

Valdir Cechinel Filho\*

Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)-FAQFAR - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) - CP 360 - 88032-202 - Itajaí - SC

Emerson F. de Queiroz e Edeltrudes de O. Lima

Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - PB

Tânia R. Pinheiro, Ricardo José Nunes e Rosendo A. Yunes

Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC - 88040-900 - Florianópolis - SC

Recebido em 5/9/95; aceito em 18/4/96

**SYNTHESIS OF N-ALKYLPHENYLMALEIMIDES AND N-ALKYLARYLMALEIMIDES WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY.** In the present study, several N-alkylphenylmaleimides and N-alkylarylmaleimides, which are analogues to alkaloid phyllanthimide, were synthesized and tested against several yeasts and mycelial fungi by using the diffusion method. The results showed that the compounds exhibited important antifungal profile against almost all microorganisms tested. However, *Aspergillus flavus* was the most resistant fungi in the two concentrations (250 and 125 µg) employed. Studies are in progress for the determining of the MIC for evaluation of their structure-activity relationships.

**Keywords:** cyclic imides; phyllanthimide; antifungal activity.

## INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre antimicrobianos têm revelado uma série de substâncias que atuam sobre uma grande variedade de microorganismos, destacando-se entre eles, os fungos. Após alguns anos à descoberta da penicilina<sup>1</sup>, pesquisadores vem tentando encontrar atividade biológica a partir dos metabólitos secundários oriundos de plantas superiores, bem como de produtos sintéticos, com a finalidade de obter novos compostos de comprovada eficácia terapêutica<sup>2-4</sup>.

As imidas cíclicas são compostos muito conhecidos devido suas importantes atividades biológicas, principalmente como bactericidas, fungicidas e inseticidas<sup>5</sup>. Diversos trabalhos demonstram o efeito fungicida de N-arilmaleimidias e compostos relacionados<sup>6-8</sup>.

Em estudos anteriores<sup>9</sup>, foi isolado em nossos laboratórios um novo alcalóide antiespasmódico e antibacteriano das folhas e ramos jovens de *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae), derivado da glutarimida e denominado filantimida (**1**) (Fig.1).

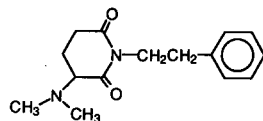


Figura 1. Estrutura molecular da filantimida isolada de *P. sellowianus*.

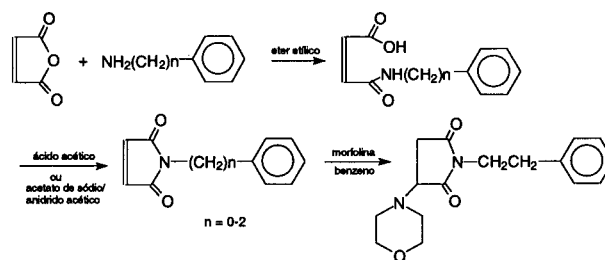
Recentemente, foram sintetizados vários análogos deste alcalóide que mostraram importante atividade antimicrobiana contra algumas bactérias que são frequentemente encontradas no trato urinário<sup>10,11</sup>, além de potente efeito antiespasmódico<sup>12</sup> e analgésico<sup>13</sup>.

Considerando o conhecido efeito fungicida de algumas imidas cíclicas, várias N-alkylarilmaleimidias, obtidas como intermediárias na rota sintética dos análogos da filantimida, foram testadas contra diversas espécies fúngicas, tais como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

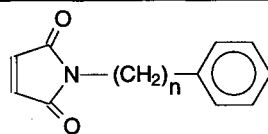
Considerando o interesse químico-medicinal de várias imidas cíclicas<sup>10-14</sup>, algumas N-alkylfenilmaleimidias e N-alkylarilmaleimidias foram obtidas pelo método anteriormente descrito<sup>15</sup>, com pequenas modificações e testadas contra uma série de fungos patogênicos aos seres humanos.

A rota sintética pode ser resumida conforme o esquema abaixo, onde todos os compostos foram identificados e caracterizados pelos métodos espectroscópicos usuais (IV, RMN <sup>1</sup>H) e análise elementar (CHN):



Todos os compostos (maleimidias) foram obtidos com rendimentos satisfatórios (40-80 %) e observou-se que para compostos com  $n > 1$ , o ácido acético foi melhor agente desidratante do que a mistura anidrido acético e acetato de sódio, sugerindo diferentes mecanismos de reações. Na reação de adição da base nitrogenada morfolina à dupla ligação imídica, para obtenção da succinimida (**12**), observou-se que o uso do solvente aprótico benzeno forneceu melhor rendimento do que quando esta adição foi realizada usando-se metanol, provavelmente devido à abertura do anel imídico, formando outros produtos indesejáveis.

A tabela 1 mostra o efeito de N-alkylfenilmaleimidias frente à vários fungos patogênicos. Como pode ser notado, os compostos apresentaram efeito contra quase todos os microorganismos testados, sendo inativos apenas contra *Aspergillus flavus*.

**Tabela 1.** Efeito antifúngico de N-alquilfenilmaleimidias pelo método de difusão em agar.

composto	ug/ml	CT	CA	AF	PE	MC	TR	EF	TM	
No	n									
2	0	250	12	15	0	11	18	12	6	8
		125	11	13	0	10	12	10	0	0
3	1	250	10	12	0	9	18	10	8	8
		125	10	10	0	8	15	8	8	6
4	2	250	10	12	0	10	18	10	12	12
		125	10	11	0	9	15	8	8	10
5	3	250	8	16	9	15	25	18	10	15
		125	0	12	7	22	16	12	12	12
6	4	250	0	12	0	10	20	12	8	10
		125	0	11	0	8	12	10	0	8

Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição.

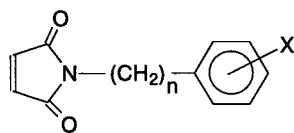
A tabela 2 mostra o efeito antifúngico de N-alquilarilmaleimidias onde observou-se algumas variações na atividade destes compostos. O composto (7), por exemplo, não apresentou nenhum efeito contra *Candida tropicalis* e praticamente não alterou a atividade em relação ao composto (3) não substituído contra os outros fungos. Entretanto, o composto monoclorado (9) apresentou halo de inibição maior do que o composto (3), enquanto o composto diclorado (8) não apresentou nenhum efeito contra *Epidermophyton floccosum*, sugerindo possíveis efeitos estéricos na posição 3 do anel aromático. O mesmo pode ser notado para o composto (11), que mostrou halo de inibição consideravelmente maior do que o composto (4) contra *Microsporium canis* e *Trichophyton rubrum*. Este fato deverá ser confirmado através do estudo de outros compostos substituídos. Outros pesquisadores<sup>16</sup> também observaram que a introdução de átomos de cloro em várias posições do anel aromático da N-fenilmaleimida aumentava significativamente a atividade frente ao fungo *S. sclerotiorum*. Por outro lado, é interessante notar que o fungo *Aspergillus flavus* mostrou-se resistente aos compostos cujas estruturas foram modificadas.

Por outro lado, a tabela 3 demonstra que a succinimida (12) foi totalmente inativa contra todos microorganismos testados.

Este resultado está de acordo com os resultados descritos anteriormente<sup>9,10,17</sup> sugerindo que a dupla ligação imídica pode representar um importante fator estrutural relacionado com a atividade antifúngica destes compostos.

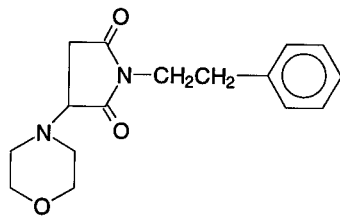
O mecanismo de ação antimicrobiana desta classe de compostos continua ainda obscuro, porém, alguns autores propuseram suas hipóteses: Cremlyn<sup>18</sup> sugere que a alta atividade fungicida de imidas cíclicas pode ser parcialmente associada com suas habilidades de acilar a enzima vital destes microorganismos, enquanto Torgenson<sup>19</sup> propôs que o modo de ação da N-fenilmaleimida está relacionada com a adição de grupos sulfidril da enzima do sistema vital à dupla ligação imídica, podendo interferir no processo metabólico normal de alguns fungos. Entretanto, os compostos imídicos em estudo provavelmente atuam por algum dos mecanismos descritos ou por outros mecanismos ainda indefinidos, sendo que sua caracterização necessita de futuras investigações.

Embora o método de difusão empregado no presente estudo seja de caráter qualitativo devido alguns fatores como solubilidade e velocidade de difusão dos compostos no agar, foi possível, pelo menos preliminarmente, determinar que as substâncias imídicas em estudo exercem ações antifúngicas contra diferentes microorganismos patogênicos. Entretanto, a

**Tabela 2.** Efeito antifúngico de N-alquilarilmaleimidias pelo método de difusão em agar.

composto	X	ug/ml	CT	CA	AF	PE	MC	TR	EF	TM	
No	n										
7	1	4-OMe	250	0	11	0	10	14	12	8	8
			125	0	0	0	9	12	10	0	0
8	1	3,4-Cl <sub>2</sub>	250	10	13	0	10	14	11	0	8
			125	9	11	0	9	12	9	0	0
9	1	4-Cl	250	10	12	0	10	15	10	18	14
			125	8	11	0	7	12	9	14	10
10	2	4-CH <sub>3</sub>	250	10	13	0	10	18	15	8	10
			125	9	12	0	8	15	10	10	8
11	2	4-Cl	250	11	15	0	14	28	28	8	8
			125	10	12	0	10	20	20	0	0

Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição.

**Tabela 3.** Efeito antifúngico da 2-morfolino-N-fenetilsuccinimida:

composto	ug/ml	CT	CA	AF	PE	MC	TR	EF	TM
12	250	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	0	0	0	0	0	0

Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição.

avaliação da concentração inibitória mínima é de grande interesse e está em andamento visando confirmar e melhor definir em termos quantitativos a correlação entre a estrutura destas imidas cíclicas e suas ações antifúngicas.

Finalmente, o uso do alcalóide natural filantimida, isolado de *P. sellowianus* segundo as recomendações da medicina popular, possibilitou a obtenção de vários compostos com efeito antifúngico contra fungos leveduriformes e filamentosos causadores de doenças infecciosas em seres humanos, abrindo novas perspectivas de se obter futuramente novas drogas antifúngicas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1- Síntese dos compostos<sup>20</sup>

Anidrido maleico (1 mol) foi dissolvido em éter etílico e sob agitação, a amina (1 mol) foi adicionada aos poucos para a obtenção dos respectivos ácidos maleâmicos, com rendimentos variando entre 85 a 99 %. Este ácido foi então aquecido com uma mistura de anidrido acético e acetato de sódio ou ácido glacial e vertido sobre água com gelo, precipitando a maleimida correspondente, com rendimento entre 40-80%. O composto (12) foi obtido a partir do (4) e a adição na dupla ligação imídica foi feita em benzeno conforme descrito anteriormente<sup>21</sup> com rendimento de 35%. A pureza dos compostos foi verificada por cromatografia em camada delgada de alta resolução (sigma), usando diferentes sistemas de eluentes e reveladores.

### 2. Ensaios microbiológicos

2.1 - Os compostos em estudo foram testados nas concentrações de 250 e 125 µg/ml e foram solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO).

2.2 - Os microorganismos ensaiados foram *Candida albicans* LM-3348 (CA), *C. tropicalis* FCF-136 (CT), *Aspergillus flavus* NRRL-3517 (AF), *Penicillium sp.* FCF-281 (PE), *Microsporium canis* LM-702 (MC), *Trichophyton rubrum* LM-45 (TR), *T. mentagrophytes* LM-16 e *Epidermophyton floccosum* LM-27 (EF).

2.3 - Metodologia<sup>22</sup>: Os ensaios foram realizados pela técnica de difusão em meio sólido (d) usando-se agar Sabouraud dextrose. Em placas de Petri esterilizadas, foi colocado 1 ml da suspensão de cada microrganismo preparada em solução fisiológica a 85%. As mesmas foram padronizadas pelo tubo 0,5 da escala de McFarland e ajustadas para 10<sup>6</sup> UFC por leitura espectrofotométrica para 90% T (530nm). Em seguida, foi adicionado 21 ml do meio sólido fundido a 45°C. Após solidificação do meio, foram feitas cavidades com 6 x 8 mm de diâmetro, onde foi depositado 50 µl dos compostos em suas diferentes concentrações. Foi feito

controle com cetoconazol a 100 µg/ml, cujos halos de inibição variaram entre 18 e 23 mm (resultados não mostrados).

Os ensaios foram incubados à temperatura de 37°C durante 24-48 horas para os fungos leveduriformes e à temperatura ambiente (28-30°C) por 10-14 dias para os fungos filamentosos.

### 3. Caracterização dos compostos

*N-Fenilmaleimida* (2): Pf = 86-88°C (Lit<sup>15</sup> = 87-88°C; Rdt = 75%, Rec. com ciclohexano. Análise: Calculado para C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>: C,69.36; H,4.04; N,8.09. Encontrado: C,69.41; H,4.06; N,8.11. <sup>1</sup>H-RMN(CCl<sub>4</sub>,60 MHz) δ: 7,40 (s,5H,Ar), 6,60 (s,2H, CH=CH).

*N-Benzilmaleimida* (3): Pf = 69-71°C (Lit<sup>23</sup> = 70-72 °C; Rdt = 42%; Rec. com EtOH. Análise: Calculado para C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>: C, 70.58; H,4.81; N,7.48. Encontrado: C,69.85; H,4.86; N,7.31. <sup>1</sup>H-RMN(CDCl<sub>3</sub>,60 MHz) δ: 7,60 (m,5H,Ar), 6,95 (s,2H,CH=CH), 4,85 (s,2H,CH<sub>2</sub>).

*N-Fenetilmaleimida* (4): Pf = 109-110 °C (Lit<sup>23</sup> = 111°C; Rdt = 60%; Rec. com EtOH. Análise: Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>: C,71.64; H,5.47; N,6.96. Encontrado: C,70.94; H,6.00; N,6.70. <sup>1</sup>H-RMN(CDCl<sub>3</sub>,60 MHz) δ: 7,30 (s,5H,Ar), 6,35 (s,2H,CH=CH), 3,60 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 2,80 (t,2H,CH<sub>2</sub>).

*N-Fenilpropilmaleimida* (5): Pf = 80-81°C; Rdt = 40%; Rec. com EtOH; Análise: Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: C,72.55; H,6.04; N,6.50. Encontrado: C,71.95; H,6.14; N,6.13. <sup>1</sup>H-RMN(CCl<sub>4</sub>,60 MHz) δ: 7,40 (s,5H,Ar), 6,90 (s,2H,CH=CH), 3,60 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 2,70 (s,2H,CH<sub>2</sub>), 2,00 (m,2H,CH<sub>2</sub>).

*N-Fenilbutilmaleimida* (6): Pf = 63-64°C; Rdt = 55%; Rec. com EtOH; Análise: Calculado para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>: C,73.36; H,6.55; N,6.10. Encontrado: C,72.66; H,6.67; N,5.98. <sup>1</sup>H-RMN(CCl<sub>4</sub>,60 MHz) δ: 7,20 (s,5H,Ar), 6,65 (s,2H,CH=CH), 3,50 (t,2H, CH<sub>2</sub>), 2,55 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 1,50 (m,4H,2 x CH<sub>2</sub>).

*N-(4-metoxi)benzilmaleimida* (7): Pf = 89°C; Rdt = 53%; Rec. com EtOH; Análise: Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>: C,66.35; H,5.07; N,6.45. Encontrado: C,65.95; H,4.55; N,6.50. <sup>1</sup>H-RMN(CCl<sub>4</sub>,60MHz) δ: 7,60-7,10 (m,4H,Ar), 6,85 (s,2H, CH=CH), 4,70 (s,2H,CH<sub>2</sub>), 3,88 (s,3H,OCH<sub>3</sub>).

*N-(3,4-dicloro)benzilmaleimida* (8): Pf = 98°C; Rdt = 65%; Rec. com EtOH; Análise: Calculado para C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: C,51.56; H,2.73; N,5.46. Encontrado: C,51.35; H,2.56; N,5.51. <sup>1</sup>H-RMN(CCl<sub>4</sub>,60 MHz) δ: 7,50-7,25 (m,3H,Ar), 6,75 (s,2H, CH=CH), 4,60 (s,2H,CH<sub>2</sub>).

*N-(4-cloro)benzilmaleimida* (9): Pf = 64°C; Rdt = 55%; Rec. com EtOH; Análise: Calculado para C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>Cl : C,59.59; H,3.61; N,6.32. Encontrado: C,59.63; H,3.62; N,6.35. <sup>1</sup>H-RMN(CCl<sub>4</sub>,60 MHz) δ: 7,60 (s,4H,Ar), 6,93 (s,2H,CH=CH), 4,80 (s,2H,CH<sub>2</sub>).

*N*-(4-metil)fenetilmaleimida (10): Pf = 84°C; Rdt = 40%; purificado por cromatografia em coluna (hexano/acetato de etila 2:1); **Análise**: Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>: C,72.55; H,6.04; N,6.51. Encontrado: C,72.95; H,6.16; N,6.18. <sup>1</sup>H-RMN(CDCI<sub>3</sub>,60 MHz) δ: 7,15 (s,4H,Ar), 6,65 (s,2H,CH=CH), 3,65 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 2,80 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 2,28 (s,3H,CH<sub>3</sub>).

*N*-(4-cloro)fenetilmaleimida (11): Pf = 68°C; Rdt = 50%; Rec. com EtOH; **Análise**: Calculado para C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>2</sub>Cl: C,61.14; H,4.24; N,5.94. Encontrado: C,61.54; H,4.29; N,6.01. <sup>1</sup>H-RMN(CDCI<sub>3</sub>,60 MHz) δ: 7,45 (s,4H,Ar), 6,85 (s,2H,CH=CH), 3,80 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 3,00 (t,2H,CH<sub>2</sub>).

2-Morfolino-*N*-fenetilsuccinimida (12): Pf = 90-91°C; Rdt = 35% a partir de (3); Rec. com EtOH; **Análise**: Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C,66.60; H,6.94; N,9.72. Encontrado: C,65.95; H,7.09; N,9.47. <sup>1</sup>H-RMN(CDCI<sub>3</sub>,60 MHz) δ: 7,55-7,40 (m,5H, Ar), 4,10 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 3,95 (dd,1H,CH), 3,80-3,70 (m,CH<sub>2</sub>), 3,30 (t,2H,CH<sub>2</sub>), 3,00-2,50 (m,CH<sub>2</sub>), 1,20 (t,2H,CH<sub>2</sub>).

## NOTA

Exceto o composto (12), o Rdt para os compostos foi calculado a partir dos respectivos ácidos maleâmicos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Ana Elisa O. Floriani, pelo auxílio na preparação do manuscrito, ao Prof. Rogério Corrêa pelas sugestões na parte experimental e ao CNPq, CAPES, UFSC, UFPB e UNIVALI pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Bier, O.; *Microbiologia e Imunologia*; Melhoramentos; São Paulo, 1985; p 175-185.
2. Cremllyn, R. J.; *Int. Pest Control* **1963**, 10.
3. Hamburger, M.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1991**, 30, 3864.
4. Grayer, R. J.; Harborne, J. B.; *Phytochemistry* **1994**, 37, 19.

5. Hargreaves, M. K.; Pritchard, J. G.; Dave, H. R.; *Chem. Rev.* **1970**, 70, 439.
6. Marrian, D. H.; Friedman, E.; Ward, J. L.; *Biochem. Journal* **1953**, 54, 65.
7. Igarashi, Y.; Keisuki, Y.; Shogi, W.; *Nippon Kagaku Kaishi* **1990**, 3, 299.
8. Nunes, R. J.; *The Chemistry and Biological Activity of Cyclic Imidobenzenesulphonyl Derivatives*. PhD Thesis. The Hatfield Polytechnic, England; 1986, p 203-212.
9. Tempesta, M. S.; Corley, D. G.; Beutler, J. A.; Metral, C. J.; Yunes, R. A.; Giacomozzi, C. A.; Calixto, J. B.; *J. Nat. Prod.* **1988**, 3, 617.
10. Cechinel Filho, V.; Pinheiro, T.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Cruz, A. B.; Moretto, E.; *Il Farmaco* **1994**, 49, 675.
11. Cechinel Filho V.; Cruz, A. B.; Nunes, R. J.; Corrêa, R.; Gonzaga, L.; Moretto, E.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Rev. Latinoamer. de Quím.* **1994**, 23, 116.
12. Cechinel Filho, V.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Pharm. Sci.* **1995**, 1, 399.
13. Cechinel Filho, V.; Vaz, Z. R.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Pharm. Sci.* **1996**, 2, 1.
14. Cremllyn, R.; Swinbourne, F.; Nunes, R. J.; *Phosphorus and Sulfur* **1987**, 3, 65.
15. Cava, M. P.; Deana, A. A.; Muth, K.; Mitchell, M. J.; *Organic Synth. Coll.* **1973**, 5, 944.
16. Fujiname, A.; Ozaki, T.; Nodera, K.; Tanaka, K.; *Agr. Biol. Chem.* **1972**, 36, 318.
17. Cremllyn, R.; Nunes, R. J.; *Phosphorus and Sulfur* **1987**, 31, 245.
18. Cremllyn, R.; *Pesticides: Preparation and Mode of Action*, John Wiley & Sons, Chichester; 1978.
19. Torgenson, D. C.; Hensley, W. H.; Lambrech, J. A.; *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **1963**, 22, 67.
20. Cechinel Filho, V.; Calixto, J. B.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; *5<sup>th</sup> Brazilian Meeting on Organic Synthesis*, Campinas - SP, 1992, PS-075.
21. Sharpless, N. E.; Falvin, M.; *Biochemistry* **1966**, 5, 2963.
22. McGinnis, M. R.; *Laboratory Handbook of Medical Micrology*, Academic Press, 1980; p 411- 416.
23. Lukes, R.; Pergal, M.; *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1962**, 27, 1387.