

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DA *N*- FENILBENZOSELENOGLICOLICAMIDA CONTRA AS CEPAS DE *ASPERGILLUS* e *PENICILLIUM*

Maria das Neves da Silva Neta¹
Fernanda Silva Soares²
Francinara da Silva Alves³
Laísa Vilar Cordeiro⁴
Helivaldo Diógenes da Silva Souza⁵

RESUMO

O desenvolvimento de microrganismo resistente aos tratamentos antifúngicos tem incentivado a busca de novas moléculas, sintéticas ou de produtos naturais. Dentre os compostos sintéticos, os compostos de organoselênio vêm se destacando durante as últimas décadas. Os compostos de organoselênio apresentam um amplo aspecto de atividades biológicas tais como: antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antiparasitária, entre outras. Na busca de obter novos agentes terapêuticos com possível atividade biológica, um composto de organoselênio, a *N*-fenilbenzoselenoglicolicamida (**7**) foi sintetizado e sua estrutura foi confirmada pelas técnicas de espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C. O composto foi avaliado em atividade antifúngica que apresentou uma inibição de 100% contra as cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* numa concentração inibitória mínima de 1024 µg/mL.

Palavras-chave: Síntese, organoselênio, *Aspergillus*, *Penicillium*.

INTRODUÇÃO

A importância clínica das infecções causadas por fungos oportunistas vem aumentando em um ritmo alarmante na segunda metade do século XX, incluindo pacientes com câncer, HIV e receptores de transplantes (CLARK & HAJJEH, 2002, p. 569). Devido ao desenvolvimento de resistência das drogas fúngicas e biodisponibilidade insuficiente dos antifúngicos convencionais, vêm sendo incentivado à busca de novas moléculas, sintéticas ou de produtos naturais. Dentre os microrganismos resistentes, estão os fungos filamentosos, como *aspergillus* e *penicillium*.

¹ Mestranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, neves_neta@hotmail.com;

² Graduanda pelo Curso de Química Industrial pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, fernandaqi@hotmail.com;

³ Mestranda em Química pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, francinaraufpb@gmail.com;

⁴ Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, laisavilar@email.com;

⁵ Pós Doutorando: Doutor, Departamento de Química - UFPB, helivaldog3@email.com.

O fungo *Aspergillus* foi descoberto pelo biólogo italiano, Pietro Micheli em 1729. O nome *Aspergillus* teve origem devido a sua forma quando observado ao microscópio, parecendo-se com um aspergillum. A infecção por *Aspergillus* spp. ocorre principalmente por via aérea, entretanto, alguns estudos sugerem que a água pode ser uma grande fonte de infecção. Devido à grande capacidade de esporulação que estes fungos possuem na água, são capazes de formar micronichos ambientais em um pequeno período de tempo, dificultando a desinfecção do ambiente (POSTER et al, 2015, p. 567). Dentre as doenças causadas pelo aspergillus, destaca-se a aspergilose, trata-se de uma infecção fúngica. A maioria das infecções em humanos é causada por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* e como principal responsável temos o *Aspergillus fumigatus*. Estes fungos, então, podem ser encontrados no solo e em material orgânico em decomposição, podendo originar vários quadros clínicos (JIANG et al, 2013, p. 502).

A descoberta do *penicillium* ocorreu em 1929 quando o microbiologista Alexander Fleming verificou um fenômeno quando estudava sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*. A placa contendo essa bactéria estava contaminada por um fungo, Fleming isolou e identificou o mesmo, estudando sua ação notou-se que era um fungo da espécie de *Penicillium* (ANVISA, 2007). O nome se deu devido ao conídio, que é sua estrutura produtora de esporos, parecer com um pincel (OLIVEIRA, 2012). Os fungos do gênero *Penicillium* sp. são encontrados no solo, na vegetação em decomposição, em madeira, alimentos secos, especiarias, cereais secos, frutas e vegetais frescos, crescendo em materiais de construção em ambientes contendo água. Algumas espécies desse gênero causam infecções na pele e problemas respiratórios, principalmente em indivíduos com imunidade baixa, como por exemplo, os pacientes com AIDS. Entretanto, alguns fungos desse gênero tem a capacidade de causar a podridão em diversos vegetais, mas outros fungos têm importância fundamental na indústria, como a produção de antibióticos, além de serem utilizados na indústria alimentar, na maturação de queijos (DONATI, 2008).

Selênio, um mineral essencial (RAYMAN, 2002, p. 203–215), é um componente vital das selenoproteínas, especificamente glutathiona peroxidase, necessária principalmente para saúde e reprodução normal (RAYMAN, 2000, p. 233-241). O selênio é essencial para uma operação eficiente e efetiva do sistema imunológico em ambos, animais e humanos (ARTHUR et al, 2003).

Compostos organoselênio têm apresentado muitas atividades biológicas úteis como antibacteriano, antiviral, antifúngica, anti-histamínicos, antiparasitários e agentes

anticancerígenos (ATHAYDE-FILHO et al, 2004, p 22-26; MUGESH & SINGH, 2000, p. 347-357).

Portanto, levando-se em consideração o potencial dos compostos de organoselênio na construção para o desenvolvimento de candidatos a fármacos, foi sintetizado um composto contendo selênio em sua base estrutural, para avaliar o seu potencial de atividade antifúngica contra fungos de *Aspergillus* e *Penicillium*.

METODOLOGIA

Local de Desenvolvimento do Estudo

A síntese da N-fenilbenzoselenoglicamicamida foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Campus I (João Pessoa) – PB, onde o mesmo é provido de toda aparelhagem necessária para o procedimento de síntese. A caracterização foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I – PB e ensaios laboratoriais referentes à atividade antifúngica frente às cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* foram realizados no Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Campus I – PB. O espectro de RMN ^1H foi obtido no aparelho da Varian (200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C). O clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi usado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em unidades de parte por milhão (ppm). As multiplicidades das bandas em RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s – singlete, d – dublete, t – tripleto e m – multiplete. A purificação do composto foi realizada pela técnica de recristalização em etanol e confirmada a partir da determinação da faixa de fusão obtido em placa de aquecimento da marca MQAPF-301 (Microquímica).

Síntese da 2-cloro-N-fenilacetamida (2)

Num balão de 50 mL contendo anilina (0,020 mols) e Et_3N (0,024 mols) solubilizado em 20 mL de DMF a uma temperatura de 0°C , é adicionado lentamente o cloreto de 2-cloroacetila (0,024 mols). O banho de gelo é retirado e a reação fica sobre

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

agitação por 6 horas em temperatura ambiente. A mistura reacional é acompanhada por TLC (hexano/acetato de etila 1:1). Ao término da reação, água gelada é adicionada a mistura reacional ocorrendo à formação de um sólido. O sólido é filtrado e lavado com água gelada (3 x 20 mL) O produto é purificado por recristalização com uma mistura de etanol/água fornecendo um sólido branco. Rendimento: 93%. Ponto de fusão: 133-135 °C. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.17 (s, 1H). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 164.01, 136.77, 129.22, 125.35, 120.27, 43.00.

Síntese da N-fenilbenzoselenoglicamicida (7)

Num balão de 50 mL, borohidreto de sódio (0,0139 mol) dissolvido em 6 mL de água foi adicionado lentamente sobre uma suspensão de selênio (0,0063 mol) em 6 mL de água contida em um balão de 50 mL. Depois de 3 minutos, o cloreto de aroíla (0,0063 mol) foi adicionado lentamente a uma temperatura ambiente. A mistura reacional torna-se amarelada e após 60 minutos de agitação à temperatura ambiente, a 2-cloro-*N*-fenilacetamida (0,0063 mol) foi adicionada lentamente sobre a mistura reacional. Observa-se a formação de um precipitado ao fim da adição. A mistura foi deixada em agitação por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura reacional foi submetida a uma extração com diclorometano (3 x 25 mL). A fase orgânica é lavada com uma solução de 10% de NaHCO₃ (3 x 25 mL), seca no sulfato, filtrada em uma placa de porcelana contendo sílica-gel e depois concentrada à uma pressão reduzida fornecendo um sólido. O produto foi purificado usando a técnica de recristalização usando o etanol. O precipitado formado no processo foi filtrado, seco e fornecendo um produto branco em forma de agulha com rendimento de 73%. Ponto de fusão: 132-133 °C. RMN ¹H – (200 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (s, 1H, NH); 7.92 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-3 and H-3'); 7.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-5); 7.54-7.45 (m, 4H, H-4, H-4', H-9 and H-13); 7.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-10 and H-12); 7.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-11); 3.78 (s, 2H, H-6). RMN ¹³C – (50 MHz, CDCl₃): δ 196.74 (C-1); 137.94 (C-2); 129.16 (C-3 and C-3'); 129.09 (C-4 and C-4'); 134.73 (C-5); 28.27 (C-6); 168.25 (C-7); 138.06 (C-8); 119.91 (C-9 and C-13); 127.38 (C-10 and C-12); 124.44 (C-11).

Avaliação Antifúngica

Foi avaliada a atividade antifúngica da *N*-fenilbenzoselenoglicamicamida. A substância foi pesada e devidamente solubilizada em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL (PEREIRA, 2015, p. 229).

Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para manutenção das cepas fúngicas foi Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltd, USA, France). Para os ensaios de atividade antimicrobiana, foi usado meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (INLAB, São Paulo, Brasil). Ambos os meios foram preparados conforme as recomendações dos respectivos fabricantes.

Microrganismos

Foram utilizados os isolados clínicos *Aspergillus flavus* LM-247, *Aspergillus niger* LM-115, *Penicillium citrinum* LM-02, *Penicillium citrinum* LM-161. Os microrganismos pertencem à MICOTECA do Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em ASD à temperatura de 4°C. Para utilização nos ensaios, as leveduras foram repicadas em ASD com incubação a 35±2°C durante 24-48h.

Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas recentes dos microrganismos em meio ASD foram suspensas em solução fisiológica estéril a 0,9% e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de Mc Farland para obtenção de 10⁶ UFC/mL (CLSI, 2015).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos recomendados (CLSI, 2015). A determinação da CIM das substâncias sobre cepas fúngicas foi realizada através da técnica de microdiluição em meio líquido em placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100µL de caldo RPMI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100µL da substância foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024µg/mL até 16µg/mL. Por fim, foram adicionados 10µL das suspensões das cepas fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles para comprovação de viabilidade das cepas (RPMI + fungos filamentosos) e esterilidade do meio de cultura (RPMI). Também foi feito o controle negativo com Fluconazol (100 µg/mL) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35±2°C por 24 - 48 horas. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto *N*-fenilbenzoselenoglicamicamida foi sintetizado de acordo com o procedimento relatado por Souza et al (2019, p. 188) e foi obtida em quatro etapas sintética descrita na figura 1.

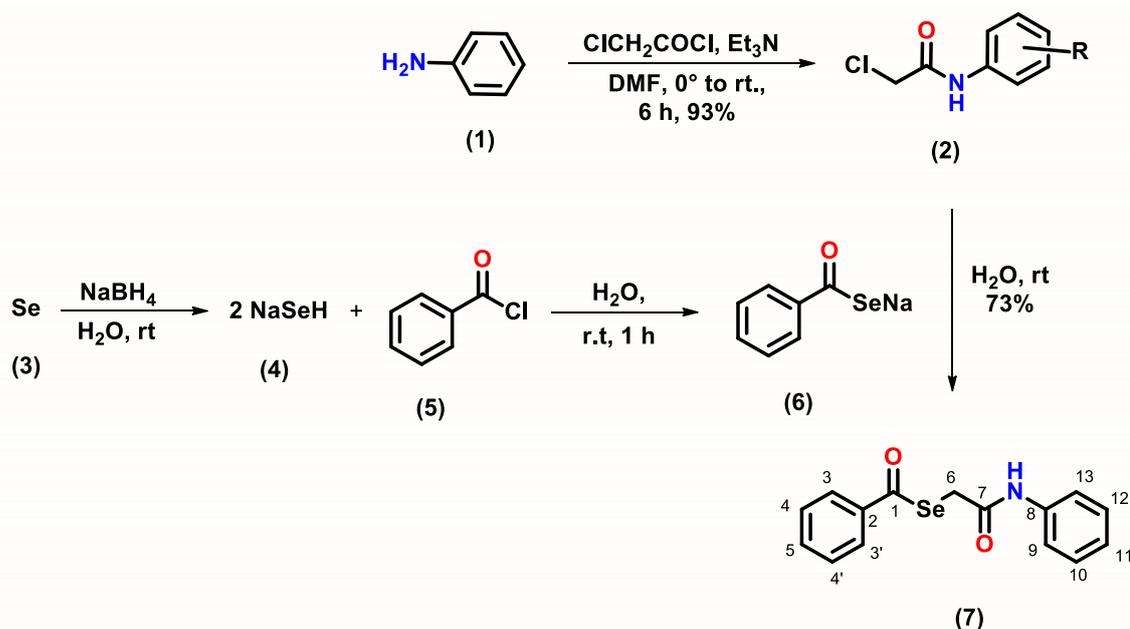


Figura 1: Rota sintética da *N*-fenilbenzoselenoglicamicamida adaptado de Souza et al (2019).

A primeira etapa da síntese é uma reação de acetilação da anilina (**1**) com o cloreto de 2-cloroacetila usando a trietilamina como base e o DMF como solvente para a obtenção da 2-cloro-*N*-fenilacetamida (**2**) (SOUZA et al, 2009, p. 188). O composto foi caracterizado usando as técnicas de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Nos espectros de RMN ^1H da 2-cloro-*N*-fenilacetamida, pode-se observar dois sinais típicos: um singlete para 2 hidrogênios atribuído aos prótons metileno do $\text{CH}_2\text{-Cl}$ (H-2) em δ 4.16 ppm e uma banda larga atribuído ao próton do N-H da amida em δ 8.28 ppm. No espectro de RMN ^{13}C dos compostos 2-cloro-*N*-fenilacetamida pode-se observar dois sinais característicos típicos: um sinal de C=O da amida entre δ 164.01 ppm e um sinal do $\text{CH}_2\text{-Cl}$ que variam entre δ 43.00 ppm. A segunda etapa da síntese é a reação entre o borohidreto de sódio com o selênio (**3**) em uma solução aquosa para a obtenção do hidrogenoseleneto de sódio (**4**). A terceira etapa é a formação do benzoselenoato de sódio (**6**) a partir da reação entre o hidrogenoseleneto de sódio (**4**) com o cloreto de benzoíla (**5**). E a quarta e ultima etapa da síntese é a reação entre o benzoselenoato de sódio com a 2-cloro-*N*-fenilacetamida (**2**) para a formação da *N*-fenilbenzoselenoglicamicamida (**7**) (SOUZA et al, 2009, p. 188). O composto foi caracterizado usando técnicas espectroscópicas de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C . No espectro RMN de ^1H podem-se observar dois sinais característicos: um atribuído aos prótons de metileno $\text{CH}_2\text{-Se}$ (**H-6**) em δ 3.78 ppm e um atribuído ao próton do N-H em δ 8.36 ppm (Figura 2).

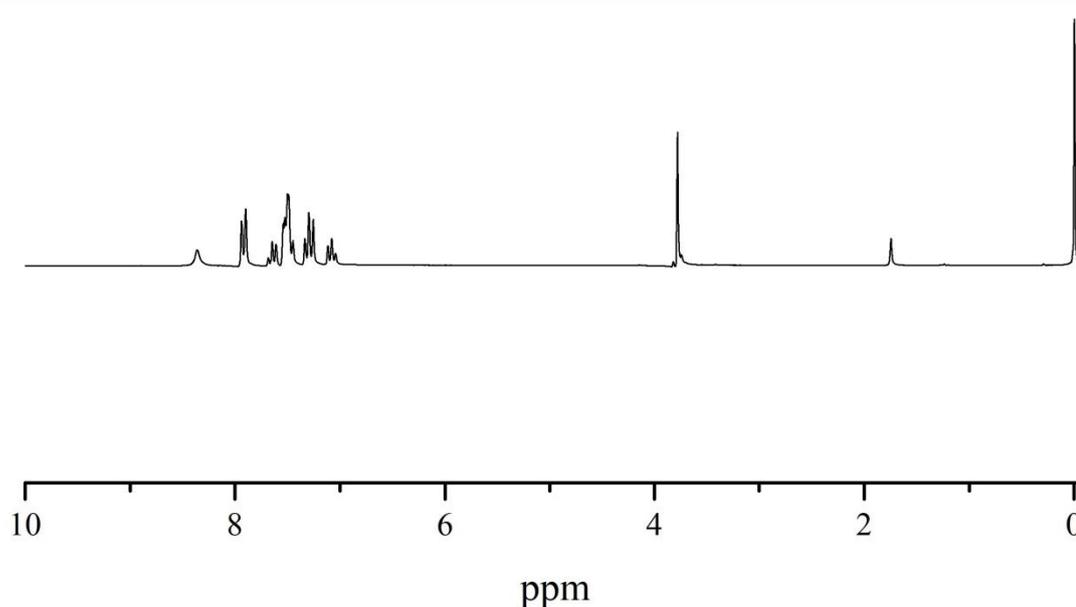


Figura 2: Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 da *N*-fenilbenzoselenoglicamicamida (**7**)

No espectro de ^{13}C podem-se observar três sinais característicos: um sinal de C=O (**C-7**) correspondente a amida em δ 168.25 ppm, um sinal de C=O (**C-1**) correspondente ao selenol éster em δ 196.74 ppm e um sinal em δ 28.27 ppm correspondente ao carbono metileno $\text{CH}_2\text{-Se}$ (**C-6**) (Figura 3).

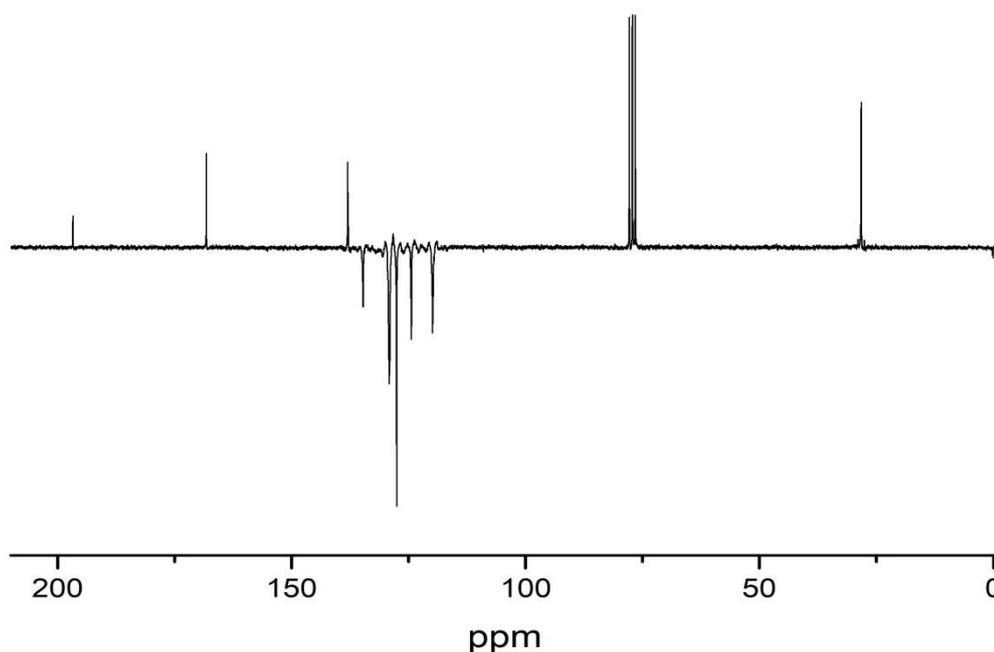


Figura 3: Espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 da *N*-fenilbenzoselenoglicamicamida (**7**)

Uma vez sintetizado e caracterizado, o composto *N*-fenilbenzoselenoglicamicamida (**7**) foi submetido à avaliação antifúngica frente às cepas de *Aspergillus* e *Penicillium*. A

avaliação dos resultados obtidos foi feita conforme análise realizada por Peixoto et al. (2016, p. 1812) que classificou o potencial antifúngico com base nos resultados da CIM, considerando como forte poder antifúngico os produtos com CIM até 500 µg/mL, moderado poder antifúngico aqueles com CIM entre 600 e 1500µg/mL e de fraco poder antifúngico os produtos com CIM acima de 1600 µg/mL (Tabela 1). O composto (7) demonstrou uma inibição de 100% e uma moderada atividade contra as quatro cepas realizadas nesse estudo, com uma concentração inibitória mínima de 1024 µg/mL.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL) da *N*-fenilbenzoselenoglicolicamida (7)

Cepas	CIM (µg/mL)	Controles		
	(7)	Fluconazol	Viabilidade	Caldo
<i>A. flavus</i> LM-247	1024	-	+	-
<i>A. niger</i> LM-115	1024	-	+	-
<i>P. citrinum</i> LM-02	1024	-	+	-
<i>P. citrinum</i> LM-161	1024	-	+	-

(-) Inibição do crescimento fúngico (+) Crescimento fúngico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *N*-fenilbenzoselenoglicolicamida (7) foi obtida em quatro etapas sintéticas e fornecendo um produto em forma de agulha brancas com um rendimento de 73%, onde o composto foi caracterizado com as técnicas de espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C e o resultado corrobora com o da literatura (SOUZA et al, 2019, p. 188). O ensaio antifúngico relevou que o composto apresentou uma inibição de 100% contra as cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* numa concentração inibitória mínima de 1024 µg/mL.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/penicilinas.html. Acesso em: 06 de junho de 2019

ATHAYDE-FILHO, P. F.; SOUZA, A. G.; MORAIS, S. A.; BOTELHO, J. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MILLER, J.; LIRA, B. F. Synthesis and characterization of three new organo-selenium compounds. A convenient synthesis of aroylselenoglycolic acids. **ARKIVOC**, v. 6, p. 22-26, 2004.

CLARK, T. A.; HAJJEH, R. A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, p. 569-574, 2002.

DONATI, I. Enzimi, acidi organici ed altri metaboliti coinvolti nella patogenesi di *Penicillium* spp. **Università di Bologna**. 2008.

JIANG, Z.; WANG, Y.; JIANG, Y.; XU, Y.; MENG, B. Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to *Aspergillus nidulans* resulting in spinal cord compression: Case report and literature review. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 2, p. 502-510, 2013.

MUGESH, G.; SINGH, H. B.; Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. **Chemical Society Reviews**, v. 29, p. 347-357, 2000.

OLIVEIRA, A. O. Aspectos morfológicos de *Penicillium* sp. Disponível em <http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/04/penicillium-sp-aldemir-souzaoliveira.html>. Acesso em: 06 de junho de 2019.

PEIXOTO, I. N.; SOUZA, H. D. S.; LIRA, B. F.; SILVA, D. F.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis and Antifungal Activity Against Candida Strains of Mesoionic System Derived From 1, 3-Thiazolium-5-thiolate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1807-1813, 2016.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2015.

POSTER, V. R.; KLAFKE, G. B.; CABANA, A. L.; ADORNES, A. C.; SILVA-FILHO, R. P.; XAVIER, M. O. Isolamento e identificação de fungos do gênero *aspergillus spp.* de água utilizada na reabilitação de pinguins-demagalhões. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 567-573, 2015.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

RAYMAN, M. P. **The argument for increasing selenium intake**. Proc. Nutr. Soc, v. 61, p. 203–215, 2002.

SOUZA, H. D. S.; SOUSA, R. P. F.; LIRA, B. F.; VIELA, R. F.; BORGES, N. H. P. B.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; LIMA, E. O.; JARDIM, J. U. G.; DA SILVA, G. A. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis, in silico and Antimicrobial Evaluation of New Selenoglycolicamides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 188-197, 2019.