



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102017015184-0 A2



(22) Data do Depósito: 14/07/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 29/01/2019

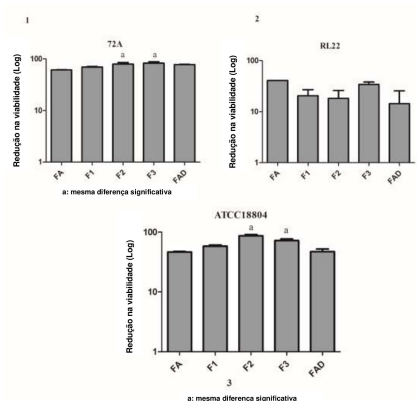
(54) **Título:** SELENOCIANATO ALÍLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS DO MESMO E COMPOSIÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL

(51) **Int. Cl.:** C07C 391/00; A61K 31/26; A61P 31/10; A61P 1/02.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.

(72) **Inventor(es):** SAULO FERNANDES DE ANDRADE; BRUNA GERARDON BATISTA; ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA; GUSTAVO POZZA SILVEIRA; ANTONIO LUIZ BRAGA; RÔMULO FARIA SANTOS CANTO; FLAVIO AUGUSTO ROCHA BARBOSA; MISAEL FERREIRA; THEO VARELLA COSTA RUSSO; MARCUS CESAR MANDOLESÍ SÁ.

(57) **Resumo:** A presente invenção descreve selenocianatos alílicos derivados de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos, assim como seu processo de obtenção. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana, mais especificamente sobre células fúngicas leveduriformes e filamentosas. Também é descrito o uso destes compostos em formulações de enxaguatórios bucais. A presente invenção se situa nos campos da química medicinal, química de compostos organocalcogênio, mais especificamente da química de compostos orgânicos contendo selênio.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

SELENOCIANATO ALÍLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS DO MESMO E COMPOSIÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve novos selenocianatos alílicos derivados de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos (reagentes oriundos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman), assim como seu processo de obtenção. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana, mais especificamente sobre células fúngicas leveduriformes e filamentosas. Também é descrito o uso destes compostos em formulações de enxaguatórios bucais. A presente invenção se situa nos campos da química medicinal, química de compostos organocalcogênio, mais especificamente da química de compostos orgânicos contendo selênio.

Antecedentes da Invenção

[0002] A constante evolução da resistência fúngica e bacteriana, podendo ser intrínseca ou adquirida, frente a vários fármacos antimicrobianos, é considerada atualmente um dos principais problemas de saúde pública (Srinivasan *et al.*, 2014). As espécies fúngicas relacionadas com micoses superficiais e invasivas há pouco tempo eram facilmente controladas pelos poucos fármacos antifúngicos disponíveis, sem a necessidade de avaliar o perfil de susceptibilidade desses isolados. Entretanto, em cerca de duas décadas, um novo panorama tornou-se evidenciado, com espécies até então consideradas não patogênicas infectando tecidos e órgãos até então não susceptíveis, associado à necessidade de doses terapêuticas maiores e por tempo mais prolongado. As consequências desse perfil são os relatos crescentes de patógenos multirresistentes, algumas vezes insensíveis às terapêuticas antimicrobianas disponíveis (Antinori *et al.*, 2016). Em vista disso, a necessidade de implementação de novos fármacos capazes de controlar

esses patógenos emergentes tornou-se urgente, seja para uso farmacológico ou como um antisséptico de controle de ambientes (Kacem *et al.*, 2016).

[0003] As infecções nos tecidos da cavidade oral devido ao uso contínuo de próteses removíveis, conhecidas como estomatite protética, são geralmente associadas ao gênero *Candida* (Pellizzaro *et al.* 2012). A inflamação ocorre na mucosa do palato em contato com a superfície da prótese e varia de irritação petequiral a irritação generalizada com hiperplasia papilar (Millsap *et al.* 1999; Hahnel *et al.* 2012; Pellizzaro *et al.* 2012). As causas que podem contribuir para o desenvolvimento destas doenças são distúrbios sistêmicos e falta de higiene bucal. Além disso, próteses com superfície hidrofóbica e rugosa podem contribuir para o desenvolvimento de microrganismos, resultando na formação de biofilme (Budtz- Jorgensen *et al.* 1978; Tylenda *et al.* 1989; Paranhos *et al.* 1991; Raab *et al.* 1991; Kulak *et al.* 1994; Wilson *et al.* 1998; Lewis *et al.* 2001; Lazarin *et al.* 2012).

[0004] Considerando que a prótese está em contato direto com a mucosa bucal e seus microrganismos naturais, o biofilme formado em sua superfície apresenta complexidade e variedade microbiana semelhante à mucosa subjacente (Brusca *et al.* 2013). Embora o gênero *Candida*, especialmente *C. albicans*, seja predominante e mais patogênico, outras espécies como *C. tropicalis* e *C. glabrata* também podem ser encontradas nestes biofilmes (West *et al.* 2004; He *et al.* 2006; de Freitas Fernandes *et al.* 2011; Gomes *et al.* 2011).

[0005] Candidíase é uma preocupação clínica bem conhecida no ambiente médico-dental. Observa-se uma associação de candidíase a pacientes que recebem prótese total (estomatite protética). Pode ocorrer infecção na cavidade oral, justificando o uso de antimicrobianos químicos para controlar rápido crescimento microbiano. Classes de fármaco de antimicrobianos, tais como polienos e azóis são comumente usados para tratar *Candida* spp. Porém, a resistência a estes tratamentos surge em longo prazo

ou em tratamentos profiláticos de pacientes imunossuprimidos (Goldman, 2004; Wingeter *et al.* 2007).

[0006] Agentes antifúngicos de uso tópico e sistêmico são geralmente usados no tratamento de estomatite. Porém, o tratamento de estomatite protética é mais complexo (Dhir *et al.* 2007), considerando o desenvolvimento de resistência, especialmente do *C. albicans*, aos antifúngicos azóis. Este fenômeno também pode levar seleção de outros microrganismos, favorecendo a ocorrência de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*. Conseqüentemente, é necessário identificar novos compostos que apresentam propriedades antibiofilmes, capazes de inibir a formação de biofilme na superfície da prótese.

[0007] Parte dos inventores vem no último triênio prospectando atividade antifúngica de amplo espectro em diferentes classes de moléculas inéditas, sempre com o intuito de identificar alternativas mais ativas e menos tóxicas que as classes atualmente disponíveis na clínica médica (Ribas *et al.*, 2016; Dalla Lana *et al.*, 2015; Casanova *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2015).

[0008] Por sua vez, derivados alílicos de (*Z*)-2-(bromometil)alcenoatos, reagentes oriundos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (Basavaiah *et al.*, 2010, Ferreira *et al.*, 2009), têm apresentado expressiva atividade biológica como agentes antitumorais e antimicrobianos (Cisilotto *et al.*, 2015; Sá *et al.*, 2014). Particular atenção vem sendo dada aos derivados alílicos sulfurados, incluindo tiocianatos alílicos com atividade antimicobacteriana (Silveira *et al.*, 2012), os quais são preparados a partir da reação entre (*Z*)-2-(bromometil)alcenoatos e NaSCN como nucleófilo (Sá *et al.*, 2008). De maneira correlata aos compostos derivados de enxofre, diversos análogos contendo selênio vêm sendo estudados devido às suas propriedades biológicas (Nogueira *et al.*, 2004). A literatura especializada descreve a síntese de selenocianatos alílicos não substituídos ou com substituintes alquila a partir de cianoselenação eletrofílica de silanos alílicos com $\text{KSeCN} \cdot 2\text{CuBr}_2$ (Guram *et*

al., 1993) ou ainda a utilização de selenocianato como nucleófilo frente a halogenetos de alila (Riague *et al.*, 2002).

[0009] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0010] Um problema constante do estado da técnica é a resistência de microrganismos aos agentes antimicrobianos atualmente utilizados. Deste modo, se faz necessário o desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana.

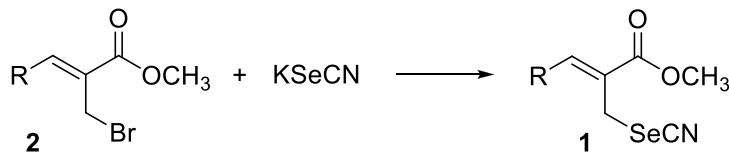
Sumário da Invenção

[0011] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de novos selenocianatos alílicos (Fórmula 1) com potencial aplicação farmacológica como agentes antifúngicos, seu processo para a obtenção, e adicionalmente, composição de enxaguatório bucal compreendendo estes novos compostos, com atividade antibiofilme.

[0012] A preparação de selenocianatos alílicos derivados de (*Z*)-2-(bromometil)alcenoatos ainda não foi descrita na literatura. Os selenocianatos alílicos descritos nesta invenção apresentam elevada potência e seletiva ação antifúngica.

[0013] Antifúngicos são conhecidos como agentes capazes de inibir o crescimento de fungos ou até mesmo matá-los, dependendo do seu mecanismo de ação frente à exposição do microrganismo a essas substâncias. Os antifúngicos podem ter aplicação farmacológica (de uso sistêmico ou tópico), aplicação sanitária (desinfetante de superfícies, conservante na indústria alimentícia) ou aplicação agrônômica (fungicidas agrícolas). O espectro de ação exibido pelos selenocianatos alílicos permite uma ampla utilização, em todo o segmento de aplicabilidade de um agente antifúngico.

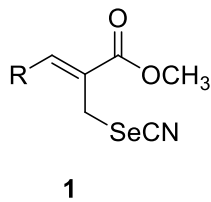
[0014] O processo para a obtenção dos compostos da Fórmula 1 consiste na reação entre brometos alílicos (Fórmula 2) e selenocianato de potássio.



[0015] Os selenocianatos alílicos obtidos através do processo descrito apresentam atividade frente a diversas espécies de fungos, relacionados a processos patogênicos superficiais e invasivos, e como contaminantes de alimentos processados e *in natura*, com eficácia equivalente aos principais fármacos e conservantes atualmente disponíveis para uso. As concentrações mínimas capazes de inibir as espécies fúngicas testadas foram extremamente baixas, alcançando concentrações próximas a nanograma por microlitro.

[0016] Foi identificada a atividade dos selenocianatos alílicos contra *Candida* sp, e foram desenvolvidas formulações de enxaguatórios bucais antibiofilme compreendendo selenocianatos alílicos como princípio ativo.

[0017] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta selenocianato alílico apresentando a Fórmula geral 1:



onde o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila,

onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado, e

(C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila,

heteroariloxi, hidroxí, nítro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, $S(O)_mR_a$, $S(O)_mNR_bR_c$, NR_bR_c , $C(=O)NR_bR_c$, $C(=O)R_a$,

onde m é 1 ou 2, e

R_a , R_b , e R_c são, independentemente: H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila.

[0018] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de selenocianato alílico, compreendendo a reação de:

- selenocianato de potássio e brometo alílico em uma proporção na faixa de 1:0 a 2:0; e

- solvente orgânico, selecionado do grupo que consiste em: tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, acetona ou uma mistura destes com água em qualquer proporção;

em que a temperatura é na faixa entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; e

em que o tempo de reação é na faixa entre 5 e 60 minutos.

[0019] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso dos selenocianatos alílicos no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por microrganismos.

[0020] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição de enxaguatório bucal, compreendendo:

- princípio ativo que consiste em selenocianato alílico;

- veículo farmacêuticamente aceitável.

[0021] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados são as novas moléculas, os selenocianatos alílicos¹, sendo descrito sua obtenção, atividade e seus usos.

[0022] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0023] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as presentes figuras:

[0024] A Figura 1 mostra a atividade antibiofilme de *C. tropicalis* 72A, *C. glabrata* RL22 e *C. albicans* ATCC18804 com base no dano de **1e**, **1f** e **1g** (F1, F2 e F3) contendo: princípio ativo (0,015% de **1e**, **1f** e **1g** dissolvida em DMSO), aromatizante (0,3% de essência hidroetanólica de hortelã-pimenta - Delaware, Porto Alegre, Brasil), edulcorante (0,05% de sacarina sódica - Dinâmica, São Paulo, Brasil), corretor de pH (0,05% de ácido láctico - Dinâmica, São Paulo, Brasil), agente conservante (0,1% desorbato de potássio - Dinâmica, São Paulo, Brasil) e água (*quantité suffisante pour* - qsp para 100 mL) e formulação com os adjuvantes e DMSO (2%) (FAD) em comparação com o controle caracterizado por uma formulação apenas com os adjuvantes (FA). Valores significativamente diferentes foram detectados por ANOVA de um fator, seguido pelo teste Tukey. ^ap<0,05 em comparação com o controle.

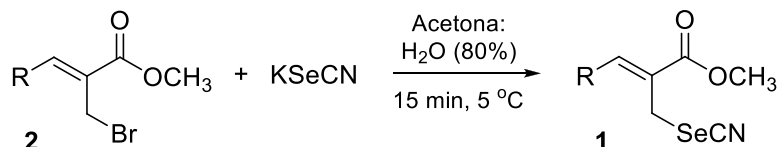
[0025] A Figura 2 mostra a atividade antibiofilme de *C. tropicalis* 72A, *C. glabrata* RL22 e *C. albicans* ATCC18804 com base no dano de três formulações de selenocinatos alílicos **1e**, **1f** e **1g** (F1*, F2*, F3*) quando todas as formulações (F1*, F2* e F3*) foram preparadas com os mesmos componentes, porém sem sorbato de potássio e formulação com os adjuvantes e DMSO (2%) (FAD*) em comparação com o controle (FA*). Valores significativamente diferentes foram detectados por ANOVA de um fator, seguido por teste Tukey. ^ap<0,05 em comparação com o controle.

[0026] A Figura 3 mostra a atividade antibiofilme de *C. tropicalis* 72A e *C. albicans* ATCC18804 com base no dano de F2, F3 e F3* em comparação com Listerine®.

[0027] A Figura 4 mostra a relação dose-resposta para os selenocinatos alílicos na concentração de 50 µg/mL **1a** (*), **1b** (●), **1c** (▲), **1d** (o), **1e** (+), **1f** (-), **1g** (x), 0,9% NaCl (controle negativo, ◆) e 0,1M NaOH (controle positivo, ■). Cada ponto representa um experimento com N de três ovos. As concentrações foram transformadas logaritmicamente: -1,4 a 3,0.

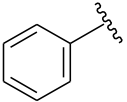
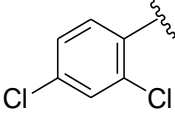
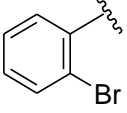
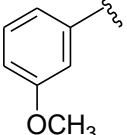
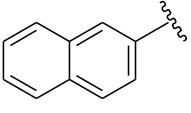
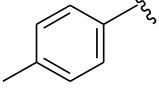
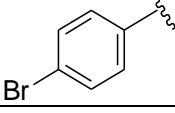
Descrição Detalhada da Invenção

[0028] A presente invenção apresenta um processo para a preparação de novos selenocianatos alílicos (Fórmula 1) através da reação entre (Z)-2-(bromometil)alcenoatos (reagentes oriundos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman - Fórmula 2) e selenocianato de potássio.



[0029] No composto da fórmula 2 R pode ser H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila, onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado e (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila, heteroariloxi, hidroxí, nitro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, onde m é 1 ou 2, e R_a, R_b e R_c são, independentemente, H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila. Mais especificamente, sem limitar o escopo, R pode ser arila ou arila substituída.

Tabela 1. Exemplos de preparação de selenocianatos alílicos

Entrada	Exemplo	R	Rendimento (%)
1	1a		93
2	1b		89
3	1c		78
4	1d		70
5	1e		90
6	1f		83
7	1g		82

[0030] A quantidade de selenocianato de potássio utilizada na reação pode variar, sem implicar qualquer limitação, entre 1,0 e 2,0 equivalentes. Preferencialmente são utilizados 1,2 equivalentes do composto de Fórmula KSeCN. O solvente utilizado para conduzir o processo pode ser, sem implicar qualquer limitação, um solvente orgânico como tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido ou etanol. Preferencialmente o processo é conduzido em acetona aquosa (80%). A temperatura utilizada para conduzir o processo pode variar, sem implicar qualquer limitação, entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferencialmente a reação é conduzida a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O tempo reacional pode variar entre 5 e 60 minutos, preferencialmente o processo é conduzido durante 15 minutos. Após a reação se completar, a mistura reacional é diluída em um solvente orgânico, preferencialmente acetato de etila. A solução orgânica é

lavada com água, seca e evaporada. O resíduo obtido desta maneira é purificado através de uma técnica cromatográfica se necessário, preferencialmente através de cromatografia em coluna de sílica gel.

[0031] Em um procedimento típico, o brometo alílico é solubilizado em acetona aquosa e resfriado a 5 °C, então o selenocianato de potássio é adicionado e a mistura reacional é agitada por 15 minutos nesta temperatura. Ao final a reação é diluída com acetato de etila e a fase orgânica resultante é lavada com água, seca e evaporada. O resíduo é purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel.

[0032] Conforme demonstrado na Tabela 1, a presente invenção apresenta um bom escopo e grande tolerância em relação a grupos funcionais. A Tabela 1 indica rendimentos superiores para os substratos substituídos nas posições *para* em relação às demais posições do anel aromático, com uma boa tolerabilidade em relação a grupos funcionais. Bons rendimentos são obtidos na maioria dos exemplos apresentados.

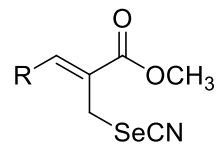
[0033] Foram desenvolvidas formulações de enxaguatórios bucais, utilizando como princípio ativo as moléculas da presente invenção. Os selenocianatos alílicos **1e**, **1f** e **1g** mostraram uma expressiva atividade antibiofilme contra *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, de acordo com o método de cristal violeta (150 µg/mL, Tabela 6), permitindo o desenvolvimento das formulações de enxaguatório bucal, compreendendo 150 µg/mL (0,015%) destes compostos como princípio.

[0034] Foi realizado o teste de HET-CAM para verificação do potencial alérgico dos compostos. O teste mostrou potencial alérgico para as moléculas 1a (score de 9,71) e 1b (score de 7,63) as demais moléculas não demonstraram irritação de acordo com a metodologia utilizada. A Figura 4 demonstra os resultados, onde o score de irritação é determinado como não irritante resultados de 0–4,9 e irritante os resultados com valores de 5,0–21.

[0035] De acordo com este ensaio, **1e**, **1f** e **1g** não são irritantes em mucosa embrionária.

[0036] O exagatório bucal Listerine® apresenta capacidade de reduzir a viabilidade do biofilme fúngico de *Candida* spp (Meiller *et al.* 2001; Nogueira Filho, 2005; Lamfon *et al.*, 2004), porém resultados obtidos para formulação **1e** (F1), **1f** (F2) e **1g** acrescida de sorbato de potássio na formulação (F3*) são relacionados aos resultados apresentados pelo Listerine® (Figura 3). É observado que a concentração dos selenocianatos alílicos nas formulações desenvolvidas na presente invenção é menor (0,015%) do que as concentrações dos princípios ativos de Listerine® (princípios ativos: eucaliptol (0,092% v/v), timol (0,064% v/v), Salicilato de metila (0,060% v/v), mentol (0,042% v/v) e etanol (26,9% v/v) (Ramage *et al.* 2011; Ful *et al.* 2014), sendo necessários cinco princípios ativos para preparar Listerine®, enquanto as formulações obtidas necessitam somente de um princípio ativo, demonstrando melhoria no processo de produção em relação ao produto comumente utilizado, proporcionando um processo de menor custo.

[0037] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta selenocianato alílico apresentando a Fórmula geral 1:



1

onde o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila,

onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado, e

(C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila, heteroariloxi, hidroxí, nitro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-

C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, $S(O)_mR_a$, $S(O)_mNR_bR_c$, NR_bR_c , $C(=O)NR_bR_c$, $C(=O)R_a$,

onde m é 1 ou 2, e

R_a , R_b , e R_c são, independentemente: H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila.

[0038] Em uma concretização, o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: fenila, 2,4-diclorofenila, 2-bromofenila, 3-metoxifenila, naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

[0039] Em uma concretização, o substituinte R do selenocianato alílico é um selecionado do grupo que consiste em: naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

[0040] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de selenocianato alílico, compreendendo a reação de:

- selenocianato de potássio e brometo alílico em uma proporção na faixa de 1:0 a 2:0; e

- solvente orgânico, selecionado do grupo que consiste em: tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, acetona ou uma mistura destes com água, em qualquer proporção;

em que a temperatura é na faixa entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; e

em que o tempo de reação é na faixa entre 5 e 60 minutos.

[0041] Em uma concretização, o processo de obtenção de selenocianato alílico, compreende:

- selenocianato de potássio e brometo alílico na proporção de 1,2:1;

- acetona aquosa (80%);

em que a temperatura de reação é de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$; e

em que o tempo de reação é de 15 minutos.

[0042] Em uma concretização, o processo de obtenção de selenocianato alílico compreende as etapas de:

i. solubilizar o brometo alílico precursor em acetona (80%);

ii. manter temperatura do meio reacional em $5\text{ }^{\circ}\text{C}$;

- iii. adicionar selenocianato de potássio ao produto obtido na etapa i, na proporção selenocianato de potássio:brometo alílico de 1,2:1;
- iv. adicionar água ao produto obtido na etapa iii;
- v. agitar o produto obtido na etapa iv por 15 minutos;
- vi. adicionar acetato de etila ao produto obtido na etapa v;
- vii. lavar fase orgânica formada na etapa vi com água e salmoura;
- viii. secar produto obtido na etapa vii com $MgSO_4$ anidro; e
- ix. evaporar fase orgânica obtida na etapa viii;

[0043] Em uma concretização, o processo de obtenção de selenocianato alílico compreende uma etapa adicional de purificação do selenocianato alílico obtido na etapa ix por cromatografia em coluna de sílica gel.

[0044] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso dos selenocianatos alílicos no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por microrganismos.

[0045] Em uma concretização, o microrganismo é fungo.

[0046] Em uma concretização, o fungo é do gênero *Fusarium* sp., *Microsporium* sp., *Trichophyton* sp. ou *Candida* sp.

[0047] Em uma concretização, o fungo é *Fusarium petrophilum*, *Fusarium keratoplasticum*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium xysporum*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* ou *Trichophyton rubrum*,

[0048] Em uma concretização, fungo é *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. albicans*.

[0049] Em uma concretização, a doença é estomatite protética.

[0050] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição de enxaguatório bucal, compreendendo:

- princípio ativo que consiste em selenocianato alílico;
- veículo farmacologicamente aceitável.

[0051] Em uma concretização, o veículo farmacêuticamente aceitável compreende:

- pelo menos um aromatizante;
- pelo menos um edulcorante; e
- pelo menos um agente conservante.

[0052] Em uma concretização, a quantidade de:

- princípio ativo é 0,015%v/v;
 - aromatizante é 0,3% v/v;
 - edulcorante é 0,05% v/v; e
- o agente conservante sorbato de potássio é 0,1% v/v.

[0053] Em uma concretização:

- o aromatizante é essência hidroetanólica de hortelã-pimenta;
- o edulcorante é sacarina sódica; e
- o agente conservante é sorbato de potássio.

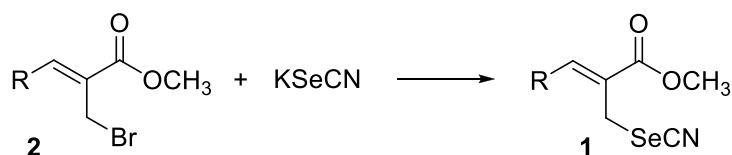
[0054] Em uma concretização, o princípio ativo é dissolvido em DMSO.

Exemplos - Concretizações

[0055] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar o escopo da mesma.

Preparação dos compostos

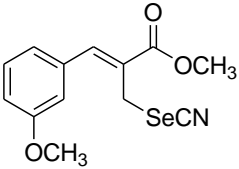
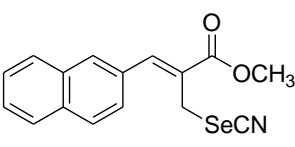
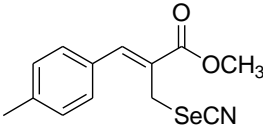
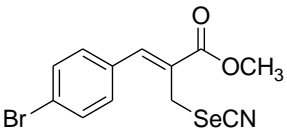
[0056] Em um balão, munido de barra magnética de agitação, é solubilizado o brometo alílico (Fórmula 2) (0,25 mmol) em acetona (3 mL). O meio reacional é resfriado sobre banho de gelo até 5°C. É então adicionado ao meio reacional KSeCN (0,3 mmol) seguido de água (1 mL). A mistura reacional é agitada a 5°C por 15 minutos. Após este período é adicionado acetato de etila ao meio reacional e a fase orgânica formada é lavada com água e salmoura e seca com MgSO₄ anidro. Após filtrar o agente secante, a fase orgânica é evaporada e o resíduo resultante é purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel (se necessário) para obtenção do selenocianato alílico (Fórmula 1).



[0057] Para a identificação dos compostos obtidos (**1a** – **1g**), foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN e ^{13}C RMN), Infravermelho (IV) e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR). São apresentados abaixo os resultados das análises.

Tabela 2. Análises ^1H RMN, ^{13}C RMN, IV e EMAR dos selenocianatos alílicos obtidos

1a		<p>(Z)-3-fenil-2-(selenocianatometil)acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3057, 3027, 2951, 2845, 2148, 1713, 1626, 1436, 1273, 1203, 773, 702. ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,86 (s, 3H); 4,17 (s, 2H); 7,43 (s, 5H); 7,88 (s, 1H). ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3): δ = 25,6; 52,5; 102,4; 127,0; 128,9; 129,2; 129,6; 133,7; 143,0; 166,9. EMAR (APPI) m/z calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] 299,0294; encontrado 299,0291.</p>
1b		<p>(Z)-3-(2,4-diclorofenil)-2-(selenocianatometil)acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3088, 2951, 2845, 2150, 1715, 1630, 1583, 1436, 1287, 763. ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,90 (s, 3H); 3,98 (s, 2H); 7,39 (s, 2H); 7,50 (s, 1H); 7,86 (s, 1H). ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3): δ = 25,4; 53,0; 102,4; 127,7; 130,0; 130,1; 130,8; 131,1; 135,0; 136,2; 138,8; 166,4. EMAR (APPI) m/z calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Se}$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] 366,9509; encontrado 366,9505.</p>
1c		<p>(Z)-3-(2-bromofenil)-2-(selenocianatometil)acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3031, 2923, 2851, 2150, 1677, 1632, 1585, 1438, 1295, 1089, 759. ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,90 (s, 3H); 3,99 (s, 2H); 7,23-7,49 (m, 3H); 7,66 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 7,88 (s, 1H). ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3): δ = 25,5; 52,9; 102,6; 124,0; 127,9; 129,2; 130,0; 130,9; 133,2; 134,5; 142,1; 166,7. EMAR (APPI) m/z calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrNO}_2\text{Se}$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] 376,9395; encontrado 376,9391.</p>

1d		<p>(Z)-3-(3-metoxifenil)2-(selenocianatometil)acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3002, 2953, 2837, 2148, 1713, 1626, 1597, 1577, 1436, 1250, 1154, 789. $^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,85 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 4,20 (s, 2H); 6,94-7,02 (m, 3H); 7,27-7,39 (m, 1H); 7,87 (s, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 25,8; 52,8; 55,5; 102,5; 114,4; 115,7; 121,6; 127,3; 130,2; 135,2; 143,3; 160,0; 167,0. EMAR (APPI) m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{Se}$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] 329,0399; encontrado 329,0403.</p>
1e		<p>(Z)-3-(naftalen-2-il)-2-(selenocianatometil)acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3002, 2925, 2853, 2142, 1707, 1617, 1589, 1434, 1254, 1152, 814, 755. $^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,88 (s, 3H); 4,25 (s, 2H); 7,46-7,55 (m, 3H); 7,81-8,01 (m, 5H). $^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 26,0; 52,8; 102,8; 126,1; 127,0; 127,2; 127,5; 127,6; 127,8; 128,8; 129,5; 131,3; 133,2; 133,6; 143,2; 167,2. EMAR (APPI) m/z calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{Se}$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] 349,0450; encontrado 349,0450.</p>
1f		<p>(Z)-2-(selenocianatometil)-3-(4-tolil)acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3027, 2951, 2856, 2148, 1711, 1626, 1609, 1436, 1273, 1203, 812, 763. $^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 2,39 (s, 3H); 3,87 (s, 2H); 4,22 (s, 2H); 7,27 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,86 (s, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 21,5; 26,0; 52,7; 102,6; 126,1; 129,5; 129,8; 131,1; 140,3; 143,4; 167,2. EMAR (APPI) m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{Se}$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] 313,04502; encontrado 313,04496.</p>
1g		<p>(Z)-3-(4-bromofenil)-2-(selenocianatometil)acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3064, 3033, 2925, 2853, 2156, 1709, 1626, 1583, 1487, 1273, 1197, 808. $^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 3,88 (s, 3H); 4,14 (s, 2H); 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,82 (s, 1H). $^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 25,5; 52,9; 102,3; 124,2; 127,9; 130,8; 132,4; 132,8; 141,9; 166,8.</p>

Exemplo II – Espectro de ação dos selenocianatos

[0058] As tabelas abaixo apresentam o espectro de ação dos selenocianatos alílicos frente a espécies patogênicas de fungos, detalhando brevemente suas concentrações inibitórias mínimas (em $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtidas conforme metodologia padrão do protocolo de referência em relação aos testes de suscetibilidade (microdiluição em caldo), para fungos filamentosos e

leveduriformes - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M38-A2, 2008; CLSI M27-S4, 2012). O espectro de ação mostra um alcance não somente de fungos superficiais (espécies de dermatófitos), mas também de micoses invasivas e de alta morbidade (espécies de *Candida* e de *Fusarium*), além de espécies relacionadas com contaminações fúngicas de alimentos.

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade de isolados de *Fusarium* aos selenocianatos alílicos.

ISOLADO	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
<i>Gibberella fujikuroi</i>	32	32	64	32	32	32	16
<i>Fusarium solani</i> *	16	16	64	16	4	32	32
<i>Fusarium solani</i> *	16	16	32	8	4	16	16
<i>Fusarium oxysporum</i>	8	8	32	32	4	8	32
<i>Fusarium petrophilum</i>	8	4	64	32	4	8	8
<i>Fusarium keratoplasticum</i> *	8	8	32	4	4	8	16
<i>Fusarium falciforme</i>	32	8	32	32	8	32	32
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	32	16	64	32	8	32	64
<i>Fusarium oxysporum</i> *	8	4	64	8	4	16	16
<i>Fusarium petrophilum</i>	8	8	64	32	8	16	64
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	16	8	32	16	16	16	64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> *	16	16	64	32	8	16	64
<i>Fusarium solani</i> *	16	8	25	25	8	25	16
<i>Fusarium falciforme</i> *	8	4	64	64	4	16	16
<i>Fusarium solani</i> *	8	4	64	32	4	8	64
<i>Fusarium oxysporum</i>	8	4	25	25	4	8	16

*isolado multirresistente

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade de isolados de *Candida* aos selenocianatos alílicos.

ISOLADO	1a	1b	1e	1f
<i>Candida albicans</i> (CA ATCC 18804)	<50	<50	<50	<50
<i>Candida krusei</i> (CK 02)	<50	<50	<50	<50
<i>Candida glabrata</i> (CG 09)	<50	<50	<50	<50
<i>Candida tropicalis</i> (CT 72A)*	<50	<50	<50	<50

*isolado multirresistente

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade de isolados de dermatófitos aos selenocianatos alílicos.

ISOLADO	1a	1b	1e	1f
<i>Microsporum canis</i> (MCA 01)	<50	<50	<50	<50
<i>Microsporum gypseum</i> (MGY 42)	<50	<50	<50	<50
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (TME 16)*	<50	<50	<50	<50
<i>Trichophyton rubrum</i> (TRU 50)	<50	<50	<50	<50

*isolado multirresistente

Atividade antibiofilme

[0059] A atividade antibiofilme dos selenocianatos alílicos foi avaliada através do ensaio de cristal violeta, utilizando microplacas de 96 poços. As formulações de enxaguatório bucal foram quantificadas pela amostra de resina acrílica (\log CFU cm^2) e os espécimes artificialmente contaminados foram determinados pelo ensaio em placa de 24 poços. A concentração de selenocianatos alílicos necessária para inibir completamente os biofilmes de *Candida* sp. (atividade antibiofilme) foi determinada através de ensaio de cristal violeta, como sendo 150 $\mu\text{g/mL}$. Esta concentração foi utilizada para preparar formulações de enxaguatório bucal apresentando atividade antibiofilme sobre a superfície da resina acrílica. Além disso, o teste MTT foi utilizado para verificar e comparar a atividade antibiofilme do enxaguatório bucal desenvolvido de acordo com a presente invenção com a formulação de enxaguatório bucal comercialmente disponível, Listerine[®].

[0060] Três isolados clínicos de *C. tropicalis* (72A), *C. glabrata* (RL22), e uma cepa de *C. albicans* comercial (ATCC18804), foram usados neste teste. O isolado 72A é resistente ao Fluconazol (Cristália[®], Porto Alegre, Brazil), Anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Voriconazol (Sigma), e Anidulafungina (Pfizer[®]). Os isolados da mucosa oral ou de candidíase utilizados neste estudo foram identificados pelo cartão de identificação de levedura Vitek[®].

[0061] Foram preparadas três formulações de selenocianatos alílicos **1e**, **1f** e **1g** (F1, F2 e F3) contendo: princípio ativo (0,015% de **1e**, **1f** e **1g** dissolvida

em DMSO), aromatizante (0,3% de essência hidroetanólica de hortelã-pimenta - Delaware, Porto Alegre, Brasil), edulcorante (0,05% de sacarina sódica - Dinâmica, São Paulo, Brasil), corretor de pH (0,05% de ácido láctico - Dinâmica, São Paulo, Brasil), agente conservante (0,1% desorbato de potássio - Dinâmica, São Paulo, Brasil) e água (*quantité suffisante pour* - qsp para 100 mL). Todas as formulações (F1*, F2* e F3*) foram preparadas com os mesmos componentes, porém sem sorbato de potássio. Além disso, preparou-se uma formulação apenas com os adjuvantes (FA) na mesma proporção descrita para F, e outra com os adjuvantes sem sorbato de potássio (FA*). Finalmente, preparou-se uma formulação com os adjuvantes e DMSO (2%) (FAD), e outra formulação com DMSO (2%) sem sorbato de potássio (FAD*) (Tabela 6). Listerine® foi utilizado como controle positivo (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil, lote 0895B24). Ingredientes ativos: eucaliptol (0,092% v/v), timol (0,064% v/v), salicilato de metila (0,060% v/v), mentol (0,042% v/v) e etanol (26,9% v/v). Ingredientes inativos: água, álcool (21,6%), solução de sorbitol, aromatizante, poloxamer 407, ácido benzóico, sacarina sódica e benzoato de sódio.

Tabela 6. Componentes e suas proporções em formulações de enxaguatório bucal.

Formulação	F1-F3	(F1-F3)*	FA	FA*	FAD	FAD*
Sacarina sódica	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sorbato de potássio	0,1	-	0,1	-	0,1	-
Essência de hortelã-pimenta	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ácido láctico	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1e, 1f e 1g	0,015	0,015	-	-	-	-
DMSO	1,5	1,5	-	-	2	2
Água	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.	qsp.

Todos os números são em porcentagem. * Sem sorbato de potássio. FA: formulação com adjuvantes. FAD: formulação com adjuvantes e DMSO.

Ensaio de formação de biofilme

[0062] A identificação da formação de biofilme foi realizada utilizando uma placa de microtitulação de 96 poços em triplicata, com modificações. Os isolados de fungos foram cultivados em ágar Sabouraud durante 24 h a 35 °C. 20 µL de cada solução fúngica contendo 10⁶ UFC/mL foi transferida para placas de microtitulação e suplementada com 180 µL de caldo triptona de soja (TSB). Após incubação durante 48 h a 35 °C adicionou-se água destilada estéril a cada poço para remover as células soltas. Em seguida, distribuiu-se 150 µL de metanol em cada poço e removeu-se o solvente. As placas de microtitulação foram coradas durante 15 minutos com 150 µL de cristal violeta (0,5%), em temperatura ambiente, e depois foram limpas com água. O biofilme adsorvido foi ressuspenso em 150 µL de etanol, e a absorção (A) foi medida após 30 minutos utilizando um espectrofotômetro ($\lambda = 450 \text{ nm}$). A seguinte classificação foi aplicada: um forte produtor de biofilme $> 0,280 \text{ A}$, médio produtor de biofilme $0,170\text{--}0,279 \text{ A}$, fraco produtor de biofilme $0,070\text{--}0,170 \text{ A}$, e não produtor de biofilme $<0,070 \text{ A}$.

[0063] A produção de biofilmes nos poços de microplaca pelos isolados de *C. tropicalis* 72A e *C. glabrata* RL22 foram classificados como médios, fortes ou fracos (para o isolado de 72A) e fortes ou fracos (para o isolado RL22), respectivamente, após 48 h a 35 °C. A cepa *C. albicans* ATCC18804 formou biofilmes fracos no mesmo período e temperatura (Tabela 7- controle).

Ensaio de atividade de biofilme

[0064] Os selenocianatos alílicos **1e**, **1f** e **1g** foram adicionados às microplacas de 96 poços, em diferentes concentrações e deixados durante 48 h a 0–10 °C. Após 48 h, a solução de cada amostra foi removida da microplaca. Em seguida, transferiram-se 20 µL do inóculo recém-preparado a 10⁶ UFC/mL para as microplacas e suplementou-se com 180 µL de TSB. Após incubação durante 48 h a 35 °C, a cultura foi removida com uma pipeta multicanal sem tocar nas paredes. Em seguida, adicionou-se água destilada em cada poço estéril para enxaguar as células soltas. Depois, adicionou-se 150 µL de

metanol, deixando descansar por 20 minutos, inverteu-se, deixou-se secar durante 30 minutos e corou-se com 150 µL de cristal violeta a 0,5% durante 15 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, o excesso de cristal violeta foi retirado com o auxílio de uma pipeta multicanal, sem tocar nas pontas nos poços, e lavado em água corrente até lavar o corante. O corante foi suspenso com 150 µL de etanol e deixado repousar durante 30 minutos. Foi verificada a taxa de adesão do agente fúngico medindo a absorbância através de leituras utilizando um espectrofotômetro ($\lambda = 450 \text{ nm}$) e os resultados foram quantificados.

[0065] Os selenocianatos alílicos **1e** e **1f** inibiram parcialmente o crescimento do biofilme de *C. tropicalis* de médio para fraco e forte para médio a 150 µg/mL, respectivamente (Tabela 7, entradas 1 e 4). Entretanto, o selenocianato **1g** inibiu completamente a formação de biofilme 72A na mesma concentração (Tabela 7, entrada 7).

[0066] Na presença de *Candida glabrata*, o selenocianato **1f** não foi capaz de modificar o perfil fenotípico do biofilme na concentração de 150 µg/mL. Ao mesmo tempo, o selenocianato **1e** causou a diminuição no biofilme RL22 de forte para fraco a 150 µg/mL e o selenocianato **1g** inibiu a formação de biofilme a 150 µg/mL (Tabela 7, entradas 1 e 7).

[0067] Não foram observadas diferenças na formação fraca de biofilme para *C. albicans* na presença do selenocianato alílico **1e** nas concentrações testadas. No entanto, os selenocianatos **1f** e **1g** inibiram completamente sua formação de biofilme a 150 µg/mL (Tabela 7, entradas 4 e 7).

Tabela 7. Inibição do biofilme de *C. tropicalis*, *glabrata*, e *albicans* na presença de três concentrações de selenocinatos **1e**, **1f** e **1g** depois de 48 h a 35 °C.

Cepas composto/controle

<i>Entrada</i>	<i>Composto</i>	<i>Concentração (µg/mL)</i>	<i>C. tropicalis</i> 72 ^a	<i>C. glabrata</i> RL22	<i>C. albicans</i> ATCC18804
1	1e	150	W/M	W/S	W/W
2		75	M/M	M/S	W/W
3		37.5	M/M	M/S	W/W
4	1f	150	M/S	W/W	N/W
5		75	S/S	W/W	W/W
6		37.5	S/S	W/W	W/W
7	1g	150	N/W	N/W	N/W
8		75	W/W	N/W	W/W
9		37.5	W/W	W/W	W/W

S: formação de biofilme forte. M: formação de biofilme média. W: formação de biofilme fraca. NBP: nenhuma formação de biofilme. Controle: biofilme formado sem pré-tratamento com selenocinatos **1e**, **1f** e **1g**.

Ensaio de formação de biofilme e avaliação da atividade antibiofilme em resina acrílica

[0068] Foram preparadas peças de resina acrílica pré-estéreis (1 cm²) para o teste de formação de biofilme. As resinas acrílicas foram mantidas em 9 mL de água peptona com 1 mL de inóculo fúngico (10⁶ CFU/mL) durante 24 h a 32 °C. Em seguida, as resinas foram lavadas com água peptona para remover as células soltas. As resinas foram transferidas para outra garrafa contendo 5 mL de água e sonicadas para libertar as células de biofilme. Finalmente, foi realizada uma diluição (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) e uma alíquota de 20 µL de cada diluição foi plaqueada em ágar Saboraud pelo método da gota. As placas de microtitulação foram incubadas a 32 °C durante 24 h para contar as colônias e os valores de CFU cm² foram determinados em triplicata.

[0069] Foi avaliada a atividade antibiofilme através do uso de resinas acrílicas estéreis (1 cm²), imergindo-as nas formulações F1-F3, F1-F3*, FA,

FA*, FAD, FAD* e Listerine® durante 1 minuto. Em seguida, secaram-se ao ar livre (2 minutos) e imergiram-se em 9 mL de água peptona contendo 1 mL de inóculo (10^6 CFU/mL, 24 h a 32 °C). Após a incubação, as amostras de resina acrílica inoculadas foram lavadas 3 vezes com água peptona para remover células soltas. As amostras lavadas foram sonicadas durante 10 minutos a 5 mL de água peptona para recolher o biofilme para quantificação. Foram realizadas diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e uma alíquota de 20 µL de cada diluição foi plaqueada em ágar Sabouraud pelo método de gota. As placas de microtitulação foram incubadas a 32 °C durante 24 h e as colônias formadas foram contadas em triplicata.

[0070] *C. tropicalis* (72A), *C. glabrata* (RL22) e *C. albicans* (ATCC18804) foram capazes de formar biofilmes (Tabela 8- BF) sobre a superfície das amostras de resina acrílica (CFU cm²). 72A e RL22 produziram biofilmes maiores (5,9) que a cepa ATCC18804 (5,3).

[0071] A atividade antibiofilme da formulação F1, F1*, F3 e F3* foi de 0,0 para *C. tropicalis* (Tabela 8, entradas 1, 2, 5 e 6). Além disso, a atividade antibiofilme apresentada por F1 e F2 foi 4,5, 5,0 para *C. albicans*, respectivamente. Para a formulação F2*, a atividade antibiofilme foi 5,0 e 4,5 para 72A e *C. glabrata*, correspondentemente, assim como 5,2 para *C. albicans*. Entretanto, a atividade antibiofilme de F2* foi 5,0 e 4,5 para 72A e isolados RL22. F3 demonstrou uma atividade antibiofilme de 4,9 e 4,5 para *C. glabrata* e *C. albicans*, respectivamente. F3* mostrou valores de inibição de 4,3 para a cepa ATCC18804. Com relação à inibição do biofilme, os controles FA e FA* apresentaram valores de log (CFU cm²) de 5,1–5,3 e 5,3–5,7, respectivamente (Tabela 8, entradas 7 e 8), enquanto FAD apresentou 5,5–5,7 e FAD* apresentou 5,3–5,5 (Tabela 8, entradas 9 e 10).

Tabela 8. Atividade antibiofilme das formulações contra *C. tropicalis*, *glabrata* e *albicans*.

Entrada	Formulações	Atividade antibiofilme- log (CFU cm ⁻²)		
		<i>C. tropicalis</i> 72 ^a	<i>C. glabrata</i> RL22	<i>C. albicans</i> ATCC 18804
1	F1	0	5,2	4,5
2	F1*	0	5,4	5,3
3	F2	5,7	5,7	5,0
4	F2*	5,0	4,5	5,2
5	F3	0	4,9	4,5
6	F3*	0	5,3	4,3
7	FA	5,1	5,3	5,3
8	FA*	5,3	5,7	5,4
9	FAD	5,5	5,5	5,3
10	FAD*	5,5	5,5	5,3
11	^a BF	5,9	5,9	5,3

^aFormação de biofilme (BF) *Sem sorbato de potássio. FA: formulação com adjuvantes. FAD: formulação com adjuvantes e 2% de DMSO. Selenocianatos alílicos **1e,1f** e **1g**: 150 µg/mL (0,015%).

Ensaio de formação de biofilme e ensaio de atividade antibiofilme em resina acrílica usando microplacas de 24 poços

[0072] Utilizaram-se placas de 24 poços e os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud durante 24 h a 32 °C. O inóculo foi preparado em meio de cultura TSB contendo uma suspensão fúngica de 10⁶ CFU/mL. 200 µL de inóculo foram adicionados a cada poço de poliestireno (placa de 24 poços) e cada resina acrílica (1 cm²) foi inserida em 1,8 mL de TSB (24 h a 35 °C). As resinas foram lavadas com água estéril para remover células soltas. Foram adicionados 150 µL de reagente colorimétrico MTT (5 mg/mL, 150 µL) em cada poço (3 h a 32 °C). Foram utilizados 150 µL de álcool isopropílico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e a absorbância foi medida (leitor de placas de

microtitulação SpectraMax - Molecular Devices, Sunnyvale, CA, comprimento de onda duplo de 570–690 nm) em triplicata.

[0073] Para o ensaio de atividade antibiofilme, as resinas foram pré-tratadas com as formulações F1-F3, F1-F3*, FA, FA*, FAD, FAD* e Listerine® durante 1 minuto. Em seguida, foram realizados os mesmos processos de crescimento de biofilme e o procedimento colorimétrico MTT.

[0074] As formulações F2 e F3 apresentaram diferenças estatísticas para o controle (FA) para *C. tropicalis* e *C. albicans* ($p < 0,05$) (Figuras 1:1 e 3). Contrariamente, F1-F3 não apresentou diferenças estatísticas para *C. glabrata* em comparação com o controle (FA) ($p > 0,05$) (Figura 1:2).

[0075] Adicionalmente, F3* (formulação sem sorbato de potássio) demonstrou atividade antibiofilme que é estatisticamente diferente em relação ao controle (FA*) para *C. tropicalis* ($p < 0,05$) (Figura 2: 1). Para *C. albicans*, as formulações F1*, F2* e F3* mostraram ser estatisticamente diferentes para o controle (FA*) ($p < 0,05$) (Figura 2: 3). Por outro lado, a formulação F1* não apresentou atividade contra o isolado RL22 ($p < 0,05$) (Figura 2: 2).

[0076] F2, F3 e F3* foram identificadas como as formulações mais promissoras pela amostra de resina acrílica ($\log \text{CFU cm}^2$) e o ensaio MTT sobre a resina acrílica. Além disso, estas formulações não apresentam adjuvantes nem substâncias interferentes. Elas foram comparadas com a capacidade antibiofilme de Listerine® contra *C. tropicalis* e *C. albicans* e mostraram-se semelhantes ($p > 0,05$) (Figura 3: 1 e 2).

[0077] Os resultados obtidos pelas formulações contendo sorbato de potássio (F1-F3) foram comparados com os resultados das formulações sem sorbato de potássio (F1-F3)*, assim como com os controles sem princípio ativo com e sem sorbato de potássio (FA e FA*). Os resultados de contagem de placas (CFU cm^2) e ensaio MTT indicaram que F2, F3 e F3* exibiram o mesmo nível de atividade antibiofilme contra *C. tropicalis* e *C. albicans*, mostrando que o sorbato de potássio não desempenha atividade antifúngica e/ou antibiótica na formulação. A sua presença parece ser importante para as formulações aqui

desenvolvidas uma vez que F2* não demonstrou ser tão potencial quanto F2 para inibir a formação de biofilme.

[0078] Notou-se que a presença de DMSO nas formulações (FAD e FAD*, 1,5%) não interferiu na atividade antibiofilme. De acordo com a literatura, formulações contendo mais que 2% de DMSO não influenciam nas células fúngicas (Rodríguez-Tudela *et al.* 2001), sendo concluído que a atividade antifúngica observada nas formulações sobre as resinas acrílicas foi devido aos selenocinatos alílicos **1e**, **1f** e **1g**.

[0079] Como esperado, a ausência dos selenocinatos alílicos **1e**, **1f** e **1g** nos controles FA e FA* não resultou em formulações com propriedades antibiofilme (Tabela 8, Figuras 1 e 2), comprovando sua atividade antibiofilme.

[0080] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Referências

Antinori, S.; Milazzo, L.; Sollima, S.; Galli, M.; Corbellino, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur. J. Intern. Med.* **2016**, *21*, 28–34.

Basavaiah, D.; Reddy, B. S.; Badsara, S. S. Recent contributions from the Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5447–5674.

Budtz-Jorgensen, E.; Knudsen, A. M. Chlorhexidine gel and Steradent employed in cleaning dentures. *Acta Odontol. Scand.* **1978**, *36*, 83–87.

Casanova, B. B.; Muniz, M. N.; Oliveira, T.; Oliveira, L. F.; Machado, M. M.; Fuentefria, A. M.; Gosmann, G.; Gnoatto, S. C. Synthesis and biological evaluation of hydrazone derivatives as antifungal agents. *Molecules* **2015**, *20*, 9229–9241.

Cisilotto, J.; Ferreira, M.; Filippin-Monteiro, F. B.; Bortoluzzi, A. J.; Sá, M. M.; Creczynski-Pasa, T. B. Isothiuronium Salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 353–362.

CLSI Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

Lana, D. F. D.; Donato, R. K.; Bündchen, C.; Guez, C. M.; Bergamo, V. Z.; Oliveira, L. F.; Machado, M. M.; Schrekker, H. S.; Fuentefria, A. M. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 377–388.

Ferreira, M.; Fernandes, L.; Sá, M. M. A highly efficient and general method for the preparation of (*Z*)-allylic bromides derived from Morita-Baylis-Hillman adducts. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 564–568.

Guram, A. S. Synthesis of Allylic Selenocyanates via Electrophilic Cyanoselenation of Allylic Silanes. *Synlett.* **1993**, 259–264.

Hahnel, S.; Rosentritt, M.; Bürgers, R.; Handel, G.; Lang, R. *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology.* **2012**, *29*, 383–391.

Kacem, N.; Roumy, V.; Duhal, N.; Merouane, F.; Neut, C.; Christen, P.; Hostettmann, K.; Rhouati, S. Chemical composition of the essential oil from *Algerian Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *90*, 87–93.

Kulak, Y.; Akiran, A.; Delibalta, N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J. Prosthet. Dent.* **1994**, *72*, 283–288.

Lamfon, H.; Porter, S. R.; McCullough, M.; Pratten, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermenter to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 383–385.

Lazarin, A. A.; Zamperini, C. A.; Vergani, C. E.; Wady, A. F.; Giampaolo, E. T.; Machado, A. L. (2014) *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an *in vitro* study. *Gerodontology*. **2014**, *31*, 25–33.

Lewis, A. L.; Cumming, Z. L.; Goreish, H. H.; Kirkwood, L. C.; Tolhurst, L. A.; Stratford, P. W. Crosslinkable coatings from phosphorylcholine-based polymers. *Biomaterials*. **2001**, *22*, 99–111.

Meiller, T. F.; Kelley, J. I.; Jabra-Rizk, M. A.; Depaola, L. G.; Baqui, A. A.; Falkler, W. A. *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2001**, *91*, 663–670.

Millsap, K. W.; Bos, R.; Mei, H. C.; Busscher, H. J. Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1999**, *75*, 351–359.

Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Rocha, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6255–6285.

Nogueira Filho, G. R. Racionalização do uso de enxaguatórios bucais, *SOBA* **2005**, Boletim 7.

Pellizzaro, D.; Polyzois, G.; Machado, A. L.; Giampaolo, E. T.; Sanitá, P. V.; Vergani, C. E. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing *in vitro* *Candida albicans* biofilm viability. *Braz. Dent. J.* **2012**, *23*, 547–554.

Paranhos, H. F. O.; Malachias, A.; Pardini, L. C. Materiais para limpeza de dentaduras: revisão da literatura. *Rev. Fac. Odontol. Lins* **1991**, *4*, 15–18.

Raab, F. J.; Taylor, A.; Bucher, J. A. Scanning electron microscopic examination of ultrasonic and effervescent methods of surface contaminant removal from complete dentures. *J. Prosthet. Dent.* **1991**, *65*, 255–258.

Ramage, G.; Jose, A.; Coco, B.; Rajendran, R.; Rautemaa, R.; Murray, C.; Lappin, D. F.; Bagg, J. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms *in vitro*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2011**, *111*, 456–460.

Riague E. H.; Guillemin, J-C. Synthesis and characterization of allylic and propargylic selenols. *Organometallics*. **2002**, *21*, 68–73.

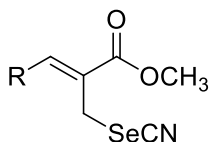
Ribas, A. D.; Del Ponte, E. M.; Dalbem, A. M.; Lana, D. D.; Bündchen, C.; Donato, R. K.; Schrekker, H. S.; Fuentefria, A. M. Imidazolium salts with antifungal potential for the control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 445–452.

Rodríguez-Tudela, J. L.; Cuenca-Estrella, M.; Díaz-Guerra, T. M.; Mellado, E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2513–2517.

Rosa, H. S.; Camargo, V. B.; Camargo, G.; Garcia, C. V.; Fuentefria, A. M.; Mendez, A. S. Ecdysteroids in *Sida tuberculata* R.E. Fries (Malvaceae): chemical composition by LC-ESI-MS and selective anti-*Candida krusei* activity. *Food Chem.* **2015**, *182*, 193–199.

Reivindicações

1. Selenocianato alílico caracterizado por apresentar a Fórmula geral 1:



1

onde o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, (C=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila,

onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado, e

(C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila, heteroariloxi, hidroxí, nitro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a,

onde m é 1 ou 2, e

R_a, R_b, e R_c são, independentemente: H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila.

2. Selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo substituinte R ser um selecionado do grupo que consiste em: fenila, 2,4-diclorofenila, 2-bromofenila, 3-metoxifenila, naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

3. Selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo substituinte R do selenocianato alílico ser um selecionado do grupo que consiste em: naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

4. Processo de obtenção de selenocianato alílico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por compreender a reação de:

-selenocianato de potássio e brometo alílico em uma proporção na faixa de 1:0 a 2:0;e

-solventeorgânico, selecionado do grupo que consiste em: tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, acetona ou uma mistura destes com água, em qualquer proporção;

em que a temperatura é na faixa entre -20°C e 30°C ; e

em que o tempo de reação éna faixa entre 5 e60 minutos.

5. Processo de obtenção de selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compreender:

-selenocianato de potássio e brometo alílico na proporção de 1,2:1;

- acetona aquosa (80%);

em que a temperatura de reação é de 5°C ; e

em que o tempo de reação é de 15 minutos.

6. Processo de obtenção de selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado por compreender as etapas de:

i. solubilizar o brometo alílico precursor em acetona(80%);

ii. manter temperatura do meio reacional em 5°C ;

iii. adicionar selenocianato de potássio ao produto obtido na etapa i, na proporção selenocianato de potássio:brometo alílico de 1,2:1;

iv. adicionar água ao produto obtido na etapa iii;

v. agitar o produto obtido na etapa iv por 15 minutos;

vi. adicionar acetato de etila ao produto obtido na etapa v;

vii. lavar fase orgânica formada na etapa vi com água e salmoura;

viii. secar produto obtido na etapa vii com MgSO_4 anidro; e

ix. evaporar fase orgânica obtida na etapa viii;

7. Processo de obtenção de selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação6 caracterizado por compreender uma etapa adicional de purificação do selenocianato alílico obtido na etapa vii em cromatografia em coluna de sílica gel.

8. Uso dos selenocianatos alílicos conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por microrganismos.

9. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo microrganismo ser fungo.

10. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fungo ser do gênero *Fusarium* sp., *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp. ou *Candida* sp.

11. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fungo ser *Fusarium petroliphilum*, *Fusarium keratoplasticum*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium xyssporum*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* ou *Trichophyton rubrum*.

12. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fungo ser *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. albicans*.

13. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela doença ser estomatite protética.

14. Composição de enxaguatório bucal, caracterizada por compreender:
- princípio ativo que consiste em selenocianato alílico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3;
- veículo farmacologicamente aceitável.

15. Composição de enxaguatório bucal de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo veículo farmacologicamente aceitável compreender:

- pelo menos um aromatizante;
- pelo menos um edulcorante, e;
- pelo menos um agente conservante.

16. Composição de enxaguatório bucal de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo:

- princípio ativo, dissolvido em DMSO, ser na faixa de 0,015% v/v;

- aromatizante ser essência hidroetanólica de hortelã-pimenta na faixa de 0,3% v/v; e

- edulcorante ser sacarina sódica na faixa de 0,05% v/v.

FIGURAS

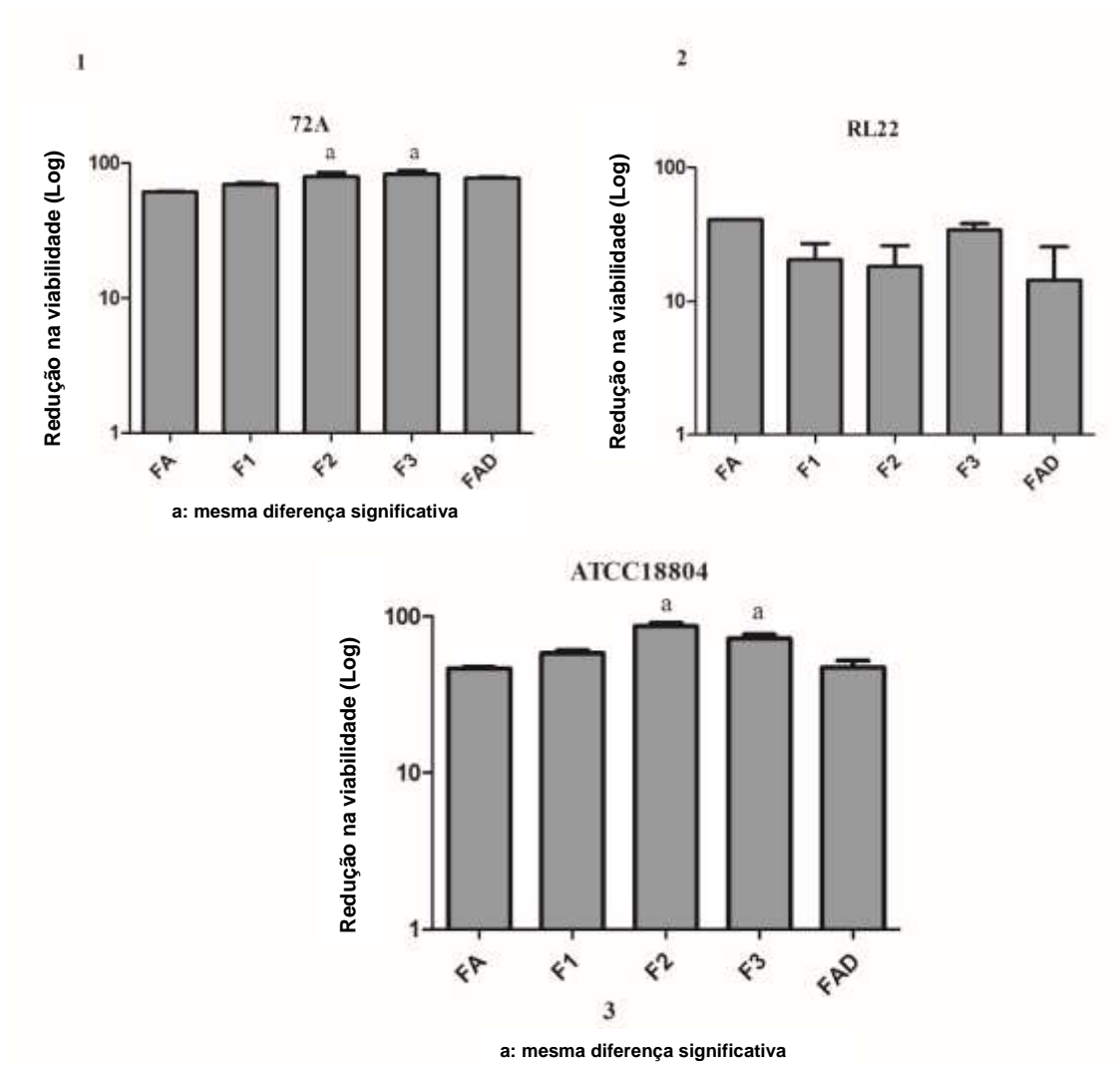


Figura 1

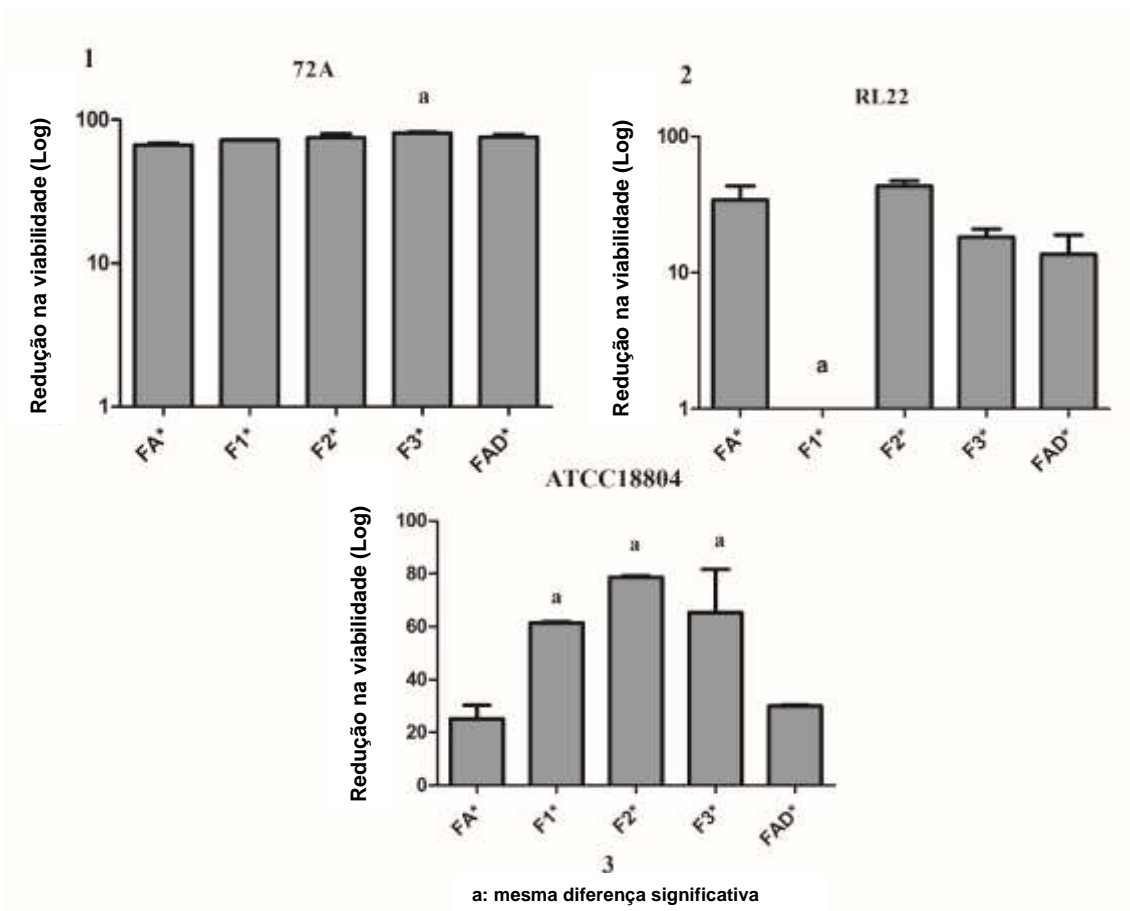


Figura 2

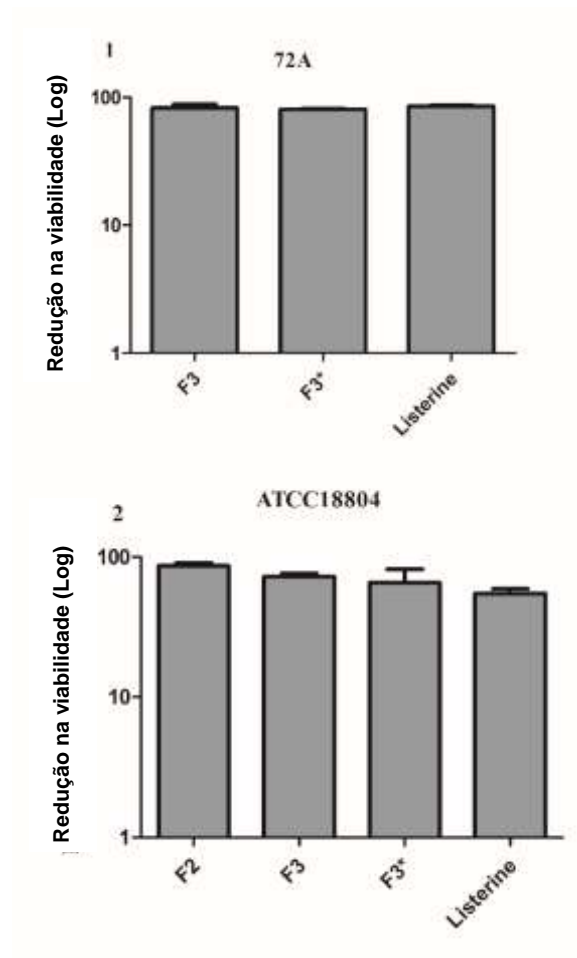


Figura 3

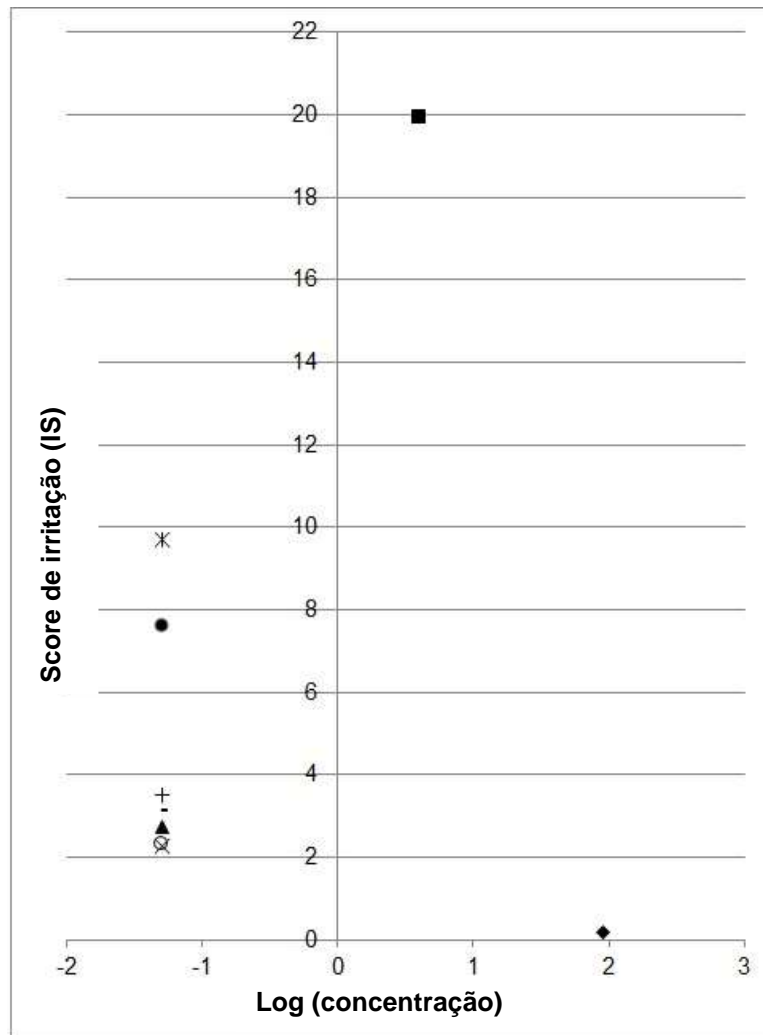


Figura 4

Resumo**SELENOCIANATO ALÍLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS DO MESMO E
COMPOSIÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL**

A presente invenção descreve selenocianatos alílicos derivados de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos, assim como seu processo de obtenção. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana, mais especificamente sobre células fúngicas leveduriformes e filamentosas. Também é descrito o uso destes compostos em formulações de enxaguatórios bucais. A presente invenção se situa nos campos da química medicinal, química de compostos organocalcogênio, mais especificamente da química de compostos orgânicos contendo selênio.