Staphylococcus aureus* LSA 88 na concentração mínima inibitória (250 ppm). 97
- Figura 24.** Toxicidade em células LLC-MK2 infectadas. A seta negra indica núcleo com aparência normal. A seta branca indica alterações nucleares sugestivas de toxicidade. (A) controle. Em (B), (C) e (D) observa-se aumento progressivo de citotoxicidade com maiores alterações nucleares e redução do número de células. 99
- Figura 25.** Microscopia óptica do teste biológico mostrando células LLC-MK2 infectadas. A seta negra aponta para o núcleo celular, a seta branca indica o vacúolo parasitóforo. Controle (A). Redução da infecção com eliminação do parasito nos tratamentos com as substâncias: C1 (B) e C7 (C). As ampliações em cada imagem referente ao vacúolo parasitóforo mostra o aumento a desorganização morfológica do parasito de A para C. ... 101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos métodos sintéticos para produção de amidas derivadas do ácido cinâmico.	16
Tabela 2. Rendimento e ponto de fusão das amidas derivadas do ácido cinâmico sintetizadas.....	34
Tabela 3. Tabela do íon molecular (m/z) encontrado para cada uma das amidas sintetizadas.....	34
Tabela 4. Tabela dos estiramentos referentes aos grupamentos C=O e N-H das amidas sintetizadas.....	35
Tabela 5. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C1.....	41
Tabela 6. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C2.....	48
Tabela 7. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C3.....	55
Tabela 8. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C4.....	62
Tabela 9. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C5.....	69
Tabela 10. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C6.....	76
Tabela 11. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C7.....	83
Tabela 12. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto C8.....	90

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. Cromatograma da substância C1.....	36
Espectro 2. Espectro de massas da substância C1 (CH ₂ Cl ₂).....	37
Espectro 3. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C1.....	38
Espectro 4. Espectro de RMN ¹³ C da substância C1 (CDCl ₃ , 125 MHz).	39
Espectro 5. Espectro de RMN ¹ H da substância C1 (CDCl ₃ , 500 Hz).	39
Espectro 6. Espectro de HSQC da substância C1 (CDCl ₃ , 500 Hz).	40
Espectro 7. Espectro de HMBC da substância C1 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	42
Espectro 8. Cromatograma da substância C2.....	43
Espectro 9. Espectro de massas da substância C2 (CH ₂ Cl ₂).....	43
Espectro 10. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C2.....	45
Espectro 11. Espectro de RMN ¹³ C da substância C2 (CDCl ₃ , 125 MHz).	46
Espectro 12. Espectro de RMN ¹ H da substância C2 (CDCl ₃ , 500 Hz).	46
Espectro 13. Espectro de HSQC da substância C2 (CDCl ₃ , 500 Hz).	47
Espectro 14. Espectro de HMBC da substância C2 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	49
Espectro 15. Cromatograma da substância C3.....	50
Espectro 16. Espectro de massas da substância C3 (CH ₂ Cl ₂).	50
Espectro 17. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C3.....	52
Espectro 18. Espectro de RMN ¹³ C da substância C3 (CDCl ₃ , 125 MHz).	53
Espectro 19. Espectro de RMN ¹ H da substância C3 (CDCl ₃ , 500 Hz).	53
Espectro 20. Espectro de HSQC da substância C3 (CDCl ₃ , 500 Hz).	54
Espectro 21. Espectro de HMBC da substância C3 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	56
Espectro 22. Cromatograma da substância C4.....	57
Espectro 23. Espectro de massas da substância C4 (CH ₂ Cl ₂).	57
Espectro 24. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C4.....	59
Espectro 25. Espectro de RMN ¹³ C da substância C4 (CDCl ₃ , 125 MHz).	60
Espectro 26. Espectro de RMN ¹ H da substância C4 (CDCl ₃ , 500 Hz).	60

Espectro 27. Espectro de HSQC da substância C4 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	61
Espectro 28. Espectro de HMBC da substância C4 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	63
Espectro 29. Cromatograma da substância C5.....	64
Espectro 30. Espectro de massas da substância C5 (CH ₂ Cl ₂).	64
Espectro 31. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C5.....	65
Espectro 32. Espectro de RMN ¹³ C da substância C5 (CDCl ₃ , 125 MHz).	66
Espectro 33. Espectro de RMN ¹ H da substância C5 (CDCl ₃ , 500 Hz).	67
Espectro 34. Espectro de HSQC da substância C5 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	68
Espectro 35. Espectro de HMBC da substância C5 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	70
Espectro 36. Cromatograma da substância C6.....	71
Espectro 37. Espectro de massas da substância C6 (CH ₂ Cl ₂).	71
Espectro 38. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C6.....	73
Espectro 39. Espectro de RMN ¹³ C da substância C6 (CDCl ₃ , 125 MHz).	74
Espectro 40. Espectro de RMN ¹ H da substância C6 (CDCl ₃ , 500 Hz).	74
Espectro 41. Espectro de HSQC da substância C6 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	75
Espectro 42. Espectro de HMBC da substância C6 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	77
Espectro 43. Cromatograma da substância C7.....	78
Espectro 44. Espectro de massas da substância C7 (CH ₂ Cl ₂).	78
Espectro 45. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C7.....	80
Espectro 46. Espectro de RMN ¹³ C da substância C7 (CDCl ₃ , 125 MHz).	81
Espectro 47. Espectro de RMN ¹ H da substância C7 (CDCl ₃ , 500 Hz).	81
Espectro 48. Espectro de HSQC da substância C7 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	82
Espectro 49. Espectro de HMBC da substância C7 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	84
Espectro 50. Cromatograma da substância C8.....	85
Espectro 51. Espectro de massas da substância C8 (CH ₂ Cl ₂).	85
Espectro 52. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância C8.....	86
Espectro 53. Espectro de RMN ¹³ C da substância C8 (CDCl ₃ , 125 MHz).	87
Espectro 54. Espectro de RMN ¹ H da substância C8 (CDCl ₃ , 500 Hz).	88

Espectro 55. Espectro de HSQC da substância C8 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	89
Espectro 56. Espectro de HMBC da substância C8 (CDCl ₃ , 500 Hz).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

BOP - hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfônio

d- dubleto

DMEDA - *N, N'*-dimetiletilenodiamina

DCC - *N,N*-dicicloexilcarbodiimida

DMF - *N,N*-dimetilformamida

DMT-MM - 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio

Dppb - bis(difenilfosfina)butano

EDC - 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida

HOBT - 1-hidroxibenzotriazol

IV - infravermelho

m – multiplete

MH – ágar Mueller Hinton

PF - ponto de fusão

q – quarteto

RMN – ressonância magnética nuclear

t – tripleto

TEA - tetraetilamônio

THF – tetraidrofurano

UFC – unidade formadora de colônias

RESUMO

A natureza tem sido considerada uma fonte abundante de substâncias com propriedades medicinais. As plantas e organismos marinhos possuem uma enorme diversidade química e alguns de seus metabolitos que podem ser de grande interesse biológico. Dentre os produtos naturais, os ácidos cinâmicos e moléculas relacionadas vêm sendo bastante estudadas visto que a maioria de seus derivados apresentam diversas ações terapêuticas como anti-inflamatória, antitumoral e atividade inibitória frente a uma grande variedade de microrganismos, onde a atividade antimicrobiana e antifúngica tem sido relatada por diversos autores. As amidas derivadas do ácido cinâmico possuem grande potencial como agentes biológicos, mostrando atividade antifúngica e antimicrobiana. Apesar das diversas atividades biológicas encontradas nas amidas derivadas do ácido cinâmico, não é descrito na literatura, até o momento, a atividade anti*Toxoplasma*. Neste trabalho foram sintetizadas oito amidas derivadas do ácido cinâmico das quais cinco são inéditas na literatura. Estas substâncias tiveram seu potencial antibacteriano avaliado através do método de microdiluição em ágar, frente às cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), e três diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*. As amidas **C2** e **C5** apresentaram concentração mínima inibitória igual a 250 ppm frente a duas cepas de *S. aureus* (ATCC 25923 e a cepa bovina LSA 88). Estas apresentaram ainda, ação sinérgica junto a uma variedade de antibióticos. Seis amidas também foram testadas contra células hospedeiras infectadas com *Toxoplasma gondii*. Todas as amidas testadas mostraram atividade, das quais as substâncias **C3** e **C4** apresentaram os melhores resultados contra o *T. gondii*, reduzindo o número de células infectadas e de parasitos intracelulares mostrando ainda, atividade antiparasitária em baixas concentrações (0.038 e 0.077 mM). Tais resultados demonstram assim que amidas derivadas do ácido cinâmico possuem potencial como agentes farmacológicos.

Palavras-chave: acrilamidas, reação de acoplamento, antibiótico, antiparasitário, células LLC-MK2.

ABSTRACT

Nature has been considered an abundant source of substances with medicinal properties. Marine plants and organisms have a huge chemical diversity and some of their metabolites can be of great biological interest. Among the natural products, cinnamic acids and related molecules have been well studied since most of their derivatives present several therapeutic actions like anti-inflammatory, antitumoral and inhibitory activity against a great variety of microorganisms and the antimicrobial and antifungal activity has been reported by several authors. Amides derived from cinnamic acid have great potential as biological agents, showing antifungal and antimicrobial activity. Despite the diverse biological activities found in amides derived from cinnamic acid, the anti-toxoplasma activity has not been described in the literature. In this work eight amides derived from cinnamic acid were synthesized, five which are unpublished in the literature. These substances had their antibacterial potential evaluated by the agar microdilution method, against bacterial strains *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), and three strains of *Staphylococcus aureus*. **C2** and **C5** amides presented a minimum inhibitory concentration of 250 ppm against two strains of *S. aureus* (ATCC 25923 and bovine strain LSA 88). These also presented synergistic action with a variety of antibiotics. Six amides were also tested against host cells infected with *Toxoplasma gondii*. All the amides tested showed activity, of which the substances **C3** and **C4** presented the best results against *T. gondii*, reducing the number of infected cells and intracellular parasites, also showing antiparasitic activity at low concentrations (0.038 and 0.077 mM). Such results thus demonstrate that amines derived from cinnamic acid have potential as pharmacological agents.

Key words: acrylamides, coupling reaction, antibiotic, antiparasitic, LLC-MK2 cells.

1. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica e bioquímica de substâncias oriundas de plantas e animais tem atraído o interesse dos pesquisadores em todo o mundo [1].

Produtos naturais são utilizados desde a antiguidade com fins medicinais, principalmente no tratamento de infecções [2,3], sendo uma fonte constante de inspiração para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos [1].

Dentro dos produtos naturais de importância na atualidade encontram-se os ácidos cinâmicos. Estes são ácidos que possuem um esqueleto químico simples, consistindo de uma estrutura C₆-C₃ e são o principal subgrupo de ácidos fenólicos de ampla distribuição no reino vegetal, sendo abundantemente encontrados em folhas de chá, café, em várias frutas (especialmente vermelhas), em legumes e grãos integrais [4].

O termo “cinâmico” se refere à espécie *Cinnamomum verum* (Sin. *C. zeylanicum*), planta conhecida popularmente como caneleira verdadeira, de onde a especiaria é obtida por secagem da casca do tronco da planta [2]. Derivados do ácido cinâmico **(1)** como o ácido *p*-cumárico **(2)**, cafeico **(3)**, ferúlico **(4)** e sinápico **(5)** (figura 1) tem ampla distribuição e possuem um papel fundamental na biossíntese de sistemas fenólicos mais complexos [4,5].

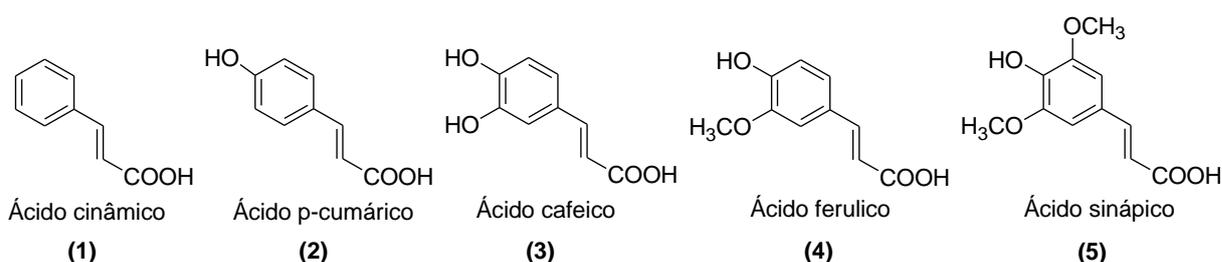


Figura 1. Ácidos cinâmicos e seus análogos fenólicos.

A biossíntese destes ácidos se inicia com o aminoácido fenilalanina **(6)**, onde a fenilalanina amônia liase (PAL) catalisa a reação de desaminação para produzir ácido cinâmico **(1)** [6]. Esta enzima é de grande importância para a formação de muitas substâncias fenólicas. Reações subsequentes àquelas catalisadas por PAL são basicamente adições de mais grupos hidroxila e outros substituintes, cujos

produtos apresentam como principal função serem precursores de outros derivados mais complexos [6,7].

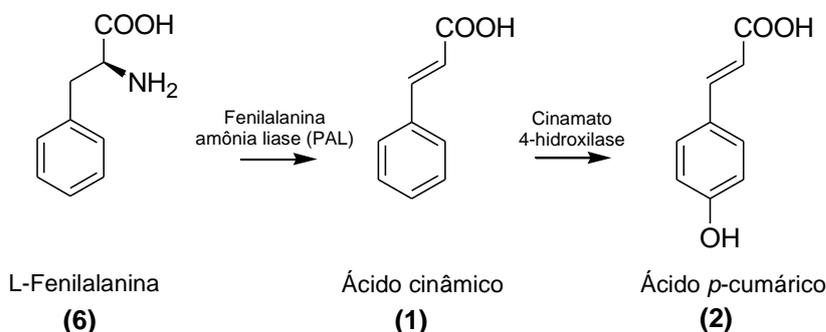


Figura 2. Esquema de transformação do ácido cinâmico a ácido *p*-cumárico.

A maioria dos ácidos cinâmicos, seus ésteres, amidas, aldeídos e álcoois, apresentam diversas ações terapêuticas como anti-inflamatória [8,9], antitumoral [10], antimalárico [5,11,12], antitripanossoma [13] e atividade inibitória frente a uma variedade de microrganismos [3,5,14–16] cujo mecanismo de ação é pouco conhecido [3,5].

Neste contexto, diversos pesquisadores vêm buscando substâncias alternativas a partir de derivados deste ácido, a fim de potencializar suas propriedades terapêuticas, onde a presença da porção cinamoíla tem demonstrado aumento da eficácia de diversos medicamentos antituberculose e antimalárico [5].

No que se refere à amidas derivadas de ácidos cinâmicos, estas foram previamente observadas em várias plantas superiores, sendo encontradas em caule, raiz [17], folhas [17–19] e sementes [20].

O grupo enamida é uma subestrutura amplamente presente nos produtos naturais [21] e quando presente junto com substâncias derivadas de tirosina mostra atividades biológicas de interesse como: fungicida e drogas metabólicas [22–24].

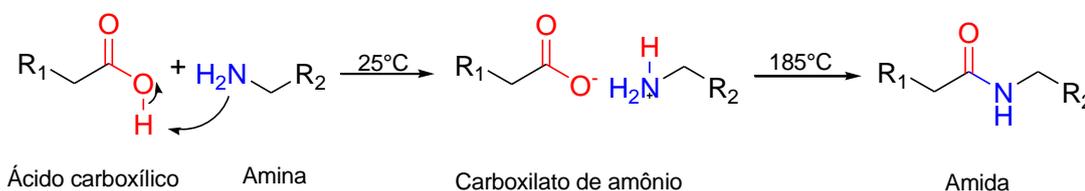
Diversos estudos vêm sendo feito com o objetivo de testar biologicamente algumas classes de amidas naturais derivadas de ácido cinâmico, sendo relatados diversos efeitos como: antibiótico [3,25–28], antifúngico [16,25,29], anticancerígeno [30,31], HIV e diabetes mellitus tipo-2 [31]. Desta forma se faz necessário o estudo de possíveis sínteses de derivados do ácido cinâmico.

1.1. SÍNTESE DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO

As reações de amidação são vistas como uma das reações mais importantes da química orgânica, devido à ocorrência generalizada de amidas em produtos farmacêuticos modernos e substâncias biologicamente ativas [32,33].

Existem diversos métodos para a síntese deste grupo funcional, porém os mais utilizados e úteis são os que envolvem condensação de ácidos carboxílicos e aminas, por ativação da porção ácida [34], sendo um dos mais utilizados em química orgânica e na indústria farmacêutica [32].

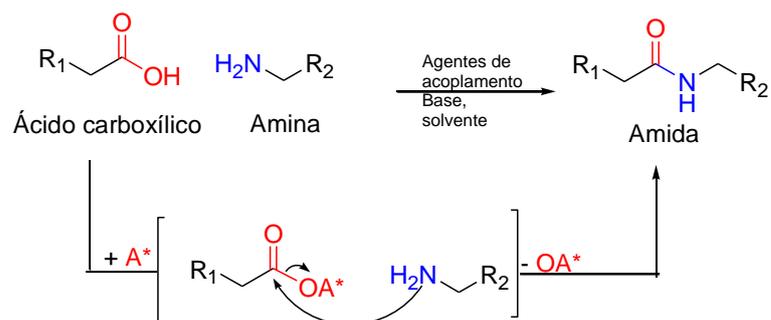
Esta síntese depende de um reagente para converter um ácido carboxílico não reativo em um carboxilato ativado. Na ausência de um reagente de acoplamento, o ácido carboxílico e a amina simplesmente formam um sal de carboxilato de amônio, em vez de uma amida, devido à termodinâmica desfavorável da reação de formação do produto [32]. A transformação do sal em amida requer um aquecimento vigoroso (esquema 1), o que pode levar a alterações estruturais [35,36].



Esquema 1. Formação do carboxilato de amônio. A temperatura ambiente, a ausência de um agente de acoplamento uma amina e um ácido carboxílico não formam a função amida. Sob aquecimento ocorre desidratação do sal carboxilato e a formação de uma amida.

Atualmente, as estratégias mais utilizadas na síntese de amidas dependem da ativação de um ácido carboxílico (deficiente em elétrons) para favorecer o ataque nucleofílico de uma amina. Esta ativação consiste na substituição do grupo hidroxila (ou H) do ácido carboxílico por um melhor grupo de saída (abandonador) [36]. O Esquema 2 mostra o mecanismo geral da síntese de amidas por esta via.

As metodologias existentes são clássicas, e as preocupações sobre os seus resíduos e os custos estão cada vez mais presentes. Desta forma, abordagens químicas inovadoras para formação de amidas estão, por conseguinte, a serem desenvolvidas de forma limpa e sustentável [32].



Esquema 2. Um método convencional para formação de amidas que envolve a ativação de um ácido carboxílico por um grupo ativador (A^*), seguido de ataque nucleofílico pela amina para gerar a ligação amida. Adaptado de Pattabiraman e Bode [32].

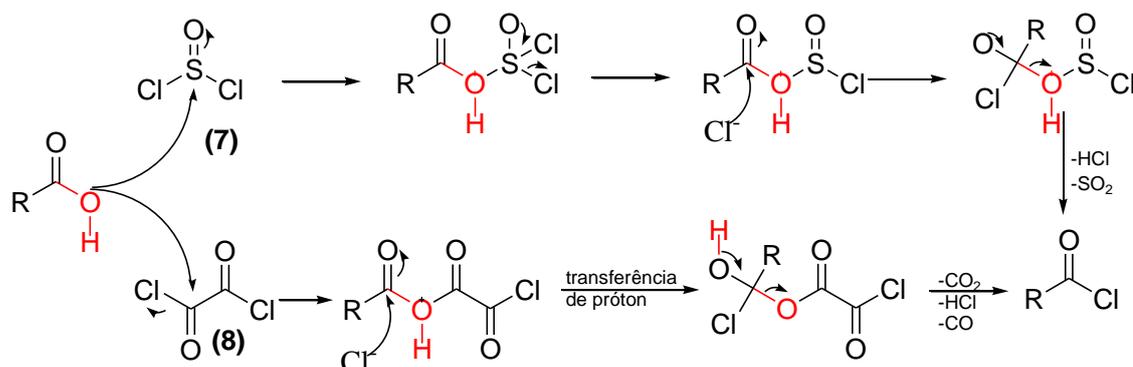
Os próximos tópicos trazem um resumo de alguns métodos de síntese de amidas derivadas do ácido cinâmico.

1.2. SÍNTESE DE AMIDAS COM CLORETOS DE ACILA

A maior reatividade do cloreto de acila, em comparação a outros derivados de ácido carboxílico, pode ser explicada levando em consideração a baixa basicidade do grupo abandonador cloreto (Cl^-), tornando este mais reativo diante de reações de substituição nucleofílica [35].

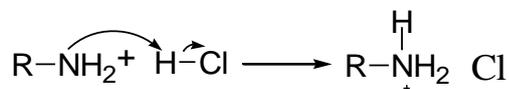
Uma das metodologias mais utilizadas para a conversão de um ácido carboxílico em um cloreto de ácido é o uso de PCl_5 (pentacloroeto de fósforo), PCl_3 (tricloroeto de fósforo) [35], SOCl_2 (cloreto de tionila, **7**) [8] e cloreto de oxalila (**8**) (esquema 3) [14].

Uma vez que os cloretos de acila são derivados mais reativos, eles reagem facilmente com outros nucleófilos, sendo convertidos em substâncias menos reativas [35].



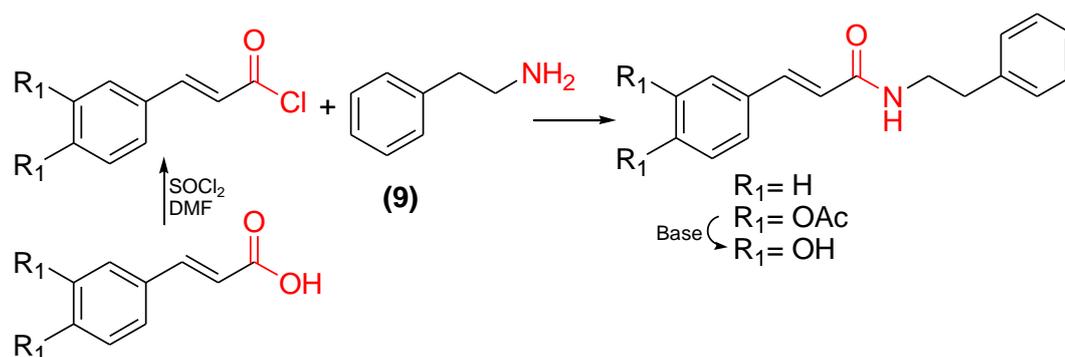
Esquema 3. Mecanismo geral da formação de um cloreto de acila usando cloreto de tionila (**7**) ou cloreto de oxalila (**8**).

Para a síntese de amidas, uma base deve ser adicionada a fim de neutralizar o HCl formado e evitar a formação de um sal não reativo (sal de amônio) a partir da amina (esquema 4).



Esquema 4. Formação de um sal de amônio não reativo a partir da amina.

Boudreau e colaboradores [8] sintetizaram amidas de interesse biológico com o uso de cloreto de tionila (SOCl_2) em *N,N*-dimetilformamida (DMF). Foi utilizado como reagentes a 2-feniletanamina (**9**), o ácido cinâmico e o ácido cafeico acetilado. A reação de desacetilação foi induzida por base realizada com carbonato de potássio em metanol e diclorometano (esquema 5).



$\text{R}_1 = \text{H}$ Ácido cinâmico
 $\text{R}_1 = \text{OAc}$ Ácido cafeico acetilado

Esquema 5. Síntese para formação do cloreto de acila e síntese proposta por Boudreau e colaboradores [8].

As substâncias sintetizadas foram testadas quanto a sua capacidade em inibir mediadores inflamatórios (envolvidos em doenças como asma, arteriosclerose e artrite reumatoide). A atividade destes análogos de amidas foi semelhante ao do Zileuton (uma droga antiasmática disponível para uso clínico, figura 3) [8]. O que torna estas moléculas uma alternativa para inibição da biossíntese de agentes inflamatórios.

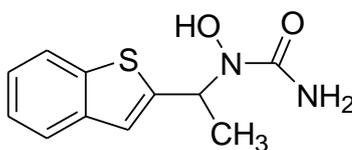
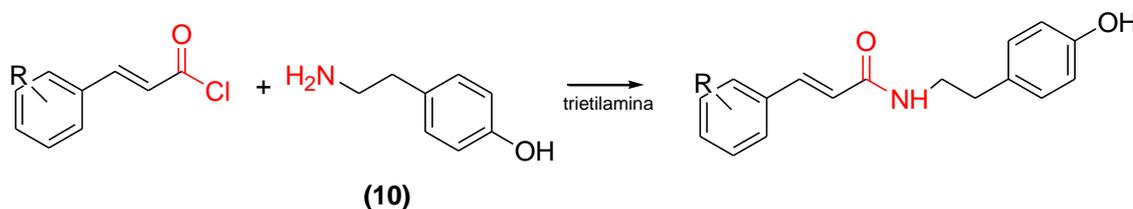


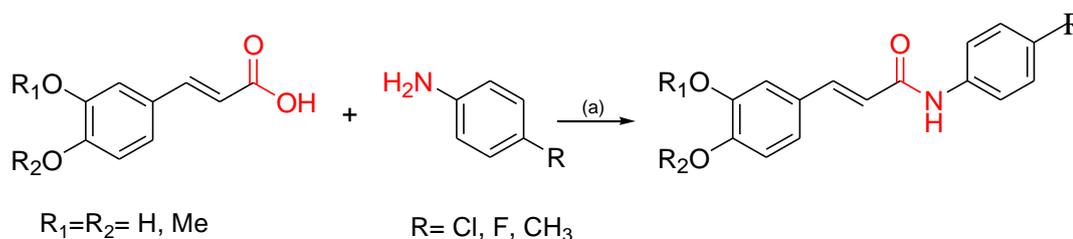
Figura 3. Estrutura química do Zileuton.

Um procedimento proposto por Chan *et. al* em 2013 [9] para a produção de cinamamidas é a mistura de cloreto de cinamoíla e tiramina (**10**), na presença de trietilamina em CH₂Cl₂, a 0 °C em atmosfera de nitrogênio (esquema 6).



Esquema 6. Síntese de cinamamidas proposta por Chan e colaboradores [9].

Uma série de amidas derivadas do ácido cafeico (**3**) foram sintetizadas [14], na presença de cloreto de oxalila (**7**) e trietilamina (TEA) em diclorometano (CH₂Cl₂, esquema 7) .



Esquema 7. Reagentes e condições das reações executadas por Daí *et. al* [14]: (a) cloreto de oxalila, TEA, CH₂Cl₂, 3-6 h.

Estas amidas foram testadas e as fenólicas mostraram ação sinérgica ao Fluconazol¹ no tratamento a cepas resistentes de *Candida albicans* [14].

Para síntese de fenolamidas, Yamazaki e colaboradores [37] adotaram metodologia semelhante a Chan *et. al* [9] e Boudreaud *et. al* [8] sendo utilizada 25 mL da tiramina (**9**) junto a 50 mL de piridina em 100 mL de tolueno, a esta solução foi adicionada gota a gota uma mistura de 350 mL de tolueno contendo 30g de cloreto de *o*-acetilferuloíla. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante uma noite, e purificada produzindo cristais na forma de agulhas com 81% de rendimento.

As fenolamidas foram testadas e se mostraram potenciais agentes para o tratamento de síndromes metabólicas, reduzindo a glicose sanguínea, os níveis de

¹ Fluconazol é um fármaco utilizado como antimicótico (antifúngico).

triglicerídeos além do aumento da produção endógena de adiponectina², onde esta atividade é, possivelmente, aumentada pela co-administração de ácido docosa-hexaenóico [37].

Nota-se que a ativação da porção ácida pela formação de um cloreto de acila é uma técnica bastante usual para a síntese de amidas, que geralmente ocorre em condições reacionais brandas e com altos rendimentos [35].

1.3. SÍNTESE DE AMIDAS JUNTO A REAGENTES DE ACOPLAMENTO

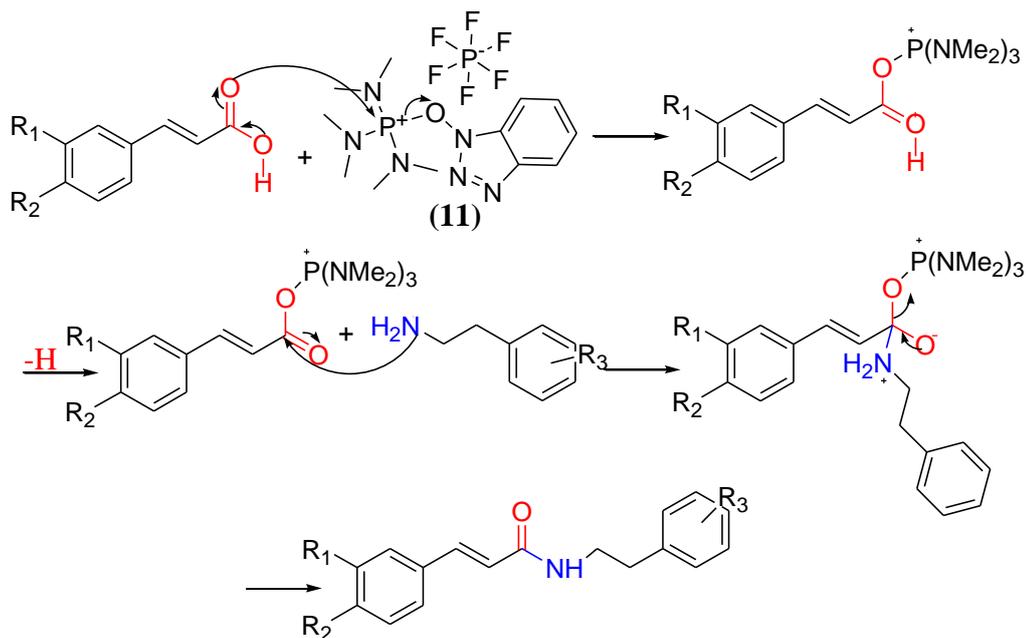
Reagentes de acoplamento aqui tratados são assim chamados por fazerem uma nova ligação à carboxila, estabelecendo uma ativação *in situ*, e favorecendo o ataque nucleofílico.

Carbodiimidas (**12**, **13**) [26,38], hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-*tris*-(dimetilamino)fosfônio (BOP **11**) [10], 1-hidroxibenzotriazol (HOBT **14**) [38], 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (DMT-MM) [34,39], são frequentemente utilizados como agentes de acoplamento.

O hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-*tris*-(dimetilamino)fosfônio (BOP, **11**) foi usado como reagente de condensação no trabalho de Shi *et. al* [10], onde o ácido carboxílico reagiu com ariletilaminas em DMF e CH₂Cl₂ (esquema 8) para formar os produtos de amida correspondentes, apresentando um bom rendimento (74-88%).

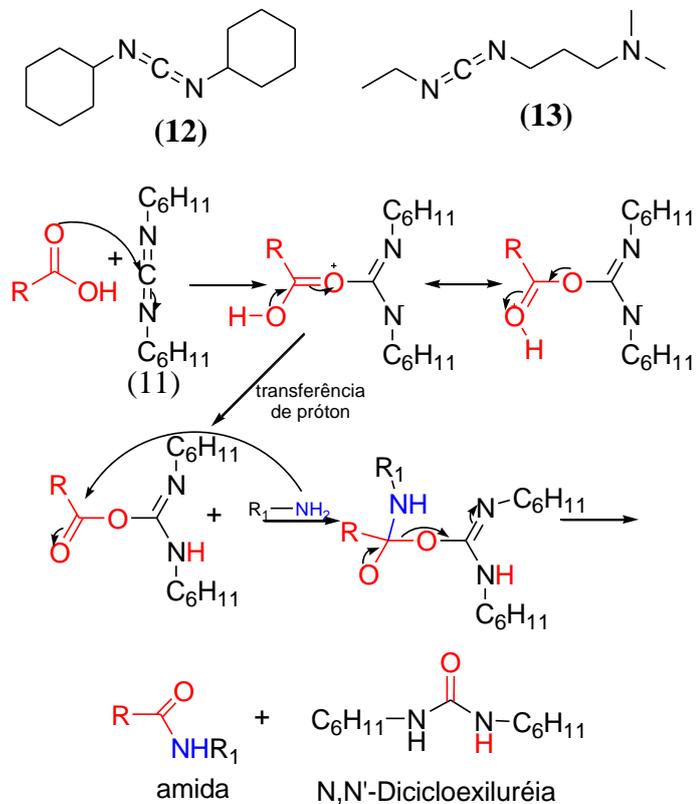
Para a síntese de amidas e de peptídeos, tem sido descrito o uso de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, **12**) e 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, **13**), como ativadores da porção ácida. A reação geralmente ocorre a temperatura ambiente com rendimentos altos [35].

²Citoquina (proteína biológica ativa envolvida na comunicação celular) derivada de adipócitos. Síndromes metabólicas, tais como diabetes tipo 2 e aterosclerose estão intimamente relacionadas com a diminuição na concentração plasmática de adiponectina.



Esquema 8. Proposta de mecanismo da reação de amidação [40] executada por Shi *et. al* [10].

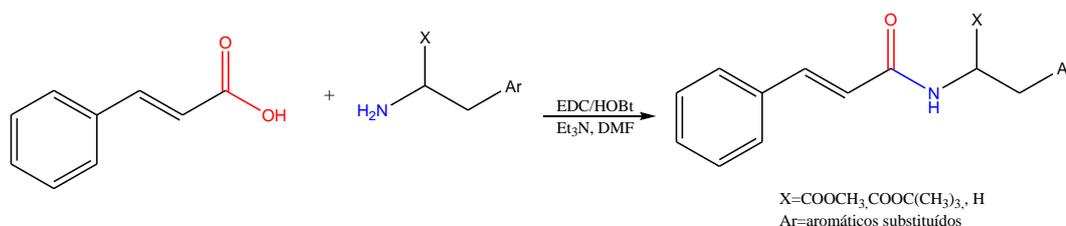
No esquema a seguir é mostrado o mecanismo da síntese de amidas promovida por reação de acoplamento com DCC (esquema 9).



Esquema 9. Estrutura química do DCC e EDC. Mecanismo de síntese de amidas com DCC [35].

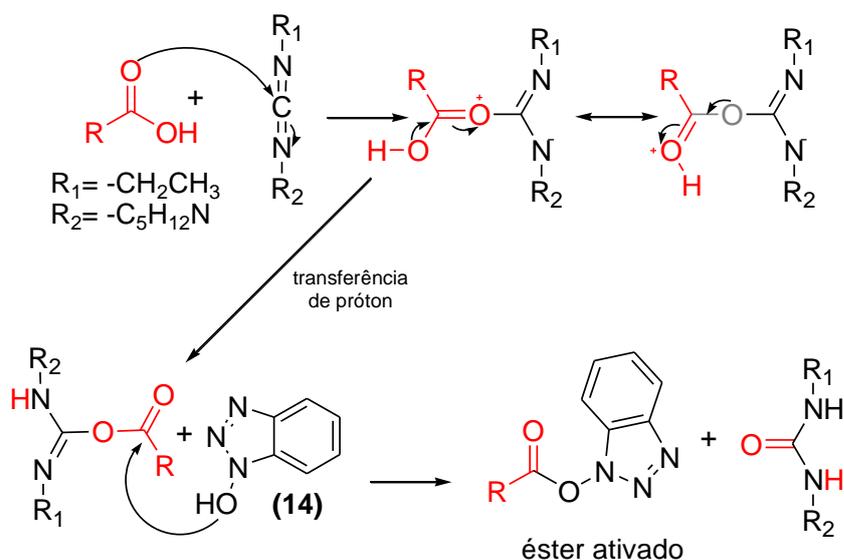
Amidas com atividades antioxidantes foram sintetizadas por acoplamento dos ácidos cinâmicos (**1**) correspondentes com derivados de aminoácidos com o uso de EDC[26].

A reação foi realizada em DMF na presença de trietilamina e de EDC (**13**), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) como reagentes de acoplamento [26]. Após purificação, os rendimentos foram entre 35 e 80% (esquema 10).



Esquema 10. Reação de amidas proposta por Georgiev *et. al* [26].

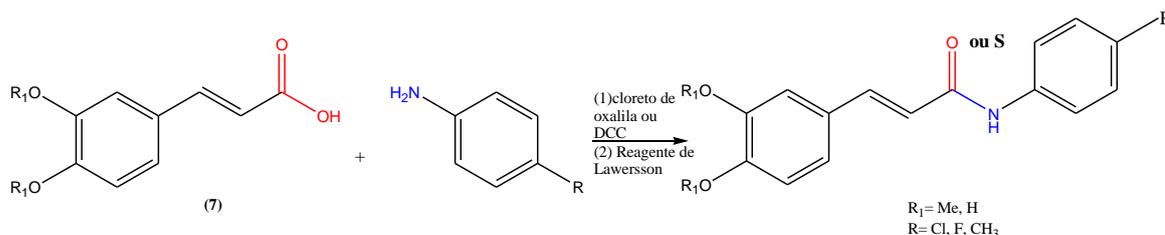
O HOBT (**14**) tem o objetivo de tornar a reação mais rápida, melhorando o grupo abandonador formando um éster ativado (ao substituir o EDC), favorecendo ainda o ataque nucleofílico devido à diminuição do impedimento estérico (esquema 11).



Esquema 11. Formação de um éster ativado a partir do HOBT. Note que há menos impedimento para o ataque nucleofílico com a substituição do EDC.

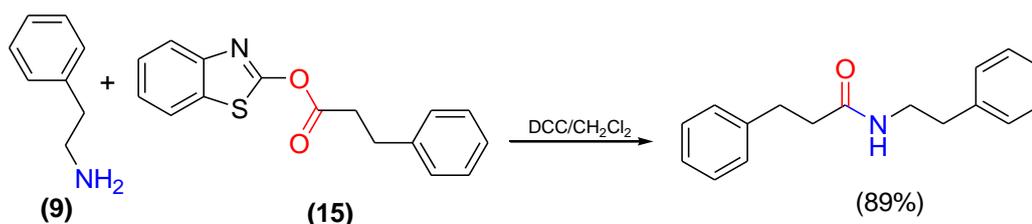
Sínteses de amidas por acoplamento do ácido cafeico (**3**) com uma série de aminas, utilizando DCC como reagente de acoplamento foram realizadas por Daí e colaboradores [14], tal como mostrado no Esquema 12.

Estas substâncias também foram testadas e mostraram ação sinérgica ao Fluconazol no tratamento a cepas resistentes de *Candida albicans* [14]



Esquema 12. Reagentes e condições executadas no trabalho de Daí *et. al* [14]: DCC, tetrahidrofurano (THF), refluxo por 3-6 h.

Um método para esterificação que pode ser também utilizado para síntese de amidas foi descrito por Sheikh e colaboradores [38] onde a feniletilamina (**9**) foi adicionada a uma solução de 3-fenilpropioniloxibenzotiazol (**15**) em CH_2Cl_2 à temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio sob agitação por 8 min. Em seguida, a mistura foi neutralizada por uma solução de ácido acético e extraído com CH_2Cl_2 . Um sólido incolor foi obtido com 89% de rendimento.

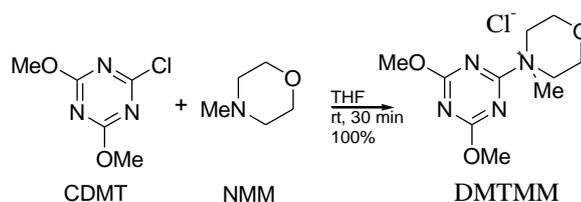


Esquema 13. Reação proposta por Sheikh *et. al* para síntese de amida com DCC [38].

As principais vantagens deste método (esquema 13) são devido à ausência de ácido forte, halogenetos de ácido, reagentes metálicos tóxicos instáveis, ou outros reagentes caros, o que o torna bastante atraente e sustentável [38].

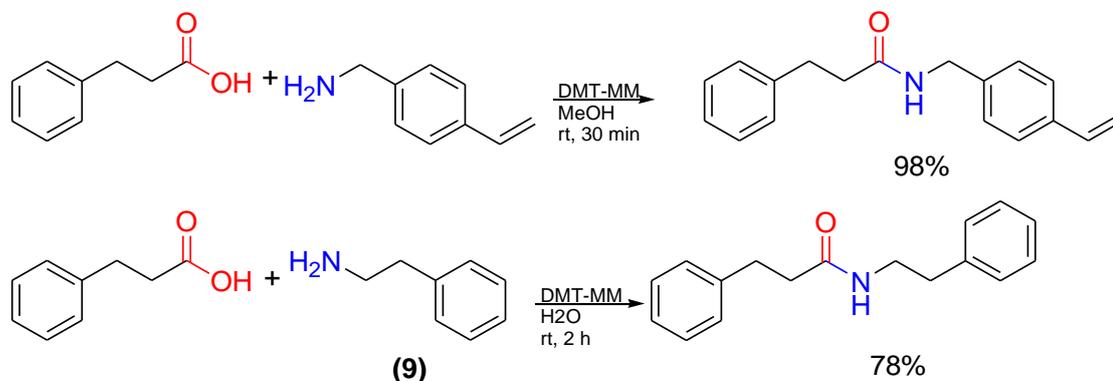
Kunishima relatou em 1999 [41] e em 2001[34] um método para a formação de carboxamidas por condensação direta de ácidos carboxílicos com aminas utilizando o cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (DMT-MM)³ em meio

³Para síntese de DMT-MM a N-metilmorfolina (NMM - 2,02 g, 0,20 mmol) deve ser adicionada a uma solução de 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT - 3,86 g, 22 mmol) em tetrahidrofurano (THF - 60 mL) a temperatura ambiente.



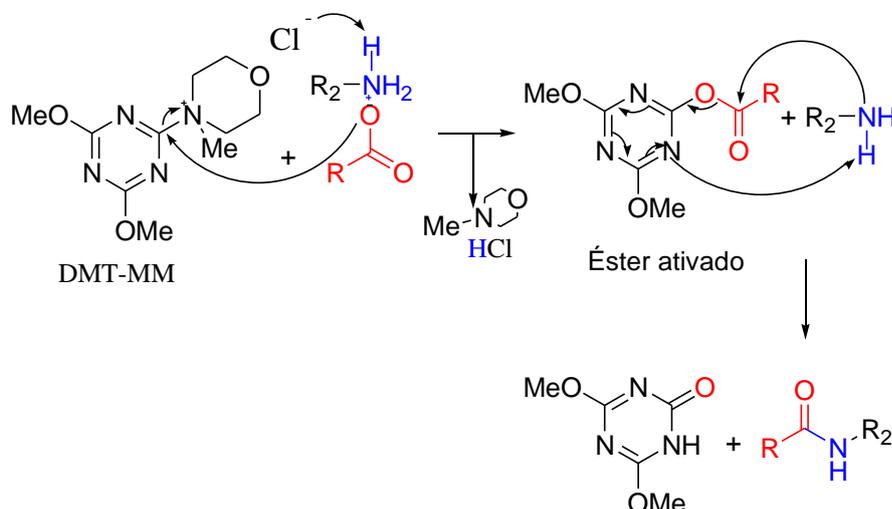
Um sólido branco surge dentro de alguns minutos. Depois de se agitar durante 30 minutos à temperatura ambiente, o sólido deve ser recolhido por sucção, lavado com THF e seco para formar DMT-MM (5,52 g, 100%). Embora a pureza de DMT-MM neste ponto seja suficiente para a condensação, este pode ser recristalizado a partir de metanol e éter gerando um sólido branco [41].

aquoso ou alcoólico. Neste procedimento, o reagente de condensação é simplesmente adicionado a mistura de ácidos e aminas, onde a reação de amidação é obtida com excelentes rendimentos (esquema 14).



Esquema 14. Método para a formação de carboxamidas com uso de DMT-MM com seus respectivos rendimentos [34].

A reação é iniciada pela adição do ânion carboxilato ao DMT-MM para formar o éster ativado, que favorece o ataque nucleofílico da amina para gerar a amida correspondente (esquema 15) [41].



Esquema 15. Mecanismo de formação de amida catalisada por DMT-MM.

Reações semelhantes as do Esquema 14 foram realizadas com metanol, etanol e propanol com excelentes rendimentos e uma seletividade elevada. Em contraste, quando dicicloexilcarbodiimida (DCC) ou cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) foi usado em vez de DMT-MM, rendimentos e seletividade foram considerados pobres (4% e 3,3%, respectivamente) [34].

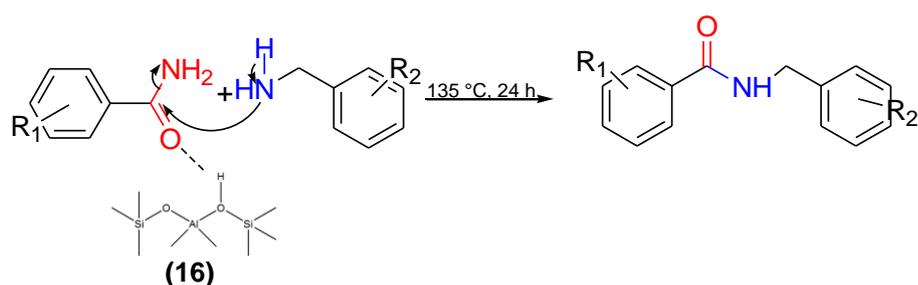
Estudos foram feitos em 2004 por Watanabe e colaboradores [39] com o objetivo de melhorar o uso de DMT-MM que passou a ser adsorvido em fase sólida (pó de alumina B), onde a área de interface das duas fases foi aumentada através da realização de reações no sistema bifásico diclorometano-água sobre a superfície de fase sólida, isto acelerou a reação e melhorou o rendimento (de 61 para 100%).

1.4. OUTRAS SÍNTESES DE AMIDAS

Os químicos vêm desenvolvendo reações de amidação alternativas, os esforços para utilizar substitutos e novos catalisadores para a reação tradicional têm se intensificado nos últimos anos [32].

Uma abordagem eficiente foi adotada por Chevella [42] com um tipo de zeólita, que são compostos tetraédricos formados de SiO_4 e AlO_4 conectados pelos átomos de oxigênio nos vértices, apresentando canais e cavidades onde encontram-se os cátions de compensação, moléculas de água ou outros adsorvatos. Sua estrutura microporosa permite a mobilidade de íons pelos canais e cavidades [43].

Nanozeólitas⁴ (**16**) foram utilizadas para reação de amidação de carboxamidas com uso de aminas em condições livres de solvente. Um mecanismo de reação plausível é ilustrado no Esquema 16.



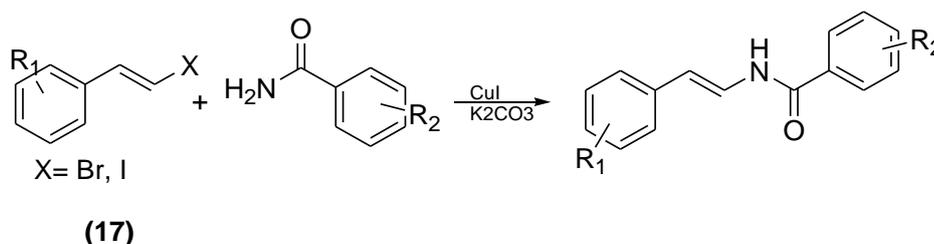
Esquema 16. Reação de amidação com nanozeólitos. Supõe-se que a amida é adsorvida sobre os sítios ácidos de Brønsted de zeólito, que, subsequentemente, reage com a amina seguido por eliminação do amoníaco produzindo a amida desejada. [42].

Este é um protocolo eficaz e verde visto que é realizado em condições livres de solvente orgânico, além disso, a zeólita pode ser reciclada algumas vezes

⁴ são um tipo de zeólitos que têm distribuições de tamanho menor que 200 nm. A redução do tamanho da partícula de micrômetro para nanômetro, leva a uma alteração significativa na área de superfície externa [42].

(recuperada por filtração simples) mantendo altos rendimentos [42], onde três usos ainda mantém acima de 90% de rendimento.

Cheung e Buchwald [44] utilizaram um haleto vinílico, mais especificamente um halogeneto de vinila (**17**), amida, CuI, e K₂CO₃ para uma reação de transamidação. As condições reacionais são mostradas a seguir (esquema 17).



Esquema 17. Reação proposta por Cheung e Buchwald. Reagentes e condições: o halogeneto de vinila e *N, N'*-dimetiletilenodiamina (DMEDA) foram adicionados a um tubo, seguido por THF anidro através de uma seringa. A reação ocorreu sob agitação a 80 ° C por 12 h.

A Tabela 1 mostra um resumo das sínteses de amidas de interesse abordadas nesta revisão.

Nota-se que as possibilidades de produção de amidas são as mais diversas. As reações de acoplamento foram escolhidas para a síntese das amidas nesta tese. A escolha deste método foi em virtude do número de etapas reduzido (conseqüentemente número reduzido de subprodutos), com reagentes disponíveis e baratos, além de uma metodologia simplificada, como recomenda as novas tendências da Química Verde.

Tabela 1. Resumo dos métodos sintéticos para produção de amidas derivadas do ácido cinâmico.

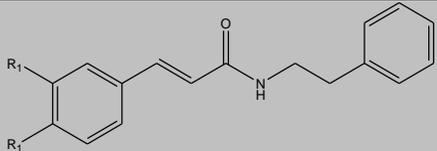
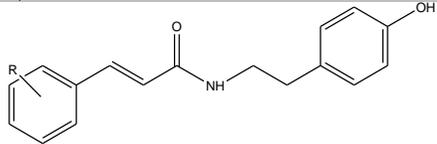
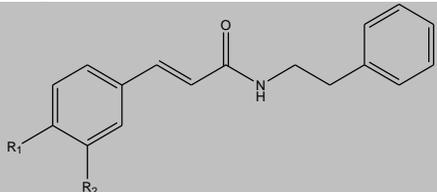
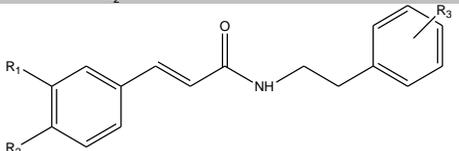
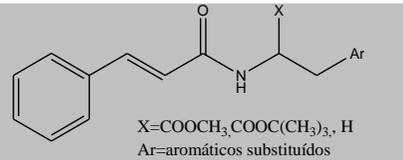
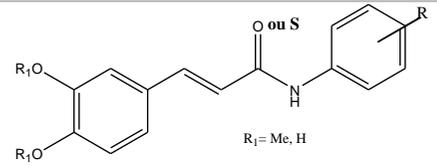
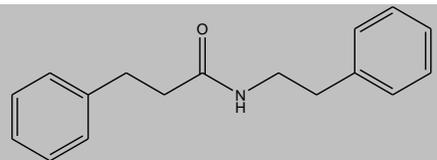
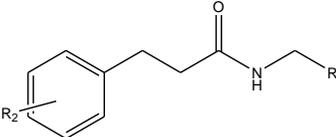
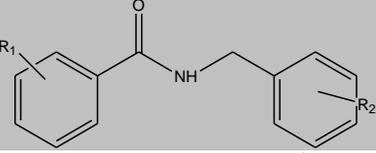
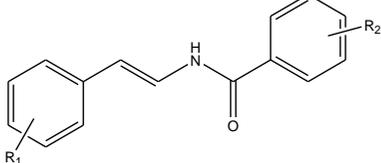
<i>Autor, ano</i>	<i>Tipo de síntese</i>	<i>Reagentes e condições</i>	<i>Rendimento</i>	<i>Estrutura geral</i>	<i>Atividade biológica</i>
Boudreau et. al, 2012	Ativação da porção ácida	Cloreto de tionila/DMF	Ni		Anti-inflamatória
Chan et. al, 2013	Ativação da porção ácida	Cloreto de cinamoíla, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , nitrogênio	84%		Anti-inflamatória
Yamazaki et. al, 2008	Ativação da porção ácida	Piridina, Tolueno	81%		Diminuição dos níveis de adiponectina
Shi et. al, 2013	Reagente de acoplamento	BOP/ Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , DMF	74-88%		Antitumoral
Georgiev et. al, 2013	Reagente de acoplamento	EDC/ Butanol, Et ₃ N, DMF	35-80%		Inibidor da tirosinase (atividade melanogênica)
Daí et. al, 2015	Ativação da porção ácida; Reagente de acoplamento	Cloreto de oxalila, TEA, CH ₂ Cl ₂ , Reagente de Lawersson; DCC/THF, refluxo	Ni		Sinergia com fluconazol (antifúngico)
Sheikh et. al, 2010	Reagente de acoplamento	DCC/ CH ₂ Cl ₂ , atmosfera de nitrogênio	89%		*

Tabela 1. (continuação) Resumo dos métodos sintéticos para produção de amidas derivadas do ácido cinâmico.

Kunishima <i>et. al</i>, 2001	Reagente de acoplamento	DMT-MM/ Metanol Água	>82%		*
Chevella <i>et. al</i>, 2016	Nanozeólitos	-	45-97%		*
Cheung e Buchwald <i>et. al</i>, 2012	Amidação de haletos de vinila catalisado por cobre	CuI, e K ₂ CO ₃ DMEDA, THF	24-88%		*

Ni – Não informado. *- Não há dados.

1.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO

A atividade antimicrobiana em produtos naturais vem sendo amplamente estudada [1], onde o desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos alternativos contra bactérias patogênicas é de grande importância [45].

Devido a sua diversidade bioquímica, produtos de origem vegetal e marinha são uma grande fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos [1].

Dentre os produtos naturais, aqueles relacionados à canela e própolis são largamente utilizados como “antibióticos naturais”, sendo os derivados de ácidos cinâmicos algumas das substâncias responsáveis pelos efeitos terapêuticos relacionados a estas preparações [3].

Os ácidos cinâmicos têm sido vastamente estudados devido à maioria dos seus derivados ésteres, amidas, aldeídos e álcoois, apresentarem diversas ações terapêuticas como anti-inflamatória [8,9], antitumoral [10], antimalárico [5,11,12], anti-tripanosossoma [13] e atividade inibitória frente a uma variedade de microrganismos [3,5,14–16] cujo mecanismo de ação é pouco conhecido [3,5].

O estudo sintético referente a amidas derivadas de ácidos cinâmicos vêm se amplificando, com o objetivo de verificação do seu potencial terapêutico frente as mais diversas patologias, sendo descritas importantes atividades biológicas tais como antibiótica [3,25–28] e antifúngica [16,25,29].

Desta forma, a síntese de novas cinamamidas pode ser a chave para o desenvolvimento novas drogas com potencial antimicrobiano.

1.6. ATIVIDADE ANTITOXOPLASMA DE AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO CINÂMICO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, uma das infecções parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais [46].

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada [47], e as manifestações clínicas incluem encefalite, coriorretinite, malformações congênitas e mortalidade neonatal [48,49] onde a sintomatologia pode ser agravada em indivíduos imunocomprometidos [50,51], deixando sequelas, podendo inclusive, ser fatal [46].

A transmissão da toxoplasmose pode ocorrer através da ingestão de água ou alimentos contaminados pelos oocistos de fezes de felídeos (hospedeiro definitivo), ou de cistos teciduais encontrados em carne crua ou em vísceras cruas ou mal cozidas dos hospedeiros intermediários. Outras formas de transmissão menos comuns são devido à taquizoítos contidos em produtos sanguíneos, transplantes de tecido ou leite não pasteurizado [50,51].

Os tratamentos mais indicados para toxoplasmose consistem no uso de sulfadiazina, juntamente com pirimetamina. Essa combinação de drogas serve de parâmetro para outras opções terapêuticas [46,51,52], a fim de reduzir os efeitos colaterais relacionados ao tratamento [52].

Diversos estudos têm sido realizados buscando a redução dos efeitos tóxicos, onde as tiosemicarbazonas e tiazolidinas têm sido vastamente estudadas [53–55].

Apesar das diversas atividades biológicas encontradas nas amidas derivadas ácido cinâmico, não é descrito na literatura, até o momento, a atividade anti*Toxoplasma gondii* [50,51].

Neste trabalho, oito amidas derivadas do ácido cinâmico foram testadas biologicamente com a finalidade de verificar seu potencial antimicrobiano e anti*Toxoplasma gondii in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Sintetizar amidas derivadas de ácido cinâmico como potenciais agentes biológicos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Sintetizar amidas derivadas de ácido cinâmico através de reações de acoplamento,
- Avaliar o potencial biológico das moléculas sintetizadas frente a diferentes cepas bacterianas,
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) para cada cepa testada,
- Verificar sinergia com antibióticos convencionais através de antibiograma,
- Avaliar o potencial biológico das moléculas sintetizadas frente ao protozoário *Toxoplasma gondii*,
- Verificar a toxicidade das amidas sintetizadas em culturas celulares LLC-MK2,
- Verificar a atividade das substâncias frente a células infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SÍNTESE

3.1.1. Materiais

Todos reagentes utilizados foram de grau P.A. da marca SIGMA-ALDRICH. Para a cromatografia de camada delgada foram utilizadas placas cromatográficas da Merck de sílica gel 60 sobre alumínio com fluorescência. Os métodos de revelação foram o de câmara de luz UV de $\lambda = 254$ nm e atmosfera de iodo como métodos não destrutivo e solução alcoólica de ácido sulfúrico 40% como método destrutivo.

3.1.1.1. Equipamentos de laboratório

Os equipamentos gerais de laboratório foram: evaporador rotatório para remoção de solventes a pressão reduzida; estufa para secagem de vidrarias; aquecedor/ agitador magnético; balança analítica (0,0001g); câmara de luz UV de $\lambda = 254$ nm.

3.1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Aparelho de Ressonância Magnética da marca BRUKER modelo Avance III (125 Hz para o carbono ¹³ e 500 Hz para hidrogênio) em clorofórmio deuterado (CDCl₃) medido em partes por milhão (ppm) e constantes de acoplamento (*J*) em Hz. A multiplicidade foi descrita como singleto (*s*), dubleto (*d*), tripleto (*t*), quarteto (*q*) e multiplete (*m*).

O tratamento dos dados foi realizado pelo software ACD/Spectrus.

3.1.1.3. Infravermelho (IV)

Os espectros de Infravermelho foram obtidos em um espectrômetro IR-Affinity (Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando pastilha de KBr. O tratamento dos dados foram realizadas pelo software IR Solution.

3.1.1.4. *Ponto de Fusão*

Aparelho de ponto de fusão da MICROQUÍMICA modelo MQAPF-301.

3.1.1.5. *Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas*

Para confirmação da pureza e da massa atômica para as substâncias foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS) modelo 5975C Inert XL EI/CI/MS Agilent Technologies, utilizando a técnica de impacto de elétrons e equipado com uma coluna HP-5MS de 30 metros, diâmetro interno de 0,25 mm e filme de 0,25 µm, utilizando hélio como gás de arraste. a temperatura do injetor e detector foi de 280° C. Todas as análises foram executadas nas seguintes condições: temperatura inicial de 80° C, temperatura final de 280° C com um gradiente de temperatura de 10° C por minuto com fluxo de hélio total de 9 mL/min.

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. *Procedimento sintético geral*

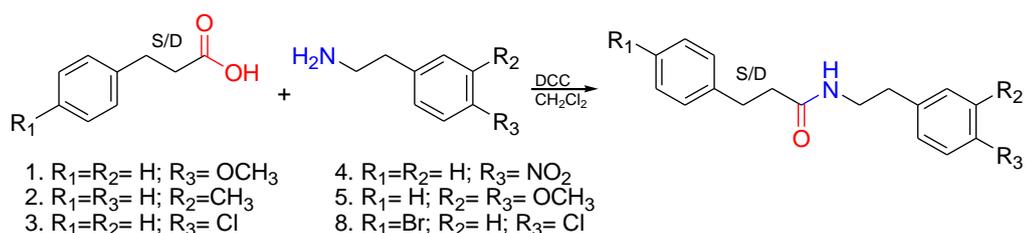
Todo procedimento foi realizado no setor de Síntese Orgânica e Química Fina do Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

A síntese das amidas derivadas de ácido cinâmico procedeu com a substituição dos grupos da cadeia aromática e retirada da insaturação da cadeia linear (**C8**).

Oito substâncias foram sintetizadas através da reação de condensação de ácidos carboxílicos com feniletílamidas por ativação da porção ácida, sendo seis (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5** e **C8**) produzidas utilizando *N,N*-dicicloexilcarbodiimida (DCC – SIGMA ALDRICH, USA) como agente de acoplamento. Para as substâncias **C6** e **C7** foi utilizado o cloreto de ácido correspondente.

3.1.2.2. Procedimento sintético geral para os substâncias **C1-C5** e **C8**

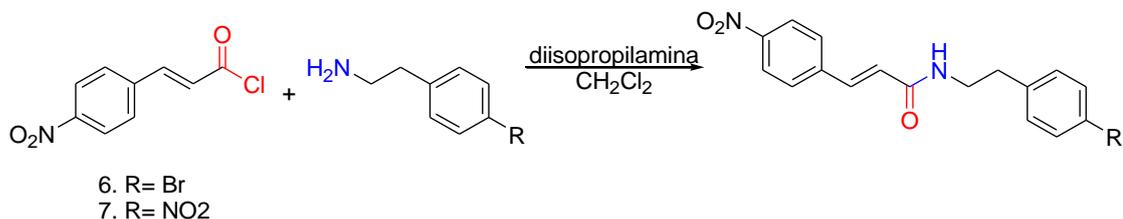
Foram adicionados 0.2 mmol de ácido cinâmico (ou derivado) junto a quantidades equimolares de DCC e das respectivas aminas em diclorometano adicionado a 0°C e agitados por 48 horas em atmosfera de argônio. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada e purificada através de coluna cromatográfica de sílica gel, eluição de hexano:acetato de etila (1:1) [14,38].



Esquema 18. Procedimento geral de síntese com DCC.

3.1.2.3. Procedimento sintético para os substâncias **C6** e **C7**

Foram adicionados 0.2 mmol de cloreto de *p*-nitrocinaoila juntamente com diisopropilamina e quantidades equimolares das feniletilaminas correspondentes em diclorometano [9,14] adicionado a 0°C e agitados por 48 horas em atmosfera de argônio. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada e purificada através de extração com funil de separação (diclorometano:água).



Esquema 19. Procedimento geral de síntese com cloreto de *p*-nitrocinaoila.

3.1.2.4. Dados experimentais

Substância C1: *N*-[2-(4-metoxifenil)-etil]-3-fenilacrilamida.

- Sólido amorfo de coloração amarelada;
- Rendimento: 39.9%;

- PF: 137.4-137.9°C;
- MS (EM), $m/z= 341.1$.

IV (ν cm^{-1} KBr): ν 1624 (N-H), 3312 (N-H), 1655 cm^{-1} (C=O); RMN ^1H (CDCl_3 , 500 Hz/ppm): δ_{H} 7.64 (*d*, $J=15.6$ Hz, 1H, C=CH), 7.51-7.48 (*m*, 2H, Ar-H), 7.39-7.35 (*m*, 3H, Ar-H), 7.18-7.14 (*m*, 2H, Ar-H), 6.90-6.86 (*m*, 2H, Ar-H), 6.36 (*d*, $J=15.6$ Hz, 1H, C=CH), 3.64 (*q*, $J=6.7$ Hz, 2H, -CH₂), 2.85 (*t*, $J=6.7$ Hz, 2H, -CH₂), 2.81 (*s*, 3H, OCH₃); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz/ppm) δ_{C} 165.9 (C=O), 158.3 (C), 140.0 (CH), 134.8 (C), 130.8 (C), 129.8 (C), 129.7 (C), 128.8 (C), 127.8 (C), 120.7 (CH), 114.1 (C), 55.2 (OCH₃), 41.0 (CH₂), 34.8 (CH₂).

Substância C2: 3-fenil-*N*-(2-*m*-toliletil)-acrilamida.

- Sólido amorfo de coloração amarelada;
- Rendimento: 49.4%;
- PF: 126.0-126.4°C;
- MS (EM), $m/z= 265.1$.

IV (ν cm^{-1} KBr): ν 1618 (N-H), 3277 (N-H), 1657 (C=O) cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 Hz/ppm): δ_{H} 7.64 (*d*, $J=15.3$ Hz, 1H, C=CH), 7.52-7.48 (*m*, 2H, Ar-H), 7.40-7.35 (*m*, 3H, Ar-H), 7.07 (*m*, 1H, Ar-H), 7.10-7.03 (*m*, 3H, Ar-H), 6.36 (*d*, $J=15.3$ Hz, 1H, C=CH), 3.68 (*q*, $J=6.8$ Hz, 2H, -CH₂), 2.88 (*t*, $J=6.8$ Hz, 2H, -CH₂), 2.38 (*s*, 3H, CH₃); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz/ppm) δ_{C} 165.9 (C=O), 141.0 (CH), 138.9 (C), 138.5 (C), 134.9 (C), 129.7 (C), 129.7 (C), 128.8 (C), 128.6 (C), 127.8 (C), 127.3 (C), 125.8 (C), 120.7 (CH), 40.9 (CH₂), 35.6 (CH₂), 21.6 (CH₃).

Substância C3: *N*-[2-(4-clorofenil)-etil]-3-fenilacrilamida.

- Sólido amorfo de coloração branca;
- Rendimento: 63.8%;
- PF: 163.4-164.0°C;
- MS (EM), $m/z= 285.1$.

IV (ν cm^{-1} KBr): ν 1620 (N-H), 1651 (C=O) 3300 (N-H) cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 Hz/ppm): δ_{H} 7.64 (*d*, $J=15.6$ Hz, 1H, C=CH), 7.52-7.49 (*m*, 2H, Ar-H), 7.39-7.36 (*m*, 3H, Ar-H), 7.32-7.29 (*m*, 2H, Ar-H), 7.19-7.16 (*m*, 2H, Ar-H), 6.35 (*d*, $J=15.6$ Hz, 1H, C=CH), 3.65 (*q*, $J=6.7$ Hz, 2H, -CH₂), 2.89 (*t*, $J=6.7$ Hz, 2H, -CH₂); RMN ^{13}C (CDCl_3 ,

125 MHz/ppm) δ_C 165.9 (C=O), 141.3 (CH), 137.3 (C), 134.7 (C), 132.4 (C), 130.2 (C), 129.8 (C), 128.8 (C), 127.8 (C), 40.7 (CH₂), 35.0 (CH₂).

Substância C4: *N*-[2-(4-nitrofenil)-etil]-3-fenilacrilamida.

- Sólido amorfo de coloração amarelada;
- Rendimento: 42.2%;
- PF: 152.9-153.0°C;
- MS (EM), m/z = 296.1.

IV (ν cm⁻¹ KBr): ν 1612 (N-H), 1651 (C=O) 3312 (N-H) cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 500 Hz/ppm): δ_H 8.20-8.15 (*m*, 2H, Ar-H), 7.66 (*d*, J =15.3 Hz, 1H, C=CH), 7.52-7.49 (*m*, 2H, Ar-H), 7.42-7.36 (*m*, 5H, Ar-H), 6.39 (*d*, J =15.3 Hz, 1H, C=CH), 3.71 (*q*, J =7.0 Hz, 2H, -CH₂), 3.04 (*t*, J =7.0 Hz, 2H, -CH₂); RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz/ppm) δ_C 166.1 (C=O), 146.8 (C), 146.8 (C), 141.6 (CH), 134.6 (C), 129.9 (C), 128.9 (C), 127.8 (C), 123.9 (C), 120.2 (CH), 40.5 (CH₂), 35.7 (CH₂).

Substância C5: *N*-[2-(3,4-dimetoxifenil)-etil]-3-fenilacrilamida.

- Sólido cristalino;
- Rendimento: 32.5%;
- PF: 110.8-111.0°C;
- MS (EM), m/z = 311.1.

IV (ν cm⁻¹ KBr): ν 1622 (N-H), 1655 (C=O) 3347 (N-H) cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 500 Hz/ppm): δ_H 7.64 (*d*, J =15.6 Hz, 1H, C=CH), 7.52-7.47 (*m*, 2H, Ar-H), 7.39-7.34 (*m*, 3H, Ar-H), 6.80-6.74 (*m*, 2H, Ar-H), 6.84 (*m*, 1H, Ar-H), 6.36 (*d*, J =15.6 Hz, 1H, C=CH), 3.88 (*s*, 6H, OCH₃), 3.65 (*q*, J =6.8 Hz, 2H, -CH₂), 2.86 (*t*, J =6.8 Hz, 2H, -CH₂); RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz/ppm) δ_C 165.9 (C=O), 149.1 (C), 147.8 (C), 141.1 (CH), 131.4 (C), 129.7 (C), 128.8 (C), 127.9 (C), 120.7 (C), 120.6 (CH), 112.0 (C), 111.4 (C), 56.0 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 41.0 (CH₂), 35.2 (CH₂).

Substância C6: *N*-[2-(4-bromofenil)-etil]-3-(4-nitrofenil)-acrilamida.

- Sólido cristalino de coloração amarelada;
- Rendimento: 89,6%;
- PF: 146.0-147.0°C;
- MS (EM), m/z = 374.0.

IV (ν cm^{-1} KBr): ν 1618 (N-H), 1651 (C=O) 3292 (N-H) cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 Hz/ppm): δ_{H} 8.25-8.22 (*m*, 2H, Ar-H), 7.66-7.63 (*m*, 2H, Ar-H), 7.68 (*d*, $J=15.7$ Hz, 1H, C=CH), 7.48-7.45 (*m*, 2H, Ar-H), 7.13-7.10 (*m*, 2H, Ar-H), 6.47 (*d*, $J=15.7$ Hz, 1H, C=CH), 3.67 (*q*, $J=6.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.88 (*t*, $J=6.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz/ppm) δ_{C} 164.9 (C=O), 148.2 (C), 141.2 (C), 138.7 (CH), 137.6 (C), 131.8 (C), 130.5 (C), 128.4 (C), 124.5 (CH), 124.2 (C), 40.8 (CH_2), 35.0 (CH_2).

Substância C7: 3-(4-nitrofenil)-*N*-[2-(4-nitrofenil)-etil]-acrilamida.

- Sólido amorfo de coloração avermelhada;
- Rendimento: 82.3%;
- PF: 149.6-151.2°C;
- MS (EM), $m/z= 341.1$.

IV (ν cm^{-1} KBr): ν 1620 (N-H), 1651 (C=O) 3294 (N-H) cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 Hz/ppm): δ_{H} 8.26-8.18 (*m*, 4H, Ar-H), 7.70 (*d*, $J=15.4$ Hz, 1H, C=CH), 7.67-7.59 (*m*, 2H, Ar-H), 7.44-7.40 (*m*, 2H, Ar-H), 6.48 (*d*, $J=15.4$ Hz, 1H, C=CH), 3.74 (*q*, $J=7.0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 3.06 (*t*, $J=7.0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz/ppm) δ_{C} 164.9 (C=O), 148.3 (C), 146.9 (C), 146.5 (C), 140.9 (C), 139.1 (CH), 129.7 (C), 128.4 (C), 124.2 (C), 123.9 (C), 123.9 (CH), 40.6 (CH_2), 35.6 (CH_2).

Substância C8: 3-(4-bromofenil)-*N*-[2-(4-clorofenil)-etil]-acrilamida.

- Sólido cristalino;
- Rendimento: 64.0%;
- PF: 130.0-131.1°C;
- MS (EM), $m/z +2= 367.0$.

IV (ν cm^{-1} KBr): ν 1639 (C=O), 3290 (N-H est) cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 Hz/ppm): δ_{H} 7.44-7.39 (*m*, 2H, Ar-H), 7.28-7.25 (*m*, 2H, Ar-H), 7.09-7.06 (*m*, 2H, Ar-H), 7.04-6.99 (*m*, 2H, Ar-H), 3.47 (*q*, $J=6.9$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.92 (*t*, $J=7.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.73 (*t*, $J=6.9$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 4.01 (*t*, $J=7.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz/ppm): δ_{C} 171.6 (C=O), 139.8 (C), 137.2 (C), 132.4 (C), 131.6 (C), 130.2 (C), 130.0 (C), 128.1 (C), 120.1 (C), 40.5 (CH_2), 38.2 (CH_2), 35.0 (CH_2), 31.0 (CH_2).

3.2. ENSAIO ANTIMICROBIANO

Os testes microbianos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Sanidade Animal do Centro de Ciência e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ (LSA/CCTA/UENF) sob a orientação do Prof. Dr. Olney Vieira-da-Motta.

3.2.1. Ensaio para obtenção concentração mínima inibitória (CMI)

As cepas bacterianas formadoras de biofilme *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), e não formadoras de biofilme *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), cepa bovina *Staphylococcus aureus* (LSA88 SEC+/SED+/TSST-1+)[56], *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), foram obtidas da coleção bacteriana do Laboratório de Sanidade Animal (LSA), Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ, Brasil.

Com exceção da bactéria *S. aureus* (LSA88) que é uma Cepa Clínica isolada de mastite bovina (isolada no próprio laboratório), todas as demais cepas utilizadas neste experimento foram procedentes da Fundação Oswaldo Cruz – RJ.

A atividade antibacteriana *in vitro* das amidas foi investigada pelo método de diluição em caldo. As cepas dos microrganismos foram cultivadas em ágar estoque (BHA Brain Heart ágar, Himedia, Índia), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Himedia, Índia) e semeadas em ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA), e levadas à estufa de crescimento bacteriológico (Quimis) a 37°C por 24 horas.

O inóculo foi obtido do caldo de cultura na fase logarítmica de crescimento através da leitura fotométrica (Densimat - bioMérieux, França) contendo 1×10^8 UFC.mL⁻¹ correspondente a 0,5 McFarland e diluído para 1×10^6 UFCmL⁻¹. Testes com gentamicina na concentração de 10 µg/mL (antibiótico controle) foram conduzidos simultaneamente. O meio de crescimento bacteriano utilizado também foi o ágar Mueller Hinton (Acumedia, EUA).

Todas as substâncias **C1-C8** foram solubilizadas em DMSO estéril (DMSO - Sigma Aldrich, USA) na concentração de 15000 ppm. (estoque em temperatura

ambiente), em seguida foram realizadas diluições em água estéril, concentração final de 5000 ppm.

Para a realização do teste, 10 µL da amostra diluída foi adicionada a 170 µL de caldo Müller Highton (MH) líquido (Acumedia, Índia) em tubos do tipo *eppendorfs* (2,0 mL), juntamente com um volume de 20 µL de suspensão da bactéria utilizada, padronizada pela turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland (inóculo).

Após a incubação, os tubos foram colocados em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 6 horas. Após este período, uma alíquota de 50 µL do conteúdo de cada tubo foi semeada, com auxílio de swab, em placas de Petri contendo meio MH sólificado (Himedia, Índia). Após a incubação das placas (em estufa de crescimento bacteriológico a 37°C 12-14 horas figura 1), foi identificada a presença ou ausência de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) obtidas em cada experimento, com subsequente comparação com o controle (figura 2) [57].

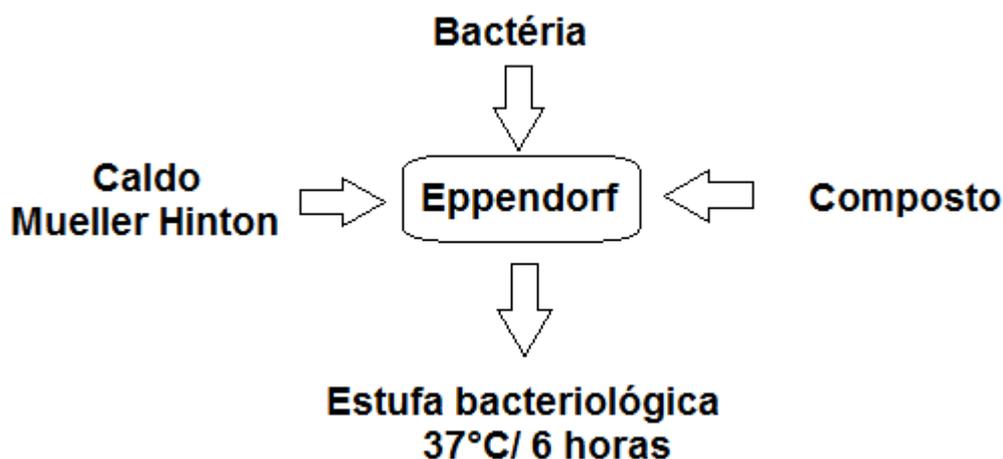


Figura 4. Esquema do ensaio microbiológico.

Os controles foram preparados de maneira semelhante às substâncias puras, sendo adicionados 180 µL de caldo Mueller Hinton e 20 µL de inóculo, 10 µL de Gentamicina como controle positivo. Para o controle negativo foram adicionados 170 µL de caldo Mueller Hinton e 20 µL de inóculo.

Subsequentemente, as placas de cultura celular foram utilizadas para ensaios de concentração mínima inibitória (CMI), e soluções das substâncias químicas diluídas em série (0,1 mL), semeadas em cada amostra de cada cepa de bactéria (0,1 mL),

que foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 12-16 horas (figura 3).

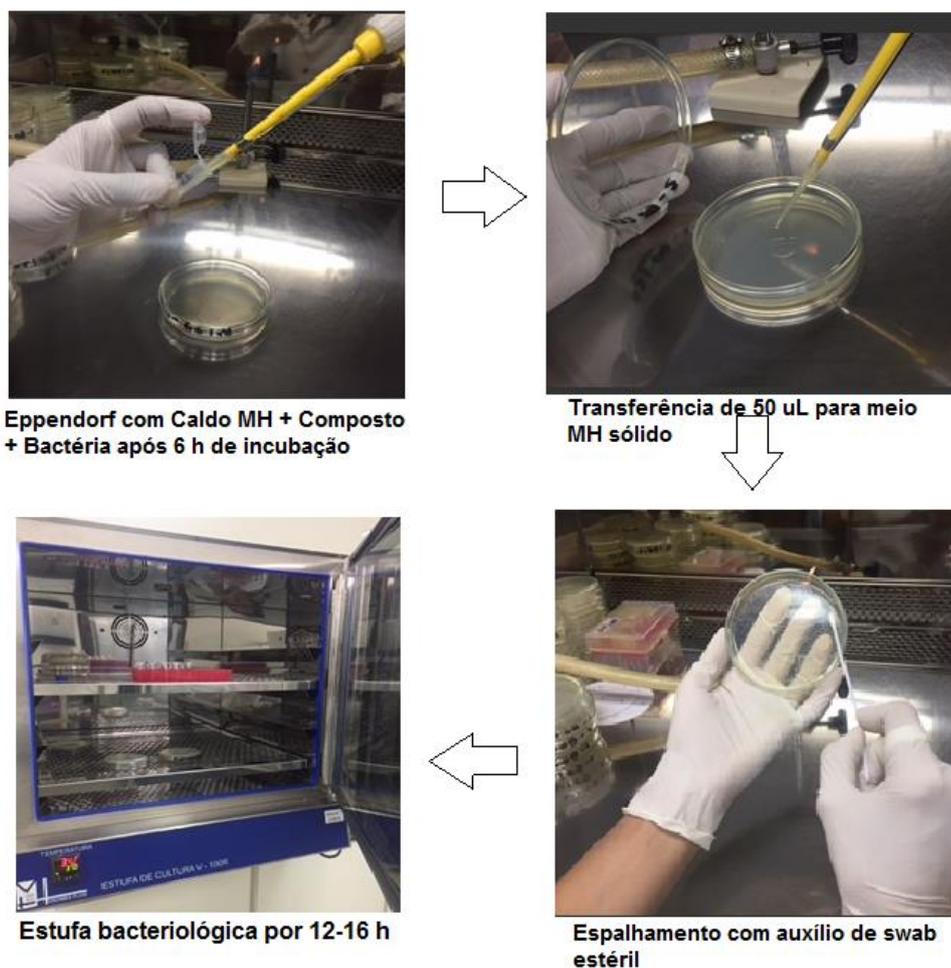


Figura 5. Procedimento experimental do ensaio microbiológico.

A análise da Concentração Mínima Inibitória foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros:

- Ausência de crescimento correspondeu ao não crescimento de unidade formadora de colônia (controle positivo - gentamicina);
- Crescimento aparente com a formação entre 30 e 300 UFC (correspondente a CMI);
- Presença de um número superior a 300 UFC (atividade inibitória sem determinação da CMI);
- Aspecto de confluência de colônia, considerado como ausência de atividade.

3.2.2. Antibiograma

Uma vez estabelecido o valor da CMI para cada substância, procedeu-se com um ensaio de sinergia para verificar a potencialização da ação dos antibióticos convencionais juntamente com os produtos para as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923 e LSA 88).

Para o teste padrão de atividade antimicrobiana, o método de difusão em disco foi utilizado em ágar Mueller Hinton, de acordo com as diretrizes do Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico [58].

Os discos continham os seguintes medicamentos: penicilina G (PEN, 10UI), oxacilina (OXA, 1 µg), amoxicilina (AMO, 10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 20/10 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), cefalexina (CFX, 30 µg), sulfazotrim (SUT, 25 µg), clindamicina (CLI, 2 µg), eritromicina (ERI, 15 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), tetraciclina (TET 30 µg) e vancomicina (VAN, 30 µg) (Laborclin, PR, Brasil).

Os halos de inibição formados em torno de cada disco foram mensurados com um paquímetro digital (Mitutoyo/CD-6"CSX-B) e os valores submetidos ao teste t de Tukey[59] 1 e 5%.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3. ENSAIO ANTITOXOPLASMA

Os ensaios de atividade *Toxoplasma gondii* foram realizados Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ (LBCT/CBB/UENF) sob a orientação do prof. Dr. Edésio José Tenorio de Melo. O procedimento foi realizado como descrito por Pessanha [60] e Liesen e colaboradores [54].

3.3.1. Célula hospedeira (LLC-MK2)

O modelo de célula hospedeira utilizado neste trabalho foi uma linhagem celular estabelecida e muito empregada em diversos estudos da área biológica - as células LLC-MK2 – fibroblastos renais de macaco verde africano, linhagem esta

muito utilizada em testes biológicos. São células que suportam longos períodos de infecção com taquizoítos de *T. gondii*, não sofrendo aparentemente drásticas mudanças morfológicas. Devido a essas características, essa linhagem celular tem se mostrado um bom modelo de célula hospedeira para o estudo de interação com o *Toxoplasma gondii*.

Esta cultura foi mantida em garrafas plásticas estéreis de 25 cm² com 5 mL do meio DMEM 1152 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB/GIBCO) até alcançarem o estágio de monocamada.

Após esse estágio, a cultura foi lavada com 3 mL de PBS (SIGMA-ALDRICH) estéril por 2 vezes. Sendo posteriormente adicionado 1 mL de Tripsina Versene Bovina, 0,25% (SIGMA-ALDRICH) a cultura por aproximadamente 30 segundos. Foram adicionados 5 mL de meio DMEM 1152 contendo 5% de SFB à cultura tripsinizada. Aproximadamente 2x10⁵ células foram distribuídas em placas de 24 poços e posteriormente, incubadas por 24h em estufa 37°C.

3.3.2. Parasito *Toxoplasma gondii*

Os testes foram feitos com taquizoítos do *Toxoplasma gondii*: cepa RH (cepa virulenta). A manutenção dos parasitos é feita em células LLC-MK2, com manutenção e suplementação igual ao descrito no item 2.1. As células foram infectadas na proporção de 10 parasitos por célula.

A obtenção do parasita se deu através de retirada do sobrenadante de garrafas infectadas após centrifugação

3.3.3. Toxicidade das substâncias em células LLC-MK2

A fim de verificar a citotoxicidade, estas culturas foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações (variando de 0.19 a 2.92 mM - tabela 1) das amidas **C1**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6** e **C7**. Este teste foi realizado a fim de encontrar a dose que não oferece toxicidade para células LLC-MK2, ou seja, dose em que a substância não apresente danos aparentes nas células hospedeiras.

A avaliação do grau de toxicidade das substâncias testadas nas diferentes concentrações foi determinada através da observação de alterações morfológicas comparando-se com controle.

3.3.4. Interação *Toxoplasma gondii* - células LLC-MK2

Para o teste de atividade anti*T. gondii* as células foram infectadas com taquizoítos (1:5) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Após o período de interação com os parasitas, as culturas foram tratadas com os derivados de ácido cinâmico em diferentes concentrações por 24 horas. O controle do processo experimental foi célula infectada e não tratada.

Após o tratamento as culturas foram lavadas com Phosphate Buffer Solution (PBS) e fixada utilizando 4% de paraformaldeído e corado com solução de GIEMSA. Posteriormente, as culturas foram analisadas por microscopia óptica (AXIOPLAN/Zeiss Germany) e o número de células infectadas e não infectadas, assim como parasitos intracelulares foram quantificados e análises quantitativas foram efetuadas a fim de verificar a atividade antitoxoplasma.

A concentração mais significativa foi aquela em que na sua presença não foi possível verificar danos aparentes nas células hospedeiras e ao mesmo tempo foi possível observar severos danos nos parasitas no interior da célula hospedeira.

Os experimentos foram realizados em triplicada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SÍNTESE

As oito amidas foram sintetizadas (figura 4) por dois métodos: reação de acoplamento dos derivados dos ácidos cinâmicos com feniletilaminas substituídas utilizando dicicloexilcarbodiimina (DCC) como agente de acoplamento, para a obtenção das amidas **C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5** e **C8**; e reação de substituição nucleofílica utilizando as aminas *p*-nitrofeniletilamina e *p*-bromofeniletilamina e o cloreto de *p*-nitrocinamoila resultando nas amidas **C6** e **C7**. Destas, as reações substituição nucleofílica produziram melhores rendimentos.

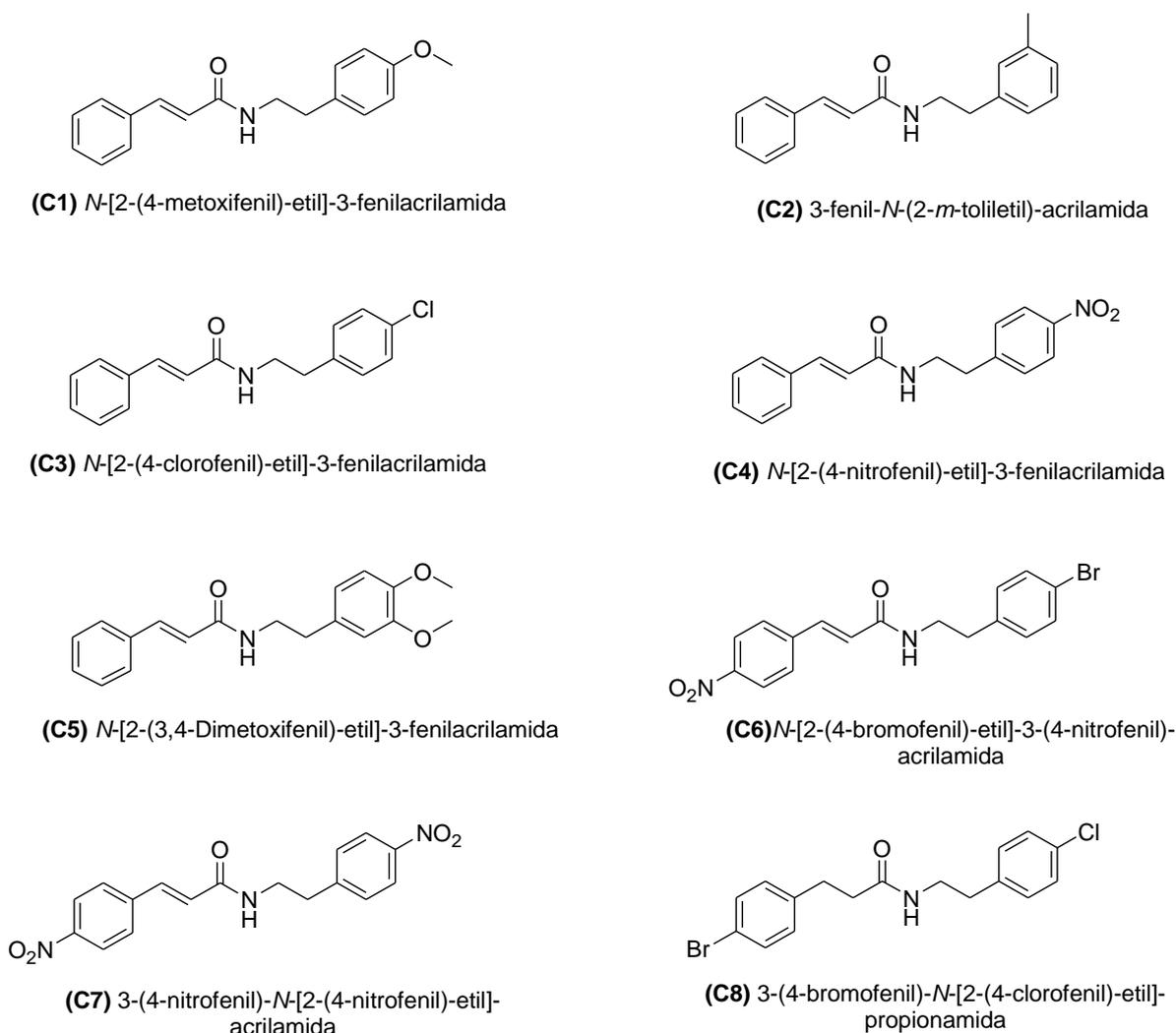


Figura 6. Estrutura química das substâncias **C1-C8**.

A síntese clássica envolvendo DCC é descrita por diversos autores [14,38,61], mostrando menores rendimentos assim como os destacados por Kunishima que comparou diversos tipos de agentes de acoplamento em reações de condensação de ácidos carboxílicos e aminas [34].

A reação de acoplamento envolvendo cloreto de cinamoíla também é amplamente descrito na literatura para síntese de amidas [8,9,14,16], que demonstra maiores rendimentos, assim como demonstrado no presente estudo, além disso o processo de purificação se mostrou mais rápido e efetivo, obtendo os produtos com maior pureza.

Todos os produtos obtidos se mostraram sólidos a temperatura ambiente com pontos de fusão entre 110.8-164.0°C (tabela 2).

Tabela 2. Rendimento e ponto de fusão das amidas derivadas do ácido cinâmico sintetizadas.

Substância	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)
C1	39.9	137.4 - 137.9
C2	49.4	126.0 - 126.4
C3	63.8	163.4 - 164.0
C4	42.2	152.9 - 153.0
C5	32.5	110.8 - 111.0
C6	89.6	146.0 - 147.0
C7	82.3	149.6 - 151.2
C8	64.0	130.0 - 131.1

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas (CG/MS) foi utilizada para a verificação da pureza dos produtos finais, assim como o peso molecular de cada substância (tabela 3).

Tabela 3. Tabela do íon molecular (*m/z*) encontrado para cada uma das amidas sintetizadas.

Substância	Pureza (%)	<i>m/z</i>
C1	98.2	281.0
C2	97.4	265.1
C3	94.3	285.1
C4	95.7	296.1
C5	97.9	311.2
C6	98.1	374.0
C7	98.0	341.1
C8	98.9	367.0

O produto desejado foi identificado através do íon molecular condizente com a massa das respectivas substâncias (tabela 3). Observa-se que as substâncias sintetizadas apresentavam pureza significativa (acima de 94%), requisito para a admissão destes em testes biológicos.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (KBr) das substâncias evidenciaram a formação do grupamento amida, mostrando absorções características na região do infravermelho nas faixas 1639-1657 e 3277-3347 cm^{-1} , correspondentes a estiramentos C=O e N-H, respectivamente (tabela 4).

Tabela 4. Tabela dos estiramentos referentes aos grupamentos C=O e N-H das amidas sintetizadas.

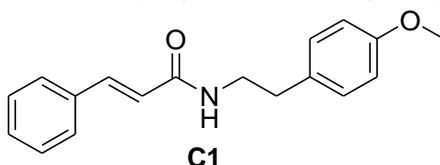
Substância	C=O ($\nu \text{ cm}^{-1}$)	N-H ($\nu \text{ cm}^{-1}$)
C1	1655	3312
C2	1657	3277
C3	1651	3300
C4	1651	3312
C5	1655	3347
C6	1651	3292
C7	1620	3294
C8	1639	3290

A elucidação estrutural das substâncias também foi estabelecida por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC). Na qual foi observada, em todas as substâncias a presença de um sinal quadruplo entre 3.64-3.74 ppm relativo ao metileno adjacente ao átomo de nitrogênio da amida.

No espectro de RMN ^{13}C foi observado sinais relativos a grupos carbonila das amidas entre 164-172 ppm. A confirmação destes grupos, também foi observada no espectro de HMBC através da correlação existente a duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico e os hidrogênios adjacentes.

Das oito substâncias sintetizadas, cinco são inéditas na literatura (**C2**, **C4**, **C6**, **C7** e **C8**). A seguir será descrita a elucidação estrutural de cada substância sintetizada individualmente.

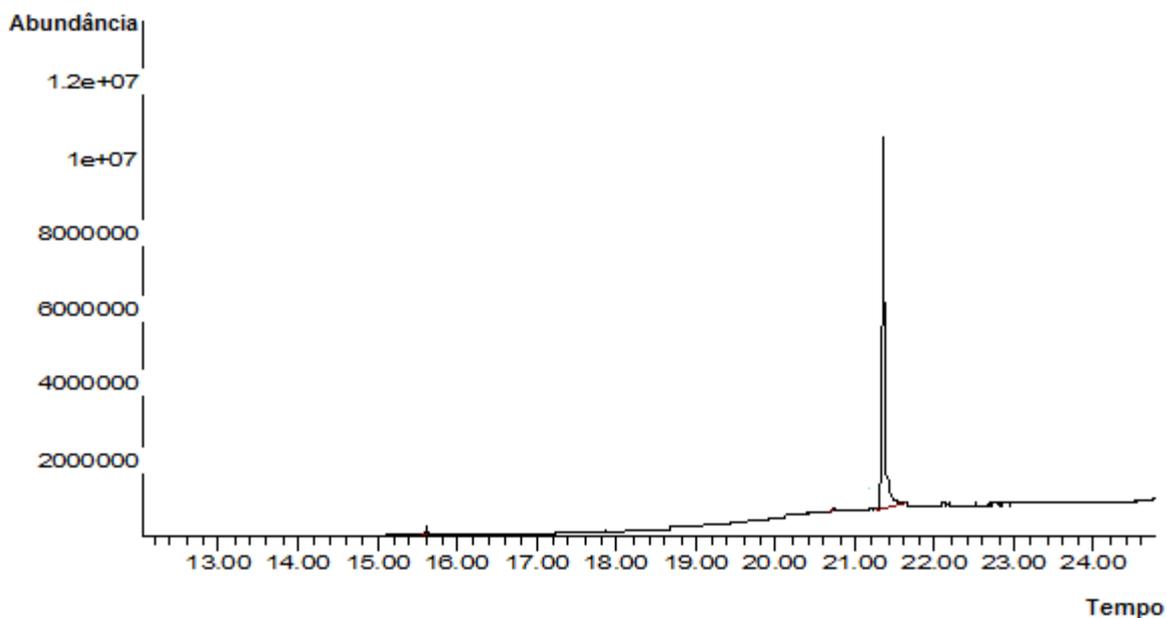
4.1.1. Determinação estrutural da *N*-[2-(4-metoxifenil)-etil]-3-fenilacrilamida (**C1**)



N-[2-(4-Metoxifenil)-etil]-3-fenilacrilamida

A substância **C1** foi sintetizada com o rendimento de 39.9%, apresentando-se como sólido amorfo de coloração amarelada, solúvel em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, com faixa de fusão entre 137.4-137.9°C.

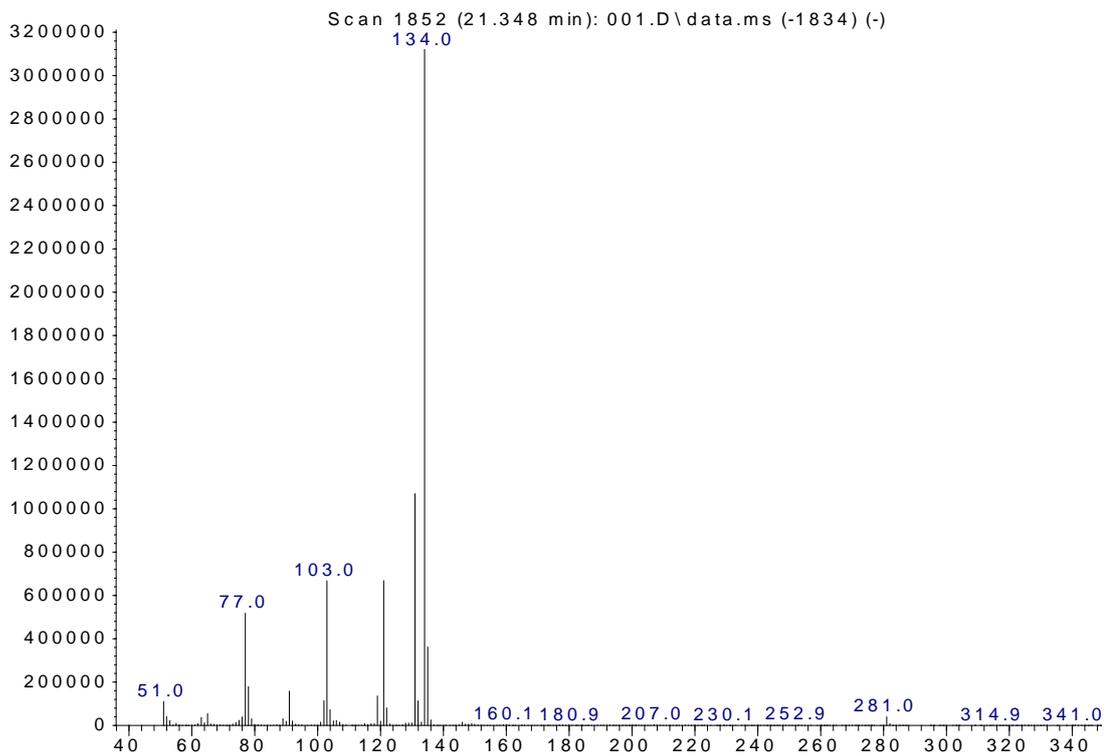
A cromatografia gasosa da substância isolada apresentou um sinal majoritário no tempo de retenção de 21.4 minutos (espectro 1).



Espectro 1. Cromatograma da substância **C1**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular m/z 281.0 condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ (espectro 2).

Abundance



m/z-->

Espectro 2. Espectro de massas da substância **C1** (CH_2Cl_2).

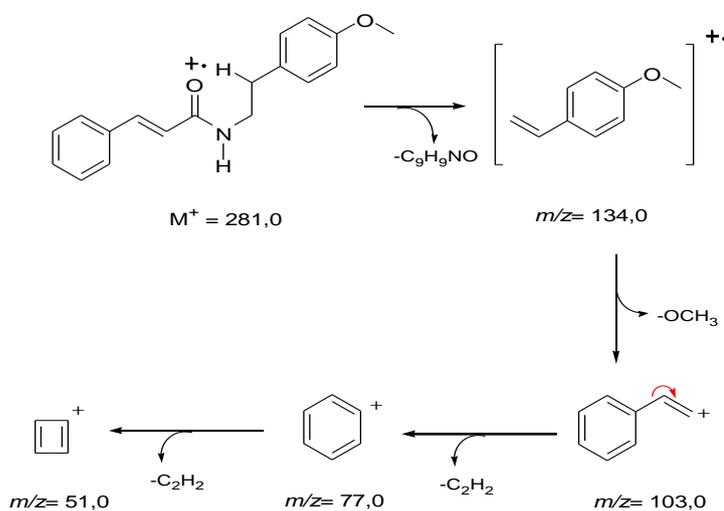
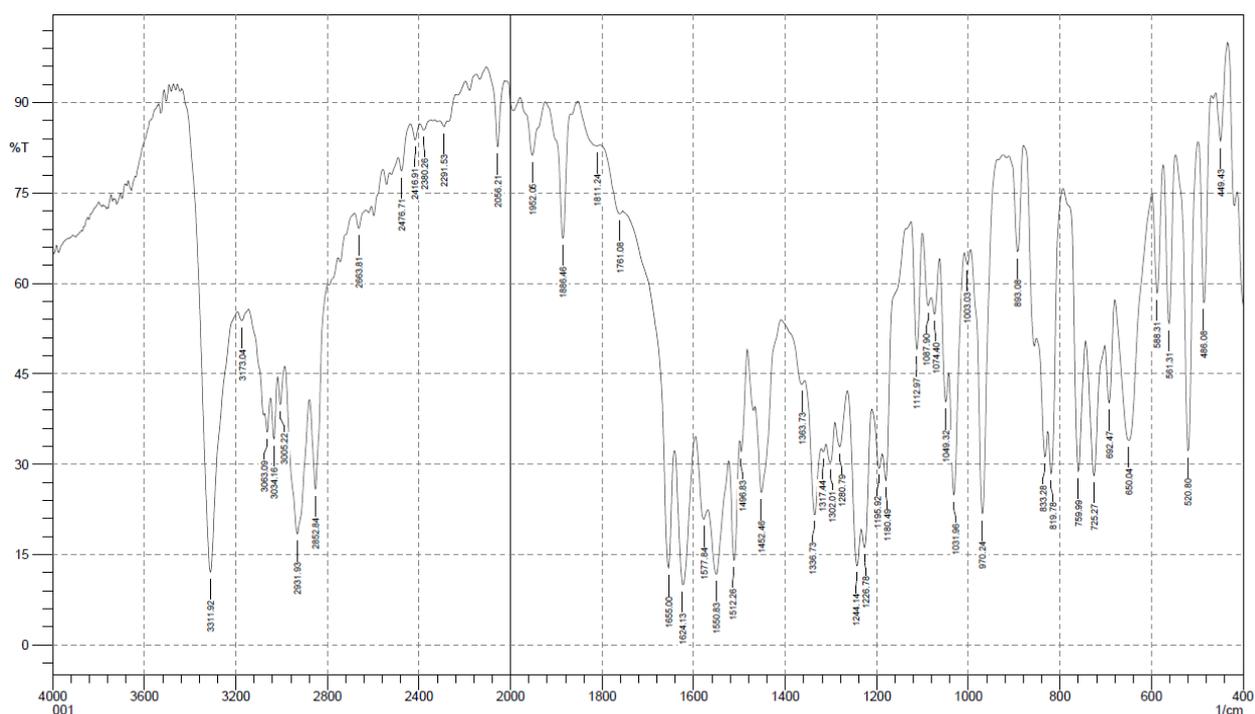


Figura 7. Proposta de fragmentação de **C1** para os principais sinais do **Espectro 2**.

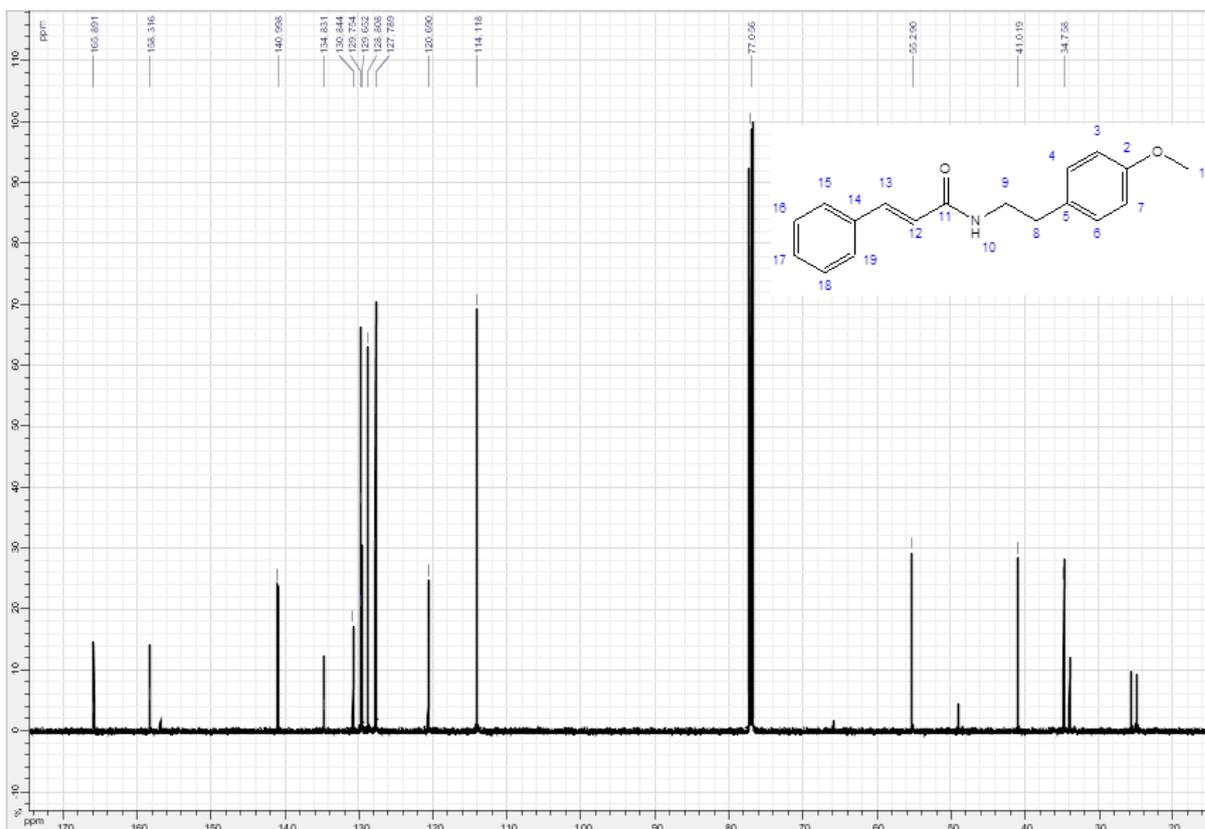
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (espectro 3) da substância **C1** mostrou banda de absorção em 1655 cm^{-1} e banda de absorção em 3312 cm^{-1} , referentes ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ e $\text{N}-\text{H}$, indicativos da presença da função amida.



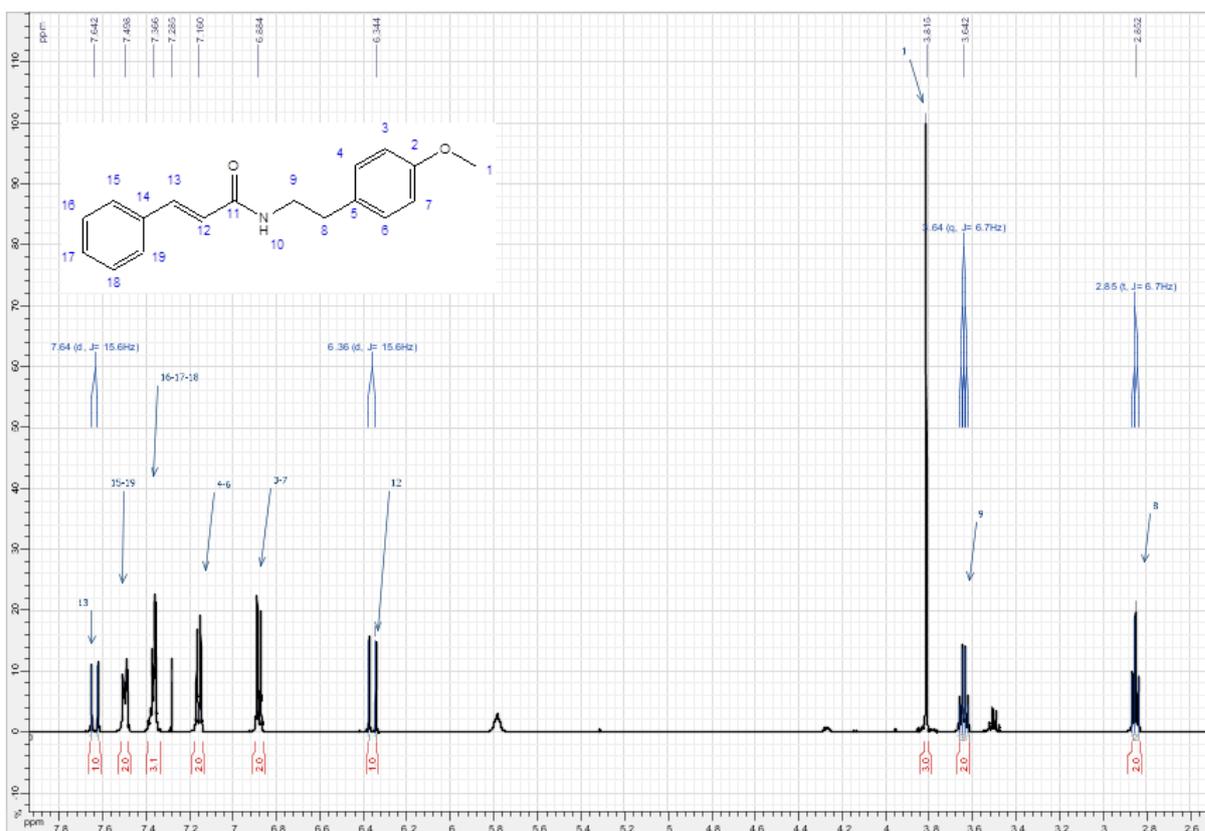
Espectro 3. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C1**.

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes aos 18 átomos de carbono (espectro 4).

No espectro de RMN¹H foram observados sinais referentes a dois hidrogênios α,β -insaturados δ_H 6,36 ppm (*d*, $J=15,6$ Hz) (H-12) e δ_H 7,64 ppm (*d*, $J=15,6$ Hz) (H-13). Os sinais relativos aos dois átomos de hidrogênios metilênicos são encontrados em δ_H 3,64 ppm (*q*, $J=6,7$ Hz) (H-9) e δ_H 2,85 ppm (*t*, $J=6,7$ Hz) (H-8) (espectro 5).

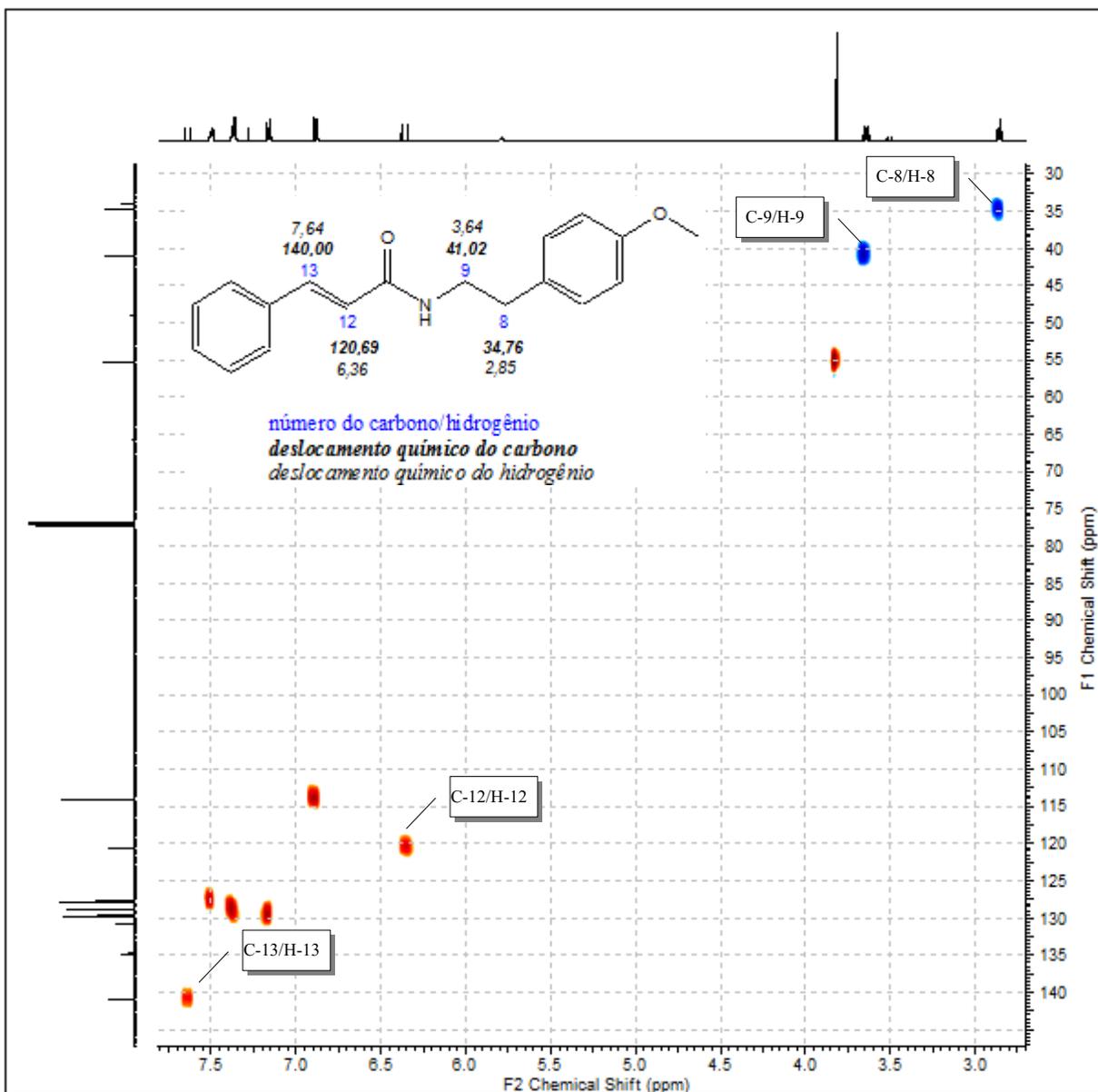


Espectro 4. Espectro de RMN ^{13}C da substância C1 (CDCl_3 , 125 MHz).



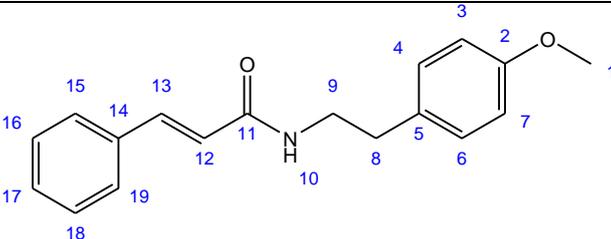
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H da substância C1 (CDCl_3 , 500 Hz).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (espectro 6) permitiu confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , principalmente através das correlações observadas entre os H-12 (δ_{H} 6,36) com o C-12 (δ 120,69), H-13 (δ_{H} 7,64) com o C-13 (δ 140,00), H-8 (δ_{H} 2,85) com o C-8 (δ 34,76) e H-9 (δ_{H} 3,64) com o C-9 (δ 41,02) (tabela 5).

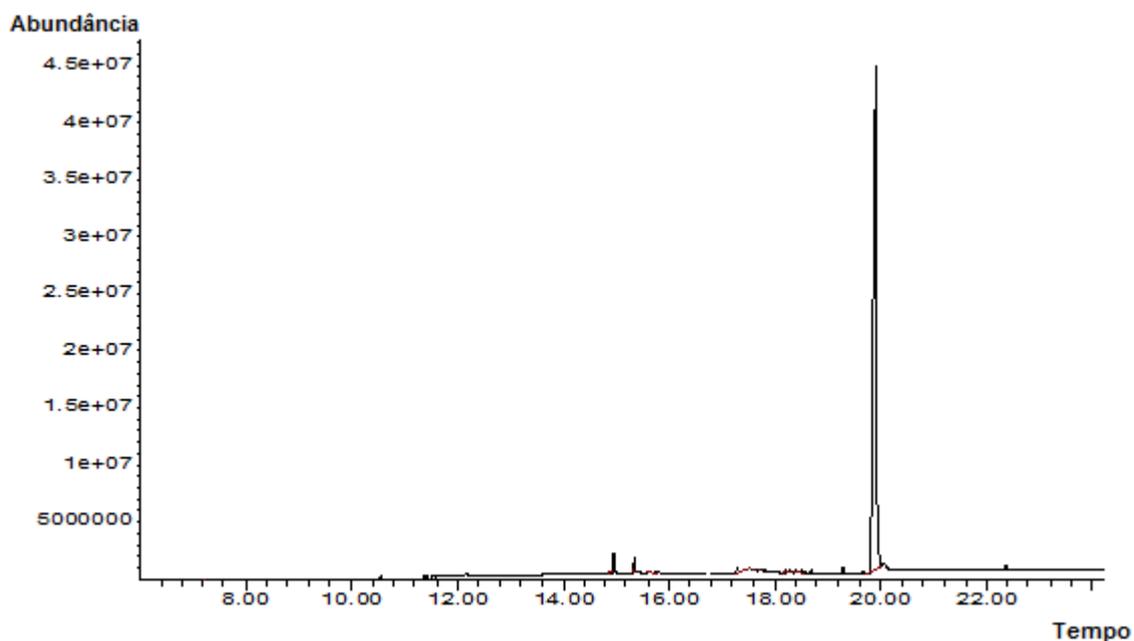


Espectro 6. Espectro de HSQC da substância **C1** (CDCl_3 , 500 Hz).

Tabela 5. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C1**.

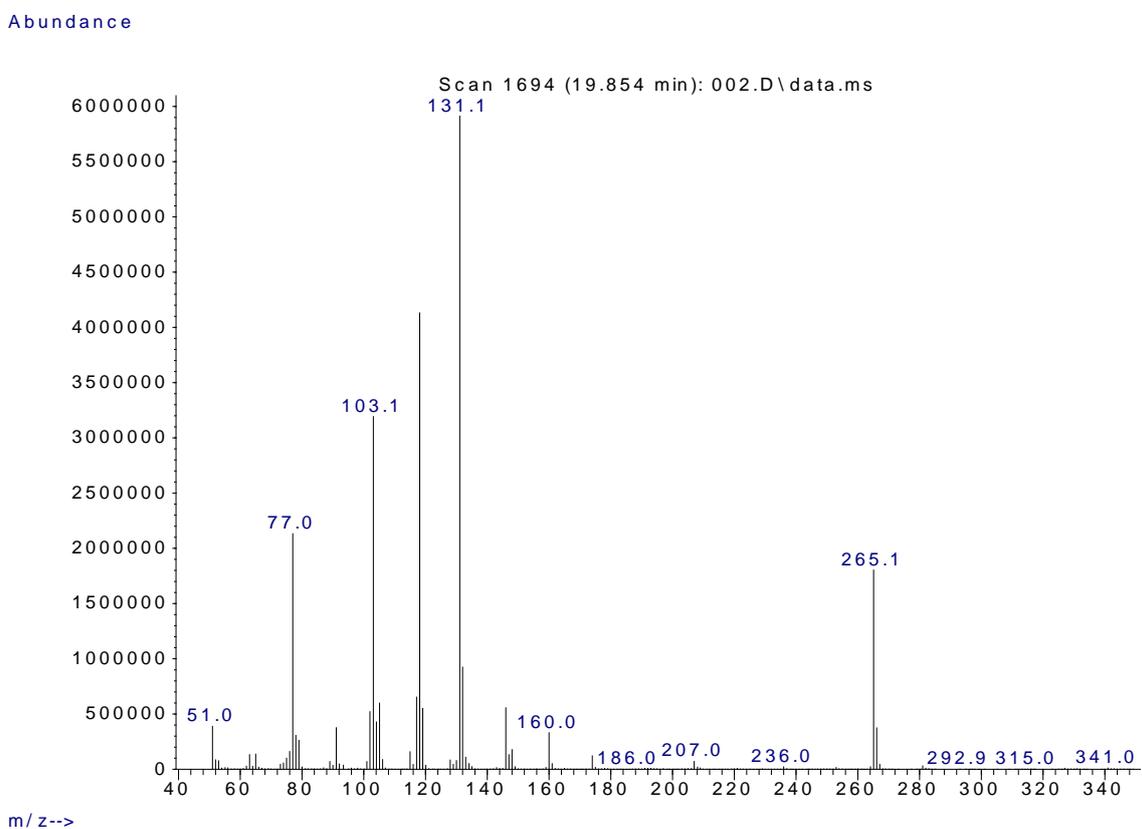
SUBSTÂNCIA C1				
				
	HSQC		HMBC	
C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
2	158,32	-	H-3;H-7	H-1;H-4;H-6
5	130,84	-	H-4;H-6;H-8	H-3;H-7;H-9
11	165,89	-	H-12	H-9;H-13
14	134,83	-	H-13;H-15;H-19	H-12;H-16;H-18
CH				
3	114,12	6,88 (m), 1H	H-3;H-4	H-7
4	129,65	7,16 (m), 1H	-	H-6; H-8
6	129,65	7,16 (m), 1H	-	H-8; H-4
7	114,12	6,88 (m), 1H	H-6	-
12	120,69	6,36 (d), $J=15,6$ Hz, 1H	H-13	-
13	140,00	7,64 (d), $J=15,6$ Hz, 1H	H-12	H-15
15	127,79	7,45 (m), 1H	H-16	H-13;H-19; H-17
16	128,81	7,37 (m), 1H	H-17	H-18
17	129,75	7,37 (m), 1H	H-16;H-18	H-15;H-19
18	128,81	7,37 (m), 1H	H-17;H-19	H-16
19	127,79	7,45 (m), 1H	H-18	H-13;H-15; H-17
CH₂				
8	34,76	2,85 (t), $J=6,7$ Hz, 2H	H-9	H-6; H-4
9	41,02	3,64 (q), $J=6,7$ Hz, 2H	H-8	-
CH₃				
1	55,29	3,81 (s), 3H	-	-

A confirmação da formação da função amida também foi observada no espectro de HMBC (espectro 7) através da correlação existente entre duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico (C-11) e os hidrogênios adjacentes (H-9, H-12,H-13).



Espectro 8. Cromatograma da substância **C2**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular m/z 265.1 condizente com a fórmula molecular $C_{18}H_{19}NO$ (espectro 9).



Espectro 9. Espectro de massas da substância **C2** (CH_2Cl_2).

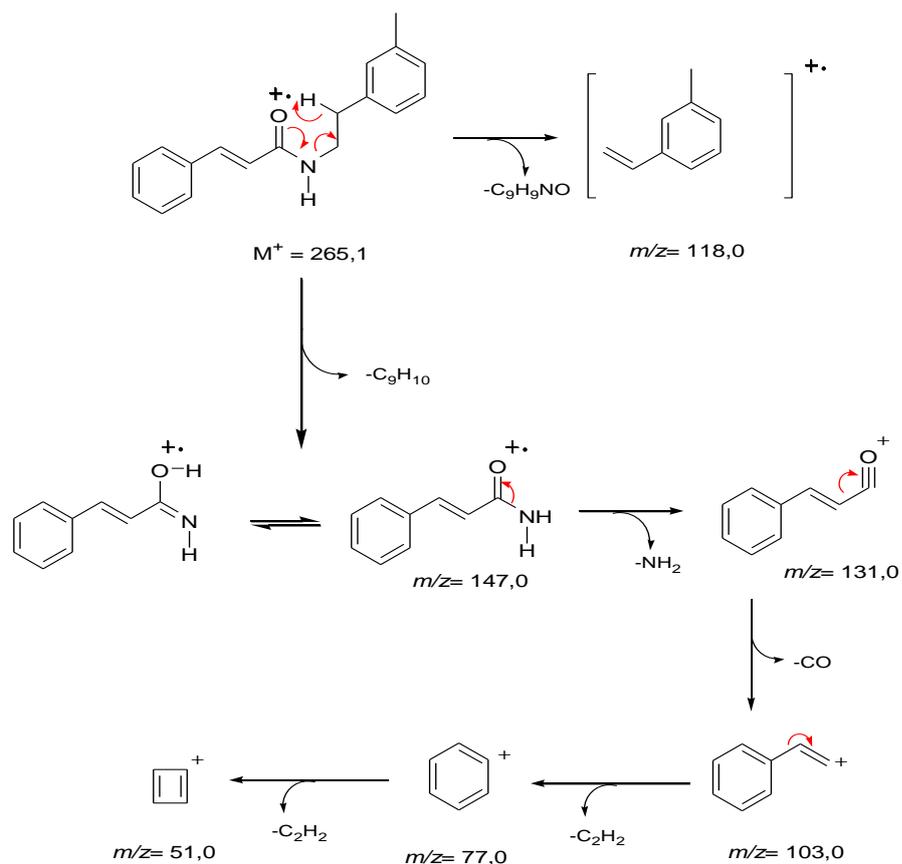
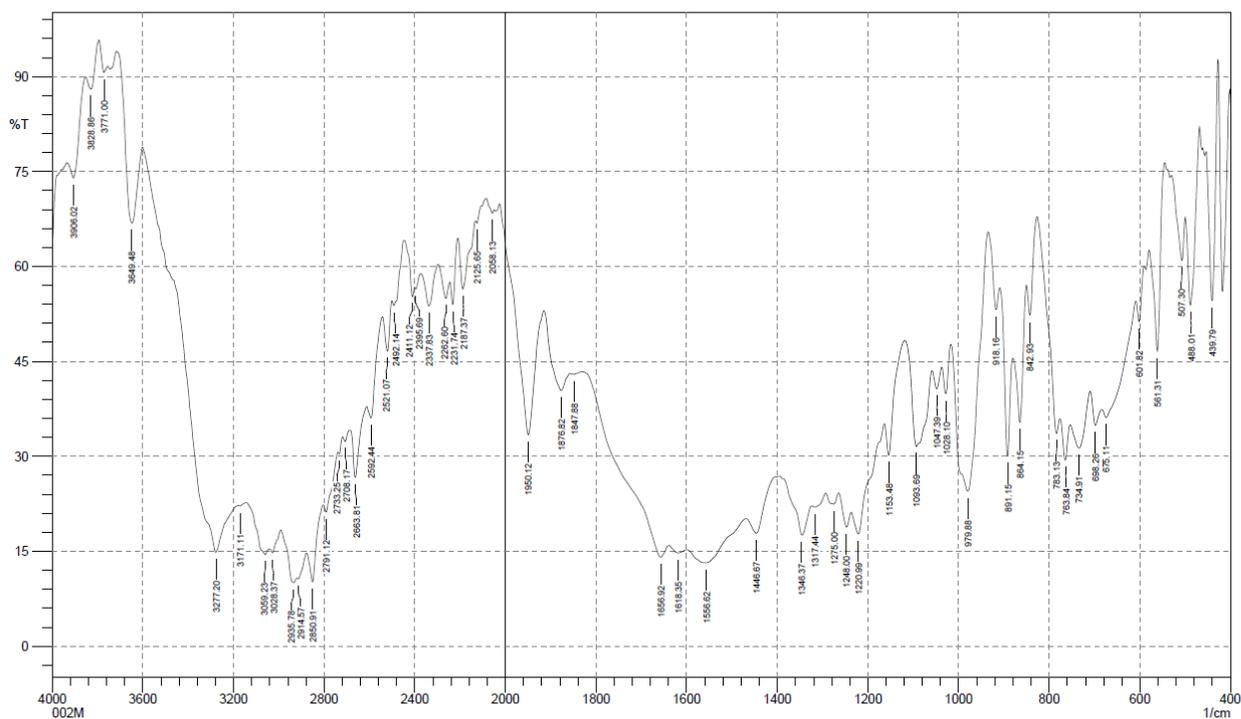


Figura 8. Proposta de fragmentação de **C2** para os principais sinais do **Espectro 9**.

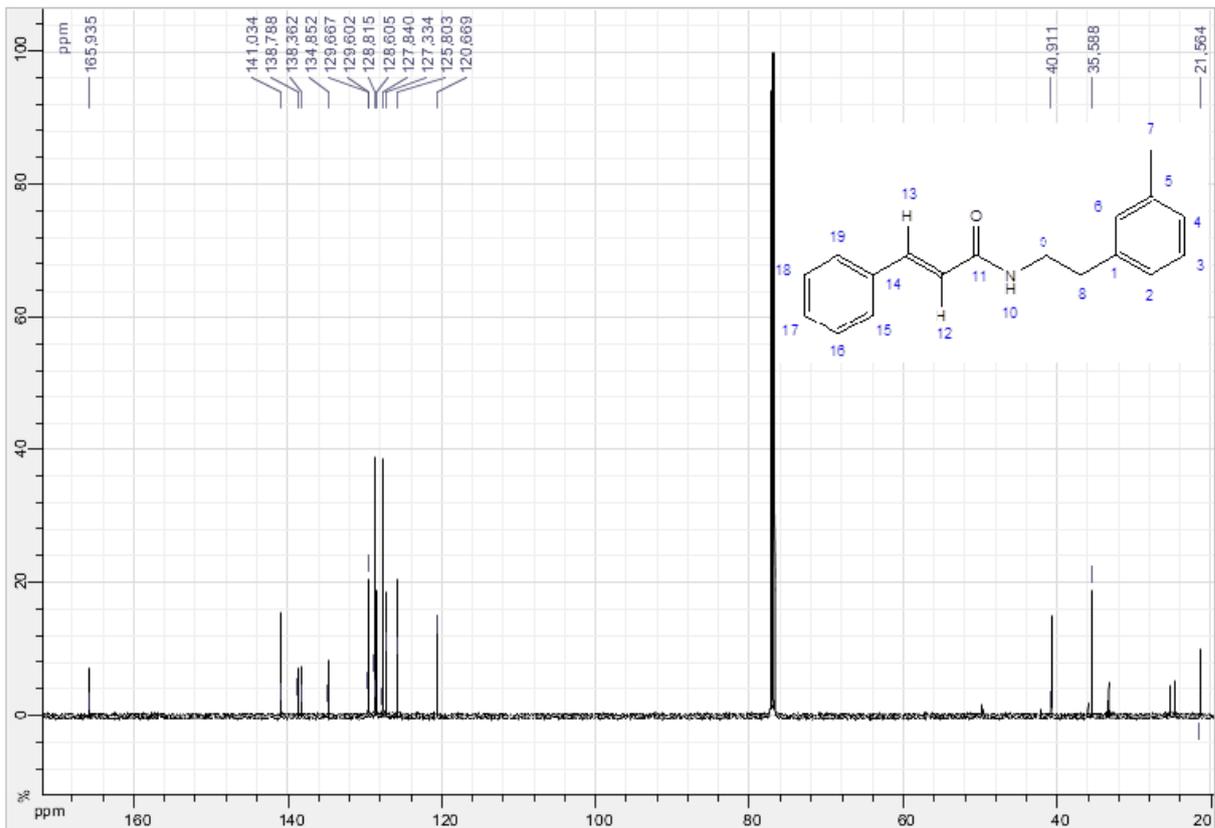
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (Espectro 10) da substância **C2** mostrou uma de absorção em 1657 cm^{-1} e banda de absorção em 3277 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O e N-H, indicativos da presença da função amida.



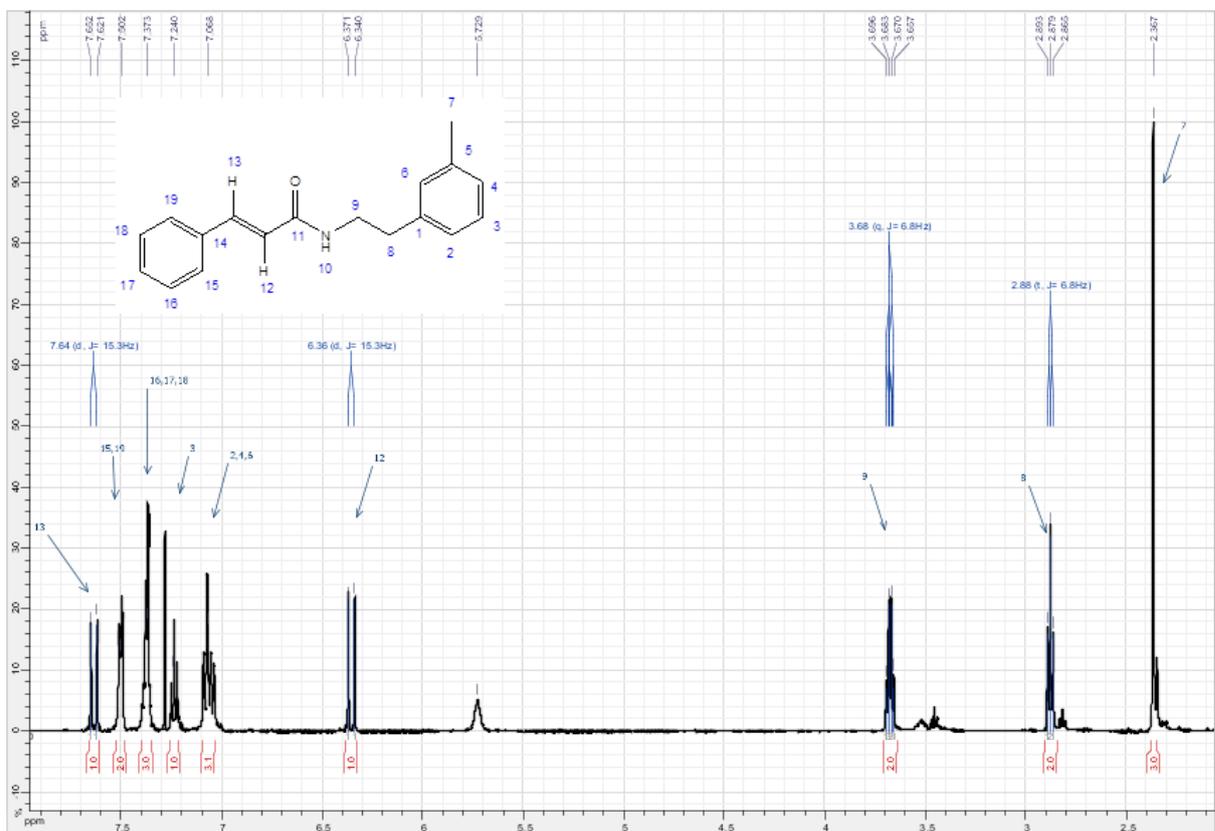
Espectro 10. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C2**.

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes a 18 átomos de carbono (espectro 11).

No espectro de RMN¹H foram observados sinais para átomos de hidrogênio, onde foi observado dois hidrogênios referentes a α,β -insaturação δ_H 6,36 ppm (*d*, $J=15,3$ Hz) (H-12) e δ_H 7,64 ppm (*d*, $J=15,3$ Hz) (H-13). Os sinais relativos aos dois átomos de hidrogênios metilênicos são encontrados em δ_H 3,68 ppm (*q*, $J=6,8$ Hz) (H-9) e δ_H 2,88 ppm (*t*, $J=6,8$ Hz) (H-8) (espectro 12).

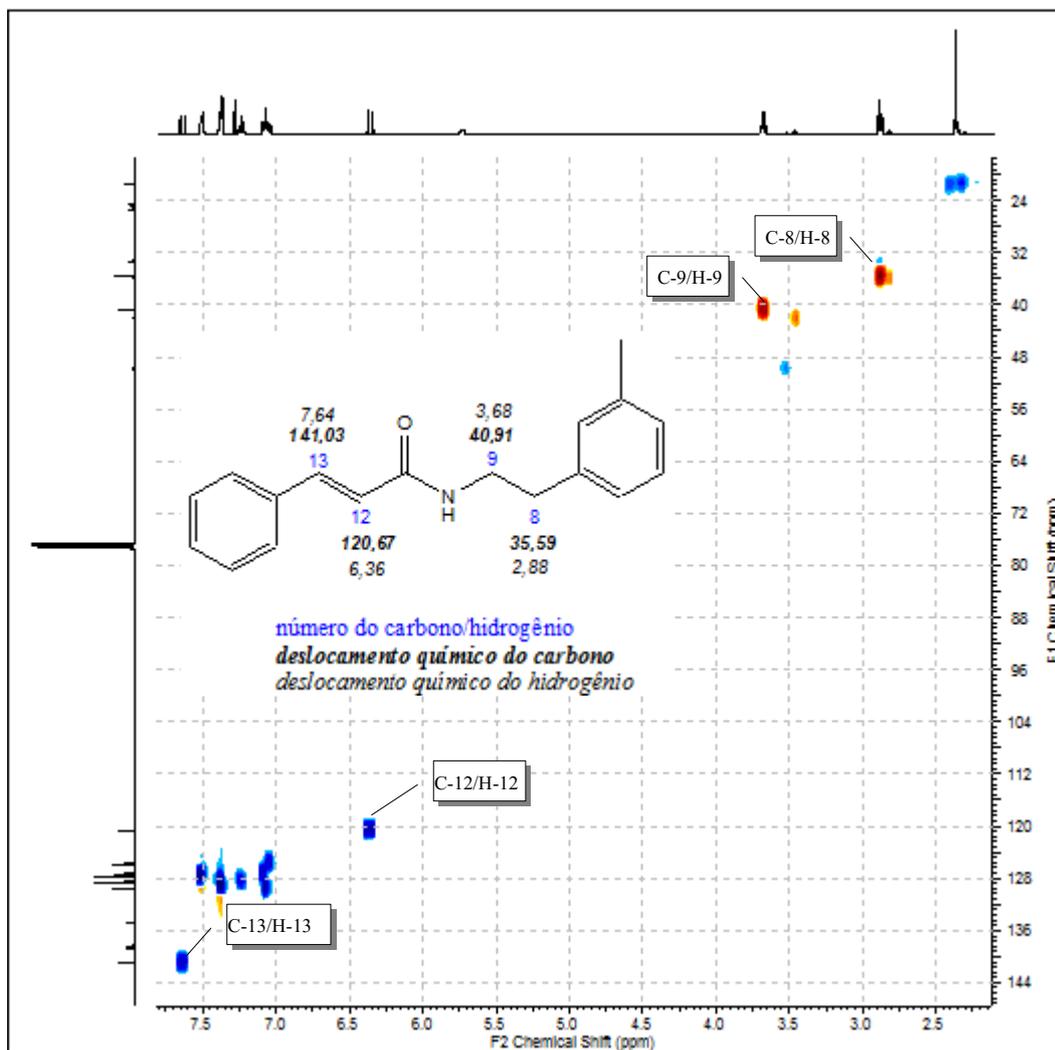


Espectro 11. Espectro de RMN ¹³C da substância **C2** (CDCl₃, 125 MHz).



Espectro 12. Espectro de RMN ¹H da substância **C2** (CDCl₃, 500 Hz).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (espectro 13) permitiu confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , principalmente através das correlações observadas entre os H-12 (δ_{H} 6,36) com o C-12 (δ_{C} 120,67), H-13 (δ_{H} 7,64) com o C-13 (δ_{C} 141,03), H-8 (δ_{H} 2,88) com o C-8 (δ_{C} 35,59) e H-9 (δ_{H} 3,68) com o C-9 (δ_{C} 40,91) (tabela 6).

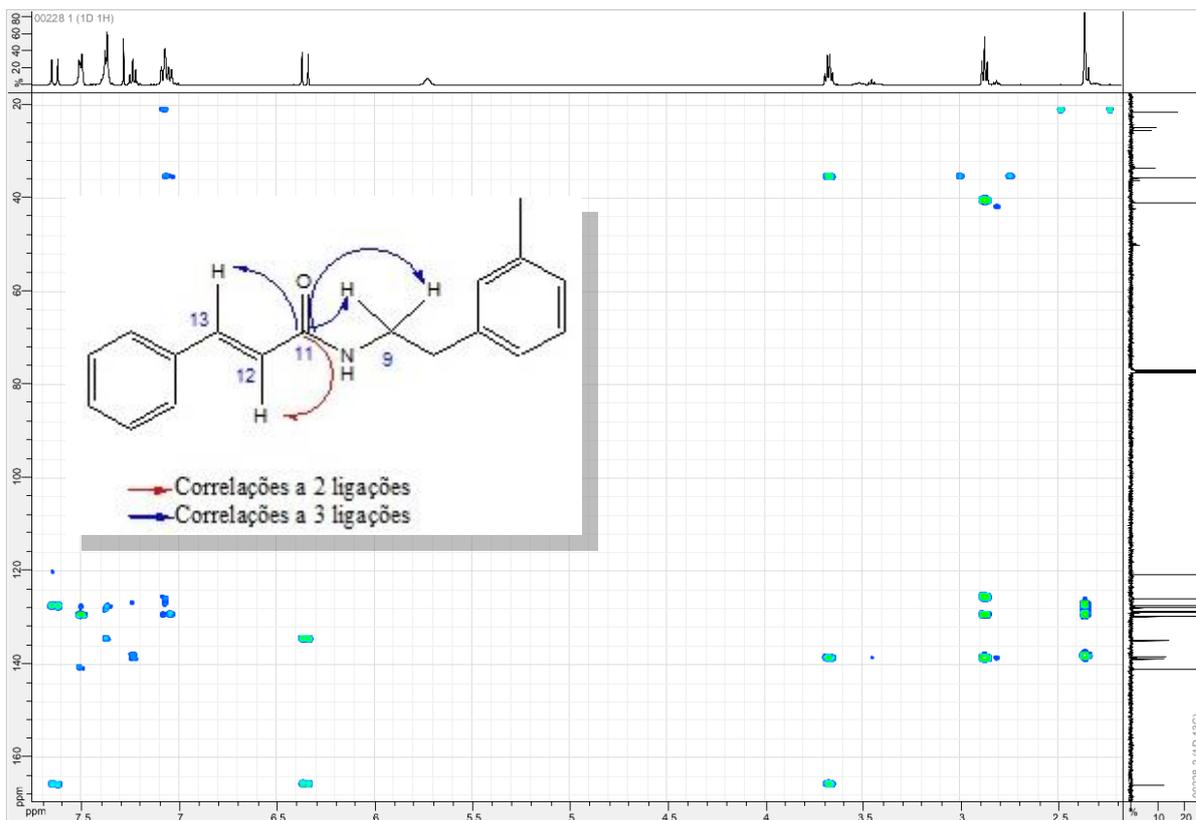


Espectro 13. Espectro de HSQC da substância **C2** (CDCl_3 , 500 Hz).

Tabela 6. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C2**.

SUBSTÂNCIA C2				
	HSQC		HMBC	
C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
1	138,89	-	H-8	H-3;H-9
5	138,36	-	H-7	H-3
11	165,93	-	H-12	H-13;H-9
14	134,85	-	H-15;H-19	H-12;H-16;H-18
CH				
2	125,80	7,07 (m), 1H	-	H-4;H-6;H-8
3	128,60	7,24 (m), 1H	H-2;H-4	-
4	129,67	7,07 (m), 1H	-	H-2;H-6;H-7
6	129,66	7,07 (m), 1H	-	H-2;H-4;H-7 H-8
12	120,67	6,36 (d), $J=15,3$ Hz, 1H	-	H-13
13	141,03	7,64 (d), $J=15,3$ Hz, 1H	H-12	H-15;H-19
15	127,84	7,50 (m), 1H	H-16	H-13;H-17; H-19
16	128,81	7,37 (m), 1H	H-15;H-17	H-18
17	127,33	7,37 (m), 1H	H-16;H-18	H-15;H-19
18	128,81	7,37 (m), 1H	H-17;H-19	H-16
19	127,84	7,50 (m), 1H	H-18	H-13;H-15; H-17
CH₂				
8	35,59	2,88 (t), $J=6,8$ Hz, 2H	H-9	H-2; H-6
9	40,91	3,68 (q), $J=6,8$ Hz, 2H	H-8	-
CH₃				
7	21,56	2,38 (s), 3H	-	H-6; H-4

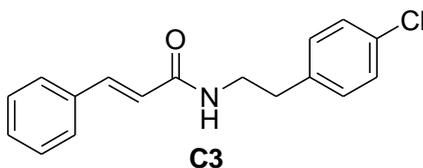
A confirmação da formação da função amida também foi observada através do espectro de HMBC (espectro 14) pela da correlação existente a duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico (C-11) e os hidrogênios adjacentes (H-9, H-12,H-13).



Espectro 14. Espectro de HMBC da substância C2 (CDCl₃, 500 Hz).

Desta forma, a substância **C2** mostrou dados espectrais consistentes com sua estrutura.

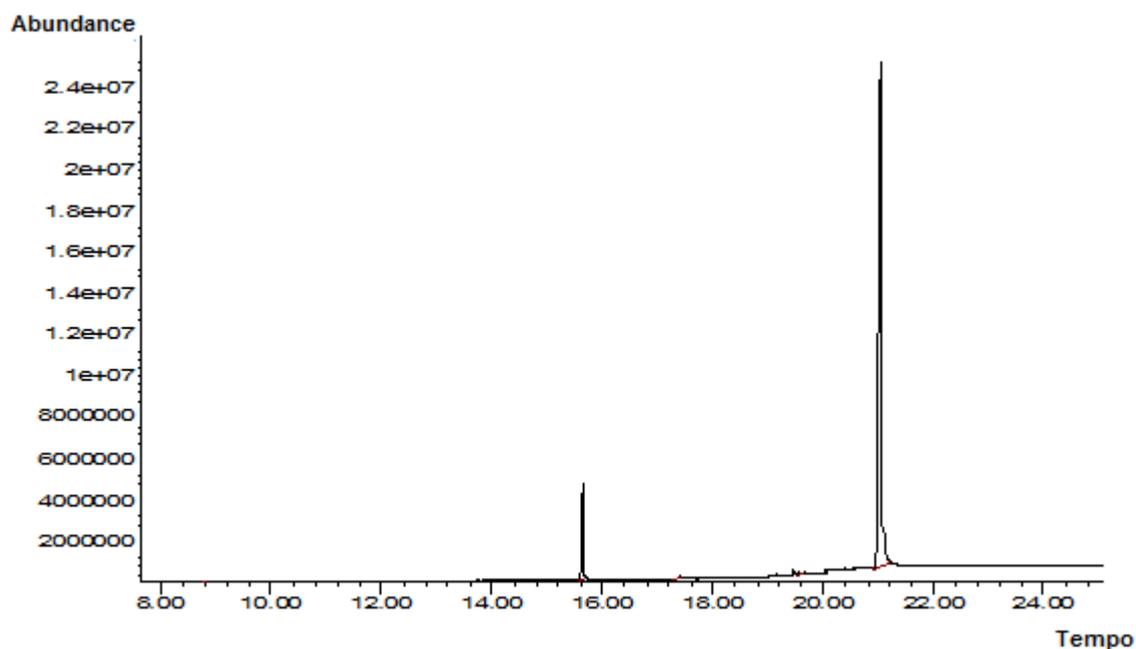
4.1.3. Determinação estrutural da *N*-[2-(4-clorofenil)etil]-3-fenilacrilamida (**C3**)



N-[2-(4-Clorofenil)etil]-3-fenilacrilamida

A substância **C3** foi sintetizada com o rendimento de 63.8%, apresentou-se como sólido amorfo de coloração branca, solúvel em CHCl₃/CH₂Cl₂, com faixa de fusão entre 163.4–164.0°C.

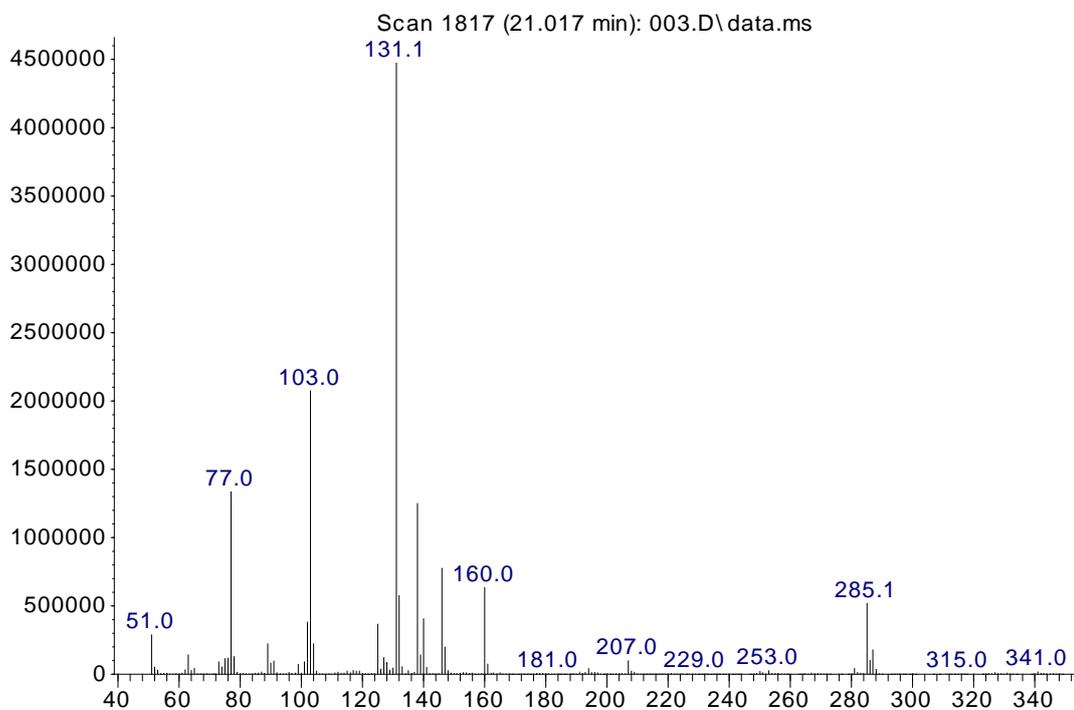
A cromatografia gasosa da substância isolada apresentou um sinal majoritário no tempo de retenção de 21.0 minutos (espectro 15).



Espectro 15. Cromatograma da substância **C3**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular m/z 285.1 condizente com a fórmula molecular $C_{17}H_{16}ClNO$ (espectro 16).

Abundance



$m/z \rightarrow$

Espectro 16. Espectro de massas da substância **C3** (CH_2Cl_2).

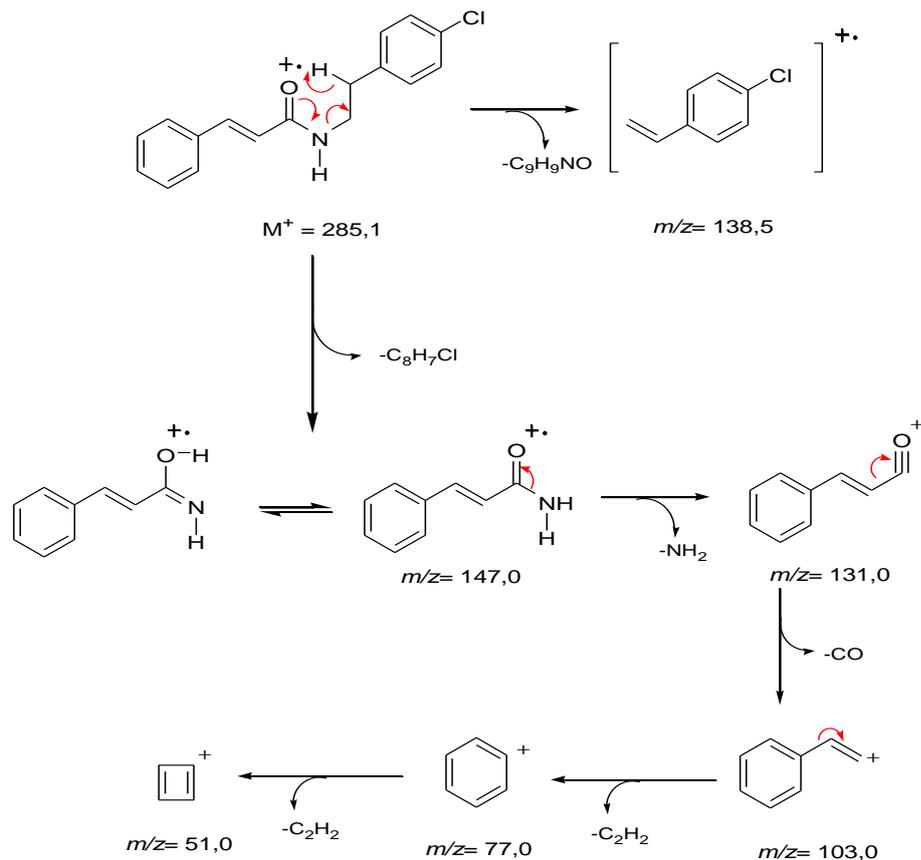
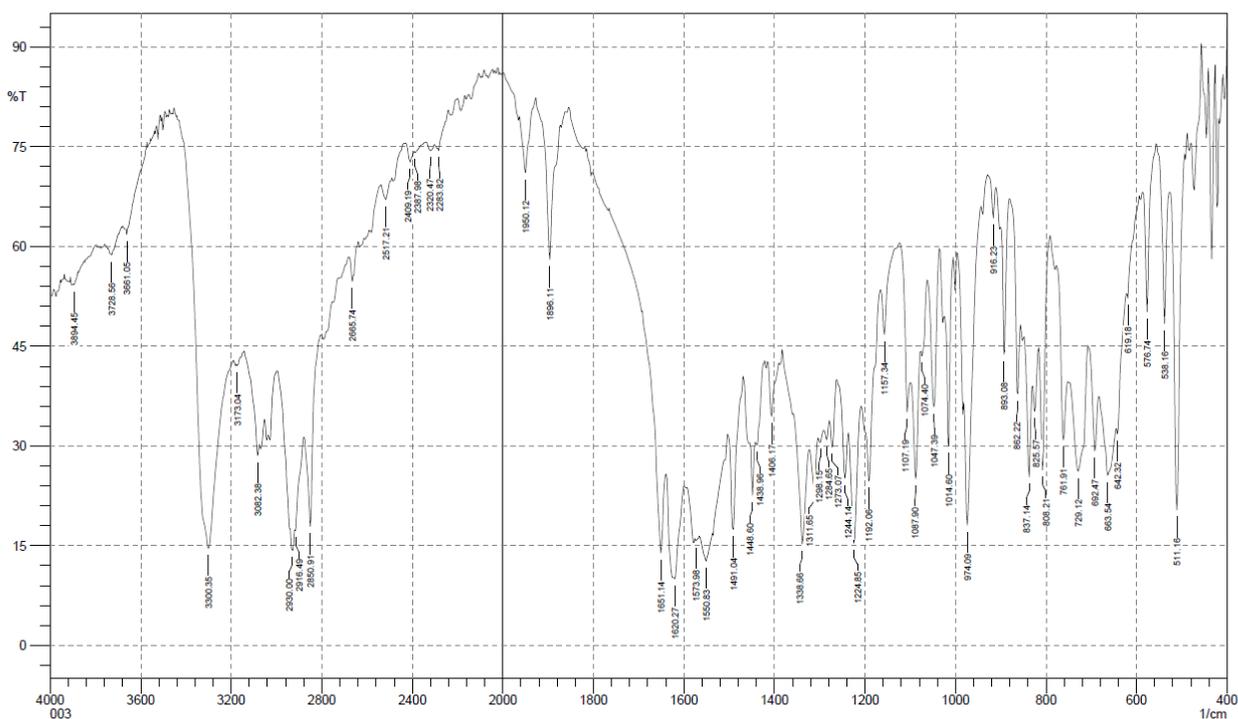


Figura 9. Proposta de fragmentação de **C3** para os principais sinais do **Espectro 16**.

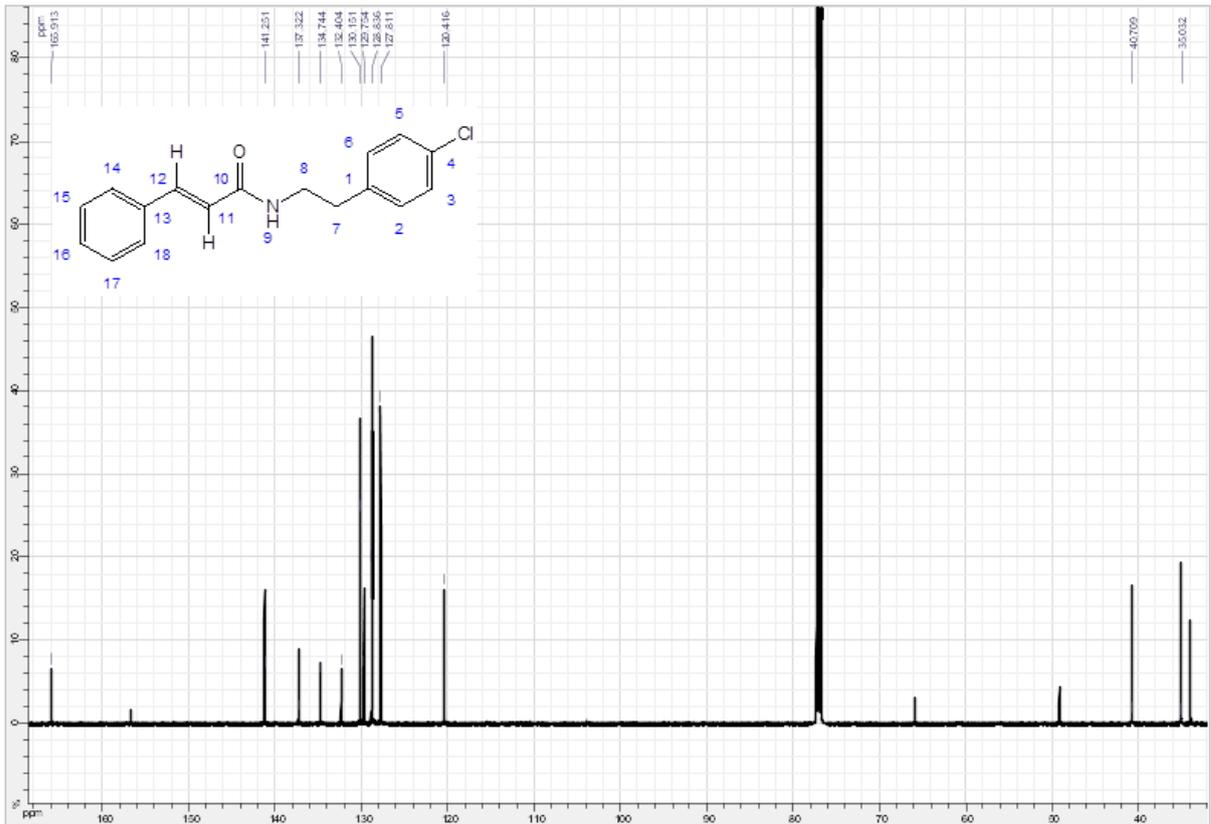
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (espectro 17) mostrou banda de absorção em 1651 cm^{-1} e banda de absorção em 3300 cm^{-1} , referentes ao estiramento $C=O$ e $N-H$, indicativos da presença da função amida na substância **C3**.



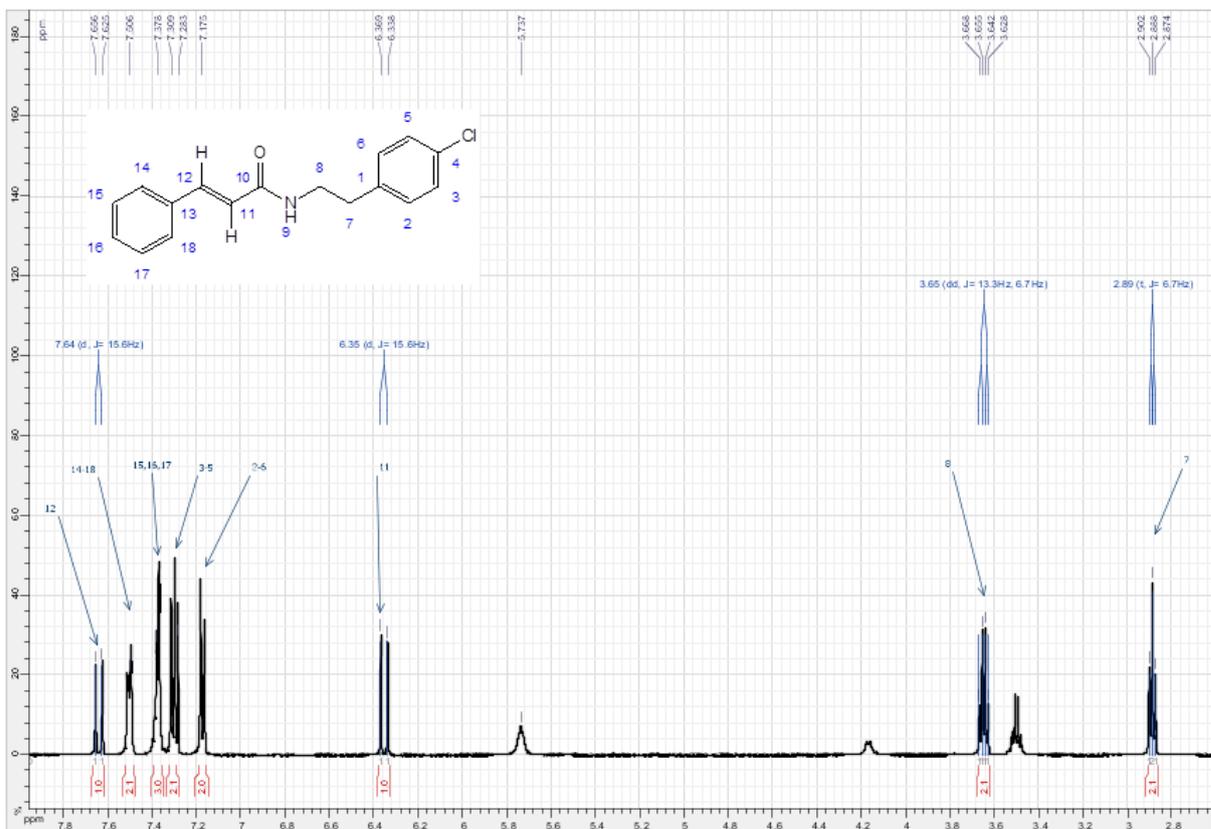
Espectro 17. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C3**.

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes aos 17 átomos de carbono (espectro 18).

O espectro de RMN¹H mostrou sinais referentes a dois hidrogênios α,β -insaturados δ_H 6,35 ppm (*d*, $J=15,6$ Hz) (H-11) e δ_H 7,64 ppm (*d*, $J=15,6$ Hz) (H-11). Dois sinais relativos a átomos de hidrogênios metilênicos são encontrados em δ_H 3,65 ppm (*q*, $J=6,7$ Hz) (H-8) e δ_H 3,65 ppm (*t*, $J=6,7$ Hz) (H-7) (espectro 19).

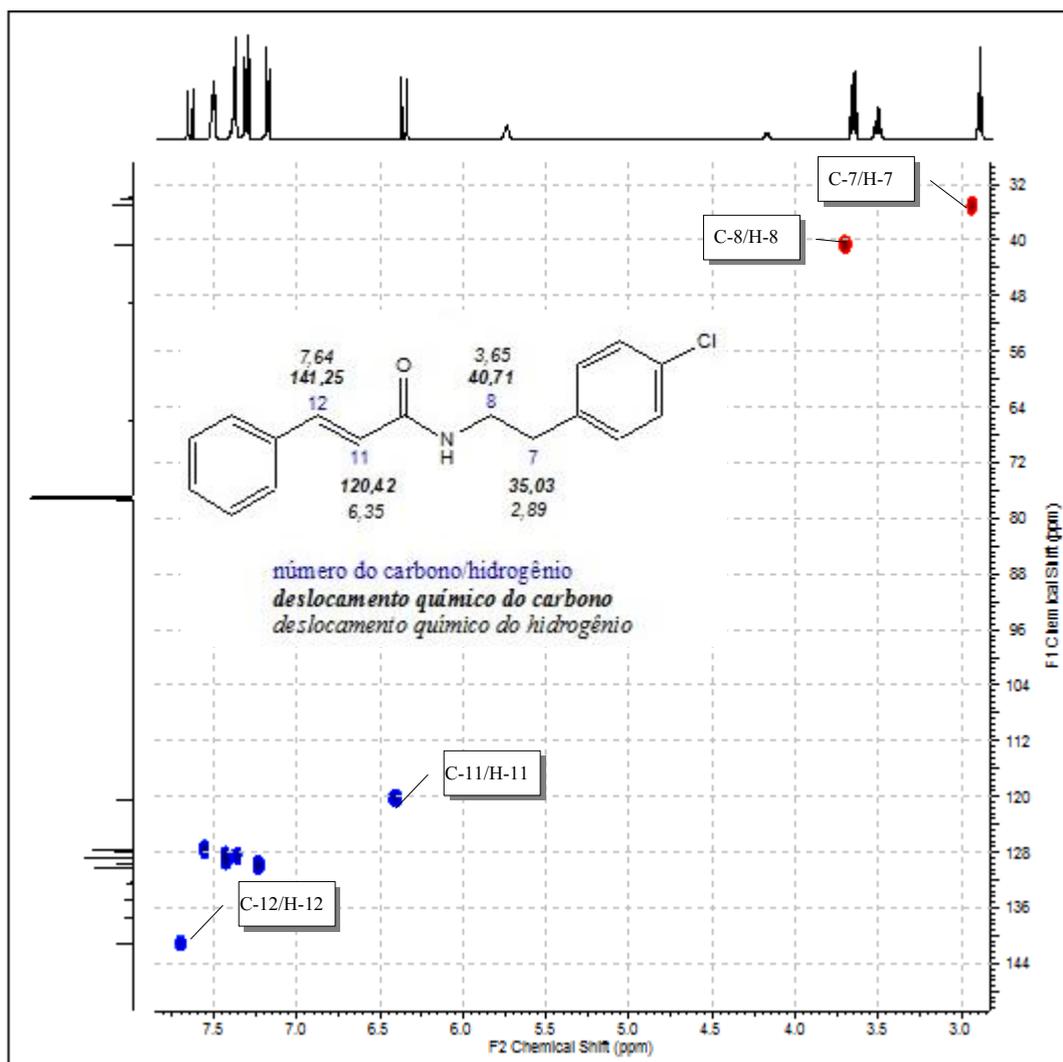


Espectro 18. Espectro de RMN ^{13}C da substância **C3** (CDCl_3 , 125 MHz).



Espectro 19. Espectro de RMN ^1H da substância **C3** (CDCl_3 , 500 Hz).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (espectro 20) permitiu confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , principalmente através das correlações observadas entre os H-11 (δ_{H} 6,35) com o C-11 (δ_{C} 120,42), H-12 (δ_{H} 7,64) com o C-12 (δ_{C} 141,25), H-7 (δ_{H} 2,89) com o C-7 (δ_{C} 35,03) e H-8 (δ_{H} 3,65) com o C-8 (δ_{C} 40,71) (tabela 7).



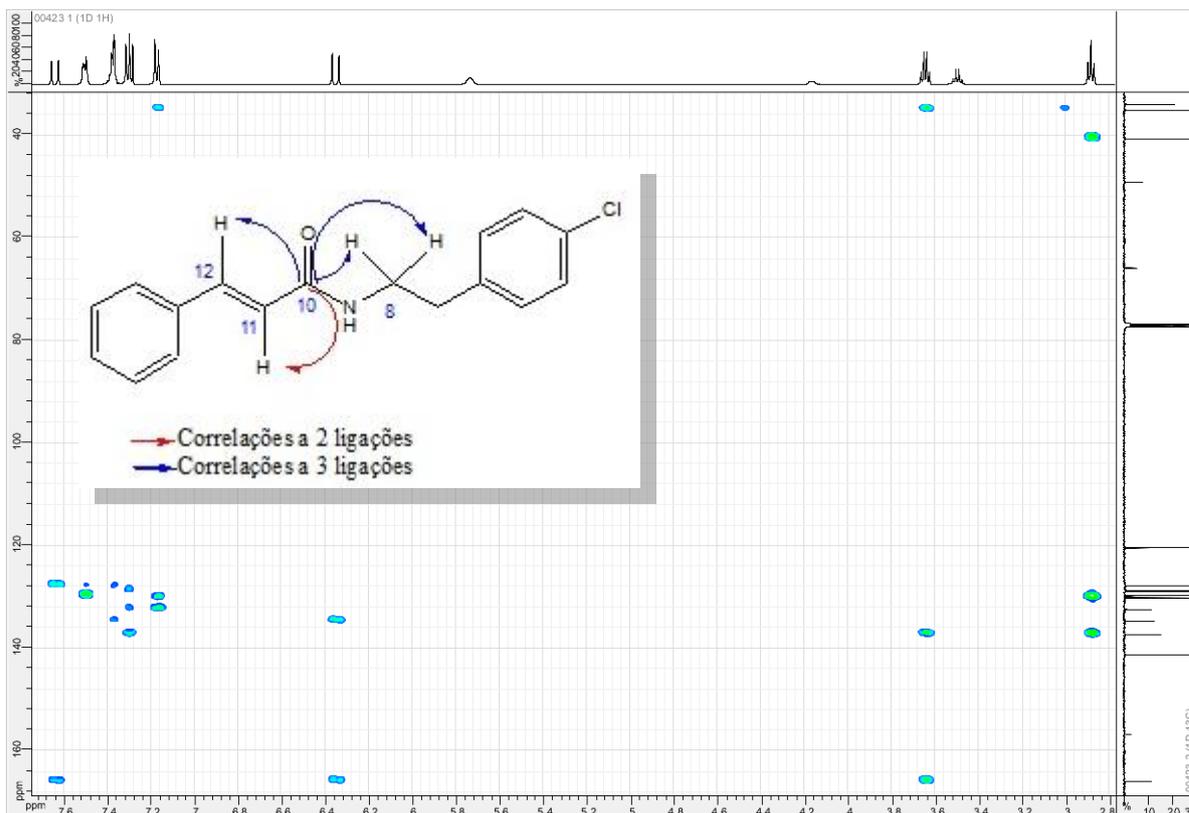
Espectro 20. Espectro de HSQC da substância **C3** (CDCl_3 , 500 Hz).

Tabela 7. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C3**.

SUBSTÂNCIA C3

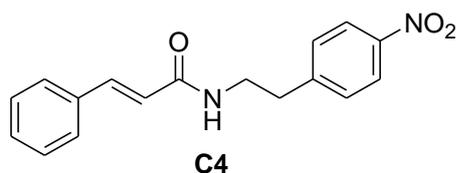
C	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
1	137,32	-	H-7	H-5;H-8
4	132,40	-	-	H-2;H-6
10	165,91	-	H-11	H-8;H-12
13	134,74	-	-	H-11;H-15;H-17
CH				
2	128,84	7,17 (m), 1H	H-3	H-6;H-7
3	127,81	7,31 (m), 1H	H-2	H-5
5	127,81	7,31 (m), 1H	H-6	H-3
6	128,84	7,17 (m), 1H	H-5	-
11	120,42	6,35 (d), $J=15,6$ Hz, 1H	H-12	-
12	141,25	7,64 (d), $J=15,6$ Hz, 1H	H-11	H-14;H-18
14	130,15	7,51 (m), 1H	H-15	H-12;H-16;H-18
15	128,84	7,38 (m), 1H	H-14;H-16	H-17
16	129,75	7,38 (m), 1H	H-15;H-17	H-14;H-18
17	128,84	7,38 (m), 1H	H-16;H-18	H-15
18	130,15	7,51 (m), 1H	H-17	H-12;H-14;H-16
CH₂				
7	35,03	2,89 (t), $J=6,7$ Hz, 2H	H-8	H-2; H-6
8	40,71	3,65 (q), $J=6,7$ Hz, 2H	H-7	-

A confirmação da função amida formada também foi observada no espectro de HMBC (espectro 21) através da correlação existente a duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico (C-10) e seus hidrogênios adjacentes (H-8, H-11,H-12), confirmando assim a estrutura prevista para a substância **C3**.



Espectro 21. Espectro de HMBC da substância C3 (CDCl₃, 500 Hz).

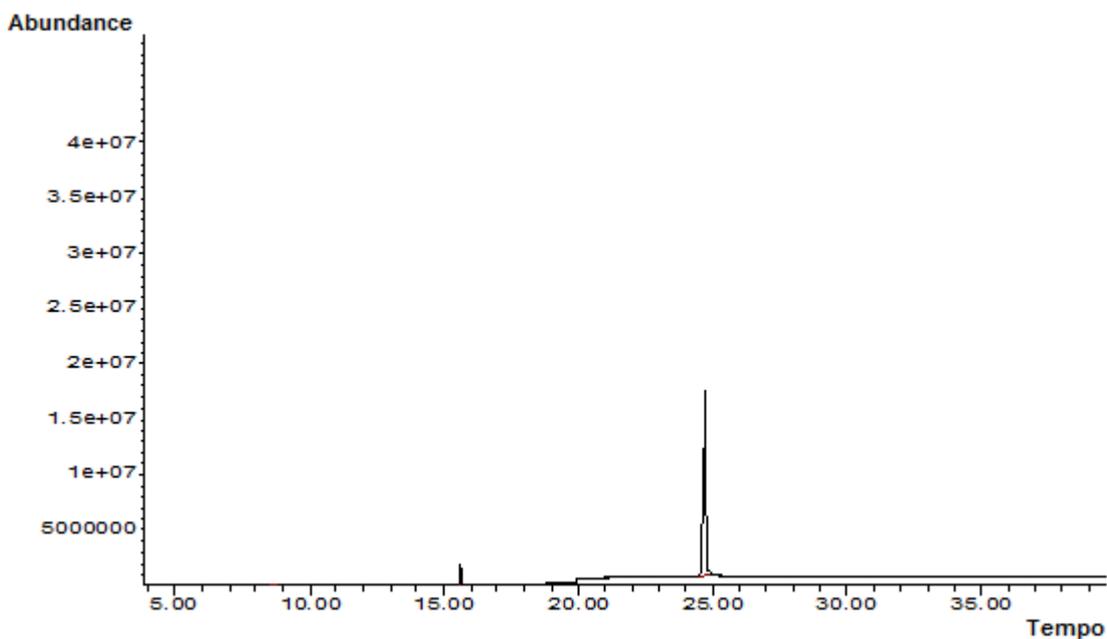
4.1.4. Determinação estrutural da *N*-[2-(4-nitrofenil)etil]-3-fenilacrilamida (**C4**)



N-[2-(4-Nitrofenil)etil]-3-fenilacrilamida

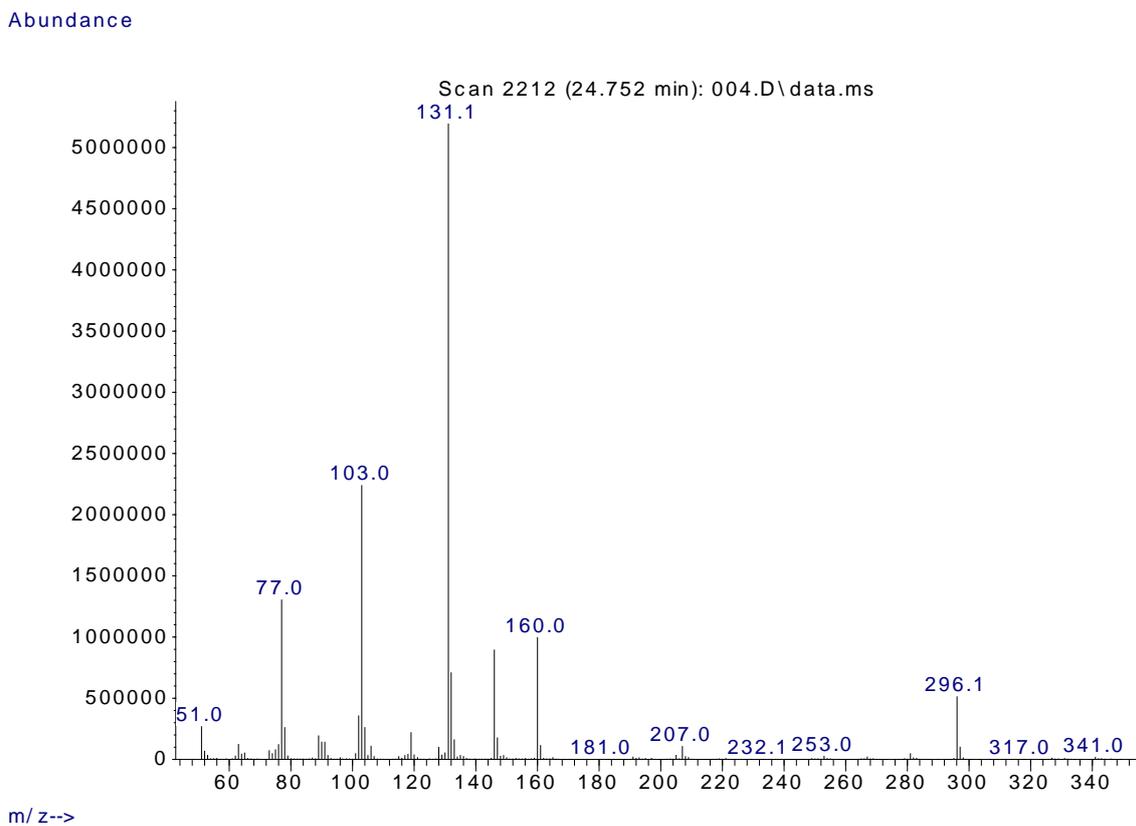
A substância **C4** foi sintetizada obtendo rendimento reacional de 42.2%, apresentando-se como sólido amorfo de coloração amarelada, solúvel em CHCl₃/CH₂Cl₂, com faixa de fusão entre 152.9–153.0°C.

A cromatografia gasosa da substância isolada apresentou um sinal majoritário no tempo de retenção de 24.8 minutos (espectro 22).



Espectro 22. Cromatograma da substância **C4**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular m/z 296.1 condizente com a fórmula molecular $C_{17}H_{16}N_2O_3$ (espectro 23).



Espectro 23. Espectro de massas da substância **C4** (CH_2Cl_2).

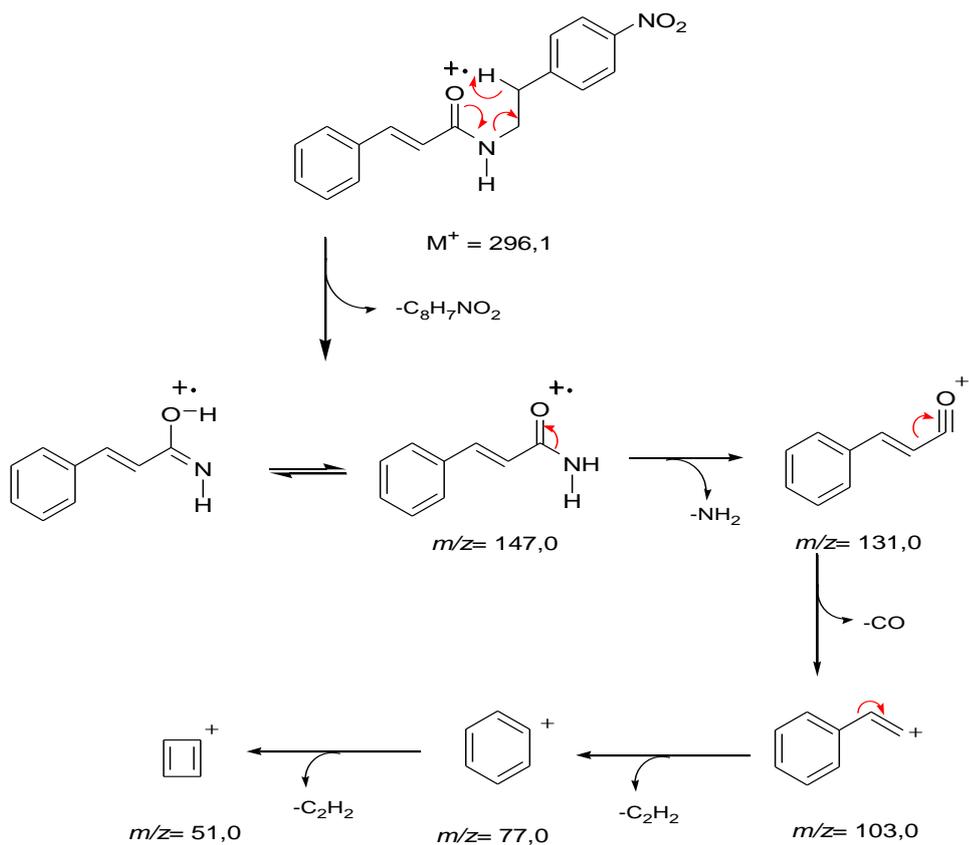
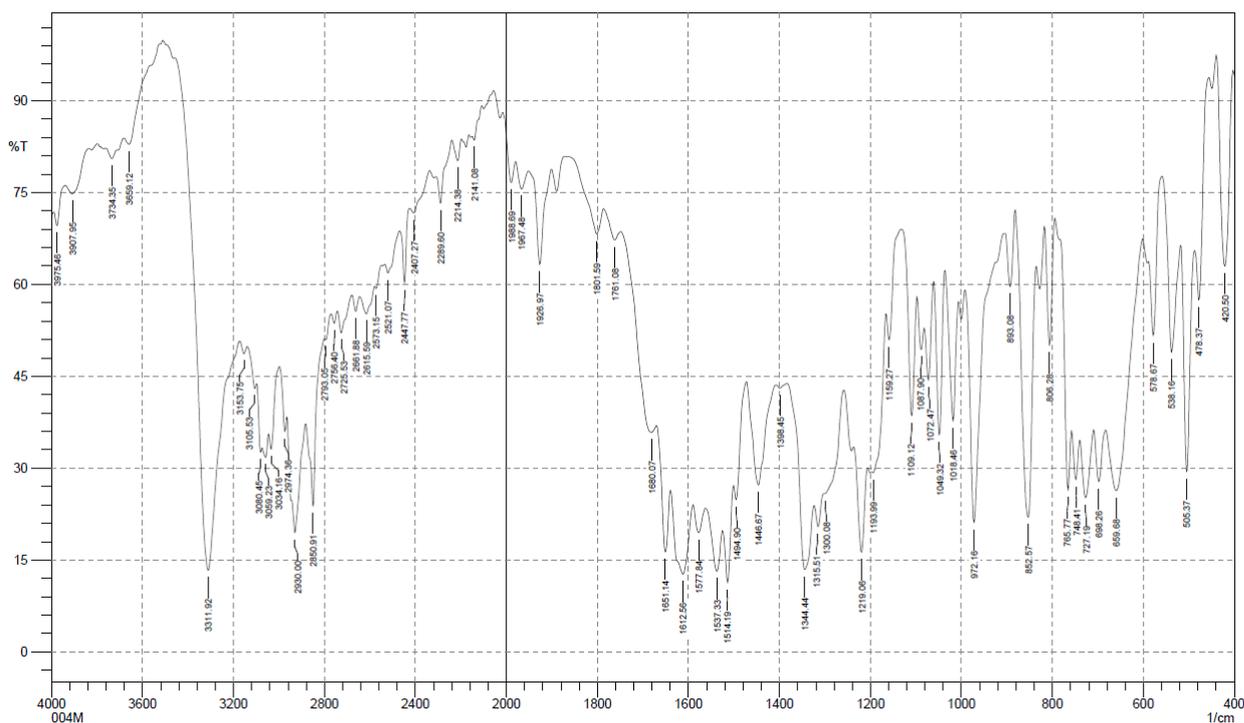


Figura 10. Proposta de fragmentação de **C4** para os principais sinais do **Espectro 23**.

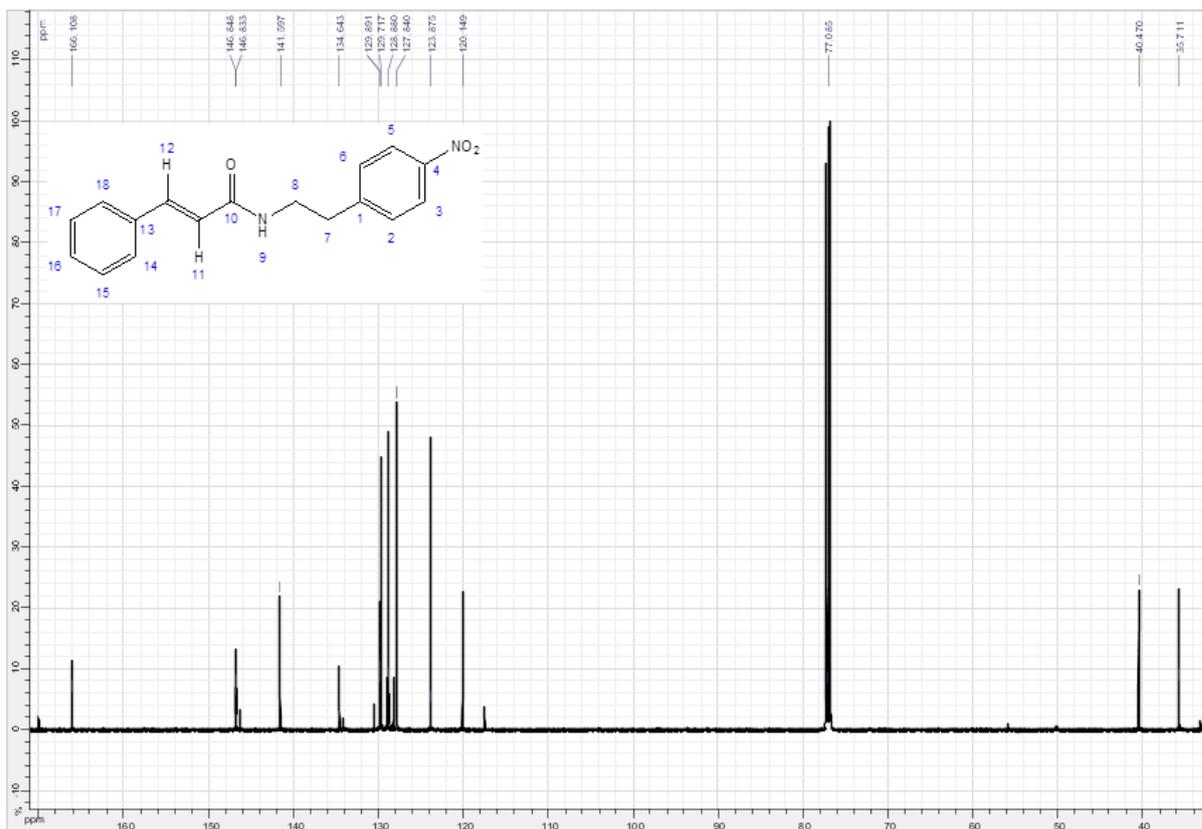
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (espectro 24) da substância **C4** mostrou banda de absorção em 1651 cm^{-1} e banda de absorção em 3312 cm^{-1} , referentes ao estiramento $C=O$ e $N-H$, indicativos da presença da função amida.



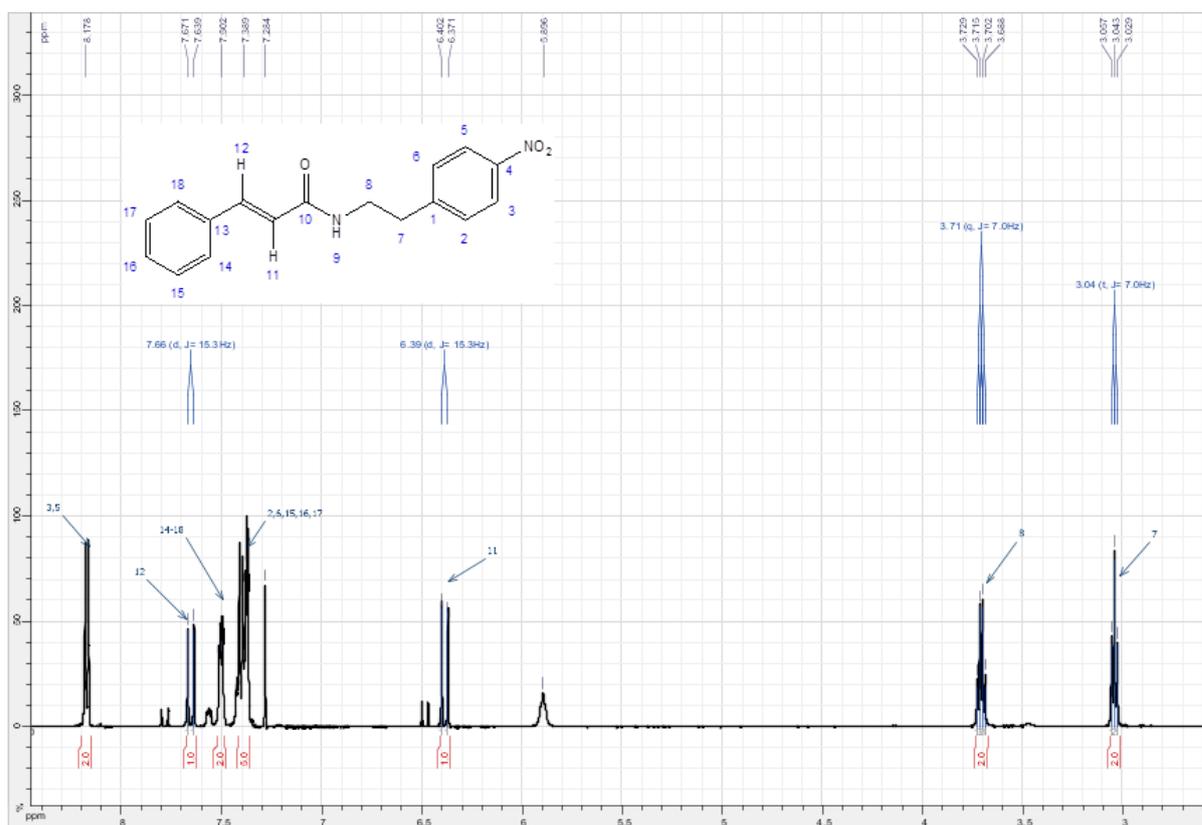
Espectro 24. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C4**.

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes a 17 átomos de carbono (espectro 25).

No espectro de RMN¹H foram observados sinais relativos a dois hidrogênios α,β -insaturados δ_H 6,39 ppm (*d*, $J=15,3$ Hz) (H-11) e δ_H 7,66 ppm (*d*, $J=15,3$ Hz) (H-12). Dois sinais relativos a átomos de hidrogênios metilênicos também foram encontrados em δ_H 3,71 ppm (*q*, $J=7,0$ Hz) (H-8) e δ_H 3,04 ppm (*t*, $J=7,0$ Hz) (H-7) (espectro 26).

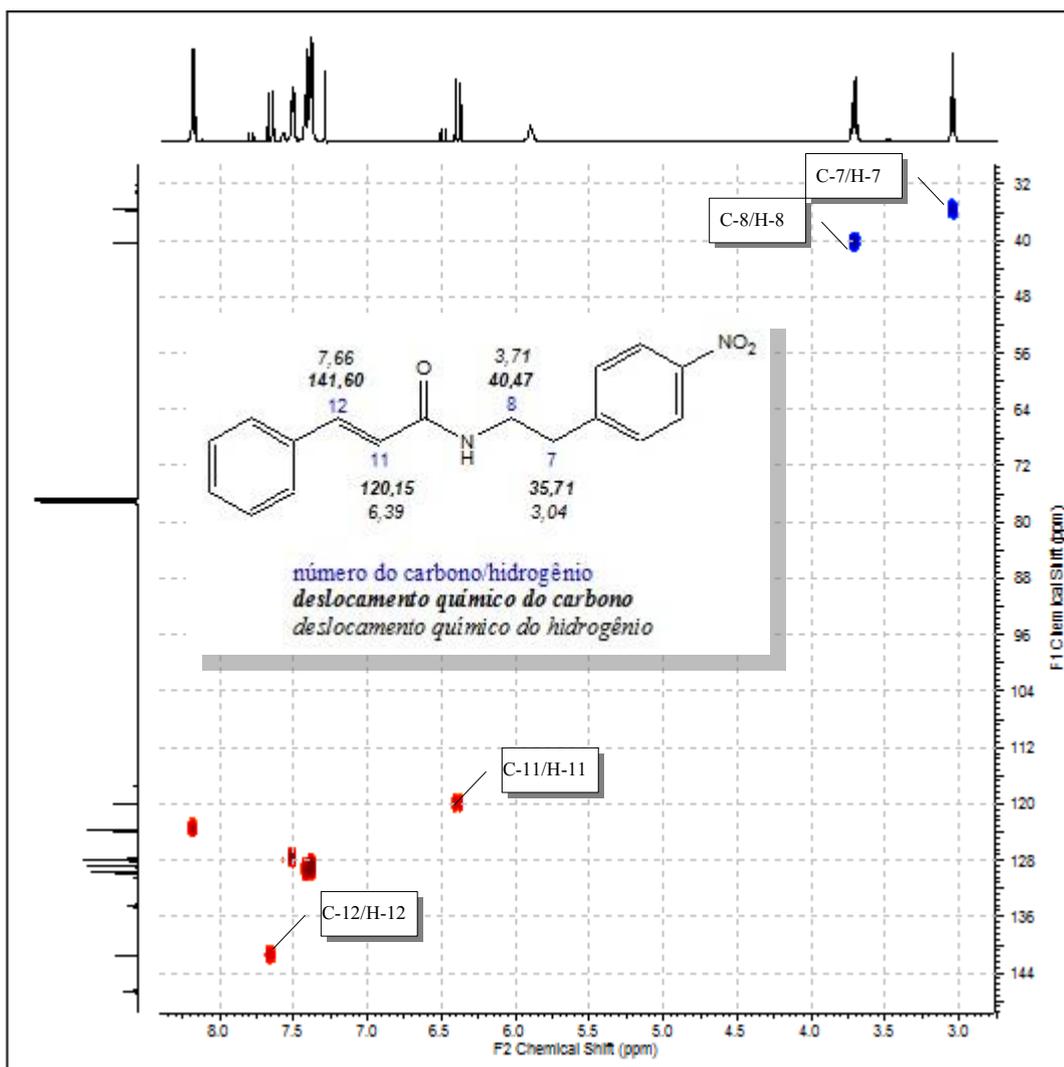


Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C da substância **C4** (CDCl_3 , 125 MHz).



Espectro 26. Espectro de RMN ^1H da substância **C4** (CDCl_3 , 500 Hz).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (espectro 27) permitiu a confirmação das atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , principalmente através das correlações observadas entre os H-11 (δ_{H} 6,39) com o C-11 (δ_{C} 120,15), H-12 (δ_{H} 7,66) com o C-12 (δ_{C} 141,60), H-7 (δ_{H} 3,04) com o C-7 (δ_{C} 35,71) e H-8 (δ_{H} 3,71) com o C-8 (δ_{C} 40,47) (tabela 8).

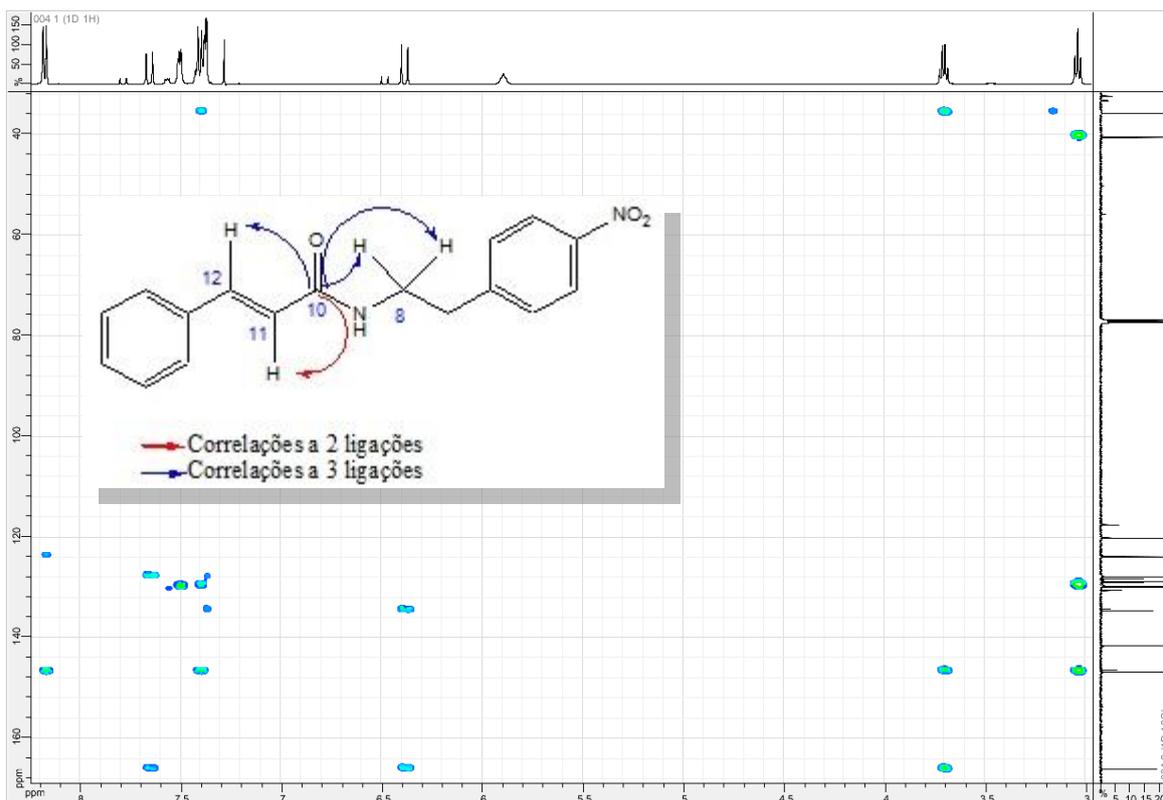


Espectro 27. Espectro de HSQC da substância **C4** (CDCl_3 , 500 Hz).

Tabela 8. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C4**.

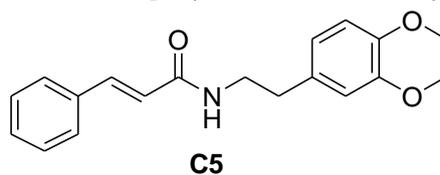
SUBSTÂNCIA C4				
	HSQC		HMBC	
	δC (ppm)	δH (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
C				
1	146,84	-	H-2;H-6;H-7	H-3;H-5;H-8
4	146,83	-	H-3;H-5	H-2;H-6
10	166,11	-	H-11	H-8;H-12
13	134,64	-	H-12;H-14;H-18	H-11;H-15;H-17
CH				
2	129,72	7,50 (m), 1H	H-3	H-6;H-7
3	123,87	8,17 (m), 1H	H-2	H-5
5	123,87	8,17 (m), 1H	H-6	H-3
6	129,72	7,50 (m), 1H	H-5	H-2;H-7
11	120,15	6,39 (d), $J=15,3$ Hz, 1H	H-12	-
12	141,60	7,66 (d), $J=15,3$ Hz, 1H	-	H-12;H-18
14	127,84	7,39 (m), 1H	H-15	H-12;H-16;H-18
15	128,88	7,39 (m), 1H	H-14;H-16	H-17
16	129,89	7,39 (m), 1H	H-15;H-17	H-14;H-18
17	128,88	7,39 (m), 1H	H-16;H-18	H-15
18	127,84	7,39 (m), 1H	H-17	H-12;H-14;H-16
CH₂				
7	35,71	3,04 (t), $J=7,0$ Hz, 2H	H-8	H-2; H-6
8	40,47	3,71 (q), $J=7,0$ Hz, 2H	H-7	-

A confirmação da função amida também foi observada no espectro de HMBC (espectro 28) através das correlações existentes a duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico (C-10) e os hidrogênios adjacentes (H-8, H-11,H-12). Contribuindo para a confirmação da substância **C4** prevista.



Espectro 28. Espectro de HMBC da substância **C4** (CDCl_3 , 500 Hz).

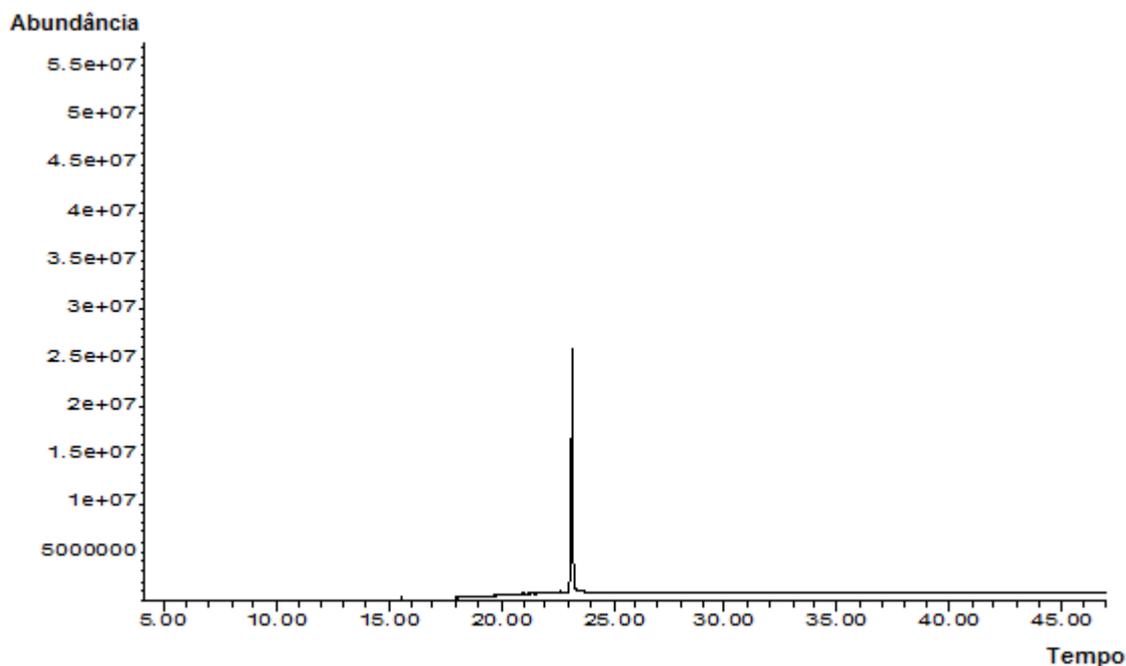
4.1.5. Determinação estrutural da *N*-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-3-fenilacrilamida (**C5**)



N-[2-(3,4-Dimetoxifenil)etil]-3-fenilacrilamida

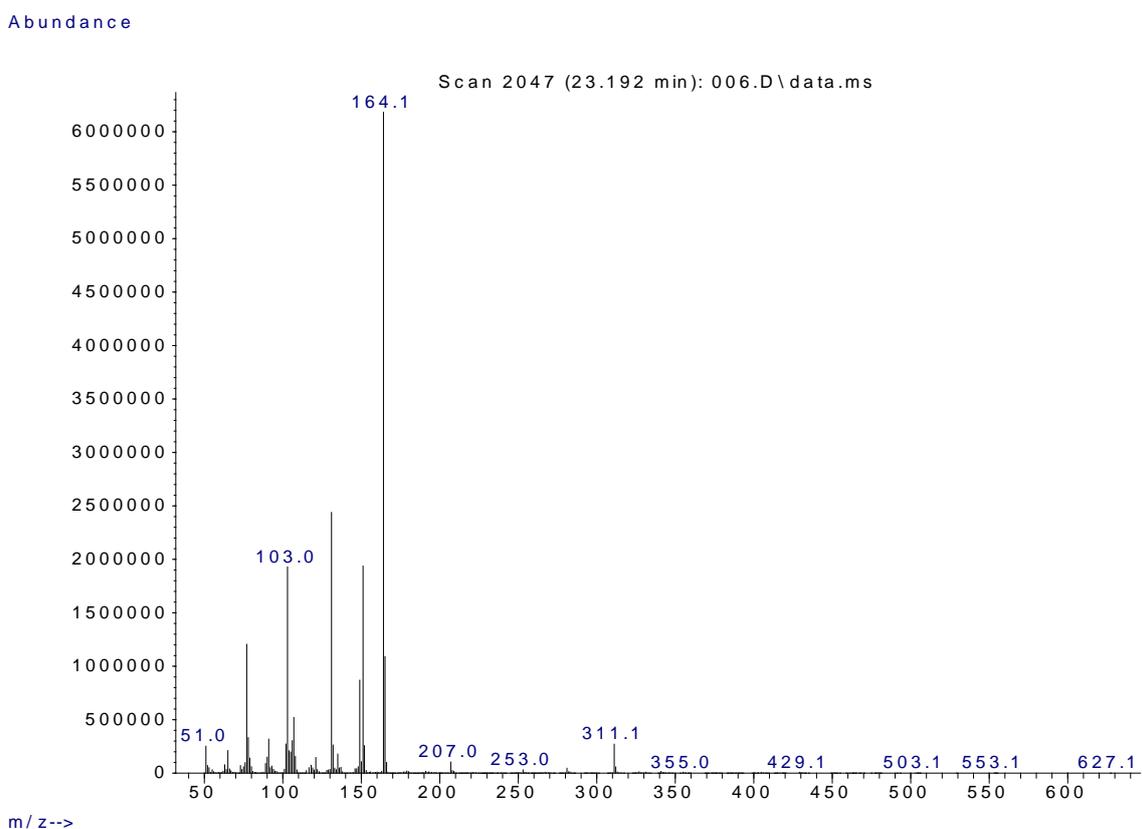
A substância **C5** foi sintetizada com o rendimento de 32.5%, apresentando-se como sólido cristalino, solúvel em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, com faixa de fusão entre 110.8–111.0°C.

A cromatografia gasosa da substância isolada apresentou um sinal majoritário com tempo de retenção de 23.2 minutos (espectro 29).



Espectro 29. Cromatograma da substância **C5**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular m/z 311.2 condizente com a fórmula molecular $C_{19}H_{11}NO_3$ (espectro 30).



Espectro 30. Espectro de massas da substância **C5** (CH_2Cl_2).

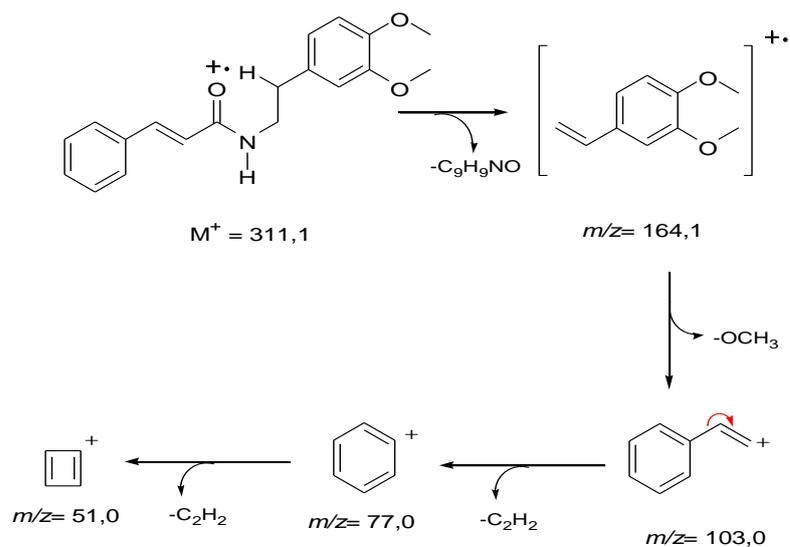
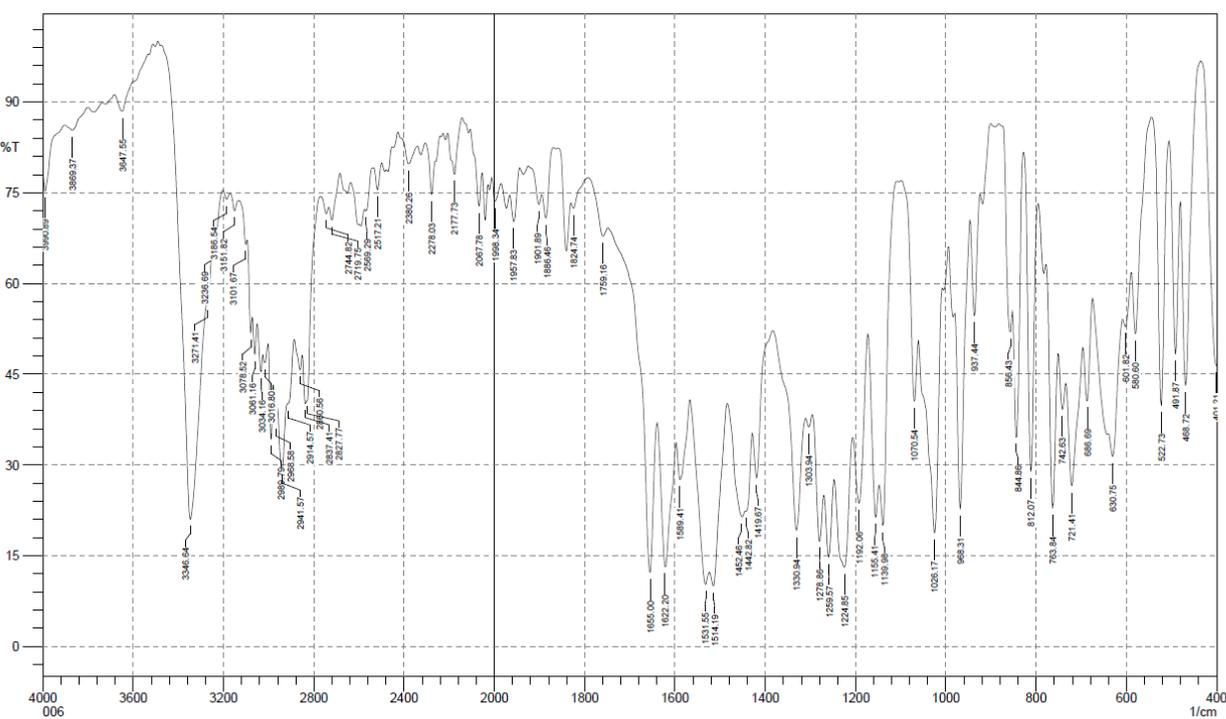


Figura 11. Proposta de fragmentação de **C5** para os principais sinais do **Espectro 30**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (espectro 31) da substância **C5** mostrou banda de absorção em 1655 cm^{-1} e banda de absorção em 3347 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O e N-H, indicando a presença da função amida na estrutura.

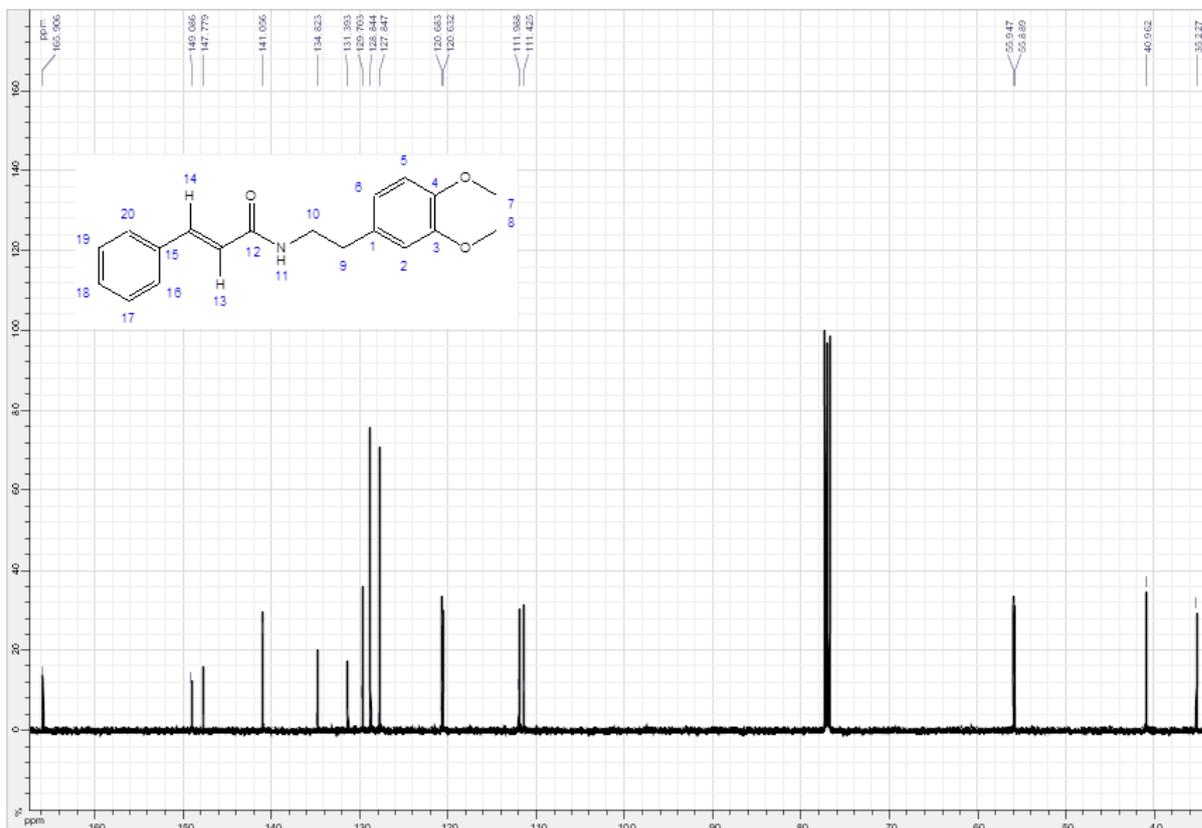


Espectro 31. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C5**.

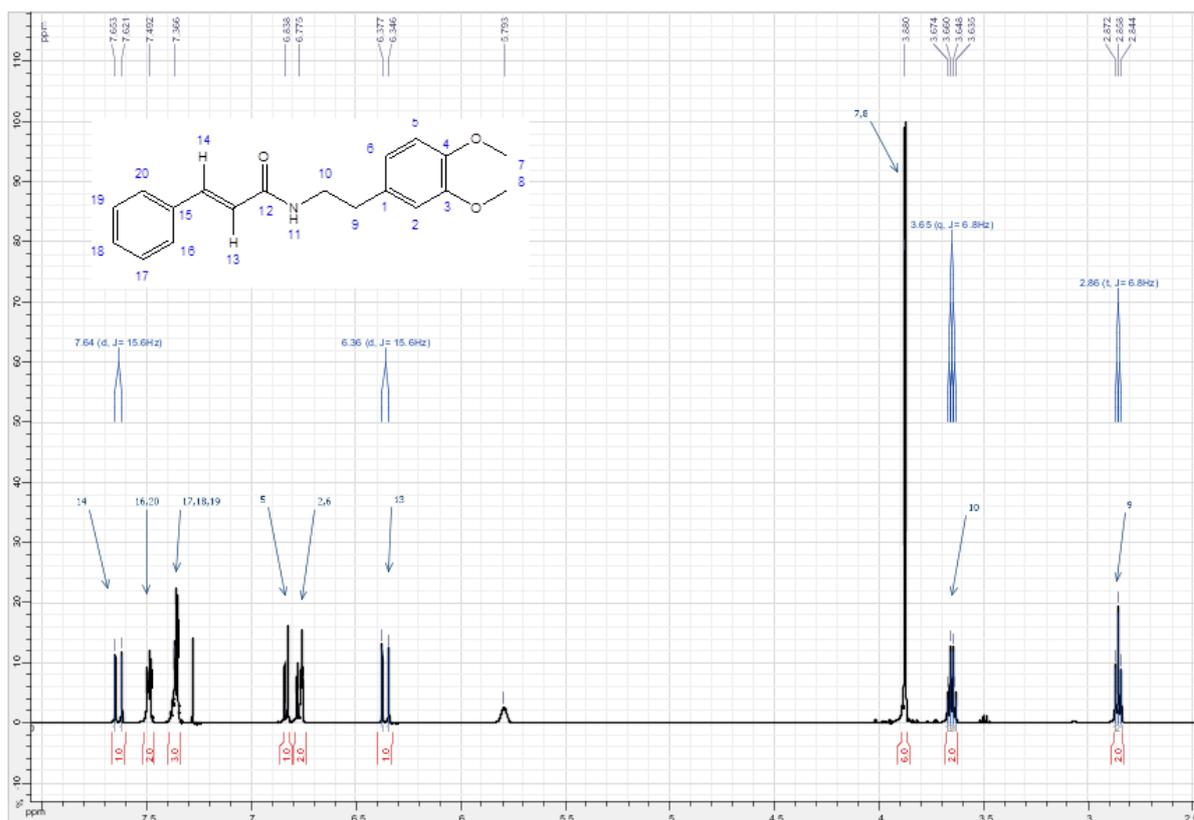
O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes a 19 átomos de carbono (espectro 32).

No espectro de RMN¹H foram observados sinais para os átomos de hidrogênio

referentes a α,β -insaturação δ_H 6,36 ppm (*d*, $J=15,6$ Hz) (H-13) e δ_H 7,64 ppm (*d*, $J=15,6$ Hz) (H-14), e dois sinais relativos aos átomos de hidrogênios metilênicos são encontrados em δ_H 3,65 ppm (*q*, $J=6,8$ Hz) (H-10) e δ_H 2,86 ppm (*t*, $J=6,8$ Hz) (H-9) (espectro 33).

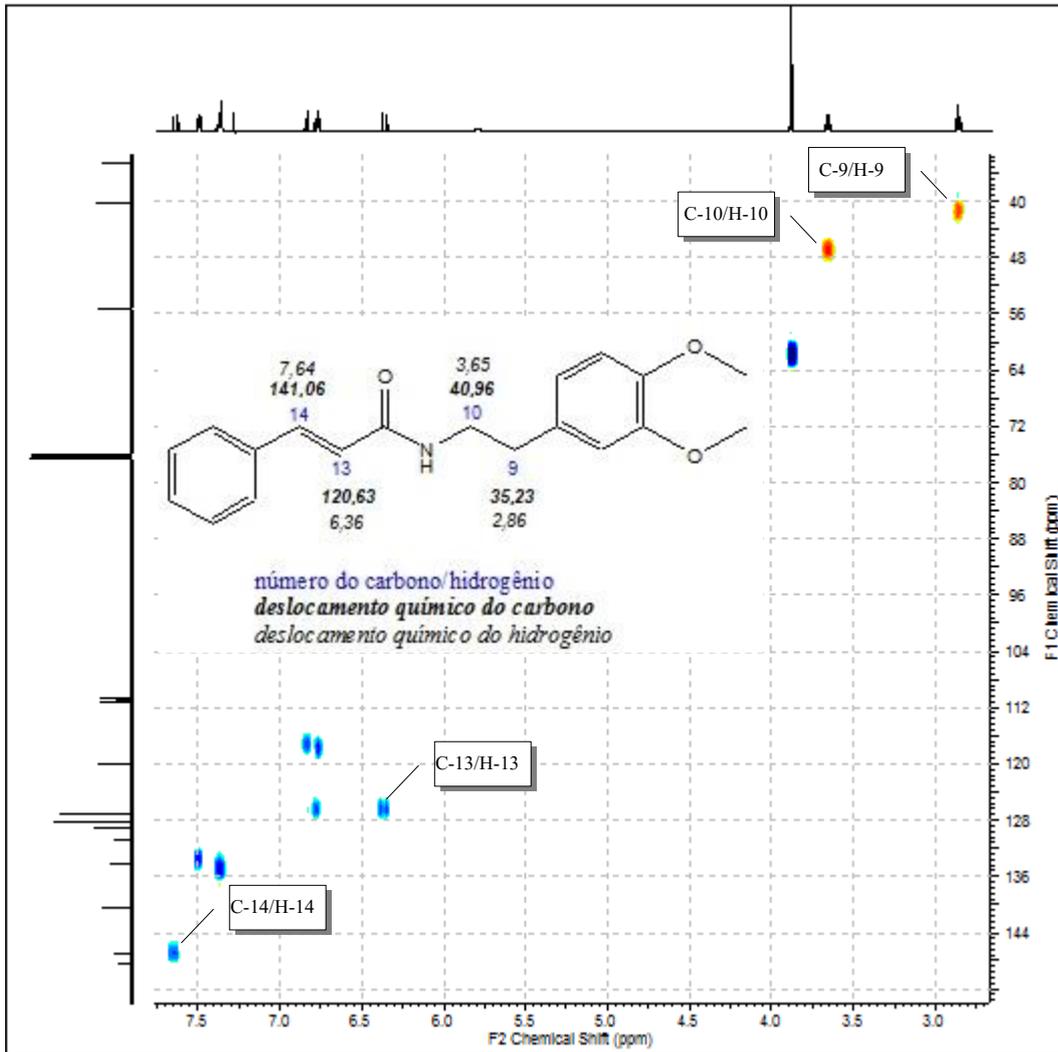


Espectro 32. Espectro de RMN ^{13}C da substância **C5** (CDCl₃, 125 MHz).



Espectro 33. Espectro de RMN ^1H da substância **C5** (CDCl_3 , 500 Hz).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (espectro 34) permitiu a confirmação das atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , principalmente através das correlações observadas entre os H-13 (δ_{H} 6,36) com o C-13 ($\delta_{120,63}$), H-14 (δ_{H} 7,64) com o C-14 ($\delta_{141,06}$), H-9 (δ_{H} 2,86) com o C-9 ($\delta_{35,23}$) e H-10 (δ_{H} 3,65) com o C-10 ($\delta_{40,96}$) (tabela 9).

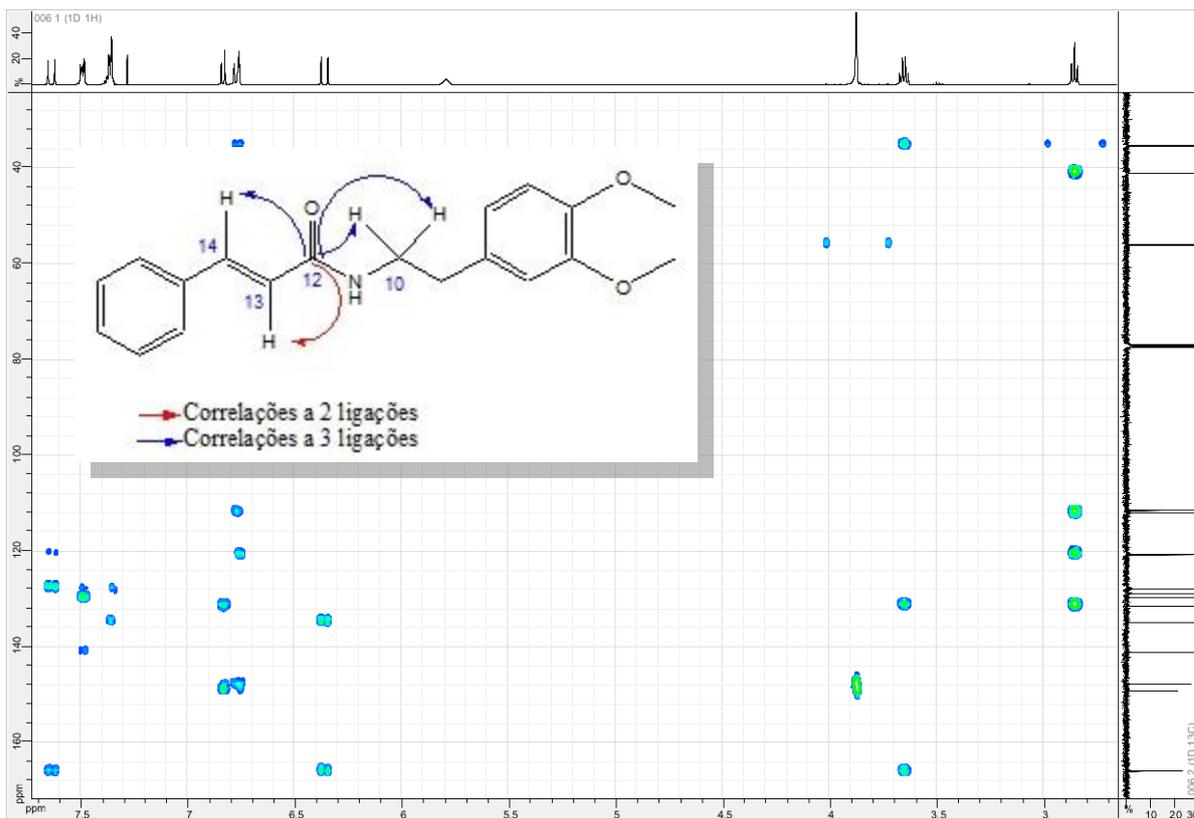


Espectro 34. Espectro de HSQC da substância **C5** (CDCl₃, 500 Hz).

Tabela 9. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C5**.

SUBSTÂNCIA C5				
HSQC		HMBC		
C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
1	131,39	-	H-2;H-6;H-9	H-5;H-10
3	147,78	-	H-2	H-5;H-8
4	149,05	-	H-5	H-6;H-7
12	165,91	-	H-13	H-10;H-14
15	134,82	-	H-14	H-13;H-17;H-19
CH				
2	111,99	6,77(m), 1H	-	H-6;H-9
5	111,42	6,84(m), 1H	H-6	-
6	120,68	6,77(m), 1H	H-5	H-2;H-9
13	120,63	6,36 (d), $J=15,6$ Hz, 1H	H-14	-
14	141,06	7,64 (d), $J=15,6$ Hz, 1H	H-13	H-16;H-20
16	127,85	7,49(m), 1H	H-17	H-14;H-18;H-20
17	128,84	7,37(m), 1H	H-16;H-18	H-19
18	129,70	7,37(m), 1H	H-17;H-19	H-16;H-20
19	128,84	7,37(m), 1H	H-18;H-20	H-17
20	127,85	7,49(m), 1H	H-19	H-14;H-16;H-18
CH₂				
9	35,23	2,86(t), $J=6,8$ Hz, 2H	H-10	H-2;H-6
10	40,96	3,65(q), $J=6,8$ Hz, 2H	H-9	-
CH₃				
7	55,89	3,88(s), 3H	-	-
8	55,95	3,88(s), 3H	-	-

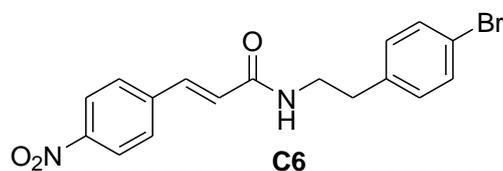
A formação da função amida também foi confirmada no espectro de HMBC (espectro 35) pela correlação existente a duas e três ligações do carbono carbonílico (C-12) e os hidrogênios adjacentes (H-10, H-13,H-14).



Espectro 35. Espectro de HMBC da substância **C5** (CDCl_3 , 500 Hz).

Desta forma, a substância **C5** mostrou dados espectrais consistentes com sua estrutura.

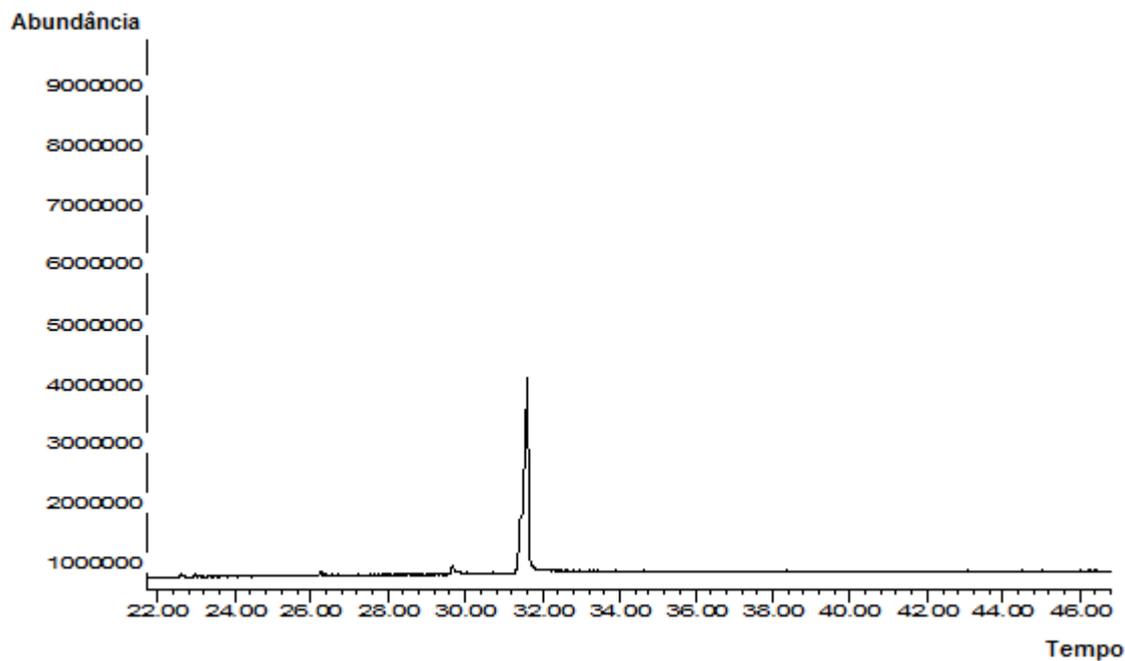
4.1.6. Determinação estrutural da *N*-[2-(4-bromofenil)etil]-3-(4-nitrofenil)-acrilamida (**C6**)



N-[2-(4-Bromofenil)etil]-3-(4-nitrofenil)-acrilamida

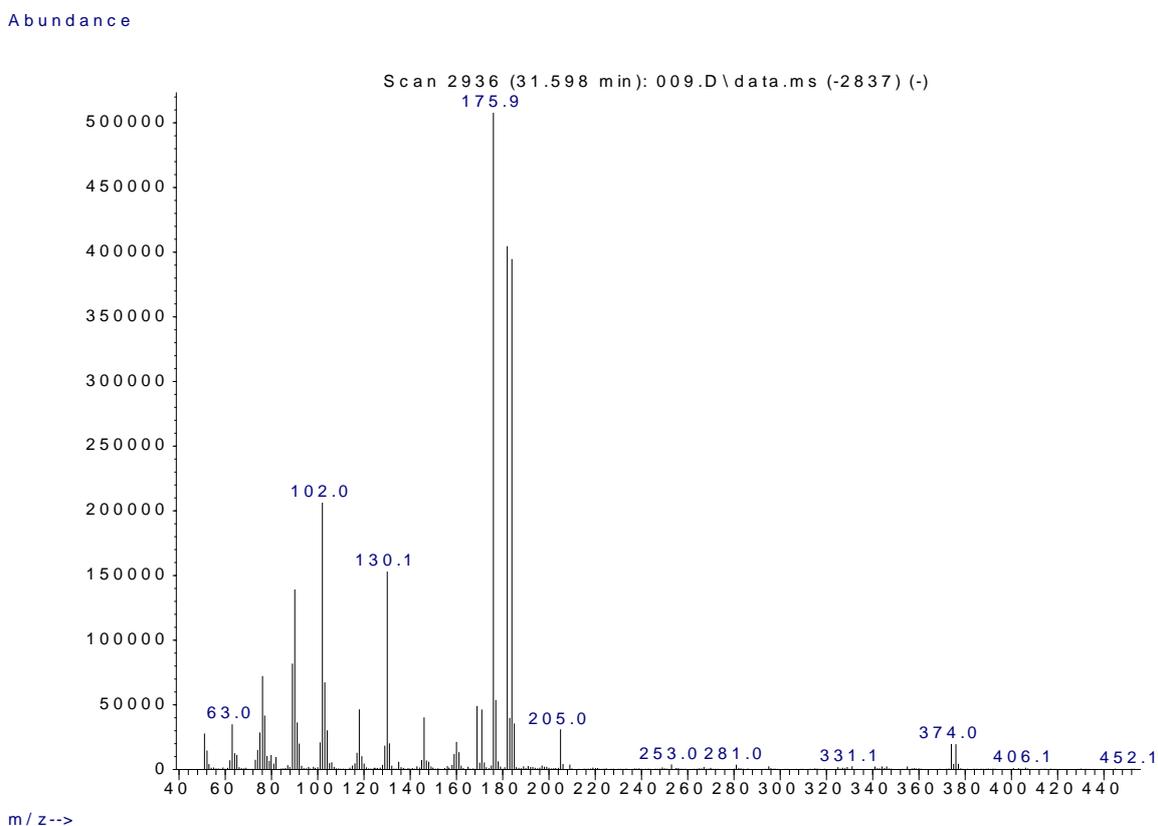
A substância **C6** foi sintetizada com o rendimento de 89.6%, apresentando-se como sólido cristalino de coloração amarelada, solúvel em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, com faixa de fusão entre 146.0–147.0°C.

A cromatografia gasosa da substância isolada apresentou um sinal majoritário no tempo de retenção de 31.4 minutos (espectro 36).



Espectro 36. Cromatograma da substância **C6**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular m/z 374.0 condizente com a fórmula molecular $C_{17}H_{15}BrN_2O_3$ (espectro 37).



Espectro 37. Espectro de massas da substância **C6** (CH_2Cl_2).

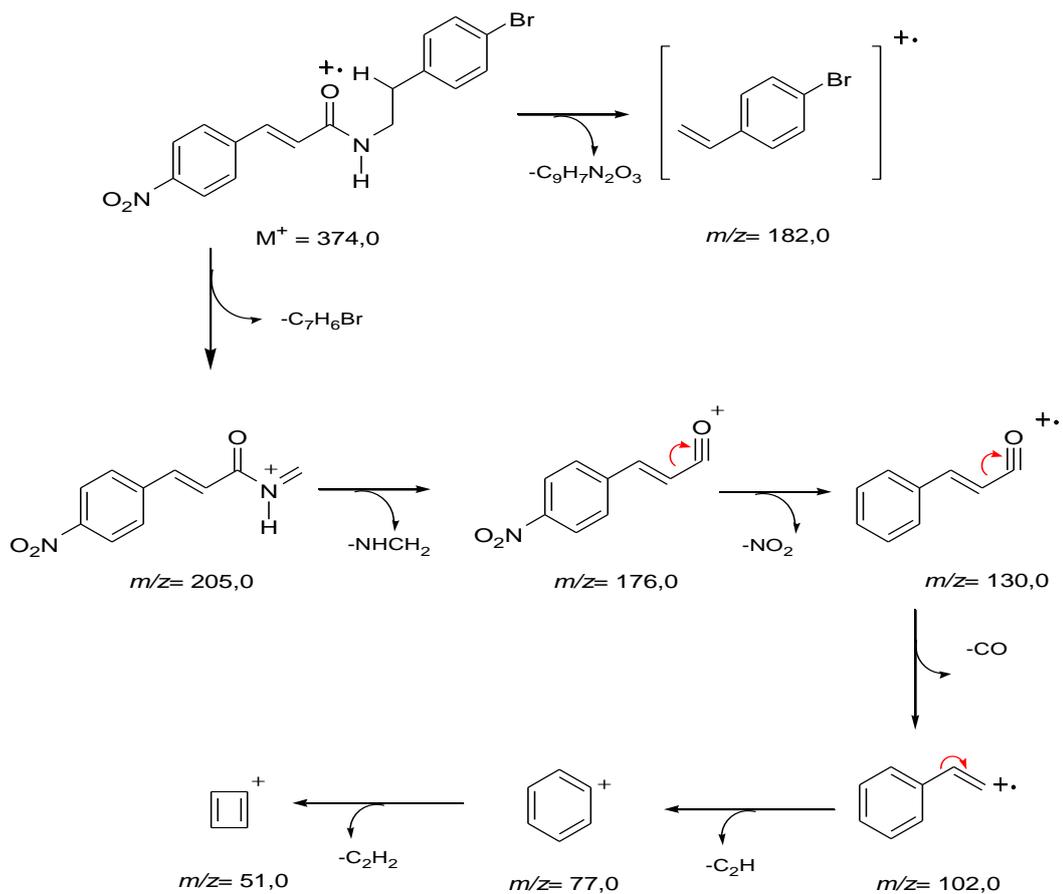
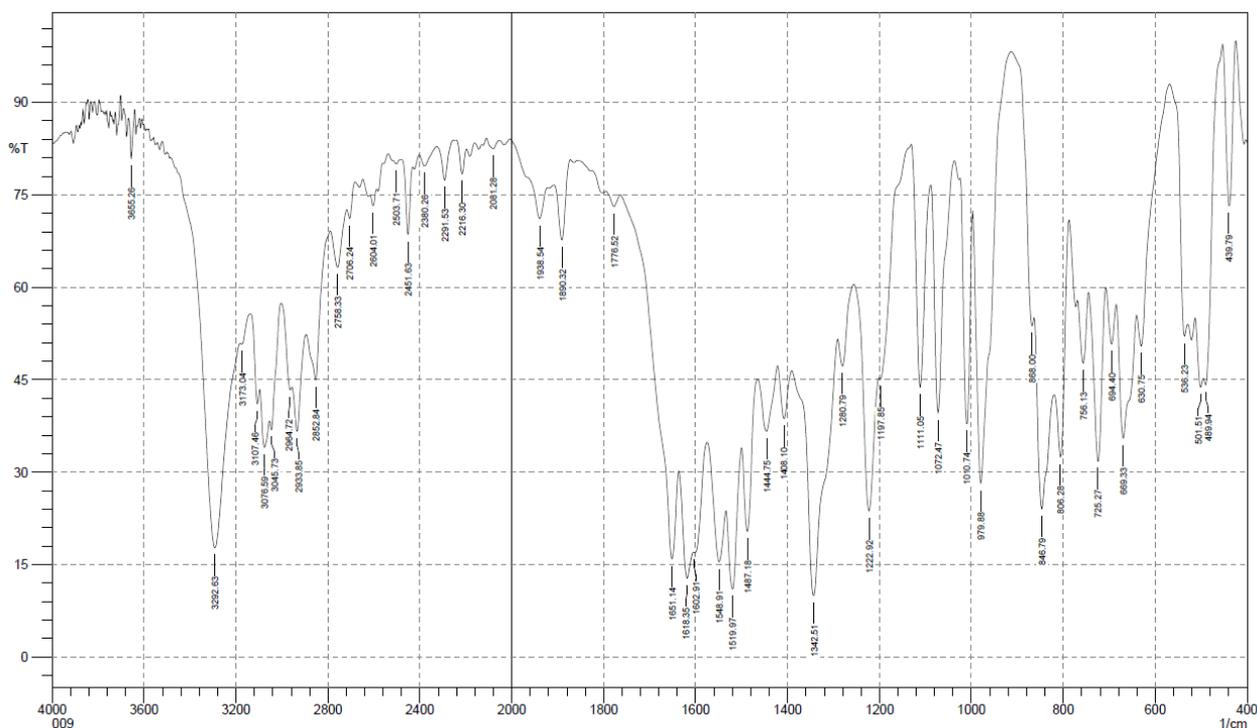


Figura 12. Proposta de fragmentação de **C6** para os principais sinais do **Espectro 37**.

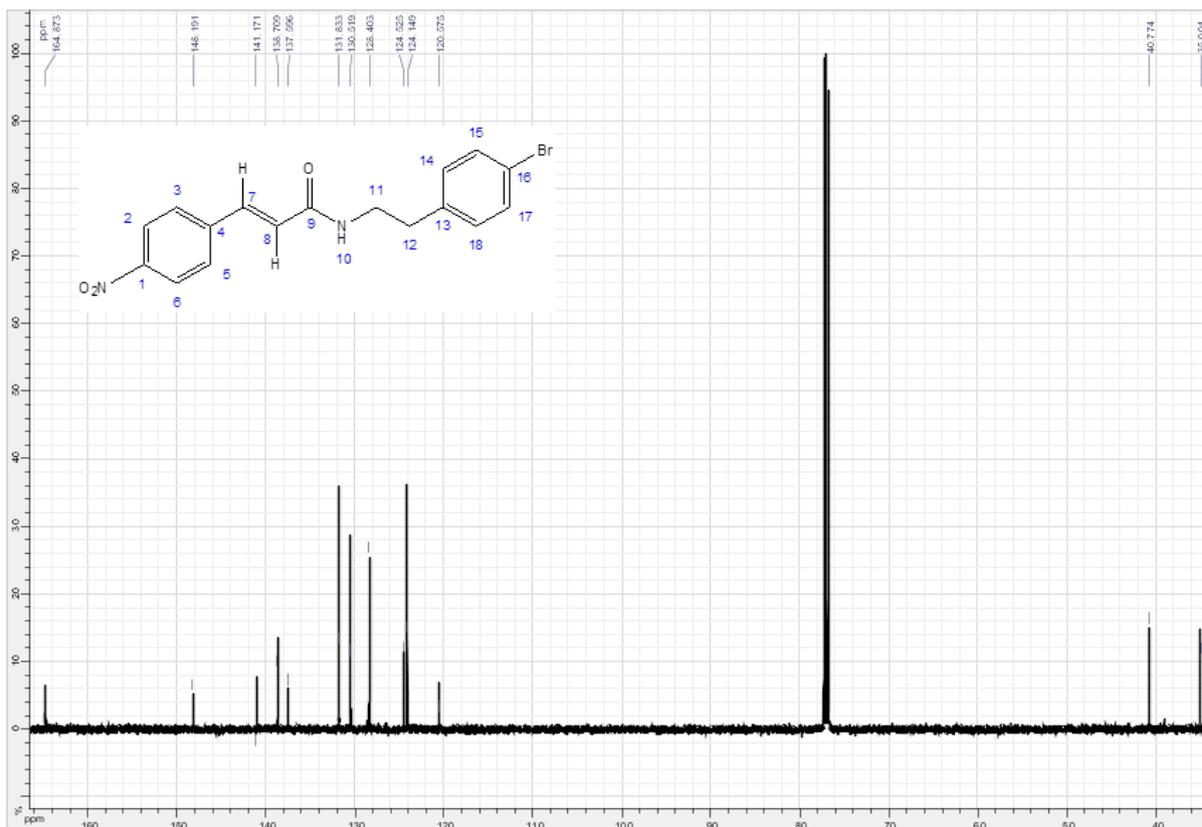
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (espectro 38) da substância **C6** mostrou banda de absorção em 1651 cm^{-1} e banda de absorção em 3292 cm^{-1} , referentes aos estiramentos C=O e N-H, indicando da presença de função amida na estrutura.



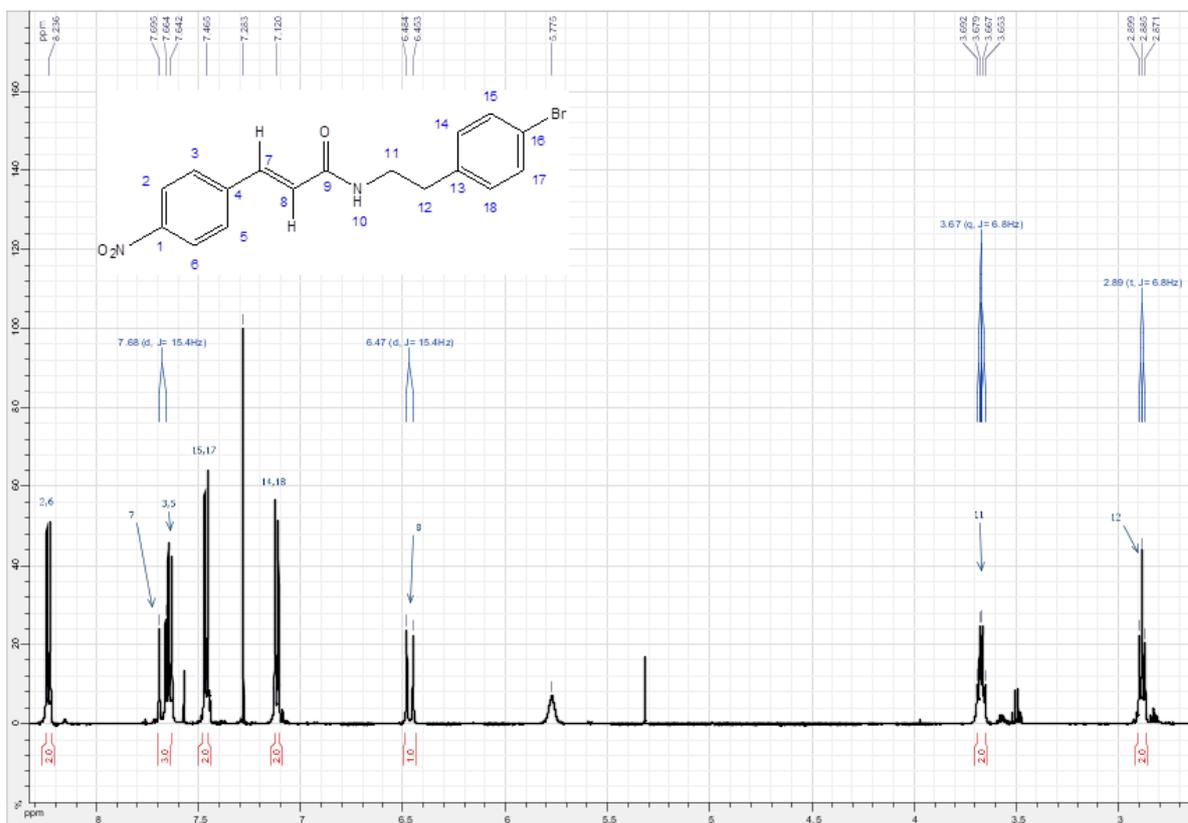
Espectro 38. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C6**.

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes a 17 átomos de carbono (espectro 39).

A partir do espectro de RMN¹H foi observado sinais referentes a dois átomos de hidrogênio α,β -insaturados δ_H 6,47 ppm (*d*, $J=15,4$ Hz) (H-8) e δ_H 7,68 ppm (*d*, $J=15,4$ Hz) (H-7), além de dois sinais relativos a átomos de hidrogênios metilênicos são encontrados em δ_H 3,67 ppm (*q*, $J=6,8$ Hz) (H-11) e δ_H 2,88 ppm (*t*, $J=6,8$ Hz) (H-12) (espectro 40).

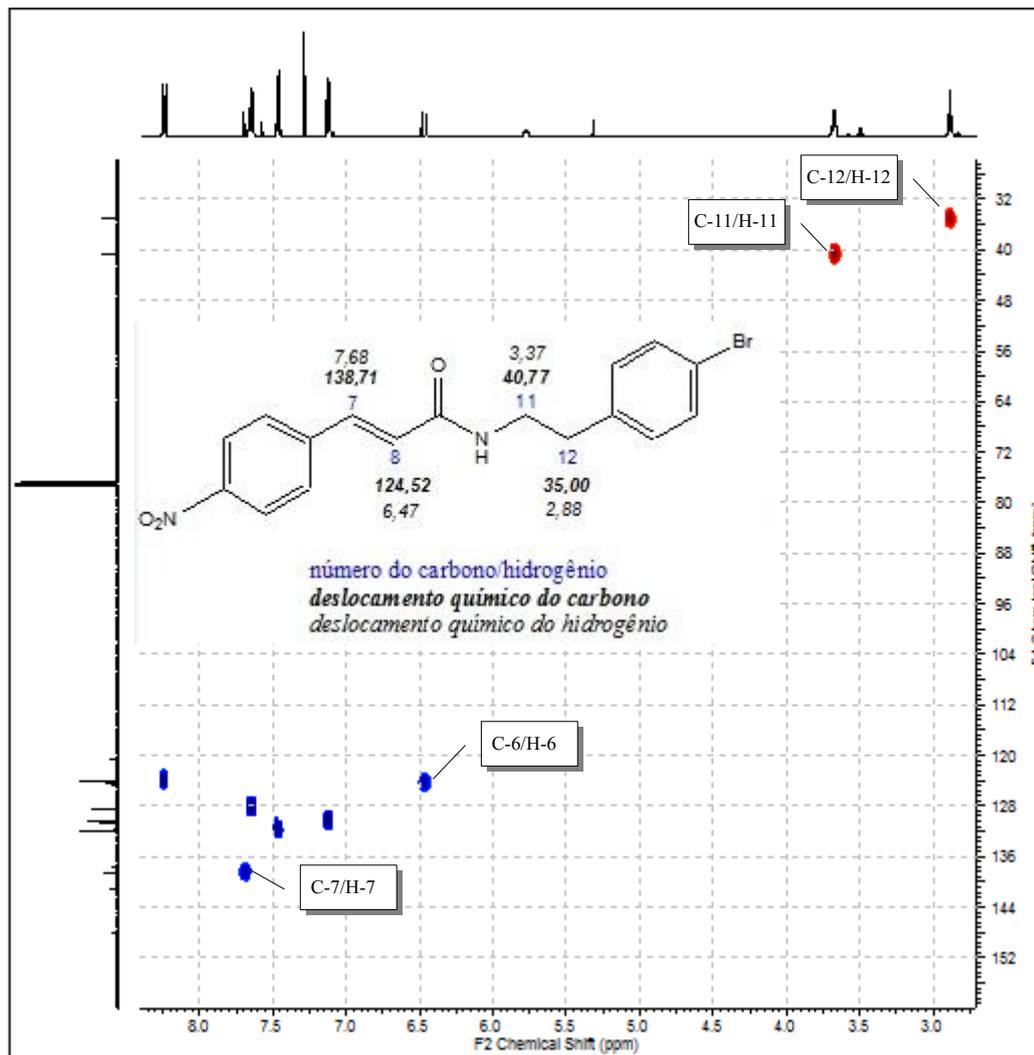


Espectro 39. Espectro de RMN ^{13}C da substância **C6** (CDCl_3 , 125 MHz).



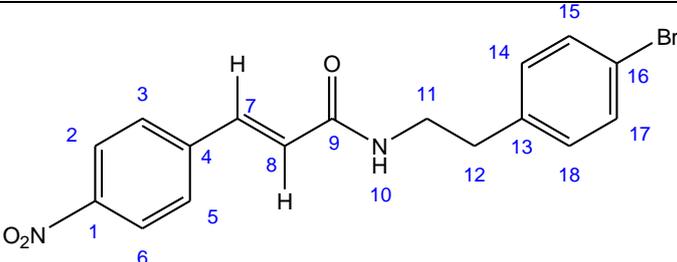
Espectro 40. Espectro de RMN ^1H da substância **C6** (CDCl_3 , 500 Hz).

A partir do mapa de correlação heteronuclear HSQC (espectro 41) foi possível confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , principalmente através das correlações observadas entre os H-7 (δ_{H} 7,68) com o C-7 ($\delta_{13\text{C}}$ 138,71), H-8 (δ_{H} 6,47) com o C-8 ($\delta_{13\text{C}}$ 124,52), H-11 (δ_{H} 3,67) com o C-11 ($\delta_{13\text{C}}$ 40,77) e H-12 (δ_{H} 2,88) com o C-12 ($\delta_{13\text{C}}$ 35,00) (tabela 10).

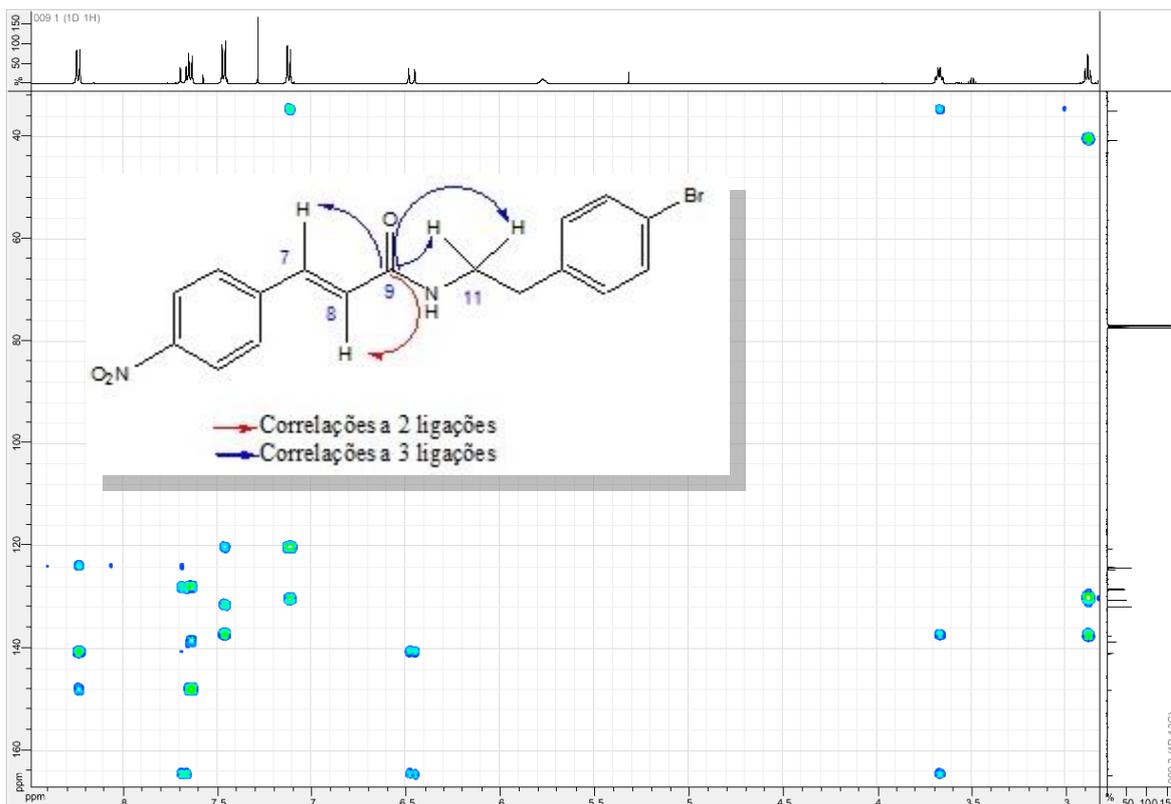


Espectro 41. Espectro de HSQC da substância **C6** (CDCl_3 , 500 Hz).

Tabela 10. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C6**.

SUBSTÂNCIA C6				
				
	HSQC		HMBC	
C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
1	148,19	-	H-2;H-6	H-3;H-5
4	141,17	-	H-3;H-5;H-7	H-2;H-6;H-8
9	164,87	-	H-8	H-7;H-11
13	137,60	-	H-12	H-11;H-15;H-17
16	120,57	-	H-15;H-17	H-14;H-18
CH				
2	124,15	8,24(m), 1H	H-3	H-6
3	128,40	7,64(m), 1H	H-2	H-5;H-7
5	128,40	7,64(m), 1H	H-6	H-3;H-7
6	124,15	8,24(m), 1H	H-5	H-2
7	138,71	7,68 (d), $J=15,4$ Hz, 1H	H-8	H-3;H-5
8	124,52	6,47 (d), $J=15,4$ Hz, 1H	H-17	-
14	130,52	7,12(m), 1H	H-15	H-12;H-18
15	131,83	7,46(m), 1H	H-14	H-17
17	131,83	7,46(m), 1H	H-18	H-15
18	130,52	7,12(m), 1H	H-17	H-12;H-14
CH₂				
11	40,77	3,67 (q), $J=6,8$ Hz, 2H	H-12	-
12	35,00	2,88 (t), $J=6,8$ Hz, 2H	H-11	H-14;H-18

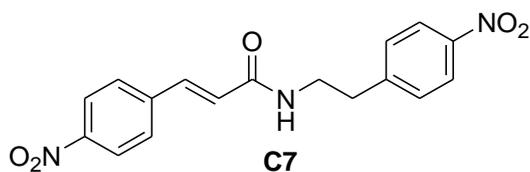
A confirmação da formação da função amida também foi observada no espectro de HMBC (espectro 42) através da correlação existente a duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico (C-9) e os hidrogênios adjacentes (H-7, H-8,H-11).



Espectro 42. Espectro de HMBC da substância **C6** (CDCl_3 , 500 Hz).

Desta forma, a substância **C6** mostrou dados espectrais consistentes com sua estrutura.

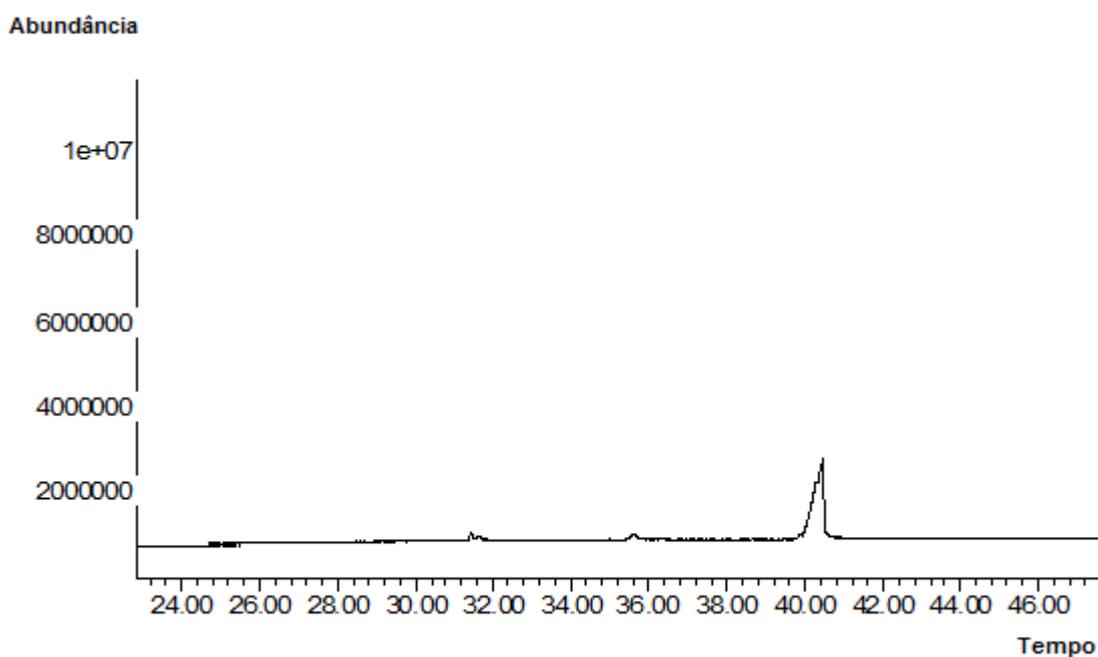
4.1.7. Determinação estrutural da 3-(4-nitrofenil)-*N*-[2-(4-nitrofenil)etil]-acrilamida (**C7**)



3-(4-Nitrofenil)-*N*-[2-(4-nitrofenil)etil]-acrilamida

A substância **C7** foi sintetizada com o rendimento de 82.3%, apresentando-se como sólido amorfo de coloração avermelhada, solúvel em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, com faixa de fusão entre 149.6–151.2°C.

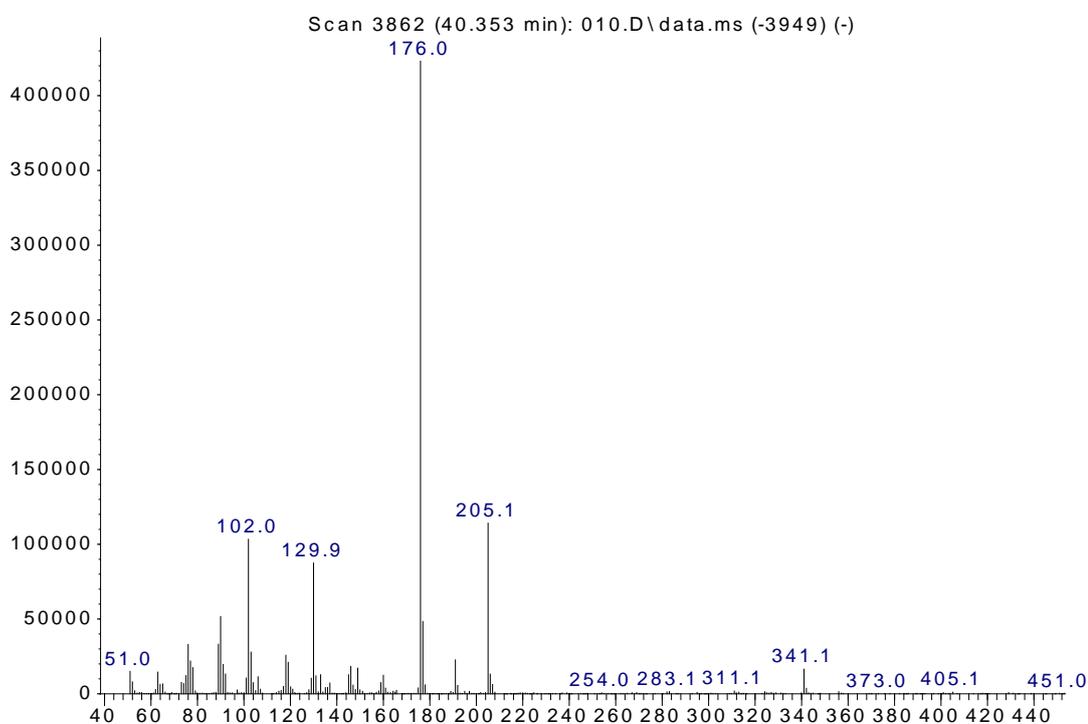
A cromatografia gasosa da substância isolada apresentou um sinal majoritário no tempo de retenção de 40.6 minutos (espectro 43).



Espectro 43. Cromatograma da substância **C7**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular m/z 341.1 condizente com a fórmula molecular $C_{17}H_{15}N_3O_5$ (espectro 44).

Abundance



$m/z \rightarrow$

Espectro 44. Espectro de massas da substância **C7** (CH_2Cl_2).

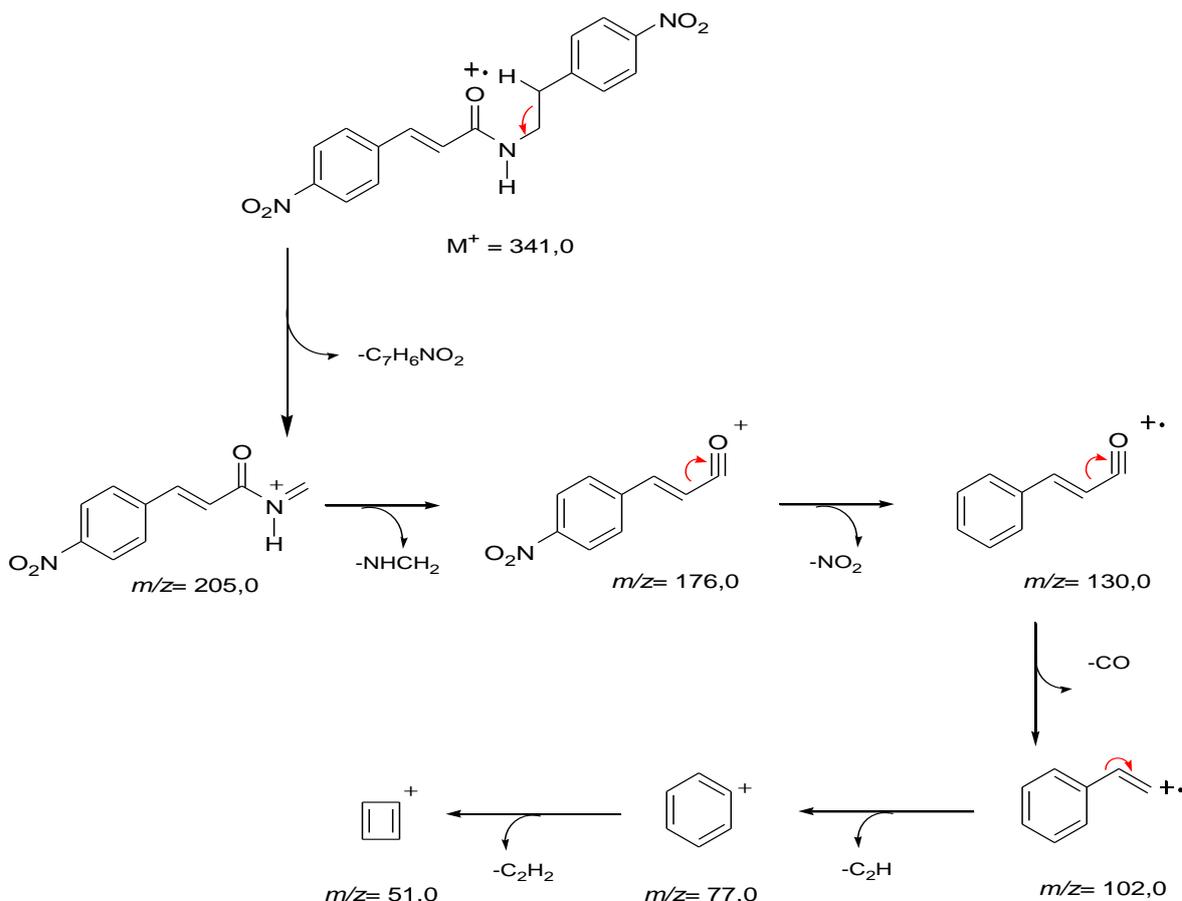
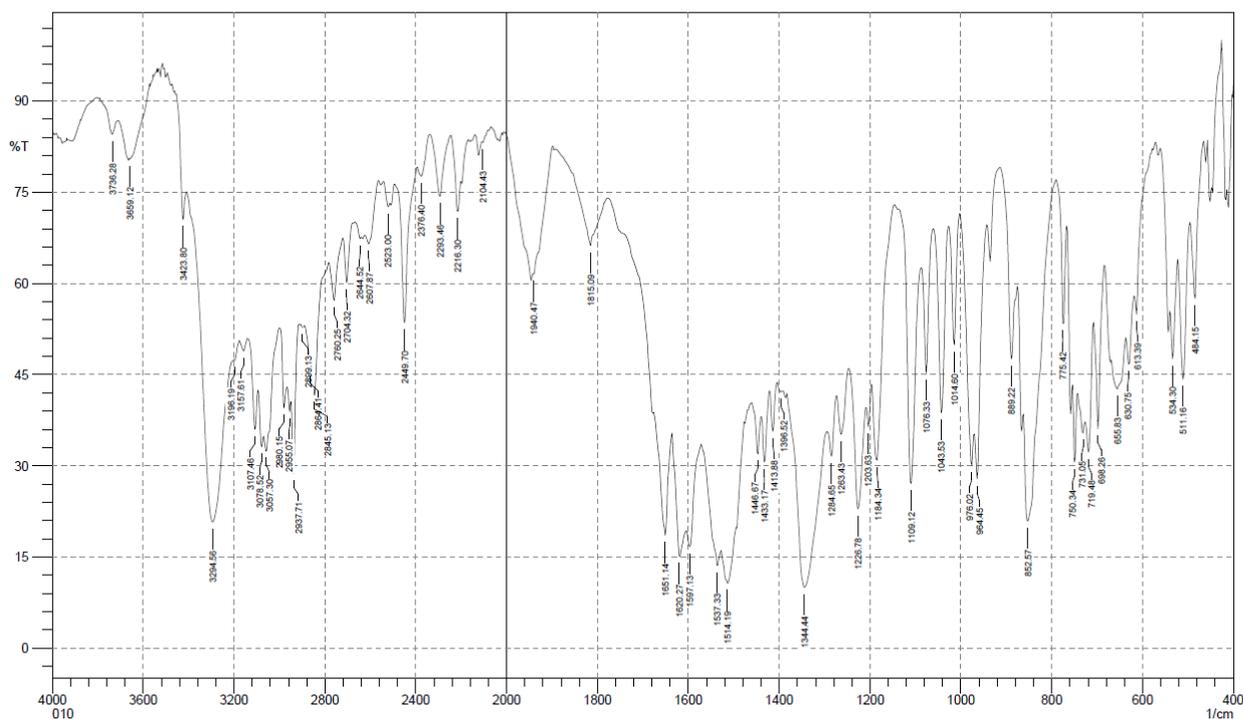


Figura 13. Proposta de fragmentação de **C7** para os principais sinais do **Espectro 44**.

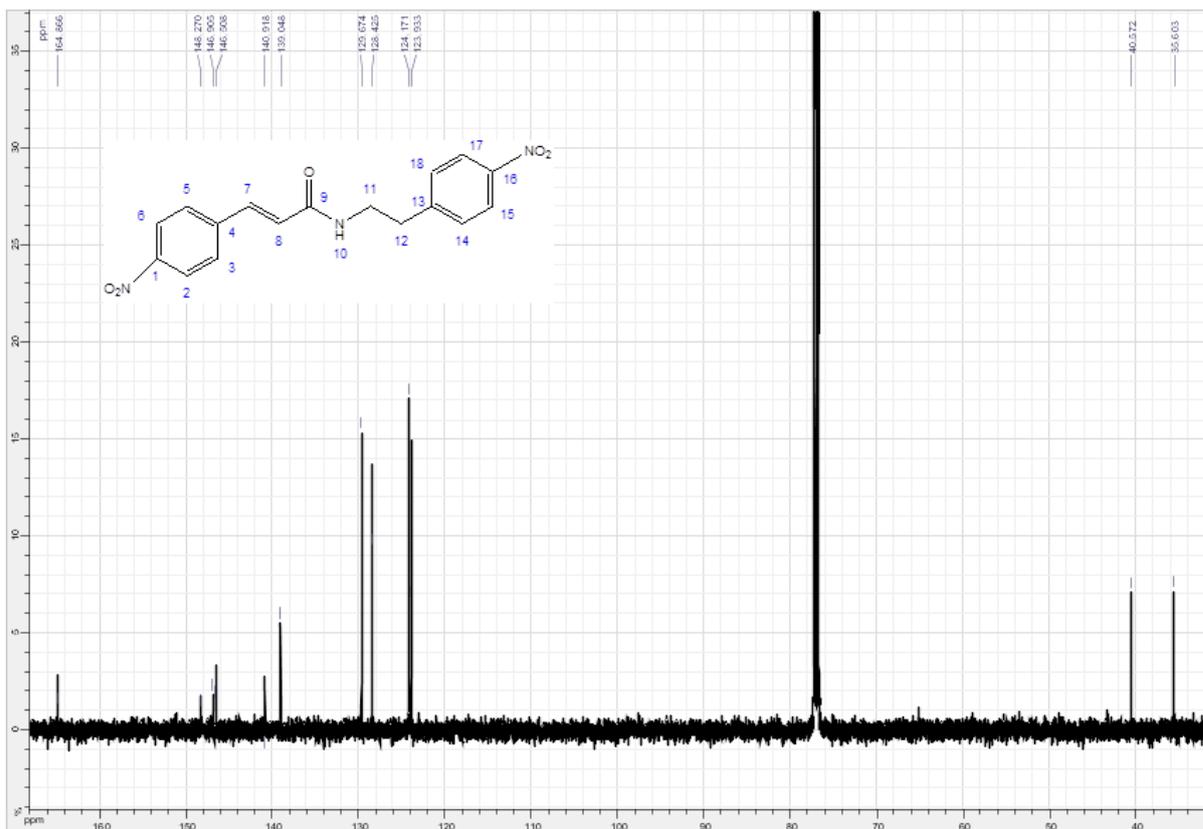
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (espectro 45) da substância **C7** mostrou banda de absorção em 1620 cm^{-1} e banda de absorção em 3294 cm^{-1} , referentes aos estiramentos C=O e N-H, indicativos da presença da função amida na estrutura.



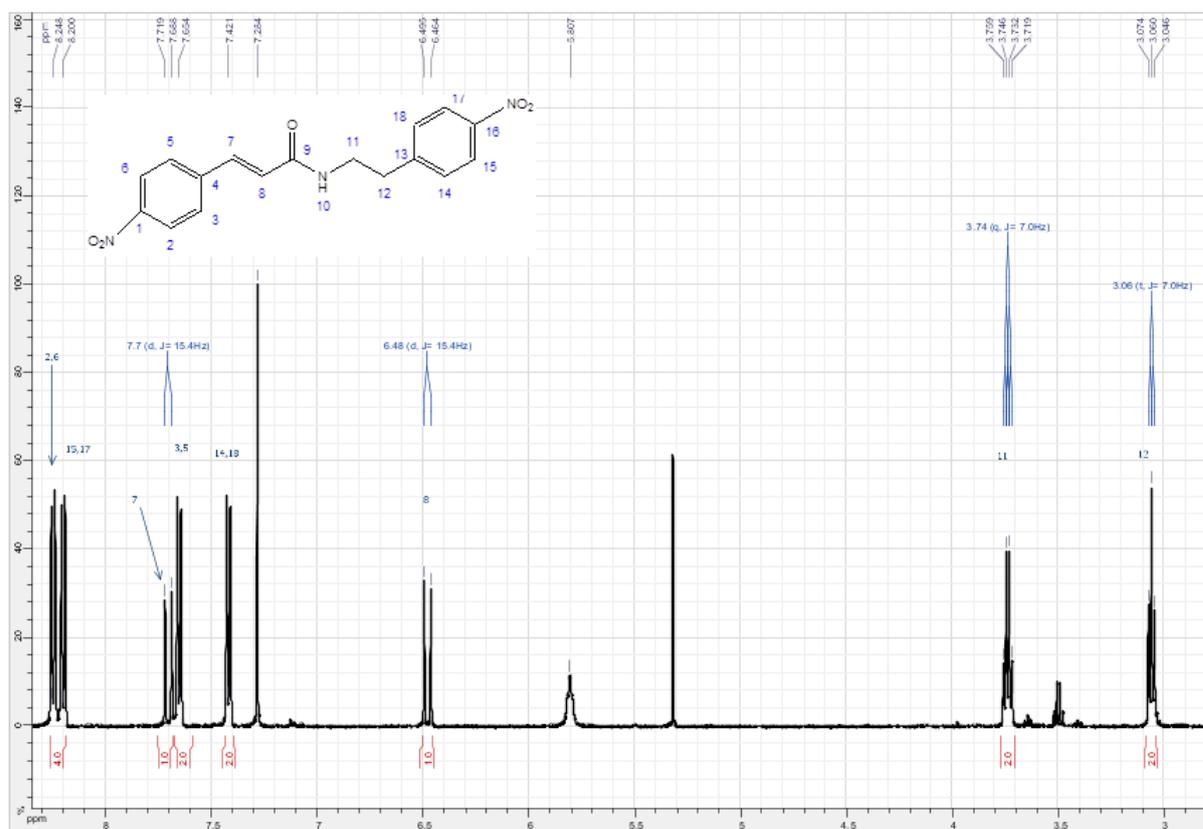
Espectro 45. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C7**.

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes a 17 átomos de carbono (espectro 46).

No espectro de RMN¹H foram observados sinais referentes a dois hidrogênios α,β -insaturados δ_H 6,48 ppm (*d*, $J=15,4$ Hz) (H-8) e δ_H 7,70 ppm (*d*, $J=15,4$ Hz) (H-7). Dois sinais relativos aos átomos de hidrogênios metilênicos são encontrados em δ_H 3,74 ppm (*q*, $J=7,0$ Hz) (H-11) e δ_H 3,06 ppm (*t*, $J=7,0$ Hz) (H-12) (espectro 47).

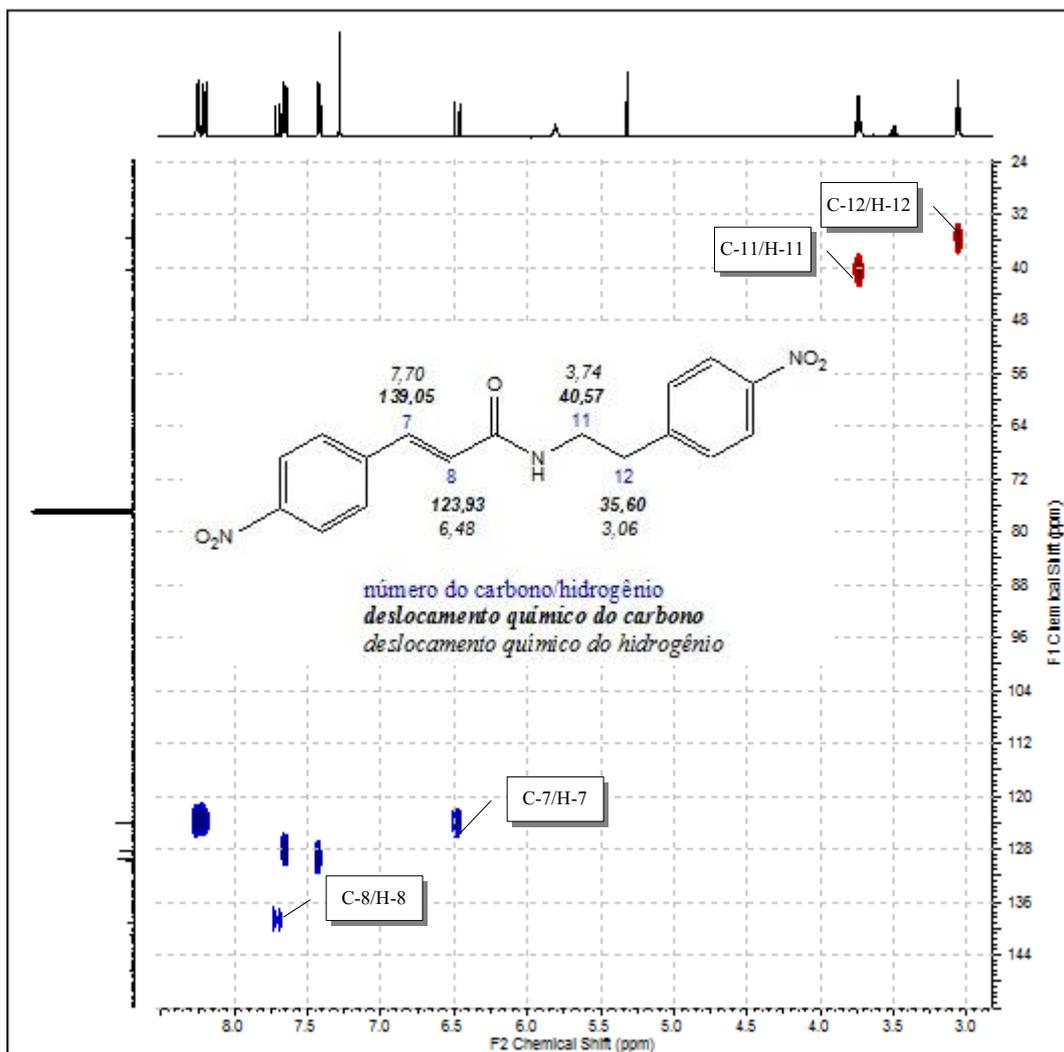


Espectro 46. Espectro de RMN ¹³C da substância C7 (CDCl₃, 125 MHz).



Espectro 47. Espectro de RMN ¹H da substância C7 (CDCl₃, 500 Hz).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (Espectro 48) permitiu a confirmação das atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , principalmente através de suas correlações entre os H-7 (δ_{H} 7,70) com o C-7 ($\delta_{139,05}$), H-8 (δ_{H} 6,48) com o C-8 ($\delta_{123,93}$), H-11 (δ_{H} 3,74) com o C-11 ($\delta_{40,57}$) e H-12 (δ_{H} 3,06) com o C-12 ($\delta_{35,60}$) (tabela 11).



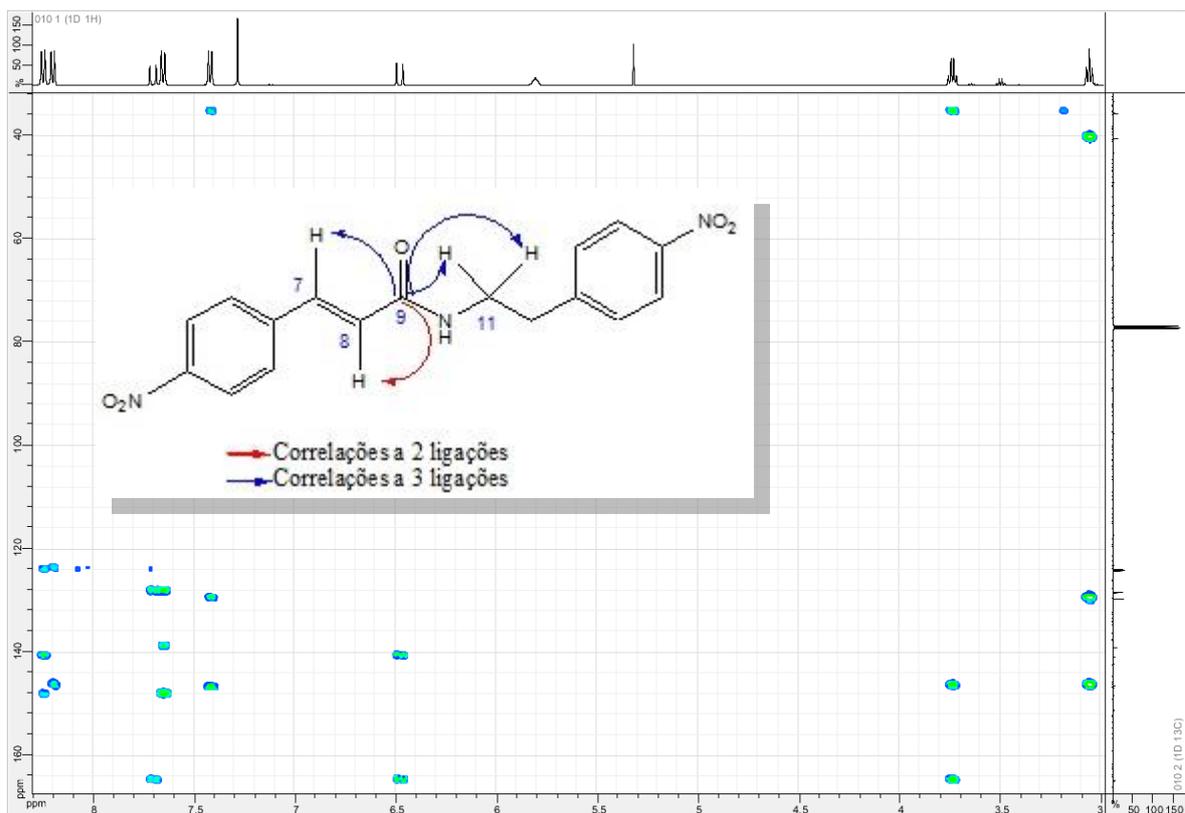
Espectro 48. Espectro de HSQC da substância **C7** (CDCl_3 , 500 Hz).

Tabela 11. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C7**.

SUBSTÂNCIA C7				
	HSQC		HMBC	
C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
1	146,90	-	H-2;H-6	H-3;H-5
4	140,92	-	H-7	H-2;H-6;H-8
9	164,87	-	H-8	H-7;H-11
13	146,51	-	H-12;H-14;H-18	H-10;H-15;H-17
17	148,27	-	H-15;H-17	H-14;H-18
CH				
2	124,17	8,25(m), 1H	H-3	H-6
3	128,42	7,65(m), 1H	H-2	H-5;H-7
5	128,42	7,65(m), 1H	H-6	H-3;H-7
6	124,17	8,25(m), 1H	H-5	H-2
7	139,05	7,70 (d), $J=15,4$ Hz, 1H	H-8	H-3;H-5
8	123,93	6,48 (d), $J=15,4$ Hz, 1H	H-17	-
14	129,67	7,42(m), 1H	H-15	H-12;H-18
15	129,67	7,42(m), 1H	H-14	H-17
16	123,93	8,20(m), 1H	H-18	H-15
18	123,93	8,20(m), 1H	H-17	H-12;H-14
CH₂				
11	40,57	3,74 (q), $J=7,0$ Hz, 2H	H-12	-
12	35,60	3,06 (t), $J=7,0$ Hz, 2H	H-11	H-14;H-18

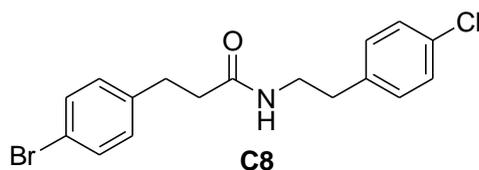
A confirmação da formação da função amida também foi observada no espectro de HMBC (espectro 49) através da correlação existente a duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico (C-9) e os hidrogênios adjacentes (H-7, H-8,H-11).

Desta forma, a substância **C7** mostrou dados espectrais consistentes com sua estrutura.



Espectro 49. Espectro de HMBC da substância **C7** (CDCl₃, 500 Hz).

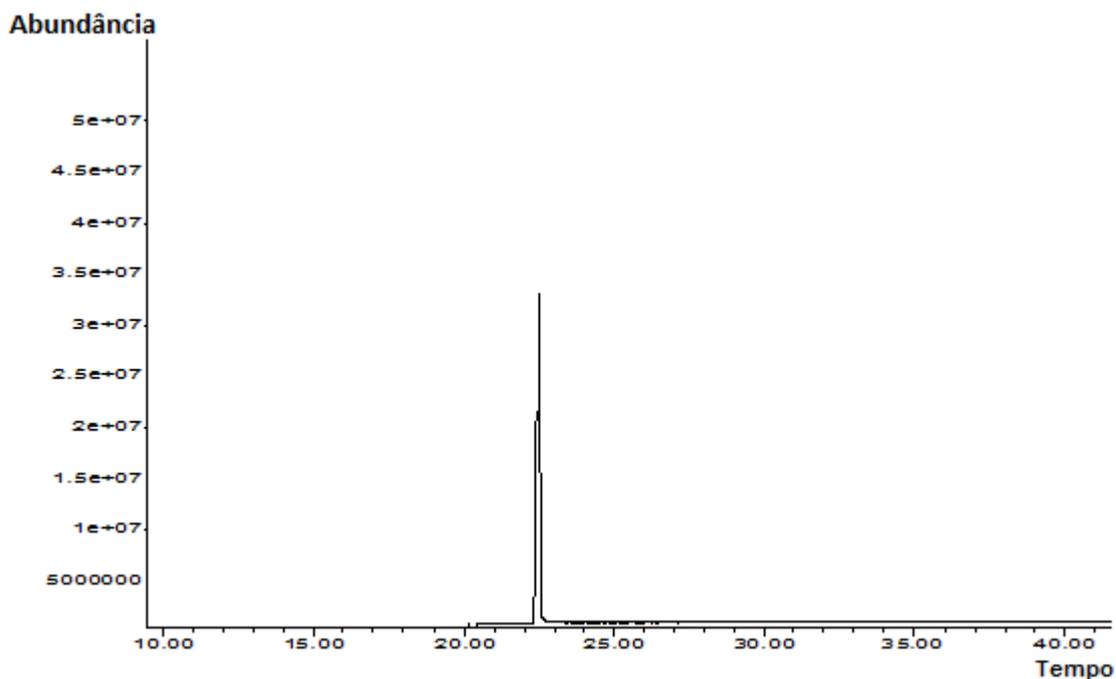
4.1.8. Determinação estrutural de 3-(4-bromofenil)-*N*-[2-(4-clorofenil)etil]-propionamida (**C8**)



3-(4-Bromofenil)-*N*-[2-(4-clorofenil)etil]-propionamida

A substância **C8** foi sintetizada com o rendimento de 64.0%, apresentou-se como sólido cristalino, solúvel em CHCl₃/CH₂Cl₂, com faixa de fusão entre 130.0–131.1°C.

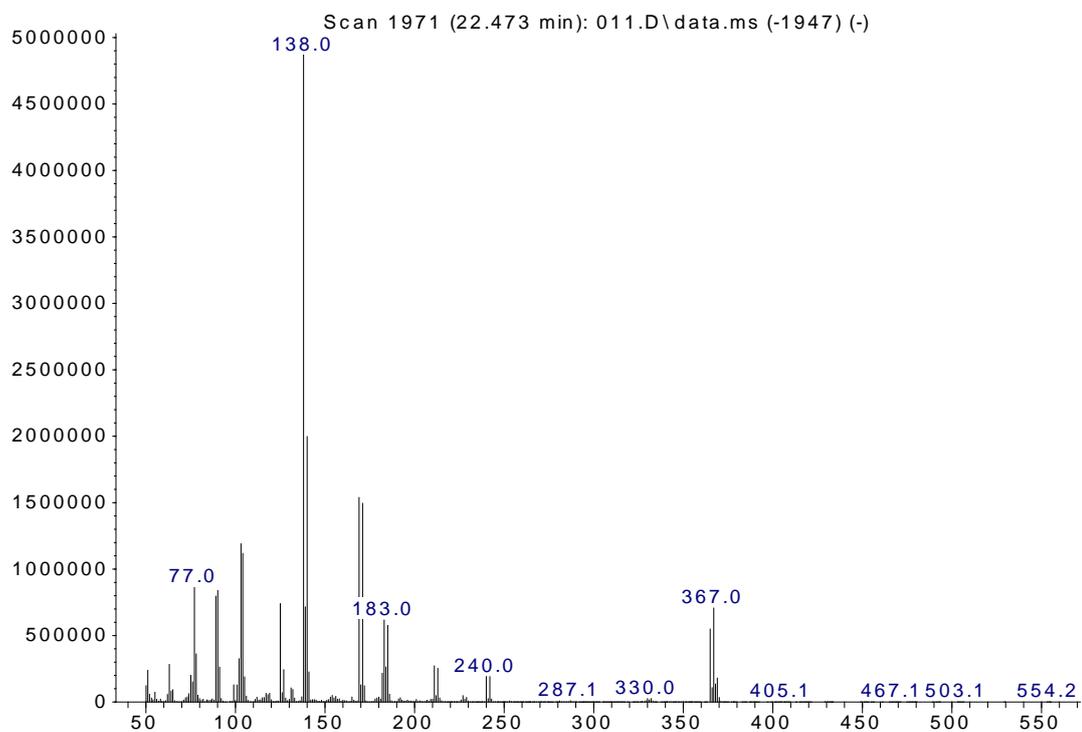
A cromatografia gasosa da substância isolada apresentou um sinal majoritário no tempo de retenção de 22.4 minutos (espectro 50).



Espectro 50. Cromatograma da substância **C8**.

O espectro de massas apresentou o sinal do íon molecular $m/z + 2$: 367.0 condizente com a fórmula molecular $C_{17}H_{17}BrClNO$ (espectro 51).

Abundance



$m/z \rightarrow$

Espectro 51. Espectro de massas da substância **C8** (CH_2Cl_2).

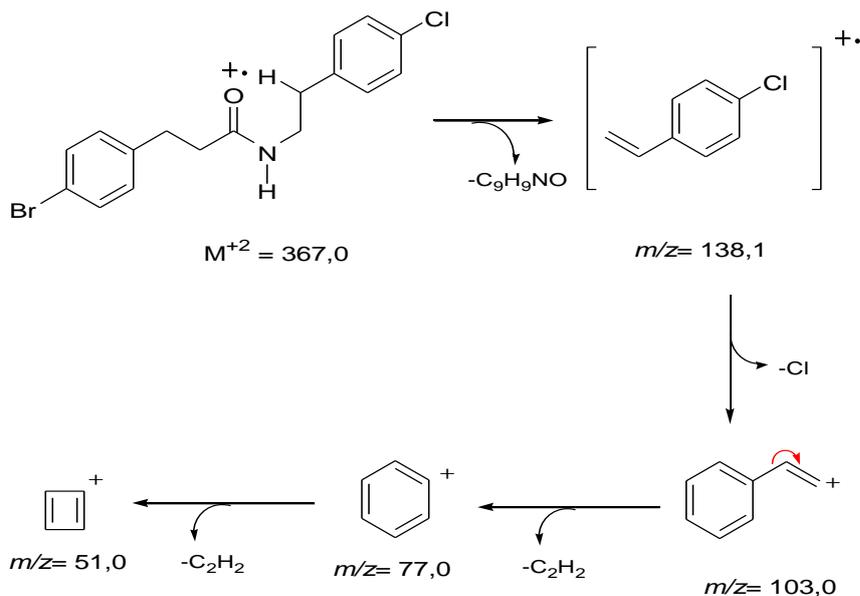
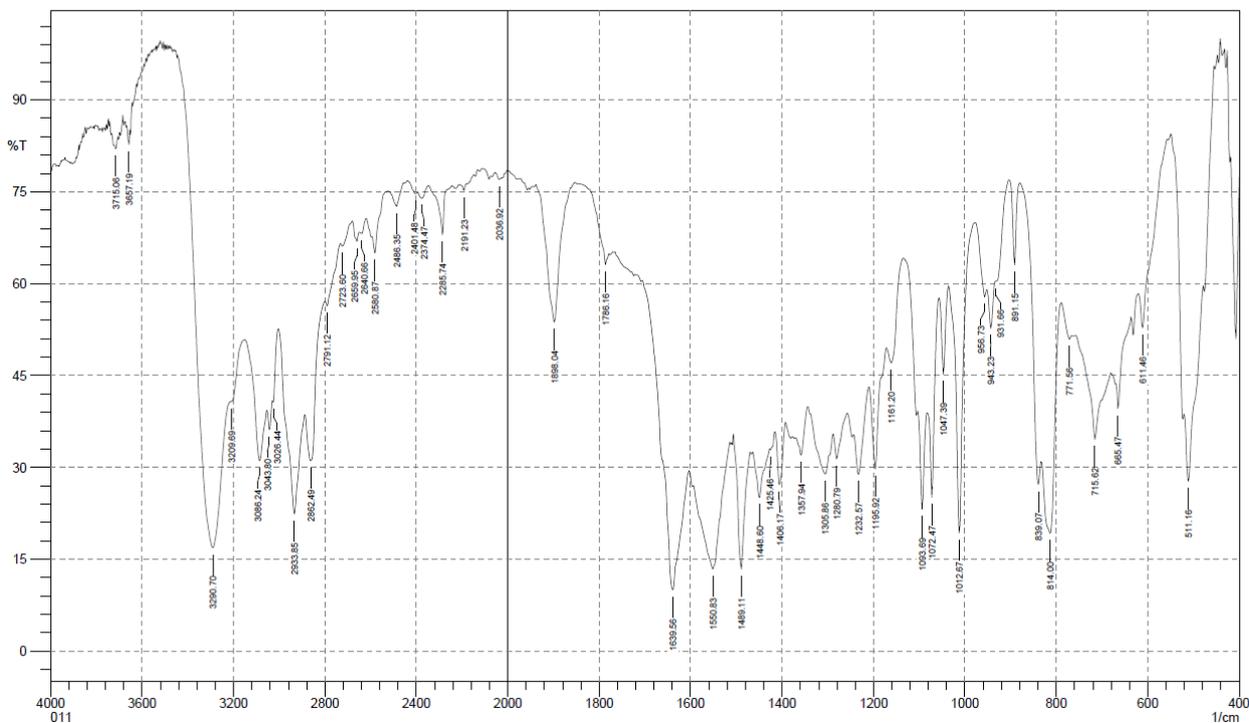


Figura 14. Proposta de fragmentação de **C8** para os principais sinais do **Espectro 51**.

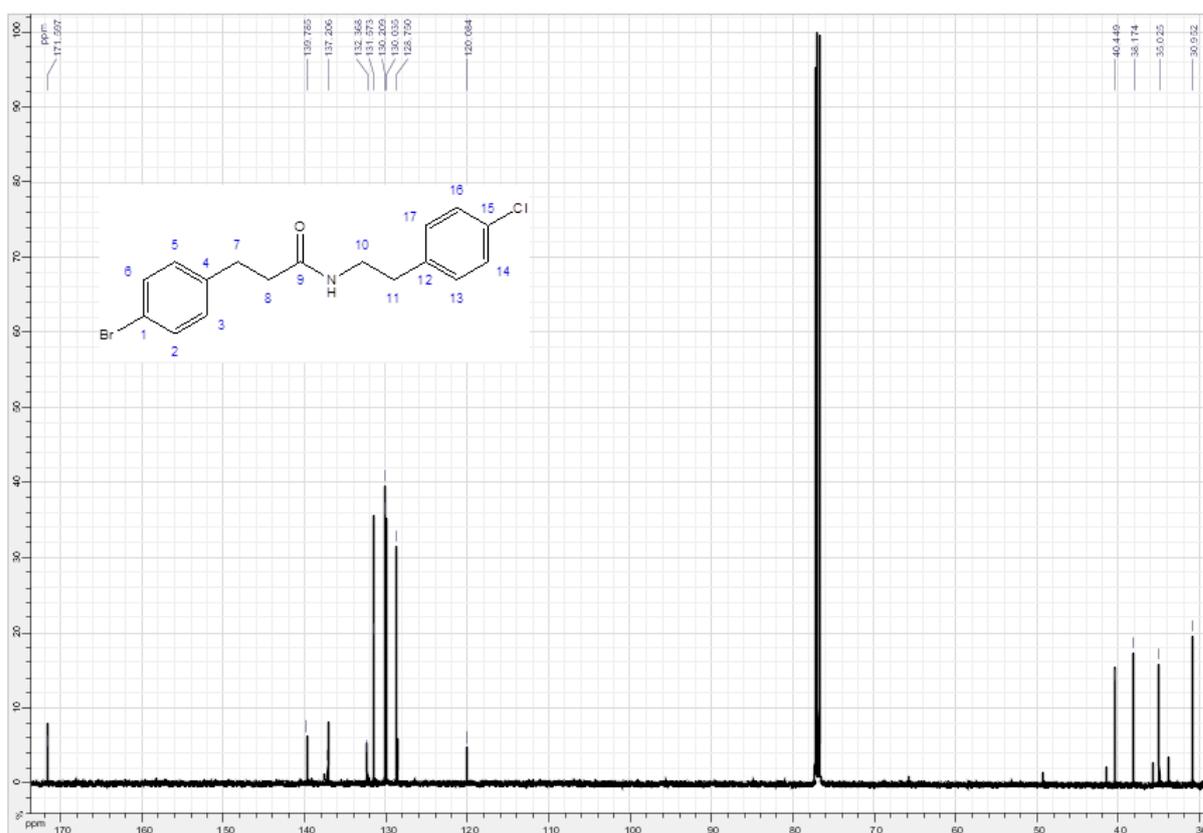
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (espectro 52) da substância **C8** mostrou banda de absorção em 1639 cm^{-1} e banda de absorção em 3290 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O e N-H, indicativos da presença da função amida.



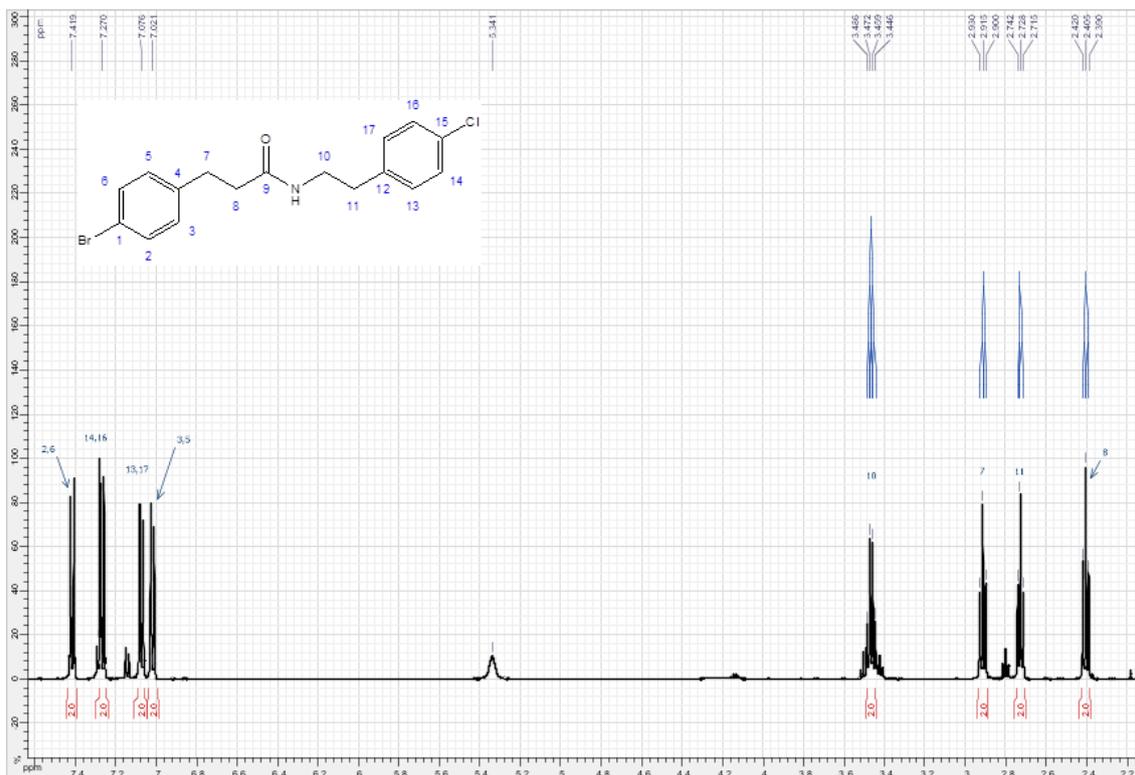
Espectro 52. Espectro de absorção na região do IV (KBr) da substância **C8**.

O espectro de RMN¹³C apresentou sinais correspondentes a 17 átomos de carbono (espectro 53).

No espectro de RMN¹H foram observados sinais para átomos de hidrogênio, onde diferente das outras moléculas sintetizadas, não foram observados sinais de hidrogênios referentes a α,β -insaturação. No entanto, quatro sinais relativos a átomos de hidrogênios metilênicos são encontrados em δ_H 2,92 ppm (*d*, $J=7,5$ Hz) (H-7), δ_H 2,41 ppm (*d*, $J=7,5$ Hz) (H-8), δ_H 3,47 ppm (*q*, $J=6,9$ Hz) (H-10) e δ_H 2,73 ppm (*t*, $J=6,9$ Hz) (H-11) (espectro 54).

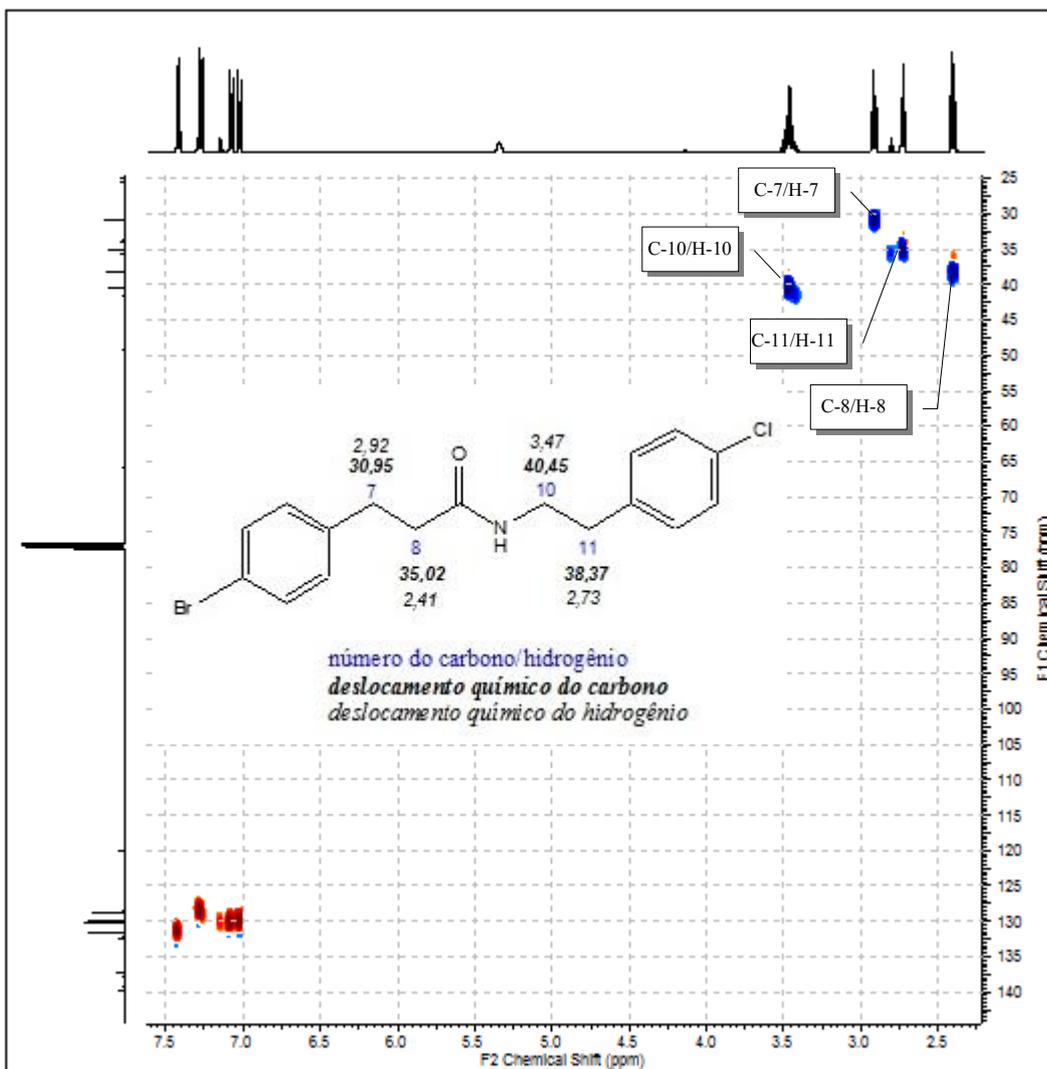


Espectro 53. Espectro de RMN ¹³C da substância **C8** (CDCl₃, 125 MHz).



Espectro 54. Espectro de RMN ¹H da substância **C8** (CDCl₃, 500 Hz).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (espectro 55) permitiu a confirmação das atribuições feitas com base nos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, principalmente através das correlações observadas entre os H-7 (δ_H 72,92) com o C-7 (δ_C 30,95), H-8 (δ_H 2,41) com o C-8 (δ_C 35,02), H-10 (δ_H 3,47) com o C-10 (δ_C 40,45) e H-11 (δ_H 2,73) com o C-11 (δ_C 38,17) (tabela 11).

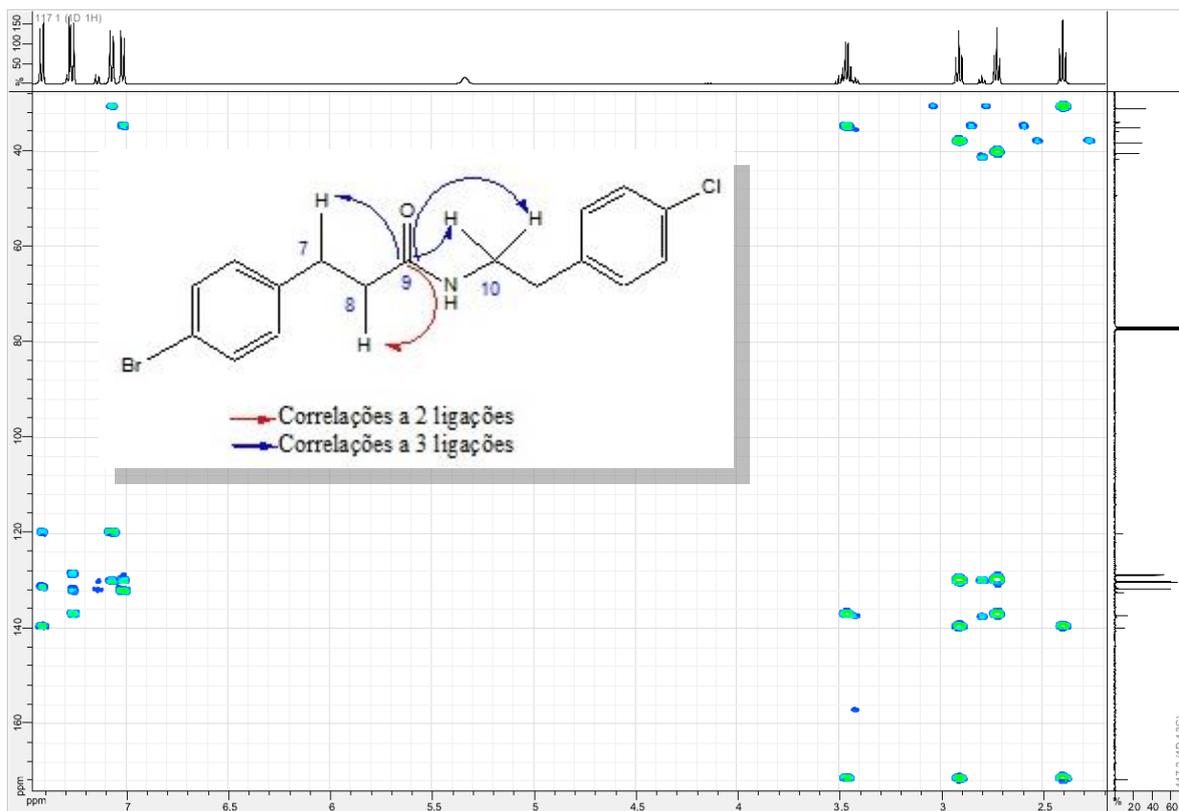


Espectro 55. Espectro de HSQC da substância **C8** (CDCl₃, 500 Hz).

Tabela 12. Sinais do espectro de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 MHz), em clorofórmio deuterado, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) e constantes de acoplamento (J) são apresentados para o produto **C8**.

SUBSTÂNCIA C8				
HSQC			HMBC	
C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	$J_{1,2}$	$J_{1,3}$
1	120,08	-	H-2;H-6	H-3;H-5
4	139,78	-	H-7	H-2;H-6;H-8
9	171,60	-	H-8	H-7;H-10
12	137,21	-	H-11	H-10;H-14;H-16
15	132,37	-	H-14;H-16	H-13;H-17
CH				
2	131,57	7,42(m), 1H	H-3	H-6
3	130,21	7,02(m), 1H	H-2	H-5;H-7
5	130,21	7,02(m), 1H	H-6	H-3;H-7
6	131,57	7,42(m), 1H	H-5	H-2
13	130,03	7,08(m), 1H	H-14	H-17;H-11
14	128,05	7,27(m), 1H	H-13	H-16
16	128,05	7,27(m), 1H	H-17	H-14
17	130,03	7,08(m), 1H	H-16	H-16;H-11
CH₂				
7	30,95	2,92 (t), $J=7,5$ Hz, 2H	H-8	-
8	35,02	2,41 (t), $J=7,5$ Hz, 2H	-	-
10	40,45	3,47 (q), $J=6,9$ Hz, 2H	H-11	-
11	38,17	2,73 (t), $J=6,9$ Hz, 2H	-	-

A confirmação da formação da função amida também foi observada no espectro de HMBC (espectro 56) através da correlação existente a duas e três ligações existentes entre o carbono carbonílico (C-9) e os hidrogênios adjacentes (H-7, H-8,H-11).



Espectro 56. Espectro de HMBC da substância **C8** (CDCl₃, 500 Hz).

Desta forma, a substância **C8** mostrou dados espectrais consistentes com sua estrutura.

4.2. ENSAIO ANTIMICROBIANO

Todas as substâncias sintetizadas foram testadas quanto sua atividade antimicrobiana através do método de microdiluição em caldo de acordo com o “Standards Institute and Laboratory” [62]. Os valores de concentração mínima inibitória (CMI) é definidos como a concentração mais baixa que apresenta crescimento entre 30 e 300 colônias (figura 15).

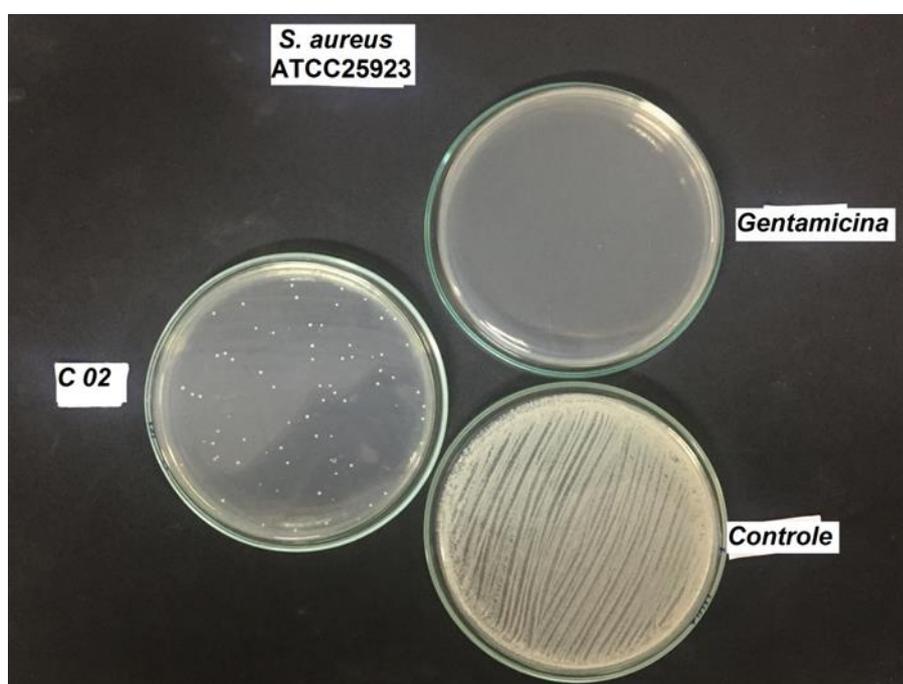


Figura 15. Ensaio para obtenção da Concentração Mínima Inibitória (CMI) para a substância C2 (C 02) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na concentração de 250 ppm. Gentamicina (10 µL/mL)- indica controle positivo. Controle – indica controle negativo (crescimento bacteriano normal).

As substâncias **C2** e **C5** apresentaram CMI de 250 ppm, contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e LSA 88, respectivamente. Algumas substâncias apresentaram ação contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (substâncias **C1**, **C2**, **C3**, **C4** and **C5**), *Staphylococcus aureus* LSA 88 (cepa clínica isolada de mastite bovina) e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (substância **C2**), *Escherichia coli* ATCC 25922 (substâncias **C6** e **C7**) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (substância **C2**, **C6** e **C7**) em concentrações superiores a 250 ppm. Somente a substância **C8** não apresentou atividade inibitória sobre os microrganismos testados (tabela 13) (figura 16-21).

Tabela 13. Concentração mínima inibitória (CMI) das substâncias C1-C8 frente a diferentes cepas bacterianas.

Substância	Concentração mínima inibitória (CMI) em ppm ^a					
	ATCC 15442	LSA 88	ATCC 33591	ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 12228
C1	>250	-	-	-	-	-
C2	>250	>250	>250	250	-	>250
C3	>250	-	-	-	-	-
C4	>250	-	-	-	-	-
C5	>250	250	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	>250	>250
C7	-	-	-	-	>250	>250
C8	-	-	-	-	-	-

^aA concentração máxima testada foi 250 ppm. Gentamicina foi utilizada como antibiótico controle. Testes realizados em triplicata.

- Não apresentou inibição na concentração testada.

>250 indica que houve sensibilidade, porém a concentração deve ser maior que 250 ppm para uma contagem de menos de 300 colônias.

Figura 16. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922. A concentração testada foi de 250 ppm.

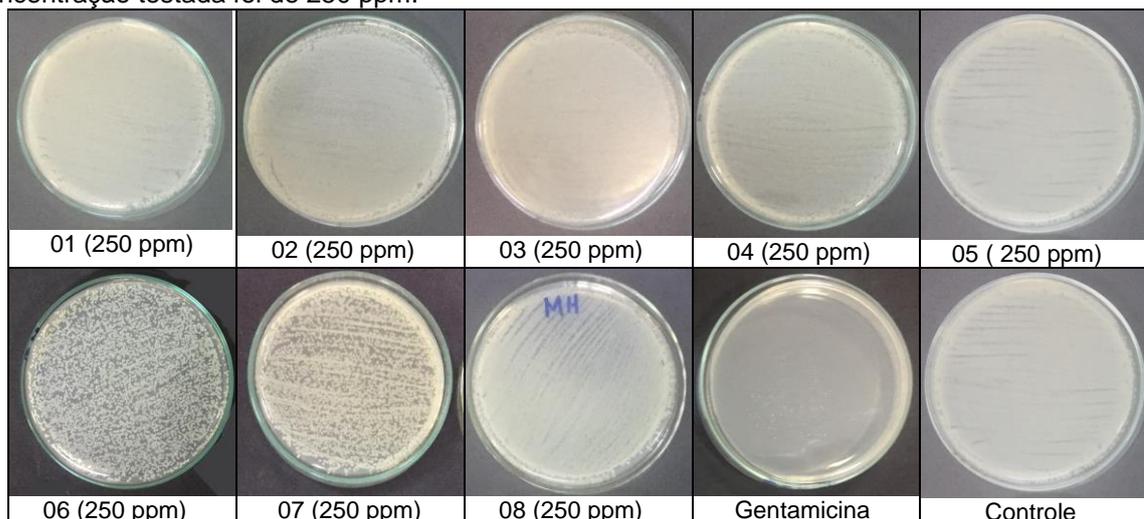


Figura 17. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. A concentração testada foi de 250 ppm.

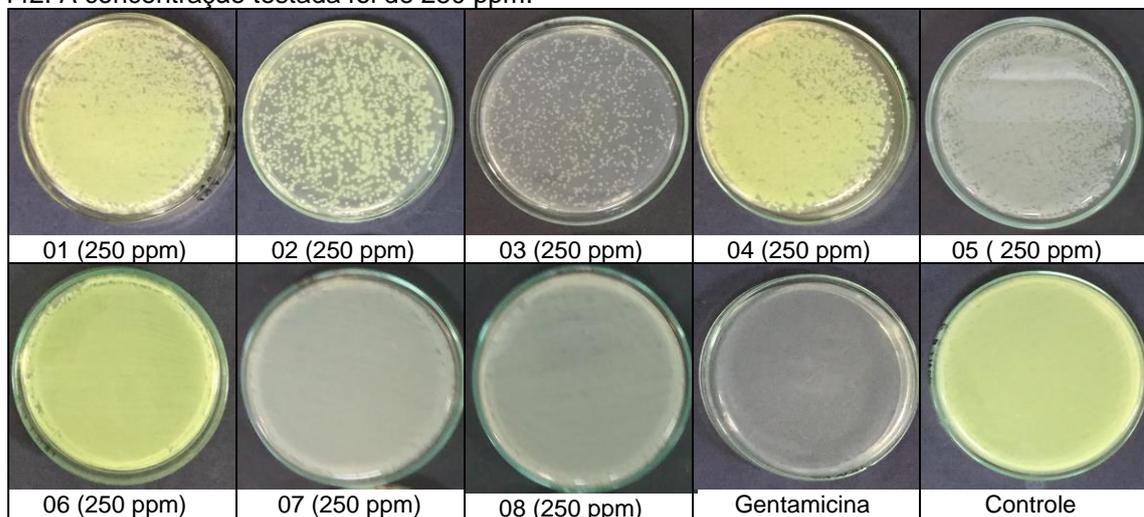


Figura 18. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. A concentração testada foi de 250 ppm.

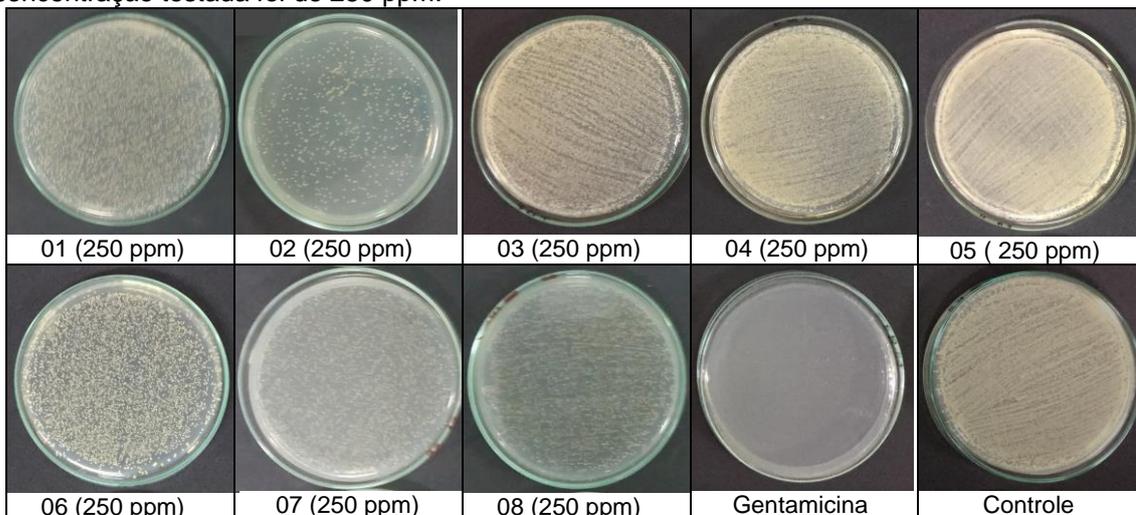


Figura 19. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A concentração testada foi de 250 ppm.

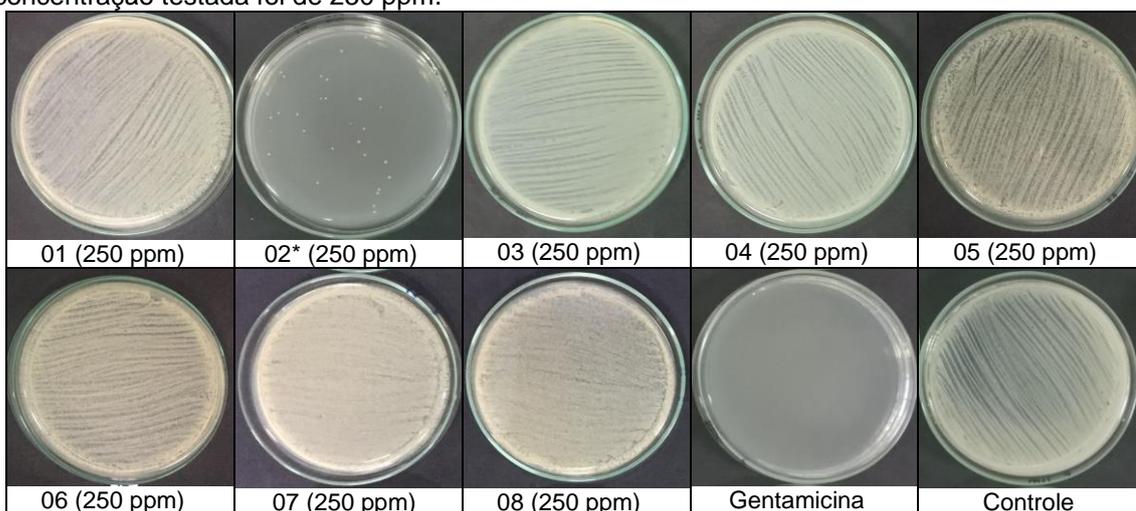


Figura 20. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria *Staphylococcus aureus* LSA 88. A concentração máxima testada foi de 250 ppm.

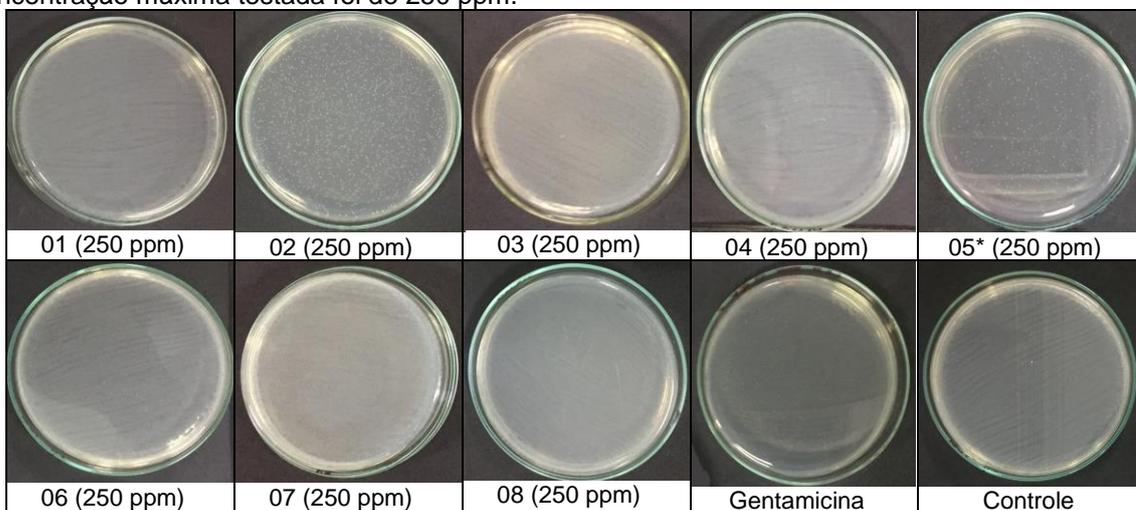
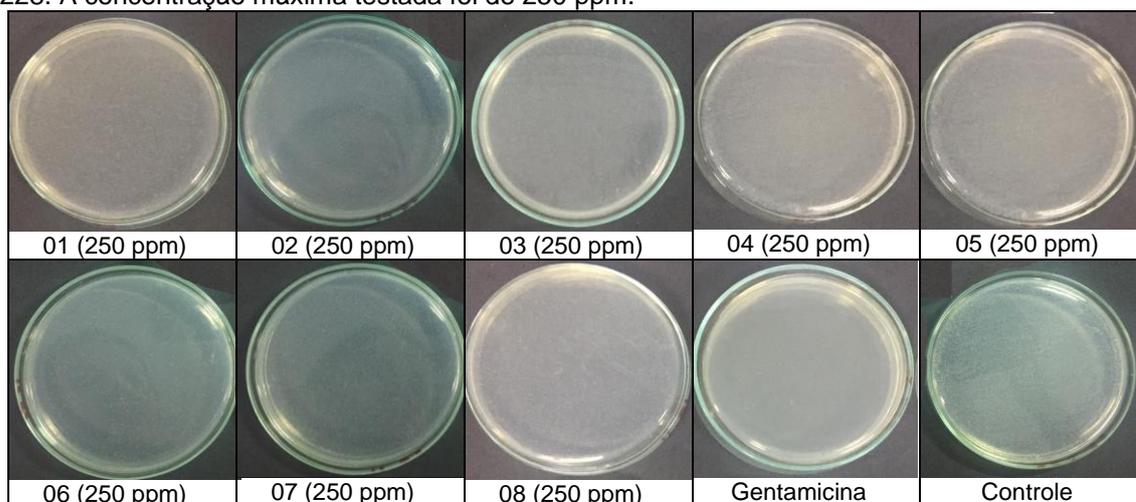


Figura 21. Resultados dos ensaios de inibição frente à bactéria *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. A concentração máxima testada foi de 250 ppm.



Georgiev e colaboradores [25], sintetizaram cinamoilamidas que apresentaram atividade contra cepas de *S. aureus* (62.5-500 ppm) assim como observado no presente trabalho. A ausência de atividade antimicrobiana em **C8** pode ser explicada devido a esta substância ser a única que não apresenta a α,β -insaturação a carbonila. Esta hipótese pode ainda ser suportada na afirmação de alguns autores acerca do grupamento enamida, indicando que este está relacionado a diversas atividades biológicas [22–24].

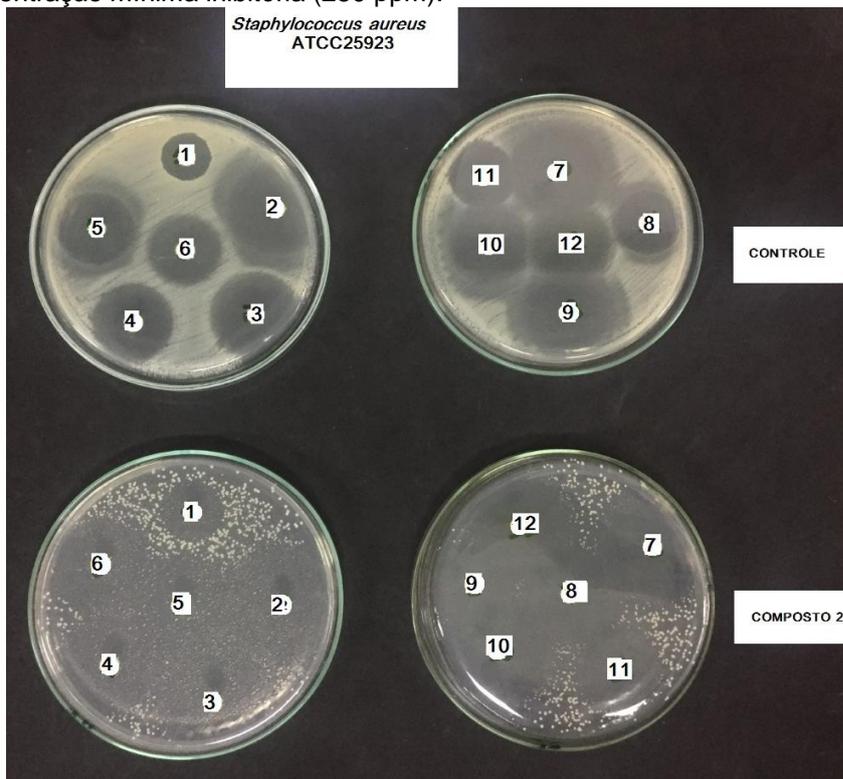
Os resultados dos antibiogramas das células tratadas com as substâncias **C2** e **C5** são apresentados na Tabela 14 (figura 22-23). Comparando células controles e as tratadas com a substância **C2** após a exposição antibiótica, os resultados mostram maiores halos de inibição ($p < 0,01$) que as dos controles respectivos para a cepa ATCC 25923 para todos os antibióticos testados. O que demonstra que a substância **C2** possui ação sinérgica junto a estes antibióticos, potencializando suas atividades.

Tabela 14. Antibiograma (valor médio medido em mm) de cepas estafilocócicas, tratadas com amidas derivadas do ácido cinâmico e submetidas a doze diferentes antibióticos. Avaliado através do método de difusão em ágar [58].

Antibiotic	Cepas			
	ATCC 25923		LSA 88	
	Control	2	Control	5
VAN	16.74Bg	23.98Ad	17.50Ae	17.45Ai
AMP	27.05Ba	36.99Aa	33.17Aab	34.64Ab
SUT	25.00Bbc	37.00Aa	28.05Bc	29.68Ade
CLI	21.40Be	34.42Aab	26.76Ac	27.17Ag
CFX	23.70Bcd	34.86Aab	28.09Bc	28.90Aef
ERI	20.87Be	32.42Aabc	25.73Bc	27.99Afg
AMO	24.95Bbc	32.88Aab	33.98Aab	31.36Bc
PEN	25.69Bab	33.40Aab	36.11Aa	36.21Aa
GEN	21.37Be	30.24Abc	26.72Ac	26.99Ag
AMC	26.81Ba	35.52Aab	35.06Aab	35.62Aab
OXA	19.02Bf	26.61Acd	21.31Ad	21.32Ah
TET	22.40Bde	33.33Aab	32.49Ab	30.91Acd

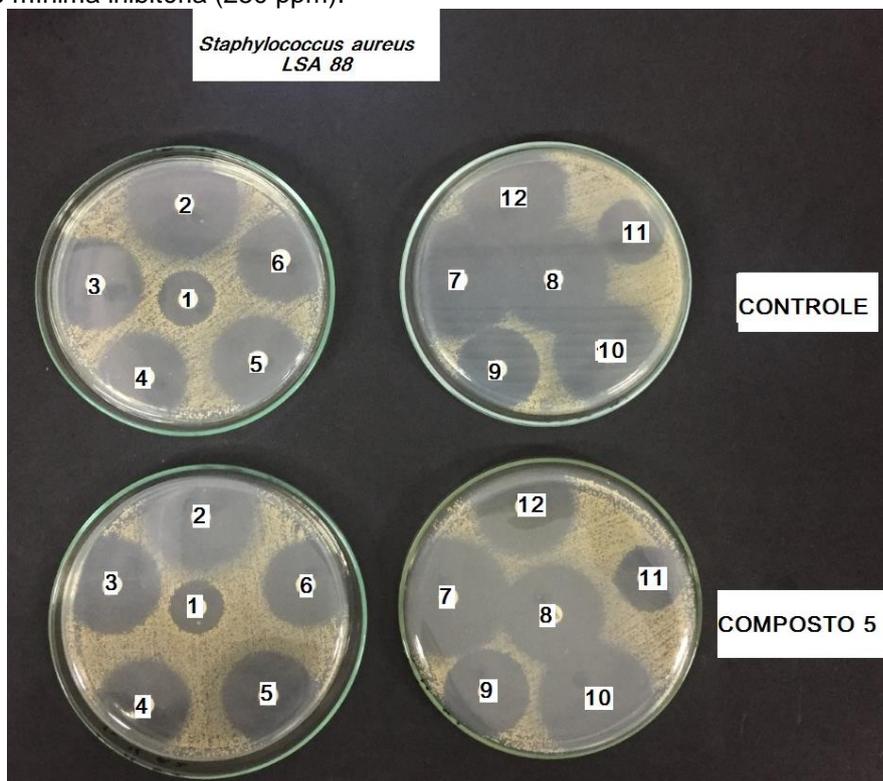
As médias seguidas pela mesma letra pequena na coluna (medicamento) e letra maiúscula na linha (tratamento com as amidas derivadas de ácido cinâmico), não diferem entre si. Teste de Tukey, 1 e 5% de probabilidade. VAN (vancomicina); AMP (ampicilina); SUT (sulfazotrin); CLI (clindamicina); CFX (cefalexina); ERI (eritromicina); AMO (amoxicilina); PEN (penicilina G); GEN (gentamicina); AMC (amoxicilina/ácido clavulâmico); OXA (oxacilina); TET (tetraciclina).

Figura 22. Resultados do antibiograma para **C2** frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na concentração mínima inibitória (250 ppm).



Antibióticos testados: 1- VAN; 2- AMP; 3- SUT; 4- CLI; 5- CFX; 6- ERI; 7- PEN; 8- AMO; 9- GEN; 10- AMC; 11- OXA; 12- TET.

Figura 23. Resultados do antibiograma para **C5** frente à bactéria *Staphylococcus aureus* LSA 88 na concentração mínima inibitória (250 ppm).



Antibióticos testados: 1- VAN; 2- AMP; 3- SUT; 4- CLI; 5- CFX; 6- ERI; 7- PEN; 8- AMO; 9- GEN; 10- AMC; 11- OXA; 12- TET.

Para a cepa clínica bovina do *S. aureus* LSA 88, o tratamento com a substância **C5** afetou significativamente ($p < 0,05$) a atividade das drogas SUT, CFX e ERI, aumentando o halo de inibição. Contudo, observa-se que este mesmo tratamento acarreta na redução do halo de inibição para AMO, demonstrando efeito antagonista ($p < 0,05$). Resultado semelhante foi observado por Carlos e colaboradores [45] onde algumas cepas apresentaram halos menores que o controle para a ampicilina, oxacilina e cefalosporina.

Na comparação dos resultados entre medicamentos, AMC e AMP demonstraram maior atividade no tratamento controle para a cepa ATCC 25923, com o tratamento junto à substância **C2** a atividade do SUT é potencializada, fazendo com que este se destaque com maior halo de inibição juntamente com AMP. Para a cepa LSA 88 maior sensibilidade foi encontrada junto com PEN, este resultado permaneceu após tratamento com a substância **C5**.

A cepa ATCC 25923 permaneceu menos sensível às drogas VAN e OXA, mesmo após os tratamentos, apesar de confirmado aumento da zona de inibição ($p < 0,01$).

Os resultados sugerem que as diferenças nos halos de inibição dos estafilococcus tratados com as substâncias **C2** e **C5** resultam no aumento da sensibilidade de *S. aureus* (ATCC 25923 e cepa clínica bovina LSA 88) a diferentes antibióticos.

4.3. ENSAIO ANTITOXOPLASMA

Das oito amidas sintetizadas, seis: **C1**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6** e **C7** foram selecionadas para o teste de atividade anti *T. gondii*. Para isso estas foram submetidas à incubação por 24 horas em culturas de células LLC-MK2 infectadas e não infectadas com *T. gondii*.

O teste de toxicidade celular foi feito com o objetivo de verificar a concentração da droga que não apresenta efeitos tóxicos e morte celular nas células LLC-MK2. Esta foi avaliada de acordo com a presença de alterações morfológicas, degenerações ou morte celular causada devido ao tratamento com as diferentes substâncias. Em geral, o aumento da toxicidade celular é diretamente proporcional ao aumento da concentração, como observado na figura 24. Nota-se que em relação ao controle (A) ocorrem alterações morfológicas nucleares características e um aumento progressivo da toxicidade com redução do número de células à medida que a concentração é aumentada (B, C e D).

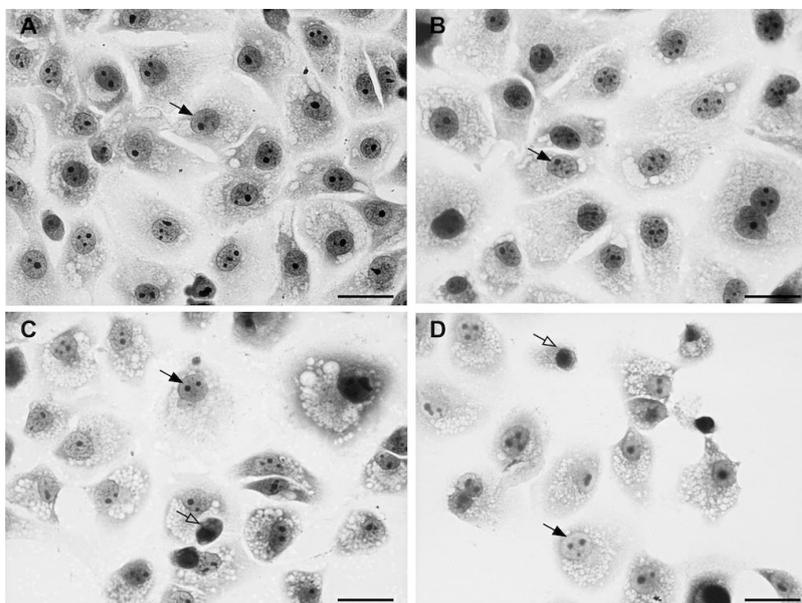


Figura 24. Toxicidade em células LLC-MK2 infectadas. A seta negra indica núcleo com aparência normal. A seta branca indica alterações nucleares sugestivas de toxicidade. (A) controle. Em (B), (C) e (D) observa-se aumento progressivo de citotoxicidade com maiores alterações nucleares e redução do número de células.

A tabela 15 mostra o teste de toxicidade para células não infectadas. Verificou-se que as substâncias **C6** e **C7** mostraram ausência de toxidez na concentração de 2.92 mM demonstrando serem os menos citotóxicos. A substância

C5 apresentou comportamento similar na concentração de 1.69 mM. Para as substâncias **C3** e **C4**, a mesma condição foi observada nas concentrações de 0.35 e 0.17 mM, respectivamente.

Tabela 15. Toxicidade das substâncias **C1** e **C3-C7** em células LLC-MK2.

Citotoxicidade (cultura não infectada) ^a					
Substância	Não tratado	Concentração (mM)			
		0.17	0.35	1.69	2.92
C1	226±09	-	229±13	112±14	0
C3	196±12	-	194±11	-	0
C4	196±12	200±21	-	0	0
C5	226±09	-	-	217±30	71±10
C6	206±10	-	-	-	209±12
C7	206±10	-	-	-	209±17

^aValores relativos à ±SD.

As substâncias **C1**, **C3** e **C4** apresentaram maiores danos celulares nas concentrações de 2.92 mM, visto que esta concentração promove 100% de morte celular. Observa-se ainda, que nenhuma substância apresentou danos celulares consideráveis em concentrações iguais ou inferiores a 0.17 mM. Para a substância **C1**, a concentração de 1.69 mM promove a redução de 50% das células LLC-MK2, enquanto que a substância **C5** na concentração de 2.92 mM promove alterações celulares em 69% das células.

Uma vez determinada a dose de cada substância que não apresenta toxicidade em células não infectadas, procedeu-se o teste com células infectadas pelo *T. gondii* em concentrações inferiores a dose tóxica estabelecida. Após a infecção das células LLC-MK2 procedeu-se a quantificação, baseada na presença de traquizoitos. Em células não tratadas com as substâncias (controle), foi observada a infecção do parasito *T. gondii*. Após o tratamento com as substâncias, observou-se a redução das células hospedeiras infectadas devido à eliminação de parasitas intracelulares (figura 25).

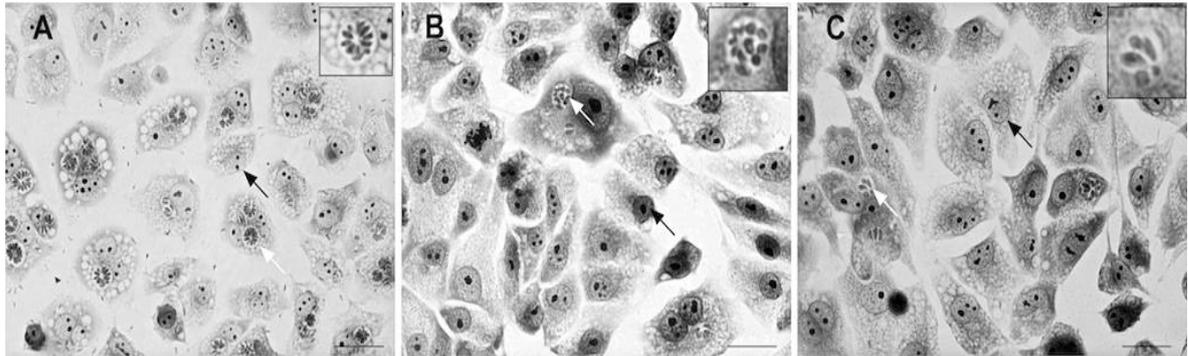


Figura 25. Microscopia óptica do teste biológico mostrando células LLC-MK2 infectadas. A seta negra aponta para o núcleo celular, a seta branca indica o vacúolo parasitóforo. Controle (A). Redução da infecção com eliminação do parasito nos tratamentos com as substâncias: **C1** (B) e **C7** (C). As ampliações em cada imagem referente ao vacúolo parasitóforo mostra o aumento a desorganização morfológica do parasito de A para C.

A tabela 16 mostra a ação das substâncias **C1**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6** e **C7** em células LLC-MK2 e parasitos intracelulares. Desta forma, observa-se que o total de células entre o tratamento com as substâncias e controle permanece semelhante, o que sugere a ausência de toxicidade nas concentrações utilizadas.

Tabela 16. Efeito das substâncias **C1** e **C3-C7** em culturas celulares LLC-MK2 infectadas e parasitas intracelulares em mM.

Substâncias	Concentração	Citotoxicidade (cultura infectada) ^a			Parasitas
		Células não infectadas	Células infectadas	Total de células	
Controle	0	83±8	28±4	111±12	179±29
C1	0.18	129±6	24±4	153±10	166±15
Controle	0	108±19	51±6	159±25	254±38
C3	0.077	147±3	23±5	170±8	127±32
Controle	0	108±19	51±6	159±25	254±38
C4	0.038	149±24	35±10	184±34	134±32
Controle	0	83±8	28±4	111±12	179±29
C5	0.16	114±3	12±1	126±4	82±19
Controle	0	79±7	37±3	116±10	174±16
C6	1.33	89±12	31±5	120±17	83±23
Controle	0	79±7	37±3	116±10	174±16
C7	1.46	104±9	28±3	132±12	98±12

^aValores relativos à ±SD.

Durante a incubação de drogas os traquizoítos apresentaram desorganização morfológica antes de serem completamente eliminados (figura 25). Estes resultados corroboram com ensaios semelhantes com realizados com tiosemicarbazonas e tiazolidonas [53–55].

Para a substância **C5** foi necessária uma concentração de 0.16 mM para uma ação efetiva na inibição do parasito intracelular. As substâncias **C3** e **C4** promoveram a eliminação de 50% dos parasitos nas concentrações de 0.077 e 0.038 mM respectivamente, o que representa uma ordem de 22.01 e 56,30 µg/mL, sendo estas as substâncias que apresentaram menor dose para ação contra o *T. gondii*.

Apesar de possuírem baixa citotoxicidade, as substâncias **C6** e **C7** apresentam melhores efeitos em concentrações de 1.33 e 1.46 mM, respectivamente (tabela 16).

Estes resultados corroboram com estudos semelhantes realizados por outros pesquisadores testando as atividades antitoxoplasma com análogos de tiosemicarbonas e tiazolidinonas que mostraram que as concentrações ativas para estas drogas variam entre 0.1 mM e 1.5 mM e a citotoxicidade entre 0.5-10 mM [53–55].

Todas as substâncias sintetizadas mostraram atividade antiparasitária em concentrações inferiores aos medicamentos padrão: hidroxiureia (DL₅₀ 4 mM [54]) e a sulfadiazina (DL₅₀ 3 mM [55]). A alta concentração destes últimos sugerem efeitos tóxicos apresentados por estes medicamentos.

No presente estudo, as substâncias **C3** e **C4** mostraram melhores resultados com menores concentrações para efeito no parasito. Estes resultados sugerem que o substituinte cloro e nitro (NO₂) na posição *para* na porção etilfenilamina promove uma considerável ação sobre o parasita.

A análise conjunta dos resultados de citotoxicidade com os de atividade antitoxoplasma mostra que a presença do grupo fortemente retirador de elétrons (NO₂) na posição *para* na porção cinamoil (substâncias **C6** e **C7**) são as menos citotóxicas, porém estas exibem a maior concentração para indução da mortalidade ao parasito.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A função amida é uma das mais importantes na química orgânica, já que esta se encontra em produtos farmacêuticos modernos e substâncias biologicamente ativas. Amidas derivadas do ácido cinâmico vem sendo bastante estudadas, mostrando atividade biológica contra uma ampla variedade de microorganismos.

Oito amidas derivadas do ácido cinâmico foram sintetizadas e caracterizadas E testadas biologicamente frente a diferentes cepas bacterianas onde as substâncias **C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6** e **C7** apresentaram atividade contra diferentes bactérias na concentração acima de 250 ppm. As substâncias **C2** e **C5** demonstraram atividade contra duas cepas de *S. aureus* (ATCC 25923 e LSA 88) na concentração de 250 ppm, os mesmos apresentaram ação sinérgica junto a diferentes antibióticos.

Todas as amidas mostraram atividade anti*Toxoplasma gondii* em concentrações inferiores aos medicamentos padrão reduzindo o número de células infectadas e de parasitos intracelulares, sendo os melhores resultados encontrados na substância **C3** e **C4**, onde o substituinte cloro e nitro (NO₂) na posição *para* na porção etilfenilamina promove uma considerável ação sobre o parasita.

Tais resultados indicam que estas classes de análogos é um interessante modelo para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas e antiparasitárias.

Estes resultados foram publicados na revista *Molecules* no dia 28 de março de 2018.

REFERÊNCIAS

1. Palkar, M. B.; Rane, R. a.; Thapliyal, N.; Shaikh, M. S.; Alwan, W. S.; Jain, K. S.; Karunanidhi, S.; Patel, H. M.; Hampannavar, G. a.; Karpoomath, R. An insight into purine, tyrosine and tryptophan derived marine antineoplastic alkaloids. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 947–954.
2. Pittman, B. S. Cinnamon: It's Not Just For Making Cinnamon Rolls. *Ethnobot. Leaflet.* **2010**, *5*.
3. Guzman, J. D. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules* **2014**, *19*, 19292–19349, doi:10.3390/molecules191219292.
4. Teixeira, J.; Gaspar, A.; Garrido, E. M.; Garrido, J.; Borges, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/251754.
5. De, P.; Bedos-Belval, F.; Vanucci-Bacque, C.; Baltas, M. Cinnamic Acid Derivatives in Tuberculosis, Malaria and Cardiovascular Diseases - A Review. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 747–768, doi:10.2174/138527212799958020.
6. Okwute, S. K.; Egharevba, H. O. Piperine-Type Amides: Review of the Chemical and Biological Characteristics. *Int. J. Chem.* **2013**, *5*, 99–122, doi:10.5539/ijc.v5n3p99.
7. Ávalos, A.; Elena, G. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biol. Ser. Fisiol. Veg.* **2009**, *2*, 119–145.
8. Boudreau, L. H.; Maillet, J.; LeBlanc, L. M.; Jean-François, J.; Touaibia, M.; Flamand, N.; Surette, M. E. Caffeic acid phenethyl ester and its amide analogue are potent inhibitors of leukotriene biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–8, doi:10.1371/journal.pone.0031833.
9. Chan, H. H.; Hwang, T. L.; Thang, T.; Leu, Y. L.; Kuo, P. C.; Nguyet, B. M.; Dai, D. N.; Wu, T. S. Isolation and Synthesis of Melodamide A, a New Anti-inflammatory Phenolic Amide from the Leaves of *Melodorum Fruticosum*. *Planta Med.* **2013**, *79*, 288–294, doi:10.1055/s-0032-1328131.
10. Shi, Z.-H.; Li, N.-G.; Shi, Q.-P.; Tang, H.; Tang, Y.-P.; Li, W.; Yin, L.; Yang, J.-P.; Duan, J.-A. Synthesis and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as selective matrix metalloproteinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1206–11, doi:10.1016/j.bmcl.2013.01.027.
11. Ferraz, R.; Pinheiro, M.; Gomes, A.; Teixeira, C.; Prudêncio, C.; Reis, S.; Gomes, P. Effects of novel triple-stage antimalarial ionic liquids on lipid membrane models. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4190–4193, doi:10.1016/j.bmcl.2017.07.006.

12. Wiesner, J.; Mitsch, A.; Wissner, P.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Structure-activity relationships of novel anti-malarial agents. Part 2: Cinnamic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 423–424, doi:10.1016/s0960-894x(00)00684-3.
13. Carvalho, S. A.; Feitosa, L. O.; Soares, M.; Costa, T. E. M. M.; Henriques, M. G.; Salomão, K.; De Castro, S. L.; Kaiser, M.; Brun, R.; Wardell, J. L.; Wardell, S. M. S. V.; Trossini, G. H. G.; Andricopulo, A. D.; Da Silva, E. F.; Fraga, C. A. M. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 512–521, doi:10.1016/j.ejmech.2012.05.041.
14. Dai, L.; Zang, C.; Tian, S.; Liu, W.; Tan, S.; Cai, Z.; Ni, T.; An, M.; Li, R.; Gao, Y.; Zhang, D.; Jiang, Y. Design, synthesis, and evaluation of caffeic acid amides as synergists to sensitize fluconazole-resistant *Candida albicans* to fluconazole. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 34–37, doi:10.1016/j.bmcl.2014.11.022.
15. Montes, R. C.; Perez, A. L. A. L.; Medeiros, C. I. S.; Araújo, M. O. De; Lima, E. D. O.; Scotti, M. T.; Sousa, D. P. De Synthesis, Antifungal Evaluation and In Silico Study of N-(4-Halobenzyl)amides. *Molecules* **2016**, *21*, 1–17, doi:10.3390/molecules21121716.
16. Narasimhan, B.; Belsare, D.; Pharande, D.; Mourya, V.; Dhake, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 827–834, doi:10.1016/j.ejmech.2004.06.013.
17. Brader, G.; Vajrodaya, S.; Greger, H.; Bacher, M.; Kalchhauser, H.; Hofer, O. Bisamides, lignans, triterpenes, and insecticidal cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaiia* species. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1482–1490, doi:10.1021/np9801965.
18. DellaGreca, M.; Previtiera, L.; Purcaro, R.; Zarrelli, A. Cinnamic acid amides and lignanamides from *Aptenia cordifolia*. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2877–2882, doi:10.1016/j.tet.2006.01.019.
19. Cutillo, F.; D'Abrosca, B.; DellaGreca, M.; Di Marino, C.; Golino, A.; Previtiera, L.; Zarrelli, A. Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: Effects on seeds germination and plant growth. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1381–1387, doi:10.1016/S0031-9422(03)00511-9.
20. Cabanne, F.; Perdrizet, E.; Martin, C. the Distribution of Hydroxycinnamic Amides in Flowering Plants *Acid.* **1978**, *17*, 1927–1928.
21. Bayer, A.; Maier, M. E. Synthesis of enamides from aldehydes and amides. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6665–6677, doi:10.1016/j.tet.2004.05.082.
22. Gooßen, L. J.; Blanchot, M.; Arndt, M.; Salih, K. S. M. Synthesis of Botryllamides and Lansiumamides via Ruthenium-Catalyzed Hydroamidation of Alkynes. *Synlett* 1685–1687.

23. Menna, M.; Fattorusso, E.; Imperatore, C. Alkaloids from Marine Ascidians. *Molecules* **2011**, *16*, 8694–8732, doi:10.3390/molecules16108694.
24. Takada, K.; Imamura, N.; Gustafson, K. R.; Henrich, C. J. Synthesis and structure – activity relationship of botryllamides that block the ABCG2 multidrug transporter. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1330–1333, doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.016.
25. Georgiev, L.; Chochkova, M.; Ivanova, G.; Najdenski, H.; Ninova, M.; Milkova, T. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. *La Riv. Ital. Delle Sostanze Grasse* **2012**, *89*, 91–102.
26. Georgiev, L.; Chochkova, M.; Totseva, I.; Seizova, K.; Marinova, E.; Milkova, T.; Ivanova, G.; Ninova, M.; Najdenski, H. Anti-tyrosinase, antioxidant and antimicrobial activities of hydroxycinnamoylamides. *Med Chem Res* **2013**, *66*, 185–192, doi:10.1007/s00044-012-0419-x.
27. Bairwa, R.; Kakwani, M.; Tawari, N. R.; Lalchandani, J.; Ray, M. K.; Rajan, M. G. R.; Degani, M. S. Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1623–1625, doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.031.
28. Yoya, G. K.; Bedos-Belval, F.; Constant, P.; Duran, H.; Daffé, M.; Baltas, M. Synthesis and evaluation of a novel series of pseudo-cinnamic derivatives as antituberculosis agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 341–343, doi:10.1016/j.bmcl.2008.11.082.
29. Vasques da Silva, R.; Debonsi Navickiene, H. M.; Kato, M. J.; Bolzani, V. da S.; Méda, C. I.; Young, M. C. M.; Furlan, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 521–527, doi:10.1016/S0031-9422(01)00431-9.
30. Yin, S.; Cullinane, C.; Carroll, A. R.; Quinn, R. J.; Davis, R. a. Botryllamides K and L, new tyrosine derivatives from the Australian ascidian *Aplidium altarium*. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3403–3405, doi:10.1016/j.tetlet.2010.04.104.
31. Song, Y. H.; Kim, D. W.; Curtis-Long, M. J.; Park, C.; Son, M.; Kim, J. Y.; Yuk, H. J.; Lee, K. W.; Park, K. H. Cinnamic acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive α -glucosidase inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *114*, 201–208, doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.044.
32. Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature* **2011**, *480*, 471–9, doi:10.1038/nature10702.
33. Lundberg, H.; Tinnis, F.; Selander, N.; Adolfsson, H. Catalytic amide formation from non-activated carboxylic acids and amines. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2714–42, doi:10.1039/c3cs60345h.
34. Kunishima, M.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Terao, K.; Tani, S. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and water-soluble condensing agent: DMT-MM.

- Tetrahedron* **2001**, *57*, 1551–1558, doi:10.1016/S0040-4020(00)01137-6.
35. Sollomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. *Química Orgânica*; LTC, Ed.; 9th ed.; Gen: Rio de Janeiro, 2011;
 36. Feroci, M.; Chiarotto, I.; Inesi, A. Internal redox amidation of α,β -unsaturated aldehydes in ionic liquids. The electrochemical route. *Electrochim. Acta* **2013**, *89*, 692–699, doi:10.1016/j.electacta.2012.11.061.
 37. Yamazaki, Y.; Kawano, Y.; Uebayasi, M. Induction of adiponectin by natural and synthetic phenolamides in mouse and human preadipocytes and its enhancement by docosahexaenoic acid. *Life Sci.* **2008**, *82*, 290–300, doi:10.1016/j.lfs.2007.11.016.
 38. Sheikh, C.; Takagi, S.; Yoshimura, T.; Morita, H. Mechanistic studies of DCC / HOBT-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of “ active ester ” and the related derivatives with nucleophiles. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7272–7278, doi:10.1016/j.tet.2010.07.011.
 39. Watanabe, Y.; Fuji, T.; Hioki, K.; Tani, S.; Kunishima, M. Development of a simple system for dehydrocondensation using solid-phase adsorption of a water-soluble dehydrocondensing reagent (DMT-MM). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2004**, *52*, 1223–6, doi:10.1248/cpb.52.1223.
 40. Lakshman, M. K.; Singh, M. K.; Kumar, M.; Chamala, R. R.; Yedulla, V. R.; Wagner, D.; Leung, E.; Yang, L.; Matin, A.; Ahmad, S. Facile synthesis of 1-Alkoxy-1H-benzo- and 7-azabenzotriazoles from peptide coupling agents, mechanistic studies, and synthetic applications. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1919–1932, doi:10.3762/bjoc.10.200.
 41. Kunishima, M.; Kawachi, C.; Morita, J.; Tani, S.; Terao, K. Morpholinium Chloride : An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13159–13170.
 42. Durgaiyah, C.; Naresh, M.; Swamy, P.; Srujana, K.; Rammurthy, B.; Narender, N. Transamidation of carboxamides with amines over nanosized zeolite beta under solvent-free conditions. *Catal. Commun.* **2016**, *81*, 29–32, doi:10.1016/j.catcom.2016.04.004.
 43. Jimenez, R. S.; Dal Bosco, S. M.; Carvalho, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolecita - Influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 734–738, doi:10.1590/S0100-40422004000500011.
 44. Cheung, C. W.; Buchwald, S. L. Room Temperature Copper(II)-Catalyzed Oxidative Cyclization of Enamides to 2,5-Disubstituted Oxazoles via Vinylic C – H Functionalization. *J. Org. Chem.* **2012**, 7526–7537.
 45. Carlos, L. de A.; Amaral, K. A. da S.; Vieira, I. J. C.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Samarão, S. S.; Vieira-da-Motta, O. *Rauvolfia Grandiflora* (Apocynaceae) Extract Interferes with Staphylococcal Density, Enterotoxin Production and

- Antimicrobial Activity. *Brazilian J. Microbiol.* **2010**, 612–620.
46. Galvani, A. T. *Toxoplasma gondii*: um novo desafio. *Núcleo Pesqui. em Avaliação Riscos Ambient.* **2014**, 1, 1–2.
 47. Galván-Ramírez, M. D. L.; Gutiérrez-Maldonado, A. F.; Verduzco-Grijalva, F.; Marcela, J.; Jiménez, D. The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review. *Front. Microbiol.* **2014**, 5, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2014.00503.
 48. Martins-duarte, E. S.; Dubar, F.; Lawton, P.; França, C.; Soeiro, M. D. N. C.; Souza, W. De; Biot, C. Ciprofloxacin Derivatives Affect Parasite Cell Division and Increase the Survival of Mice Infected with *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* **2015**, 10, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0125705.
 49. Weiss, Louis M, Dubey, P. J. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *NIH Public Access* **2010**, 39, 895–901, doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.004.Toxoplasmosis.
 50. William J. Sullivan Jr, V. J. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *NIH Public Access* **2013**, 36, 717–733, doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x.Mechanisms.
 51. Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* **2000**, 30, 1217–1258.
 52. Wei, H.; Wei, S.; Lindsay, D. S.; Peng, H. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Anti-*Toxoplasma gondii* Medicines in Humans. *PLoS One* **2015**, 10, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0138204.
 53. Tenório, R. P.; Carvalho, C. S.; Pessanha, C. S.; Lima, J. G.; Faria, A. R.; Alves, A. J.; Melo, E. J. T.; Góes, A. J. S. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2575–2578, doi:10.1016/j.bmcl.2005.03.048.
 54. Liesen, A. P.; Aquino, T. M.; Carvalho, C. S.; Lima, V. T.; Araújo, J. M.; Lima, J. G.; Faria, A. R.; Melo, E. J. T.; Alves, A. J.; Alves, E. W.; Alves, A. Q.; Góes, A. J. S. Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1, 3, 4-thiadiazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 3685–3691, doi:10.1016/j.ejmech.2010.05.017.
 55. Aquino, T. M.; Liesen, A. P.; Silva, R. E. A.; Lima, V. T.; Carvalho, C. S.; Faria, A. R.; Araújo, J. M.; Lima, J. G.; Alves, A. J.; Melo, E. J. T.; Góes, A. J. S. Synthesis, anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones 5-thiazolidineacetic acids. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 446–456, doi:10.1016/j.bmc.2007.09.025.
 56. Vieira-Da-Motta, O.; Folly, M. M.; Sakiyama, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brazilian J. Microbiol.* **2001**, 32, 27–31,

doi:10.1590/S1517-83822001000100007.

57. Azevedo, F. M. Estudo fitoquímico e avaliação biológica das espécies *Lonchocarpus guilleminianus* (Fabaceae) e *Calycophyllum Spruceanum* (Rubiaceae)., Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro, 2009.
58. CLSI *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition*; 2015; Vol. 35; ISBN 1562387812.
59. Silva, F. de A. S. e.; Azevedo, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. 2016, 3733–3740.
60. Pessanha, C. S. Efeito “ in vitro ” de Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos sobre o desenvolvimento intracelular do *Toxoplasma gondii*
Efeito “ in vitro ” de Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos sobre o desenvolvimento intracelular do Toxopla, Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro, 2006.
61. Liu, Z.; Fu, J.; Shan, L.; Sun, Q.; Zhang, W. Synthesis, Preliminary Bioevaluation and Computational Analysis of Caffeic Acid Analogues. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 8808–8820, doi:10.3390/ijms15058808.
62. J.H. Jorgensen, in: P.R. Murray, E.J. Baro, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R. H. Y.; (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*; Washington, 1995;

ANEXO

Article

In Vitro Anti-*Toxoplasma gondii* and Antimicrobial Activity of Amides Derived from Cinnamic Acid

Graziela Rangel Silveira ^{1,*}, Karoline Azerêdo Campelo ¹, Gleice Rangel Silveira Lima ¹,
Lais Pessanha Carvalho ², Solange Silva Samarão ³, Olney Vieira-da-Motta ³, Leda Mathias ¹,
Carlos Roberto Ribeiro Matos ¹, Ivo José Curcino Vieira ¹, Edesio José Tenório de Melo ² and
Edmilson José Maria ¹

¹ Laboratório de Ciências Químicas, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000—Parque Califórnia, 28013-602 Campos dos Goytacazes/RJ, Brazil; karolcampelo16@yahoo.com.br (K.A.C.); gleice.sil@hotmail.com (G.R.S.L.); leddam8@gmail.com (L.M.); matos@uenf.br (C.R.R.M.); curcino@uenf.br (I.J.C.V.); edmilson_maria@yahoo.com.br (E.J.M.)

² Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000—Parque Califórnia, 28013-602 Campos dos Goytacazes/RJ, Brazil; lais_pessanha@hotmail.com (L.P.C.); ejtm1202@gmail.com (E.J.T.M.)

³ Laboratório de Sanidade Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000—Parque Califórnia, 28013-602 Campos dos Goytacazes/RJ, Brazil; solangesamarao@gmail.com (S.S.S.); olney.motta@gmail.com (O.V.-d.-M.)

* Correspondence: graziela_sil@hotmail.com; Tel.: +55-022-2728-6167

Received: 1 March 2018; Accepted: 23 March 2018; Published: 28 March 2018



Abstract: Most cinnamic acids, their esters, amides, aldehydes, and alcohols present several therapeutic actions through anti-inflammatory, antitumor, and inhibitory activity against a great variety of microorganisms. In this work, eight amines derived from cinnamic acid were synthesized and tested against host cells infected with *Toxoplasma gondii* and the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, and three strains of *Staphylococcus aureus*. Compounds **3** and **4** showed the best result against intracellular *T. gondii*, presenting antiparasitic activity at low concentrations (0.38 and 0.77 mM). The antibacterial activity of these compounds was also evaluated by the agar microdilution method, and amides **2** and **5** had a minimum inhibitory concentration of 250 µg mL⁻¹ against two strains of *S. aureus* (ATCC 25923 and bovine strain LSA 88). These also showed synergistic action along with a variety of antibiotics, demonstrating that amines derived from cinnamic acid have potential as pharmacological agents.

Keywords: synthetic amides; antiparasitic; antibiotic; acrylamides

1. Introduction

The cinnamic acids belong to a group of (C₆-C₃) substances derived from the secondary metabolism of plants. The term “cinnamic” refers to *Cinnamomum verum* (*Sin. C. zeylanicum*), commonly known as the “cinnamon tree”. From this plant, “cinnamon” is obtained by drying the central part of the bark [1,2].

Most of the cinnamic acids, their esters, amides, aldehydes, and alcohols present several therapeutic actions like anti-inflammatory [3,4], antitumor [5], antimalarial [6,7], antitrypanosomal [8], and inhibitory activity against a broad range of microorganisms [2,9–11]. The mechanism of action is still poorly known [2]. Several researchers tried to produce alternative compounds obtained from derivatives of this acid to potentiate its therapeutic properties.

Despite the broad range of biologic activities described in the derivatives of the cinnamic acid, there has been no literature record until now on its effect against the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis [12,13]. One-third of the global population is estimated to be infected by this disease [12,14]. The most used treatment for this disease is the joint use of sulfadiazine and pyrimethamine [15]. This combination of drugs shall be used as a reference for other therapeutic protocols [13,15,16] to reduce the collateral effects associated with the treatment [16]. Several studies using thiosemicarbazones and thiazolidines aimed to reduce the toxic effects of the treatment [17–19].

Studies on the amides derived from cinnamic acid described inhibitory activity against several main bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. [2]. The development of alternative antimicrobials against pathogenic bacteria is of great interest to the pharmaceutical industry [20].

With the aim of verifying the antimicrobial and antiparasitic activity, we synthesized eight amides derived from the cinnamic acid (Figure 1).

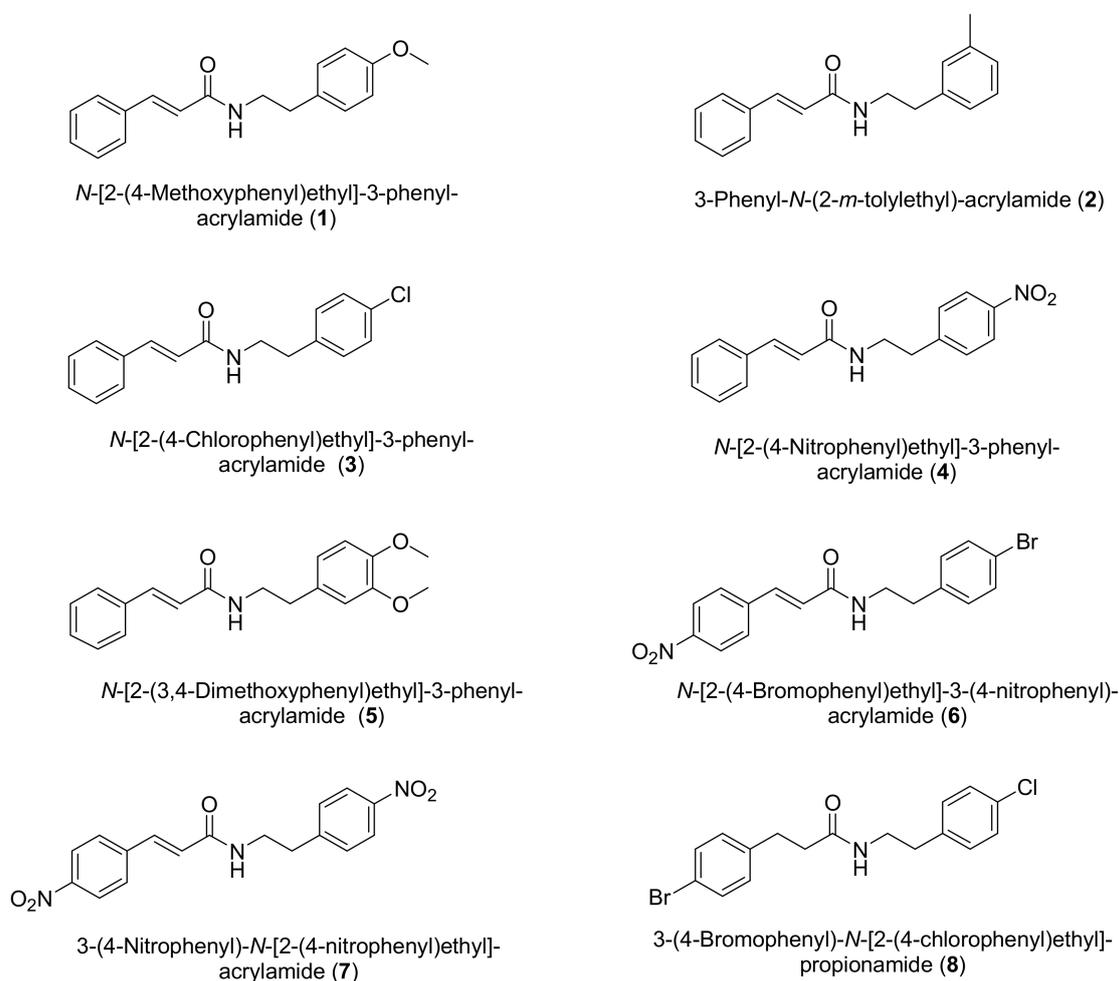


Figure 1. Chemical structure of compounds 1–8.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

The amides were synthesized by two different methods: coupling of the derivatives of the cinnamic acids with phenylethylamines substituted by dicyclohexylcarbodiimine (DCC) as a coupling agent (to obtain amides 1–5 and 8) and nucleophilic substitution reaction using

p-nitrophenylethylamine, *p*-bromophenylethylamine, and *trans-p*-nitrocinnamoyl chloride (to obtain amines **6** and **7**). Among these reactions, those with acid chloride displayed higher yield.

The products of the reactions were solid at room temperature. These were analyzed using a nuclear magnetic resonance spectrometer. In all compounds, a quartet signal in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum was visible between 3.64–3.74 ppm, associated to the methylene adjacent to the nitrogen atom of the amide. In the $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum, signals relating to carbonyl groups of the amides were present between 164–172 ppm. The confirmation of these groups was also found in the HMBC spectrum by the correlation at two and three bonds between the carbonyl carbon and the adjacent hydrogens. The adsorptions in the infrared spectrum in the ranges of 1639–1657 and 3277–3347 cm^{-1} are characteristic of the C=O and N-H stretch, respectively. To verify the functional groups and to assess the purity of the obtained products and their molecular weight we used gas chromatography coupled to the mass spectrophotometer (GC-MS).

In this way, all the synthesized compounds showed spectral data consistent with the respective structures.

Of the eight synthesized compounds, five are unpublished as of yet (**2**, **4**, **6–8**).

2.2. Assay for Anti-Toxoplasma gondii Activity

We focused the tests against *T. gondii* on the amides **1**, **3–7**. For this purpose, they were incubated for 24 h in cultures of LLC-MK2 cells infected and non-infected with *T. gondii*.

The cellular toxicity test was performed to assess the concentration of the synthesized amides causing neither toxic effects nor cell death in LLC-MK2 cells. The presence of morphological alterations, degenerations or cell death induced due to the treatment with the different compounds defined the presence of cellular toxicity. In general, increased cellular toxicity is directly proportional to the increase in concentration, as displayed in Figure 2. The figure highlights that, as compared to the control (Figure 2a), increasing the concentration (Figure 2b–d) caused nuclear morphological changes and the progressive increase of toxicity with the reduction of cell numbers.

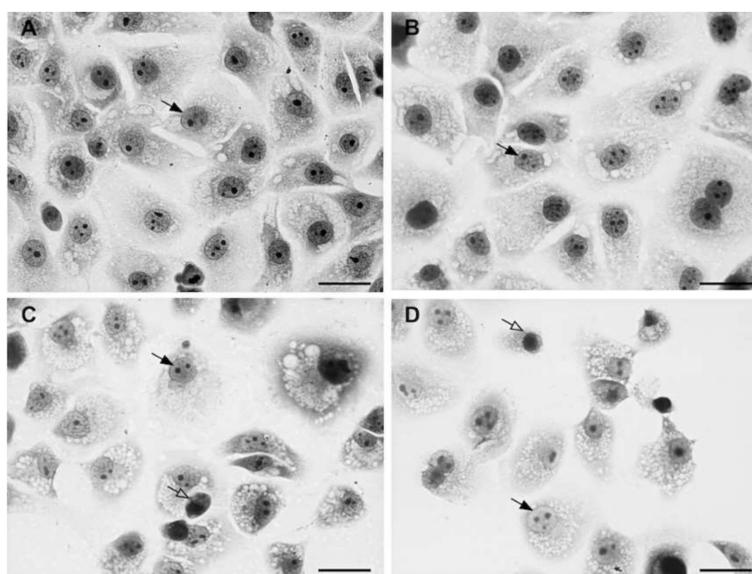


Figure 2. Toxicity in uninfected LLC-MK2 cells. The black arrow indicates nuclei with physiological appearance. White arrows indicate nuclear morphological changes indicative of toxicity. (a) Control case; In (b–d) a gradual increase of cytotoxicity is visible, associated with significant nuclear disorders and a decrease of the cellular number.

Table 1 displays the results of the toxicity test in uninfected cells. Data show that compounds 6 and 7 exhibited no toxicity at 2.92 mM and are, therefore, the least toxic. Compound 5 had a similar behavior at 1.69 mM. Compounds 3 and 4 showed no toxicity at concentrations of 0.35 and 0.17 mM, respectively.

Table 1. Cytotoxicity of the compounds 1 and 3–7 in LLC-MK2 uninfected cells.

Cytotoxicity (Uninfected Culture) ^a					
Drug	Concentration (mM)				
	Untreated	0.17	0.35	1.69	2.92
Compound 1	226 ± 09	-	229 ± 13	112 ± 14	0
Compound 3	196 ± 12	-	194 ± 11	-	0
Compound 4	196 ± 12	200 ± 21	-	0	0
Compound 5	226 ± 09	-	-	217 ± 30	71 ± 10
Compound 6	206 ± 10	-	-	-	209 ± 12
Compound 7	206 ± 10	-	-	-	209 ± 17

^a Values means ± SD.

Compounds 1, 3, and 4 displayed higher cellular damages at the concentration of 2.92 mM. At this concentration, these compounds caused 100% of cellular death. No substance caused significant damages at levels equal or lower than 0.17 mM. The 1.69 mM concentration of compound 1 caused the reduction of 50% of the LLC-MK2 cells. The 2.92 mM concentration of compound 5 caused cellular damages in 69% of the cells.

To define the dose of each compound which does not cause toxicity in uninfected cells, we tested cells infected with *T. gondii* at concentrations lower than the toxic dose established. After the infection of the LLC-MK2 cells with the parasite, we quantified the parasites based on the presence of tachyzoites. Infection of the *T. gondii* parasite was visible in untreated (control) cells. After treatment with the compounds, the number of infected host cells was reduced due to the elimination of the intracellular parasites (Figure 3).

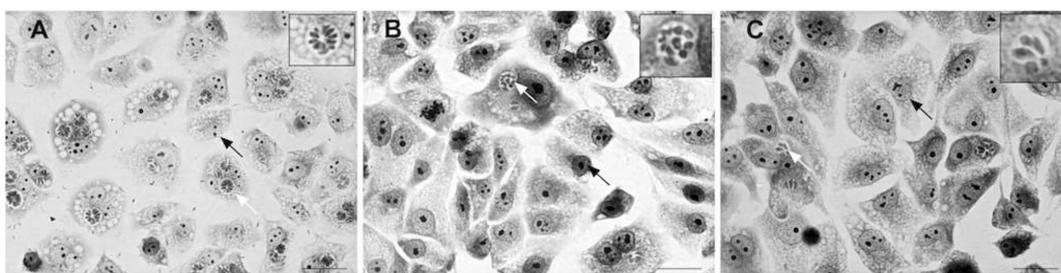


Figure 3. Optical microscopy of the biological test showing infected LLC-MK2 cells. The black arrows point to the cell nucleus; the white arrows indicate the parasitophorous vacuole. (a) Control case. Reduction of infection with the elimination of the parasite in the cells treated with (b) compound 1 and (c) 7.

Table 2 displays the effect of compounds 1, 3–7 on LLC-MK2 cells and intracellular parasites. The number of cells in the control tests and the treatments are similar, suggesting no cytotoxicity of the tested compounds at the concentration used in the experiment.

Table 2. Effect of compounds 1 and 3–7 on cultures of LLC-MK2 cells infected and multiplication of *T. gondii*.

Drugs	Concentration (mM)	Cytotoxicity (Infected Culture) ^a			
		Uninfected Cells	Infected Cells	Total of Cells	Parasites
Control	0	83 ± 8	28 ± 4	111 ± 12	179 ± 29
Compound 1	0.18	129 ± 6	24 ± 4	153 ± 10	166 ± 15
Control	0	108 ± 19	51 ± 6	159 ± 25	254 ± 38
Compound 3	0.077	147 ± 3	23 ± 5	170 ± 8	127 ± 32
Control	0	108 ± 19	51 ± 6	159 ± 25	254 ± 38
Compound 4	0.038	149 ± 24	35 ± 10	184 ± 34	134 ± 32
Control	0	83 ± 8	28 ± 4	111 ± 12	179 ± 29
Compound 5	0.16	114 ± 3	12 ± 1	126 ± 4	82 ± 19
Control	0	79 ± 7	37 ± 3	116 ± 10	174 ± 16
Compound 6	1.33	89 ± 12	31 ± 5	120 ± 17	83 ± 23
Control	0	79 ± 7	37 ± 3	116 ± 10	174 ± 16
Compound 7	1.46	104 ± 9	28 ± 3	132 ± 12	98 ± 12

^a Values means ± SD.

During the incubation, tachyzoites displayed morphologic disorganization before being eliminated. These results corroborate with similar experiences using thiosemicarbazones and thiazolidines [17–19].

Compound 5 required a 0.16 mM concentration to be effective against the intracellular parasite. Compounds 3 and 4 eliminated 50% of the parasites at 0.077 and 0.38 mM, respectively. This concentration corresponds to 22.01 and 56.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which are the lowest effective doses against *T. gondii* among the compounds we tested. Compounds 6 and 7 showed better effects at concentrations of 1.33 and 1.46 mM, respectively (Table 2), although they had low cytotoxicity.

These results align with similar experiments performed by other researchers which studied the anti-toxoplasmic activity of thiosemicarbazone and thiazolidine analogues. Their results showed, the active concentrations of these drugs varied between 0.1 mM and 1.5 mM and cytotoxicity was between 0.5 and 10 mM [17–19]. Regarding the activity of the compounds used in this study, compounds 3 and 4 displayed better results at lower concentrations. This data suggests that the substitution of chlorine and nitro (NO_2) in the *para* position in the ethylphenylamine portion promotes a significative action on the parasite.

The analysis of both cytotoxicity and antitoxoplasmic activity shows that the presence of an active electron scavenger group (NO_2) in the *para* position of the cinnamoyl portion (as in compounds 6 and 7) are characteristic of the least cytotoxic compounds. Similarly, these compounds display the highest concentration for the induction of parasite mortality.

All the compounds had antiparasitic activity at concentrations lower than the standard drugs hydroxyurea (DL_{50} 4 mM) [18] and sulfadiazine (DL_{50} 3 mM) [19]. The high concentration of these drugs suggests the possibility of toxic effects.

2.3. Assay for Antimicrobial Activity

All synthesized compounds were tested for their antimicrobial activity by the broth microdilution method according to the Standards Institute and Laboratory [21]. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were the lowest concentration that presented growth between 30 and 300 colonies.

Compounds 2 and 5 showed MICs of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and LSA 88, respectively (Table 2). Most of the compounds displayed some activity against the tested strains at concentrations higher than 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Compounds 1–5 were effective against

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442. Compound 2 was effective against *Staphylococcus aureus* LSA 88 (clinical strain isolated from bovine mastitis) and *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. Compounds 6 and 7 were effective against *Escherichia coli* ATCC 25922; compounds 1, 6 and 7 were effective against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228⁻¹. Compound 8 displayed no inhibitory activity on the tested microorganisms (Table 3).

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of compounds 1–8 against different bacterial strains.

Compound	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in $\mu\text{g mL}^{-1}$ ^a					
	ATCC 15442	LSA 88	ATCC 33591	ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 12228
1	>250	–	–	–	–	–
2	>250	>250	>250	250	–	>250
3	>250	–	–	–	–	–
4	>250	–	–	–	–	–
5	>250	250	–	–	–	–
6	–	–	–	–	>250	>250
7	–	–	–	–	>250	>250
8	–	–	–	–	–	–

^a The maximum concentration tested was $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Gentamicin was used as control antibiotic (concentration $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Tests were performed in triplicate. – No inhibition at the concentration tested. >250 indicates that there was sensitivity, but the concentration should be higher than $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ for a count of fewer than 300 colonies.

Georgiev et al. [22] synthesized cinnamoylamides effective against *S. aureus* strains (62.5 – $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) as observed in the present study.

Table 4 displays the antibiograms of the bacteria treated with the compounds 2 and 5. The comparison between control bacteria and those treated with compound 2 after the exposition to the antibiotics displays larger inhibition halos of the strain ATCC 25923 ($p < 0.01$) for all the antibiotics that have been tested together with compound 2. The increase of halo size of the compounds treated with compound 2 demonstrates that this product has synergic actions with these antibiotics, boosting their effects.

Table 4. Antibiogram (average halo diameter expressed in mm) of strains of *S. aureus* treated with amides derived from cinnamic acid and submitted to 12 different antibiotics. Assessed by agar gel diffusion method [23].

Antibiotic	Strains			
	ATCC 25923		LSA 88	
	Control	2	Control	5
VAN	16.74Bg	23.98Ad	17.50Ae	17.45Ai
AMP	27.05Ba	36.99Aa	33.17Aab	34.64Ab
SUT	25.00Bbc	37.00Aa	28.05Bc	29.68Ade
CLI	21.40Be	34.42Aab	26.76Ac	27.17Ag
CFX	23.70Bcd	34.86Aab	28.09Bc	28.90Aef
ERI	20.87Be	32.42Aabc	25.73Bc	27.99Afg
AMO	24.95Bbc	32.88Aab	33.98Aab	31.36Bc
PEN	25.69Bab	33.40Aab	36.11Aa	36.21Aa
GEN	21.37Be	30.24Abc	26.72Ac	26.99Ag
AMC	26.81Ba	35.52Aab	35.06Aab	35.62Aab
OXA	19.02Bf	26.61Acd	21.31Ad	21.32Ah
TET	22.40Bde	33.33Aab	32.49Ab	30.91Acd

The averages followed by the same small letter in the column (antibiotics) and a capital letter on the line (treatment with amines derived from cinnamic acid) do not differ from each other. Tukey test, 1 and 5% probability. VAN: Vancomycin; AMP: Ampicillin; SUT: Sulfazotrim; CLI: Clindamycin; CFX: Cefalexin; ERI: Erythromycin; AMO: Amoxicillin; PEN: Penicillin G; GEN: Gentamicin; AMC: Amoxicillin/ Clavulanic acid; OXA: Oxacillin; TET: Tetracycline.

Compound **5** had a significant synergism ($p < 0.05$) on the effect of Sulfazotrim (SUT), Cefalexin (CFX), and Erythromycin (ERI) against the *S. aureus* bovine clinical sample LSA 88. On the contrary, the same compound **5** had an antagonistic effect toward AMO, reducing its inhibition halo ($p < 0.05$). Carlos et al. [20] also described the antagonistic effect between the control and the *Rauwolfia grandiflora* extracts with the antibiotics ampicillin, oxacillin, and cephalosporin.

Comparing the results among drugs, AMC and AMP displayed more significant activity in the control treatment for the ATCC 25923 strain. With the treatment of compound **2**, SUT activity is potentiated, producing a broader inhibition halo together with AMP. The LSA 88 strain displayed higher sensitivity toward penicillin G (PEN). This result remained after treatment with compound **5**.

The ATCC 25923 strain remained less sensitive to VAN and OXA even after the treatments, although an increase in the inhibition zone was confirmed ($p < 0.01$).

The results suggest the differences in the inhibition halos of *S. aureus* treated with compounds **2** and **5** increased the sensibility of strains ATCC 25923 and LSA 88 to different antibiotics.

3. Materials and Methods

3.1. General Information

All the chemical reagents used in this experiments were from Sigma Aldrich (St. Louis, MI, USA). Nuclear magnetic resonance spectra (NMR ^1H , ^{13}C , HMBC e HSQC) were obtained using BRUKER Avance III equipment (125 and 500 MHz) in deuterated chloroform (CDCl_3) measured as parts per million (ppm) and coupling constants (J) in Hz. Infrared spectra were obtained using an IR-affinity spectrometer/Shimadzu (Tokyo, Japan) using KBr pellets. Purity and atomic mass of the compounds were confirmed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), model 5975C Inert XL EI/CI/MS Agilent Technologies. All spectra are available in Supplementary Materials Figure S1–S48.

3.2. General Synthetic Procedure

The eight compounds were synthesized by the condensation reaction of carboxylic acids with phenylethylamines by activation of the acid portion; six compounds (**1**, **2**, **3**, **4**, **5** and **8**) were produced using *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC-Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) as the coupling agent. For compounds **6** and **7**, the corresponding acid chloride was used (Figure 1).

3.2.1. General Synthetic Procedure for Compounds 1–5 and 8

The addition of 0.2 mmol of cinnamic acid together with equimolar amounts of DCC and their amines in dichloromethane is done at 0°C and stirred for 48 h under argon atmosphere. The reaction was monitored by thin layer chromatography and purified through a silica gel chromatographic column, eluting hexane and ethyl acetate (1:1) [9,24].

N-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]-3-phenyl-acrylamide (**1**). Yellow amorphous solid; Yield: 39.9%; MP: $137.4\text{--}137.9^\circ\text{C}$; IR ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): ν 1624 (N-H), 3312 (N-H), 1655 cm^{-1} (C=O); NMR ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7.64 (*d*, $J = 15.6$ Hz, 1H, C=CH), 7.51–7.48 (*m*, 2H, Ar-H), 7.39–7.35 (*m*, 3H, Ar-H), 7.18–7.14 (*m*, 2H, Ar-H), 6.90–6.86 (*m*, 2H, Ar-H), 6.36 (*d*, $J = 15.6$ Hz, 1H, C=CH), 3.64 (*q*, $J = 6.7$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.85 (*t*, $J = 6.7$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.81 (*s*, 3H, OCH_3); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} 165.9 (C=O), 158.3 (C), 140.0 (CH), 134.8 (C), 130.8 (C), 129.8 (C), 129.7 (C), 128.8 (C), 127.8 (C), 120.7 (CH), 114.1 (C), 55.2 (OCH_3), 41.0 (CH_2), 34.8 (CH_2); MS (EI), $m/z = 281.0$.

3-Phenyl-*N*-(2-*m*-tolylethyl)-acrylamide (**2**). Yellow amorphous solid; Yield: 49.4%; MP: $126.0\text{--}126.4^\circ\text{C}$; IR ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): ν 1618 (N-H), 3277 (N-H), 1657 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7.64 (*d*, $J = 15.3$ Hz, 1H, C=CH), 7.52–7.48 (*m*, 2H, Ar-H), 7.40–7.35 (*m*, 3H, Ar-H), 7.07 (*m*, 1H, Ar-H), 7.10–7.03 (*m*, 3H, Ar-H), 6.36 (*d*, $J = 15.3$ Hz, 1H, C=CH), 3.68 (*q*, $J = 6.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.88 (*t*, $J = 6.8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 2.38 (*s*, 3H, CH_3); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} 165.9 (C=O), 141.0 (CH), 138.9 (C),

138.5 (C), 134.9 (C), 129.7 (C), 129.7 (C), 128.8 (C), 128.6 (C), 127.8 (C), 127.3 (C), 125.8 (C), 120.7 (CH), 40.9 (CH₂), 35.6 (CH₂), 21.6 (CH₃); MS (EI), $m/z = 265.1$.

N-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-3-phenyl-acrylamide (3). White amorphous solid; Yield: 63.8%; MP: 163.4–164.0 °C; IR (ν cm⁻¹ KBr): ν 1620 (N-H), 1651 (C=O) 3300 (N-H) cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} 7.64 (*d*, $J = 15.6$ Hz, 1H, C=CH), 7.52–7.49 (*m*, 2H, Ar-H), 7.39–7.36 (*m*, 3H, Ar-H), 7.32–7.29 (*m*, 2H, Ar-H), 7.19–7.16 (*m*, 2H, Ar-H), 6.35 (*d*, $J = 15.6$ Hz, 1H, C=CH), 3.65 (*q*, $J = 6.7$ Hz, 2H, -CH₂), 2.89 (*t*, $J = 6.7$ Hz, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_{C} 165.9 (C=O), 141.3 (CH), 137.3 (C), 134.7 (C), 132.4 (C), 130.2 (C), 129.8 (C), 128.8 (C), 127.8 (C), 40.7 (CH₂), 35.0 (CH₂); MS (EI), $m/z = 285.1$.

N-[2-(4-Nitrophenyl)ethyl]-3-phenyl-acrylamide (4). Yellow amorphous solid; Yield: 41.2%; MP: 152.9–153.0 °C; IR (ν cm⁻¹ KBr): ν 1612 (N-H), 1651 (C=O) 3312 (N-H) cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} 8.20–8.15 (*m*, 2H, Ar-H), 7.66 (*d*, $J = 15.3$ Hz, 1H, C=CH), 7.52–7.49 (*m*, 2H, Ar-H), 7.42–7.36 (*m*, 5H, Ar-H), 6.39 (*d*, $J = 15.3$ Hz, 1H, C=CH), 3.71 (*q*, $J = 7.0$ Hz, 2H, -CH₂), 3.04 (*t*, $J = 7.0$ Hz, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_{C} 166.1 (C=O), 146.8 (C), 146.8 (C), 141.6 (CH), 134.6 (C), 129.9 (C), 128.9 (C), 127.8 (C), 123.9 (C), 120.2 (CH), 40.5 (CH₂), 35.7 (CH₂); MS (EI), $m/z = 296.1$.

N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]-3-phenyl-acrylamide (5). Crystalline solid; Yield: 32.5%; MP: 110.8–111.0 °C; IR (ν cm⁻¹ KBr): ν 1622 (N-H), 1655 (C=O) 3347 (N-H) cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} 7.64 (*d*, $J = 15.6$ Hz, 1H, C=CH), 7.52–7.47 (*m*, 2H, Ar-H), 7.39–7.34 (*m*, 3H, Ar-H), 6.80–6.74 (*m*, 2H, Ar-H), 6.84 (*m*, 1H, Ar-H), 6.36 (*d*, $J = 15.6$ Hz, 1H, C=CH), 3.88 (*s*, 6H, OCH₃), 3.65 (*q*, $J = 6.8$ Hz, 2H, -CH₂), 2.86 (*t*, $J = 6.8$ Hz, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_{C} 165.9 (C=O), 149.1 (C), 147.8 (C), 141.1 (CH), 131.4 (C), 129.7 (C), 128.8 (C), 127.9 (C), 120.7 (C), 120.6 (CH), 112.0 (C), 111.4 (C), 56.0 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 41.0 (CH₂), 35.2 (CH₂); MS (EI), $m/z = 311.1$.

3-(4-Bromophenyl)-*N*-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-propionamide (8). Crystalline solid; Yield: 64.0%; MP: 130.0–131.1 °C; IR (ν cm⁻¹ KBr): ν 1639 (C=O), 3290 (N-H est) cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.44–7.39 (*m*, 2H, Ar-H), 7.28–7.25 (*m*, 2H, Ar-H), 7.09–7.06 (*m*, 2H, Ar-H), 7.04–6.99 (*m*, 2H, Ar-H), 3.47 (*q*, $J = 6.9$ Hz, 2H, -CH₂), 2.92 (*t*, $J = 7.5$ Hz, 2H, -CH₂), 2.73 (*t*, $J = 6.9$ Hz, 2H, -CH₂), 4.01 (*t*, $J = 7.5$ Hz, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ_{C} 171.6 (C=O), 139.8 (C), 137.2 (C), 132.4 (C), 131.6 (C), 130.2 (C), 130.0 (C), 128.1 (C), 120.1 (C), 40.5 (CH₂), 38.2 (CH₂), 35.0 (CH₂), 31.0 (CH₂); MS (EI), $m/z = 367.0$.

3.2.2. Synthetic Procedure for Compounds 6 and 7

The addition of 0.2 mmol of *trans-p*-nitrocinnamoyl chloride together with diisopropylamine with equimolar amounts of their phenylethylamines in dichloromethane [4,9] was done at 0 °C and stirred for 48 h under argon atmosphere. The reaction was monitored by thin layer chromatography and purified through a separation funnel (dichloromethane to water).

N-[2-(4-Bromophenyl)ethyl]-3-(4-nitrophenyl)-acrylamide (6). Yellow crystalline solid; Yield: 89.6%; MP: 146.0–147.0 °C; IR (ν cm⁻¹ KBr): ν 1618 (N-H), 1651 (C=O) 3292 (N-H) cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} 8.25–8.22 (*m*, 2H, Ar-H), 7.66–7.63 (*m*, 2H, Ar-H), 7.68 (*d*, $J = 15.7$ Hz, 1H, C=CH), 7.48–7.45 (*m*, 2H, Ar-H), 7.13–7.10 (*m*, 2H, Ar-H), 6.47 (*d*, $J = 15.7$ Hz, 1H, C=CH), 3.67 (*q*, $J = 6.8$ Hz, 2H, -CH₂), 2.88 (*t*, $J = 6.8$ Hz, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_{C} 164.9 (C=O), 148.2 (C), 141.2 (C), 138.7 (CH), 137.6 (C), 131.8 (C), 130.5 (C), 128.4 (C), 124.5 (CH), 124.2 (C), 40.8 (CH₂), 35.0 (CH₂); MS (EI), $m/z = 374.0$.

3-(4-Nitrophenyl)-*N*-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]-acrylamide (7). Red amorphous solid; Yield: 82.3%; MP: 149.6–151.2 °C; IR (ν cm⁻¹ KBr): ν 1620 (N-H), 1651 (C=O) 3294 (N-H) cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} 8.26–8.18 (*m*, 4H, Ar-H), 7.70 (*d*, $J = 15.4$ Hz, 1H, C=CH), 7.67–7.59 (*m*, 2H, Ar-H), 7.44–7.40 (*m*, 2H, Ar-H), 6.48 (*d*, $J = 15.4$ Hz, 1H, C=CH), 3.74 (*q*, $J = 7.0$ Hz, 2H, -CH₂), 3.06 (*t*, $J = 7.0$ Hz,

2H, -CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_C 164.9 (C=O), 148.3 (C), 146.9 (C), 146.5 (C), 140.9 (C), 139.1 (CH), 129.7 (C), 128.4 (C), 124.2 (C), 123.9 (C), 123.9 (CH), 40.6 (CH₂), 35.6 (CH₂); MS (EI), *m/z* = 341.1.

3.3. Anti-Toxoplasma Gondii Activity

Cells of LLC-MK2 (monkey kidney fibroblasts) were seeded on culture plates with 24 sumps with RPMJ 1640 (Sigma Aldrich, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum for 24 h at 37 °C, as described by Liesen et al. [18]. These cultures were treated with different concentrations of selected amides (ranging from 0.19 to 2.92 mM) to verify cytotoxicity. The dose which did not show cellular toxicity was determined by observation of morphological alterations when compared to the control.

Subsequently, for the anti-*T. gondii* activity, test cells were infected with tachyzoites (1:5) and incubated at 37 °C for 24 h. After confirmation of infection, the cultures were treated with the cinnamic acid derivatives at different concentrations (Table 2) for 24 h.

After treatment, the cultures were washed with phosphate buffer solution (PBS), fixed using 4% paraformaldehyde, and stained with GIEMSA solution. Subsequently, cultures were analyzed by optical microscopy (AXIOPLAN/Zeiss, Jena, Germany). The number of infected and uninfected cells, as well as intracellular parasites, were quantified, and quantitative analyses were performed to verify anti-toxoplasma activity.

The data presented were performed in triplicate.

3.4. Antimicrobial Activity

The biofilm forming bacterial strains of *S. aureus* (ATCC 33591), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 15442) and those strains which did not form biofilm—*S. aureus* (ATCC 25923), bovine strain *S. aureus* (LSA88 SEC+/SED+/TSST-1+) [25], and *S. epidermidis* (ATCC 12228)—were obtained from the bacterial collection of the Animal Health Laboratory (Laboratório de Sanidade Animal—LSA, Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil).

The in vitro antibacterial activity of the amides was investigated using the broth dilution method. Mueller Hinton agar (Acumedia, Lansing, MI, USA) was used as the bacterial growth medium. Stock solutions of the compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO—Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) and serial dilutions. The maximum concentration tested was 250 µg mL⁻¹.

Through the photometric reading (Densimat—bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) the inoculum containing 1 × 10⁸ CFU mL⁻¹ corresponding to 0.5 McFarland was obtained from the culture broth in the log phase of growth and diluted to 1 × 10⁶ CFU mL⁻¹. Tests with gentamicin (control antibiotic) at 10 µg mL⁻¹ concentration were conducted simultaneously.

Subsequently, a cell culture plate was used for MIC trials and solutions of serially diluted chemical compounds (0.1 mL) were seeded into each sample of each bacterial strain (0.1 mL). These were incubated in a bacteriological oven at 37 °C for 24 h. The MIC of each compound tested was defined as the lowest concentration that presented growth between 30 and 300 colonies.

After determining the MIC value of each compound, a synergy test was performed to verify the potentiation of the action of the conventional antibiotics together with the products for *S. aureus* strains (ATCC 25923 and LSA 88). For the antimicrobial activity pattern, the disc diffusion method was used on Mueller Hinton agar, according to the guidelines of the National Committee of Clinical Laboratory Standards [23]. The disks contained the following drugs: penicillin G (PEN, 10UI), oxacillin (OXA, 1 µg), amoxicillin (AMO, 10 µg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), cefalexin (CFX, 30 µg), sulfazotrim (SUT, 25 µg), clindamycin (CLI, 2 µg), erythromycin (ERI, 15 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), tetracycline (VAN, 30 µg), and vancomycin (VAN, 30 µg) (Laborclin, Pinhais, Brazil).

The inhibition halos formed around each disc were measured with a digital caliper (Mitutoyo/CD-6''CSX-B) and values submitted to Tukey's *t*-test [26] were 1 and 5%. All trials were performed in triplicate.

4. Conclusions

Eight amides derived from cinnamic acid were synthesized and characterized based on their physical, analytical, and spectrometric data. All amides tested showed anti-*T. gondii* activity, reducing the number of infected cells and intracellular parasites. Compound 3 and 4 displayed the best results. Compounds 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 showed weak activity against different strains of bacteria at a concentration higher than 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Compounds 2 and 5 demonstrated activity against two strains of *S. aureus* (ATCC 25923 and LSA 88) at a concentration of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The same compounds showed a synergic effect with different antibiotics. These results indicate that these classes of analogs are potential pharmacological agents.

Supplementary Materials: MS and IV spectra, ^1H -, ^{13}C -, HMBC, HSQC, and HMBC spectral data are available as supplementary materials online.

Acknowledgments: The authors are very grateful for the financial support from the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

Author Contributions: G.R.S., K.A.C., and G.R.S.L. prepared the amides. G.R.S., K.A.C. and S.S.S. performed the antimicrobial experiments. O.V.-d.-M. developed the antimicrobial study. L.P.C. performed the anti-*T.gondii* experiments. E.J.T.d.M. developed the anti-*T. gondii* study. L.M., C.R.R.M. and I.J.C.V. were responsible for the analysis of these data and E.J.M. planned and coordinated the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pittman, B.S. Cinnamon: It's Not Just For Making Cinnamon Rolls. *Ethnobot. Leaflet*. **2010**, *2010*, 11.
2. Guzman, J.D. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules* **2014**, *19*, 19292–19349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Boudreau, L.H.; Mailliet, J.; LeBlanc, L.M.; Jean-François, J.; Touaibia, M.; Flamand, N.; Surette, M.E. Caffeic acid phenethyl ester and its amide analogue are potent inhibitors of leukotriene biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 31833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chan, H.H.; Hwang, T.L.; Thang, T.; Leu, Y.L.; Kuo, P.C.; Nguyet, B.M.; Dai, D.N.; Wu, T.S. Isolation and Synthesis of Melodamide A, a New Anti-inflammatory Phenolic Amide from the Leaves of *Melodorum fruticosum*. *Planta Med.* **2013**, *79*, 288–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Shi, Z.-H.; Li, N.-G.; Shi, Q.-P.; Tang, H.; Tang, Y.-P.; Li, W.; Yin, L.; Yang, J.-P.; Duan, J.-A. Synthesis and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as selective matrix metalloproteinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1206–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ferraz, R.; Pinheiro, M.; Gomes, A.; Teixeira, C.; Prudêncio, C.; Reis, S.; Gomes, P. Effects of novel triple-stage antimalarial ionic liquids on lipid membrane models. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4190–4193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wiesner, J.; Mitsch, A.; Wissner, P.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Structure-activity relationships of novel anti-malarial agents. Part 2: Cinnamic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 423–424. [[CrossRef](#)]
8. Carvalho, S.A.; Feitosa, L.O.; Soares, M.; Costa, T.E.M.M.; Henriques, M.G.; Salomão, K.; De Castro, S.L.; Kaiser, M.; Brun, R.; Wardell, J.L.; et al. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 512–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Dai, L.; Zang, C.; Tian, S.; Liu, W.; Tan, S.; Cai, Z.; Ni, T.; An, M.; Li, R.; Gao, Y.; et al. Design, synthesis, and evaluation of caffeic acid amides as synergists to sensitize fluconazole-resistant *Candida albicans* to fluconazole. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 34–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Montes, R.C.; Perez, A.L.; Medeiros, C.I.S.; Araújo, M.O.; Lima, E.D.; Scotti, M.T.; Sousa, D.P. Synthesis, Antifungal Evaluation and In Silico Study of N-(4-Halobenzyl)amides. *Molecules* **2016**, *21*, 1716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Narasimhan, B.; Belsare, D.; Pharande, D.; Mourya, V.; Dhake, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: Synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 827–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. William, J.; Sullivan, V.J., Jr. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *NIH Public Access* **2013**, *36*, 717–733. [[CrossRef](#)]
13. Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1217–1258. [[CrossRef](#)]
14. Galván-Ramírez, M.D.L.; Gutiérrez-Maldonado, A.F.; Verduzco-Grijalva, F.; Marcela, J.; Jiménez, D. The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: A systematic review. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 503. [[CrossRef](#)]
15. Galvani, A.T. *Toxoplasma gondii*: Um novo desafio. *Núcleo Pesquisas em Avaliação Riscos Ambientais* **2014**, *1*, 1–2.
16. Wei, H.; Wei, S.; Lindsay, D.S.; Peng, H. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Anti-*Toxoplasma gondii* Medicines in Humans. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 0138204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tenório, R.P.; Carvalho, C.S.; Pessanha, C.S.; Lima, J.G.; Faria, A.R.; Alves, A.J.; Melo, E.J.T.; Góes, A.J.S. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2575–2578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Liesen, A.P.; Aquino, T.M.; Carvalho, C.S.; Lima, V.T.; Araújo, J.M.; Lima, J.G.; Faria, A.R.; Melo, E.J.T.; Alves, A.J.; Alves, E.W.; et al. Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3685–3691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Aquino, T.M.; Liesen, A.P.; Silva, R.E.A.; Lima, V.T.; Carvalho, C.S.; Faria, A.R.; Araujo, J.M.; Lima, J.G.; Alves, A.J.; Melo, E.J.T.; et al. Synthesis, anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones 5-thiazolidineacetic acids. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 446–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. De Almeida Carlos, L.; da Silva Amaral, K.A.; Curcino Vieira, I.J.; Mathias, L.; Braz-Filho, R.; Silva Samarão, S.; Vieira-da-Motta, O. *Rauvolfia Grandiflora* (Apocynaceae) Extract Interferes with Staphylococcal Density, Enterotoxin Production and Antimicrobial Activity. *Braz. J. Microbiol.* **2010**, *41*, 612–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jorgensen, J.H. *Manual of Clinical Microbiology*; Murray, P.R., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 1995.
22. Georgiev, L.; Chochkova, M.; Ivanova, G.; Najdenski, H.; Ninova, M.; Milkova, T. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **2012**, *89*, 91–102.
23. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*, 12th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2015; Volume 35, ISBN 1562387812.
24. Sheikh, M.C.; Takagi, S.; Yoshimura, T.; Morita, H. Mechanistic studies of DCC/HOBt-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of “active ester” and the related derivatives with nucleophiles. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7272–7278. [[CrossRef](#)]
25. Vieira-Da-Motta, O.; Folly, M.M.; Sakyama, C.C.H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Braz. J. Microbiol.* **2001**, *32*, 27–31. [[CrossRef](#)]
26. Silva, F.A.S.; Azevedo, C.A.V. The Assisat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* **2016**, *11*, 3733–3740.

Sample Availability: Samples of all the compounds are available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).