

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PRISCILA BRANDÃO GOMES DA SILVA SANTIAGO

SÍNTESE, AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DE
NOVAS TIAZOLIDINA-2,4-DIONAS E
4-TIOXO-TIAZOLIDINA-2-ONAS

Recife, PE

2014

PRISCILA BRANDÃO GOMES DA SILVA SANTIAGO

**SÍNTESE, AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DE
NOVAS TIAZOLIDINA-2,4-DIONAS E
4-TIOXO-TIAZOLIDINA-2-ONAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^{ta}. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadora: Prof^{ta}. Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

Recife, PE

2014

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

S235s Santiago, Priscila Brandão Gomes da Silva.
Síntese, avaliação microbiológica e citóxica de novas tiazolidina-2, 4-dionase 4-tioxo-tiazolidina-2-onas / Priscila Brandão Gomes da Silva Santiago. – Recife: O autor, 2014.
87 folhas: il. ; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências e apêndices.

1. Anti-Infeciosos. 2. Tiazolidinas. I. Lima, Maria do Carmo Alves de. (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2014-0162)

PRISCILA BRANDÃO GOMES DA SILVA SANTIAGO

**SÍNTESE, AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CITOTÓXICA DE NOVOS
DERIVADOS DA TIAZOLIDINA-2,4-DIONA E 4-TIOXO-TIAZOLIDINA-2-ONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 29/07/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dalci José Brondani (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Silene Carneiro do Nascimento (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

*Dedico aos meus pais, Zulmira e
Paulo, pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar, me guiar e me dar forças para seguir em frente.

À Prof^ª. Dr^ª. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque, por todo o conhecimento fornecido, além da amizade e do carinho, que muito contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria do Carmo Alves de Lima, por toda a colaboração para a concretização deste trabalho.

À equipe do laboratório, por toda a colaboração prestada e convivência, lado a lado, todos os dias. Em especial a Micalyne Soares, que compartilhou mais intensamente dos momentos de estudo e da minha vida pessoal.

Aos Professores do Departamento de Antibióticos e Farmácia, pelo acolhimento e ensinamentos transmitidos. Em especial à Prof^ª. Kêsia Xisto, por toda a paciência e participação ativa nos testes microbiológicos realizados em seu laboratório. E à Prof^ª. Dr^ª. Gardênia Militão, pela realização dos testes citotóxicos.

Aos funcionários da Central Analítica-UFPE, em especial à Eliete Barros e Abene Ribeiro, pelas análises espectroscópicas.

Aos amigos e colegas do PPGCF-UFPE, pela amizade e troca de conhecimento durante o curso.

Aos colegas dos outros laboratórios, em especial à Maria Cláudia, Tiago Bento e Jamerson, pela amizade e colaboração em algumas etapas do projeto.

Aos grandes amigos Fernanda, Ana Daura e Rafael pela amizade, carinho e apoio constantes.

Aos meus familiares por todo amor, carinho, apoio e incentivo constante e, principalmente, pela compreensão dos muitos momentos em que me fiz ausente.

Aos meus pais, por todos os esforços, ensinamentos, amor, carinho e incentivo, que foram essenciais durante toda minha formação.

Ao meu esposo Rocir, pelo companheirismo, apoio, boas idéias, incentivo e por compartilhar das minhas expectativas.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram com críticas ou sugestões, que certamente em muito enriqueceram esse trabalho.

RESUMO

Tiazolidina é um sistema de anel heterocíclico com múltiplas aplicações. Seu núcleo tem sido relatado por ser responsável pela maior parte das ações farmacológicas relacionadas com os seus análogos estruturais, como anti-câncer, anti-inflamatória, anticonvulsivante, hipoglicemiantes, anti-viral e anti-bacteriana. Devido ao aumento do número de infecções hospitalares e resistência de patógenos ao arsenal terapêutico existente, há uma demanda no avanço da pesquisa de novos compostos bioativos. Diante desses fatos, este estudo teve como objetivo o planejamento estrutural, a síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novos derivados da tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxo-tiazolidina-2-ona, além da avaliação quanto ao potencial citotóxico *in vitro* dos derivados obtidos. Treze arilidenos substituídos na posição 5 do anel heterocíclico foram obtidos por meio de reações de condensação de Knoevenagel. As estruturas químicas dos compostos sintetizados foram caracterizadas por RMN ¹H e RMN ¹³C, Infravermelho e Massa. As cepas selecionadas para a atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em disco foram dos grupos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes e levedura. Os testes antimicrobianos foram ainda complementados com os valores da CMI e CMB. Os compostos foram avaliados quanto a seu potencial citotóxico pelo método de MTT em três linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia promielocítica - humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama - humano) e NCI-H292 (carcinoma epidermoide de pulmão - humano). Os compostos foram considerados puros, com rendimentos satisfatórios e suas constantes físico-químicas determinadas. Nove dos treze compostos sintetizados apresentaram atividade frente a, no mínimo, duas cepas testadas. Os compostos não se mostraram ativos contra bactérias Gram-negativas e levedura. Quanto ao estudo de citotoxicidade, o composto **IIe** apresentou melhor potencial citotóxico contra as linhagens testadas, com valores de IC₅₀ inferiores a 4 µg/mL. Este estudo demonstrou que a substituição bioisostérica da tiocarbonila em vez da carbonila na posição 4 do anel tiazolidínico, em alguns compostos, resultou em um aumento da atividade antimicrobiana. Devido aos resultados obtidos, esses compostos podem representar pontos de partida úteis para a otimização das pesquisas. Os estudos que envolvem o mecanismo de ação são necessários para uma compreensão completa da atividade antimicrobiana e citotóxica dos compostos, bem como modificações estruturais para melhorar a atividade anti-proliferativa e anti-mitótica.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Citotoxicidade. Tiazolidinas.

ABSTRACT

Thiazolidine is a heterocyclic ring system with multiple applications. Its nucleus has been reported to be responsible for most of the pharmacological actions related to its structural analogs such as anti-cancer, anti-inflammatory, anticonvulsant, antidiabetic, anti-viral and anti-bacterial. Due to the increased number of hospital infections and resistance of pathogens to the therapeutic armamentarium, there is a demand to advance the search for new bioactive compounds. Given these facts, this study aimed at structural design, synthesis and evaluation of the antimicrobial activity of new derivatives of thiazolidine-2,4-dione and 4-thioxo-thiazolidine-2-one, besides assessing the in vitro cytotoxic potential. Thirteen arylidenes were obtained by Knoevenagel Condensation reactions at the position 5 on the heterocyclic ring. The chemical structures of the synthesized compounds were characterized by ^1H MNR and ^{13}C MNR, IR and Mass. The strains selected for the antimicrobial activity by disc diffusion technique were a Gram-positive bacteria group, a Gram-negative, an Alcohol acid resistant and yeast. The antimicrobial tests were further complemented with the values of CIM and CBM. The compounds were evaluated for their in vitro cytotoxic potential by the MTT method on three human tumor cell lines HL-60 (promyelocytic leukemia - human), MCF-7 (breast carcinoma - human) and NCIH-292 (lung cancer - human). The compounds were considered pure, with satisfactory yields and their physical and chemical constants were set. Nine out of the thirteen synthesized compounds were active against at least two tested strains. The compounds were not active against Gram-negative bacteria and yeast. As for the cytotoxicity study, the compound **IIe** was stronger against tested stains with IC_{50} values less than $4\ \mu\text{g/mL}$. This study demonstrated that the replacement of the thiocarbonyl bioisosteric instead of the carbonyl in position 4 of the thiazolidine ring, in some compounds, resulted in increased antimicrobial activity. Due to the results obtained, these compounds may represent useful starting points for research. Studies involving the mechanism of action are necessary for a complete understanding of their compound's antimicrobial activity as well as structural changes to improve the anti-proliferative activity.

Keywords: Antimicrobials. Cytotoxicity. Thiazolidines.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese da Tiazolidina-2,4-diona (1) a partir do éster etilcloroacético(3)	21
Esquema 2. Síntese da Tiazolidina-2,4-diona (1) a partir da tiouréia (5) e ácido monocloroacético (6).....	21
Esquema 3. Síntese da Tiazolidina-2,4-diona (1) em micro-ondas.....	22
Esquema 4. Exemplo de N-alquilação.....	23
Esquema 5. Reação de Mannich com 2-imino-tiazolidina-4-ona (7).....	23
Esquema 6. Reação de Condensação de Knoevenagel.....	24
Esquema 7. Reação de Tionação da Tiazolidina-2,4-diona (1).....	25
Esquema 8. Exemplo de reação de Adição de Michael.....	25
Esquema 9. Exemplo de reação de Oxidação.....	26
Esquema 10. Reação de Diazotação evidenciando a formação da ligação C=N.....	26
Esquema 11. Síntese de compostos tiopirânicos (24).....	27
Esquema 12. Síntese do 1-metil-3-(4-clorobemnzil)-5-(3,4-diclorobenzilideno)-2,4-diona (32).....	28
Esquema 13. Condensação de benzaldeídos com 2-tioxo-tiazolidina-4-ona (34) ou tiazolidina-2,4-diona (1). Reagentes e condições: (a) acetato de piperidina, tolueno, refluxo.....	28
Esquema 14. Síntese de 2-tioxo-tiazolidina-4-ona (38) ou tiazolidina-2,4-dionas (39) 5-substituídas. (a) piperidina, AcOH, EtOH, micro-ondas, 20 min.....	29
Esquema 15. Síntese dos derivados 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (40).....	30
Esquema 16. Síntese de derivados 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona (39).....	32
Esquema 17. Esquema geral de síntese dos derivados da Tiazolidina-2,4-diona (I) e 4-Tioxo-tiazolidina-2-ona (III).....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tiazol.....	20
Figura 2. Tiazolidina (0) e derivados Tiazolidina-2,4-diona (1) e 4-Tioxo-tiazolidina-2-ona (2)	20
Figura 3. Principais reações do anel 4-tiazolidinona.....	22
Figura 4. Estrutura dos ácidos (a) (R,Z)-2-[3-({4-[(2,4-dioxotiazolidin-5-ilideno)metil]fenilamino}metil)benzamido]-pentanodióico (42) e (b) (R,Z)-2-[3-({4-[(2-tioxo-4-oxotiazolidin-5-ilidene)metil]fenilamino}metil)benzamido]-pentanodióico (41)	30
Figura 5. Estrutura do ácido 4-{{(Z)-2,4-dioxo-5-{{4-[(E)-3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il]benzilideno}tiazolidin-3-il]metil}}benzoico (43).....	31
Figura 6. Estrutura dos 5-arilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-onas (44).....	32
Figura 7. Estrutura da 2-{{2-[3-(benzotiazol-2-ilamino)-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-ilidenometil]-4-clorofenoxi}}-N-(4-metoxifenil)-acetamida (45).....	32
Figura 8. Estrutura da (±)-2-adamantan-1-il-3-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-tiazolidina-4-ona (46).....	33
Figura 9. Estruturas da (E)-5-(4-isobutylbenzylidene)-tiazolidina-2,4-diona (47) e (E)-5-(2-hidroxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (48)	33
Figura 10. Exemplo de espectro de Infravermelho para o composto IIe.....	48
Figura 11. Exemplo de espectro de RMN ¹ H para o composto IIe.....	49
Figura 12. Exemplo de espectro de RMN ¹³ C para o composto IIe.....	51
Figura 13. Halos de inibição dos compostos IIa (A) (30 mm), IIb (B) (35.33 mm) e IIc (C) (18.66 mm) frente ao micro-organismo <i>M. luteus</i>	63
Figura 14. Exemplo de atividade antimicrobiana após tionação da carbonila da posição 4 do anel tiazolidínico.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura dos compostos, nomenclatura e seus respectivos códigos.....	40
Tabela 2. Condições de crescimento dos micro-organismos utilizados em testes de antagonismo realizados nos compostos obtidos por síntese.....	44
Tabela 3. Constantes físico-químicas dos compostos sintetizados.....	47
Tabela 4. Atividade antimicrobiana de compostos testados contra cepas bacterianas e levedura, utilizando o método de difusão em disco (diâmetro do halo de inibição em mm).....	62
Tabela 5. Os valores de CMI e CMB (em $\mu\text{g/mL}$) contra cepas de bactérias Gram-positivas.....	65
Tabela 6. Efeito da inibição do crescimento (% de inibição) em linhagens celulares de carcinoma humano (em $25 \mu\text{g/mL}$).....	67
Tabela 7. IC_{50} (em $\mu\text{g/mL}$) para os compostos que apresentaram inibição de crescimento acima de 70% no teste de concentração única.....	68

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1.	NÚCLEO TIAZOLIDÍNICO	20
2.2.	SÍNTESE DA TIAZOLIDINA-2,4-DIONA	21
2.3.	REAÇÕES DAS TIAZOLIDINONAS	22
2.3.1.	Reações de N-Alquilação	22
2.3.2.	Reações de Mannich	23
2.3.3.	Reações de Condensação Knoevenagel	24
2.3.4.	Reação de Tionação	24
2.3.5.	Reações de Adição de Michael	25
2.3.6.	Reação de Oxidação	26
2.3.7.	Reações de Diazotação	26
2.3.8.	Outras Reações das Tiazolidionas	27
2.4.	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	29
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	GERAL	35
3.2.	ESPECÍFICOS	35
4.	MATERIAL E MÉTODO	37
4.1.	ESTUDO QUÍMICO	37
4.1.1	Metodologias Sintéticas	38
4.1.2	Síntese da tiazolidina-2,4-diona (I)	39
4.1.3	Síntese do 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)	39
4.1.4	Síntese geral dos derivados 5-arilidenos-tiazolidina-2,4-diona (IIa-g)	39
4.1.5	Síntese geral dos derivados 5-arilidenos-4-tioxo-tiazolidina-2-diona (IVa-f)	40
4.2.	ESTUDO BIOLÓGICO	41
4.2.1.	Avaliação da Atividade Microbiológica	41
4.2.1.1.	Método de difusão em disco de papel	42
4.2.1.2.	Metodologia de poços: Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)	43
4.2.2.	Avaliação da Citotoxicidade	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ESTUDO QUÍMICO	47
5.1.1	5-(2-Bromo-6-fluorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIa)	51
5.1.2	5-(2-Hidroxi-3-bromo-5-clorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIb)	52
5.1.3	5-(2-Hidroxi-5-clorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIc)	53
5.1.4	5-(2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IId)	53
5.1.5	5-(2-Bromo-5-metoxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIe)	54

5.1.6	5-(3-Bromo-4-metilbenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIf)	55
5.1.7	5-(6-Bromo-4-cloro-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (IIg)	56
5.1.8	5-(6-Bromo-4-cloro-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetileno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IVa)	56
5.1.9	5-(3-Bromo-4-metilbenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IVb)	57
5.1.10	5-(5-Bromo-piridin-2-il-metileno)4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IVc)	58
5.1.11	5-(2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxilbenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IVd)	59
5.1.12	5-(2-Bromo-6-fluorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IVe)	60
5.1.13	5-(2-Bromo-5-metoxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IVf)	60
5.2	ESTUDO BIOLÓGICO	61
5.2.1	Atividade Microbiológica	61
5.2.2	Atividade Citotóxica	66
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE 1	79
	APÊNDICE 2	87

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A tiazolidina é um sistema de anel heterocíclico com múltiplas aplicações. Os seus derivados representam uma classe bem conhecida de medicamentos e substâncias patenteados em diferentes fases da pesquisa. Seu núcleo tem sido relatado por ser responsável pela maior parte das suas ações farmacológicas. Seu uso em síntese orgânica tem se tornado cada vez mais importante. As diversas atividades biológicas relacionadas com os seus análogos estruturais, têm sido destacadas como antimicrobiana (ALEGAON e ALAGAWADI 2012), anticâncer (ROMAGNOLI et al., 2013), anti-inflamatória, analgésica (REANMONGKOL e SONGKRAM, 2013), anti-convulsivante (AMIN et al., 2008), dentre outras. Recentemente, a atenção tem sido dada à atividade antitumoral desses derivados como novos agentes anticancerígenos com grande potencial de ação (METWALLY, 2007). Propriedades anti-neoplásicas de 4-tiazolidinonas e heterociclos relacionados podem provavelmente ser causada pela sua afinidade para alvos biológicos anticancerígenos, tais como estimuladores da JNK fosfatase-1 (JSP-1) e o fator de necrose tumoral TNF alfa (HAVRYLYUK et al., 2010).

O tratamento de infecções bacterianas continua a ser um problema terapêutico importante no mundo. Este fato é desafiador devido a fatores que incluem as doenças infecciosas emergentes e aumento do número de patógenos microbianos resistentes a múltiplas drogas. Atualmente existe um grande número de antibióticos e quimioterápicos disponíveis para utilização médica. Porém, o aparecimento de estirpes de bactérias resistentes a novos e antigos antibióticos, nas últimas décadas, constitui uma necessidade substancial de novas classes de agentes anti-bacterianos (TOMASIC et al., 2010).

A produção de novas drogas com amplo espectro antimicrobiano é um forte aliado no combate à mortalidade em grupos de pessoas de diferentes idades ao redor do mundo. Neste contexto, há compostos de tiazolidinas cuja literatura descreve excelentes resultados. A atividade antimicrobiana do 5-arylideno-4-tioxi-tiazolidina-2-ona e 5-arylideno-tiazolidina-2,4-diona vem sendo avaliada contra uma grande variedade de micro-organismos, dentre as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, Álcool-ácido Resistentes e fungos (GOUVEIA et al., 2009). Logo, as tiazolidinas surgem como perspectivas de novos fármacos podendo, assim, contribuir nos estudos para a descoberta de compostos potencialmente bioativos.

Em vista dos fatos mencionados e, como parte de nossos esforços para descobrir novos agentes potencialmente ativos, treze compostos foram sintetizados sendo sete arilidenos derivados da Tiazolidina-2,4-diona substituída na posição 5 de seu núcleo e seis 5-arilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-onas. Este último teve a carbonila da posição 4 do anel heterocíclico substituída pela tiocarbonila. Os compostos foram avaliados como agentes antimicrobianos. Além disso, a citotoxicidade destes compostos foi testada contra linhagens de células cancerígenas com bons resultados.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os subtópicos deste capítulo perfazem a revisão minuciosa da bibliografia acerca das tiazolidinas e seus atividades biológicas.

2.1. NÚCLEO TIAZOLIDÍNICO

Um dos principais objetivos da química orgânica e medicinal é desenhar, sintetizar e produzir moléculas que possuam valor como agentes terapêuticos humanos. Compostos contendo sistemas de anéis heterocíclicos são de grande importância e recebem atenção especial, pois pertencem a uma classe de compostos com utilidade comprovada em química medicinal. Como exemplo, o anel heterocíclico de cinco membros contendo três átomos de carbono, um átomo de Nitrogênio e um átomo de Enxofre, conhecido como tiazóis (**Figura 1**) são de considerável interesse em diferentes áreas da química medicinal (JAIN, 2013).

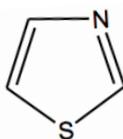


Figura 1. Tiazol.

Tiazolidina-2,4-diona (1) é o derivado da tiazolidina (0) com os dois grupos carbonila nas posições 2 e 4 e 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (2), com um grupo carbonila na posição 2 e um grupo tiocarbonila na posição 4 (**Figura 2**). Os substituintes nas posições 3 e 5 podem ser variados. O primeiro composto no qual o ciclo tiazol foi caracterizado foi a tiazolidina-2,4-diona (1), que foi preparada por isomerização do ácido tiocianoacético. Sua estrutura foi elucidada por Libermann et al. em 1881 (LIMA, 1998).

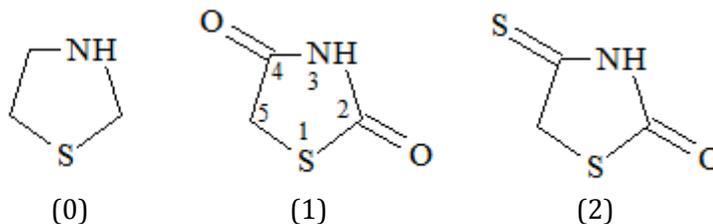
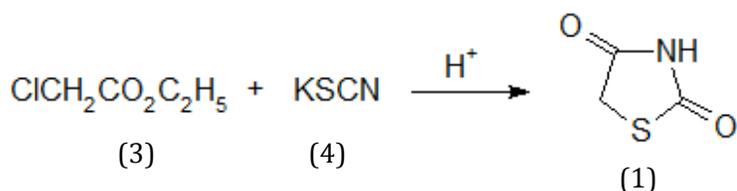


Figura 2. Tiazolidina (0) e derivados, tiazolidina-2,4-diona (1) e 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (2).

2.2. SÍNTESE DA TIAZOLIDINA-2,4-DIONA

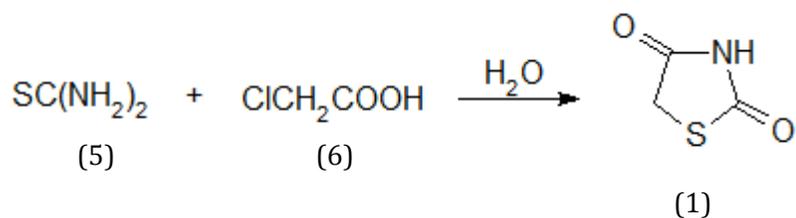
De acordo com Langmür (1919) isósteros são compostos ou grupo de átomos que possuem a mesma disposição de elétrons e número de átomos, caracterizando-se por apresentarem propriedades físicas semelhantes. As tiazolidinas fazem este papel ante à imidazolidina e oxazolidina, cujas propriedades biológicas e farmacológicas são bastante evidentes.

Em 1865, Heintz sintetizou a tiazolidina-2,4-diona (1) a partir do éster etilcloroacético (3) e tiocianato de potássio (4) em meio ácido (**Esquema 1**) (HEINTZ, 1865 apud SPRAGUE at al., 1957).



Esquema 1. Síntese da Tiazolidina-2,4-diona (1) a partir do éster etilcloroacético (3).

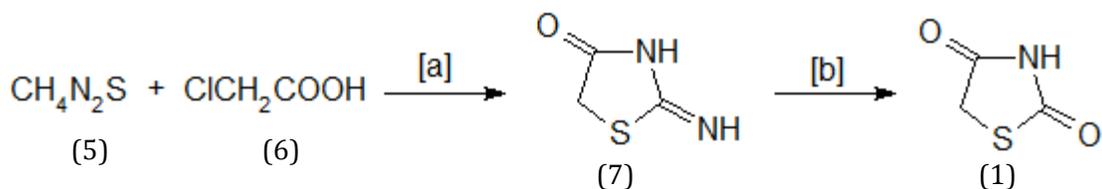
A tiazolidina-2,4-diona (1) também pode ser obtida, segundo Libermann et al., (1948), pelo aquecimento de tiouréia (5) e ácido monoclóroacético (6) em meio aquoso sob refluxo, com rendimento de 83% (**Esquema 2**).



Esquema 2. Síntese da Tiazolidina-2,4-diona (1) a partir da tiouréia (5) e ácido monoclóroacético (6).

Atualmente, além dos métodos convencionais de obtenção da Tiazolidina-2,4-diona (1), existe o método por meio de micro-ondas que envolve uma reação de dois passos. No primeiro passo [a], a tiouréia (5) e o ácido monoclóroacético (6) são agitados a 0 °C para obter um precipitado branco intermediário de 2-imino-tiazolidina-4-ona (7), o

qual, na segunda etapa [b] é ainda irradiada com micro-ondas a 250 W durante 5 minutos para se obter cristais brancos de Tiazolidina-2,4-diona (**Esquema 3**) (JAIN et al., 2013).



Esquema 3. Síntese da Tiazolidina-2,4-diona (1) em micro-ondas.

2.3. REAÇÕES DAS TIAZOLIDINONAS

Dentre as diversas reações que envolvem o anel 4-tiazolidinona são destacados os processos quimiosseletivos que ocorrem no enxofre da posição 1, em reações de oxidação; no nitrogênio da posição 3, em reações de *N*-alquilação e em reações de Mannich; na carbonila 4, em reações de tionação via reagente de Lawesson ou P_2S_5 ; na posição 5 (carbono metilênico) em reações de condensação com aldeídos, cetonas ou com sais de diazônio (**Figura 3**) (LIESEN et al., 2008). Várias reações têm sido descritas sobre tiazolidinas, porém duas são bastante exploradas, estas reações são a *N*-alquilação e a condensação.

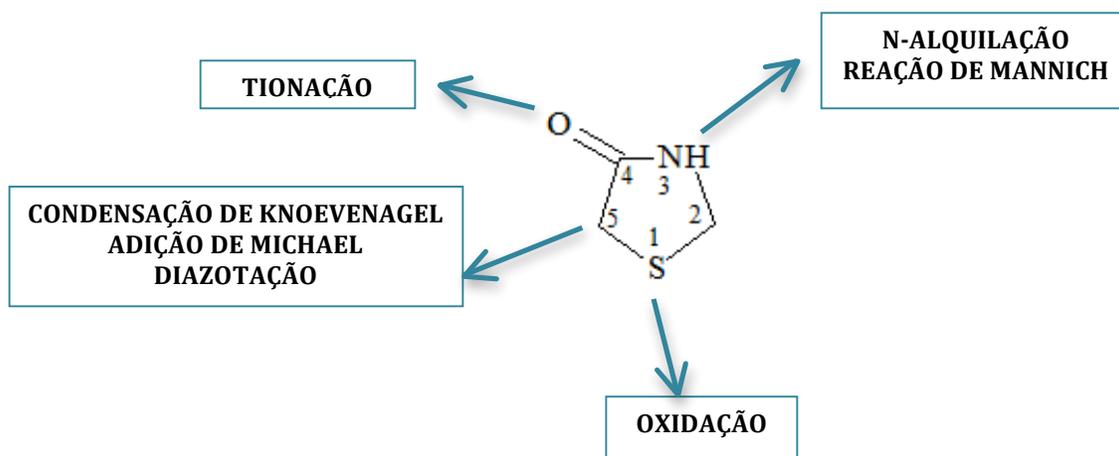
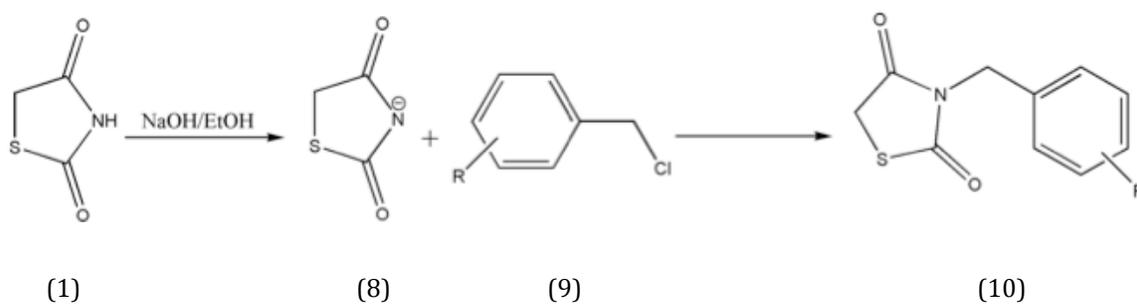


Figura 3. Principais reações do anel 4-tiazolidinona.

2.3.1. Reações de *N*-Alquilação

As reações de *N*-alquilação são do tipo ácido-base de Lewis e que também são

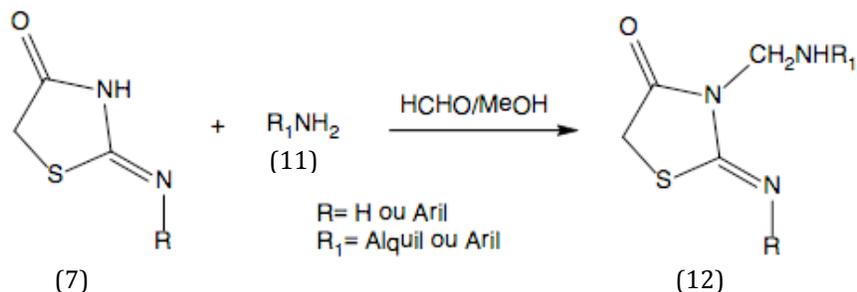
possíveis de serem realizadas no núcleo das tiazolidinonas (TDZs). Trata de uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2), onde a tiazolidinadiona reage com haletos substituídos, conduzindo a formação de derivados substituídos na posição 3 do núcleo (LIMA et al., 1998). A reação se processa em meio básico (NaOH) e metanol (**Esquema 4**), onde ocorrerá desprotonação do nitrogênio conduzindo a formação do ânion (8) que agirá como nucleófilo da reação com haletos (9) na etapa posterior levando ao composto (10) (LIESEN et al., 2008).



Esquema 4. Exemplo de N-alkilação.

2.3.2. Reações de Mannich

Outro método de substituições na posição 3 consiste na reação de Mannich. Essas reações ocorrem geralmente entre 2-imino-4-tiazolidinonas (7) e aminas primárias ou secundárias (11), em presença de formaldeído (HCHO) ou paraformaldeído [(HCHO) n], em metanol, levando à formação de 2-imino-3-(aminometil substituído)-4-tiazolidinona (12) (**Esquema 5**) (SINGH et al, 1981).

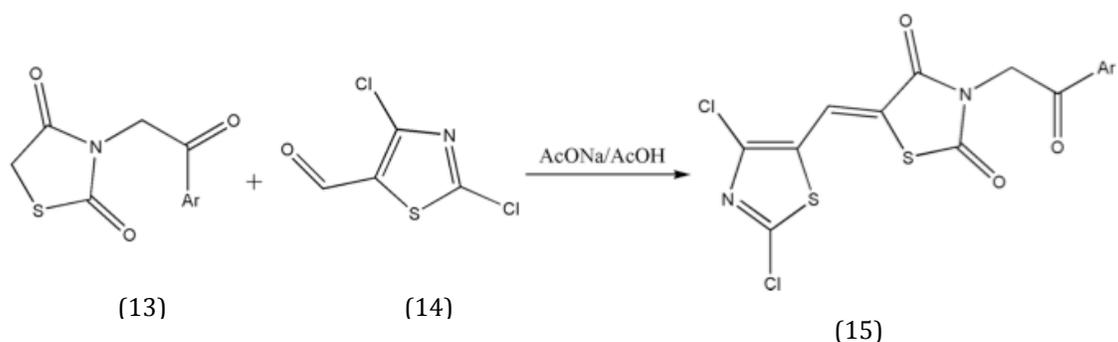


Esquema 5. Reação de Mannich com 2-imino-tiazolidina-4-ona (7).

2.3.3. Reações de Condensação Knoevenagel

Esta transformação consiste na reação entre um composto carbonílico (aldeídos ou cetonas) e outro contendo o grupo metileno ativado, resultando na formação do produto com uma ligação dupla carbono-carbono (CUNHA & SANTANA, 2012). O composto metileno ativo é assim chamado quando é observada a seguinte estrutura $Z-CH_2-Z'$, onde Z e Z' são átomos ou grupamentos retiradores de elétrons causando polarizabilidade da ligação C-H deixando os hidrogênios ácidos (OLIVEIRA et al., 2008).

As tiazolidinas ou tiazolidinas substituídas (13) sofrem esse tipo de reação quando reagem com aldeídos aromáticos substituídos (14) utilizando acetato de sódio como catalisador e ácido acético glacial como solvente para formação do derivado (15) (**Esquema 6**) (BOZDAĞ-DÜNDAR et al., 2007).



Esquema 6. Reação de Condensação de Knoevenagel.

2.3.4. Reação de Tionação

A tionação de tiazolidinonas pode ser atingida utilizando o reagente de Lawesson (1,3-ditio-2,4-difosfatano-2,4-dissulfeto-2,4-bis(4-metóxfenil)) (16), para a síntese de 4-tioxi-tiazolidina-2-ona (2) a partir da tiazolidina-2,4-diona (1), que foi realizada em dioxano anidro, sob refluxo (**Esquema 7**) (GOUVEIA et al., 2009).



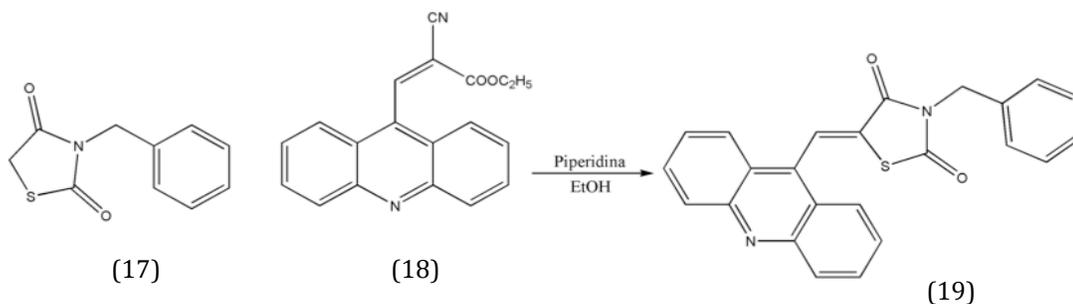
Esquema 7. Reação de Tionação da Tiazolidina-2,4-diona.

A velocidade da tionação depende da densidade eletrônica existente na carbonila e limitada pela temperatura. Em compostos contendo duas ou mais carbonilas, sofrerá primeiramente tionação aquela que for mais rica em elétrons. A conversão do grupo carbonila em tiocarbonila é atribuída a ílideos de ditiofosfina ($p\text{-CH}_3\text{O-C}_6\text{H}_4\text{-PS}_2$), formados a partir da quebra do anel de quatro membros, contendo átomos de fósforo e enxofre alternados, existente no reagente de Lawesson (LIESEN et al., 2008).

2.3.5. Reações de Adição de Michael

Uma das reações para a formação da ligação carbono-carbono é a reação de Michael, convencionalmente caracterizada pela adição de nucleófilos (doadores de Michael) à olefinas ativadas (aceptores de Michael) (MATTOS & MARZORATI, 1999).

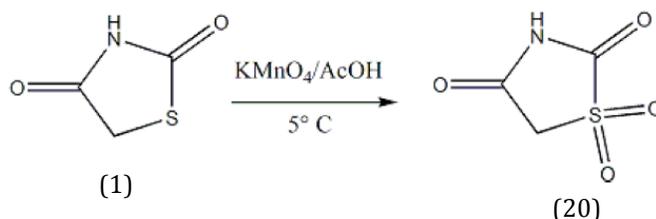
A literatura mostra uma série de derivados tiazolidínicos obtidos a partir do 3-Benzil-tiazolidina-2,4-diona substituído (17) e 9-[etil-(2-ciano)-acrilato]-acridina (18). Utilizando piperidina como catalisador e etanol como solvente a reação foi conduzida para a formação de derivados 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (19) (**Esquema 8**) (MOURÃO et al., 2005).



Esquema 8. Exemplo de reação de Adição de Michael.

2.3.6. Reação de Oxidação

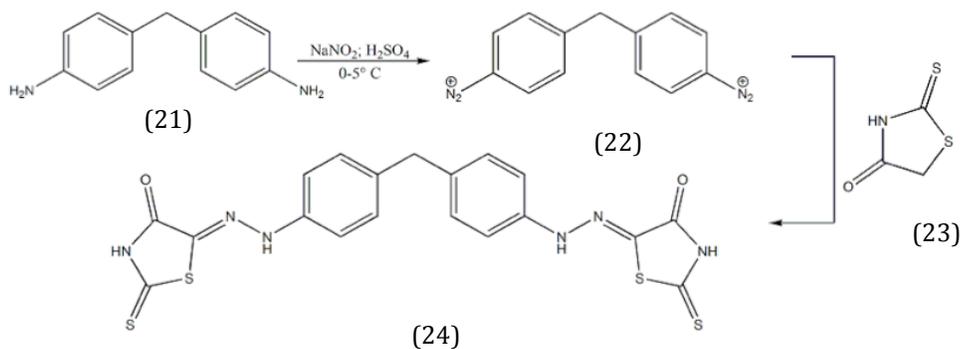
As reações de oxidação ocorrem na posição 1 do anel da tiazolidina-2,4-diona (1) utilizando permanganato de potássio (KMnO_4) em ácido acético aquoso a 5°C , por se tratar de uma reação exotérmica, conduzindo a formação de 1,1-dioxo-2,4-tiazolidinadionas (20) (**Esquema 9**) (LIESEN et al., 2008).



Esquema 9. Exemplo de reação de oxidação

2.3.7. Reações de Diazotação

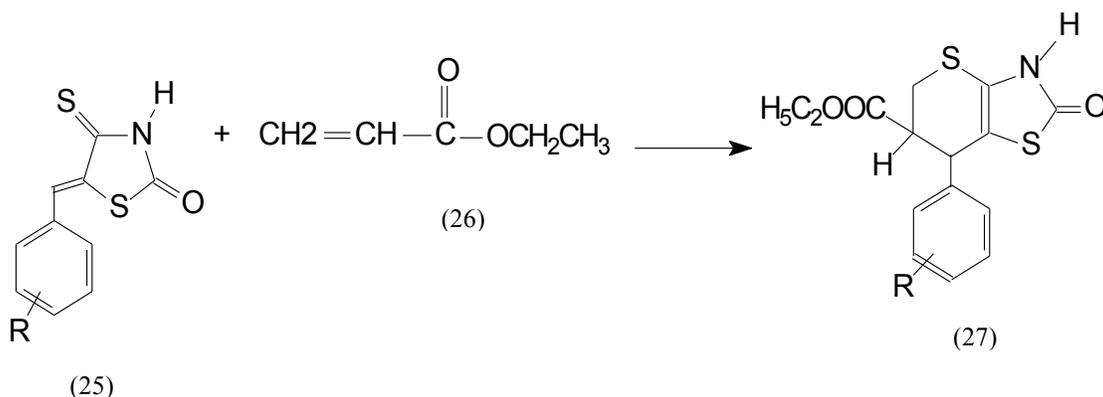
Esse tipo de reação ocorre com o objetivo de produzir uma ligação do tipo $\text{C}=\text{N}$. Eletrófilos reacionais são formados quando uma amina aromática reage com nitrito de sódio na presença de ácido (LIESEN et al., 2008). As tiazolidinonas permitem esse tipo de reação na posição 5 do anel, na qual é evidenciada quando se faz reagir uma bis anilina (21) com nitrito de sódio na presença de H_2SO_4 concentrado na temperatura de $0-5^\circ\text{C}$ produzindo um sal de diazônio (22). Posteriormente é adicionado a tiazolidinona (23), previamente solubilizada que agirá como nucleófilo da reação, levando ao produto (24) (**Esquema 10**) (DIXIT et al., 2012).



Esquema 10. Reação de Diazotação evidenciando a formação da ligação $\text{C}=\text{N}$.

2.3.8. Outras Reações das Tiazolidionas

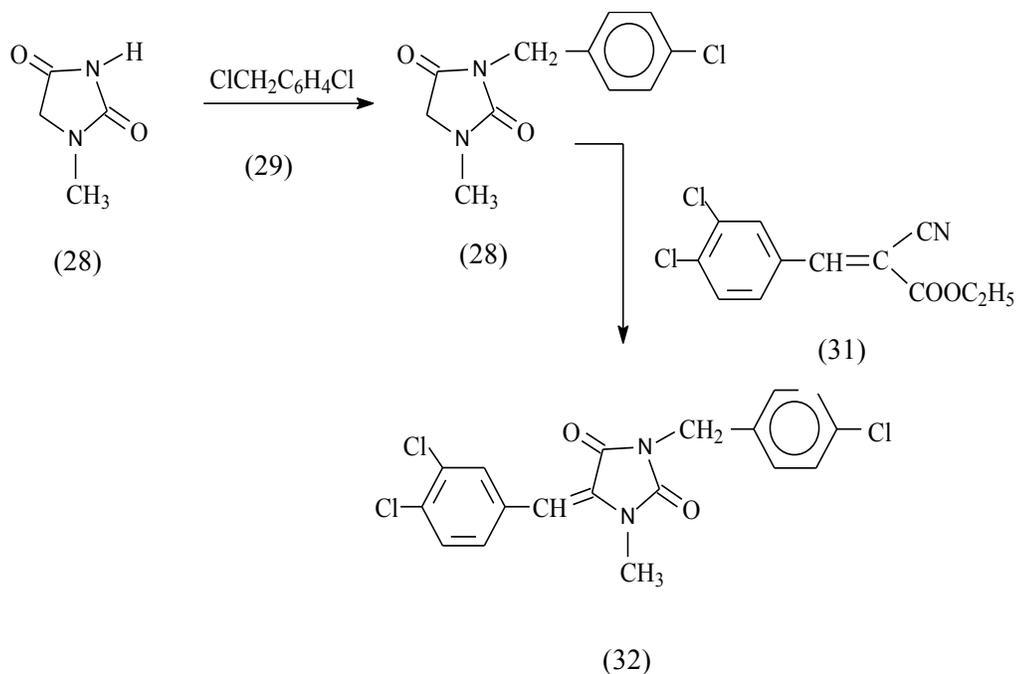
Vários compostos tiopirânicos foram sintetizados por meio do tratamento do 4-Tioxo-5-benzilideno-tiazolidina-2-ona (25) com acrilonitrila ou acrilato de etila (26). Nestas reações foram utilizados benzeno como solvente e piridina como catalizador. Estes compostos são formados via S-β-cianoetilação ou S-β-carboxietilação, seguido pela adição de Michael ao centro insaturado do acrilato de etila formando o composto tiopirâmico (27) (**Esquema 11**) (KASSAB & MESSEHA, 1973).



Esquema 11. Síntese de compostos tiopirânicos (27).

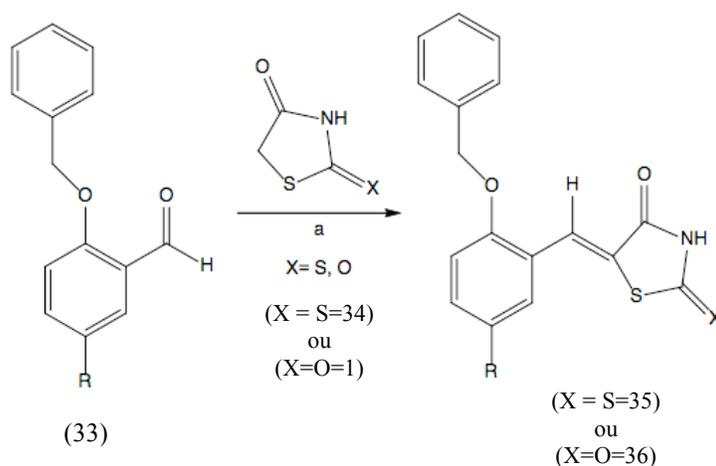
Albuquerque et al., 1999, observaram que a reação de condensação entre o derivado 1-metil-3-(4-clorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona (30), análogo da tiazolidina-2,4-diona (28), e determinados aldeídos substituídos era difícil, pois a posição cinco do anel imidazolidínico estava parcialmente impedida pelo grupo metil, posicionado no nitrogênio do anel heterocíclico.

Deste modo, estes pesquisadores usaram como método alternativo a alquilação do composto (28) com cloreto de 4-clorobenzila (29) para obter o composto intermediário 3-(4-clorobenzil-tiazolidina-2,4-diona) (30). Este derivado reagiu com o éster 2-arilideno-cianoacetato de etila substituído (31), para sintetizar o derivado 1-metil-3-(4-clorobemnzil)-5-(3,4-diclorobenzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (mistura de isômeros *E* e *Z* 8:2) (32) (**Esquema 12**).



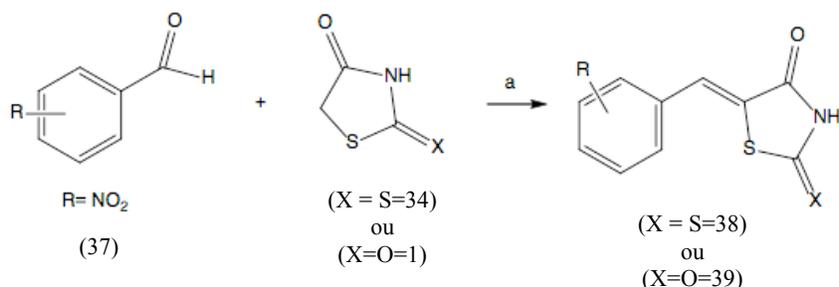
Esquema 12. Síntese do 1-metil-3-(4-clorobenzil)-5-(3,4-diclorobenzilideno)-2,4-diona (32).

Outro grupo de pesquisa (CHEN et al., 2004), por sua vez, empregou acetato de piperidina (como catalizador) em tolueno sob refluxo na condensação de benzaldeídos 2,5- dissustituídos (33) com 2-tioxi-tiazolidina-4-ona (rodanina) (34) ou tiazolidina-2,4-diona (1) (**Esquema 13**).



Esquema 13. Condensação de benzaldeídos com 2-tioxi-tiazolidina-4-ona (34) ou tiazolidina-2,4-diona (1). Reagentes e condições: (a) acetato de piperidina, tolueno, refluxo.

A irradiação por micro-ondas é um novo método que vem inovando a síntese orgânica. Este processo foi utilizado por Zidar et al., 2010, para reduzir o tempo de reação entre aldeídos aromáticos (37) e 2-tioxo-tiazolidin-4-ona (rodanina) (34) ou tiazolidina-2,4-diona (1). O sistema por eles escolhido era anteriormente composto por uma mistura de etanol e ácido acético como solventes e piperidina como catalisador, aquecidos a 150°C. A irradiação por micro-ondas reduziu o tempo reacional para 20 minutos (**Esquema 14**).



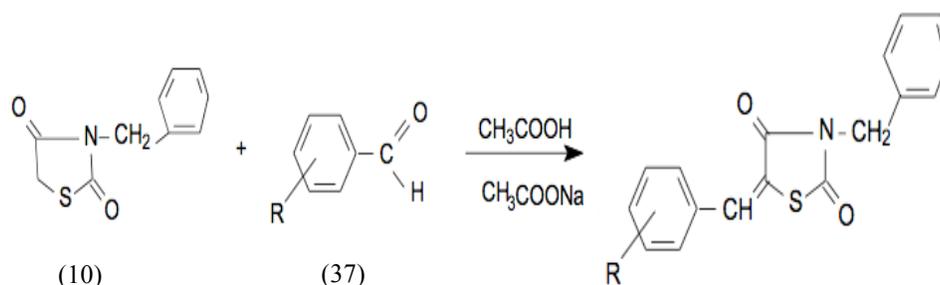
Esquema 14. Síntese de 2-tioxo-tiazolidin-4-ona (rodanina) (38) ou tiazolidina-2,4-dionas 5-substituídas (39). (a) piperidina, AcOH, EtOH, micro-ondas, 20 min.

Os derivados tiazolidínicos e seus análogos isósteros, apresentam um amplo e variado espectro de atividade biológica, existindo diversos estudos a respeito da bioatividade desses compostos.

2.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

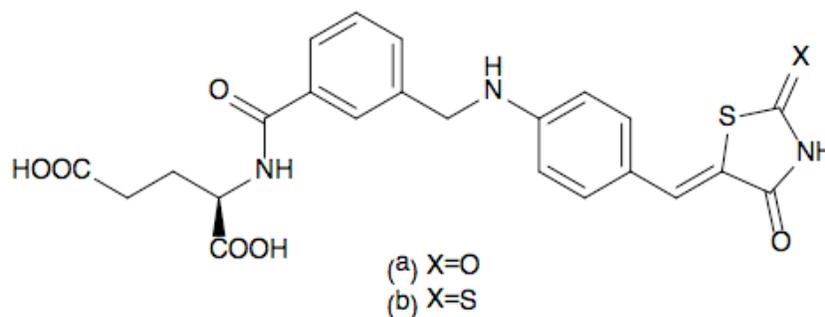
Os derivados tiazolidínicos, bem como seus análogos isósteros são conhecidos por apresentarem atividades biológicas, o que possibilitou, ao longo dos anos, diversos artigos na literatura a respeito de sua bioatividade tanto em propriedades microbiológicas como farmacológicas.

A condensação de benzaldeídos aromáticos (37) com 3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (10) em presença de ácido acético e acetato de sódio rendeu o derivado 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (40) (**Esquema 15**). Os derivados obtidos apresentaram atividade antifúngica frente a *Aspergillus niger* (BRADSHER et al., 1951).



Esquema 15. Síntese dos derivados 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (40).

Derivados do 5-benzilideno-rodanina (41) e da 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona (42) foram sintetizados e avaliados como inibidores da enzima bacteriana MurD. Dentre estes, dois compostos demonstraram maior potencial inibitório, com valores de IC_{50} de 85 e 45 μ M, respectivamente (**Figura 4**) (ZIDAR et al., 2010).



a) X = O (42) e b) X = S (41)

Figura 4. Estrutura dos ácidos (a) (R,Z)-2-[3-({4-[(2,4-dioxotiazolidin-5-ilideno)metil]fenilamino}metil)benzamido]-pentanodióico (42) e (b) (R,Z)-2-[3-({4-[(2-tioxo-4-oxotiazolidin-5-ilidene)metil]fenilamino}metil)benzamido]-pentanodióico (41).

O isômero S do ácido (Z)-2-[3-({4-[(2-tioxo-4-oxotiazolidin-5-ilidene)metil]fenilamino}metil)benzamido]-pentanodióico (41) inibiu a enzima MurD ligase de *Escherichia coli* de forma mais eficiente ($IC_{50} = 10 \mu$ M) que seu isômero R ($IC_{50} = 45 \mu$ M) (TOMASIC et al, 2010).

Uma série de derivados da chalcona contendo grupamentos 2,4-tiazolidinadiona e ácido benzóico foi avaliada quanto à atividade antibacteriana. Dentre os compostos testados, cinco deles se mostraram tão ou mais potentes que os fármacos de referência

(Oxaciclina e Norfloxacin) contra seis bactérias Gram-positivas, incluindo isolados clínicos resistentes a várias drogas. O ácido 4- {[(Z)-2,4-dioxo-5- {4-[(E)-3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il]benzilideno} tiazolidin-3-il]metil}benzóico (43) (**Figura 5**) possui uma maior capacidade inibitória e os resultados sugeriram que o grupo carboxila aparenta ser necessário para a atividade (LIU et al., 2011).

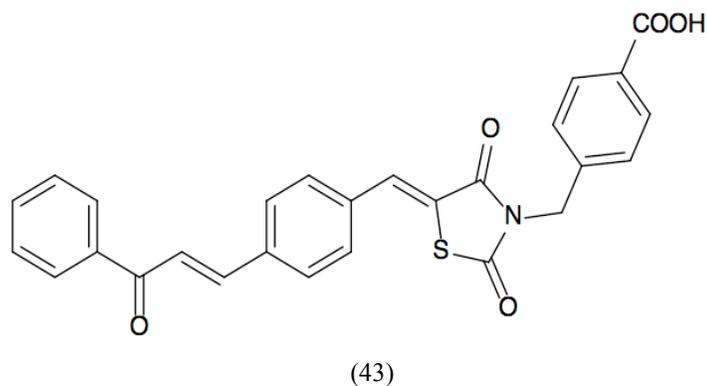
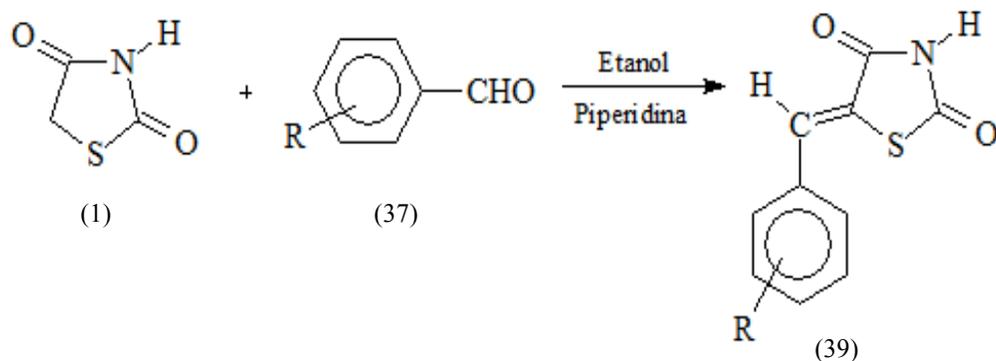


Figura 5. Estrutura do ácido 4- {[(Z)-2,4-dioxo-5- {4-[(E)-3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il]benzilideno} tiazolidin-3-il]metil}benzóico (43).

Derivados do 5-arylideno-tiazolidina-2,4-diona (39) foram sintetizados e a atividade antimicrobiana foi avaliada contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativa, bactérias álcool-ácido resistentes e levedura. Todos os derivados mostraram atividade, moderada, principalmente contra bactérias Gram-positivas, com valores de MIC variando de 2 a 16 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (**Esquema 16**) (SILVA et al., 2014).



Esquema 16. Síntese de derivados 5-arylideno-tiazolidina-2,4-diona (39).

Treze 5-arilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-onas (44) (**Figura 6**) foram sintetizados e avaliados quanto a citotoxicidade contra duas linhagens de células de carcinoma humano (NCIH-292 e HEp-2). Nenhum dos derivados exibiram atividade antiproliferativa significativa na concentração de até 10 µg/mL (GOUVEIA et al., 2009).

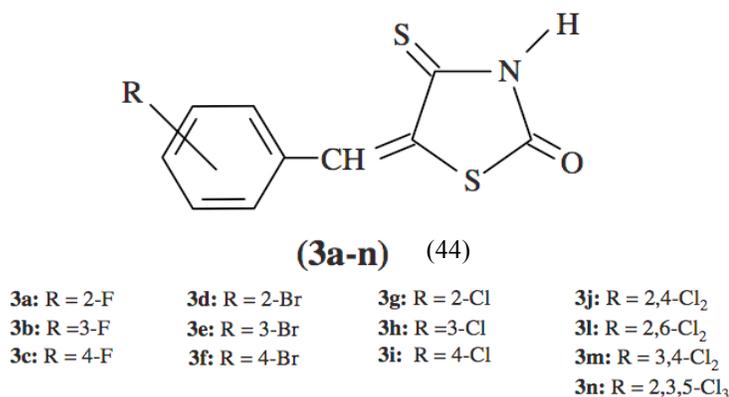


Figura 6. Estrutura dos derivados 5-arilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-onas (44).

Uma triagem da atividade antitumoral foi realizada com várias 4-tiazolidinonas contendo ligante benzotiazol. Dois deles revelaram atividade frente a linhagens de células de leucemia, melanoma, câncer de pulmão, cólon, sistema nervoso central, ovários, rins, próstata e mama. Dentre os compostos testados, um derivado da 2-tioxi-tiazolidina-4-ona (rodanina) substituído nas posições 5 e 3 do núcleo heterocíclico, a 2-{2-[3-(benzotiazol-2-ilamino)-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-ilidenometil]-4-clorofenoxi}-N-(4-metoxifenil)-acetamida (45) (**Figura 7**) mostrou ser o candidato mais ativo, com valores médios de logGI₅₀ e logTGI de -5,38 e -4,45, respectivamente (HAVRYLYUK et al., 2010).

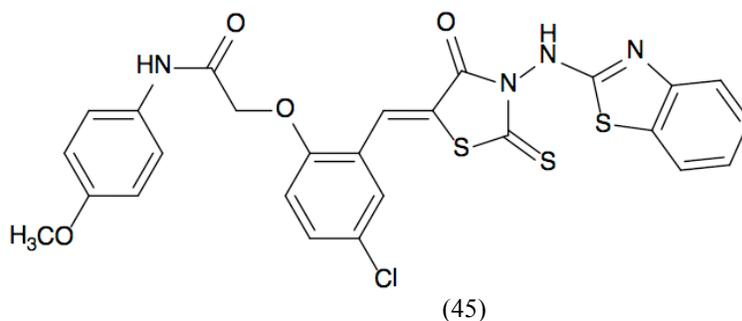
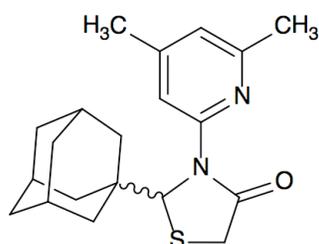


Figura 7. Estrutura da 2-{2-[3-(benzotiazol-2-ilamino)-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-ilidenometil]-4-clorofenoxi}-N-(4-metoxifenil)-acetamida (45).

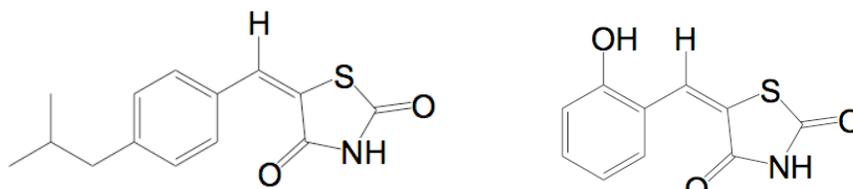
Uma série de novas tiazolidina-4-onas foi avaliada por seu potencial anti-HIV-1. Os derivados contêm um substituinte lipofílico adamantil na posição 2 e diversos substituintes no átomo de nitrogênio do anel tiazolidínico. A (\pm)-2-adamantan-1-il-3-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-tiazolidin-4-ona (46) (**Figura 8**) demonstrou um potencial antiviral marcante ($EC_{50} = 0,35 \mu M$). O substituinte adamantano teve uma importante atuação na eventual atividade antiviral do composto (BALZARINI et al., 2007).



(46)

Figura 8. Estrutura da (\pm)-2-adamantan-1-il-3-(4,6-dimetil-piridin-2-il)-tiazolidin-4-ona (46).

Na tentativa de desenvolver inibidores selectivos de ciclo-oxigenase-2 como enzimas candidatas a fármacos para o tratamento de inflamação e dor, Reanmongkol e Songkram, 2013, sintetizaram dois análogos da tiazolidina-2,4-diona, (E)-5-(4-isobutylbenzylidene)-tiazolidina-2,4-diona (47) e (E)-5-(2-hidroxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (48) (**Figura 9**). Os resultados indicam que os análogos da tiazolidina-2,4-diona possuem atividade sistêmica anti-inflamatória, analgésica, bem como potenciais antipiréticos, mas não têm atividade anti-inflamatória tópica em modelos animais experimentais.



(47)

(48)

Figura 9. Estruturas da (E)-5-(4-isobutylbenzylidene)-tiazolidina-2,4-diona (47) e (E)-5-(2-hidroxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (48).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

A seguir estão descritos todos os objetivos que fazem parte deste trabalho.

3.1. GERAL

O estudo realizado teve como finalidade sintetizar novos derivados da Tiazolidina-2,4-diona e 4-Tioxo-tiazolidina-2-ona, tendo em vista a busca de novos agentes terapêuticos com potencial atividade antimicrobiana e citotóxica.

3.2. ESPECÍFICOS

- Sintetizar a tiazolidina 2,4-diona por meio de reação de ciclização;
- Sintetizar a 4-tioxo-tiazolidina-2-ona por reação de tionação;
- Sintetizar derivados tiazolidínicos substituídos na posição 5 por condensação de Knoevenagel;
- Purificar e determinar as constantes físico-químicas dos produtos obtidos;
- Caracterizar a estrutura química destes compostos por métodos físicos convencionais, tais como: Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H e RMN¹³C), Espectroscopia no Infravermelho (IV) e massas;
- Avaliar a atividade microbiológica dos diferentes compostos tiazolidínicos substituídos, frente a micro-organismos dos grupos Gram-positivos, Gram-negativos, álcool-ácido resistentes e leveduras;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos frente às linhagens tumorais HL-60 (leucemia promielocítica - humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama - humano), e NCI-H292 (carcinoma epidermoide de pulmão - humano).

MATERIAL E MÉTODO

4. MATERIAL E MÉTODO

A seguir serão descritos os materiais e as metodologias empregadas na síntese dos novos derivados tiazolidínicos e na avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica.

4.1. ESTUDO QUÍMICO

Os derivados tiazolidínicos foram obtidos a partir de uma rota sintética já consolidada no Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos - UFPE utilizando mecanismos reacionais de condensação de Knoevenagel e tionação. Os reagents foram obtidos da Sigma-Aldrich e os solventes das marcas Vetec ou Dinâmica.

As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada utilizando placas cromatográficas Merck sílica gel 60 F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas com lâmpada ultravioleta com duplo comprimento de onda (254 ou 366 nm).

As reações mediadas por agitação magnética foram realizadas em banho de óleo com chapa aquecedora Fisatom modelo 752A. As reações foram rotaevaporadas no aparelho Fisatom, modelo 550. Para as reações realizadas por irradiação foi utilizado o banho de ultrassom Unique, modelo USC-1400A, usando frequência de 40 KHz (180 W).

O ponto de fusão foi aferido em capilares usando o fusiômetro da Quimis, modelo 340.23. Quando não especificado pela abreviação “dec” (decomposição), os valores indicam que os produtos se fundiram sem aparente decomposição da amostra.

As substâncias foram pesadas em balança analítica Bel, modelo Mark 210A e algumas foram secas em liofilizador Liobras, L101.

Para todos os compostos foram feitas análises de RMN¹H e RMN¹³C, DEPT e quando necessário, algumas análises bidimensionais. Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C foram obtidos nos instrumentos Varian, modelo Unity Plus (400 MHz para ¹H; 100 MHz para ¹³C) ou Bruker AMX (300 MHz para ¹H e 75.5 MHz para o ¹³C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN¹H foram designadas da seguinte forma: s (singlete); d (dublete); t (triplete); dd (duplo dublete); q (quarteto); m (multiplete).

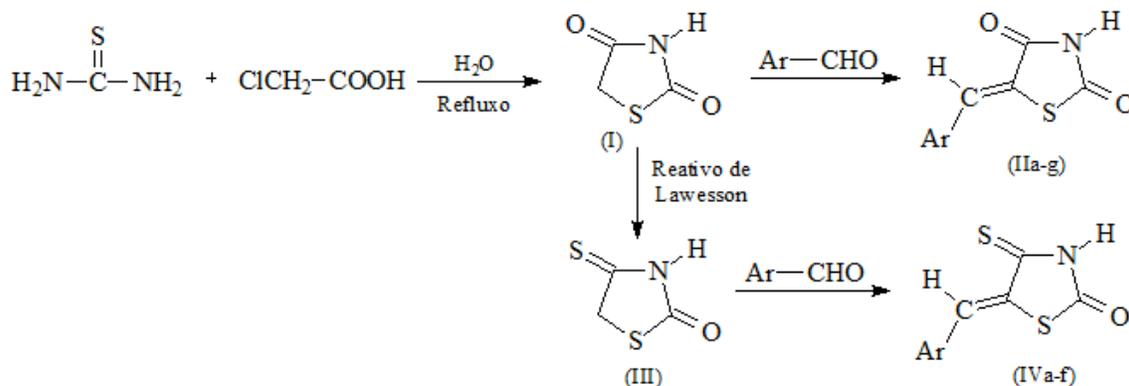
Os espectros de IV foram obtidos em Espectrofotômetro de Absorção no Infravermelho - FTIR Bruker Modelo IFS 66 e PerkinElmer - Spectrum 400 usando

pastilhas de KBr. Para os espectros de massas de alta-resolução (EMAR), foi utilizada a técnica de ionização por electro spray (ESI) nos modos positivos (ESI+) ou negativo (ESI-) com detecção no modo “time-of- flight” (TOF), medido em aparelho LCMS-IT-TOF da Shimadzu.

4.1.1 Metodologias Sintéticas

Os derivados tiazolidínicos foram obtidos em duas séries **A** e **B**. Os compostos 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona, série A, e os derivados 5-arilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-ona, série B. As reações foram desenvolvidas a partir de uma rota sintética já consolidada no Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos do Departamento de Antibióticos da UFPE utilizando mecanismos reacionais de condensação de Knoevenagel e tionação.

As rotas de sínteses deste projeto estão descritas no **Esquema 17**, onde foram escolhidas as séries da tiazolidina-2,4-diona (I) série A e da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III) série B substituídas na posição 5 do anel heterocíclico, visando a realização de suas atividades microbiológicas e citotóxicas. A tiazolidina-2,4-diona é o composto inicial deste esquema e foi obtido pelo método descrito por Libermann em 1948, e modificado por Albuquerque, 1995, onde ocorre a condensação do ácido monocloroacético e a tiouréia em meio aquoso. O composto 4-tioxo-tiazolidina-2-ona foi obtido pela tionação da posição 4 do anel heterocíclico, reagindo com Reativo de Lawesson em Dioxano seco, sob refluxo. Os respectivos compostos obtidos nas reações anteriores foram substituídos na posição 5 do anel heterocíclico por condensação de Knoevenagel com aldeídos.



Esquema 17. Esquema geral de síntese dos derivados da tiazolidina-2,4-diona (I) e 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III).

4.1.2 Síntese da tiazolidina-2,4-diona (I)

Em um balão de fundo redondo foram colocados 10 g (131,3 mmols) de tiouréia, dissolvido em 70 mL de água destilada. A seguir foi adicionado 12,4 g (131,3 mmols) de ácido monocloroacético. A mistura foi mantida sob agitação magnética e refluxo, à temperatura de 100 °C, durante 20 horas. Após o término da reação, os cristais foram filtrados e secos na estufa a 37 °C.

4.1.3 Síntese do 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)

Em balão de fundo redondo e duas entradas foram adicionados 1 g (8,538 mmol) de I e 12 mL de Dioxano seco. Após total solubilização foi adicionado 1,1511 g (2,845 mmol) do Reativo de Lawesson. O balão foi acoplado a um condensador e uma corrente de gás Argônio foi utilizada para expurgar o ar e produzir atmosfera inerte. Em seguida, dois pequenos balões preenchidos com gás Argônio foi acoplado no topo do condensador, previamente vedado, para manter a atmosfera inerte. O sistema foi levado ao banho de óleo e agitação magnética, estabilizado à 90 °C durante 24 horas. Após o término da reação, o excesso de solvente foi rotaevaporado e o conteúdo do balão foi transferido para um Erlemayer e adicionado água destilada. Em seguida a suspensão foi levada para o freezer para a precipitação dos cristais. Após 24 horas, os cristais foram filtrados e liofilizados para secagem da umidade restante.

4.1.4 Síntese geral dos derivados 5-arilidenos-tiazolidina-2,4-diona (IIa-g)

Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,100 g (0,8537 mmol) de I e 4 mL de etanol, sob agitação, havendo total solubilização do composto Inicial a tiazolidina-2,4-diona. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 minutos, quando foi adicionado 0,8537 mmol do benzaldeído substituído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo até o término da reação. O material foi vertido para um

berker e submetido a um banho de gelo havendo precipitação do produto que foi filtrado e purificado por recristalização em etanol. Os cristais foram filtrados e lavados sucessivamente com etanol gelado.

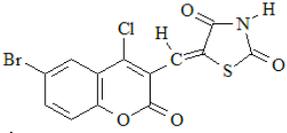
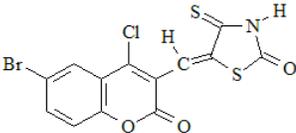
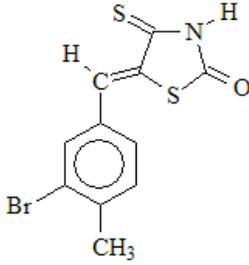
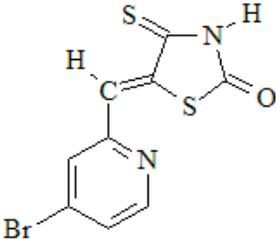
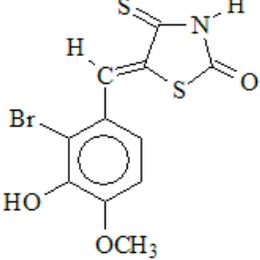
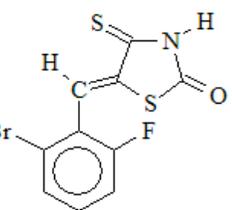
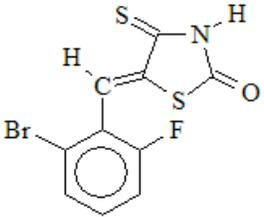
4.1.5 Síntese geral dos derivados 5-arilidenos-4-tioxi-tiazolidina-2-diona (IVa-f)

Em balão de fundo redondo foram adicionados 0,130 g (0,9760 mmol) de **III** e (0,9760 mmol) de acetato de sódio, acrescido de 5 mL de ácido acético glacial, sob agitação contínua, havendo total solubilização do composto Inicial. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente até total solubilização. Em seguida, foi adicionado 0,9760 mmol do benzaldeído substituído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 60 °C, sob agitação magnética e refluxo até ausência total dos reagentes. O material foi vertido para um berker e submetido a um banho de gelo havendo precipitação do produto que foi filtrado, purificado por recristalização e secos em estufa à 37 °C.

A **tabela 1** mostra a estrutura química, nomenclatura de acordo com a IUPAC e os respectivos códigos dos compostos sintetizados.

Tabela 1. Derivados sintetizados, nomenclatura e seus respectivos códigos.

IIa		IIb		IIc	
5-(2-Bromo-6-fluorobenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona		5-(2-Hidroxi-3-bromo-5-clorobenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona		5-(2-Hidroxi-5-clorobenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona	
IId		IIe		IIf	
5-(2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxibenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona		5-(2-Bromo-5-metoxibenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona		5-(3-Bromo-4-metilbenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona	

IIg		IVa		IVb	
5-(6-Bromo-4-cloro-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona		5-(6-Bromo-4-cloro-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetileno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona		5-(3-Bromo-4-metilbenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	
IVc		IVd		IVe	
5-(5-Bromo-piridin-2-ilmetileno)4-tioxo-tiazolidina-2-ona		5-(2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxilbenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona		5-(2-Bromo-6-fluorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	
IVf					
5-(2-Bromo-5-metoxilbenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona					

4.2. ESTUDO BIOLÓGICO

Segue nos tópicos abaixo as metodologias dos teste antimicrobianos e citotóxico.

4.2.1. Avaliação da Atividade Microbiológica

Os testes para avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Fármacos do Departamento de

Antibióticos – UFPE. Foram utilizados os micro-organismos da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos-UFPE, representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* DAUFPE 01, *Micrococcus luteus* DAUFPE 06, *Bacillus subtilis* DAUFPE 16, *Enterococcus faecalis* DAUFPE 138; Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, *Escherichia coli* DAUFPE 224, *Serratia marcescens* DAUFPE 398; álcool-ácido resistentes: *Mycobacterium smegmatis* DAUFPE 71 e levedura: *Candida albicans* DAUFPE 1007.

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes dos micro-organismos teste, com 18-24 horas de incubação à 35 °C nos seguintes meios de cultura:

- Müeller-Hinton ágar – bactérias Gram-positivas e Gram negativas.
- Sabouraud dextrose ágar – *Candida albicans*.
- Glicose extrato de levedura ágar (GL) – *Enterococcus faecalis* e *Mycobacterium smegmatis*.

Suspensões desses inóculos foram padronizadas à densidade óptica de 0,2 de absorvância a 600 nm, equivalentes à turvação 0,5 da escala de McFarland, em solução fisiológica, correspondente a, aproximadamente, 10^7 UFC para bactérias e 10^6 UFC leveduras, obedecendo aos métodos descritos por Barry et al., 2002 e Koneman et al., 2001.

4.2.1.1. Método de difusão em disco de papel

A avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados foi inicialmente realizada pela técnica de difusão em disco de papel, de acordo com Bauer et al., 1966.

Os testes foram realizados com uma solução de 30.000 µg/ml das substâncias em estudo, utilizando DMSO (Dimetilsulfóxido) como solvente.

As suspensões dos micro-organismos teste foram semeadas em placas de Petri contendo 10 mL do meio de cultura apropriado para o micro-organismo. Foram utilizados

discos de 6 mm de diâmetro impregnados com 10 µl da solução, obtendo-se uma concentração de 300 µg por disco.

Os discos foram colocados na superfície do meio semeado com o micro-organismo teste, sendo as placas incubadas de acordo com a exigência do micro-organismo em estudo (**Tabela 2**).

Tabela 2. Condições de crescimento dos micro-organismos utilizados em testes de antagonismo realizados nos compostos obtidos por síntese.

Micro-organismos	Meios de cultura	Temperatura(°C)	Tempo(h)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Micrococcus luteus</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Bacillus subtilis</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Glicose-extrato de levedura ágar	35	48
<i>Enterococcus faecalis</i>	Glicose-extrato de levedura ágar	35	24
<i>Escherichia coli</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Serratia marcescens</i>	Müeller-Hinton	27	24
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud-ágar	30	48

A placa com o micro-organismo *Serratia marcescens* foi deixada à temperatura ambiente para que houvesse produção de pigmentação. Após esse período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, medindo o diâmetro dos halos de inibição formados em torno dos discos. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos halos de inibição em mm e calculado os desvios padrão. Os controles positivos utilizados como padrões foram a ampicilina (10 µg/disco), cefotaxime (30 µg/disco) e kanamicina (30 µg/disco). A escolha desses antibióticos como padrões foi devida à existência do anel tiazolidínico nas penicilinas e derivados relacionados.

4.2.1.2. Metodologia de poços: Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A determinação da CMI foi avaliada segundo os critérios adotados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013). Placas multipoços (96 poços) foram

utilizadas, enumeradas de 1 a 12 na horizontal e em ordem alfabética, de A a H, na vertical. As substâncias foram totalmente dissolvidas em DMSO até formar uma mistura homogênea a 1280 µg/mL intitulada solução mãe, e foi feita uma suspensão padronizada dos micro-organismos teste de acordo com o tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Com exceção da terceira coluna, nas demais colunas foi colocado 100 µL do meio caldo Müeller-Hinton, sendo a segunda coluna o controle negativo, ou seja, contendo apenas 100 µl do caldo Müeller-Hinton; na primeira, foram adicionados 10 µl da suspensão microbiana padronizada aos 100 µL do caldo Müeller-Hinton (controle positivo). Na terceira coluna, foram colocados 180 µL do caldo Müeller-Hinton e depois adicionado 20 µL da solução mãe. A partir dessa coluna foram feitas diluições seriadas de 1:2 ou seja, foram retirados 100 µL da coluna atual e adicionados na coluna seguinte, até a décima segunda coluna. Aos poços das diluições foram colocados 10 µL da suspensão dos micro-organismos teste. A placa foi incubada durante 18-22 horas e após o período de incubação foi aplicado um corante revelador (resazurina sódica), capaz de exibir de forma mais precisa se houve ou não turbidez no poço.

O valor de CMI foi determinado na concentração do último poço onde não houve turbidez visível. A partir deste poço foram feitos semeios por esgotamento em placas com meio Agar Müeller-Hinton, para estabelecer a CMB, que será a concentração onde não houver crescimento de colônias. A CMI foi determinada onde houve 50 % do crescimento bacteriano em relação ao controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata ou quadruplicata.

4.2.2. Avaliação da Citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* foi realizada para verificar a citotoxicidade de substâncias puras em 3 linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrito primeiramente por Mosmann, 1983, e tem a capacidade de analisar a

viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (MOSMANN, 1983).

As linhagens tumorais utilizadas, HL-60 (leucemia promielocítica - humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama - humano), e NCIH-292 (carcinoma epidermoide de pulmão - humano) foram obtidas do Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio DMEN e RPMI, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5 % de CO₂.

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL para as linhagens MCF-7 e NCI H-292. Para a linhagem HL 60, a concentração foi de 3×10^5 células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas, em série, no meio de cultura para obtenção das concentrações finais (25 µg/mL) e distribuídas em placa de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. No final deste período, o meio de cultura com o excesso de MTT foi aspirado e depois, 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A doxorubicina foi utilizada como padrão. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado e comparada com o controle (células apenas com o meio) em espectrofotômetro a 595nm. O valor de CI₅₀ foi definido como a concentração à qual foi observado 50% de inibição do crescimento. Os testes foram realizados em concentrações de 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5; 0,7 e 0,3 µg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos os resultados obtidos da síntese dos novos derivados tiazolidínicos, bem como da avaliação antimicrobiana e citotóxica. Além da discussão desses resultados.

5.1 ESTUDO QUÍMICO

As estruturas químicas foram comprovadas por métodos físicos de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono treze (RMN¹H; RMN¹³C, além de DEPT quando necessário), Infravermelho (IV) e espectrometria de Massas (EMAR).

As propriedades físico-químicas de todos os compostos sintetizados estão expressas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Constantes físico-químicas dos compostos sintetizados.

Composto	Fórmula molecular	Peso molecular	Rend. (%)	Rf	Sistema	PF (°C)
I	C ₃ H ₃ NO ₂ S	117.1264	62	0,46	(0,9: 0,1 CHCl ₃ / MeOH)	120-122
III	C ₃ H ₃ NOS ₂	133.192	54	0,62	(0,7: 0,3 Hexano/AcOEt)	158
Ila	C ₁₀ H ₅ BrFNO ₂ S	302.1196	67.81	0,4	(9,8: 0,2 CHCl ₃ / MeOH)	115-116
Ilb	C ₁₀ H ₅ BrClNO ₃ S	334.5736	42.5	0,47	(9,6: 0,4 CHCl ₃ / MeOH)	197
Ilc	C ₁₀ H ₆ ClNO ₃ S	255.6775	59	0,45	(0,9: 0,1 CHCl ₃ / MeOH)	207
Ild	C ₁₁ H ₈ BrNO ₄ S	330.1545	79.28	0,51	(0,9: 0,1 CHCl ₃ / MeOH)	245 (dec)
Ile	C ₁₁ H ₈ BrNO ₃ S	314.1551	30.45	0,5	(9,6: 0,4 CHCl ₃ / MeOH)	212-213
Ilf	C ₁₁ H ₈ BrNO ₂ S	298.1557	40.2	0,58	(0,9: 0,1 CHCl ₃ / MeOH)	215
Ilg	C ₁₃ H ₅ BrClNO ₄ S	386.6051	92.3	0,45	(0,9: 0,1 CHCl ₃ / MeOH)	178
IVa	C ₁₃ H ₅ BrClNO ₃ S ₂	402.6707	71.42	0,44	(0,9: 0,1 CHCl ₃ / MeOH)	173
IVb	C ₁₁ H ₈ BrNOS ₂	314.2213	81.5	0,56	(8,5: 1,5 CHCl ₃ / MeOH)	214
IVc	C ₉ H ₅ BrN ₂ OS ₂	301.1828	52.91	0,53	(9,6: 0,4 CHCl ₃ / MeOH)	218
IVd	C ₁₁ H ₈ BrNO ₃ S ₂	346.2201	79.47	0,53	(8: 2 CHCl ₃ / MeOH)	125-126
IVe	C ₁₀ H ₅ BrFNOS ₂	318.1852	68.24	0,53	(8,5: 1,5 CHCl ₃ / MeOH)	175
IVf	C ₁₁ H ₈ BrNO ₂ S ₂	330.2207	62.1	0,46	(9,5: 0,5 CHCl ₃ / MeOH)	155

Os rendimentos obtidos foram considerados satisfatórios, exceto os compostos que foram inferiores a 50%. Todavia, os compostos **IIg** e **IVb** tiveram rendimentos superior à 80% (92.3% e 81.5%, respectivamente).

A elucidação estrutural dos novos derivados tiazolidínicos sintetizados permitiu evidenciar a presença de absorções na região de estiramento axial de carbonilas C=O (1610-1768 cm^{-1}) nos espectros de Infravermelho, confirmando assim a formação do anel tiazolidínico. O sinal referente ao carbono da carbonila foi também localizado na RMN¹³C e DEPT. Também foi possível evidenciar a presença de bandas de estiramentos características do grupo funcional N-H (3128-3371 cm^{-1}), além do sinal característico C=C (1570-1635 cm^{-1}) e C=S (1493-1610 cm^{-1}) para os compostos tionados.

A **figura 10** mostra um espectro de infravermelho (IV) referente ao composto **IIe**, no qual é possível identificar o estiramento C=C vinílico em 1588 cm^{-1} . Esse estiramento é uma das confirmações da condenação na posição 5 do anel tiazolidínico. Os estiramentos C=O no núcleo tiazolidínico em 1768 cm^{-1} e 1702 cm^{-1} e o estiramento NH em 3163,2 cm^{-1} .

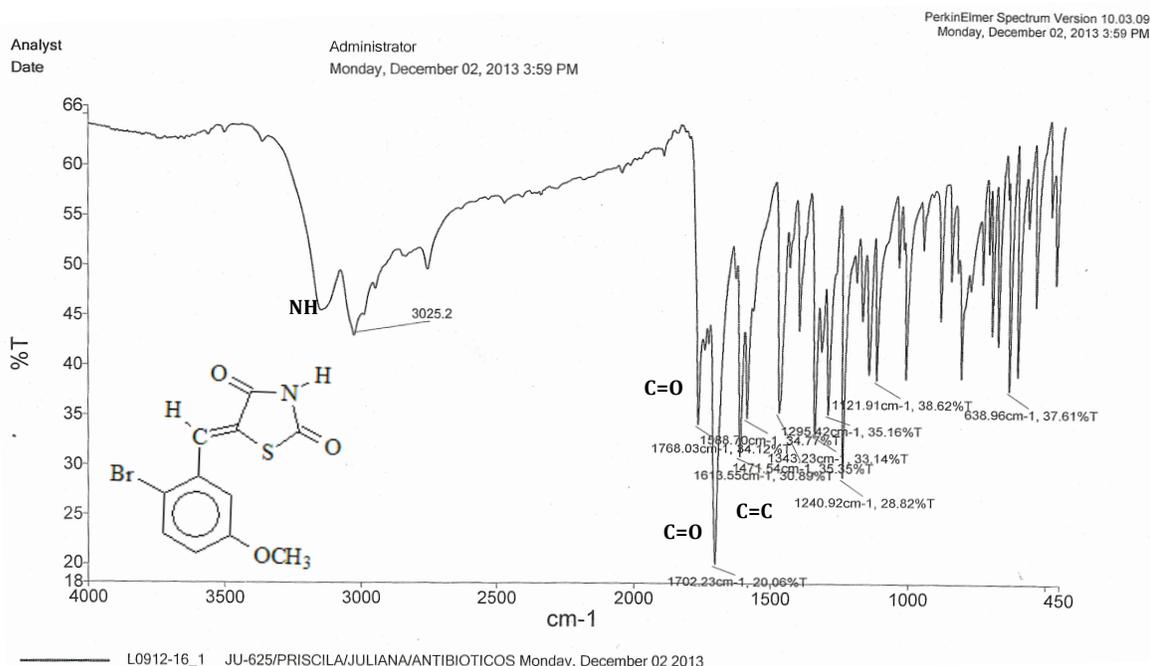


Figura 10. Exemplo de espectro de Infravermelho para o composto **IIe**.

Uma característica espectroscópica, da análise de RMN¹H, dos compostos sintetizados, é a presença de singletos largos referentes ao próton do grupo NH do anel heterocíclico, o qual apresentou deslocamento químico variando de 8,4 a 13,07 ppm. Em todos os espectros analisados foi possível observar sinais de singlete (s), dubleto (d), tripleto (t), duplo dubleto (dd) e/ou multipletos (m) na região característica de grupamentos aromáticos (6,97 a 8,83 ppm). As estruturas com grupo metil (CH₃) ou metoxi (OCH₃) apresentaram deslocamento químico, como singlete integrando para 3 Hidrogênios, na faixa entre 2,37 a 3,89 ppm dependendo do composto.

Na **figura 11**, é possível identificar no espectro de RMN¹H para o composto **IIe** sinais característicos dos prótons (CH₃) em 3,8 ppm, apresentados como singlete. Além disso, os hidrogênios aromáticos benzílicos em 7,03 ppm ($J=6,3$ Hz) e 7,67 ($J=6$ Hz) ppm, como dois dubletos. O hidrogênio vinílico (C=CH) é o resultado da confirmação da condensação, tanto para os derivados **IIa-g** como para **IVa-f**, e aparece como singlete em 7.79 ppm. E o sinal do NH em 12,76 ppm, como singlete largo, foi identificado para **IIe**.

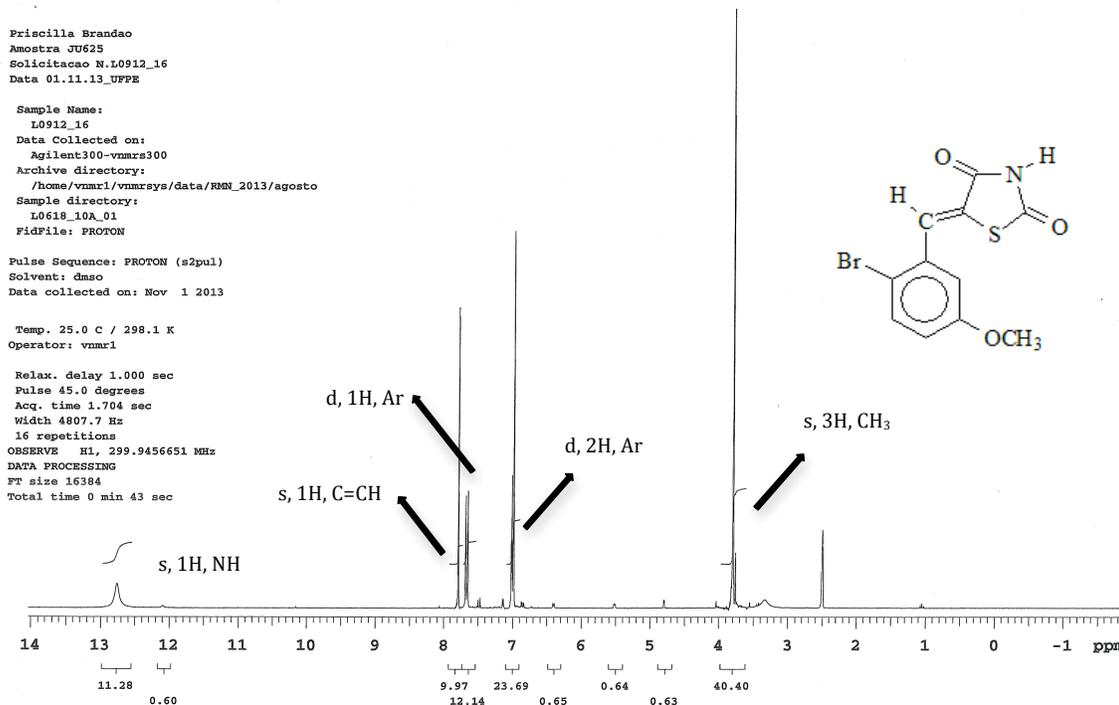


Figura 11. Exemplo de espectro de RMN¹H para o composto **IIe**.

Os hidrogênios vinílicos da dupla ligação exocíclica presentes na posição 5 do

anel tiazolidínico tiveram deslocamentos variando entre 7,70 a 8,98 ppm. Em teoria, é possível obter dois isômeros geométricos (*Z* e *E*) em torno dessa dupla ligação. Todavia, todos os compostos sintetizados exibiram apenas a configuração *Z*, como esperado a partir da literatura e comprovada pelos deslocamentos dos espectros de RMN ^1H (GÓES et al., 2004; GOUVEIA et al., 2009; SILVA et al., 2014). Estes resultados estão de acordo com a literatura confirmados por estudos de cristalografia de raio-X e por RMN ^{13}C , a preferência pela configuração *Z* de derivados 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona (HANDZLIK et al., 2012). O próton vinílico no isômero *E* aparece com valores menores de deslocamento químico devido ao efeito retirador menor do átomo de enxofre da posição 1 (BOZDAĞ-DÜNDAR et al., 2007).

Os espectros de RMN ^{13}C evidenciam as absorções dos átomos de carbono característicos dos derivados tiazolidínicos. Os deslocamentos dos carbonos referentes à carbonila (C=O) do núcleo tiazolidínico são evidenciados nos sinais entre 155,14 a 173,18 ppm. O grupo tiocarbonila (C=S) foi observado entre 169,9 e 180,69 ppm. Os deslocamentos dos carbonos aromáticos variaram entre 108,64-159,83 ppm, devido principalmente a natureza dos substituintes aos quais estes se encontram ligados (F, N, Cl, Br, S).

A **figura 12** revela, para o composto **IIe**, sinais característicos no espectro de RMN ^{13}C do Ju-625 como, por exemplo, as C=O em 166,85 e 167,49 ppm, o C=C-H em 134,28 ppm, o CH $_3$ em 55,63 ppm, os carbonos aromáticos benzílicos em 114,03, 117,82 e 129,36 ppm. O carbono quaternário em 158,81 ppm é característico do carbono 5 do anel tiazolidínico após a condensação. Resultado que confirma a formação do composto pretendido. Essa identificação mais detalhada foi possível devido ao DEPT.

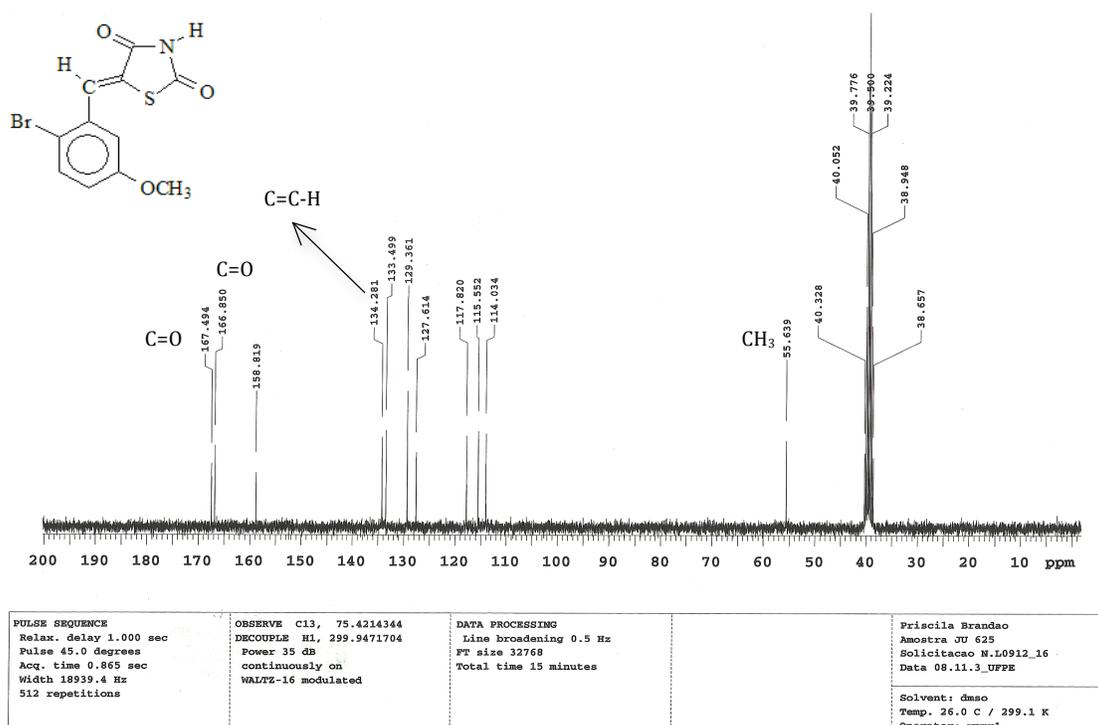
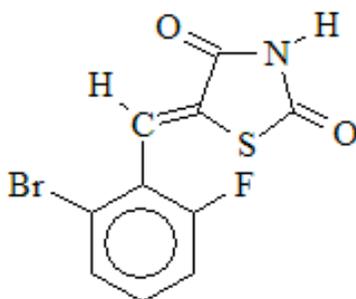


Figura 12. Exemplo de espectro de RMN¹³C para o composto IIe.

5.1.1 5-(2-Bromo-6-fluorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIa)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,100 g (0,8537 mmol) de I e 4 mL de Etanol, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Por fim, foi adicionado 0,1720 g (0,8537 mmol) do 2-Bromo-6-Fluorobenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo

estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo por 29 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido, que foi purificados através de recristalização e filtrações sucessivas em Etanol gelado.

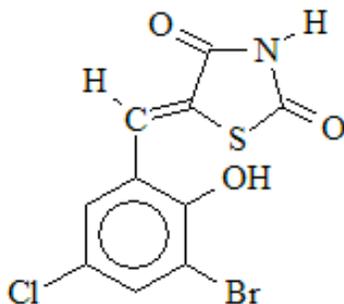
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3164 (N-H), 1735 (C=O), 1703 (C=O) e 1590 (C=C).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7,09-7,15 (t, 1H, Ar, $J=9$ Hz), 7,23-7,30 (m, 1H, Ar), 7,46 (d, 1H, Ar, $J=7.8$ Hz), 7,77 (s, 1H, C=CH), 11,7 (s largo, 1H, NH).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 115,28, 115,58, 127,28, 127,32, 128,94, 129,98, 131,88, 132,00, 162,19 (C=O), 167,19 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado: 301,9118; Encontrado: 302,1196.

5.1.2 5-(2-Hidroxi-3-bromo-5-clorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIb)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,100 g (0,8537 mmol) de (I) e 4 mL de etanol, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Por fim, foi adicionado 0,2010 g (0,8537 mmol) do 2-Hidroxi-3-bromo-5-clorobenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo por 24 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido, que foi purificado por recristalização, filtração e lavagens sucessivas em etanol gelado.

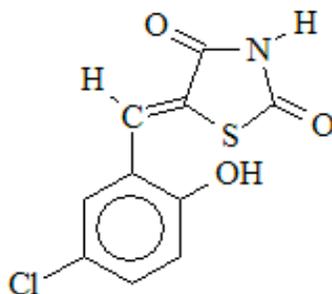
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3157 (N-H), 1720 (C=O), 1698 (C=O) e 1592 (C=C).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3,0 (s, 1H, OH), 7,27 (s, 1H, Ar), 7,7 (s, 1H, Ar), 7,85 (s, 1H, C=CH).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 113,83, 123,52, 124,85, 125,37, 126,59, 126,87, 133,40, 153,19 (C=CH), 168,32 (C=O), 168,47 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado: 334,5736; Encontrado: 335,261.

5.1.3 5-(2-Hidroxi-5-clorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIc)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,200 g (1,707 mmol) de (I) e 5 mL de etanol, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Por fim, foi adicionado 0,2681 g (1,707 mmol) do 2-Hidroxi-5-clorobenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo por 68 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido, que foi purificado por recristalização, filtração e lavagens sucessivas em etanol gelado.

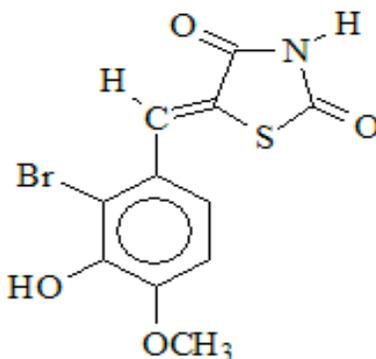
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3128 (N-H), 1723 (C=O), 1680 (C=O) e 1588 (C=C).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3,39 (s, 1H, OH), 6,96 (d, 1H, Ar, $J=8.7$ Hz), 7,23 (d, 1H, Ar, $J=1.8$ Hz), 7,33 (dd, 1H, Ar, $J_1=2.4$ Hz e $J_2=8.7$ Hz), 7,87 (s, 1H, C=CH), 10,86 (s, 1H, NH).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 117.83, 121.67, 123.09, 123.86, 125.57, 127.37, 131.59, 156.02 (C=CH), 167.43 (C=O), 167.8 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado: 255,6775; Encontrado: 254.092.

5.1.4 5-(2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIId)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,200 g (1,707 mmol) de (I) e 5 mL de etanol, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. A seguir, foi adicionado 0,3945 g (1,707 mmol) do 2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo por 28 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido, que foi purificado por recristalização, filtração e lavagens sucessivas em etanol gelado.

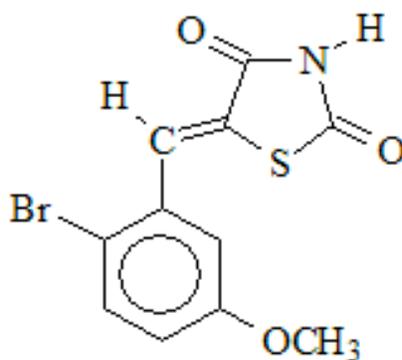
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3257 (N-H), 1734 (C=O), 1701 (C=O) e 1585 (C=C).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.89 (s, 3H, CH₃), 7.16 (d, 1H, Ar, $J=8.1$ Hz), 7.35 (d, 1H, Ar, $J=8.1$ Hz), 7.92 (s, 1H, C=CH), 9,9 (s, 1H, OH), 12.61 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 56.33 (CH₃), 110.84, 113.33, 120.06, 123.87, 125.36, 130.45 (C=CH), 144.62, 149.93, 167.12 (C=O), 167.97 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado: 330.1545; Encontrado: 329.952.

5.1.5 5-(2-Bromo-5-metoxibenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIe)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,200 g (1,707 mmol) de (I) e 5 mL de etanol, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Por fim, foi adicionado 0,3671 g (1,707 mmol) do 2-Bromo-5-metoxibenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo por 5 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido, que foi purificado por recristalização, filtração e lavagens sucessivas em etanol gelado.

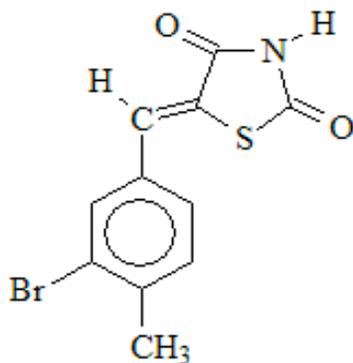
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3163 (N-H), 1768 (C=O), 1702 (C=O) e 1613 (C=C).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.80 (s, 3H, OCH₃), 7.03 (d, 2H, Ar, $J=6.3$ Hz), 7.67 (d, 1H, Ar, $J=6$ Hz), 7.79 (s, 1H, C=CH), 12.76 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 55.63 (CH₃), 114.03, 115.55, 117.82, 127.61, 129.36, 133.49, 134.28 (C=CH), 158.82, 166.85 (C=O), 167.49 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado: 315.983; Encontrado: 314.1551.

5.1.6 5-(3-Bromo-4-metilbenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (IIf)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,200 g (1,707 mmol) de (I) e 5 mL de etanol, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Por fim, foi adicionado 0,3398 g (1,707 mmol) do 3-Bromo-4-metilbenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo por 24 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente, o produto obtido foi purificado por recristalização, filtrado e lavado sucessivas vezes em etanol gelado.

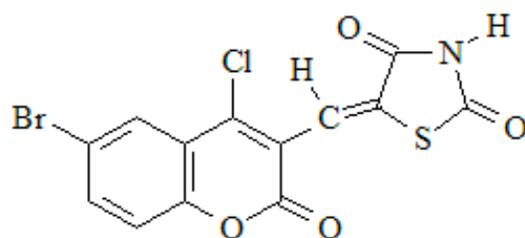
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3205 (N-H), 1745 (C=O), 1673 (C=O) e 1610 (C=C).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.38 (s, 3H, CH₃), 7.48 (m, 2H, Ar), 7.74 (s, 1H, Ar), 7.81 (s, 1H, C=CH), 12.64 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 22.91 (CH₃), 124.7, 125.2, 128.7, 130.5, 132.2, 133.3, 134.0, 140,2, 167.6 (C=O), 168.0 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado: 297.982; Encontrado: 298.1557.

5.1.7 5-(6-Bromo-4-cloro-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (IIg)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foi adicionado 0,150 g (1,280 mmol) de (I) e 6 mL de etanol, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. Em seguida, foram adicionadas 4 gotas de piperidina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Por fim, foi adicionado 0,3681 g (1,280 mmol) do 6-Bromo-4-cloro-3-formilcumarina. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 75 °C, sob agitação magnética e refluxo por 6 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente, o produto obtido foi purificado por recristalização, filtrado e lavado sucessivas vezes em etanol gelado.

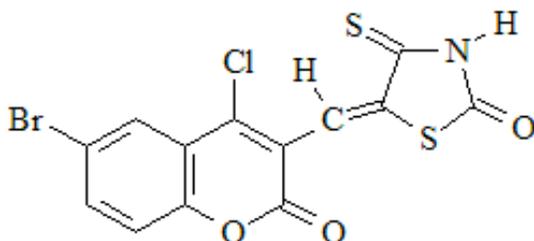
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3371 (N-H), 1686 (C=O), 1632 (C=O), 1610 (C=O) e 1570 (C=C).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.33 (d, 1H, $J=9$ Hz), 7.80 (dd, 1H, $J_1=2.4$ Hz e $J_2=8.7$ Hz), 8.27 (d, 1H, $J=1.8$ Hz), 8.57 (s, 1H, C=CH), 13.07 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 120.9, 129.6, 131.1, 131.2, 131.8, 132.2, 132.9, 137.3, 137.5, 149.54 (C=CH), 152,70 (C=O), 155.14 (C=O), 161.06 (C=O).

EMAR (ESI): Calculado: 386.6051; Encontrado: 377.020.

5.1.8 5-(6-Bromo-4-cloro-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetileno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IVa)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foram adicionados 0,130 g (0,9760 mmol) de (III) e 0,080 g (0,9760 mmol) de acetato de sódio fundido, acrescido de 5 mL de ácido acético glacial, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. A mistura foi mantida sob agitação magnética e à temperatura ambiente até total solubilização. Em seguida, foi adicionado 0,2806 g (0,9760 mmol) de 6-Bromo-4-cloro-3-formilcumarina. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 60 °C, sob agitação magnética e refluxo por 5 horas e meia. Após resfriamento e evaporação do solvente, o produto obtido foi purificado por recristalização, filtrado, lavado sucessivas vezes em clorofórmio e liofilizado.

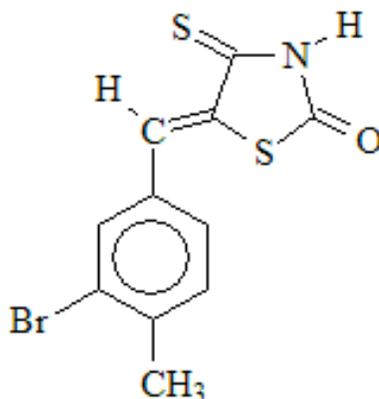
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3350 (N-H), 1728 (C=O), 1664 (C=O), 1635 (C=C) e 1610 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.28 (d, 1H, $J=8.8$ Hz), 7.80 (dd, 1H, $J_1=2.4$ Hz e $J_2=8.8$ Hz), 8.48 (d, 1H, $J=2.4$ Hz), 8.98 (s, 1H, C=CH), 12.78 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆): δ 108.64, 116.51, 116.92, 119.36, 119.60, 126.01, 130.83, 136.10, 149.73 (C=CH), 159.61, 163,07 (C=O), 164.14 (C=O), 169.90 (C=S).

EMAR (ESI): Calculado: 402.6707 Encontrado: 405.852.

5.1.9 5-(3-Bromo-4-metilbenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IVb)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foram adicionados 0,130 g (0,9760 mmol) de (III) e 0,080 g (0,9760 mmol) de acetato de sódio, acrescido de 5 mL de ácido acético glacial, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. A mistura foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente até total solubilização. Em seguida, foi adicionado 0,1942 g (0,9760 mmol) de 3-Bromo-4-metilbenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 60 °C, sob agitação magnética e refluxo por 6 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente, houve cristalização do produto obtido, que foi filtrado sucessivamente em clorofórmio e liofilizado.

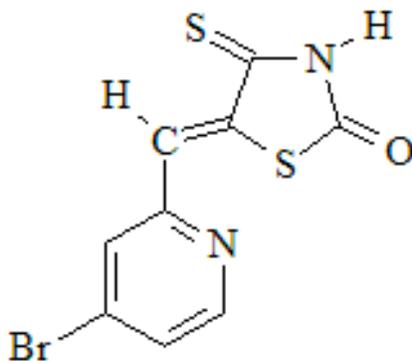
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3322 (N-H), 1677 (C=O), 1573 (C=C) e 1507 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.41 (d, 1H, Ar, $J=7.6$ Hz), 7.47 (d, 1H, Ar, $J=8$ Hz), 7.64 (s, 1H, Ar), 7.79 (s, 1H, C=CH), 9.42 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆): δ 22.41 (CH₃), 124.76, 125.53, 128.45, 129.37, 131.80, 132.56, 134.00, 139,14, 173.18 (C=O), 176.30 (C=S).

EMAR (ESI): Calculado: 314.2213; Encontrado: 315.03.

5.1.10 5-(5-Bromo-piridin-2-il-metileno)4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IVc)



Procedimento reacional: m balão de fundo redondo foram adicionados 0,140 g (1,051 mmol) de (III) e 0,086 g (1,051 mmol) de acetato de sódio, acrescido de 5 mL de ácido acético glacial, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. A mistura foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente até total solubilização. Em seguida, foi adicionado 0,1955 g (1,051 mmol) de 5-Bromo-2-piridinocarboxaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 60 °C, sob agitação magnética e refluxo por 3 horas. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido,

que foi purificado, filtrado por sucessivas vezes em clorofórmio e liofilizado.

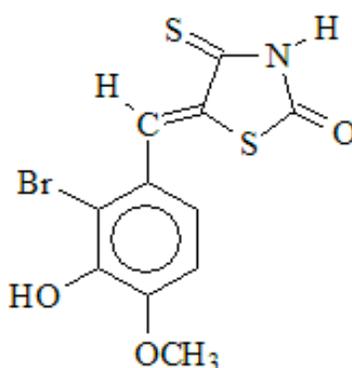
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3200 (N-H), 1658 (C=O), 1580 (C=C) e 1540 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.45 (d, 1H, Ar, $J=8$ Hz), 7.83 (s, 1H, C=CH), 8.11 (dd, 1H, Ar, $J_1=1.6$ Hz e $J_2=8.4$ Hz), 8.83 (d, 1H, Ar, $J=1.6$ Hz), 9.46 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆): δ 119.76, 122.65, 128.15, 133.34, 139.86, 150.31 (C=CH), 173.15 (C=O), 180.69 (C=S).

EMAR (ESI): Calculado: 301.1828; Encontrado: 302.006.

5.1.11 5-(2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxilbenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona



(IVd)

Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foram adicionados 0,150 g (1,126 mmol) de (III) e 0,0924 g (1,126 mmol) de acetato de sódio, acrescido de 6 mL de ácido acético glacial, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. A mistura foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente até total solubilização. Em seguida, foi adicionado 0,2602 g (1,126 mmol) de 2-Bromo-3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 60 °C, sob agitação magnética e refluxo por 1 hora e meia. Após resfriamento e evaporação do solvente, houve cristalização do produto obtido, que foi purificado, filtrado sucessivas vezes em clorofórmio e liofilizado.

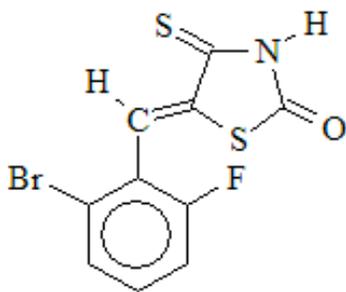
IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3412 (OH), 3300 (N-H), 1669 (C=O), 1570 (C=C) e 1493 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4,87 (s, 1H, OH), 7.06 (dd, 2H, Ar, $J_1=8.8$ Hz e $J_2=8.4$ Hz), 7.85 (s, 1H, C=CH), 8.4 (s, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆): δ 56.21 (OCH₃), 110.56, 112.37, 119.56, 127.35 (C=CH), 127.88, 130.26 144.99, 149.48, 172.45 (C=O), 177.17 (C=S).

EMAR (ESI): Calculado: 346.2201; Encontrado: 349.016.

5.1.12 5-(2-Bromo-6-fluorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IVe)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foram adicionados 0,150 g (1,126 mmol) de (III), 0,2286 g (1,126 mmol) de 2-Bromo-6-fluorobenzaldeído, 0,0924 g (1,126 mmol) de acetato de sódio e 6 mL de ácido acético glacial. Em seguida, o balão foi vedado com tampa esmerilhada e levado ao sonicador, com aquecimento de 60 °C, durante 15 minutos. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido, que foi filtrado sucessivas vezes em clorofórmio e liofilizado.

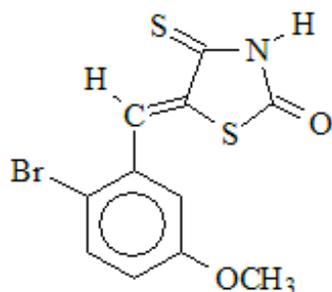
IV, principais sinais (KBr, cm⁻¹): 3222 (N-H), 1678 (C=O), 1595 (C=C) e 1522 (C=S).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.36-7.48 (m, 2H, Ar), 7.60 (m, 1H, Ar), 7.70 (s, 1H, C=CH), 9.77 (s largo, 1H, NH).

RMN¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 120.76, 123.16, 123.20, 124.15, 128.84, 132.20, 137.64, 157.32, 171.45 (C=O), 175.53 (C=S).

EMAR (ESI): Calculado: 318.1852; Encontrado: 317.115.

5.1.13 5-(2-Bromo-5-metoxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IVf)



Procedimento reacional: Em balão de fundo redondo foram adicionados 0,150 g (1,126 mmol) de (III) e 0,0924 g (1,126 mmol) de acetato de sódio fundido, acrescido de 6 mL de ácido acético glacial, sob agitação, havendo total solubilização do Inicial. A mistura foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente até total solubilização. Em seguida, foi adicionado 0,2432 g (1,126 mmol) de 2-Bromo-5-metoxibenzaldeído. O balão foi levado ao banho de óleo estabilizado à 60 °C, sob agitação magnética e refluxo por 2 horas e meia. Após resfriamento e evaporação do solvente houve cristalização do produto obtido, que foi purificado filtrado sucessivas vezes em clorofórmio e liofilizado.

IV, principais sinais (KBr, cm^{-1}): 3276 (N-H), 1691 (C=O), 1583 (C=C) e 1515 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 3.78 (s, 3H, OCH₃), 6.97 (d, 1H, Ar, $J=7.8$ Hz), 7.13 (s, 1H, Ar), 7.63 (d, 1H, Ar, $J=7.8$ Hz), 7.83 (s, 1H, C=CH), 9.76 (s largo, 1H, N-H).

RMN¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-d₆): δ 55.61 (OCH₃), 114.38, 114.70, 117.16, 126.10, 133.68, 133.84, 135.98, 158.72 (C=C), 172.26 (C=O), 176.31 (C=S).

EMAR (ESI): Calculado: 341.102; Encontrado: 330.2207.

5.2 ESTUDO BIOLÓGICO

Os resultados das atividade microbiológicas e citotóxicas dos compostos sintetizados estão descritos nos itens a seguir.

5.2.1 Atividade Microbiológica

Os resultados da avaliação do teste de difusão em disco de papel estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de compostos testados contra cepas bacterianas e levedura, utilizando o método de difusão em disco (diâmetro do halo de inibição em mm).

Código	Micro-organismos								
	Bactéria Gram-positiva				Bactéria Gram-negativa			Bactéria Álcool- ácido resistente	Levedura
	<i>Sa</i>	<i>Ml</i>	<i>Bs</i>	<i>Ef</i>	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Sm</i>	<i>Ms</i>	<i>Ca</i>
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	19	26	21	22	0	0	0	18	19
IIa	21,66 ± 3,78	30	19,33 ± 0,57	9,66 ± 0,57	0	0	0	14	0
IIb	20,33 ± 0,57	35,33 ± 0,57	20	15,66 ± 0,57	0	0	0	15	0
IIc	19	18,66 ± 1,15	20,33 ± 0,57	16,66 ± 0,57	0	0	0	14,33 ± 0,57	0
IId	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IIe	16,33 ± 0,57	15,66 ± 0,57	11	0	0	0	0	0	0
IIf	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IIg	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IVa	10	0	12	0	0	0	0	9	0
IVb	17	21 ± 1	36	0	0	0	0	0	0
IVc	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IVd	0	11,33 ± 1,52	13,66 ± 0,57	0	0	0	0	0	0
IVe	22	23,33 ± 1,52	22,33 ± 0,57	12	0	0	0	8	0
IVf	16,66 ± 0,57	11,66 ± 0,57	40	0	0	0	0	9	0
Kanamicina (30 µg/disc)	22,33 ± 0,58	27 ± 1,0	13,33 ± 0,58	13 ± 1,0	14,6 ± 0,58	14,66 ± 0,58	14,66 ± 0,58	40 ± 1,0	NT
Cefotaxime (30 µg/disc)	34	45	25	12	22	38	36	15	24 ± 1,0
Ampicilina (10 µg/disc)	38	45	28	24	NT	20	NT	NT	NT

Os resultados representam a média ± desvio padrão.

Sa, *S. aureus*; *Bs*, *B. subtilis*; *Ml*, *M. luteus*; *Ef*, *E. faecalis*; *Pa*, *P. aeruginosa*; *Ec*, *E. coli*; *Sm*, *S. mar-cescens*; *Ms*, *M. smegmatis*; *Ca*, *C. albicans*.

Treze derivados tiazolidínicos substituídos na posição 5 do anel heterocíclico foram sintetizados, nove deles apresentaram atividade frente a, no mínimo, duas cepas testadas.

Os valores de halo de inibição para os compostos **I** e **II** foram obtidos pelo nosso grupo de pesquisa e divulgado por Gouveia et al, 2009. Os resultados mostram que após a

tionação da carbonila 4 do composto **I**, o composto obtido (**III**) passa a apresentar atividade antimicrobiana. Apenas para *Mycobacterium smegmatis*, não é observado halo de inibição maior que 8 mm.

Os compostos 5-arlideno-tiazolidina-2,4-dionas (**IIa-g**) e 5-arlideno-4-tioxo-tiazolidina-2-onas (**IVa-f**) mostraram atividade contra bactérias Gram-positivas e Álcool-ácido resistentes, mas não apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas e *Candida albicans*.

O composto **IVe** foi o que apresentou melhor resposta frente a *S. aureus* com halo de inibição de 22 mm, seguido dos compostos **IIb** (20.33 mm) e **IIa** (21.66 mm). Esses resultados foram próximo ao padrão Kanamicina com halo de 22.33 mm.

Os melhores resultados frente a cepa do *M. luteus* foi evidenciado com os compostos **IIb** (35.33 mm) e **IIa** (30 mm), que foram superior ao padrão Kanamicina (27 mm) para esse micro-organismo. A **figura 13** evidencia os halos de inibição dos compostos **IIa** (A), **IIb** (B) e **IIc** (C) frente ao *M. luteus*.

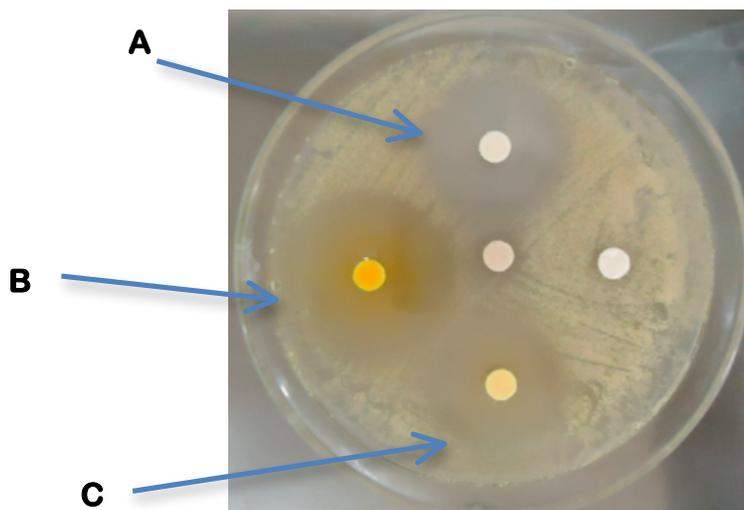


Figura 13. Halos de inibição dos compostos **IIa** (A) (30 mm), **IIb** (B) (35.33 mm) e **IIc** (C) (18.66 mm) frente ao micro-organismo *M. luteus*.

Os compostos **IVb** e **IVf** apresentaram halo de 36 mm e 40 mm, respectivamente frente ao micro-organismo *B. subtilis*. Esses halos foram maiores que os três padrões Kanamicina (13.33 mm), Cefotaxime (25 mm) e Ampicilina (28 mm). O **IIa** (29.33 mm), **IIb** (20 mm), **IIc** (20.33 mm), **IVd** (13.66 mm) e **IVe** (22.33 mm), também revelaram halos de inibição superior ao padrão Kanamicina para essa cepa.

A cepa de *E. faecalis* apresentou resultados mais sensíveis frente aos compostos **IIc** (16.66 mm) e **IIb** (15.66 mm). Resultados maiores que para os padrões Cefotaxime (12 mm) e Kanamicina (13 mm). O **IVe** (12 mm) tendo apresentado halo de inibição igual ao controle Cefotaxime.

Os compostos que apresentaram melhor resposta frente à bactéria Álcool-ácido resistente (*M. smegmatis*) foram o **IIb** (15 mm), **IIa** (14 mm) e **IIc** (14.33 mm). Esses resultados foram semelhantes ao padrão Cefotaxime (15 mm).

Em estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa e publicado por Silva et al., 2014, foi evidenciado que dois 5-arilideno-tiazolidina-2,4-dionas tiveram halo de inibição maior que 30 mm para os micro-organismos *M. luteus* e *B. subtilis*. O composto 5-(2,4-Diclorobenzilideno)-tiazolidina-2-ona (32 mm e 30.7 mm) para *M. luteus* e *B. subtilis*, respectivamente. E o 5-(3,4-Diclorobenzilideno)-tiazolidina-2-ona (34 mm) para *M. luteus*. Resultados semelhantes aos encontrados nessa análise.

Gouveia et al, 2009 sintetizou o 5-(4-Bromobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona, o qual foi o único, dos trezes obtidos, que apresentou halo acima de 30 mm (31 mm) para *S. aureus*. Porém, de forma geral, obteve resultados muito bons, visto que todos apresentaram halo de inibição, inclusive para *C. albicans*. Esse resultado diverge com o que obtivemos, pois para os compostos sintetizados nesse trabalho, não foi evidenciada atividade para *C. albicans*. Entretanto, se assemelham em relação ao *S. aureus*.

Os derivados da tiazolidina-2,4-diona substituída nas posições 3 e 5 sintetizados por Boja et al., 2012, apresentaram atividade contra duas bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) e dois fungos (*C. albicans* e *A. niger*), além das Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*). Esse resultado evidencia que a substituição na posição 3 do anel tiazolidinico pode conferir tal atividade para essas moléculas, visto que apenas a substituição na posição 5 não apresentou atividade para esses tipos de micro-organismos.

Quatro derivados não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhuma cepa testada. Três desses compostos (**IIId**, **IIIf** e **IIIg**) têm os mesmos arilidenos que foram substituídos na posição 5 do 4-Tioxo-tiazolidina-2-ona, são estes (**IVd**, **IVb** e **IVa**). Todavia, esses representantes evidenciaram atividade para *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* e *M. smegmatis* (**Figura 14**). Os resultados reforçam que a tionação da Tiazolidina-2,4-diona na posição 4 tende a melhorar atividade biológica do composto final.

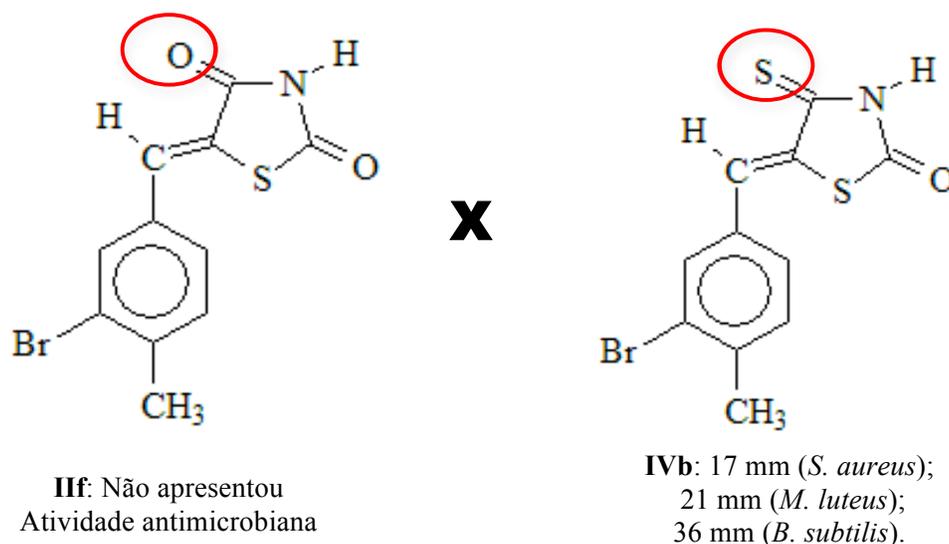


Figura 14. Exemplo de atividade antimicrobiana após tionação da carbonila da posição 4 do anel tiazolidínico.

Os compostos que apresentaram halo de inibição superior a 15 mm de diâmetro foram submetidos aos testes para determinar a CMI e CMB (**Tabela 5**).

Tabela 5. Os valores de CMI e CMB (em $\mu\text{g/mL}$) contra cepas de bactérias Gram-positivas.

Código	Micro-organismos							
	<i>S. aureus</i>		<i>M. luteus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>E. faecalis</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
IIa	>128	>128	32	64	128	>128	-	-
IIb	16	32	16	32	32	32	16	32
IIc	128	>128	8	16	128	128	32	64
IIf	8	>128	16	>128	-	-	-	-
IVb	128	>128	4	32	4	4	-	-
IVe	>128	>128	4	16	32	32	-	-
IVf	128	>128	4	16	32	64	-	-
Cefalexina	8	16	<2	2	<2	<2	>128	>128

Os resultados mostraram efeitos inibitórios significativos, e a maioria dos compostos exibiram valores de CMI entre 4-16 $\mu\text{g/mL}$.

Este grupo de derivados tiazolidínicos evidenciou uma elevada atividade contra *M. luteus*. Os compostos **IVb**, **IVe** e **IVf** apresentaram CMI 4 $\mu\text{g/mL}$ para este micro-organismo, valor próximo ao padrão Cefalexina (<2 $\mu\text{g/mL}$).

O composto **IIe** apresentou uma CMI igual ao padrão (8 $\mu\text{g/mL}$) para o *S. aureus* e o **IIb** (16 $\mu\text{g/mL}$). O **IVb** apresentou CMI (4 $\mu\text{g/mL}$) próxima ao padrão (<2 $\mu\text{g/mL}$) para o *B. subtilis*.

Os compostos **IIb** (CMI: 16 $\mu\text{g/mL}$ e CMB 32 $\mu\text{g/mL}$), e **IIc** (CMI: 32 $\mu\text{g/mL}$ e CMB 64 $\mu\text{g/mL}$), obtiveram potência superior ao padrão para o *E. faecalis* (CMI e CMB >128 $\mu\text{g/mL}$).

O composto (Z)-5-(2,3,4-Trifluorobenzilideno)-rodanina sintetizado por Tomasic et al., 2010, inibiu o crescimento de *S. aureus* a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e *S. aureus* resistente a Metilicina (MRSA) de 32 $\mu\text{g/mL}$. Uma forte atividade antimicrobiana contra *S. aureus* foi observada para compostos que ostentam o anel rodanina, maior que aqueles que contêm outros grupos heterocíclicos. Nenhum dos compostos 5-Benzilideno-tiazolidina-4-ona and 5-benzilideno-pirimidino-4,6-diona inibiram o crescimento de bactérias gram-negativas *E. coli* ou *P. aeruginosa*.

5.2.2 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica *in vitro* dos compostos (**IIa-g**) e (**IVa-f**) foi realizada pelo ensaio de MTT frente às células HL 60 (leucemia promielocítica - humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama - humano), e NCI-H292 (carcinoma epidermoide de pulmão - humano). A Tabela 6 mostra os valores do efeito da inibição do crescimento (% de inibição) nas linhagens celulares testadas (em 25 $\mu\text{g/mL}$).

Treze derivados tiazolidínicos substituídos na posição 5 do anel heterocíclico foram sintetizados e testados. Oito deles apresentaram inibição do crescimento tumoral superior a 70 %, frente a, no mínimo, uma linhagem celular. Os compostos **IIe** e **IIf** apresentaram inibição frente às três linhagens testadas (**Tabela 6**).

Tabela 6. Efeito da inibição do crescimento (% de inibição) em linhagens celulares de carcinoma humano (em 25 µg/mL).

Código	LINHAGENS		
	NCI-H292	HL60	MCF-7
IIa	83,6 ± 2,7	100,0	56,5 ± 6,7
IIb	77,7 ± 5,0	100,0	69,0 ± 2,6
IIc	74,0 ± 1,6	100,0	47,2 ± 9,5
IId	54,6 ± 0,5	99,9 ± 0,1	33,4 ± 2,4
IIe	100,0	100,0	76,3 ± 0,2
IIf	99,0 ± 0,8	100,0	79,2 ± 2,1
IIg	0,0	24,06 ± 0,9	14,68 ± 1,5
IVa	3,9 ± 3,7	97,43 ± 1,0	48,89 ± 1,8
IVb	34,2 ± 2,5	37,46 ± 3,5	2,96 ± 2,6
IVc	38,87 ± 1,5	3,62 ± 15,1	45,59 ± 2,3
IVd	12,23 ± 0,23	0,0	4,25 ± 23,2
IVe	57,71 ± 3,6	49,31 ± 9,8	24,49 ± 0,3
IVf	47,25	76,28	61,21

Os resultados representam a média ± desvio padrão.

Cinco compostos inibiram mais de 70% o crescimento celular da linhagem NCI-H292: **IIa** (83,6%), **IIb** (77,7%), **IIc** (74,0%), **IIe** (100,0%) e **IIf** (99,0%). A série **IV** apresentou um potencial de inibição inferior a 60% frente a essa linhagem.

O 5-(6-Bromo-4-cloro-2-oxo-2H-cromen-3-ilmetileno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**IVa**), apresentou alta seletividade para a linhagem HL-60 com percentual de inibição de 97,43%, enquanto apresentou (3,9%) para NCI-H292 e (48,89%) para MCF-7.

A linhagem HL-60 foi a mais sensível frente aos outros derivados tiazolidínicos sintetizados. Oito compostos apresentaram inibição superior a 70%: **IIa** (100,0%), **IIb** (100,0%), **IIc** (100,0%), **IId** (99,9%), **IIe** (100,0%), **IIf** (100,0%), **IVa** (97,43%) e **IVf** (76,28%).

A linhagem MCF-7 foi a mais resistente inibindo a proliferação celular, onde apenas o **IIe** (76,3%) e **IIf** (79,2%) apresentaram inibição superior a 70 %.

Os derivados tiazolidínicos sintetizados que apresentaram citotoxicidade acima de 70% no teste de concentração única foram submetidos a diluições para avaliar a IC₅₀, onde foi definido como a concentração à qual se observou 50% de inibição do crescimento. Os valores obtidos nesse teste estão descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7. IC₅₀ (em µg/mL) para os compostos que apresentaram inibição de crescimento acima de 70% no teste de concentração única.

Código	LINHAGENS		
	NCI-H292	HL60	MCF-7
IIa	15,43	9,07	-
IIb	10,96	16,12	-
IIc	16,96	10,21	-
IId	-	9,17	-
IIe	1,26	2,05	3,45
IIf	4,12	7,42	6,71
IVa	-	*	-
IVf	-	*	-

* contaminação celular.

Os compostos evidenciaram moderada capacidade de inibir o crescimento das células tumorais testadas, exceto o **IIe**, que apresentou IC₅₀ inferior a (4 µg/mL) para as três linhagens celulares testadas: (NCI-H292) 1,26 µg/mL, (HL60) 2,05 µg/mL e (MCF-7) 3,45 µg/mL. No protocolo estabelecido no experimento (o composto é ativo, quando a IC₅₀ apresenta valor igual ou inferior a (4µg/mL) (GERAN et al, 1972; FERRARI et al, 1992).

Estes resultados foram considerados bons, entretanto outros derivados do composto 4-tioxi-tiazolidina-2-ona sintetizados por Gouveia et al., 2009, não foram capazes de inibir 50% da proliferação celular para as linhagens Hep-2 e NCI-H292, na concentração de até 10 µg/mL.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Treze derivados tiazolidínico inéditos foram sintetizados, purificados e suas constantes físico-químicas determinadas;
- Todos os compostos tiveram rendimento acima de 40%;
- Nove compostos apresentaram atividade frente a, no mínimo, duas cepas testadas. Todavia, nenhum inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas e levedura.
- De maneira geral, os derivados do 4-tioxo-tiazolidina-2-ona apresentaram maior halo de inibição quando comparados com os arilidenos derivados da tiazolidina-2,4-diona;
- Os compostos **IVb** e **IVf** apresentaram os maiores halos de inibição frente ao micro-organismo *B. subtilis*, 36 mm e 40 mm, respectivamente. Estes resultados foram superiores ao dos três padrões testados.
- Os resultados mostraram efeitos inibitórios significativos contra as cepas testadas, e a maioria dos compostos exibiram valores de CMI entre 4-16 µg/mL.
- Oito compostos apresentaram inibição citotóxica superior a 70%, frente a, no mínimo, uma linhagem celular. Os compostos **IIe** e **IIif** apresentaram inibição frente às três linhagens testadas.
- O composto **IIe** apresentou IC₅₀ inferior a (4 µg/mL) para as três linhagens celulares testadas.
- Avaliar outras atividades biológicas dos derivados sintetizados;
- Otimizar a metodologia de síntese dos compostos que não apresentaram rendimentos satisfatórios;
- Sintetizar os mesmos derivados pela metodologia de ultrassom para estudo comparativo entre as duas metodologias.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos arilidenos sintetizados frente a cepas multirresistentes;
- Avaliar a atividade antitumoral frente a outras linhagens celulares de carcinoma humano.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J. F. C., AZEVEDO L. C., GALDINO S. L., CHANTEGREL J., ROCHA, P. I., LUU-DUC C. Synthèse et étude structurale des 5-arylidène thiazolidine-2,4-diones et 4-thio-imidazolidine-2-ones-3-substituées. **Ann. Pharm. Française**, 53 (5): 209-214, 1995.

ALBUQUERQUE, J. F. C., ROCHA FILHO, J. A., BRANDÃO, S. S. F., LIMA, M. C. A., XIMENES, E. P. C. A., GALDINO, S. L., CHANTEGREL, J., PERRISIN, M. Syntheses and Antimicrobial Activity of Substituted Imidazolidinediones and Thioxo-Imidazolidinediones. **Il Farmaco (Pavia), Itália**. 54: 77-82, 1999.

ALEGAON, S. G., ALAGAWADI, K. R. New thiazolidine-2,4-diones as antimicrobial and cytotoxic agent. **Med Chem Res**. 21: 3214–3223, 2012.

AMIN, K. M., RAHMAN, A. D. E., AL-ERYANI, Y. A. Synthesis and preliminary evaluation of some substituted coumarins as anticonvulsant agents. **Bioorg. Med. Chem**. 16: 5377- 5388, 2008.

BALZARINI, J., ORZESZKO, B., MAURIN, J. K., ORZESZKO, A. Synthesis and anti-HIV studies of 2-adamantyl- substituted thiazolidin-4-ones. **Eur. J. Med. Chem**. 42 (7): 993-1003, 2007.

BARRY, A. L., PFALLER, M. A., RENNIE, R. P., FUCHS, P. C., BROWN, S. D. Precision and Accuracy of Fluconazole Susceptibility Testing by Broth Microdilution, E-test and Disk Diffusion Methods. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. 46 (6): 1780-1784, 2002.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical**

Pathology. 45 (4): 493–496, 1966.

BOJA, P., PRAJWAL, L. L., MANJUNATHA, K., PRATHIBHA, A., KUMARI, N.S. Novel thiazolidine-2,4-dione mannich bases: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. **Der Pharma Chemica.** 4 (3): 867-871, 2012.

BOZDAĞ-DÜNDAR, O., ÖZGEN, Ö., MENTEŞE, A., ALTANLAR, N., ATLI, O., KENDI, E., ERTAN, R. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 15(18): 6012-7, 2007.

BRADSHER, C. K., BROWN, F. C., GRANTHAM, R. J. Rhodanine derivatives in reactions of the Michael type. **J. Am. Chem. Soc.** 73: 5377-5379, 1951.

BROWN, F. C. 4-Thiazolidinones. **Chem. Rev.** 61 (5): 463–521, 1961.

CHEN, H., FAN, Y. H., NATARAJAN, A., GUO, Y., IYASERE, J., HARBINSKI, F., LUUS, L., CHRIST, W., AKTAS, H., HALPERIN, J.A. Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2,4-dione and 2,4-thione derivatives as inhibitors of translation initiation. **Bioorg. Med. Chem.** 14: 5401–5405, 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne, PA. 23rd informational supplement M100-S23, USA, 2013.

CUNHA, S., SANTANA, L. L. B. Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de meldrum em água: uma aula experimental de química orgânica verde. **Química Nova.** 35 (3): 642-647, 2012.

DIXIT, R. B., BULSARA, A. P., MEHTA, H. B., DIXIT, B. C. Synthesis, characterization and antimicrobial activities of new bis-hydrazonothioxothiazolidinone

derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**. 16: 193-197, 2012.

FERRARI, M., FORNASIERO, M. C., ISETTA, A. M., MTT colorimetric assay for testing macrophase cytotoxic activity in vitro. **J. Immunology Methods**. 153 (1-2): 265-267, 1992.

GERAN R. I., GREENBERG N. H., McDONALD M. M., SCHUMACHER A N., ABBOT B. J. Protocols for screening clinical agents and natural products against animal tumors and other biological systems, 1972.

GÓES, A. J. S., LIMA, W. T. L., NAGY, H. J., ALVES, A. J., FARIA, A. R., LIMA, J. G., MAIA, M. B. S. Síntese e atividade antiedematogênica de derivados N-triptofil- 5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona e N-triptofil-5-benzilideno-rodanina. **Química Nova**. 27 (6): 905-910, 2004.

GOUVEIA, F. L., OLIVEIRA, R. M. B., OLIVEIRA, T. B., SILVA, I. M., NASCIMENTO, S. C., SENA, K. X. F. R., ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5- arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 44 (5): 2038–2043, 2009.

HANDZLIK, J., MANSKA, E., WOJCIK, R., DELA, A., JASTRZEBSKA-WIESEK, M., KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J., FRUZINSKI, A., SIWEK, A., FILIPEK, B., KIEC-KONONOWICZ, K. Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonistic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 20 (14): 4245–4247, 2012.

HAVRYLYUK, D., MOSULA, L., ZIMENKOVSKY, B., VASYLENKO, O., GZELLA, A., LESYK, R. Synthesis and anticancer activity evaluation of 4- thiazolidinones containing benzothiazole moiety. **Eur. J Med. Chem**. 45: 5012-5021, 2010.

JAIN, V. S., VORA, D. K., RAMAA, C. S. Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. (21): 1599–1620, 2013.

KASSAB, N. A. L., MESSEHA, N. A. Reactions with 5-Substituted 2-Thiazolidinone-4-thiones (isorhodanies). **Journal für Praktische Chemie**. 315 (6): 1017-1024, 1973.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LANGMÜIR, I., Isomorphism, isosterism and covalence. **J. Amer. Chem. Soc.** 41: 1543-1559, 1919.

LIBERMANN, D., HIMBERT, J., HENGL, L. La thiazolidione, point de depart d'une synthèse des acides thiopyruviques et thioglyoxyliques substituées. **Bull. Soc. Chim. Fr.**, (11-12): 1220-1224, 1948.

LIESEN, A. P., AQUINO, T. M., GÓES, A. J. S., LIMA, J. G., FARIA, A. R., ALVES, A. J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Química Nova**. 31 (2): 369-376, 2008.

LIMA, J. G. Alguns aspectos químicos do anel tiazolidina-2,4-diona. **Revista Universitária Rural**. 18/20 (1/2): 1-8, 1998.

LIU, X. F., ZHEN, C. J., LIU, X. K., PIAO, H. R. Synthesis of new chalcone derivatives bearing 2,4- thiazolidinedione and benzoic acid moieties as potential anti-bacterial agents. **Eur. J. Med. Chem.** 46 (8): 3469-3473, 2011.

MATTOS, M. C., MARZORATI, L. Aspectos mecanísticos da adição de Michael. **Química Nova**. 22 (5): 710-714, 1999.

METWALLY, N. H. Synthesis of some new fused thiopyrano[2,3-d]thiazoles and their derivatives. **Journal of Sulfur Chemistry**. 28 (3): 275-284, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 65 (1–2): 55–63, 1983.

MOURÃO, R. H., SILVA, T. G., SOARES, A. L., VIEIRA, E. S., SANTOS, J. N., LIMA, M. C., LIMA, V. L., GALDINO, S. L., BARBE, J., PITTA, I. R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 40: 1129–1133, 2005.

OLIVEIRA, S. M., SILVA, J. B. P., HERNANDES, M. Z., LIMA, M. C. A., GALDINO, S. L. G., PITA, I. R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Química Nova**. 31: 614-622, 2008.

REANMONGKOL, W., SONGKRAM, C. In vivo anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of novel thiazolidine-2,4-dione analogs derived from some classical NSAIDs. **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 35 (1): 33-40, 2013.

ROMAGNOLI, R., BARALDI, P. G., SALVADOR, M. K., CAMACHO, M. E., BALZARINI, J., BERMEJO, J., ESTÉVEZ, F. Anticancer activity of novel hybrid molecules containing 5-benzylidene thiazolidine-2,4-dione. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 63: 544-557, 2013.

SILVA, I. M., FILHO, J. S., SANTIAGO, P. B. G. S., EGITO, M. S., SOUZA, C. A., GOUVEIA, F. L., XIMENES, R. M., SENA, K. X. F. R., FARIA, A. R., BRONDANI, D. J., ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis and Antimicrobial Activities of 5-Arylidene-thiazolidine-2,4-dione Derivatives. **BioMed Research International**. vol. 2014, Article ID 316082, 8 pages, 2014.

SINGH, S. P., PARMAR, S. S., RAMAN, K., STENBERG, V. I. Chemistry and biological activity of thiazolidinones. **Chem. Rev**. 81 (2): 175–203, 1981.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.

SPRAGUE, J. M., LAND, A. H. Heterocyclic Compound. **New York**. 5, 711, 1957.

TOMASIC, T., ZIDAR, N., MUELLER-PREMRU, M., KIKELJ, D., MASIC, L. P. Synthesis and antibacterial activity of 5-ylidenethiazolidin-4-ones and 5-benzylidene-4,6-pyrimidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 45: 1667–1672, 2010.

ZIDAR, N., TOMASIĆ, T., SINK, R., RUPNIK, V., KOVAC, A., TURK, S., PATIN, D., BLANOT, D., CONTRERAS, M. C., DESSEN, A., MÜLLER, P. M., ZEGA, A., GOBEC, S., PETERLIN, M. L., KIKELJ, D. Discovery of Novel 5-Benzylidenerhodanine and 5-Benzylidenethiazolidine-2,4-dione Inhibitors of MurD Ligase. **J. Med. Chem.** 53: 6584–6594, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: Artigo publicado em 2014 sob o título: *Synthesis and Antimicrobial Activities of 5-Arylidene-thiazolidine-2,4-dione Derivatives.*

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2014, Article ID 316082, 8 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/316082>



Research Article

Synthesis and Antimicrobial Activities of 5-Arylidene-thiazolidine-2,4-dione Derivatives

Ivanildo Manguiera da Silva,¹ João da Silva Filho,²
Priscila Brandão Gomes da Silva Santiago,¹ Micalyne Soares do Egito,¹
Carlos André de Souza,² Frederico Leite Gouveia,¹ Rafael Matos Ximenes,²
Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena,² Antonio Rodolfo de Faria,¹
Dalci José Brondani,¹ and Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque^{1,2}

¹ Department of Pharmacy, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

² Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque; julianna@ufpe.br

Received 27 February 2014; Revised 14 April 2014; Accepted 15 April 2014; Published 7 May 2014

Academic Editor: Terry K. Smith

Copyright © 2014 Ivanildo Manguiera da Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Antibiotic resistance is considered one of the world's major public health concerns. The main cause of bacterial resistance is the improper and repeated use of antibiotics. To alleviate this problem, new chemical substances against microorganisms are being synthesized and tested. Thiazolidines are compounds having many pharmacological activities including antimicrobial activities. For this purpose some thiazolidine derivatives substituted at position 5 in the thiazolidine nucleus were synthesized and tested against several microorganisms. Using a disc diffusion method, antimicrobial activity was verified against Gram-positive, Gram-negative, and alcohol acid resistant bacteria and yeast. The minimum inhibition concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined. All derivatives showed antimicrobial activity mainly against Gram-positive bacteria, with MIC values ranging from 2 to 16 µg/mL.

1. Introduction

Thiazolidine is a class of compounds which merit special attention because it belongs to a group of substances with activity in medicinal chemistry. This nucleus is associated with antibacterial, antifungal, antiviral, antituberculosis, anti-cancer, and antiparasite biological activities [1–4]. The use of new synthetic methods and structure-activity relationship studies has made possible a broad study of new drugs with different actions. The computational search for possible mechanisms of 4-thiazolidinones anticancer activity has been studied together with the medical chemistry which permits the optimization of existing drugs [5].

Currently, very important groups of heterocyclic compounds such as thiazolidine-2,4-dione, 2-imino-4-thiazolidinone, 4-thioxo-thiazolidine-2,4-dione, and 2-thioxo-1,3-thiazolidine-4-one (rhodanine) have attracted the attention of researchers in their search for new agents with specific pharmacological properties [6–14].

Multiple antibiotic resistant bacteria represent a challenge in the treatment of infections. It is imperative, therefore, that new substances with antimicrobial properties be found to fight these microorganisms [15]. To be considered a bacterium resistant to a certain antibiotic, the microorganism should be able to grow in vitro when subjected to an inhibitory concentration equal to that obtained in the blood.

However, the concentration of several antibiotics in the bloodstream can be much lower than that achieved by the same antibiotic in other body tissues or fluids. Thus, a bacterium could be "resistant" to a certain antibiotic when it is present in the bloodstream but "sensitive" when it is in the urinary tract or vice versa [16].

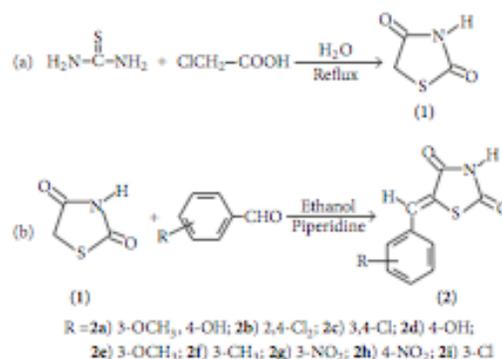
Bacteria become resistant to chemotherapeutic agents by three main mechanisms: destruction or inactivation of the drug, prevention of the penetration of the target site within the microbe, and alteration of drug target sites. There may be variations in these mechanisms [17]. With increasing bacterial resistance to antibiotics, attention has become focused on the development of new derivatives to be used as antimicrobial therapy in infection control [18]. Antibiotics are substances produced synthetically by bacteria and fungi with the function of suppressing the growth of microorganisms [19]. Currently, new antibiotics are needed for the treatment of multidrug resistant bacteria. The clinical use of new drugs has decreased since the 1980s, due to a reduction in the discovery of new, more efficient, and less toxic drugs by pharmaceutical companies around the world. Other research groups are worried about the rise in recurrence of many infectious diseases and the lack of new drugs and development of new antimicrobial products in the face of increasing resistance to existing agents [20].

The literature reports on the results of a number of biological activities when the substituents and their positions on the thiazolidine ring are changed [21]. In this case, medicinal chemistry is an important aid in the discovery of new active molecules using small heterocyclic rings to increase the biological activity of certain nuclei [22]. Due to the importance of the core of the thiazolidine ring, eleven compounds have been synthesized by our research group, some products already known and others unknown by introducing arylidene groups at the position 5 of the thiazolidine ring in order to test the antimicrobial activity of each compound against nine different microorganisms.

2. Material and Methods

2.1. Chemistry. The chemical reagents were supplied by Sigma-Aldrich (USA) and were used without further purification. Purity of the compounds was checked using thin layer chromatography (TLC) plates (silica gel G) in the appropriated system for each compound. The spots were located with short (254 nm)/long (365 nm) UV wavelength.

All melting points were measured in a capillary tube on a Quimis apparatus. Infrared spectra of 1% KBr pellets were recorded using a Bruker IFS66 spectrometer. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were measured on a VARIAN VNMRS 400-MR, using 400 MHz for ^1H and 75.4 MHz for ^{13}C in CDCl_3 and acetone- d_6 maintained at 25°C using Me_4Si (TMS) as an internal standard. The chemical shifts were reported in δ units and the coupling constants (J) were reported in hertz. The following abbreviations were used to indicate the peak multiplicity: s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), and m (multiplet). C, H, N, and S analyses were performed with a Carlo Erba elemental analyzer, model



SCHEME 1: Substituent in the synthesis of 5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione (**2a-i**).

EAl108. Mass spectra were recorded on a Varian MAT 711 spectrometer at an electron impact of 70 eV. The synthesized compounds are shown in Scheme 1, showing the respective substituent.

2.2. Procedure for Preparation of the Synthesis of Thiazolidine-2,4-dione (1). Compound (1) (thiazolidine-2,4-dione) was synthesized by refluxing monochloroacetic acid and thiourea in water. This compound was synthesized according to a published procedure [16]. Molecular formula $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{NS}$; yield 78%; mp 118–120°C; Rf 0.48 (0.9:0.1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). Recrystallization: water.

2.3. General Method for the Synthesis of 5-Arylidene-thiazolidine-2,4-dione (2a-i). The compound (**2a-i**) was synthesized from a mixture of thiazolidine-2,4-dione (1) (2.5 g, 21.36 mmol), aldehyde (21.36 mmol), piperidine (14.11 mmol), and ethanol (150 mL). The reaction mixture was heated under reflux and continuously stirred for a period of 8–9 h. The course of the reaction was monitored by TLC. The reaction mixture was poured into water and acidified with acetic acid. The resulting precipitate was filtered off and recrystallized from acetic acid to give (**2a-i**).

2.4. Microbiological Activity. Gram-positive, Gram-negative, and alcohol acid resistant bacteria and yeast were selected for the examination of antimicrobial activity in vitro. For the evaluation of the antimicrobial activity, first a disc diffusion test was used to screen the antimicrobial activity of all compounds. The compounds that had inhibition zones greater than 10 mm of diameter were submitted to a second test for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The tests were performed as follows.

2.4.1. Disk Diffusion Method. Antimicrobial activity was evaluated by disc diffusion method according to Bauer et al. [23]

against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*—DAUFPE 01, *Micrococcus luteus*—DAUFPE 06, *Bacillus subtilis*—DAUFPE 16, and *Enterococcus faecalis*—DAUFPE 138), Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*—DAUFPE 39, *Escherichia coli*—DAUFPE 224, and *Serratia marcescens*—DAUFPE 398), acid alcohol resistant bacteria (*Mycobacterium smegmatis*—DAUFPE 71), and yeast (*Candida albicans*—DAUFPE 1007) obtained from the culture collection of the Department of Antibiotics at the Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

Paper discs (Whatman number 2) with 6 mm diameters were impregnated with 20 μ L of a 15,000 μ g/mL solution of the synthesized compounds and dissolved in DMSO. The discs were then placed in medium sown with one of the microorganisms. The following standard drugs were used as controls: ketoconazole (Neoquímica, Brazil), for yeast and cefalexin (Eurofarma, Brazil) and kanamycin (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos—CECON, Brazil) for bacteria. The tests were carried out 3 times, with the results expressed (in millimeters) as mean \pm SEM of the diameters of the inhibition zones formed around the discs. The negative control test was carried out with DMSO soaked discs.

2.4.2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). A multiwell plate (96 wells) was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) following the criteria adopted by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [24]. Tests were carried out in Müller-Hinton broth and Sabouraud dextrose broth (Difco, USA) at pH 7.4 and the twofold serial dilution technique was applied. A 1,280 μ g/mL stock solution was prepared from the product. A standardized suspension of microorganisms was prepared for use with a 0.5 tube on the McFarland scale. The plate was incubated for 18 hours and thereafter an indicator dye resazurin (Sigma-Aldrich, USA) was applied to show if there was microbial growth in the well. MIC was determined as the concentration of the last well where there was no microbial growth. From this experiment, the content of the wells was sown on plates with Müller-Hinton agar medium to establish the minimum bactericidal concentration (MBC), which is the concentration where there is no colony growth. All analyses were performed in triplicate.

3. Result and Discussion

3.1. Synthesis

5-(3-Methoxy-4-hydroxy-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2a). Yield 70%; mp 260°C; Rf 0.50 (CHCl₃/MeOH 9:1). Recrystallization: ethanol; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm⁻¹) 1566 (C=C); 1730–1670 (C=O). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 8.48 (s 1H, NH); 7.71 (s 1H, CH=); 3.77 (s 3H, OCH₃); 6.02 (s 1H, OH); 6.92 (s 1H₍₂₎); 6.86 (d 1H₍₅₎ J = 8.33); 6.91 (d 1H₍₅₎ J = 8.34); ¹³C NMR (Acetone-d₆, 75.4 MHz, δ ppm): 169.81 (C=O₂); 166.89 (C=O₄); 119.55 (C₅ heterocycle); 143.28 (CH=); 56.50 (OCH₃); 129.20 (C₁); 112.58 (C₂); 148.06 (C₃); 144.76 (C₄); 115.56 (C₅); 122.30 (C₆). Anal. Calcd. for

C₁₁H₉NO₄S: C, (52.58%); H, (3.61%); N, (5.57%). Found: C, 53.01%; H, 3.83%; N, 5.25%. HRMS⁺: calcd 251.0252; found 251.0253.

5-(2,4-Dichloro-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2b). Yield 65%; mp 203°C; Rf 0.51 (CHCl₃/MeOH 9.6:0.4). Recrystallization: ethanol; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm⁻¹) 1570 (C=C); 1737–1675 (C=O). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 8.50 (s 1H, NH); 7.35 (s 1H, CH=); 7.55 (s 1H, H₍₃₎); 7.44 (d 1H, H₍₅₎ J = 7.90); 7.39 (d 1H (H₍₆₎) J = 7.90). ¹³C NMR (Acetone-d₆, 75.4 MHz, δ ppm): 169.85 (C=O₂); 166.86 (C=O₄); 120.20 (C₅ heterocycle); 140.23 (CH=); 133.61 (C₁); 134.84 (C₂); 129.52 (C₃); 134.93 (C₄); 127.52 (C₅); 135.80 (C₆). Anal. Calcd. for C₁₀H₂Cl₂NO₂S: C, 43.81%; H, 1.84%; N, 5.11%. Found: C, 44.01%; H, 1.96%; N, 5.05%. HRMS⁺: calcd 272.9418; found 272.9419.

5-(3,4-Dichloro-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2c). Yield 59%; mp 174°C; Rf 0.50 (CHCl₃/MeOH 9.5:0.5). Recrystallization: ethanol; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm⁻¹) 1571 (C=C); 1735–1676 (C=O). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 8.50 (s 1H, NH); 7.77 (s 1H, CH=); 7.52 (s 1H, H₍₂₎); 7.38 (d 1H, H₍₅₎ J = 8.91); 7.52 (d 1H (H₍₅₎) J = 8.92). ¹³C NMR (Acetone-d₆, 75.4 MHz, δ ppm): 169.86 (C=O₂); 166.89 (C=O₄); 119.17 (C₅ heterocycle); 143.13 (CH=); 134.42 (C₁); 129.49 (C₂); 133.15 (C₃); 131.79 (C₄); 130.71 (C₅); 127.26 (C₆). Anal. Calcd. for C₁₀H₂Cl₂NO₂S: C, 43.81%; H, 1.84%; N, 5.11%. Found: C, 43.91%; H, 1.97%; N, 5.07%. HRMS⁺: calcd 272.9418; found 272.9419.

5-(4-Hydroxy-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2d). Yield 45%; mp 149–150°C; Rf 0.49 (CH₂Cl₂/Hex. 5:5). Recrystallization: methanol; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm⁻¹) 1570 (C=C); 1734–1677 (C=O). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 8.49 (s 1H, NH); 7.54 (s 1H, CH=); 6.40 (s 1H, OH); 7.31 (d 1H, H₍₂₎–H₍₅₎ J = 8.65); 7.21 (d 1H, H₍₃₎–H₍₅₎ J = 8.65). ¹³C NMR (Acetone-d₆, 75.4 MHz, δ ppm): 169.86 (C=O₂); 166.89 (C=O₄); 119.55 (C₅ heterocycle); 140.25 (CH=); 129.15 (C₁); 129.15 (C₂)–(C₆); 115.96 (C₃)–(C₅); 157.71 (C₄). Anal. Calcd. for C₁₀H₇NO₃S: C, 54.29%; H, 3.19%; N, 6.33%. Found: C, 54.93%; H, 3.23%; N, 6.11%. HRMS⁺: calcd 221.0147; found 221.0148.

5-(4-Methoxy-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2e). Yield 40%; mp 210–212°C; Rf 0.48 (CHCl₃/MeOH 9.6:0.4). Recrystallization: CHCl₃; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm⁻¹) 1575 (C=C); 1734–1676 (C=O). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 8.49 (s 1H, NH); 7.74 (s 1H, CH=); 3.65 (s 3H, OCH₃); 7.35 (d 1H, H₍₂₎–H₍₆₎ J = 8.65); 6.75 (d 1H (H₍₃₎–H₍₅₎) J = 8.65). ¹³C NMR (Acetone-d₆, 75.4 MHz, δ ppm): 169.86 (C=O₂); 166.89 (C=O₄); 119.50 (C₅ heterocycle); 142.55 (CH=); 55.67 (OCH₃); 128.42 (C₁); 129.37 (C₂)–(C₆); 114.32 (C₃)–(C₅); 160.31 (C₄). Anal. Calcd. for C₁₁H₉NO₃S: C, 56.16%; H, 3.86%; N, 5.95%. Found: C, 56.98%; H, 3.99%; N, 6.45%. HRMS⁺: calcd 235.0303; found 235.0303.

5-(3-Methyl-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2f). Yield 52%; mp 195–196°C; Rf 0.50 (Hex/Ethyl acetate 8.5:1.5).

Recrystallization: acetic acid; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm^{-1}) 1573 (C=C); 1730–1739 (C=O); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 8.49 (s 1H, NH); 7.73 (s 1H, CH=); 2.36 (s, 3H CH_3); 7.25 (s 1H $\text{H}_{(2)}$); 6.95 (d 1H $\text{H}_{(4)}$, $J = 7.71$); 7.31 (t, 2H H_5 , $J = 7.72$); 7.31 (d 1H H_6 , $J = 7.52$). ^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 75.4 MHz, δ ppm): 169.86 (C=O₂); 167.89 (C=O₄); 119.55 (C₅ heterocycle); 143.18 (CH=); 21.20 (CH₃); 136.18 (C₁); 128.93 (C₂); 133.87 (C₃); 126.60 (C₄); 129.51 (C₅); 125.93 (C₆). Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$: C, 60.26%; H, 4.14%; N, 6.39%. Found: C, 60.66%; H, 4.45%; N, 6.11%; HRMS⁺: calcd 219.0354; found 272.0353.

5-(3-Nitro-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2g). Yield 80%; mp 250°C; Rf 0.51 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9.6 : 0.4). Recrystallization: acetic acid. IR (KBr 1%, ν_{\max} cm^{-1}) 1571 (C=C); 1740–1667 (C=O); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 8.49 (s 1H, NH); 7.37 (s 1H, CH=); 8.35 (s 1H $\text{H}_{(2)}$); 7.92 (d 1H $\text{H}_{(4)}$, $J = 8.0$); 7.54 (t, 2H H_5 , $J = 7.72$); 7.77 (d 1H H_6 , $J = 7.7$). ^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 75.4 MHz, δ ppm): 169.86 (C=O₂); 166.88 (C=O₄); 119.55 (C₅ heterocycle); 143.65 (CH=); 136.25 (C₁); 123.06 (C₂); 148.74 (C₃); 122.14 (C₄); 130.16 (C₅); 131.91 (C₆). Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C, 48.00%; H, 2.42%; N, 11.20%. Found: C, 48.35%; H, 2.1%; N, 11.01%; HRMS⁺: calcd 250.0048; found 250.0051.

5-(4-Nitro-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2h). Yield 69%; mp 220–223°C; Rf 0.52 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9.6 : 0.4). Recrystallization: THF; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm^{-1}) 1575 (C=C); 1734–1676 (C=O). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 8.49 (s 1H, NH); 7.74 (s 1H, CH=); 7.63 (d 1H, $\text{H}_{(2)}$ - $\text{H}_{(6)}$, $J = 8.65$); 8.09 (d 1H ($\text{H}_{(3)}$ - $\text{H}_{(5)}$), $J = 8.65$). ^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 75.4 MHz, δ ppm): 169.86 (C=O₂); 166.89 (C=O₄); 119.50 (C₅ heterocycle); 142.55 (CH=); 141.50 (C₁); 129.37 (C₂)-(C₆); 124.13 (C₃)-(C₅); 147.21 (C₄); Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C, 48.00%; H, 2.42%; N, 11.20%. Found: C, 48.35%; H, 2.1%; N, 11.01%; HRMS⁺: calcd 250.0048; found 250.0049.

5-(3-Chloro-arylidene)-thiazolidine-2,4-dione (2i). Yield 54%; mp 208–209°C; Rf 0.46 (Hexane/Ethyl acetate 4 : 1). Recrystallization: ethyl acetate; IR (KBr 1%, ν_{\max} cm^{-1}) 1582 (C=C); 1729–1672 (C=O). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 8.48 (s 1H, NH); 7.77 (s 1H, C=H); 7.34 (s 1H_{(2)}}); 7.18 (d 1H_{(4)}} ($J = 8.07$); 7.36 (t 2H₍₅₎ ($J = 8.07$); 7.36 (d 1H₍₆₎ ($J = 2.27$); ^{13}C NMR (Acetone- d_6 , 75.4 MHz, δ ppm): 169.86 (C=O₂); 166.46 (C=O₄); 119.55 (C₅ heterocycle); 143.09 (CH=); 135.81 (C₁); 127.72 (C₂); 133.85 (C₃); 128.62 (C₄); 130.25 (C₅); 125.78 (C₆). Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClNO}_2\text{S}$: C, 50.11%; H, 2.52%; N, 5.84%. Found: C, 50.55%; H, 2.67%; N, 5.57%. HRMS⁺: calcd 238.9808; found 238.9810.

The compounds (2a–i) were synthesized by Knoevenagel condensation with nine aromatic aldehydes yielding 5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione derivatives. The infrared spectrum of these compounds showed a strong absorption band of the functional group ranging between 1566 at 1775 cm^{-1} corresponding to C=C and 1775–1676 cm^{-1} concerning the carbonyl in positions 2 and 4 of the thiazolidine-2,4-dione ring [25]. The molecular structures of the compounds were established by ^1H NMR and ^{13}C NMR

spectra which exhibited the presence of the signals corresponding to hydrogen and carbons in the molecule. The compound (2a) presented a singlet at 3.77 ppm of 3 hydrogen referent to OCH_3 and a singlet at 6.02 concerning the absorption of the OH group. This substituent also presented absorption at 56.50 ppm of the OCH_3 in ^{13}C NMR. The group OCH_3 in (2d) presented signal in 3.77 ppm to hydrogen and 56.50 to absorption in ^{13}C NMR. The absorption of hydrogen as a singlet at 3.65 ppm of the OCH_3 group at position 4 of arylidene and 55.67 to ^{13}C NMR was sufficient to characterize the compound (2e). The compound (2f) presented absorption as a singlet at 2.36 ppm to hydrogen in methyl group at position 3 and 20.15 ppm to ^{13}C NMR in the molecule. The ^1H NMR spectra of compounds showed only one kind of proton absorption for CH= in the range 7.71–7.78. According to the literature, this proton absorption is the compound represented by the configuration Z, as illustrated by the absorption of the CH= group. Isomer (Z) appears to be more thermodynamically stable than isomers E [26].

The ^1H NMR spectrum of compounds in CDCl_3 -d6 revealed the presence of methyne moiety and the position of the hydrogen of the aromatic group. In addition, the structures were supported by their mass spectrum which revealed a molecular ion peak. The elemental analysis was also important to supplement the characterization of the chemical structure.

3.2. Antimicrobial Activity. The results of the disc diffusion test are shown in Table 1. Most of the synthesized compounds were active against Gram-positive bacteria. MIC and MBC values are shown in Table 2.

Compound (1) thiazolidine-2,4-dione showed no antimicrobial activity against any of the tested microorganisms [12]. When it reacted with aromatic benzaldehydes forming derivatives substituted at position 5, however, all derivatives showed antimicrobial activity. This affirmation is similar to what is in the literature, showing that substitution at position 5 with arylidene groups has an important effect on enhancing the antimicrobial properties [14].

This shows the importance of the dual CH= bond at position 5, thus introducing a pharmacophore group in the molecule. This group generally influences the specific structural changes in biological effects, stereochemistry, size, and shape of the carbon chain as well as the nature of the other substituent. The compound (2a) with substituents 3- OCH_3 and 4-OH of the arylidene ring was the most active of all, showing better inhibition for almost all microorganisms tested. This compound inhibited all Gram-positive bacteria tested and, additionally, was the only one that inhibited the growth of Gram-negative bacteria, alcohol acid resistant bacteria, and also the yeast, as shown in Table 1. Generally, 4-thiazolidinediones derivatives have demonstrated antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria [14].

Compounds (2b) and (2c), containing the substituents 2,4- Cl_2 and 3,4- Cl_2 , respectively, inhibited all Gram-positive bacteria tested and also the alcohol acid resistant bacteria.

TABLE I: Antimicrobial activity of compounds tested against different microorganisms (diameter of inhibition halo in mm).

Synthesized compounds (300 µg/disc)	Subs.	Microorganisms											
		Gram-positive bacteria					Gram-negative bacteria					Alcohol acid resistant bacteria	
n		<i>S. aureus</i> DAUFPE	<i>M. luteus</i> DAUFPE	<i>E. faecalis</i> DAUFPE	<i>B. subtilis</i> DAUFPE	<i>P. aeruginosa</i> DAUFPE	<i>E. coli</i> DAUFPE	<i>S. marcescens</i> DAUFPE	<i>M. smegmatis</i> DAUFPE	<i>C. albicans</i> DAUFPE			
1	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2a	3-OCH ₃ 4-OH	19.3 ± 0.47	27.8 ± 0.16	11.2 ± 0.62	15.0 ± 0.16	15.0 ± 0.16	0	0	19.3 ± 0.77	16.2 ± 0.82			
2b	2,4-Cl	11.7 ± 0.56	32.0 ± 0.81	18.8 ± 0.85	30.7 ± 0.47	0	0	0	19.2 ± 0.41	0			
2c	3,4-Cl	19.4 ± 0.08	34.0 ± 0.80	8.4 ± 0.17	25.4 ± 0.05	0	0	0	12.1 ± 0.09	0			
2d	4-OH	0	13.8 ± 0.56	11.0 ± 0.82	0	0	0	0	0	0			
2e	3-OCH ₃	0	12.7 ± 0.56	0	0	0	0	0	0	0			
2f	3-CH ₃	18.3 ± 0.47	0	18.8 ± 0.16	17.8 ± 0.62	0	0	0	0	0			
2g	3-NO ₂	21.8 ± 0.16	0	22.8 ± 0.70	23.7 ± 0.16	0	0	0	0	0			
2h	4-NO ₂	23.8 ± 0.16	0	21.9 ± 0.17	18.6 ± 0.15	0	0	0	0	0			
2i	3-Cl	20.8 ± 0.27	24.8 ± 0.16	21.8 ± 0.16	27.7 ± 0.16	0	0	0	0	0			
	Kan (30 µg/disc)	23.0 ± 0.82	28.3 ± 0.09	0	14.0 ± 0.82	20.0 ± 0.12	15.1 ± 0.19	15.0 ± 0.12	40.0 ± 0.12	—			
	Cef (30 µg/disc)	35.3 ± 0.09	54.0 ± 0.12	24.1 ± 0.19	45.0 ± 0.12	0	24.3 ± 0.09	0	0	—			
	Ket (300 µg/disc)	—	—	—	—	—	—	—	—	—			24.1 ± 0.19

Standard compounds: Cef: cephalixin; Ket: ketoconazole; Kan: kanamycin.
 —: not tested; X: medium; δ: standard deviation.

Table 2: Inhibition and bactericidal concentrations of compounds (2a-1), with respect to different microorganisms ($\mu\text{g/mL}$).

Synthesized compounds	<i>S. aureus</i>		<i>M. luteus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>M. smegmatis</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
	DAUPPE 01 MIC	MBC	DAUPPE 06 MIC	MBC	DAUPPE 16 MIC	MBC	DAUPPE 71 MIC	MBC	DAUPPE 18 MIC	MBC	DAUPPE 007 MIC	MBC
2a	16	32	4	8	4	8	16	32	64	>128	8	32
2b	8	16	2	4	2	4	2	4	16	32	—	—
2c	8	16	2	4	2	4	2	4	16	32	—	—
2d	—	—	4	8	—	—	—	—	—	—	—	—
2e	—	—	4	8	—	—	—	—	—	—	—	—
2f	16	32	16	32	4	8	—	—	—	—	—	—
2g	8	16	8	16	16	32	—	—	—	—	—	—
2h	8	16	8	16	—	—	—	—	—	—	—	—
2i	8	16	16	32	4	8	—	—	—	—	—	—
Cefalexin	8	16	<2	2	<2	<2	>128	>128	>128	>128	—	—
Ketoconazole	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<2	2

MIC: minimum inhibitory concentration;

MBC: minimum bactericidal concentration;

—: not tested.

However, compound (2c) showed halos slightly smaller than (2b).

The compound (2d) with 4-OH group was active only for two Gram-positive bacteria, *M. luteus* and *E. faecalis*, while (2e), substituted with 3-OCH₃, was only active against *M. luteus*. This fact indicates that the groups OH and OCH₃ separately do not contribute to a significant antimicrobial activity. This fact is reinforced by the activity of compound (2a), which had both groups (3-OCH₃ and 4-OH), against all tested microorganisms, including the Gram-negative bacterium *P. aeruginosa*. The compounds (2f, 2g, and 2h) were active only for Gram-positive bacteria, except *E. faecalis*, with halos between 17.8 ± 0.62 and 23.8 ± 0.16 mm. The compound (2i) also inhibited the growth of all Gram-positive bacteria.

In general, all compounds tested were active against Gram-positive bacteria presenting values of 16 and 32 µg/mL for *S. aureus* and 4 and 8 µg/mL for *M. luteus* and *B. subtilis*, for MIC and MBC, respectively. MIC and MBC values for *M. smegmatis* were 16 and 32 µg/mL, smaller than the standard drugs. The compounds (2b, 2c, 2g, 2h, and 2i) showed MIC and MBC values for *S. aureus* near those obtained for the standard drug, cefalexin. The compounds (2b) and (2c) showed MIC and MBC for *M. luteus* and *B. subtilis* also near the standard drug. The results for *M. smegmatis* 16 and 32 µg/mL were lower than the standard Kanamycin (128 µg/mL) showing significant activity in inhibiting these microorganisms. Recent studies with 5-hydroxy-arylidene derivatives showed MIC values higher than 128 µg/mL for two Gram-negative bacteria, *E. coli* and *P. aeruginosa*, and 128 µg/mL for *E. faecalis* and *S. aureus* [7].

These results showed that these substituents separately did not have significant antimicrobial activity. The groups chlorine, nitro, and methyl at position 3 on the thiazolidine ring seem to favor this activity for other positions [7]. This affirmation reveals that electrons donating or withdrawing groups in molecules increase the lipophilicity of the compounds, which alters the permeability across the bacterial cell membrane [27]. These molecules showed the greatest inhibition among the tested compounds. The compounds (2b, 2c, and 2i) containing chlorine atoms in the molecule were active for all Gram-positive bacteria, indicating the power of chlorine in antimicrobial activity.

This demonstrates that the substitution of arylidene at position 5 on the thiazolidine ring enhances the antimicrobial activity of the pharmacophore group in these compounds. The condensation of the compounds 5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione was crucial to generate considerable activity in the synthesized derivatives [8]. The results of this study demonstrate significant antimicrobial activity for compounds 5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione substituted (2a-i), with values similar to the drugs tested cephalixin >128, confirming the antimicrobial activity of thiazolidine compounds as described in the literature [1, 27]. These compounds probably act on the synthesis of peptidoglycan from the cell wall, which explains the higher antimicrobial effects on Gram-positive bacteria instead of Gram-negative ones [2, 28].

4. Conclusion

In order to find an antimicrobial agent, nine compounds were synthesized and tested against Gram-positive, Gram-negative, and alcohol acid resistant bacteria and yeast. All compounds were active against all Gram-positive bacteria. One of the compounds was the most active, inhibiting Gram-positive, Gram-negative, and alcohol acid resistant bacteria and also the yeast. The other compounds had varied activity between classes of Gram-positive and acid alcohol resistant bacteria. Compounds containing chlorine in the molecule showed the best antibacterial activity, thus demonstrating the power of this atom on the bacteria. The compounds with substituents nitro and methyl also showed significant activity. All the compounds presented the *Z* configuration. The chemical structures of the compounds were determined by physical methods IR, ¹HNMR, ¹³CNMR and mass spectrometry.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank the CNPq for financial support and the Fundamental Chemistry Department of Federal University of Pernambuco for the use of the Analytical Center. The English version of this work has been revised by Sidney Pratt, Canadian, B.A., M.A.T. (The Johns Hopkins University), RSAdip (TEFL).

References

- [1] A. Verma and S. K. Saraf, "4-Thiazolidinone—a biologically active scaffold," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 43, no. 5, pp. 897–905, 2008.
- [2] C. J. Andres, J. J. Bronson, S. V. D'Andrea et al., "4-Thiazolidinones: novel inhibitors of the bacterial enzyme MurB," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 10, no. 8, pp. 715–717, 2000.
- [3] M. Tunçbilek and N. Altanlar, "Synthesis and antimicrobial evaluation of some 3-(substituted phenacyl)-5-[4'-(4H-4-oxo-1-benzopyran-2-yl)-benzylidene]-2,4-thiazolidinediones," *II Farmaco*, vol. 54, no. 7, pp. 475–478, 1999.
- [4] O. Devinyak, D. Havrylyuk, B. Zimenkovskiy, and R. Lesyk, "Computational search for possible mechanisms of 4-thiazolidinones anticancer activity: the power of visualization," *Molecular Informatics*, vol. 33, no. 3, pp. 216–229, 2014.
- [5] T. Tomašić and L. P. Mašić, "Rhodanine as a privileged scaffold in drug discovery," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 13, pp. 1596–1629, 2009.
- [6] A. M. C. Andrade, W. T. Lima, M. P. A. Rocha et al., "Synthesis and structural study of substituted thioxothiazolidinones and thioximidazolidinones," *Bollettino Chimico Farmaceutico*, vol. 141, no. 6, pp. 428–433, 2002.
- [7] T. Tomašić, N. Zidar, A. Kovač et al., "5-benzylidenethiazolidin-4-ones as multitarget inhibitors of bacterial Mur ligases," *ChemMedChem*, vol. 5, no. 2, pp. 286–295, 2010.

- [8] M. S. A. El-Gaby, G. A. M. El-Hag Ali, A. A. El-Maghraby, M. T. Abd El-Rahman, and M. H. M. Helal, "Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel 2-thioxo-4-thiazolidinones and 4,4'-bis(2-thioxo-4-thiazolidinone-3-yl)diphenylsulfones," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 44, no. 10, pp. 4148–4152, 2009.
- [9] R. B. Lesyk, B. S. Zimenkovskyy, D. V. Kaminskyy et al., "Thiazolidinone motif in anticancer drug discovery. Experience of DH LNMU medicinal chemistry scientific group," *Biopolymers and Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 107–117, 2011.
- [10] A. A. R. Silva, A. J. da Silva Góes, W. T. de Lima, and M. B. de Souza Maia, "Antiedematogenic activity of two thiazolidine derivatives: *N*-tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene) rhodanine (GS26) and *N*-tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2,4-thiazolidinedione (GS28)," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 51, no. 12, pp. 1351–1355, 2003.
- [11] T. Tomašić and L. P. Masic, "Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 1, pp. 130–151, 2014.
- [12] F. L. Gouveia, R. M. B. de Oliveira, T. B. de Oliveira et al., "Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 44, no. 5, pp. 2038–2043, 2009.
- [13] R. Ottanà, R. MacCarì, M. L. Barreca et al., "5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel anti-inflammatory agents," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 13, pp. 4243–4252, 2005.
- [14] P. Vicini, A. Geronikaki, K. Anastasia, M. Incerti, and F. Zani, "Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 11, pp. 3859–3864, 2006.
- [15] W. Tavares, *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-Infeciosos*, Atheneu, São Paulo, Brazil, 3th edition, 2002.
- [16] K. Babanglu, M. A. Page, V. C. Jones et al., "Novel inhibitors of an emerging target in *Mycobacterium tuberculosis*; substituted thiazolidinones as inhibitors of dTDP-rhamnose synthesis," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 13, no. 19, pp. 3227–3230, 2003.
- [17] G. J. Tortora and B. R. Funke, *Microbiologia*, Artes Médicas Sul, Porto Alegre, Brazil, 6th edition, 2003.
- [18] O. Bozdağ-Dündar, Ö. Özgen, A. Mentese et al., "Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 15, no. 18, pp. 6012–6017, 2007.
- [19] T. Gumbo, "General principles of antimicrobial therapy," in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, L. L. Brunton, B. A. Chabner, and B. C. Knollmann, Eds., McGraw-Hill, 12th edition, 2012.
- [20] I. Chopra, C. Schofield, M. Everett et al., "Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 8, no. 2, pp. 133–139, 2008.
- [21] S. Malik, P. K. Upadhyaya, and S. Miglani, "Thiazolidinediones: a plethora of biological load," *International Journal of PharmTech Research*, vol. 3, no. 1, pp. 62–75, 2011.
- [22] S. Allen, B. Newhouse, A. S. Anderson et al., "Discovery and SAR of trisubstituted thiazolidinones as CCR4 antagonists," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 14, no. 7, pp. 1619–1624, 2004.
- [23] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Tenckhoff, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method," *The American Journal of Clinical Pathology*, vol. 45, no. 4, pp. 493–496, 1966.
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 23rd informational supplement M100-S23, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 2013.
- [25] M. Tunçbilek, O. Bozdağ-Dündar, G. Ayhan-Kilicgil et al., "Synthesis and hypoglycemic activity of some substituted flavonyl thiazolidinedione derivatives—fifth communication: Flavonyl benzyl substituted 2,4-thiazolidinediones," *Il Farmaco*, vol. 58, no. 1, pp. 79–83, 2003.
- [26] G. Bruno, L. Costantino, C. Curinga et al., "Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 4, pp. 1077–1084, 2002.
- [27] A. Kocabalkanli, Ö. Ates, and G. Ötük, "Synthesis of Mannich bases of some 2,5-disubstituted 4-thiazolidinones and evaluation of their antimicrobial activities," *Archiv der Pharmazie*, vol. 334, no. 2, pp. 35–39, 2001.
- [28] N. Zidar, T. Tomašić, R. Šink et al., "New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: design, synthesis, crystal structures, and biological evaluation," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 46, no. 11, pp. 5512–5523, 2011.

APÊNDICE 2: Comprovante de submissão do artigo intitulado: Evaluation of antimicrobial activity of the compound 5-(3-methoxy-4-hydroxybenzylidene)-4-thioxo-thiazolidine-2-one against multidrug resistant clinical isolates from different sites of infection

Manuscript ID: molecules-61437

Type of manuscript: Article

Title: Evaluation of antimicrobial activity of the compound 5-(3-methoxy-4-hydroxybenzylidene)-4-thioxo-thiazolidine-2-one against multidrug resistant clinical isolates from different sites of infection

Authors: Ivanildo Silva, Ana Carolina Medeiros, Rosilma Araújo, Priscila Santiago, Micalyne Egito, Carlos Andre Souza, Kêsia Sena, Antonio Rodolfo Faria, Dalci José Brondani, Rafael Ximenes, Julianna Albuquerque

*Received: 16 July 2014