

## AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS MESOIÔNICOS CONTRA LINHAGEM DE *CANDIDA*

Raissa Malzac Pontes<sup>1</sup>; Priscila Santos Vieira de Lima<sup>2</sup>; Rafael Farias de Oliveira<sup>3</sup>; Helivaldo Diógenes da Silva Souza<sup>4</sup>; Petrônio Filgueiras de Athayde Filho<sup>5</sup>

(<sup>1,2,3,4,5</sup>Universidade Federal da Paraíba <sup>1</sup> [raissamalzac@gmail.com](mailto:raissamalzac@gmail.com); <sup>2</sup> [priscilaquimicaufpb@gmail.com](mailto:priscilaquimicaufpb@gmail.com); <sup>3</sup> [rfarias.quimica@gmail.com](mailto:rfarias.quimica@gmail.com); <sup>4</sup> [helivaldog3@gmail.com](mailto:helivaldog3@gmail.com); <sup>5</sup> [athayde-filho@quimica.ufpb.br](mailto:athayde-filho@quimica.ufpb.br))

**Resumo:** Entre os compostos da classe heterocíclica, os compostos mesoiônicos apresentam um amplo aspecto de atividades biológicas tais como: antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antimalárica, analgésica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, entre outras. Na busca de obter novos agentes terapêuticos com possível atividade biológica, dois novos compostos derivados de mesoiônico do sistema 1,3-tiazólio-5-tiolato foram sintetizados e suas estruturas foram confirmadas pela técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H. Os compostos foram avaliados em atividade antifúngica e apenas o composto **5b** apresentou uma inibição de 100% contra as cepas de *Candida* com uma concentração inibitória mínima de 64 µg/mL.

**Palavras-chave:** Mesoiônico, Antifúngica, *Candida*.

### Introdução

As doenças infecciosas causadas por microrganismos têm aumentado gradualmente ao longo das últimas três décadas, levando a taxas consideráveis de morbidade e mortalidade, principalmente devido à baixa efetividade dos medicamentos disponíveis e o desenvolvimento de cepas resistentes. (SMITH et al, 2005).

Portanto, a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que sejam mais eficazes e seguros do que os fármacos já existentes no mercado são de extrema importância. Nesse sentido, os compostos heterocíclicos têm um lugar especial na Química Medicinal de compostos sintéticos biologicamente importantes. A notável capacidade de núcleos heterocíclicos de servir como unidades reativas contribuem largamente para o seu valor original como tradicionais unidades-chave de numerosos fármacos, (BOSTROM et al, 2012).

Compostos heterocíclicos formam de longe a maior divisão clássica da Química Orgânica. Sua participação em uma ampla gama de áreas não pode ser subestimada. A maioria dos produtos farmacêuticos que imitam os produtos naturais com atividade biológica são heterocíclicos. A maioria dos avanços significativos no desenvolvimento de novos fármacos contra os diversos tipos de doenças envolve compostos heterocíclicos (MARTINS et al, 2008).

Os compostos heterocíclicos, com ênfase para os compostos mesoiônicos, se destacam na química medicinal por apresentarem uma variedade de atividades biológicas tais como: analgésica,

antimicrobiana, anti-inflamatória, anticâncer, antiviral, antifúngica, antimalárica, analgésica, dentre outras, todas já bem descritas na literatura (KIER; ROCHE, 1967, ATHAYDE-FILHO et al, 1999).

Portanto, levando-se em consideração o potencial dos compostos mesoiônicos na construção para o desenvolvimento de candidatos a fármacos, foram sintetizados dois novos derivados de mesoiônico (especificamente do sistema 1,3-tiazólio-5-tiolato) para avaliar o seu potencial de atividade antifúngica contra fungos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

## Metodologia

### Química

**Síntese do N-metil-C-4-metilfenilglicina (2):** Em um béquer contendo 100 mL de água e acoplado a um agitador mecânico, foram adicionados cianeto de potássio (16,28g, 250 mmols) e cloridrato de metilamônio (16,88g, 250 mmols). A mistura foi agitada dentro da capela. Foi adicionado aos poucos 4-metilbenzaldeído (30g, 250 mmols) previamente diluído em 100 mL de metanol. Após duas horas de agitação vigorosa, adicionou-se cerca de 150 mL de água destilada e submetida a uma extração com diclorometano (3 x 100 mL). A fase orgânica foi coletada em um balão e concentrada em um evaporador rotatória. Foram adicionados 300 mL de HCl 6M e submetida a um refluxo. Após 6 horas de refluxo, evaporou-se a pressão reduzida cerca de 70% da solução de HCl 6M, obtendo-se o aminoácido (na forma de cloridrato) e os cristais foram filtrados em um funil de Buchner e em seguida lavou-se com diclorometano até eliminar toda impureza amarelada. Foram obtidos 29,17 g de cristais brancos com rendimento 66,8%. Ponto de fusão: 214-216 °C. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz - DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4.96 (s, 1H, CH); 7.24 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7.36 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>) e 9.64 (s, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>).

**Síntese do N-(4-clorobenzoil)-N-metil-C-4-metifenilglicina (3):** O N-metil-C-4-metóxfenilglicina (na forma de cloridrato) (5,9g, 27,4 mmol) foi dissolvido em 48 mL de uma água contendo 3,2 g NaOH (80,6 mmol) em um erlenmeyer e deixado sob agitação mecânica por uma hora. Ainda sob agitação, foi adicionado aos poucos, cloreto de 4-clorobenzoíla (4,36g, 25 mmol) e deixado por mais três horas. Em seguida foi adicionado na mistura reacional HCl 12M (6,7 mL) e agitada por mais 30 min. A mistura reacional foi submetida a uma extração com clorofórmio (3 x 100 mL), seca no sulfato de sódio e concentrada a pressão reduzida fornecendo 5,9g de uma massa branca com aparência pegajosa com rendimento de 74,58%. Ponto de fusão: 152-154 °C. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz - DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6.34 (s, 1H, CH); 7.18 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7.23 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7.62 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7.98 (sl, 1H, do ácido carboxílico) e 8.22 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>).

**Síntese do mesoiônico 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)-1,3-tiazólio-5-tiolato (4):**

N-(4-clorofenil)-N-metil-C-4-metilfenilglicina 3,8 g (12 mmols) foi dissolvido em anidrido acético (20 mL) e a solução obtida ficou sob aquecimento a 55 °C por uma hora. Em seguida adicionou-se dissulfeto de carbono (40 mL) e uma solução de cor vermelha foi formada, a qual ficou em refluxo a 60 °C por mais uma hora. A mistura reacional ficou em repouso por 48 horas. A mistura reacional foi levada para o rotaevaporador para retirar o excesso de CS<sub>2</sub>. Foi adicionado água e o precipitado foi filtrado e seco ao ar. O material obtido foi recristalizado em etanol. Foram obtidos 2,28 g de cristais vermelhos com rendimento de 57%. Ponto de fusão: 188-190 °C. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz - DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2.35 (s, 3H; CH<sub>3</sub>); 3.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.22 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>); 7.46 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>); 7.47 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>) e 7.56 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>).

**Síntese do Iodeto de 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)- 1,3-tiazólio-5-metiltio (5a):**

Uma mistura de 0,2 g (0,60 mmoles) do mesoiônico 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)- 1,3-tiazólio-5-tiolato (4) e 0,17 g (1,2 mmoles) de iodeto de metila em 10 mL de etanol foi agitado a temperatura ambiente por uma hora. A solução foi concentrada a pressão reduzida fornecendo um sólido. O sólido foi recristalizado em uma solução etanol/água (1:1), foram obtidos 0,25 g de cristais amarelo com rendimento de 89 %. Ponto de fusão: 186-188 °C. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz - DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2.44 (s, 3H; CH<sub>3</sub>); 2.53 (s, 3H; SCH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7.33 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>); 7.54 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>); 7.79 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>) e 8.15 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>).

**Síntese do Iodeto de 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)-1,3-tiazólio-5-etiltio (5b):**

Uma mistura de 0,2 g (0,60 mmoles) do mesoiônico 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)- 1,3-tiazólio-5-tiolato (4) e 0,28 g (1,8 mmoles) de iodeto de etila em 10 mL de etanol foi agitado a temperatura ambiente por uma hora. A solução foi concentrada a pressão reduzida fornecendo um sólido. O sólido foi recristalizado em uma solução etanol/água (1:1), foram obtidos 0,24 g de cristais amarelo com rendimento de 83 %. Ponto de fusão: 155-156 °C. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz - CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.31 (t, 3H; CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2.45 (s, 3H; CH<sub>3</sub>); 2.92 (q, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.86 (s; 3H, CH<sub>3</sub>); 6.34 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>); 7.55 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>); 7.79 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>) e 8.18 (d, 2H; CH<sub>Ar</sub>).

**Atividade Antifúngica**

No ensaio antifúngico dos compostos sintetizados, os microrganismos usados foram: *Candida albicans* (ATCC 76645 e LM 86) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803 e LM 6) e foram adquiridos na MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas

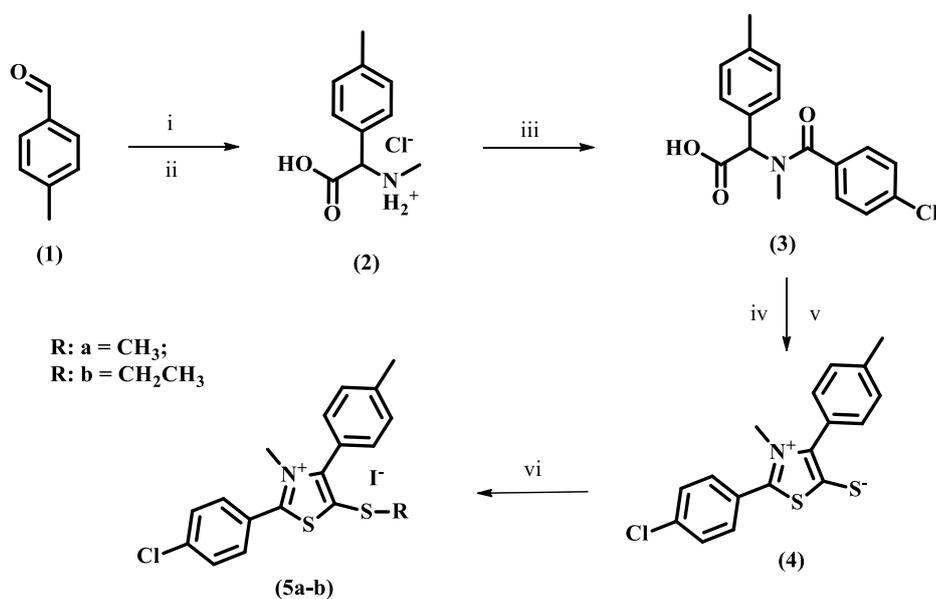
(DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba, Brasil. As cepas de fungos foram mantidas em meio apropriado, Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (DIFCO Laboratories), e armazenados a 4 e 35 °C. A suspensão de microrganismos foi preparada de acordo com o tubo de escala de 0,5 de McFarland e ajustada por meio de um espectrofotômetro (Leitz-Phtometer 340-800) a 90% T (530 nm) correspondente a aproximadamente  $10^6$  UFC/mL (NCCLS 2000; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991). Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados em Sabouraud Dextrose Broth-SDB (Laboratórios DIFCO, França-EUA), que foi preparado e usado de acordo com instruções do fabricante.

O valor de MIC foi determinado pelo método de microdiluição, utilizando placas de microtitulação de 96 poços com fundo em "U" e em duplicado. A cada poço da placa, foi adicionado 100  $\mu$ L de SDB de meio líquido duplamente concentrado. Em seguida, 100  $\mu$ L da solução da solução dos produtos (também duplamente concentrada) foram distribuídos nos poços da primeira linha da placa. Por meio de diluição em série (proporção de dois), foram obtidas concentrações de 1024 para 64  $\mu$ g/mL, de modo que na primeira linha da placa, a concentração mais alta, e nas últimas, as concentrações mais baixas. Finalmente, 10  $\mu$ L de inóculo foram adicionados aos poços onde cada coluna da placa se referia especificamente a uma cepa. O mesmo também foi feito no meio de cultura com a droga fúngica nistatina (100 UI). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24-48 h. Para cada estirpe, a MIC foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico observado visualmente nos poços, quando comparado ao controle. Todos os testes foram realizados em duplicado e os resultados foram expressos como a média geométrica dos valores de MIC obtidos nos dois ensaios. Os resultados da atividade antifúngica estão apresentados na Tabela 1.

## Resultados

### Química

A síntese dos derivados mesoiônicos **5a-b** foram sintetizados pela reação do mesoiônico **4** com o iodeto de metila e o iodeto de etila, respectivamente. O esquema 1 descreve a obtenção desses derivados.

**Esquema 1 - Rota sintética dos derivados de mesoiônico 5a e 5b**


**Reagentes e condições:** i) CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, KCN, H<sub>2</sub>O/MeOH, 2h, t.a.; ii) 6M HCl, refluxo, 6 h; iii) 10% NaOH, Cloreto de 4-clorobenzoila; iv) Ac<sub>2</sub>O, 60°C, 1 h; v) CS<sub>2</sub>, 60°C, 1h; vi) CH<sub>3</sub>I/CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>I; EtOH, 2 h, t.a

O aminoácido **2** é obtido a partir da síntese de Strecker, que envolve o aldeído **1** com cianeto de potássio e cloridrato de metilamônio em quantidade equimolares. Nessa reação ocorre a formação de um intermediário,  $\alpha$ -aminonitrila que em seguida sofre uma hidrólise com uma solução de HCl 6M formando o N-metil-C-4-metilfenilglicina. O espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **2** apresentou um singlete referente a metila do anel aromático em  $\delta$  2.27 ppm, um singlete referente a metila ligado a amina em 2.37 ppm e um singlete em 4.96 ppm para o CH do carbono quiral. O amidoácido **3** foi obtido pela reação entre o aminoácido e cloreto de 4-clorobenzoila previamente tratado com NaOH 10%. O espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **3** apresentou um singlete referente a metila do anel aromático em  $\delta$  2.34 ppm, um singlete referente a metila ligado a amina em  $\delta$  2.70 ppm, um singlete largo em 7.98 referente a OH do ácido carboxílico e todos os prótons dos anéis aromáticos foram observados em  $\delta$  7.18-8.22 ppm. A ciclodesidratação de N-(4-clorobenzoil)-N-metil-C-4-metilfenilglicina **3** com anidrido acético como agente desidratante em temperatura de 60°C, formando o mesoiônico da classe 1,3-oxazólio-5-olato. Posteriormente (in situ), é adicionado dissulfeto de carbono, CS<sub>2</sub>, como dipolarófilo ao mesoiônico 1,3-oxazólio-5-olato obtendo-se assim o mesoiônico 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)-1,3-tiazólio-5-tiolato **4** a partir da reação de cicloadição e cicloneversão 1,3-dipolar. O espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **4** apresentou um singlete referente a metila do anel aromático em  $\delta$  2.35 ppm, um singlete referente a metila ligado a

amina em  $\delta$  3.62 ppm, e todos os prótons dos anéis aromáticos foram observados em  $\delta$  7.22-7.56 ppm.

Os derivados de mesoiônico **5a** e **5b** foram obtidos a partir de uma reação  $S_N2$  entre o mesoiônico **4** com o iodeto de metila e com o iodeto de etila, respectivamente, usando etanol como solvente com rendimentos entre 83-89%. Verificou-se a pureza dos compostos examinando os seus intervalos de fusão. As estruturas dos derivados de mesoiônico foram confirmadas pelas técnicas espectroscópicas RMN  $^1H$ . Para os compostos (**5a** e **5b**) os espectros de RMN  $^1H$  apresentaram os seguintes sinais característicos: um singlete para 3 hidrogênios dos prótons metílicos  $CH_3N$  em  $\delta$  3.62 ppm e um singlete para 3 hidrogênio de  $CH_3$  em  $\delta$  2.35 ppm. No espectro do composto **5a**, aparece um singlete para 3 hidrogênios em  $\delta$  2,29 ppm onde  $R = CH_3$ . Já no espectro do composto **5b** aparece um tripleto para 3 hidrogênios em  $\delta$  1.19 ppm e um quarteto para 2 hidrogênios em  $\delta$  2.59 ppm onde  $R = CH_2CH_3$ .

### Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica in vitro dos compostos **5a** e **5b** foi avaliada pelo método de microdiluição com quatro cepas de fungos patogênicos, *Candida albicans* (ATCC 76645 e LM 86) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803 e LM 6) utilizando a nistatina como o fármaco padrão (Tabela 1). Os compostos foram testados em concentrações de 64 a 1024  $\mu g/mL$  e solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) numa proporção de até 10 % para evitar interferência com os microrganismos. A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500  $\mu g/mL$ = forte/ótima atividade; 600-1500  $\mu g/mL$ = moderada atividade; acima de 1500  $\mu g/mL$ = fraca atividade ou produto inativo.

Dos compostos testados, o composto **5a** não apresentou atividade inibitória contra as cepas mencionadas na avaliação. O composto **5b** apresentou uma inibição de 100% e com uma forte atividade contra as quatro cepas de *Candida* (*C. albicans* ATCC-76645, *C. albicans* LM 86, *C. tropicalis* ATCC-13803 e *C. tropicalis* LM 6) numa concentração inibitória mínima de 64  $\mu g/mL$ . Os resultados, portanto, foram considerados ótimos em termos de atividade biológica e levando em consideração os parâmetros estabelecidos por Sartoratto et al., 2004 e Houghton et al.; 2007.

**Tabela 1** - Concentração Inibitória Mínima dos derivados de mesoiônicos sobre as linhagens de *Candida*.

Compostos	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL			
	Linhagem de <i>Candida</i>			
	<i>C. albicans</i> ATCC 76645	<i>C. albicans</i> LM 86	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	<i>C. tropicalis</i> LM 6
<b>5a</b>	+	+	+	+
<b>5b</b>	64	64	64	64
<b>Controle</b>	+	+	+	+
<b>Levedura</b>				
<b>Nistatina</b>	-	-	-	-

(+): crescimento do microrganismo; (-): não houve crescimento do microrganismo.

## Conclusão

A rota sintética utilizada para a síntese dos derivados mesoiônicos (**5a** e **5b**) foram obtidas em seis etapas sintéticas, apresentando bons rendimentos e os compostos foram caracterizados pela técnica espectroscópica de RMN <sup>1</sup>H. Na avaliação antifúngica contra as linhagens de *Candida*, apenas o composto **5b** apresentou inibição de 100% contra os microrganismos estudados com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 64 µg/mL.

## Referências

ATHAYDE-FILHO, P. F.; SIMAS, A. M.; MILLER, J.; CHIAPPETA, K. X. Synthesis and characterization and evaluation of the activity of ten mesoionic compounds against microorganisms. *Acta Pharm. Bonaerense.*, v. 18, n. 1, p. 17-22, 1999.

BOSTROM, J.; HOGNER, A.; LLIN, A.; WELLNER, E.; PLOWRIGHT, A. T. Oxadiazoles in Medicinal. *Chemistry. J. Med. Chem.* 2012, 55, 1817-1830.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Etnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **J. Pharm. Sci.**, v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.

MARTINS, M. A. P.; FRIZZO, C. P.; MOREIRA, D. N.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G. Ionic Liquids in Heterocyclic Synthesis. **Chem. Rev.** 108, 2015–2050, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SMITH, E.; WILLIAMSON, M.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytoth. Res.** 19, 538-542, 2005.