

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
DERIVADOS DA TIAZOLIDINA-2,4-DIONA
E 4-TIOXO-TIAZOLIDINA-2-ONA**

João da Silva Filho

Recife -2004

João da Silva Filho

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
DERIVADOS DA TIAZOLIDINA-2,4-DIONA
E 4-TIOXO-TIAZOLIDINA-2-ONA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS
BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Área de Concentração: Química de Produtos Bioativos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcanti
de Albuquerque

Recife -2004

Silva Filho, João da
Estudo químico e biológico de derivados da
Tiazolidina-2,4-diona e 4-Tioxo-tiazolidina-2-ona/ João
da Silva Filho. – Recife : O Autor, 2004.
xx, 87 folhas : il., tab., fig., gráf., quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos
Bioativos, 2004.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia de produtos bioativos –
Compostos heterocíclicos aromáticos. 2. Tiazolidina-
2,4-diona e 4-Tioxo-tiazolidina-2-ona – Estudo
químico e biológico – Síntese de derivados
tiazolidínicos. 3. Atividade antimicrobiana, citotóxica
e marcação de hemácias – Proteínas plasmáticas
com Tecnécio-99m. I. Título.

54.05
547.64

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2004-080

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR JOÃO DA SILVA
FILHO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.**

**DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 26 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA
BANCA EXAMINADORA:**


Dra. SILENE CARNEIRO DO NASCIMENTO
Departamento de Antibióticos - UFPE


Dr. ALEXANDRE JOSÉ DA SILVA GÓES
Departamento de Antibióticos - UFPE


Dr. ANTÔNIO RODOLFO DE FARIA
Departamento de Farmácia - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

REITOR

Prof. Dr. Amaro de Albuquerque Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Ana Maria dos Santos Cabral

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Leonor Costa Maia

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Prof^a. Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO

Prof^a. Dr^a. Alda de Andrade Chiappeta

VICE-COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO

Prof^a. Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

AGRADECIMENTOS

A DEUS, meu Criador e meu Salvador, fonte da vida, através do qual vivo e existo.

À Prof^a. Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcanti Albuquerque, pela orientação e pelo incentivo a uma qualificação completa durante toda essa pesquisa.

Agradeço às Professoras Dr^a. Alda de Andrade Chiappeta, pela realização dos testes microbiológicos, e Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento, pela realização dos testes de citotoxicidade, e ao técnico Orlando Silva, pela preparação dos meios de cultura para os testes microbiológicos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Jansen de Almeida Catanho, às doutorandas Grace Mary de Lima Souza e Simey Pereira Magnata e aos estagiários Jailson Oliveira e Marília Bezerra, do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE pela colaboração no experimento de marcação de hemácias com ^{99m}Tc .

Ao corpo docente do Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos do Departamento de Antibióticos da UFPE pelos novos ensinamentos tanto em Química quanto em Microbiologia que expandiram meus conhecimentos para novos horizontes.

À Ricardo Oliveira Silva, Eliete de Fátima Nery e Juliana Manso, da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE pela realização dos espectros de RMN¹H, RMN¹³C, Massa e Infravermelho.

A todos os colegas pela troca de idéias e colaboração mútuas.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos, Érika, Pollianna, Simone, Juliano e Leandro pela colaboração nos experimentos e também a todos os funcionários do Departamento de Antibióticos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Palavras inesquecíveis:

“Buscai ao Senhor enquanto se pode achar, invocai-o enquanto está perto. Deixei o ímpio o seu caminho e o iníquo os seus pensamentos. Converta-se ao Senhor, que se compadecerá dele.

Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos os meus caminhos, diz o SENHOR DEUS. Porque, assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos do que os vossos pensamentos. Eu sou a ressurreição e a vida, o Alfa e o Ômega, o Princípio e o Fim. Aquele que tem sede venha receber de graça a água da vida.”

(Is.55.6-9; Jo.11.25; Ap. 22.13,17).

Dedico este trabalho aos meus pais, João da Silva (*In memoriam*) e Maria Vieira e aos meus irmãos Sueli, Edjane, Jonas, Lúcia, Luciana e Luciano. A todos os meus sobrinhos e outros parentes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	16
LISTA DE ESQUEMAS.....	17
LISTA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS.....	18
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1. Estudo Químico.....	24
2.1.1. As tiazolidinas.....	24
2.1.2. Preparação de derivados das tiazolidinas.....	24
2.1.2.1. Preparação da tiazolidina-2,4-diona.....	24
2.1.2.2. Preparação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona com pentasulfeto de fósforo.....	25
2.1.2.3. Preparação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona com o reagente de Lawesson.....	25
2.1.2.4. Preparação de derivados da 2-imino-tiazolidina-4-ona.....	25
2.1.2.5. Preparação dos compostos E,Z-5-aroilmetileno-3-benzil-4-oxo-2-tioxo- 1,3-tiazolidina.....	26
2.1.3. Reações das tiazolidinonas.....	27
2.1.3.1. Reações de N-alkilação das tiazolidinonas.....	27
2.1.3.2. Reações de condensação.....	31
2.2. Estudo Biológico.....	34
2.2.1. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade.....	34
2.2.1.1. Atividade antimicrobiana.....	34
2.2.1.2. Citotoxicidade.....	35
2.2.1.2.1. Mecanismos de resistência.....	36
2.2.2. Atividade antioxidante.....	36
2.2.2.1. Substâncias antioxidantes e radicais livres.....	36
2.2.2.2. Autoxidação.....	37

2.2.2.3.	Peroxidação dos lipídios.....	40
2.2.2.4.	Envelhecimento.....	41
2.2.2.5.	Marcação de hemácias e plasma In vitro com ^{99m} Tc.....	41
3.	OBJETIVOS.....	46
3.1.	Objetivo Geral.....	46
3.2.	Objetivos específicos.....	46
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1.	Materiais.....	47
4.1.1	Solventes.....	47
4.1.2.	Reagentes.....	48
4.1.3.	Equipamentos.....	48
4.1.4.	Diversos.....	49
4.2.	Métodos.....	50
4.2.1.	Metodologia do Estudo químico.....	50
4.2.1.1.	Diagrama de Síntese.....	51
4.2.1.2.	Parte Experimental.....	52
4.2.1.2.1.	Obtenção dos Derivados Tiazolidínicos.....	52
4.2.1.2.1.1.	Obtenção da tiazolidina-2,4-diona (I).....	52
4.2.1.2.1.2.	Obtenção da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (II).....	52
4.2.1.2.1.3.	Obtenção dos derivados 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-a) e 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-b) da tiazolidina-2,4diona.....	53
4.2.1.2.1.4.	Obtenção dos derivados 5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV-a), 5-(6-metil-4-oxo-4H-cromona-3-il-metileno)-4-tioxo-metileno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V-d) e 5-(10-cloro-9-metilideno)-4-tioxo-tiazolidi-na-2-ona (VI-c) da 4-tioxo-tiazolidina-2,4-diona.....	54
4.2.1.2.1.5.	Obtenção do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzo [1,4]-oxa-zin-6-il)-etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e) da benzoxazona.....	55
4.2.1.2.1.6.	Obtenção do derivado 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-	

	2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzol [1,4]-oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona (VIII-a) do 10-cloro-9-formil-antraceno.....	55
4.2.2.	Metodologia do Estudo Biológico.....	56
4.2.2.1.	Atividade antimicrobiana.....	56
4.2.2.1.1	Microrganismos–teste.....	56
4.2.2.1.2.	Meios de cultura.....	57
4.2.2.1.3.	Padronização.....	57
4.2.2.1.4.	Teste de antagonismo.....	59
4.2.2.1.5.	Concentração mínima inibitória (CMI).....	60
4.2.2.2.	Atividade citotóxica.....	61
4.2.2.3.	Marcação de Hemácias e Proteínas Plasmáticas com Tc ^{99m}	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1.	Estudo Químico.....	64
5.1.1.	Resultados Espectroscópicos de RMN ¹ H e Infravermelho do derivado 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4- diona (III-a).....	64
5.1.2.	Resultados Espectroscópicos de RMN ¹ H e Infravermelho do derivado 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-b).....	68
5.1.3.	Resultados Espectroscópicos de RMN ¹ H, Infravermelho, RMN ¹³ C e Massas do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo [1,4]-oxazin-6-il)-etil-tiazolidina-2,4-diona(VII-e).....	72
5.1.4.	Resultados Espectroscópicos de RMN ¹³ C, Massas e infravermelho do derivado 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzol[1,4]-oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona(VIII-a).....	78
5.1.5.	Dados físico-químicos das reações.....	82
5.1.6.	Mecanismos de fragmentação do derivado VIII-a.....	84
5.2.	Estudo Biológico.....	89
5.2.1.	Atividade antimicrobiana.....	89

5.2.2.	Atividade citotóxica.....	92
5.2.3.	Marcação de Hemácias e Proteínas Plasmáticas com Tecnécio-99m.....	93
6.	CONCLUSÃO.....	98
7.	SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS.....	99
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1:	Representação das etapas (dentro da célula) para marcação de hemácias com tecnécio-99m.....	43
Figura 2:	Gerador de Tecnécio-99m.....	44
Figura 3:	Série de concentrações da substância-teste, em caldo Mueller-Hinton, para determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	60
Figura 4:	Seqüência da metodologia da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com tecnécio-99m.....	63
Figura 5:	Espectro de RMN ¹ H do derivado 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-a).....	65
Figura 5a:	Espectro de RMN ¹ H do derivado 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-a), ampliação da faixa dos hidrogênios aromáticos..	66
Figura 6:	Espectro de Infravermelho do derivado 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-a).....	67
Figura 7:	Espectro de RMN ¹ H do derivado 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-b).....	69
Figura 7a:	Espectro de RMN ¹ H do derivado 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-b), ampliação da faixa dos hidrogênios aromáticos.....	70
Figura 8:	Espectro de Infravermelho do derivado 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-b).....	71
Figura 9:	Espectro de RMN ¹ H do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e).....	73

Figura 9a:	Espectro de RMN ¹ H do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo [1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e), ampliação da faixa dos hidrogênios aromáticos.....	74
Figura 10:	Espectro de RMN ¹³ C do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e).....	75
Figura 11:	Espectro de Massa do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo [1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e).....	76
Figura 12:	Espectro de Infravermelho do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> - benzo [1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e).....	77
Figura 13:	Espectro de RMN ¹³ C do 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzol[1,4]oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona (VIII-a).....	79
Figura 14:	Espectro de massa do derivado 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzol[1,4]oxazin-6-il)-etil-tiazolidina-2,4-diona (VIII-a).....	80
Figura 15:	Espectro de Infravermelho do derivado 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzol[1,4]oxazin-6-il)-etil-tiazolidina-2,4-diona (VIII-a).....	81
Figura 16:	Halos de inibição de diferentes microrganismos.....	90
Figura 17:	Gráfico da atividade antimicrobiana dos derivados tiazolidínicos.....	90
Figura 18:	Curvas representativas da capacidade de ligação do Tecnécio-99 em células e proteínas plasmáticas na presença de diferentes concentrações da benzoxazona.....	95

Figura 19: Curva representativa da capacidade do percentual de ligação do Tecnécio-99m na fração Hm (sol.) e PI (sol.) de células sangüíneas e proteínas plasmáticas na presença de diferentes concentrações da benzoxazona.....95

Figura 20: Curva representativa da capacidade do percentual de ligação do Tecnécio-99m na fração Hm (insol.) e PI (insol.) de células sangüíneas e proteínas plasmáticas na presença de diferentes concentrações da benzoxazona.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de crescimento dos microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana para os compostos obtidos por síntese.....	58
Tabela 2: Dados de RMN ¹ H e Infravermelho do derivado 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-a).....	64
Tabela 3: Dados de RMN ¹ H e Infravermelho do 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-b).....	68
Tabela 4: Dados de RMN ¹ H, RMN ¹³ C, Infravermelho e Massas do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]-oxazin-6-il)-etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e).....	72
Tabela 5: Dados de RMN ¹³ C, Infravermelho e Massas do derivado 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo[1,4]-oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona (VIII-a).....	78
Tabela 6: Dados e constantes físico-químicas dos compostos obtidos.....	82
Tabela 7: Atividade antimicrobiana de compostos tiazolidínicos e de benzoxazona frente a representantes de diferentes grupos de microrganismos -teste.....	89
Tabela 8 : Atividade Citotóxica dos derivados tiazolidínicos e benzoxazona Frente às linhagens HEP-2 e NCI-H292.....	92
Tabela 9 : Médias e desvios padrões das concentrações 0 a 12,5% do composto Benzoxazona.....	93
Tabela 10: Médias e desvios padrões das concentrações 25 a 100% do composto benzoxazona.....	94

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Formação do peróxido de H_2O_2	39
Esquema 2: Superóxido dismutase (SOD) catalizando o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.....	39
Esquema 3 : Decaimento do Tecnécio metaestável a ^{99}Tc estável.....	42
Esquema 4: Bombardeamento do molibdênio-98 por nêutrons no reator nuclear formando o molibidênio-99.....	43
Esquema 5: Decaimento de Molibdênio-98 a Tecnécio-99 metaestável.....	44
Esquema 6: Fragmentação do composto VIII-a.....	85
Esquema 7: Fragmentação do composto VIII-a (continuação).....	86
Esquema 8: Fragmentação do composto VIII-a (continuação).....	87

LISTA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Nº do composto	Sigla	Nomenclatura
I	Ju-32	Tiazolidina-2,4-diona
II	Ju-33	4-Tioxo-tiazolidina-2-ona
III-a	Ju-296	5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
III-b	Ju-298	5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
IV-a	HRJ-1	5-(2,4-diclorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona
V-d	HRJ-32	5-(6-metil-4-oxo-4H-cromona-3-il-etileno)-tioxo-tiazolidina-2-ona
VI-c	HRJ-33	5-(10-cloro-9-metilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona
VII-e	Ju-306	3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-enzo[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona
VIII-a	Ju-312	5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzol[1,4]oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	-deslocamento químico	
cm^{-1}	-número de ondas (Frequência)	
s	-singlete	
sl	-singlete largo	
d	-dublete	
dd	-duplo dublete	
t	-triplete	
m	-multiplete	
DMSO	-dimetilsulfóxido	
DMSO_{d6}	-dimetilsulfóxido deuterado	
$\text{CDCl}_3 \text{ d}$	-clorofórmio deuterado	
Hz	-hertz	
ppm	-partes por milhão	
R _f	-razão de frente	
IV	-infravermelho	
TMS	-tetrametil-silano	
M ⁺	-íon molecular	
m/e	-massa/carga	
UFPEDA	-coleção de microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE	-
CMI	-concentração mínima inibitória	
CMB	-concentração mínima bactericida	
μg	-micrograma	
λ	-comprimento de onda	
J	-constante de acoplamento	
RPM	-rotação por minutos	
FIC	-fração insolúvel da célula	
FIP	-fração insolúvel do plasma	
FSC	-fração solúvel da célula (hemácia)	
FSP	-fração solúvel do plasma	

TCA	-ácido tricloroacético
Bq	-bequerel (unidade de atividade da amostra radioativa no sistema internacional)
SnCl ₂	-cloreto estanoso
^{99m} Tc	-tecnécio- 99 (Tecnécio metaestável)
TcO ₄ ⁻	-íon pertecnetato
IPEN	-Instituto de Pesquisas em Energia Nuclear
LDL	-proteína de Baixa Densidade (Low Density Lipoprotein)
Hm (sol)	-hemácias da fração solúvel
Hm (H ₂ O)	-hemácias da fração água
Hm (ins)	-hemácias da fração insolúvel

RESUMO

As tiazolidinonas são compostos heterocíclicos com anel de cinco membros contendo oxigênio e enxofre na estrutura. Apresentam propriedades biológicas e farmacológicas como hipoglicemiante, analgésica, antiinflamatória, anticonvulsivante, antimicrobiana entre outras. Este trabalho visa sintetizar novos derivados tiazolidínicos caracterizados pela substituição da posição 5 da tiazolidina-2,4-diona por radicais metilênicos e benzilidênicos, a posição 3 por 6-cloroacetil-1,4-benzoxazin-3-ona (benzoxazona) e na posição 4 pelo enxofre. Foram observadas e comparadas as atividades biológicas dos compostos segundo os radicais no núcleo tiazolidínico. Os compostos III-a e III-b, obtidos por condensação, tiveram rendimentos de 65 e 58%, $R_f=0,51$ e $R_f=0,50$, pontos de fusão de 203 e 174°C. Os compostos IV-a, V-d e VI-c, tiveram rendimentos de 63, 36 e 3%; $R_f=0,49$, $R_f=0,46$ e $R_f=0,56$; pontos de fusão de 143, 175 e 141°C, respectivamente. O composto VII-e foi preparado por reação de *N*-alquilação com 6-cloroacetil-1,4-benzoxazin-3-ona e apresentou rendimento de 69%, $R_f=0,66$ (0,90:0,1:CHCl₃ / MeOH), ponto de fusão 243°C. O composto VIII-a apresentou rendimento de 92%, $R_f=0,46$ (0,94:0,6: CHCl₃ / MeOH), ponto de fusão 304°C. Foram obtidos seis novos compostos e determinadas suas estruturas químicas através de métodos espectroscópicos. Estes compostos (juntamente com a benzoxazona) foram submetidos a testes biológicos para determinação das atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante. A atividade antimicrobiana determinou a concentração inibitória mínima (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB), frente a 10 microrganismos patógenos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bacilos álcool-ácido resistentes, leveduras e fungos filamentosos. A atividade citotóxica foi realizada com células de linhagem HEp-2 (Carcinoma Epidermóide de Laringe) e Linhagem NCI-H292 (Pulmão). Para a atividade antioxidante foi utilizado 0,1 mL de Tc-99m na forma de pertecnetato de sódio (99m TcO₄Na), para avaliar o potencial de ligação nas células do sangue e plasma de um rato wistar. Foi testado apenas o composto Benzoxazona, apresentando baixa ação antioxidante. Os compostos mostraram inibição citotóxica variando de 30 a 80% para as duas linhagens.

ABSTRACT

Thiazolidines are five membered heterocycle compounds ring containing oxygen and sulfur in their structure. They show microbiological and pharmacological properties as hypoglycemic, analgesic, anti-inflammatory, etc. This work seeks to synthesize new thiazolidinics derivatives characterized by the substitution of the positions 3, 4 and 5 of the thiazolidine-2,4-dione by different radicals observing their biological activity. The derivatives were prepared by reactions of N-alkylation with 6-chloroacetyl-1,4-benzoxazin-3-one (benzoxazone) refluxing in methanol/KOH and condensation with substituted aromatic aldehydes, using pyridine and methanol or sodium acetate and acetic acid. The compounds obtained were submitted to biological assays for determination of the anti-microbiological, cytotoxic and anti-oxidant activities. The antimicrobial activity was evaluated qualitative, by disk diffusion method and quantitatively by determination of the minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), against 10 pathogen microorganisms, including Gram-positive bacteria, Gram-negative, bacilli alcohol-acid resistant, yeasts and filamentous mushrooms. The cytotoxic activity was accomplished with lineage cells HEp-2 (Cancer Epidermoid of Larynx) and lineages NCI-H292 (Lung). For the anti-oxidant activity 0,1 mL was used (3,7 MBq) of Tc-99m in the sodium pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) form. To evaluate the connection potential in the cells of the blood and plasma of mouse wistar. Six new compounds were obtained and their chemical structures were established by spectroscopic methods. All the compounds were submitted to qualitative microbiological evaluation, that of larger inhibition was submitted the determination of MIC. The compounds presented cytotoxic inhibition varying from 30 to 80% to the two lineages. One derived it presented low anti-oxidant action.

1. INTRODUÇÃO

Entre os grupos de compostos heterocíclicos mais estudados no mundo destacam-se as tiazolidinonas, que são derivados das tiazolidinas. Pesquisas na área da Química Medicinal estão totalmente voltadas para estas substâncias devido às suas propriedades biológicas.

As tiazolidinonas têm diversas atividades biológicas tais como: antibacteriana (Lima *et al*, 1992), anticancerígenos (Bhatt *et al*, 1994), antioxidantes (Noguchi, 1996) anticonvulsivantes (Ragab *et al*, 1997), fungicidas (Liu *et al*, 2000), antidiabética e antiinflamatória (Prabhakar, 1998), tuberculostática (Sing, 1981), atividade antiartrítica (Missbach *et al*, 1996), entre outras. O poder da atividade biológica das tiazolidinonas está relacionado aos vários sítios reativos do seu núcleo os quais lhes conferem esta diversificada atividade química e biológica.

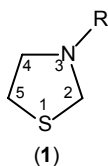
Com a finalidade de melhorar a atividade biológica destes compostos e seus derivados, pesquisadores de diversas partes do mundo vêm se preocupando em sintetizar novos compostos programados, com maiores atividades biológicas, na intenção de aumentar seu potencial contra diversas doenças infecciosas. Desta forma as novas tiazolidinonas sintetizadas neste trabalho trouxeram importantes contribuições ao estudo químico e biológico dos derivados tiazolidínicos visando melhorar ou aumentar a atividade biológica destes compostos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTUDO QUÍMICO

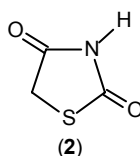
2.1.1. As Tiazolidinas

As tiazolidinas (1) são compostos formados por um anel pentagonal contendo os heteroátomos enxofre (posição 1) e nitrogênio (posição 3) em sua estrutura.



2.1.2. Preparação de derivados tiazolidínicos

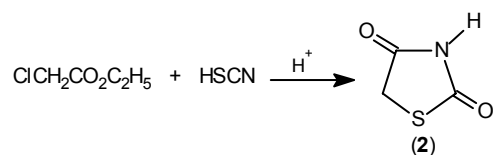
Entre o importante grupo das tiazolidinas encontram-se as tiazolidinonas com destaque para a tiazolidina-2,4-diona (2), que por ter vários sítios reativos podem sofrer substituições no anel heterocíclico. Estes compostos têm se destacado por apresentarem diversas atividades farmacológicas descritas na literatura (Sing *et al*, 1981; Góes *et al*, 1991; Albuquerque *et al*, 1995; Kuçukgüzel *et al*, 2002; Chandrakant *et al*, 2004).



Desde o século XIX vários pesquisadores vêm se preocupando em introduzir diversas substituições no anel tiazolidínico e testar suas atividades biológicas. Estas substituições lhes conferem ampla atividade biológica e são objeto de pesquisas em todo o mundo.

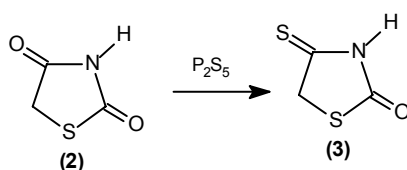
2.1.2.1. Preparação da tiazolidina-2,4-diona

O estudo das tiazolidinonas propriamente dito, se deu por volta de 1865 quando Heintz sintetizou a tiazolidina-2,4-diona (2) a partir do ácido tiocianoacético e cloroacetato de etila em meio ácido.



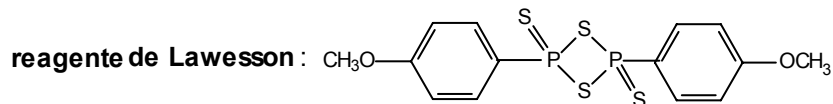
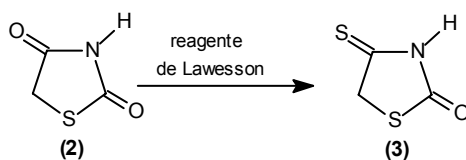
2.1.2.2. Preparação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona utilizando o pentassulfeto de fósforo

A obtenção da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**3**) se dá utilizando o reativo pentassulfeto de fósforo (P_2S_5) a partir da tiazolidina-2,4-diona (**2**) em dioxano seco e atmosfera inerte (Grishchuk *et al*, 1967).



2.1.2.3. Preparação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona utilizando o reagente de Lawesson

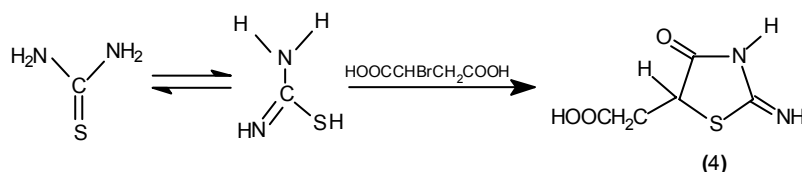
O tratamento da tiazolidina-2,4-diona pelo 2,4-bis-(4-metóxfenil)-1,3-ditiadifosfatano-2,4-dissulfeto, reagente de Lawesson, em presença de dioxano seco conduz à formação da 4-tioxo-tiazoldina-2-ona (Andrade *et al*, 2002).



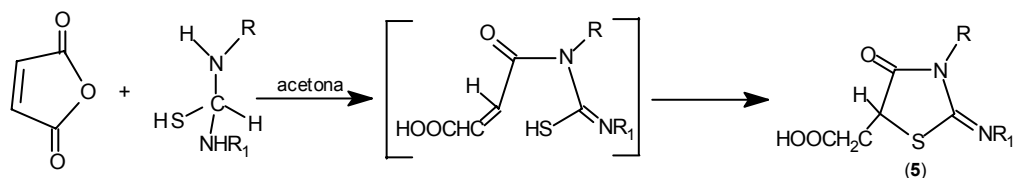
2.1.2.4. Preparação de derivados da 2-imino-tiazolidina-4-ona

Um dos compostos tiazolidinônicos substituídos por um grupo imino na posição 2 do anel heterocíclico, foi preparado tratando o ácido α -bromosuccínico na presença

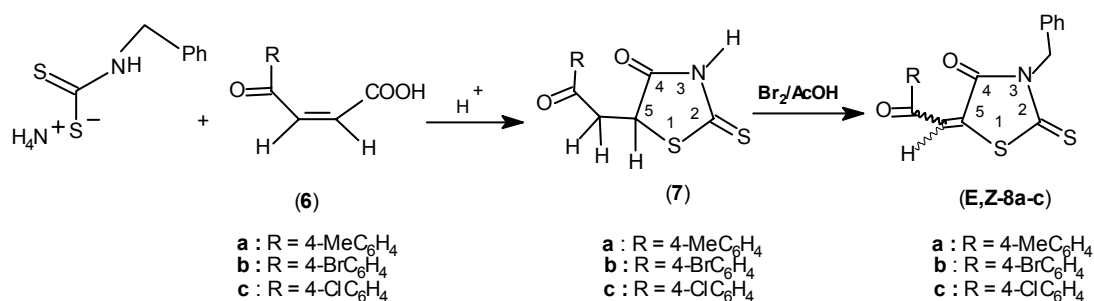
de acetato de sódio em metanol produzindo o ácido 2-imino-4-oxo-5-tiazolidina-acético (**4**) (Minka, 1966).



Para melhorar o rendimento desses derivados, Trived em 1966 e Raman em 1978, usaram quantidades equimolares de tiouréias substituídas, e anidrido maléico em acetona, obtendo o ácido 2-imino-4-oxo-5-tiazolidina-acético (**5**).

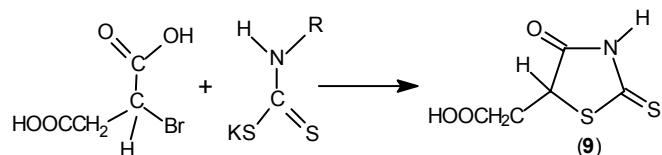


2.1.2.5. Preparação dos compostos E,Z-5-Aroilmetileno-3-benzil-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidina.



Diversos autores estudaram os compostos de configuração (**E,Z-8a-c**), que foram sintetizados pelo método similar àquele de Nagase (1974), no qual tratou 5-(2-arila-oxoetil)-4-oxo-2-tioxo-1,3-tiazolidina (**7a-c**) obtido através da reação dos ácidos aroilacrílico (**6a-c**) com benzilditiocarbamato de amônio. Estes autores relataram a formação dos estereoisômeros E e Z, com predominância da forma Z (Omar *et al*, 1995; Kandeel, 2001).

Utilizando um ácido dicarboxílico, Minka obteve, em 1966, o ácido 4-oxo-5-tiazolidina-acético (**9**).



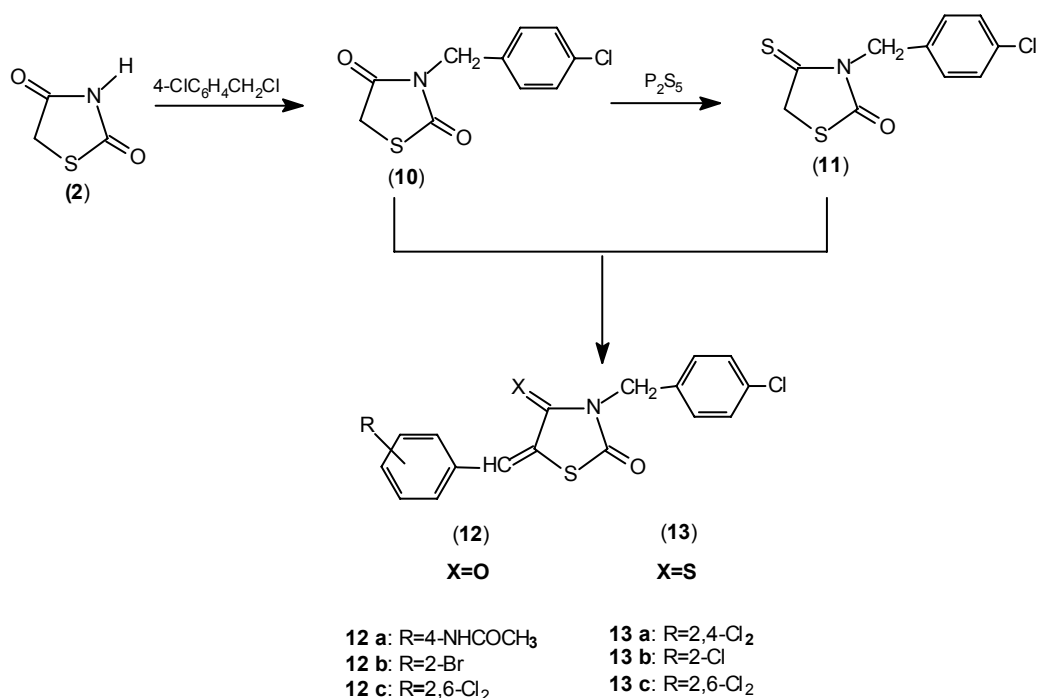
2.1.3. Reações das tiazolidinonas

Apesar de existir um grande número de reações de tiazolidinonas conhecidas, aqui serão descritas apenas a *N*-alquilação e condensação, por serem estas que fazem parte deste trabalho.

2.1.3.1. Reações de *N*-alquilação das tiazolidinonas

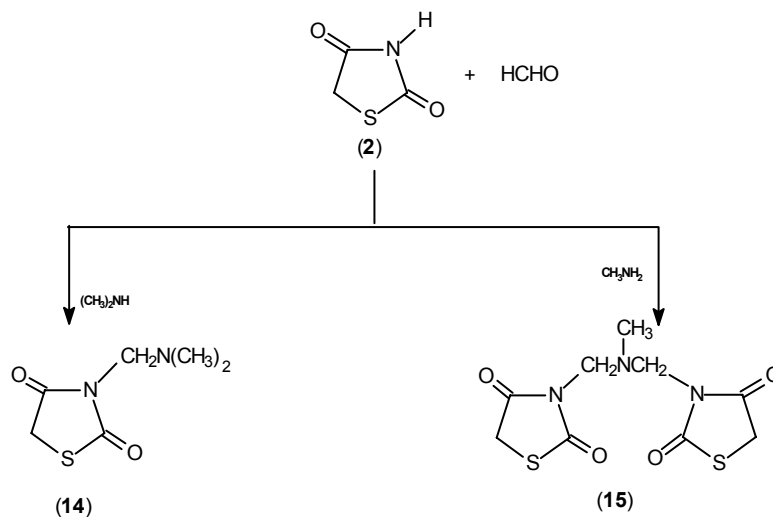
a) Preparação dos compostos 5-arilideno-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona e 5-arilideno-3-(4-cloro-benzil)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona.

A condensação dos compostos **10** e **11** foi realizada com vários aldeídos aromáticos, levando aos produtos **12 a-c** e **13 a-c**) (Guarda *et al*, 2003).



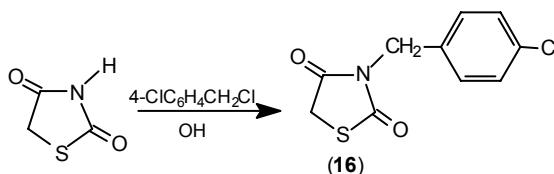
b) N-alquilação utilizando a reação de Mannich

Um dos métodos utilizados na N-alquilação foi a reação de Mannich a qual ocorre entre 2,4-tiazolidinadiona, formaldeído e aminas. Brown (1961), relatou a reação com aminas secundárias morfina, piperidina ou dimetilamina, obtendo a 3-aminometil-tiazolidina-2,4-diona (**14**), enquanto uma reação similar com metilamina, produziu a N,N-bis (2,4-tiazolidinadiona-3-il-metil)-metilamina (**15**).



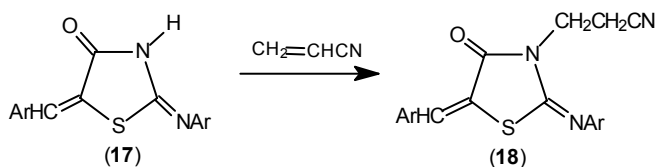
c) N-alquilação utilizando o 1-cloro-4-clorometilbenzeno

A tiazolidina-2,4-diona, foi alquilada na posição 3 pelo 1-cloro-4-clorometilbenzeno em meio alcalino formando o 4-clorobenzil (**16**) (Guarda *et al*, 2003; Albuquerque *et al*, 1995; Góes *et al*, 1991).



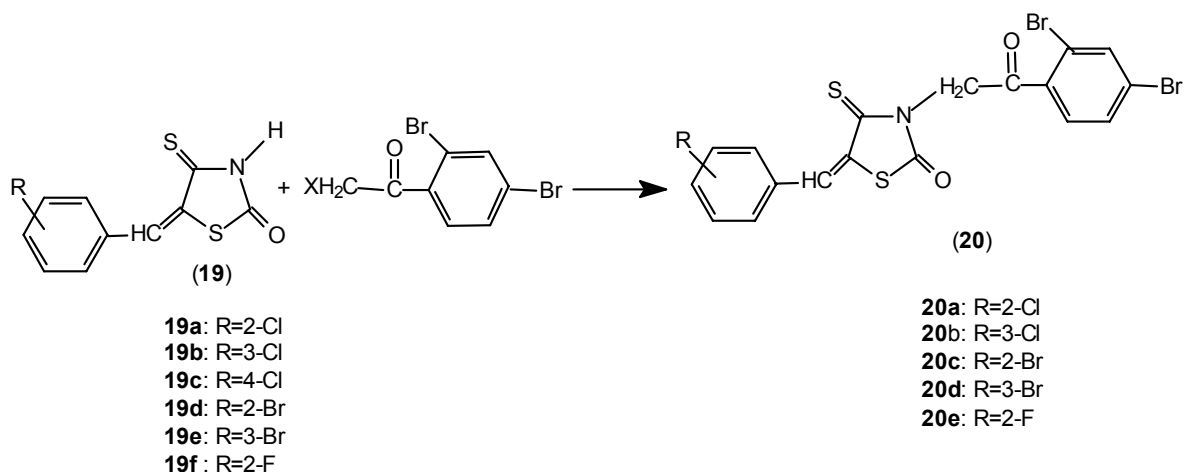
d) N-alquilação das 2-(arilimino)-5-arilideno-4-tiazolidinonas

Harhash (1972) realizou a N-alquilação das 2-(arilimino)-5-arilideno-4-tiazolidinonas (**17**). A reação deste composto na posição 3 com acrilonitrila produziu as 2-(arilimino)-3-(cianoetil)-5-arilideno-4-tiazilidinonas (**18**).

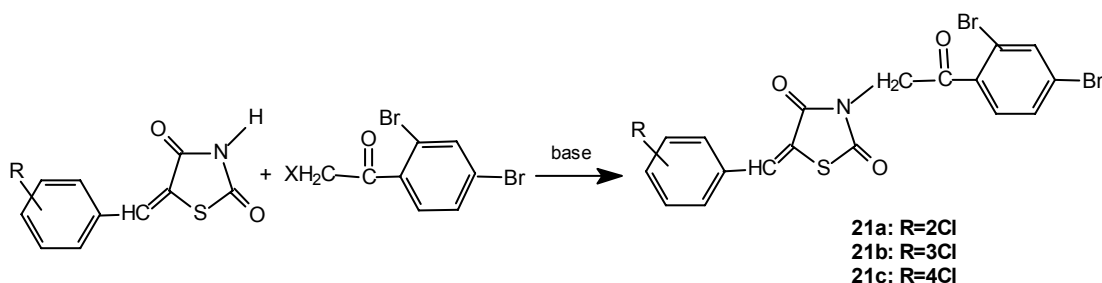


e) N-alquilação da 4-tioxo-5-benzilideno-tiazolidina-2-ona

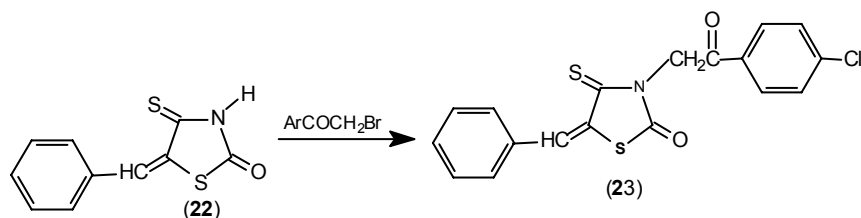
Esta alquilação procedeu pela reação da 4-tioxo-5-benzilideno-tiazolidina-2-ona (**19**), usando KOH e metanol para formação do sal seguido da adição de cloretos ou brometos de benzila ou fenacila substituídos. Utilizando a 2,4-dibromoacetofenona os produtos obtido foram os novos compostos (**20a-e**) (Albuquerque *et al*, 1995; Chantegrel *et al*, 2002).



Reagindo o 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona com a 2,4-dibromoacetofenona os produtos sintetizados foram **(21a-c)**.



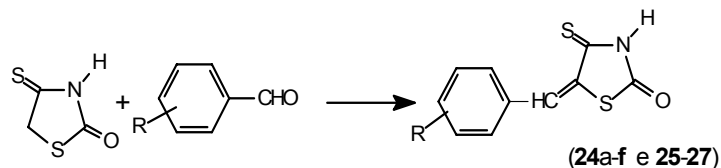
A alquilação do 5-benzilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**(22)**) foi processada em presença de hidróxido de potássio e um equivalente de metanol à temperatura ambiente podendo apresentar-se sob duas formas de isômeros, Z ou E (**(23)**). Os valores da constante de acoplamento são compatíveis com o isômero tipo Z (Andrade *et al*, 2002).



2.1.3.2. Reações de condensação

a) Condensação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona

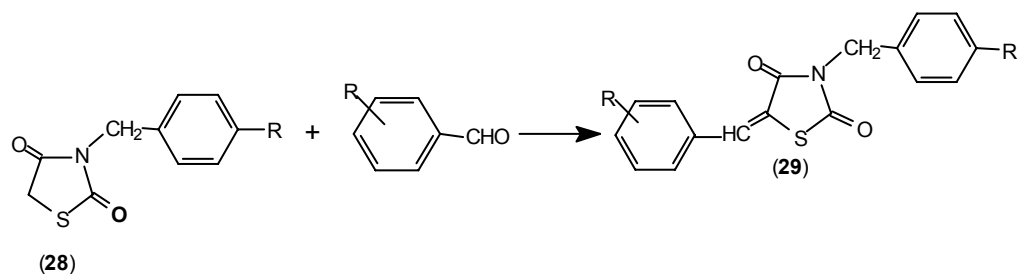
A 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**3**) reage com diferentes aldeídos aromáticos formando os derivados (**24a-f** e **25-37**) em presença de acetato de sódio em ácido acético (Andrade *et al* e Chantegrel *et al*, 2002).



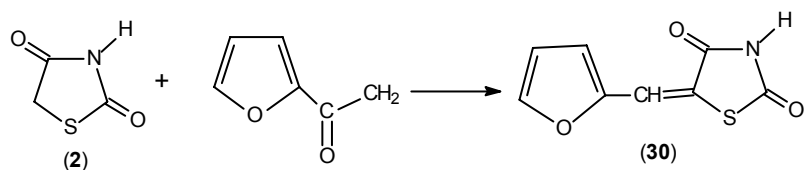
24a : R=2-Cl
24b : R=3-Cl
24c : R=4-Cl
24d : R=2-Br
24e : R=3-Br
24f : R=2-F
25 : R = H
26 : R=2-Br
27 : R=2,4-OCH₃

b) Condensação da tiazolidina-2,4-diona

Através de diversos tipos de aldeídos aromáticos foram realizadas várias condensações obtendo-se vários compostos tais como (**28**) e (**29**) substituídos (Albuquerque *et al*, 1995, 1997; Góes *et al*, 1991).

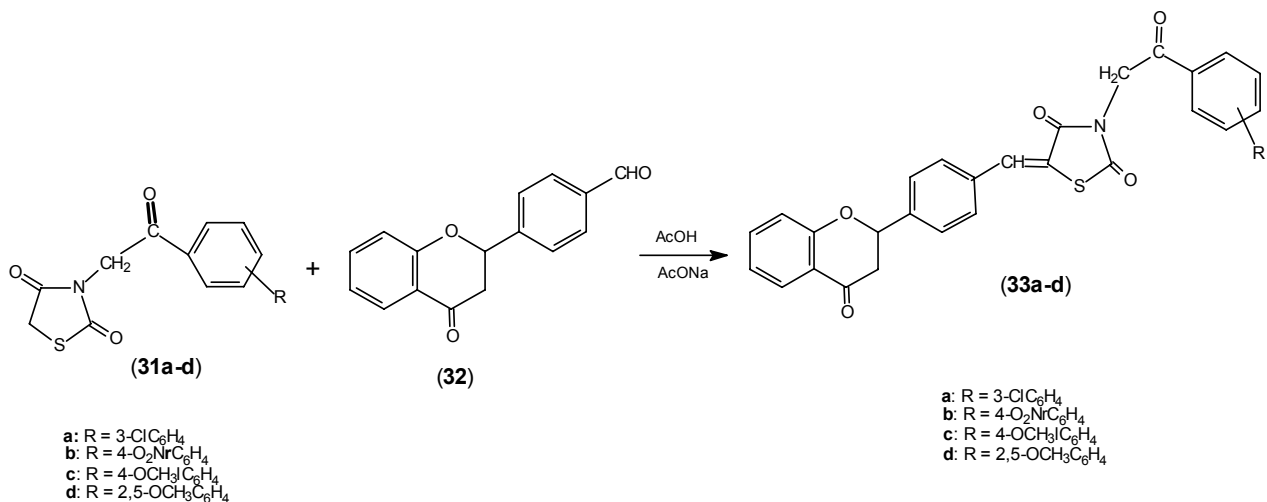


c) Usando uma mistura de furfuraldeído, tiazolidina-2,4-diona, ácido benzóico, piperidina e tolueno, Prabhakar *et al*, (1998), obtiveram o composto **(30)**.



d) Preparação dos compostos 3-(substituído-fenacil)-5-[4'(4H-4-oxo-1-benzopirano-2-il)-benzilideno]-tiazolidina-2,4-diona

Os compostos **(33a-d)** foram obtidos utilizando a condensação de Knoevenagel do derivado tiazolidínico **(31a-d)** e da 4'-flavonacarboxialdeído **(32)** (Tunçbilek, 1999).



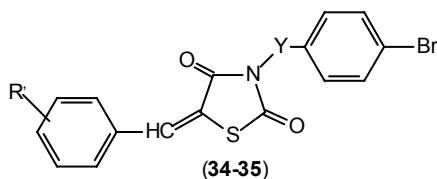
Vários destes compostos relatados na literatura, e substituídos nas posições 3,4 e 5, apresentaram comprovadas propriedades biológicas. Os novos compostos sintetizados neste trabalho também foram substituídos nestas posições, sendo por isso de grande importância o estudo biológico destes compostos.

2.2. ESTUDO BIOLÓGICO

2.2.1. Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade

2.2.1.1. Atividade antimicrobiana

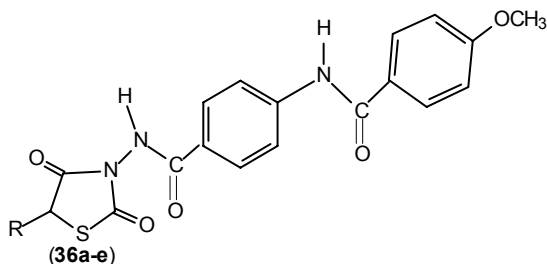
Os derivados tiazolidínicos como os 3-substituídos-5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona (**34-35**) foram sintetizados e selecionado para atividade antiinflamatória (Albuquerque *et al*, 1995).



34: R= Br, Y= CH₂CO

35: R= H, Y= CH₂

Também os derivados da tiazolidina-2,4-diona (**36 a-e**) têm demonstrado possuir atividade antibacteriana, antifúngica, anticâncer e antituberculose (Küçükgülzel *et al*, 2002).



36a : R= 5-nitrofuryl

36b : R= C₆H₄-F (4)

36c : R= C₆H₄-Cl (4)

36d : R= C₆H₄-Br (4)

36e : R= C₆H₄-OH, OCH₃ (4, 3)

Estes derivados tiazolidínicos, entre outros estudados no mundo, apresentaram ação antimicrobiana e trazem grandes contribuições à saúde humana, uma vez que o homem vive em contato permanente com os microrganismos. Muitos desses microrganismo colonizam o corpo, o trato digestivo e os orifícios naturais.

O estudo das doenças trouxe ao longo dos séculos maior compreensão à medida que os métodos de estudo dos processos vitais progrediram. A terapêutica antimicrobiana tem hoje ao seu dispor uma grande variedade de antibióticos que são testados para os mais diversos microrganismos como bactérias, fungos, leveduras, etc.

As pesquisas com microrganismos obtêm resultados imediatos devido à multiplicação rápida desses agentes (Pelczar, 1996).

2.2.1.2.Citotoxicidade

Estudos feitos recentemente mostraram que, apesar da troglitazona (um derivado da tiazolidina-2,4-diona) ser um agente antidiabético oral efetivo, a mesma apresenta efeito apoptótico (morte celular programada) em hepatoma (o mais freqüente câncer originado no fígado) humano. O uso clínico de troglitazona tem sido restringido no EUA e Japão por causa da indução severa de lesão hepática (Yamamoto *et al*, 2001). Os quimioterápicos são utilizados há muito tempo. As civilizações antigas do Egito utilizavam sais metálicos provenientes do chumbo, arsênico e cobre no tratamento de algumas doenças. No século I depois de Cristo, Dioscorides utilizou a Colchinina no tratamento de tumores iniciais. Durante a Segunda Guerra Mundial alguns trabalhadores foram expostos ao gás mostarda, proveniente da explosão de um depósito, depois de determinado tempo, apresentaram aplasia medular. Esse fato despertou a curiosidade dos cientistas que iniciaram uma série de estudos e pesquisas sobre o efeito dos compostos químicos no tratamento das neoplasias (Pelczar, 1996).

As pesquisas atuais buscam novas drogas e novas formas de utilização para as drogas já existentes que apresentem efeitos tóxicos menos agressivos, especialmente para o coração, pulmão, rins e sistema nervoso. Dá-se o nome genérico de quimioterapia ao tratamento de qualquer doença por meio de substâncias químicas citotóxicas.

2.2.1.2.1. Mecanismos de resistência

As drogas citotóxicas são capazes de induzir resistência nos tecidos neoplásicos e células malignas, sendo essa a causa da perda de ação dos ditos fármacos depois de uma ou várias séries de tratamento, entre as quais o processo haja reaparecido.

Esta resistência é semelhante à observada para as bactérias frente aos quimioterápicos e antibióticos, obedecendo às mesmas leis. Assim é possível observar a existência de resistência cruzada com respeito a drogas de estruturas químicas semelhantes ou que se transformam em substâncias análogas no organismo, de maneira que quando o tumor se faz resistente a um agente alquilante, também o é para outros. Não se conhece o mecanismo da dita resistência. Acredita-se que é devido a uma propriedade que adquire a célula neoplásica de recuperar-se do dano produzido pela droga (Litter, 1970). Entre estas alterações nas células resistentes a agentes alquilantes estão: 1) permeação diminuída de drogas transportadas ativamente; 2) produção aumentada de substâncias nucleófilas, como glutacion, que são capazes de competir com o DNA-alvo pela alquilação; 3) atividade aumentada das enzimas de reparação do DNA como a guanina O⁶ – alquil transferase, que repara a alquilação pela nitrosuréia; e 4) taxas aumentadas de metabolismo das formas ativadas de ciclofosfamida para os seus metabólitos inativos ceto e carbóxi pela enzima aldeído desidrogenase (Goodman *et al*, 1996). O problema da resistência exige a busca de efetivos agentes antimicrobianos contra a resistência de microrganismos patogênicos. Além disso, o tratamento de doenças infecciosas torna-se mais difícil atualmente em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Chandrakant, *et al*, 2004), um vírus que exemplifica bem a questão da resistência aos antibióticos devido à sua capacidade de sofrer mutações.

2.2.2. Atividade antioxidante

2.2.2.1. Substâncias antioxidantes e radicais livres

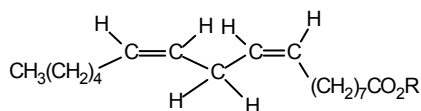
Uma substância antioxidante é um potente redutor que inibe o processo da oxidação ou, em termos biológicos, protege os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos dos radicais livres, os quais promovem a oxidação de macromolé-

culas ou estruturas celulares estando por isso implicados em um grande número de doenças que afetam o ser humano (Oga, 1996). Os radicais livres são toda e qualquer espécie que contenha um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais atômicos ou moleculares (Oga, 1996; Grossman, 2002).

No nosso organismo os átomos de hidrogênio de ligações N-H, O-H e hidrogênios de carbonos insaturados olefínicos, por exemplo, podem ser capturados pelos radicais livres. Esta captura produz um novo radical que pode reagir com o oxigênio numa reação em cadeia provocando a autooxidação (Fiorucci, 2003).

2.2.2.2. Autooxidação

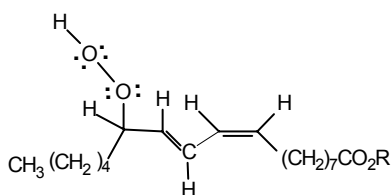
A autooxidação é um processo que ocorre com muitas substâncias e é responsável pela rancidez que aparece quando há deterioração de gorduras e óleos, e também ocorre no nosso organismo provocando danos irreversíveis. O éster do ácido linoléico (**37**) é um derivado do ácido graxo poliinsaturado que aparece como éster nas gorduras poliinsaturadas e que podem sofrer ataques dos radicais livres aos seus átomos de hidrogênio ligados aos carbonos das duplas ligações (Solomons, 1996).



(37)

(Éster do Ácido linoléico)

O resultado da autooxidação deste éster (**37**), por exemplo, é a formação de um hidroperóxido (**38**).

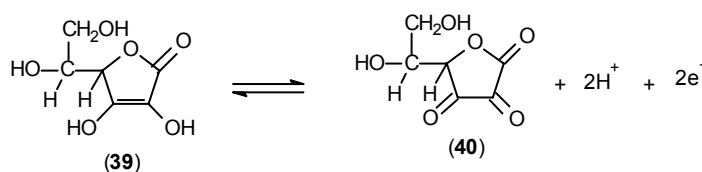


Hidroperóxido

(38)

A autooxidação é inibida pela presença de compostos que agem como “capturadores” de radicais peroxila, reagindo com eles e formando radicais estabilizados que não propagam a cadeia (Solomons, 1996). Tais compostos constituem o sistema de defesa antioxidante do organismo (Oga, 1996).

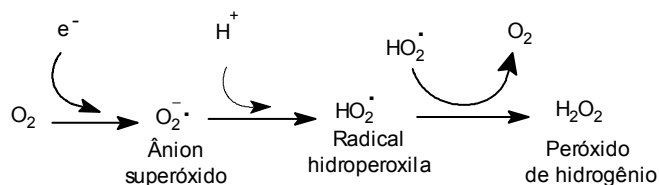
A vitamina C (ácido L-ascórbico) (**39**) é um agente redutor poderoso, em solução aquosa. A excepcional facilidade com que essa vitamina é oxidada faz com que ela funcione como um bom antioxidante (um composto que pode proteger outras espécies químicas de possíveis oxidações, devido a seu próprio sacrifício). A primeira etapa de sua oxidação é facilmente reversível e produz o ácido desidroascórbico (**40**) (Fiorucci, 2003).



Oxidação do ácido ascórbico ao ácido desidroascórbico

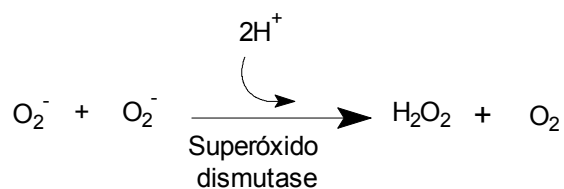
A redução do O_2 por um único elétron origina o ânion superóxido, $\text{O}_2^{\cdot -}$, um radical livre com elevado poder destruidor (Stryer, 2001) e que pode atuar como iniciador e propagador de cadeias de radicais livres (Oga, 1996). A liberação do ânion superóxido é reduzida pelo citocromo oxidase e outras proteínas que reduzem o O_2 (Stryer, 2001).

Ainda assim nos processos biológicos se formam pequenas quantidades do ânion superóxido como a oxidação do grupo ferrohemo (Fe^{2+}) da hemoglobina a ferrihemo (Fe^{3+}) pelo O_2 , conhecida como reação de Fenton (Vieira, 1995). A protonação do ânion superóxido conduz à formação do radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), que pode reagir espontaneamente com outro radical hidroperoxila para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**Esquema 1**).



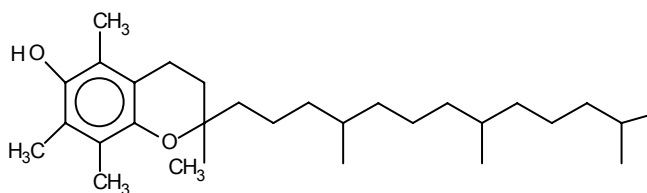
(Esquema 1)

O ânion superóxido pode ser eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD) que cataliza este radical em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Stryer, 2001). (Esquema 2).



(Esquema 2)

Também a vitamina E (α -tocoferol) (**41**) pode agir como armadilha capturadora de radicais livres como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor da vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), flavanóides, probucol, entre outros.

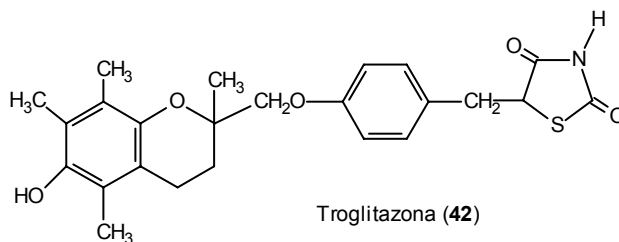
Vitamina E (**41**) (α -tocoferol)

Um dos importantes papéis dos antioxidantes, no nosso organismo, pode ser a inibição de radicais livres que provocam danos às células tais como a peroxidação lipídica e o envelhecimento.

2.2.2.3. Peroxidação dos lipídios

Os constituintes antioxidantes da partícula da proteína de baixa densidade LDL (do inglês: Low Density Lipoprotein), são fundamentais para a sua proteção (Esterbauer *et al*, 1992). A LDL constitui um complexo de lipídios polares neutros, uma proteína de grande peso molecular, a apolipoproteína B, e antioxidantes lipofílicos, predominando o α -tocoferol e o β -caroteno. Estudos *in vitro* mostraram que a oxidação de LDL somente se inicia após o estresse oxidativo haver depletado o conteúdo antioxidante celular (Jessup *et al*, 1990). O estresse oxidativo ocorre em situações em que há desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de prooxidantes, predominando estes últimos (Oga, 1996). Vários estudos levantam a hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha papel importante na patogênese da aterosclerose (Batlouni, 1997).

Também a ação antioxidante de derivados tiazolidínicos tem sido pesquisada. Esta ação fica demonstrada na inibição da oxidação de proteína de baixa densidade (LDL) pela troglitazona (5-[4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromona-2-il-metóxi)benzil]-tiazolidina-2,4-diona) (**42**) (Noguchi, 1996). A troglitazona tem sido selecionada após testes de muitos derivados fenólicos com um anel tiazolidínico para selecionar uma droga que seja duplamente efetiva como um agente hipoglicêmico e um antioxidante (Fujiwara, 1988; Yoshida, 1989).



2.2.2.4. Envelhecimento.

De acordo com Oga (1996) vários estudos científicos tentam explicar a natureza do processo do envelhecimento, entre eles a teoria dos radicais livres propõe que o envelhecimento resulta de lesões danosas aleatórias aos tecidos, as quais seriam induzidas por radicais livres. É importante salientar que a radiação ionizante produz radicais livres e acelera algumas características do envelhecimento, mesmo que este envelhecimento induzido não mimetize o envelhecimento normal.

Um outro ponto a destacar é que os radicais livres de oxigênio são produzidos normalmente no metabolismo celular, os quais podem não ser seqüestrados pelos sistemas de defesa antioxidante e provocariam lesões nas células. Algumas pesquisas demonstram que as defesas antioxidantes de alguns tecidos são suficientes apenas para protegê-los contra incidências normais de geração de radicais, mas que se tornam insuficientes quando ocorre a produção demasiada de radicais livres.

As várias pesquisas sobre a ação antioxidante nas células podem ser feitas também pela marcação de hemácias com tecnécio-99m (metaestável) que mede a ação antioxidante de uma substância pelo aumento da capacidade de ligação do ^{99m}Tc na cadeia beta da hemoglobina (Braga *et al*, 2000).

2.2.2.5. Marcação de hemácias e plasma *In vitro* com ^{99m}Tc

Na tabela periódica o tecnécio se encontra no grupo VIIB sendo então um metal de transição, de número atômico 43 e massa atômica 99,9062, tendo na sua última camada sete elétrons. Podendo atingir o estado de oxidação 7^+ , caso perca-os, dando origem ao íon pertecnetato (TcO_4^+). No estado de oxidação 7^+ , esse radionuclídeo é uma espécie não reativa e não pode, por isso, se fixar às estruturas moleculares por adição direta. Desta forma é necessária a redução do tecnécio-99m do estado de oxidação para um estado de oxidação mais baixo. O agente redutor utilizado para esse fim é o cloreto estanoso (Braga, 2000).

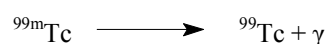
Este agente redutor nos sistemas biológicos, no entanto, tem sido referido em alguma investigações por apresentar efeitos nocivos (tóxicos) (Bernardo-Filho *et al*, 1996). Busca-se desta forma um agente redutor que ofereça menor ou nenhum dano aos sistemas biológicos.

Os radiofármacos marcados com tecnécio-99m são os principais agentes para diagnósticos utilizados nas clínicas de medicina nuclear, em função de uma série de características físicas do radionuclídeo e pela praticidade dos radiofármacos serem preparados no local de uso, por meio de uma reação de complexação entre um agente complexante (fármaco) e o tecnécio-99m. Entretanto, durante esta reação podem ser geradas algumas impurezas que proporcionam a formação de produtos com baixa qualidade ou com características diferentes das desejadas (Marques *et al*, 2001).

O uso de radioisótopos na medicina nuclear tem aplicação tanto terapêutica quanto para diagnóstico.

No uso terapêutico, a radiação é empregada na tentativa de curar doenças. Algumas formas de câncer, por exemplo, podem ser tratadas por radioterapia.

As células do tumor cancerígeno são destruídas pelos efeitos da radiação. Os radioisótopos são empregados também em diagnóstico, fornecendo informações sobre o tipo ou extensão da doença. O radioisótopo ideal para uso de diagnóstico deveria possuir algumas qualidades: emitir partículas gama, pois estas tem um grande poder de penetração, e podem sair do organismo; não emitir, preferencialmente, partículas alfa ou beta; o tempo de meia-vida deve ser ideal: nem tão curto, que não possa ser detectado a tempo, nem tão longo, onde atividade ainda existiria após o diagnóstico. O tecnécio-99m, ^{99m}Tc é o isótopo que atende a quase todas as necessidades. A letra m corresponde a metaestável: o isótopo pode perder alguma energia e se tornar estável. É isto o que ocorre, o átomo ^{99m}Tc emite uma partícula gama e se torna o átomo ^{99}Tc , estável (**Esquema 3**) (Revista eletrônica do Departamento de Química da UFSC, 2003).



(Esquema 3)

Entre os diagnósticos com o tecnécio-99m estão a marcação de células sanguíneas como hemácias, leucócitos e plasma. A molécula de hemoglobina é o sítio de ligação do tecnécio-99m e, para haver fixação no interior das hemácias, os íons pertecnetato e estanoso atravessam a membrana plasmática das células, provavelmente por transporte ativo, através do sistema de transporte ânion Banda 3 (íon pertecnetato, TcO_4^-) e canais de cálcio (íon estanoso, Sn^{2+}) (Oliveira *et al*, 1997). (**Fig. 1**)

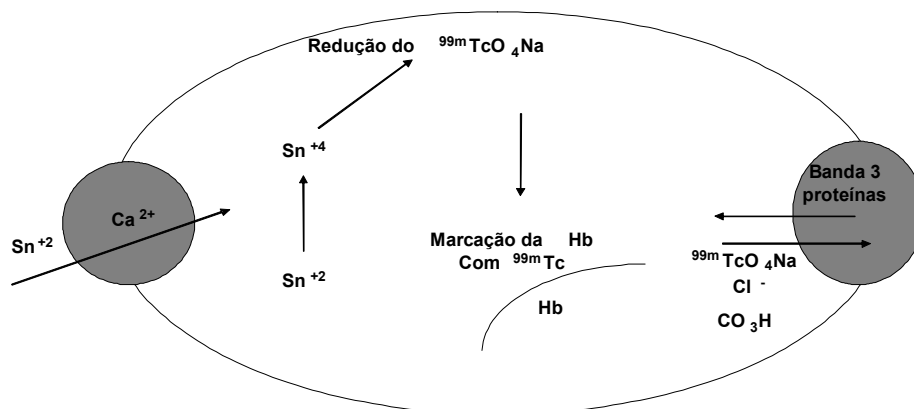
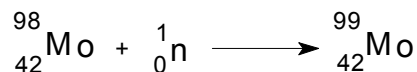


Figura 1.: Representação das etapas (dentro da células) para a marcação de hemácias com tecnécio-99m.

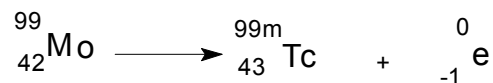
Em medicina nuclear o tecnécio é largamente utilizado devido as suas características que justificam o seu emprego, tem meia-vida de 6 horas, marcação de diferentes moléculas e estruturas celulares, energia gama de radiação de 140 KeV, dose mínima aos pacientes e energia corpuscular desprezíveis. A fonte de tecnécio-99m é o molibidênio-99, que é produzido pelo bombardeamento do molibidênio-98 por nêutrons no reator nuclear (**Esquema 4**).



(Esquema 4)

Muitos laboratórios de radiologia têm um pequeno gerador (**Fig. 2**) de radioisótopo contendo molibidênio-99, que decai para formar o tecnécio-99m (**Esque-**

ma 5), o qual pode ser produzido em hospitais através do decaimento β de ^{99}Mo . (Costa e Sousa, 1999).



(Esquema 5)

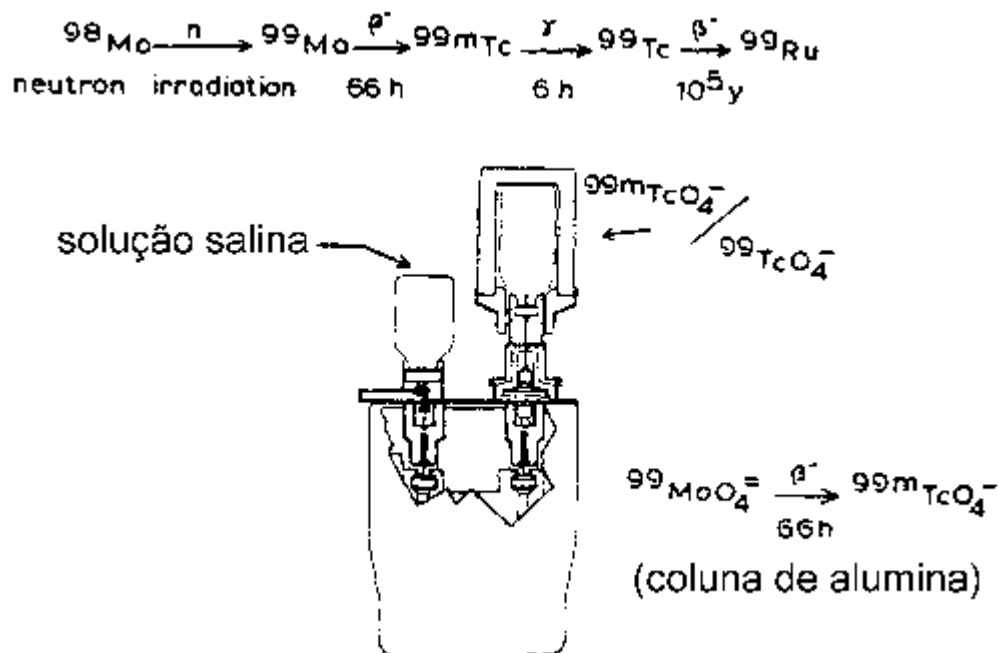


Figura 2: gerador de Tecnécio- $^{99\text{m}}$

A revisão da literatura destacou a importância dos vários métodos de síntese dos derivados tiazolidínicos, rotas e grupos de reagentes mais favoráveis para obtenção destes compostos bem como a importância dos antibióticos para a atividade antimicrobiana. Mostrou também a atividade citotóxica e o amplo campo de pesquisas que os mesmos oferecem para a síntese de novos compostos. Foi destacado também suas possíveis aplicações na medicina nuclear através do melhoramento da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas buscando substituir o cloreto estanoso (tóxico) por

um agente redutor menos nocivo para os sistemas biológicos. Tais enfoques direcionaram os objetivos deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Sintetizar derivados substituídos da tiazolidinona, determinar a atividade antimicrobiana, citotóxica e promover a marcação de hemácias e plasmas com tecnécio-99m.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar os compostos nas séries 1 e 2. Na série 1 usar os aldeídos aromáticos 2,4-diclorobenzaldeído e 3,4-diclorobenzaldeído para substituição na posição 5 e o 6-cloroacetil-1,4-benzoxazin-3-ona para substituição da posição 3 da tiazolidina-2,4-diona, respectivamente;
- Sintetizar os compostos da série 2 utilizando o pentasulfeto de fósforo para a introdução do enxofre na posição 4, obtendo a 4-tioxo-tiazolidina-2-ona;
- Utilizar os aldeídos 3-formil-6-metil-cromona e 10-cloro-9-formil-antraceno para a substituição da posição 5 da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona.
- Determinar a estrutura química dos compostos sintetizados usando métodos espectroscópicos tais como Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) e de carbono treze (RMN¹³C), Infravermelho (IV) e Massas (EM).
- Determinar a atividade antimicrobiana qualitativa pelo método de difusão em disco e, quantitativa, pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB), frente a 10 microrganismos patógenos.
- Determinar a atividade citotóxica frente a linhagem HEp-2 (Carcinoma Epidermóide de Laringe) e a linhagem NCI-H292 (Carcinoma Muco Epidermóide de Pulmão) através de teste de inibição do crescimento celular baseado no método MTT.
- Promover a marcação de hemácias e plasmas com o radioisótopo Tc-99m utilizando sangue de rato wistar e cloreto estanoso para redução do ^{99m}Tc.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Solventes

Acetona

Acetato de etila

Ácido acético glacial

Ácido monocloroacético

Ácido Tricloroacético

Benzeno

Ciclohexano

Cloreto de Benzila

Cloreto de Sódio

Cloreto Estanoso Di-Hidratado

Clorofórmio

Diclorometano

Dioxano

DMSO

Etanol

Éter Etílico

Hexano

Hidróxido de Sódio

Hidróxido de Potássio

Metanol

Tetracloreto de carbono

Tolueno

Tetrahidrofurano (THF)

4.1.2. Reagentes

Acetato de sódio

2,4-dicloro-benzaldeído

3,4-dicloro-benzaldeído

3-formil-6-metil-cromona

10-cloro-9-formil-antraceno

6-cloroacetil-1,4-benzoxazin-3-ona (benzoxazona)

Pentassulfeto de fósforo

Piperidina

Tecnécio- Tc-99m ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$)-pertechnetato de sódio, eluido do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ do IPEN/CNEN)

Cloreto de sódio

Cloreto estanoso di-hidratado

Corante azul Tripan

4.1.3. Equipamentos

Aparelho para ponto de fusão modelo 340.23 QUIMIS.

Balança analítica modelo E. Mettler

Centrífuga JANETZK K23 RPM IN 4000

Cilindro de argônio – WHITE MARTINS

Espectrofotômetro de infravermelho, marca BRUKER modelo IFS66

Espectrofotômetro de massa HEWLETT-PACKARD 5890. Série II modelo 5988A

Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear, marca BRUKER modelo DRX 400

Estufas modelos diversos, marca FANEM

Estufas (Sedas, Milão-Itália) com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO_2

Freezer mod. 340 Pratices – CONSUL

Lâmpada ultravioleta

Placa de aquecimento com agitador magnético FANEM

Leitor automático de placas do tipo Multiskan a 540 nm

4.1.4. Diversos

Cromatofolhas de sílica gel 60F₂₅₄

Discos de papel de 6 mm de diâmetro (Whatman nº 2)

Placas de Petri

Placas de cultura com 96 poços (225 µL em cada poço)

Meios de cultura Mueller-Hinton-ágar, Glicose extrato de levedura ágar e Sabouraud-ágar

DMEM-Minimun Essencial Médium Eagle Modificado Dulbecco's

Soro fetal bovino

Solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/ mL + estreptomicina 250 mg/mL)

L-glutamina 200 mM.

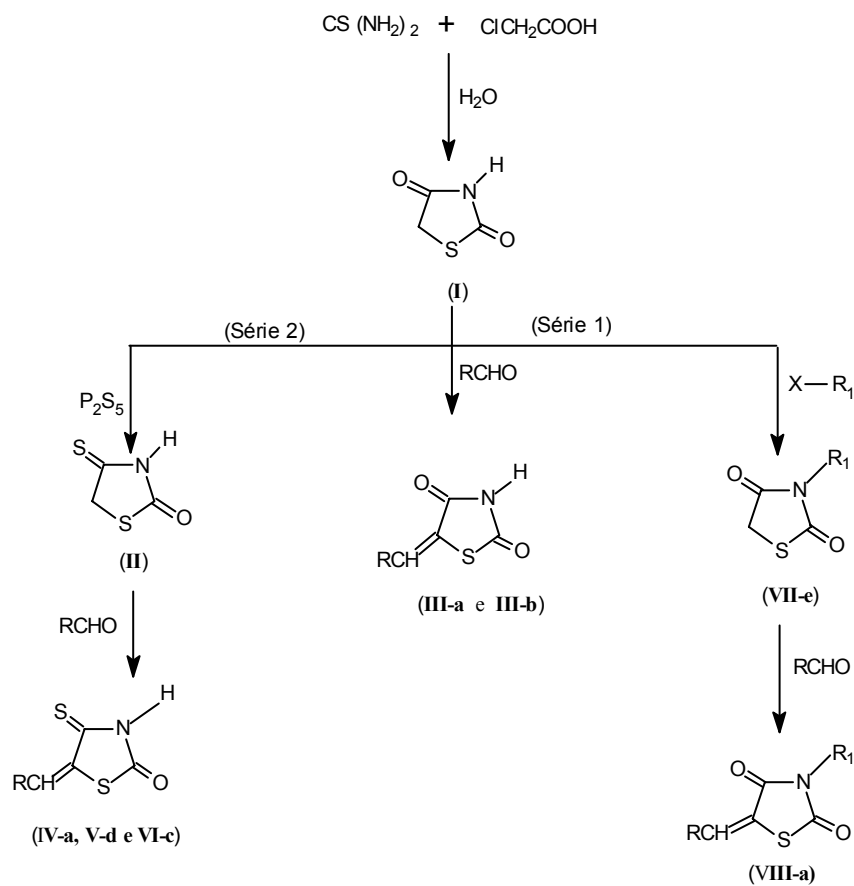
4.2. Métodos

4.2.1. Metodologia do Estudo Químico

A reação da tiouréia com o ácido monocloroacético em meio aquoso a 110°C, sob agitação magnética, conduziu à formação da tiazolidina-2,4-diona (**I**) com rendimento de 45% . A tiazolidina-2,4-diona (**I**) tratada com pentassulfeto de fósforo em presença de dioxano seco, levou à formação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**II**). A tiazolidina-2,4-diona (**I**) reagiu com o 2,4-diclorobenzaldeído e 3,4-dicloro-benzaldeído na presença de piperidina em metanol, sob refluxo formando os derivados **III-a e III-b**. A 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**II**) reagiu com o 2,4-diclorobenzaldeído, 3-formil-6-metil-cromona e o 10-cloro-9-formil-antraceno na presença de acetato de sódio anidro em ácido acético, sob refluxo sendo obtidos os produtos **IV-a, V-d e VI-c**.

O átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio na posição 3 da tiazolidina-2,4-diona e da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona, que é suficientemente ácido, foi substituído por um átomo de potássio da base KOH, formando um sal. O sal formado reagiu com o 6-cloroacetil-1,4-benzoxazin-3-ona através de uma reação de alquilação sintetizando o composto (**VII-e**). Este composto reagiu com o aldeído 10-cloro-9-formil-antraceno na presença de piperidina em etanol absoluto formando o composto (**VIII-a**). Estas reações foram efetuadas de acordo com o diagrama de síntese a seguir.

4.2.1.1. Diagrama de Síntese



a : R = 2,4-ClC₆H₃—

b : R = 3,4-ClC₆H₃—

c : R =

d : R =

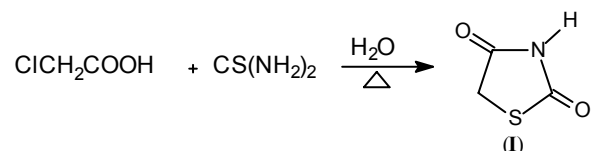
e : R₁ =

X = Cl

4.2.1.2. Parte Experimental

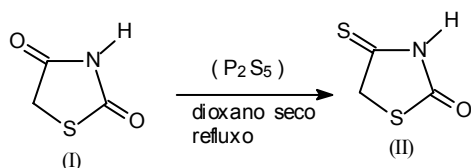
4.2.1.2.1. Obtenção dos derivados tiazolídínicos

4.2.1.2.1.1. Obtenção da tiazolidina-2,4-diona (I)



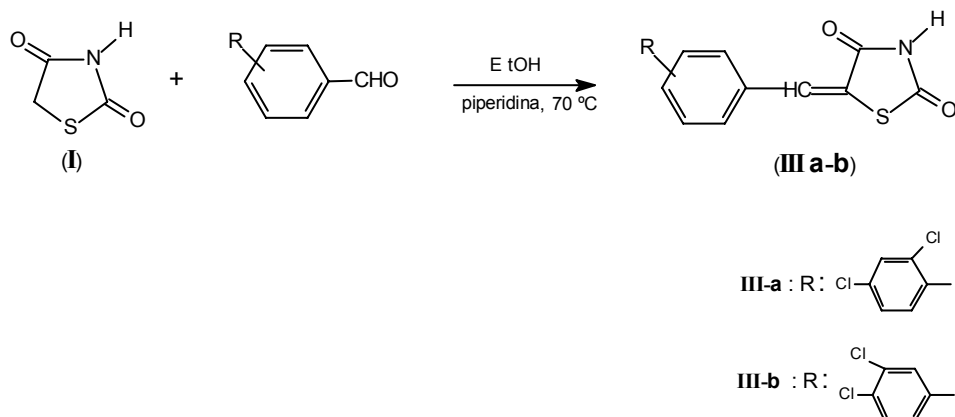
Em um balão de fundo chato foi adicionado 15g (0,1973 mol) de tiouréia e dissolvida em 100 mL de água destilada, em seguida foi colocado 18,6g (0,1973 mol) de ácido monocloraacético. O balão foi aquecido diretamente na chapa a 110 °C sob agitação magnética. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada fina até seu término, durante 25 horas. Após esse período o produto foi vertido para um béquer onde cristalizou. O produto (I) foi filtrado em funil sinterizado, seco, pesado e determinado seu ponto de fusão (**Tabela 6**).

4.2.1.2.1.2. Obtenção da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (II)



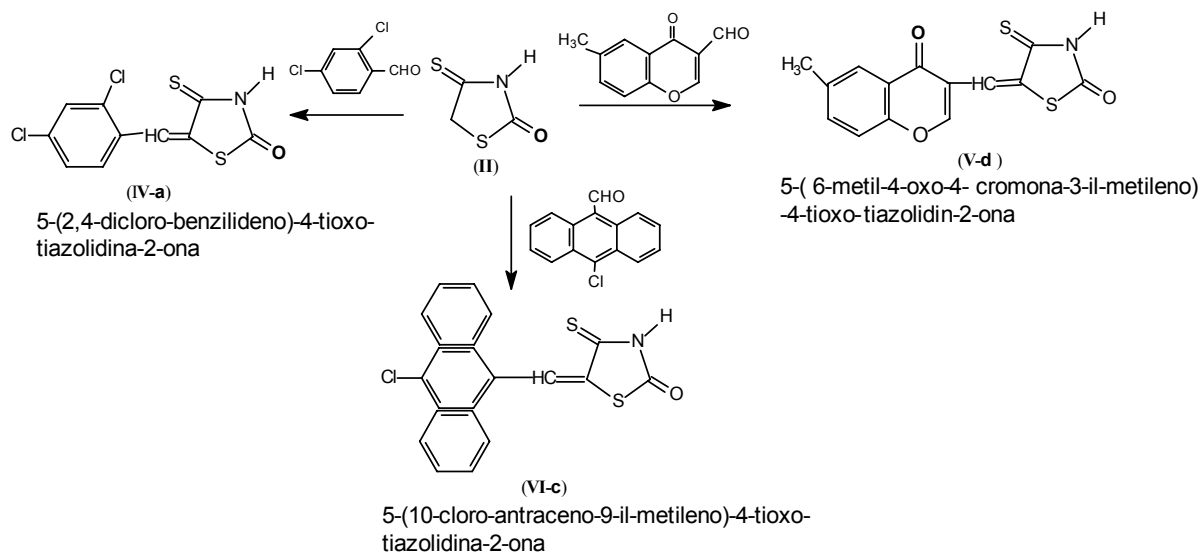
Em um balão de fundo redondo foi adicionado 2,5g (0,0213 mol) de tiazolidina-2,4-diona (I), 40 mL de dioxano e em seguida 5g (0,0213 mol) de P₂S₅ (pentassulfeto de fósforo). O balão foi aquecido em banho de óleo a 90°C sob agitação magnética por um período de 8 horas. O produto da reação foi transferido para um béquer e adicionado gelo triturado para precipitar o composto formado e dissolver o P₂S₅ restante. A fase dioxano foi separada, evaporada até a metade e recristalizada. O composto obtido foi filtrado, seco, pesado e submetido a ponto de fusão (**Tabela 6**).

4.2.1.2.1.3. Obtenção dos derivados (III-a) e (III-b) da tiazolidina-2,4-diona



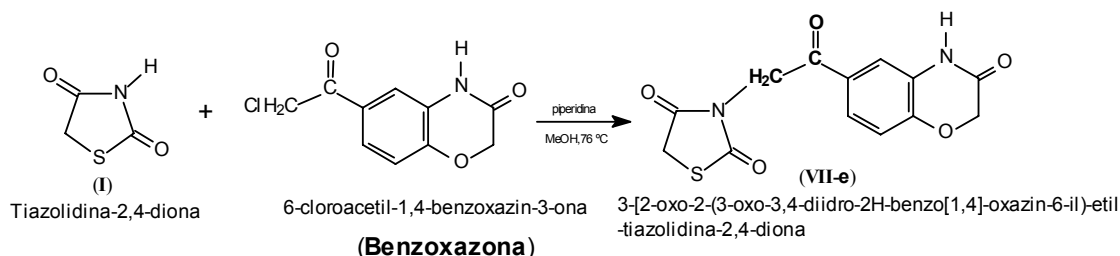
Em um balão do fundo redondo foi adicionada 0,200g (0,0017mol) da tiazolidina-2,4-diona (I) e dissolvida em 8 mL de etanol absoluto, colocadas duas gotas de piperidina como catalisador. A mistura foi deixada sob agitação durante uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado lentamente 0,0017mol de benzaldeídos substituídos e a reação foi aquecida a 70 °C sob agitação magnética. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada fina até seu término durante 11 e 13 horas. Os produtos foram recristalizados em etanol, filtrados, secos , pesados e verificado seus rendimentos e pontos de fusão (**Tabela 6**).

4.2.1.2.1.4. Obtenção dos derivados (IV-a, V-d, VI-c) da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona



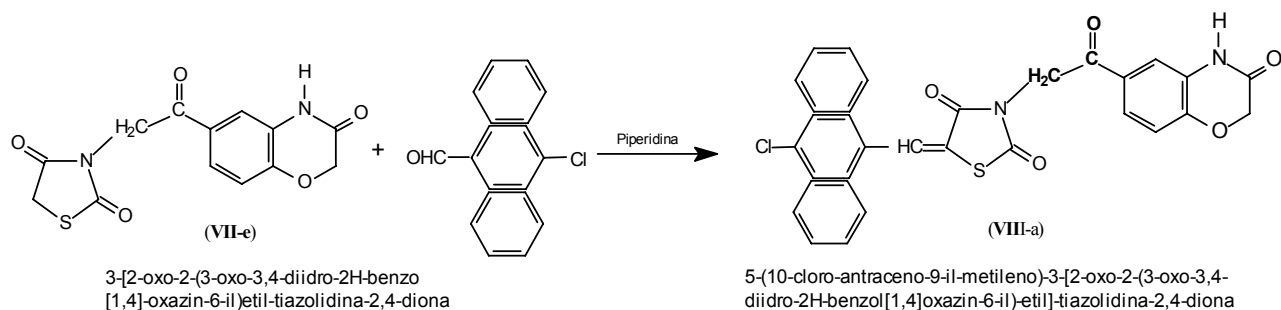
Em um balão de fundo redondo foi colocado 0,5g (0,00376 mol) de 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (II) sob agitação magnética, adicionado 10 mL de ácido acético glacial e 4,5 mL de diclorometano. Em seguida foi colocado lentamente 0,3085g (0,00376 mol) de acetato de sódio fundido. Uma hora após a formação do sal, foi colocado o reagente 0,6578g (0,00376 mol) lentamente. A mistura reacional foi aquecida em banho de óleo a 76°C durante 4, 14 e 19 horas, respectivamente. Os produtos foram resfriados, recristalizados, filtrados, secos, pesados e submetidos a ponto de fusão (**Tabela 6**).

4.2.1.2.1.5. Obtenção do composto (VII-e) derivado da benzoxazona



Em um balão de fundo redondo foram colocados 0,2502g (0,0021mol) de tiazolidina-2,4-diona (I) dissolvida em 7,5 mL de metanol, adicionado gota a gota 0,1196g (0,0021 mol) de uma solução de KOH em metanol e 0,4818g (0,0021mol) de 6-cloroacetil-1,4-benzoxazin-3-ona (benzoxazona) em acetato de etila. Após o término da reação em 25 horas, sob refluxo o produto (VII-e) foi cristalizado a frio, filtrado, lavado, pesado, seco e determinado o seu ponto de fusão (Tabela 6).

4.2.1.2.1.6. Obtenção do composto (VIII-a) derivado do 10-cloro-9-formil-antraceno



Em um balão de fundo redondo foi colocado sob agitação magnética 0,1242g (0,00039 mol) do composto (VII-e) adicionado 4 mL de etanol absoluto, 4mL de clorofórmio, e acrescentado 4 gotas de piperidina. Uma hora depois foi colocado gota a gota 0,0943g (0,00039 mol) do aldeído 10-cloro-9-formil-antraceno solubilizado em 3 mL de acetato de etila. A reação foi aquecida a 80°C sob agitação. Após o término, o produto (VIII-a) foi cristalizado, pesado e submetido a ponto de fusão (Tabela 6).

4.2.2. Metodologia do Estudo Biológico

4.2.2.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada qualitativamente, pelo método convencional de difusão em disco de papel (Bauer *et al*, 1966), e quantitativamente, pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

O estudo foi realizado frente a 10 microrganismos-teste, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bacilos álcool-ácido resistentes, leveduras e fungos filamentosos.

4.2.2.1.1. Microrganismos-teste

Foram utilizados representantes dos diversos grupos de microrganismos, pertencentes a Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos:

Bactérias Gram-positivas

Staphylococcus aureus (DAUFPE-1)

Bacillus subtilis (DAUFPE-16)

Micrococcus luteus (DAUFPE-6)

Enterococcus faecalis (DAUFPE-138)

Bactérias Gram-negativas

Escherichia coli (DAUFPE-224)

Pseudomonas aeruginosa (DAUFPE-39)

Serratia marcescens (DAUFPE-398)

Bactéria álcool-ácido-resistente

Mycobacterium smegmatis (DAUFPE-71)

Fungo filamentoso

Monilia sitophila (DAUFPE-2083)

Levedura *Candida albicans* (DAUFPE-1007)

4.2.2.1.2. Meios de cultura

Foram utilizados os meios Müeller-Hinton-ágar para realização dos testes com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (exceto *Enterococcus faecalis*), glicose extrato de levedura agar (GL) para a realização de experimentos com *Mycobacterium smegmatis* e *Enterococcus faecalis* e Sabouraud-ágar para *Candida albicans* e *Monilia sitophila*.

4.2.2.1.3. Padronização

Os inóculos bacterianos, foram obtidos a partir de pré-culturas com aproximadamente 18-24 horas de incubação à 35°C em caldo Müeller-Hinton. A levedura e o fungo filamentoso permaneceram durante 24-48 horas a 30 °C em Sabouraud-ágar (**Tabela 1**).

As suspensões dos inóculos foram padronizadas em solução fisiológica, a uma densidade óptica de 0,2 de absorbância a 600 nm, equivalente à turvação 0,5 da escala de McFarland (Koneman, 1997), que corresponde a aproximadamente 10^7 UFC para bactérias e 10^6 UFC para fungos e leveduras.

Tabela 1: Condições de crescimento dos microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana para os compostos obtidos por síntese.

Microrganismo	Meios de cultura	Temperatura (°C)	Tempo (h)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mueller-Hinton-ágar	35	24
<i>Micrococcus luteus</i>	Mueller-Hinton-ágar	35	24
<i>Bacillus subtilis</i>	Mueller-Hinton-ágar	35	24
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	Mueller-Hinton-ágar	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-ágar	35	24
<i>Serratia marcescens</i>	Müeller-Hinton-ágar	27	24
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud-ágar	30	48
<i>Monilia sitophila</i>	Sabouraud-ágar	30	48

4.2.2.1.4. Teste de antagonismo

A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada pelo método de difusão em disco, no meio Muller-Hinton-ágar (Bauer *et al*, 1966).

Suspensões microbianas padronizadas pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 10^{-7} UFC para bactérias e 10^{-6} UFC para leveduras), foram semeadas em meio Müller-Hinton-ágar.

Discos de papel (Whatman nº 2) de 6 mm de diâmetro, impregnados com 20 µL de uma solução a 15000 µg/ mL foram colocados sobre a superfície do meio semeado.

As placas foram incubadas por 24-48 horas, a 35 °C (bactérias) ou 30 °C (fungos filamentosos e leveduras). Após o período de incubação, procedeu-se a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, formado ao redor dos discos. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos pela média aritmética dos diâmetros, nas três repetições. Os compostos que formaram os maiores halos de inibição foram selecionados para determinação da CMI (concentração mínima inibitória).

4.2.2.1.5. Concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração inibitória mínima (CMI) corresponde a menor concentração do produto, onde não ocorreu crescimento visível a olho nu. Esta concentração é expressa em $\mu\text{g} / \text{mL}$. As diluições foram realizadas com cristais de cada produto sintetizado, e diluídos em água destilada ou solvente apropriado a partir de soluções-mãe das substâncias de concentração igual a $1000 \mu\text{g/mL}$. Com essa solução foram preparadas diluições sucessivas em caldo Mueller Hinton a fim de obter uma série de $100 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$, $25 \mu\text{g/mL}$, $12,5 \mu\text{g/mL}$, $6,25 \mu\text{g/mL}$, $3,25 \mu\text{g/mL}$ e $1,75 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 3). (Lorian, 1986).

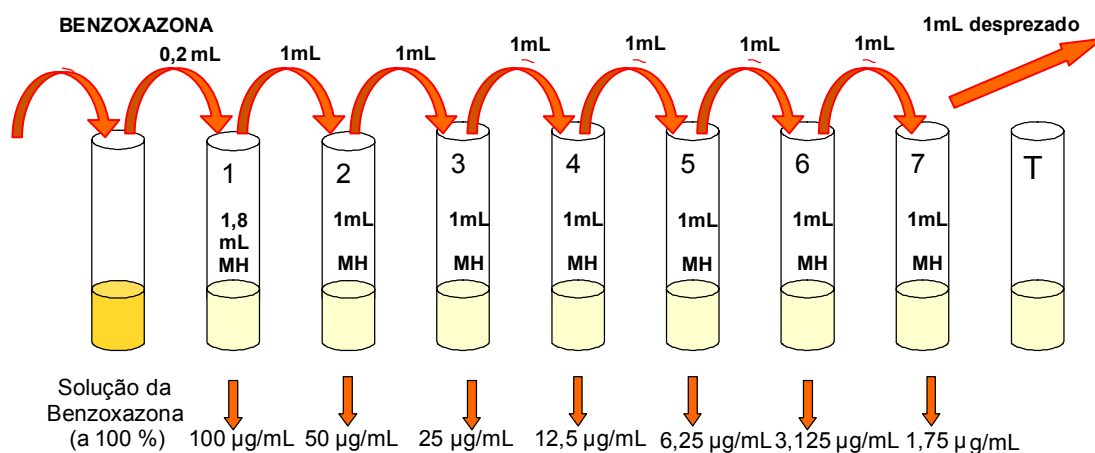


Figura 3: Série de concentrações da substância-teste, em caldo Mueller-Hinton, para determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Os tubos contendo as diferentes concentrações da substância, foram inoculados com $100 \mu\text{L}$ da suspensão do microrganismo-teste e incubados à temperatura apropriada, durante 24 horas. Um controle positivo, contendo o meio de cultura (sem a substância) inoculado com igual volume da suspensão microbiana, e um controle negativo, contendo apenas o meio de cultura, foram também incubados para comparação dos resultados.

Após 24 horas de incubação, procedeu-se à leitura dos resultados; a CMI é expressa pela concentração da substância no primeiro tubo onde não ocorreu crescimento visível (turbacão do meio). Dos tubos onde não ocorreu crescimento foram semeados 10 µL em Müller-Hinton-ágar, para verificação da concentração mínima bactericida (CMB) que é determinada pela concentração do tubo que não apresentou crescimento de colônias na placa.

4.2.2.2. Atividade citotóxica

As células NCI-H292 (obtidas de carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e HEP-2 (derivadas de carcinoma epidermoide de laringe) foram mantidas em DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/ml + estreptomicina 250 mg/ml) e 1% de L-glutamina 200 mM. (Nascimento *et al*, 1993).

Para determinar a viabilidade celular, foi utilizado o corante vital Azul Tripán (Merck) 0,4% em PBS, o qual penetra facilmente nas células danificadas corando-as em azul, enquanto que as células íntegras permanecem incolores, permitindo assim, determinar a porcentagem de células vivas e células mortas (Weisenthal *et al*, 1983).

A contagem das células foi realizada em microscópio invertido Leitz, com a utilização de um hemocitômetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizadas.

Para determinação da citotoxicidade, a suspensão celular de 10^5 células/ml, foi preparada em meio adaptado para cada linhagem celular. A suspensão foi distribuída em placas de cultura com 96 poços (225 µl em cada poço). As placas foram incubadas a 37°C em estufa (Sedas, Milão-Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. Após 24h as substâncias testes foram adicionadas (25 µl/poço) e as placas foram reincubadas a 37°C (Costa & Nascimento, 2003).

O método do MTT (Mosmann, 1983), baseia-se na capacidade que as células vivas possuem de reduzir o sal tetrazólio de cor amarela, a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita graças à ação da enzima mitocondrial succinil desidrogenase, ativa apenas em células vivas.

Após 72 h de contato das células com os compostos **III-a**, **III-b**, **V-d**, **VII-e** e **VIII-a**, foi adicionado a cada poço, 25 µl de MTT brometo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a uma concentração de 5 mg/ml em PBS. As placas foram deixadas por duas horas em estufa (37°C). Ao final desse período o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT foram aspirados e em seguida, 100 µl de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolução dos cristais Formazan (Alley *et al*, 1988).

Para verificar a porcentagem de inibição, a leitura óptica foi feita em leitor automático de placas do tipo Multiskan a 540 nm. A densidade óptica (DO) média dos poços testes foi comparada com a (DO) média dos poços controle

4.2.2.3. Marcação de Hemácias e Proteínas Plasmáticas com Tc^{99m}

Amostras de 0,5 mL de sangue de ratos Wistar (n=3) foram coletadas em seringa, previamente heparinizada. O primeiro tubo foi o controle com solução salina a 0,9%. Logo após, foi adicionado 0,5 mL de SnCl₂ (1,2 µg/mL) do composto benzoxazona à temperatura ambiente, nas concentrações 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%.

Após uma hora de incubação foi adicionado 0,1 mL de Tc^{99m} na forma de pertecnetato de sódio (^{99m}TcO₄Na) mantendo as mesmas condições por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos, e em seguida as células do sangue e do plasma foram separados, e calculada a radioatividade em cpm (contagem por minuto). Para obter a fração solúvel das células (FSC) e do plasma (FSP) e a fração insolúvel das células (FIC) e do plasma (FIP) foi utilizado o ácido tricloro-acético (TCA a 5%) seguido da centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm. A fim de obter-se o percentual de radioatividade foi procedida a contagem em contador gama (DPC Gamgyt Cr). Um esquema que resume a metodologia utilizada está apresentado na **figura 4**.

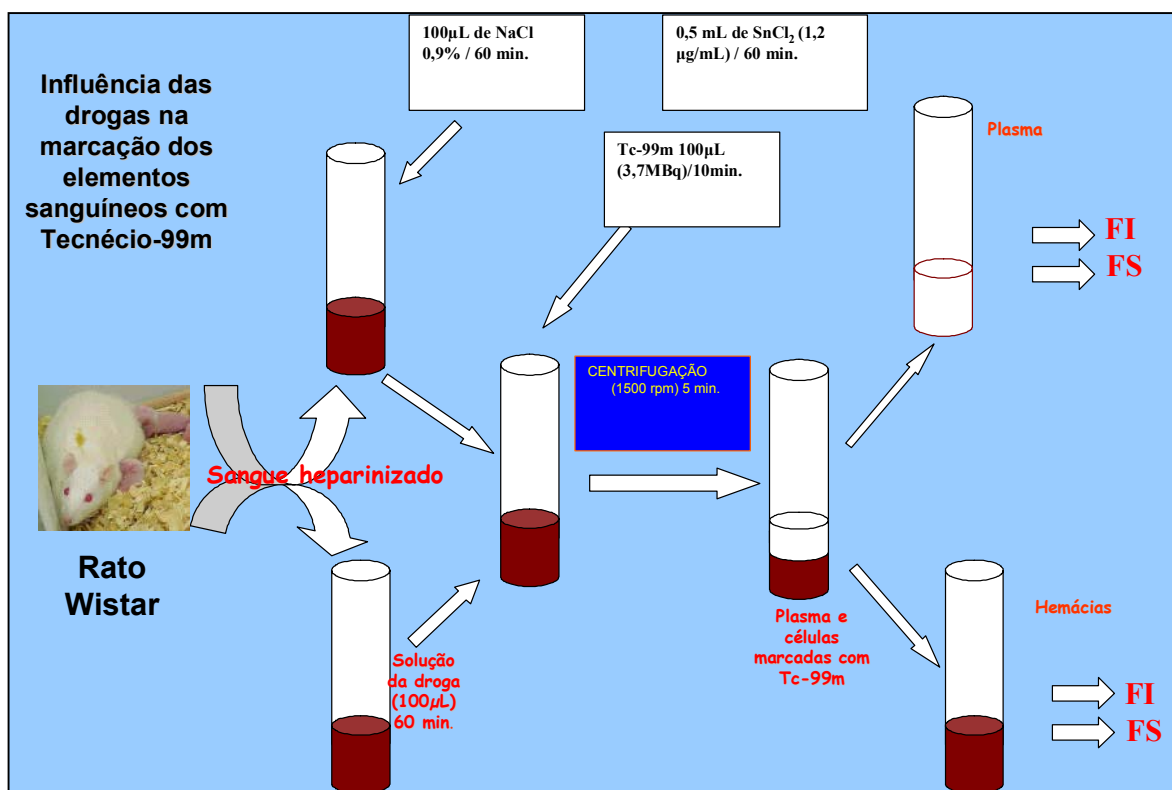


Figura 4: Seqüência da metodologia da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com tecnécio-99m

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo Químico

Os resultados espectroscópicos dos compostos sintetizados estão demonstrados nas **Figuras 5 a 15** a seguir acompanhadas das respectivas estruturas químicas. A leitura numérica dos espectros estão relatadas nas **tabelas 2 a 5** e os dados físico-químicos estão descritos na **tabela 6**.

5.1.1. Resultados Espectroscópicos de RMN¹H e Infravermelho do derivado 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-a)

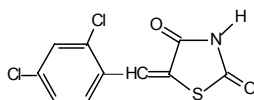


Tabela 2.: Dados de RMN¹H e Infravermelho do derivado 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-a)

Espectro	Absorções
RE (DMSO) (δ ppm)	7,59 (m, 3H, Ar) J = 8,69Hz ; 7,84 (d, 1H) J =2,09 Hz; 12,74 (sl, NH)
IV (ν cm ⁻¹), KBr (1%):	Deformação axial de NH, em ligação de hidrogênio, dublete de imida, 3250-3000; deformação axial de CH aromático, 3033-3183 ; deformação axial simétrica e assimétrica de C=O acoplado 1751-1680; deformação axial de C=C aromático, 1740-1700; deformação axial de C-O, 1300-1250; deformação angular de C-H aromático, 730-680.

Obs: Os sinais que aparecem entre 5 e 4 ppm e 2 e 1 ppm, no espectro de RMN¹H, são impurezas.

João Filho
 Amostra: Ju-296
 Solicitação N. B0704_4 UFPE
 09.07.03
 Pulse sequence: s2pul
 Solvente: DMSO
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 UNITY plus-300 "UFPEu300"
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 3.744 sec
 Width 5999.7 Hz
 48 repetitions
 OBSERVE H1, 299.9547906 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 3 min, 0 sec

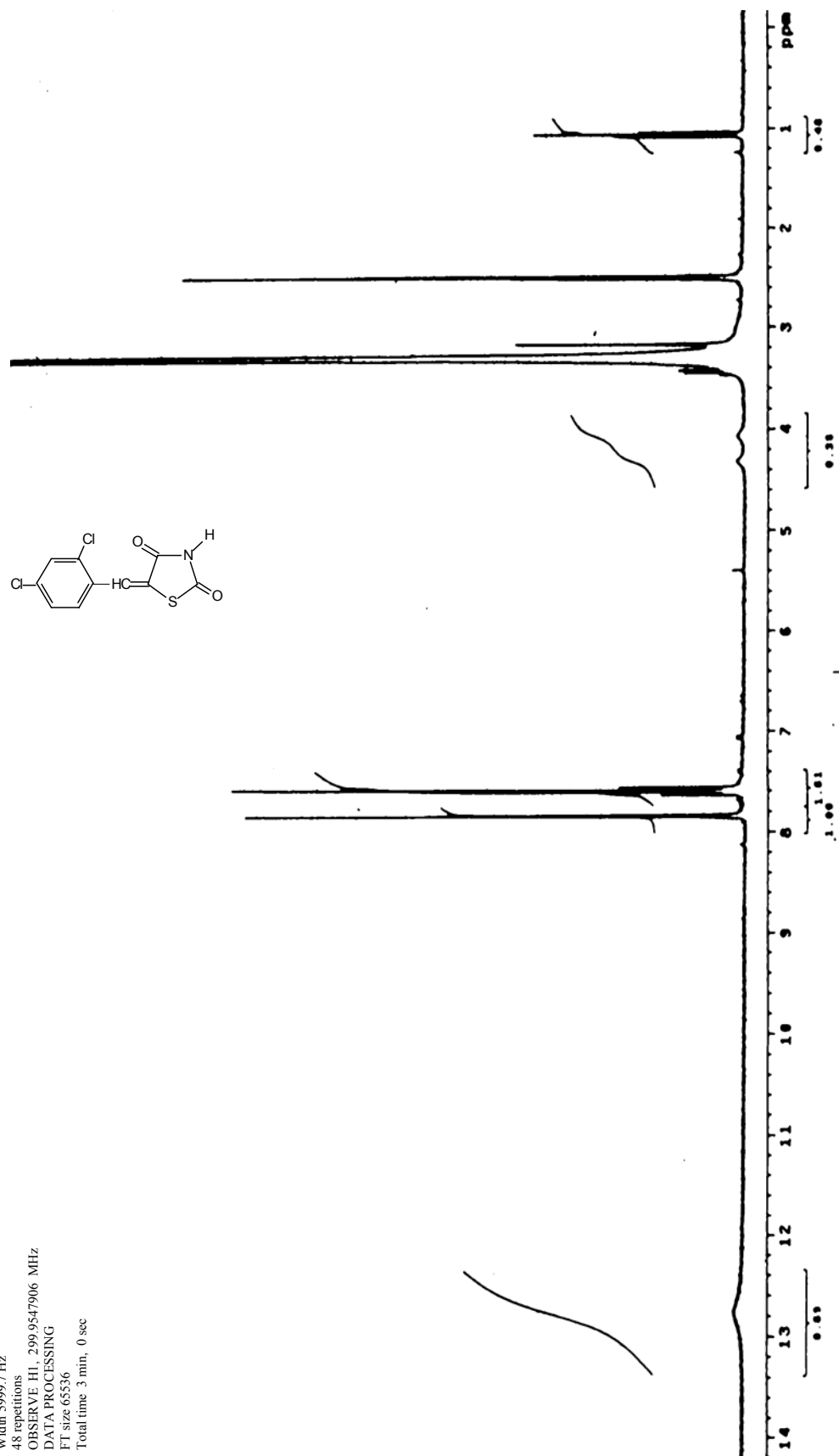
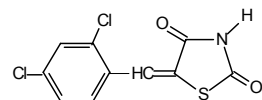


Figura 5 : Espectro de RMN¹H do composto III-a : 5-(2,4-diclorobenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona

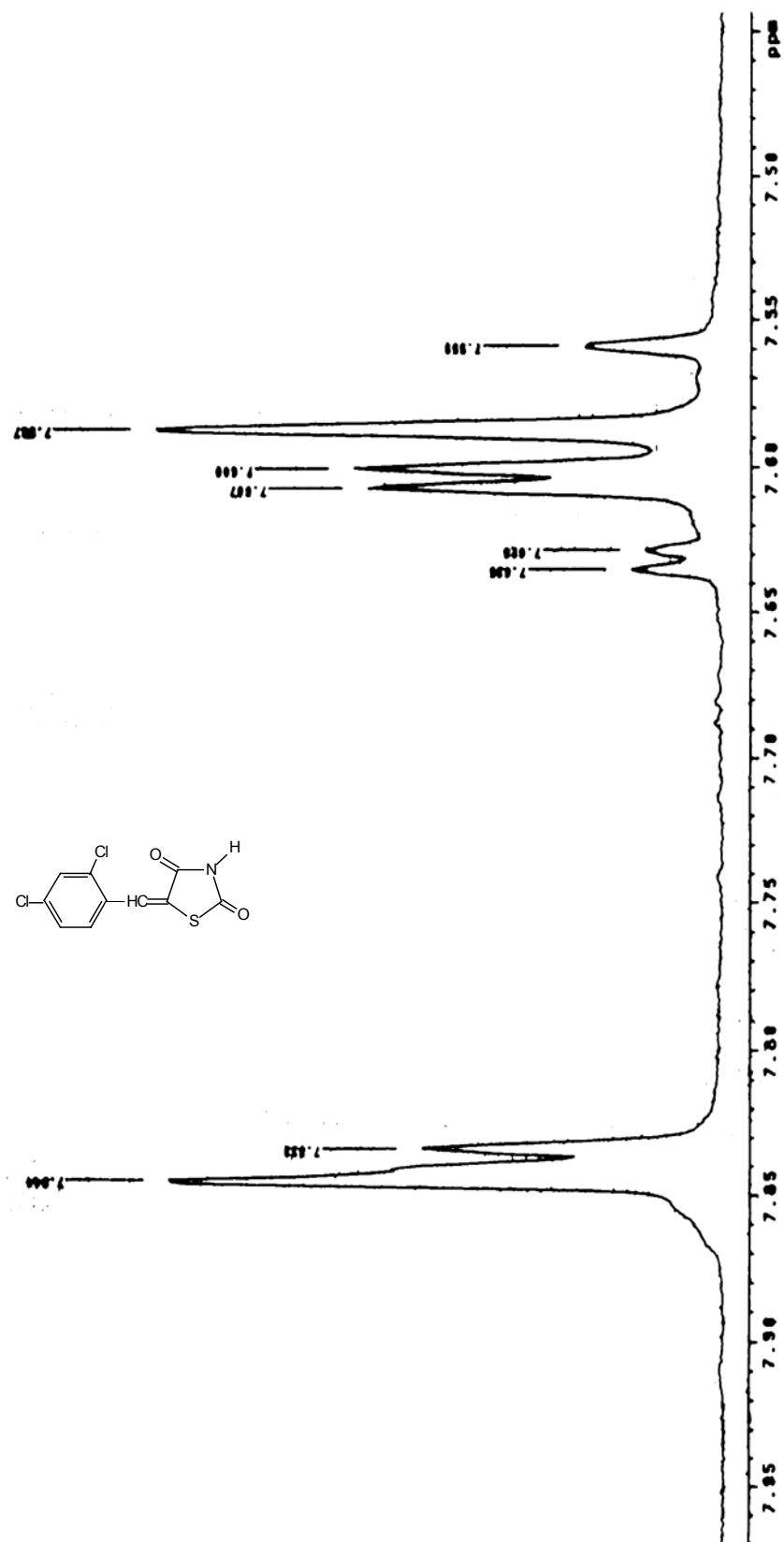


Figura 5.a. : Espectro de RMN¹H do composto III-a: 5-(2,4-diclorobenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona

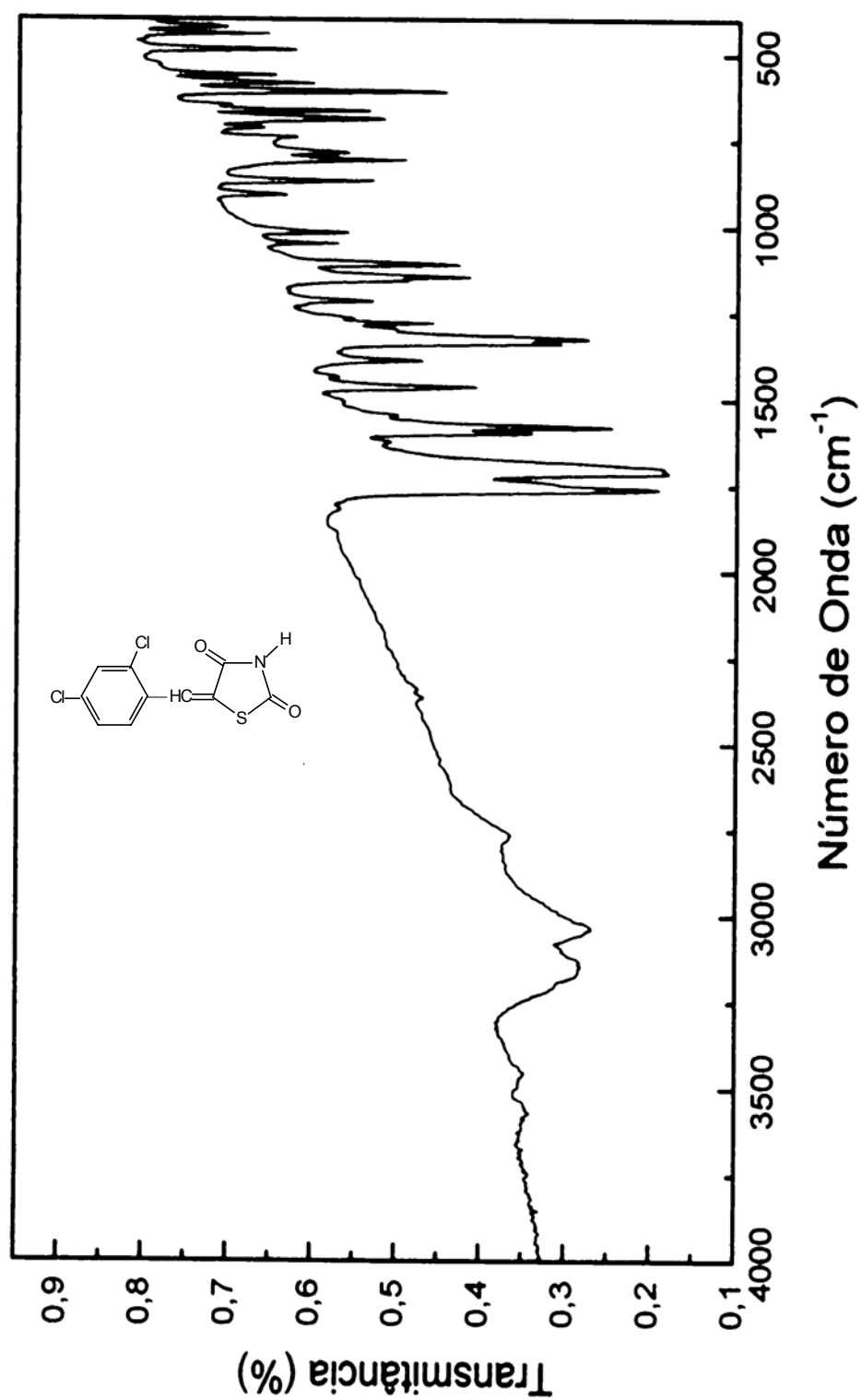


Figura 6. : Espectro de Infravermelho do composto III-a: 5-(2,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona

5.1.2. Resultados Espectroscópicos de RMN¹H e Infravermelho do derivado 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (III-b)

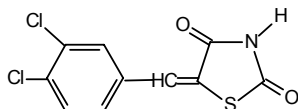


Tabela 3.: Dados de RMN¹H e Infravermelho do composto III-b

Espectro	Absorções
RMN¹H (DMSO) (δ ppm)	7,54 (dd,2H, ArH) J= 2,39Hz; 7,77 (m,1H, H C=) J= 4,2Hz; 7,88 (d,1H,ArH) J=2,1Hz; 12,74 (sl,1H, NH)
IV (v cm ⁻¹), KBr(1%):	Deformação axial de NH, em ligação de hidrogênio, dublete de imida, 3240-3060; deformação axial de CH aromático, 3062-3000; deformação axial simétrica e assimétrica de C=O acoplado 1750-1687; deformação axial de C=C aromático, 1687-1625; deformação axial de C-O, 1300-1250; deformação angular de C-H aromático fora do plano, 750-688

Obs: Os sinais que aparecem entre 5 e 4 ppm e 2 e 1 ppm, no espectro de RMN¹H, são impurezas.

João Filho
 AmostraJu-298
 Solicitação N. B0704_3 UFPE
 09.07.04
 Pulse sequence: s2pul
 Solvente: DMSO
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 UNITYplus-300 "UFPEu300"
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 3.744 sec
 Width 5999.7 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE H1, 299.9547906 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 4 min, 0 sec

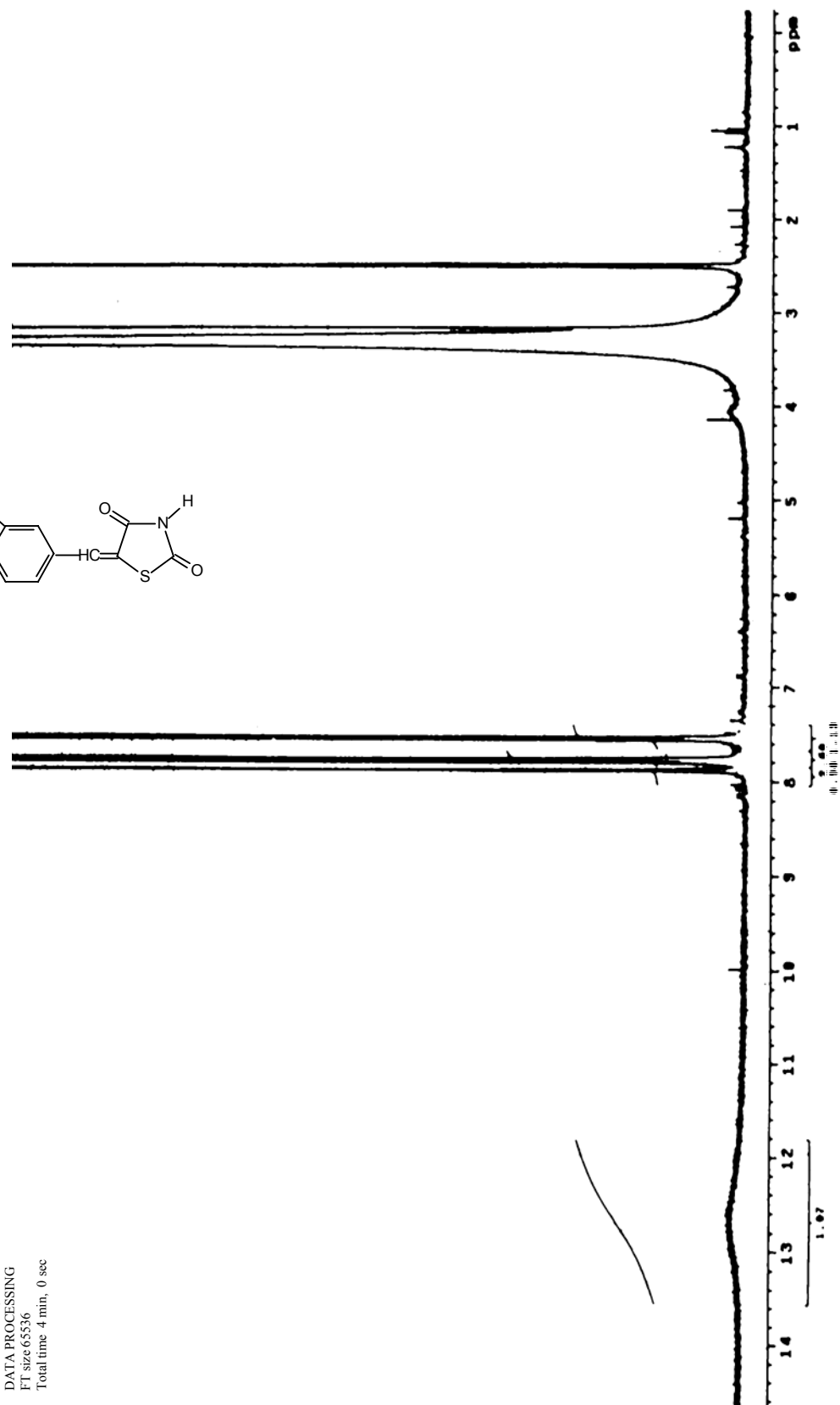
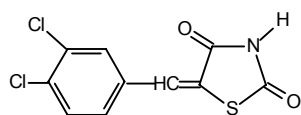


Figura 7 : Espectro de RMN¹H do composto III-b: 5-(3,4-diclorobenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona

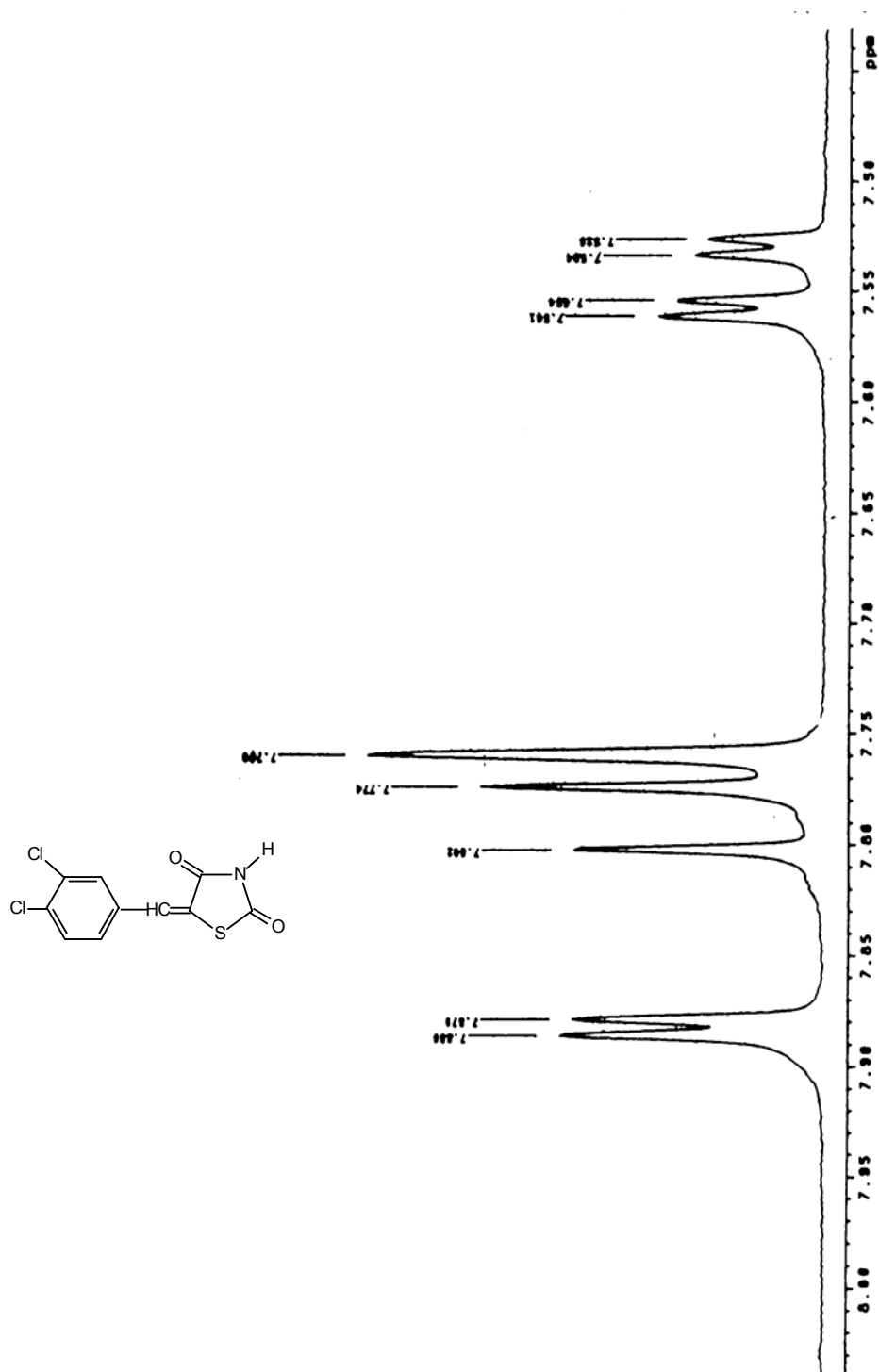


Figura 7.a. : Espectro de RMN^1H do composto III-b: 5-(3,4-diclorobenzilideno)-thiazolidina-2,4-diona

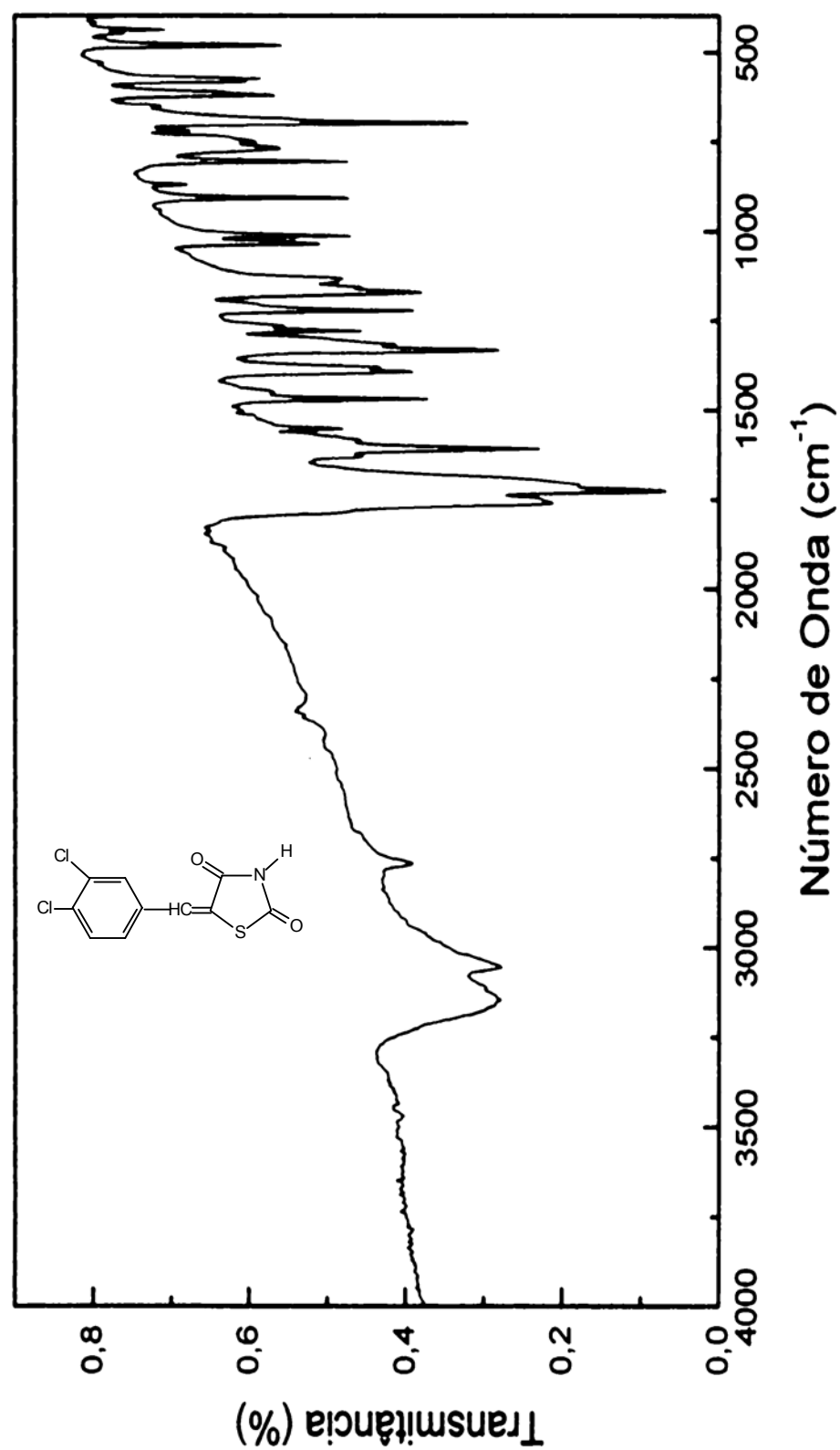


Figura 8 : Espectro de Infravermelho do composto III-b: 5-(3,4-diclorobenzilideno)-tiazolidina-2,4-diona

5.1.3. Resultados Espectroscópicos de RMN¹H, Infravermelho (IV), RMN¹³C e MASSAS do derivado 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H- benzo[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona (VII-e)

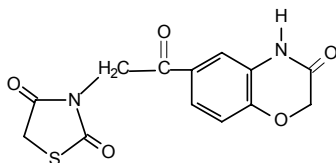


Tabela 4. : Dados de RMN¹H, RMN¹³C, Infravermelho e Massas do composto VII-e

	Absorções
RMN¹H (DMSO)(δ ppm)	4,38 (1s, 2H: CH ₂); 4,71 (1s, 2H: CH ₂); 5,02 (1s, 2H:CH ₂) 7,09 (d,1H:Ar) J= 8,1Hz; 7,48 (d,1H: Ar) J=2,1Hz; 7,75(dd, 1H:Ar) J= 10,5Hz;10,92 (sl, 1H: NH)
RMN¹³C (δ ppm):	34,09 (CH ₂); 40,0 (CH ₂); 47,0 (CH ₂); 66,78 (C-O);115,06-148,17 (C=); 164,05 (N-C=O); 171,66(N-C=O); 171,97 (C=ON); 189,55 (C=O)
MASSAS m/e	Intensidade 41; 44; 55; 65; 81; 92; 120; 122; 135; 148; 165; 183; 211; 277
IV (v cm ⁻¹ , KBr(1%):	Deformação axial de NH de imida, em ligação de hidrogênio, 3000-2900; deformação axial de CH aromático, 2900-2850; deformação axial simétrica e assimétrica de C=O acoplado 1730 -1690; deformação axial de C=C aromático, 1390-1500; deformação axial de C-O, 1250-1200; deformação angular de C-H aromático, 1000-750.

João Filho
 Amostrado: 306-i (D)
 Solicitação N: B1017_23
 22.10.03 UFPE
 Pulse sequence: s2pul
 Solvente: DMSO
 Ambient temp: 30.0 C / 303.1 K
 UNITYplus-300 "UPPEu300"
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 3.744 sec
 Width 4000.0 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE H1: 299.9547894 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 1 min, 0 sec

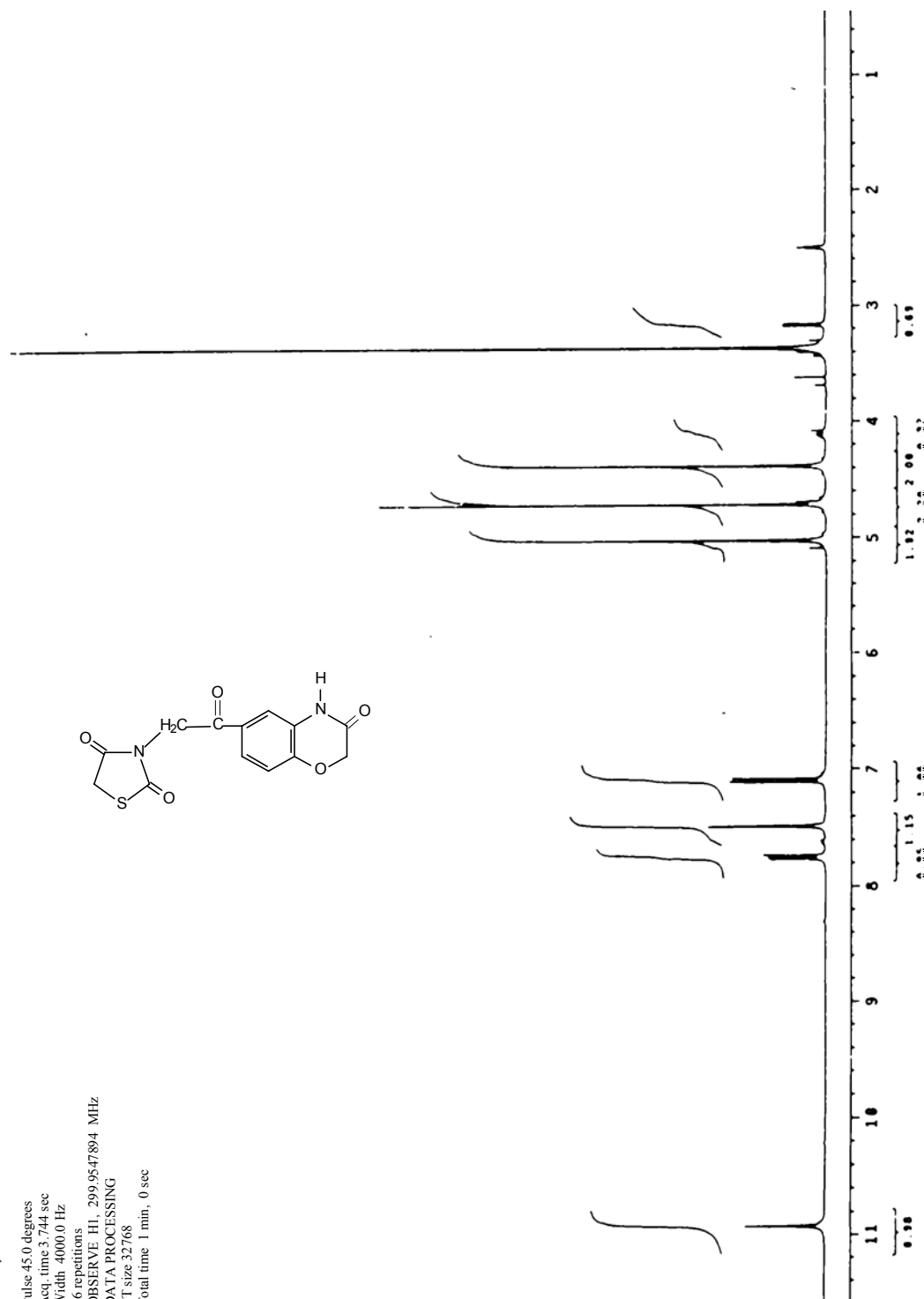


Figura 9 : Espectro de RMN¹H do composto VII-e: 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona

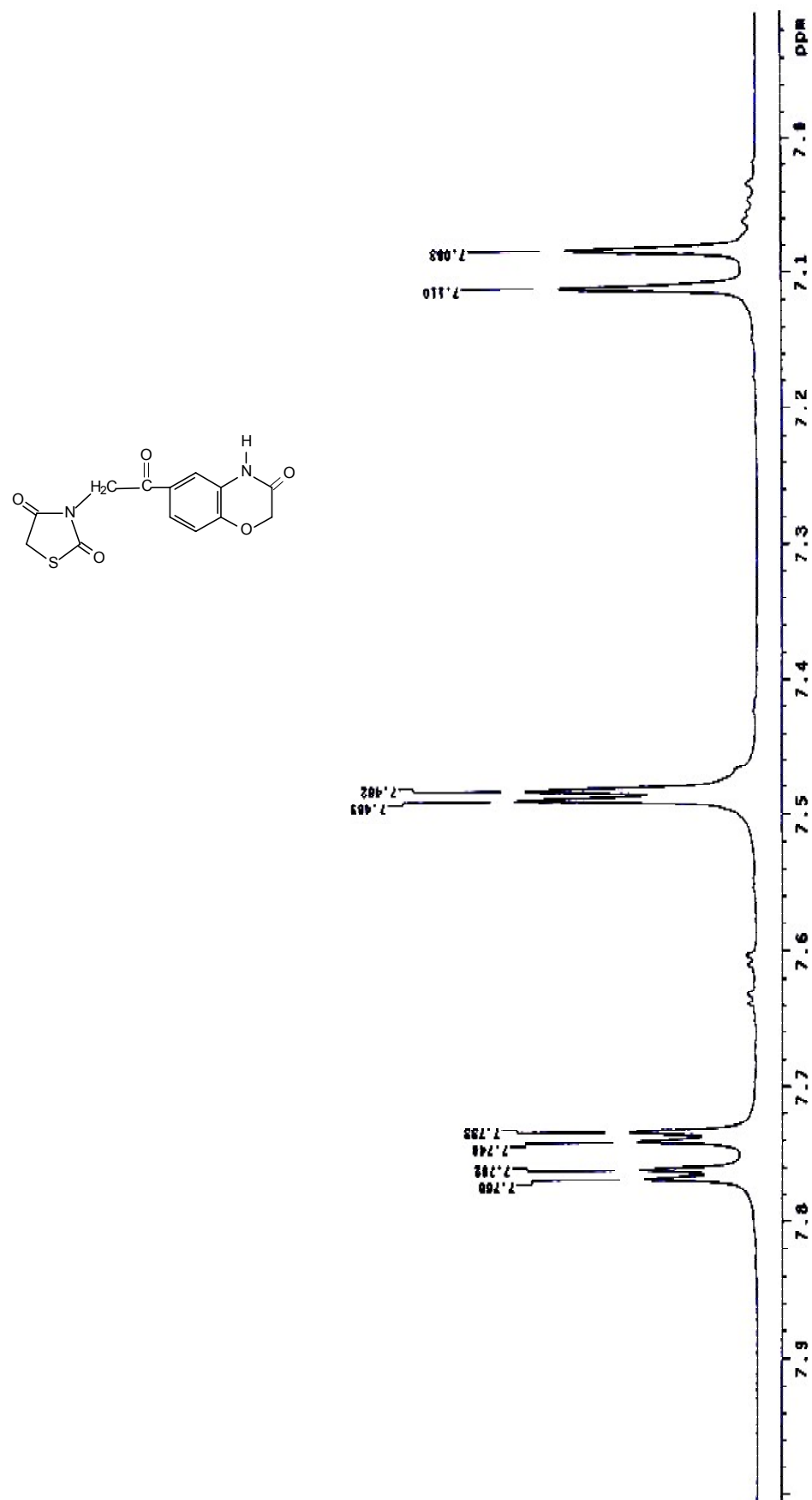


Figura 9.a.: Espectro de RMN^1H do composto VII-e: 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[1,4]-oxazin-6-il)etil-tiazolidina-2,4-diona

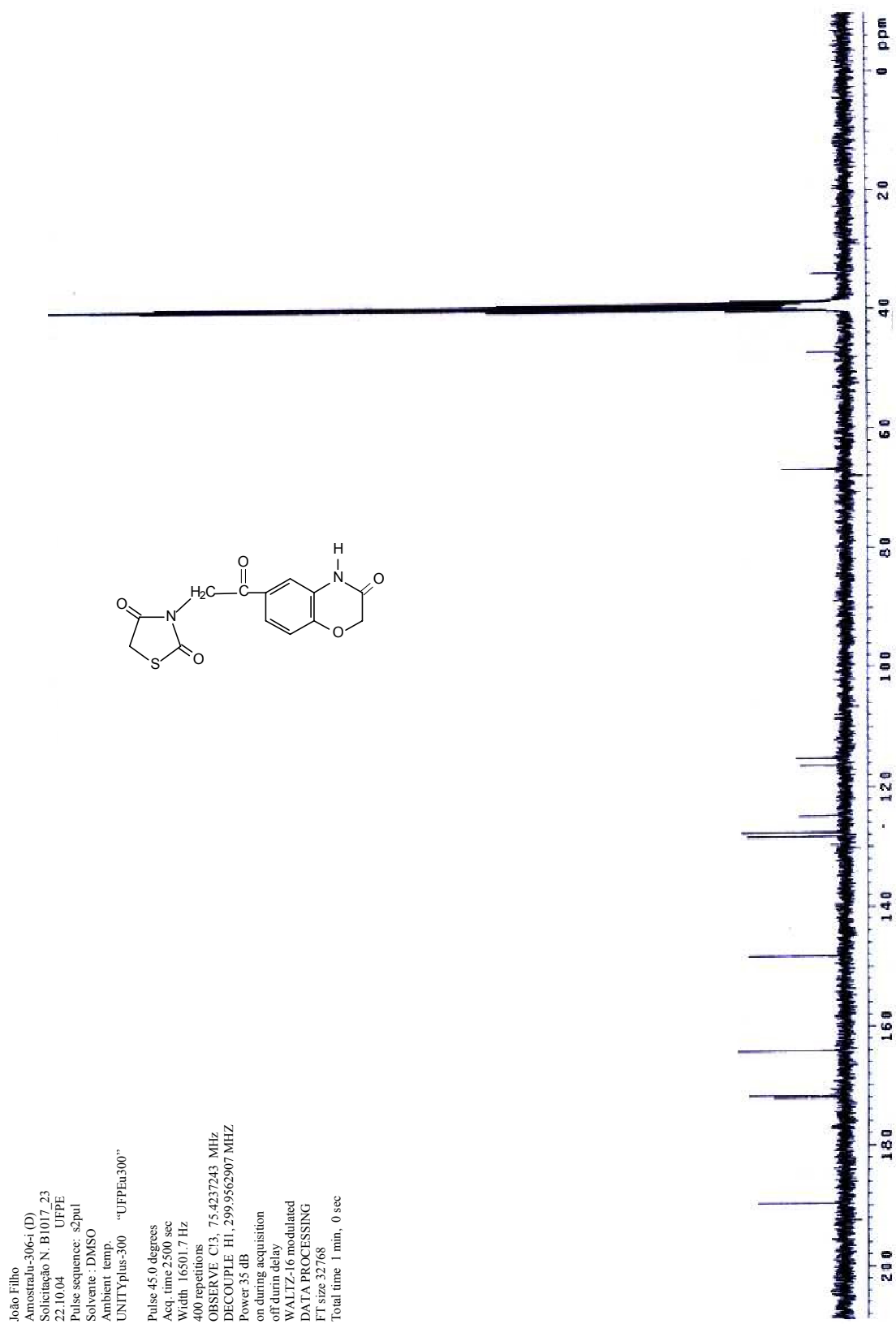


Figura 10: Espectro de RMN¹³C do composto VII-e: 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona

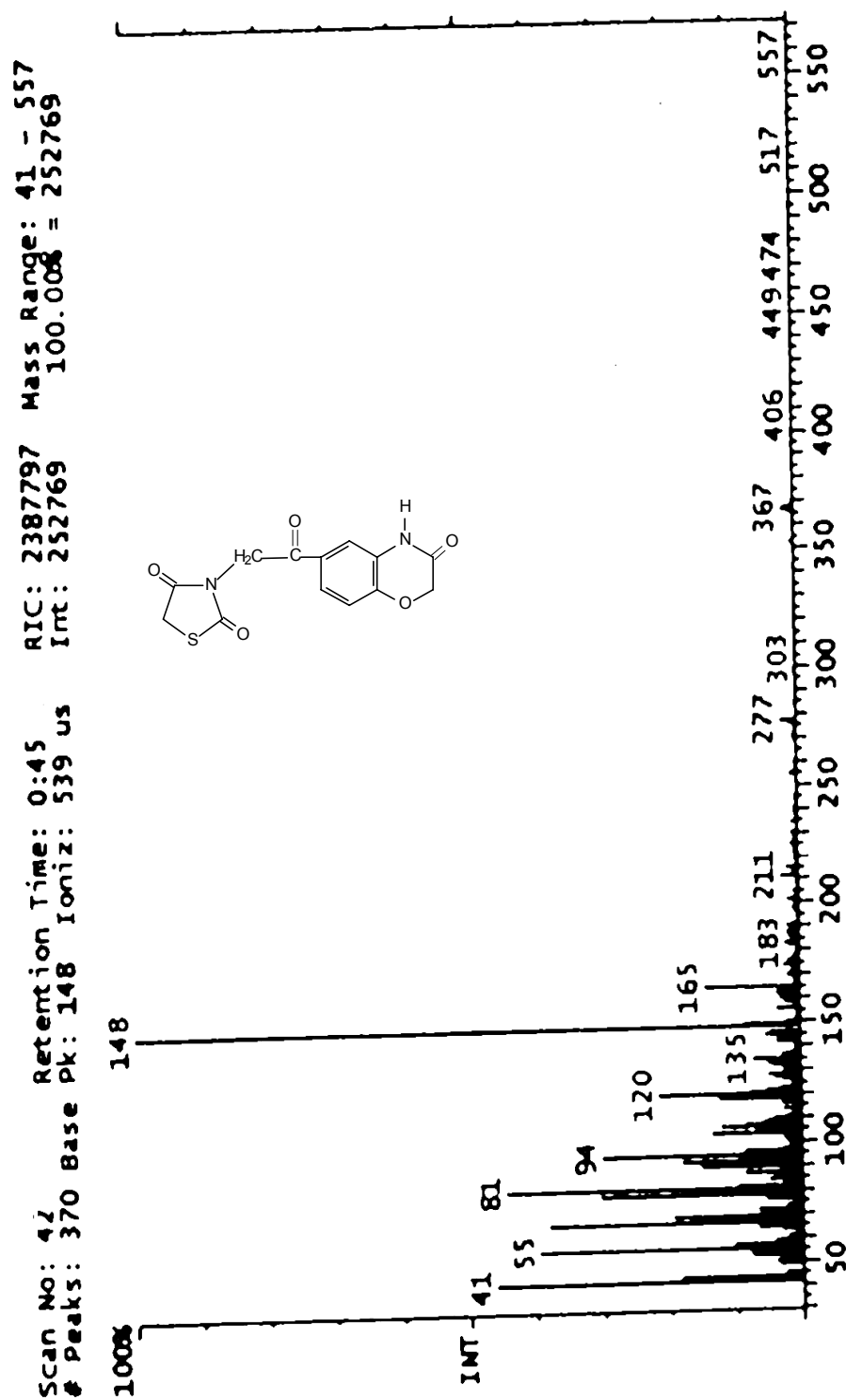


Figura 11 : Espectro de Massa do composto VII-e: 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona

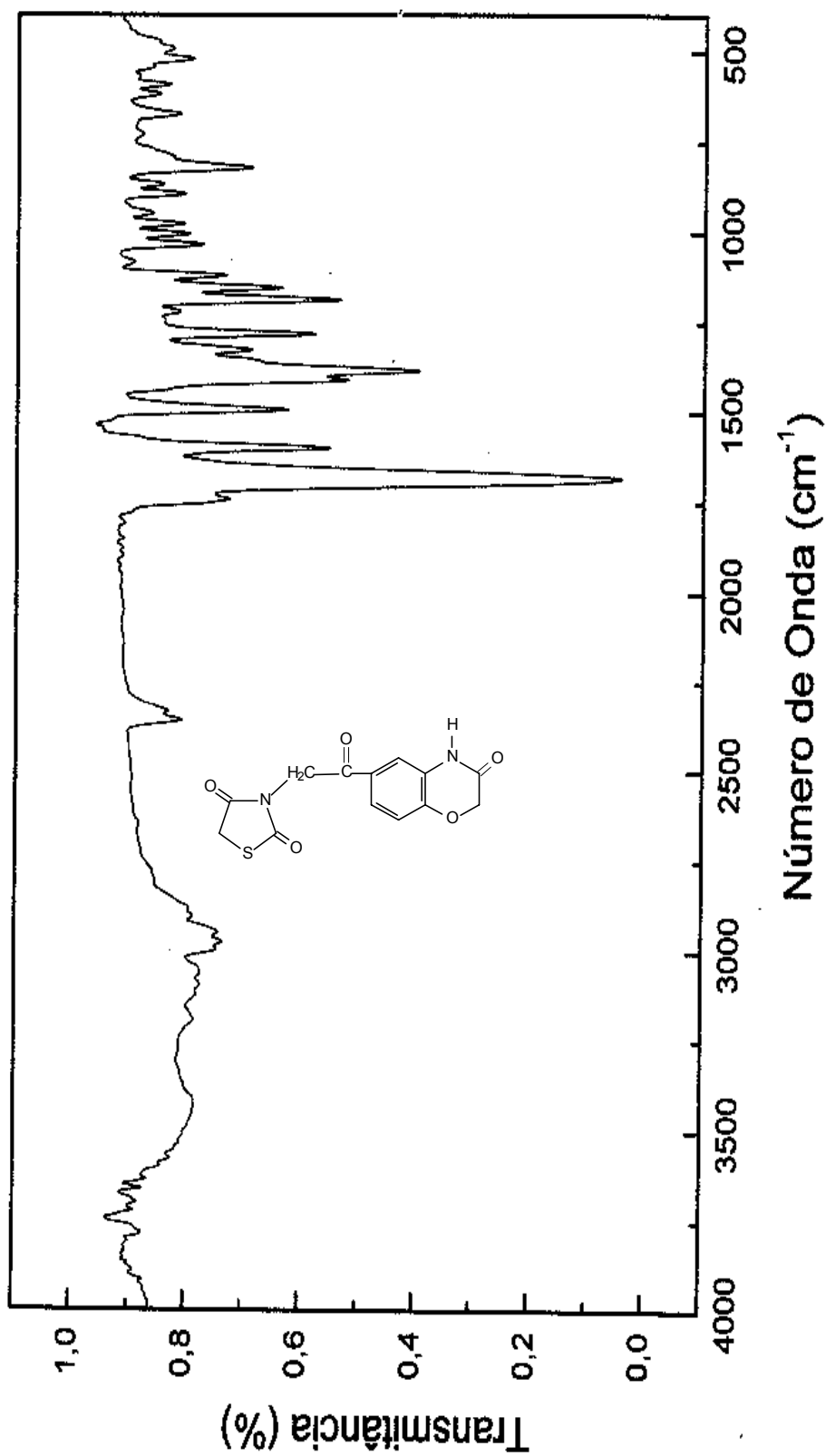


Figura 12 : Espectro de Infravermelho do composto VII-e: 3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzol[1,4]-oxazin-6-il) etil-tiazolidina-2,4-diona

5.1.4. Resultados Espectroscópicos de RMN¹³C, Massas e Infravermelho (IV) do derivado 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzol [1,4]oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona (VIII-a).

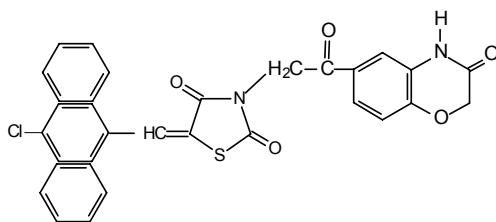


Tabela 5: Dados de RMN¹³C, Infravermelho e Massas do composto VIII-a

Espectro	Absorções
RMN¹³C (δ ppm):	40 (CH ₂); 47,27 (CH ₂); 66,75 (C-O); 115,41-147,80 (C= e C de arila); 164,12 (N-C=O); 189,93 (C=O)
MASSAS (Fragmentações%)	Intensidade 41; 54; 66; 110; 128; 148; 162; 176; 204; 227; 257; 276; 314; 369; 388
IV (v cm ⁻¹ , KBr (1%))	Deformação axial de NH de imida, em ligação de hidrogênio, 2983-2700; deformação axial de CH aromático, 2900-2850; deformação axial simétrica e assimétrica de C=O acoplado 1730-1684; deformação axial de C=C aromático, 1401-1500; deformação axial de C-O, 1250-1200 ; deformação angular de C-H aromático, 1000-750.

João Filho
 Amostra Ju-312
 Solicitação N.º B1017_21
 22.10.05 UFPE
 Pulse sequence: s2pul
 Solvente : DMSO
 Ambient temp.
 UNITYplus-300 "UPPEu300"
 Relax. delay 1500 sec.
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2500 sec
 Width 16501.7 Hz
 720 repetitions
 OBSERVE C13, 75.4237245 MHz
 DECOUPLE H1, 299.9562907 MHz
 Power 35 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 1h, 8 min, 27 sec

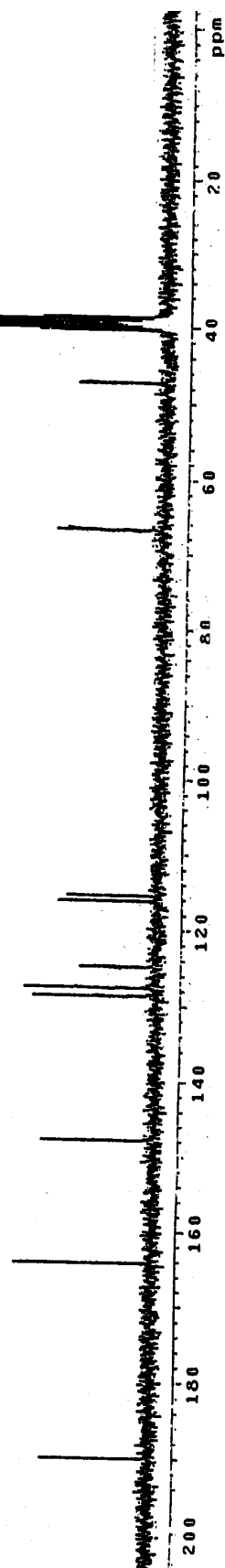
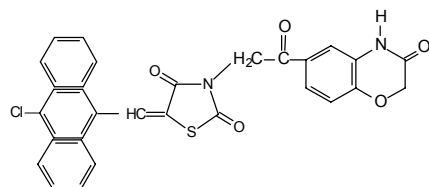


Figura 13. : Espectro de RMN¹³C do composto VIII-a : 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzol[1,4]oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona

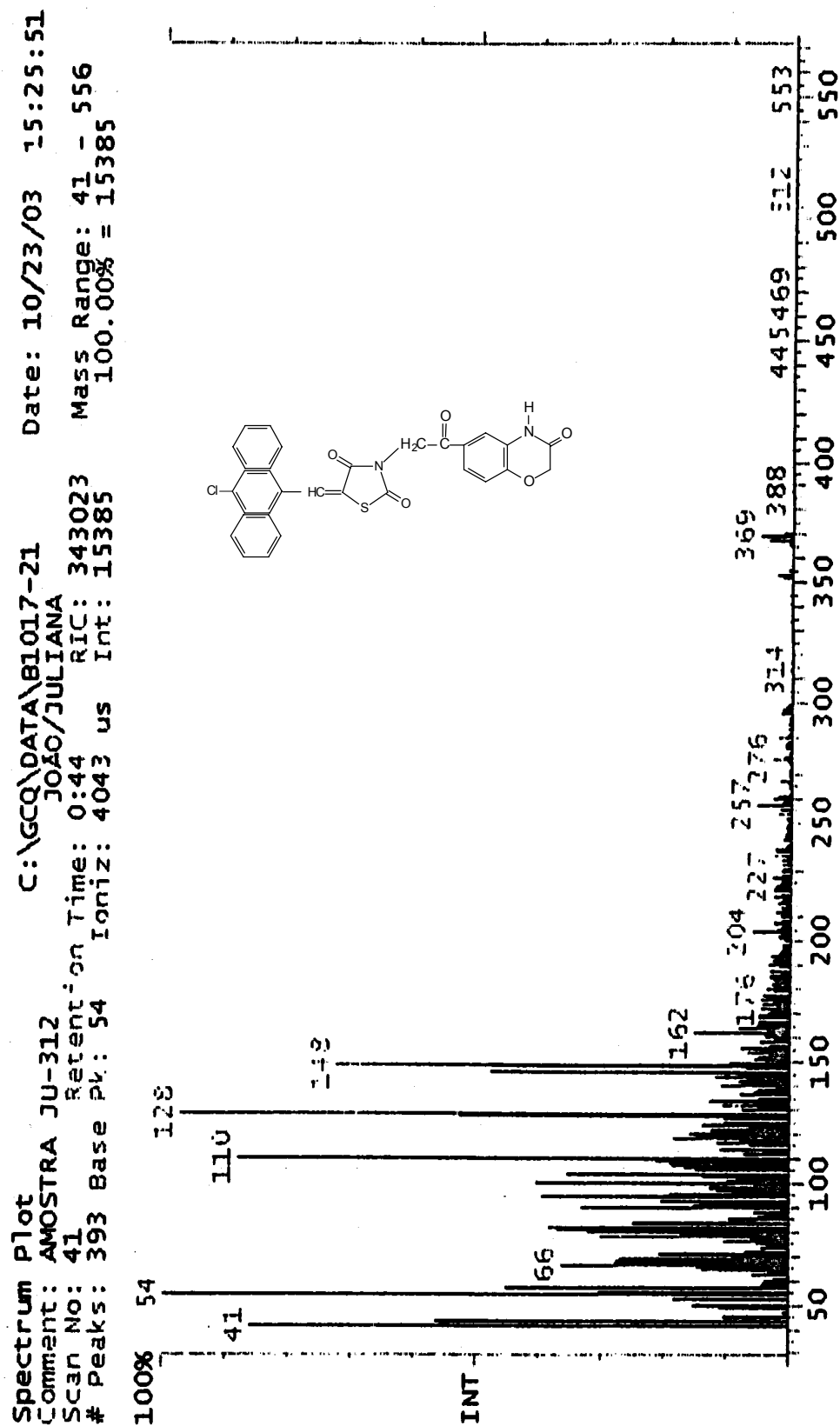


Figura 14 : Espectro de Massa do composto VIII-a : 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzol [1,4]oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona

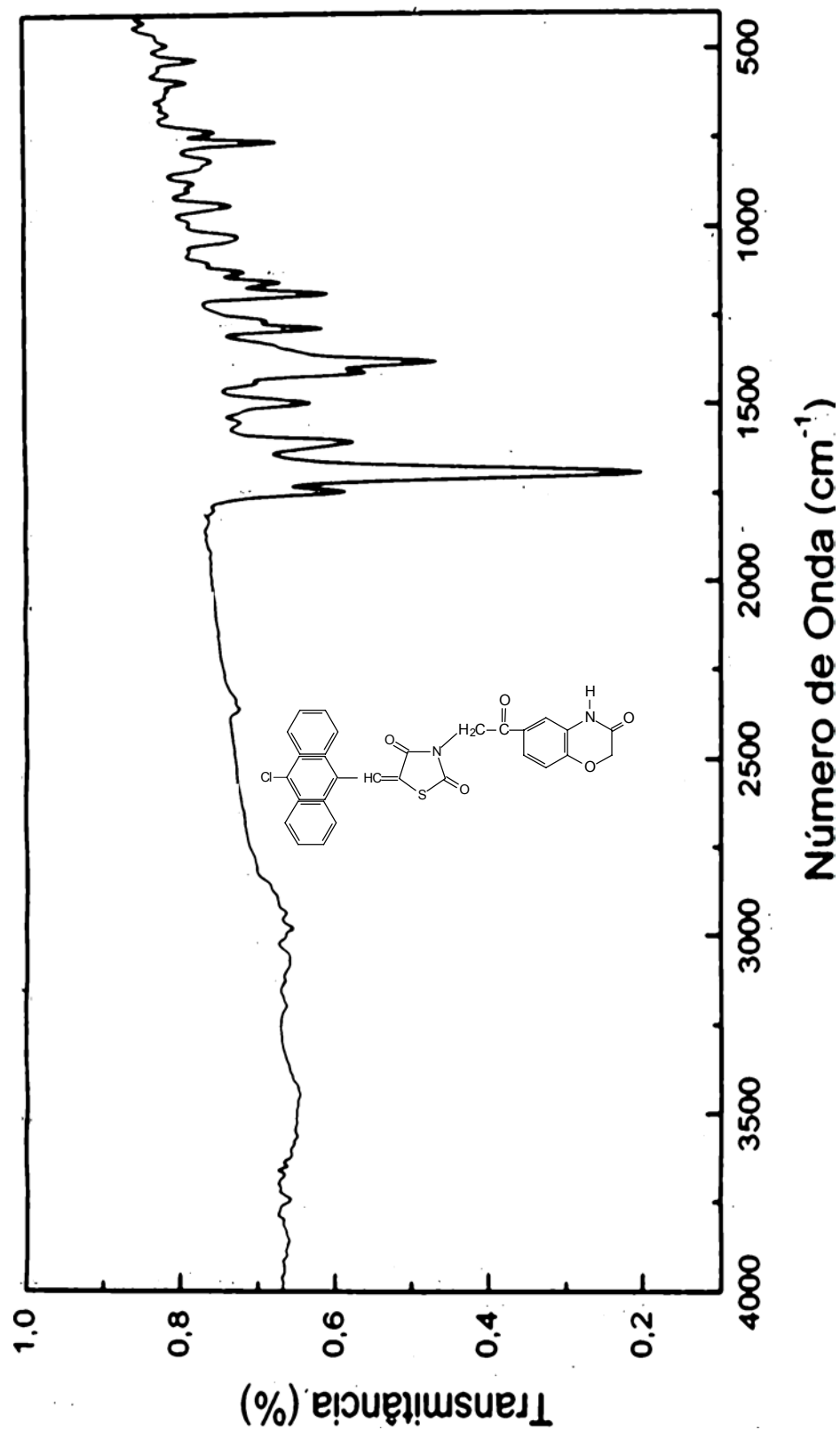


Figura:15 : Espectro de Infravermelho do composto VIII-a : 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzol[1,4]oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona

5.1.5. Dados físico-químicos das reações

Tabela 6. : Dados e constantes físico-químicas dos compostos obtidos

Composto	Quantidade Obtida pura (g)	Rdt (%)	Purificação	R _f /sistema	Tempo de reação (h)	PF (°C)	Solubilidade
I	11,0290	45	Recristalização (em água)	0,46 (CHCl ₃ /MeOH (0,96: 0,04)	25	112	MeOH, acetona, acetato de etila
II	1,6400	60	Recristalização (em dioxano)	0,50 CH ₂ Cl ₂ /EtOH (0,96: 0,04)	8	99	Benzeno, CHCl ₃ CHCl ₂ , acetona, acetato de etila, THF, MeOH, EtOH, Ác. Acético, dioxano, Tween
III-a	0,1168	65	Recristalização (em metanol)	0,51 (CHCl ₃ /MeOH (0,96: 0,04)	11	203	CHCl ₃ CHCl ₂ , acetona, acetato de etila, THF
III-b	0,1747	58	Recristalização (em metanol)	0,50 (CHCl ₃ /MeOH (0,95: 0,05)	13	174	acetona, acetato de etila, EtOH, MeOH.
IV-a	0,4727	63	Recristalização (em ác.Acético)	0,49 (CHCl ₃ /MeOH (0,97: 0,03)	4	143	CHCl ₃ CHCl ₂ , acetona, acetato de etila, THF. DMSO, EtOH
V-d	0,1089	36	Recristalização (em ác. Acético)	0,46 (CHCl ₃ /MeOH (0,95: 0,05)	14	175	MeOH. CHCl ₃ CHCl ₂ , DMSO

Tabela 6: (Continuação)

Composto	Quantidade Obtida pura (g)	Rdt (%)	Purificação	R _f /sistema	Tempo de reação (h)	PF (°C)	Solubilidade
VI-c	0,0057	3	Recristalização (em ác. Acético)	0,56 (CHCl ₃ /MeOH (0,97: 0,03))	19	141	Benzeno, CHCl ₃ , CHCl ₂ , éter, acetona, acetato de etila, THF, EtOH, Ac. Acético, dioxano.
VII-e	0,1739	69	Recristalização (em metanol)	0,66 (CHCl ₃ /MeOH (0,90: 0,1))	23	243	Acetona, acetato de etila, MeOH, DMSO, THF e dioxano
VIII-a	0,1109	92	Recristalização (em Etanol)	0,46 (CHCl ₃ /MeOH (0,94: 0,06))	17	304	n-hexano, acetona, acetato de etila

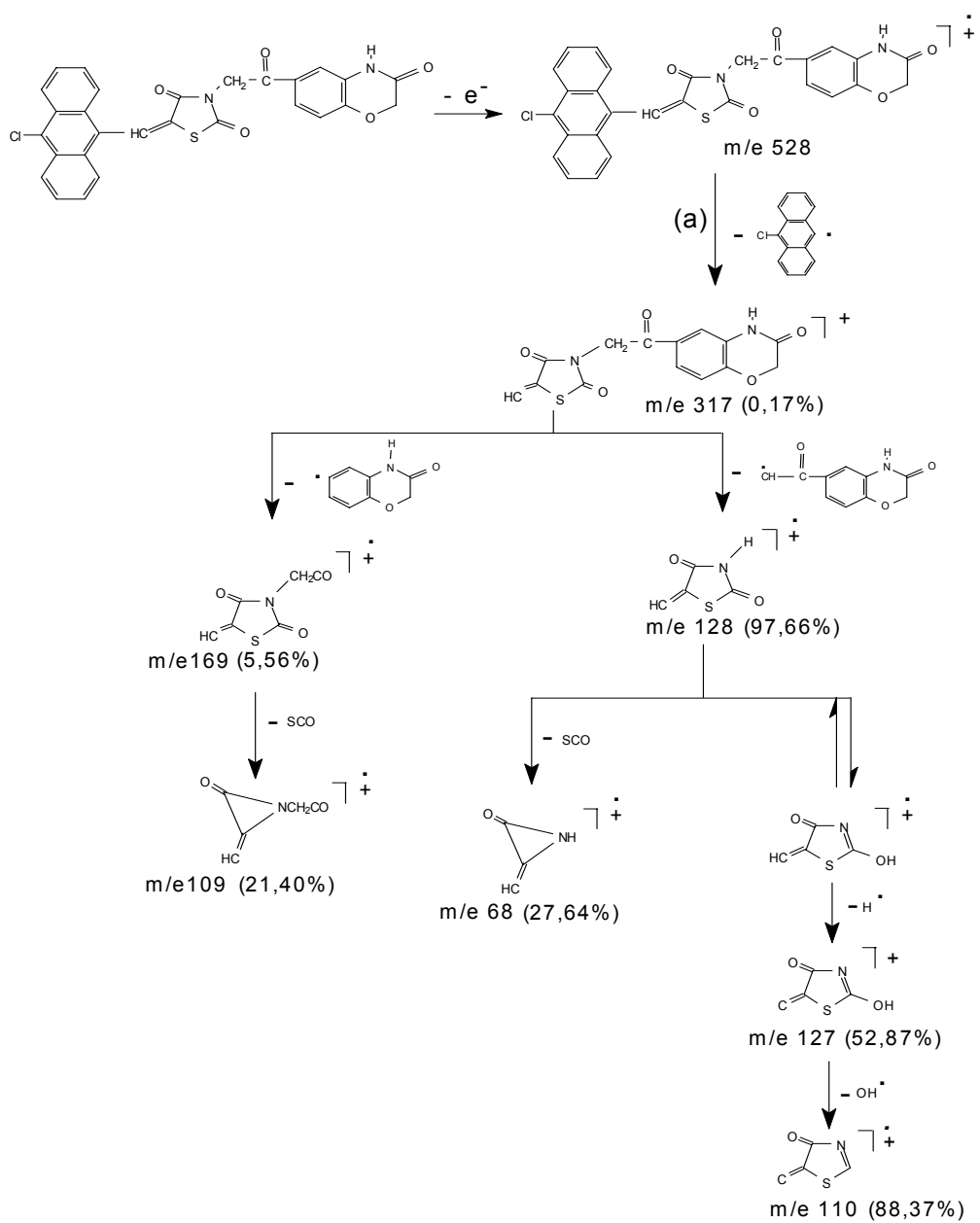
5.1.6. Mecanismos de Fragmentação do derivado VIII-a

O composto 5-(10-cloro-antraceno-9-il-metileno)-3-[2-oxo-2-(3-oxo-3,4-diidro-2H-benzol[1,4]oxazin-6-il)-etil]-tiazolidina-2,4-diona(VIII-a) sofre cinco quebras importantes.

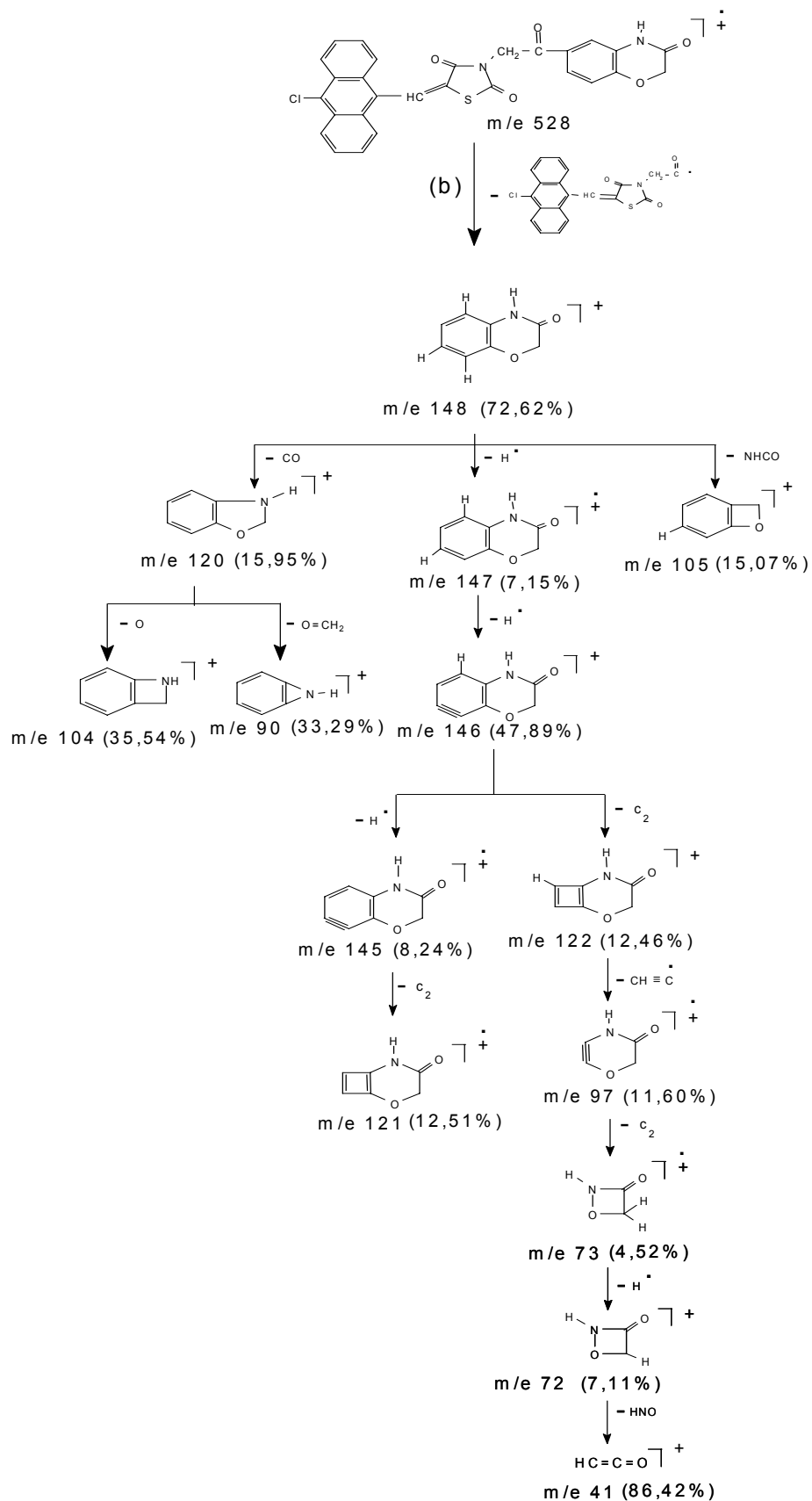
A primeira (caminho **a**) é oriunda do íon molecular m/e 528 que sofre perda do radical C₁₄H₈Cl levando ao íon m/e 317, que pela perda do radical 1-(3,4-diidro-2H-benzo[1,4]oxazin-6-il)-etanona, m/e 189, produz o íon radical m/e 128 (97,66%). Este sofre tautomeria perdendo os radicais H e OH produzindo os íons m/e 127 (52,87%) e m/e 110 (88,37%), respectivamente. O íon radical m/e 128 perde ainda SCO produzindo o fragmento m/e 68 (27,68%). Do íon m/e 317 parte outra fragmentação que é produzida pela quebra da ligação carbono-carbonila ligada ao anel aromático levando ao íon radical m/e 169 (5,56%). Deste fragmento partem duas quebras formando o íon m/e 109 (21,40%) (**Esquema 6**).

Em outra seqüência o íon m/e 528, produz fragmentações pelos caminhos (**b**), (**c**), (**d**) e (**e**). Na fragmentação (**b**) a quebra da ligação C-C entre a carbonila e o anel, leva ao íon m/e 148 (72,62%). Este íon sofreu três fragmentações: a primeira ocorreu com perda da carbonila levando ao íon m/e 120 (15,95 %) e deste ao íon m/e 90 (33,29%) pela perda de H₂C=O e ao íon m/e 104, pela perda de oxigênio. A segunda pela perda consecutiva de radicais hidrogênio formando os fragmentos m/e 147 (7,15%) e m/e 146 (47,89%). Este íon perdeu o radical hidrogênio e C₂ levando ao m/e 145 (8,24%) e o íon radical m/e 121. O m/e 146 perdeu, ainda, consecutivamente, as espécies C₂, HC≡C·, C₂, H· e HNO para formar os fragmentos m/e 122 (12,46%), 97 (11,60%), 73 (4,52%), 72 (7,11%) e 41 (86,42%), respectivamente (**Esquema 7**).

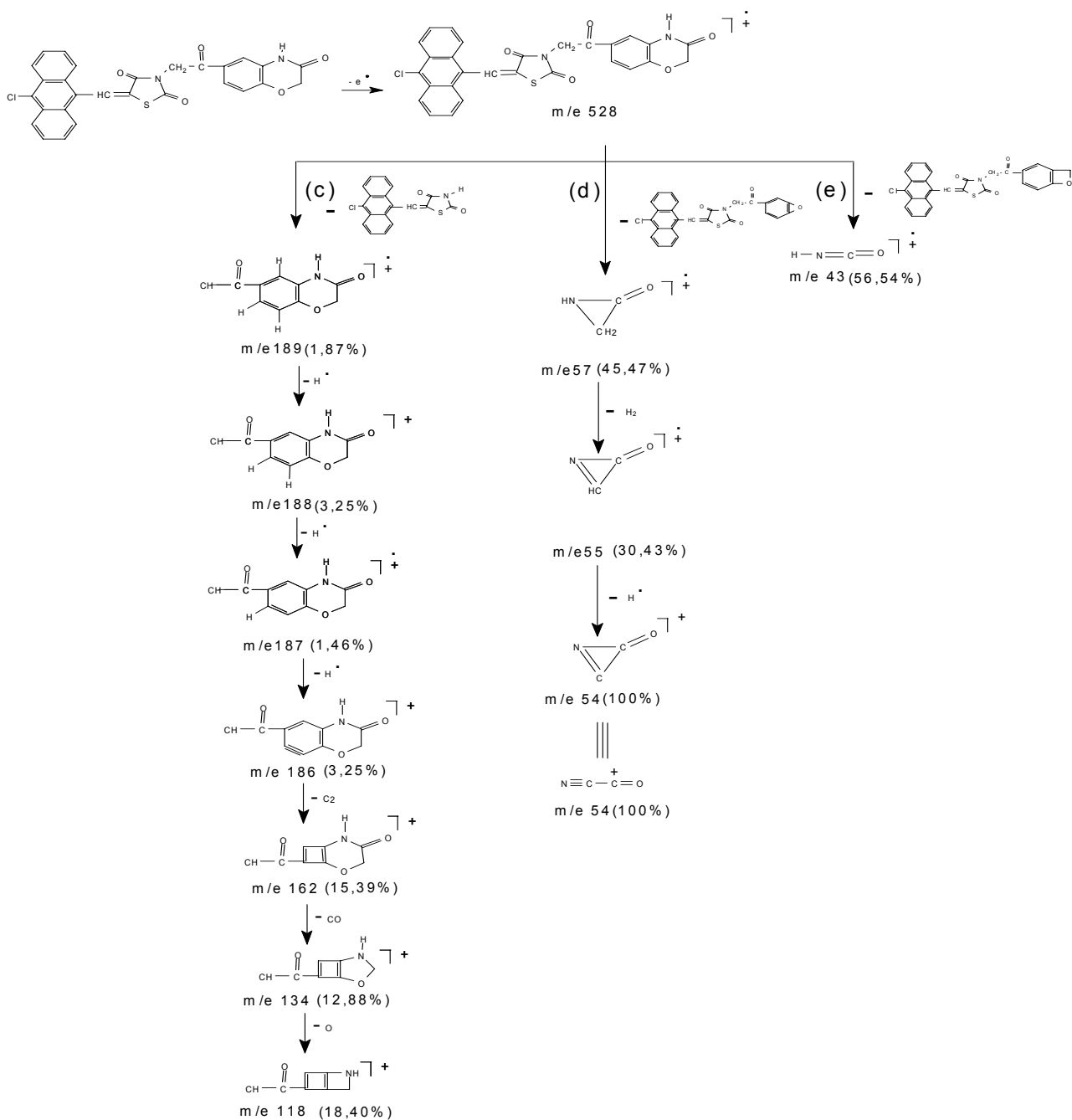
Na fragmentação (**c**) o íon molecular m/e 528 sofre perda da partícula 1-(3,4-diidro-2H-benzo[1,4]oxazin-6-il)-etanona produzindo o íon 189 que perde três radicais hidrogênio consecutivos, C₂, CO e O originando os íons m/e 188, m/e 187 e m/e 186, m/e 162, m/e 134 (12,88%) e m/e 118 (18,40%) (**Esquema 8**). O caminho (**d**) leva ao íon radical m/e 57 (45,47%) que perde uma molécula de H₂ e um radical hidrogênio formando o pico base m/e 54 (100%). A fragmentação (**e**) dá origem ao íon radical m/e 43 (56,54%).



Esquema 6: Fragmentação do composto VIII-a



Esquema 7: Fragmentação do composto VIII-a



Esquema 8: Fragmentação do composto VIII-a

Dos seis compostos novos obtidos os de melhores rendimentos foram o **III-a** (65%), **III-b** (58%), **VII-e** (69%) e **VIII-a** (92%). Os compostos **III-a** e **III-b** não sofreram reações de alquilação com o reagente 6-cloro-acetil-1,4-benzoxazin-3-ona. O composto **VIII-a** apresentou rendimento excelente (92,4%). Os compostos **V-d** e **VI-c** tiveram baixos rendimentos. Os dados espectroscópicos confirmaram as estruturas dos novos compostos. No RMN¹H dos compostos **III-a** e **III-b** se destaca o singlete largo em 12,74 ppm referente ao NH e os sinais dos hidrogênios aromáticos na faixa entre 7,0 e 8,0 ppm. No composto **VII-e** o singlete largo em 10,92 ppm corresponde ao sinal de NH. No RMN¹³C dos compostos **VII-e**, **VIII-a** os sinais (em ppm) 34,09 (CH₂); 40 (CH₂); 47,27 (CH₂); 66,75 (C-O); 115,41-147,80 (C= de alceno); 164,12 (N-C=O); 189,93 (C=O), confirmaram os principais grupos funcionais destes compostos. Na análise do infravermelho as faixas dos grupos funcionais em número de onda (cm⁻¹); Deformação axial, em ligação de hidrogênio, entre 3000-2900 cm⁻¹; deformação axial de CH aromático, entre 3033-2850 cm⁻¹; deformação axial simétrica e assimétrica de C=O acoplados entre 1751-1680 cm⁻¹; deformação axial de C=C aromático, 174 cm⁻¹ (C-H aromático m-dissubstituído); 1515-1650 cm⁻¹ (NH de lactama); 1680-1751 cm⁻¹ (C=O, acopladas); 3033-3183 cm⁻¹ (C-H aromático) e 1660-1750 cm⁻¹ (C=O) caracterizaram os compostos **III-a**, **III-b**, **VII-e** e **VIII-a**. A fragmentação do composto **VIII-a** deu origem ao íon molecular m/e 528. Este fragmentou-se em intensidades bastantes altas m/e 128 (97,66%), no íon m/e 148 (72,62%) e m/e 110 (88,37%). Numa das quebras (caminho d) do íon radical m/e 528 se formou o íon radical m/e 57 (45.47%) o qual pela perda da molécula H₂ e do radical H[•] deu origem ao pico base m/e 54 (100%).

5.2. Estudo Biológico

5.2.1. Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos no teste de difusões em disco estão apresentados na **tabela 7** e na **figura 16**.

Tabela 7.: Atividade antimicrobiana de compostos tiazolidínicos e de benzoxazona frente a representantes de diferentes grupos de microrganismos-teste.

Compostos	Microrganismos-teste *									
	1	6	16	39	71	138	224	398	1007	2083
III-a	11	32	30	0	19	15	0	0	0	0
III-b	19	34	23	0	10	0	0	0	0	0
V-d	11	0	21	0	19	0	0	20	0	0
VI-c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VII-e	25	35	25	0	22	20	18	11	NT	NT
VIII-a	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT
Benzoxazona**	32	40	30	0	30	26	25	15	NT	NT

* **1** = *Staphylococcus aureus*; **6** = *Micrococcus luteus*; **16**= *Bacillus subtilis*; **39**= *Pseudomonas aeruginosa*; **71**=*Myco bacterium smegmatis*; **138**= *Enterococcus faecalis*; **224** = *Escherichia coli*; **398** = *Serratia marcescens*; **1007** = *Candida albicans*; **2083** = *Monilia sitophila*; **NT**= Não Testado.

** Benzoxazona: (6-cloroacetil-1,4-benzoxazin-3-ona)

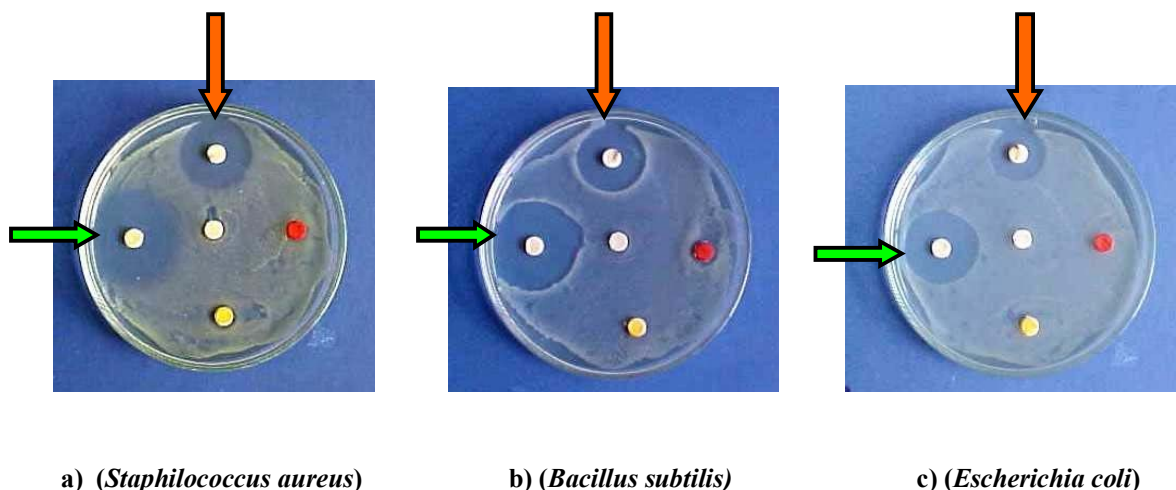


Figura 16: Halos de inibição de diferentes microrganismos, pelos compostos VIII (seta laranja) e benzoxazona (seta verde).

O composto benzoxazona foi o que representou maior atividade para todos os microrganismos (Fig. 17).

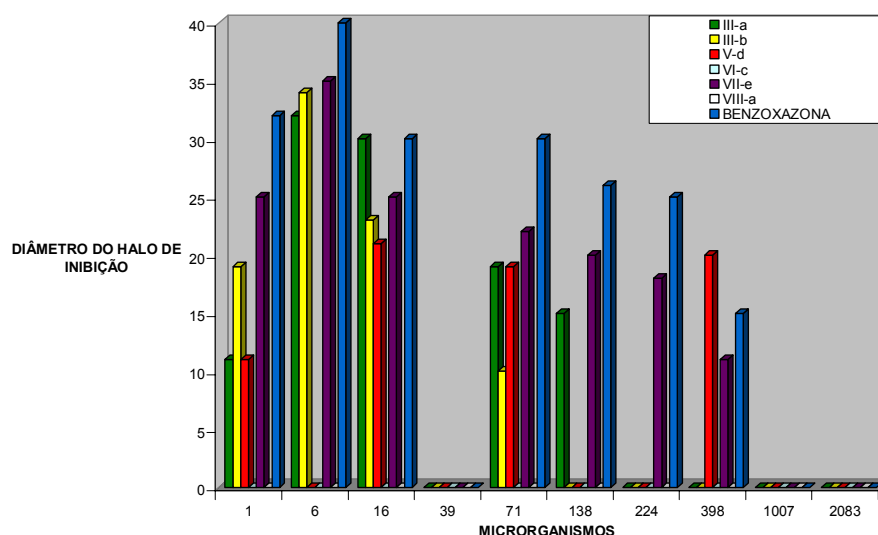


Figura 17 : Atividade antimicrobiana dos compostos III-a, III-b, V-d, VI-c, VII-e, VIII-a e Benzoxazona
 1 = *Staphylococcus aureus*; 6 = *Micrococcus luteus*; 16 = *Bacillus subtilis*; 39 = *Pseudomonas aeruginosa*; 71 = *Mycobacterium smegmatis*; 138 = *Enterococcus faecalis*; 224 = *Escherichia coli*; 398 = *Serratia marcescens*; 1007 = *Candida albicans*; 2083 = *Monilia sitophila*

Dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* realizados com os dez microrganismos, usando a técnica de difusão em disco, foi observado uma boa atividade dos compostos sintetizados, (com exceção dos compostos **VI-c** e **VIII-a**) frente a *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*. Apenas o composto **VII-e** e a **benzoxazona** apresentaram atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*. Foi observado também que, o composto 5-(2,4-dicloro-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (**III-a**), teve uma atividade razoável enquanto o seu isômero de posição, o composto **III-b**, 5-(3,4-dicloro-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona, não apresentou nenhuma atividade frente a *Enterococcus faecalis*. É sabido que a tiazolidina-2,4-diona não apresenta atividade frente aos microrganismos testados. No entanto, quando o anel da benzoxazona foi introduzido na posição 3 da tiazolidina-2,4-diona, foi observado inibição de todos os microrganismos com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Monilia sitophila* (que não foram testados).

A CMI (concentração mínima inibitória) do composto benzoxazona para *Staphylococcus aureus* foi de 25 µg, enquanto a CMB (concentração mínima bactericida) foi de 50 µg. Em relação à *Escherichia coli*, a CMI foi de 50 µg e a CMB foi de 100 µg.

5.2.2. Atividade citotóxica

A citotoxicidade para os compostos **III-a**, **III-b**, **VI-c**, **VII-e**, **VIII-a** e a **benzoxazona** está relatada na **tabela 8**.

Tabela 8: Atividade Citotóxica dos derivados Tiazolidínicos frente às linhagens HEP-2 e NCI-H292

Linhagem Celular	Concentração µg/ml	Derivados Tiazolidínicos (% de inibição)					
		III-a	III-b	VI-c	VII-e	VIII-a	Benzoxazona
Linhagem HEP-2	10,0	60,0	60,9	82,3	22,7	45,3	77,5
	5,0	25,0	34,2	80,7	18,4	24,5	46,1
	2,5	20,0	18,0	50,7	13,2	20,4	25,2
	1,25	11,0	13,5	22,5	10,0	10,5	22,5
Linhagem NCI-H292	10,0	-	-	44,2	50,5	33,1	71,4
	5,0	-	-	42,5	50,3	23,7	69,3
	2,5	-	-	30,5	44,4	23,5	34,6
	1,25	-	-	29,5	40,2	18,0	15,8

Os compostos **III-a** e **III-b** apresentaram atividade citotóxica relevante frente às células HEP-2 (**tabela 8**). Estes dois compostos testados, **III-a** e **III-b**, apresentaram, na concentração de 10 µg/mL, inibição de 60% e 60,9%, respectivamente da proliferação celular. Porém, os mesmos compostos não apresentaram percentagem de inibição relevante para a linhagem NCI-H292 ficando as mesmas menores que 10%. Os compostos **VI-c**, **VII-e**, **VIII-a** e a **benzoxazona**, tiveram boa atividade inibitória para as duas linhagem de células (HEP-2 e NCI-H292). O composto **VII-e** apresentou altos níveis de inibição para as células da linhagem HEP-2, principalmente nas concentrações 10 e 5 µg/mL. Este composto teve inibição variável para as duas linhagens de células. O composto **VII-e** teve eficácia mais pronunciada frente às células da linhagem NCI-H292.

5.2.3. Marcação de Hemácias e Proteínas Plasmáticas com Tecnécio-99m

Foi analisada a marcação de hemácias e plasmas de ratos wistar pela radioatividade do Tecnécio-99m juntamente com as frações solúveis e insolúveis na presença do composto benzoxazona em diferentes concentrações (0,084mg/ml (6,25%); 0,168 mg/ml (12,5%); 0,336 mg/ml (25%); 0,672 mg/ml (50%) e 1,35 (100%).

Foram feitas as médias e os desvios padrões das frações água, frações solúveis e insolúveis tanto das hemácias quanto do plasma dos quatro grupos e dos controles das duas repetições em duplicatas (**tabelas 9 e 10**). As médias das frações água e frações solúveis e insolúveis foram utilizadas para estabelecer as curvas representativas da capacidade do percentual de ligação do Tecnécio-99m nestas frações (**fig. 18, 19 e 20**)

Tabela 9: Médias e desvios padrões das concentrações 0 a 12,5% do composto benzoxazona

	0% (1)	0%(2)	0% (3)	0% (4)	MÉDIA	σ	σ_{n-1}
Hm(H ₂ O)	95,79	98,83	95,21	91,14	95,24	2,73	3,16
PI(H ₂ O)	4,21	1,16	4,79	8,86	4,76	2,74	3,17
Hm(Sol)	98,71	98,78	46,75	48,82	73,27	25,5	29,43
PI(Sol)	1,29	1,22	53,25	51,18	26,73	25,49	29,43
Hm (ins)	86,66	99,14	96,59	87,17	92,4	5,55	6,41
PI (Ins)	13,33	0,86	3,41	12,83	7,6	5,55	6,4
	6,25%(1)	6,25%(2)	6,25%(3)	6,25%(4)			
Hm(H ₂ O)	93,79	87,87	94,2	85,1	90,24	3,88	4,48
PI(H ₂ O)	6,21	12,13	5,8	14,9	9,76	3,88	4,48
Hm(Sol)	96,36	98,02	58,8	81,33	83,67	15,74	18,17
PI(Sol)	3,63	1,98	41,2	18,67	16,33	15,74	18,17
Hm (ins)	98,7	96,68	84,3	88,38	91,99	5,88	6,79
PI (Ins)	1,29	3,43	15,7	11,62	8,01	5,88	6,79
	12,5%(1)	12,5%(2)	12,5%(3)	12,5%(4)			
Hm(H ₂ O)	82,22	78,28	87,97	85,8	83,57	3,68	4,25
PI(H ₂ O)	17,78	21,72	12,03	14,2	16,43	3,68	4,25
Hm(Sol)	71,33	80,2	40,45	55,52	61,88	15,2	17,55
PI(Sol)	28,67	19,8	59,55	44,48	38,12	15,2	17,55
Hm (ins)	98,34	93,91	93,87	94,92	95,26	1,83	2,11
PI (Ins)	1,66	6,09	6,13	5,08	4,74	1,83	2,11

Tabela 10: Médias e desvios padrões das concentrações 25 a 100% do composto benzoxazona

	25%(1)	25%(2)	25%(3)	25%(4)	MÉDIA	σ	σ_{n-1}
Hm (H ₂ O)	94,33	91,55	91,3	61,97	84,79	13,22	15,27
PI (H ₂ O)	5,67	8,45	8,7	38,03	15,21	13,22	15,27
Hm (Sol)	95,24	96,34	72,6	60,5	81,17	15,23	17,6
PI (Sol)	4,76	3,66	27,4	39,5	18,83	15,23	17,6
Hm (ins)	99,32	98,86	89,7	55,93	85,95	17,75	20,5
PI (Ins)	0,68	1,14	10,3	44,07	14,05	17,75	20,5
	50%(1)	50% (2)	50%(3)	50%(4)			
Hm (H ₂ O)	99,08	82,47	85,39	93,42	90,09	6,56	7,57
PI (H ₂ O)	0,92	17,53	14,61	6,57	9,91	6,56	7,57
Hm (Sol)	86,36	80,2	41,45	57,25	66,32	17,99	20,77
PI (Sol)	13,64	19,8	58,55	42,75	33,68	17,99	20,77
Hm (ins)	51,13	93,91	92,9	94,51	83,11	18,47	21,33
PI (Ins)	48,87	6,09	7,1	5,49	16,88	18,47	21,33
	100% (1)	100% (2)	100% (3)	100% (4)			
Hm (H ₂ O)	63,35	74,87	63,05	79,65	70,23	7,23	8,35
PI (H ₂ O)	36,65	25,13	36,98	20,35	29,77	7,23	8,35
Hm (Sol)	68,91	57,74	68,8	85,05	70,13	9,74	11,24
PI (Sol)	31,09	42,26	31,2	14,95	29,87	9,74	11,24
Hm (ins)	98,69	76,53	85,84	54,13	78,8	16,27	18,79
PI (Ins)	1,31	23,47	14,16	45,87	21,2	16,27	18,79

	Hm (H ₂ O)	PI (H ₂ O)
0%	95,24	4,76
6,25%	90,24	9,76
12,50%	83,57	16,43
25%	84,79	15,21
50%	90,09	9,91
100%	70,23	29,77

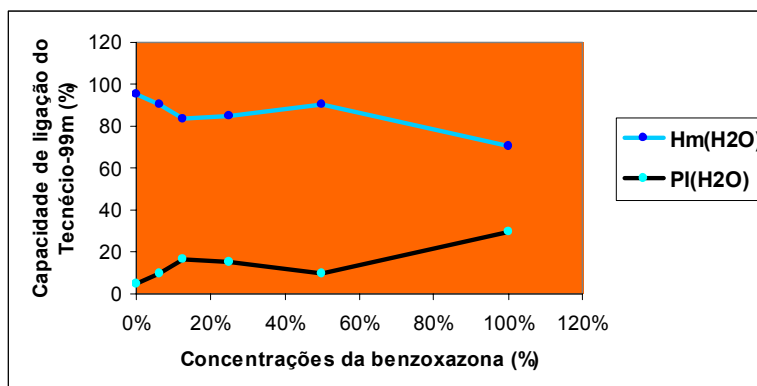


Figura 18: Curva representativa da capacidade do percentual de ligação do Tecnécio-99m na fração água de células sangüíneas e proteínas plasmáticas na presença de diferentes concentrações da benzoxazona.

	Hm (sol)	PI (sol)
0%	73,27	26,73
6,25%	83,67	16,33
12,50%	61,88	38,12
25%	81,17	18,83
50%	66,32	33,68
100%	70,13	29,87

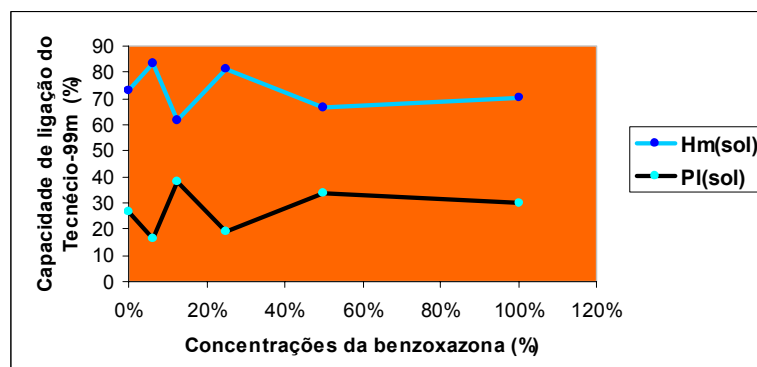


Figura 19: Curva representativa da capacidade do percentual de ligação do Tecnécio-99m na fração Hm (sol.) e PI (sol.) células sangüíneas e proteínas plasmáticas na presença de diferentes concentrações da benzoxazona.

	Hm (ins.)	PI (ins.)
0%	92,40	7,60
6,25%	91,99	8,01
12,50%	95,26	4,74
25%	85,95	14,05
50%	83,11	16,88
100%	78,80	21,20

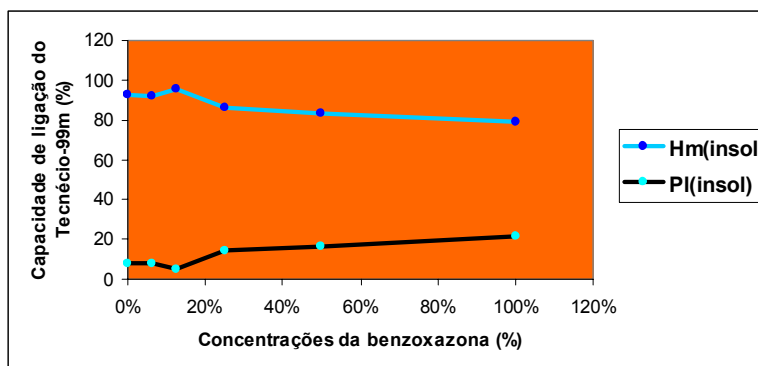


Figura 20: Curva representativa da capacidade do percentual de ligação do Tecnécio-99m nas frações Hemácias insolúveis (ins.) e Plasma insolúveis (ins.) de células sanguíneas e proteínas plasmáticas na presença de diferentes concentrações da benzoxazona.

Na fração Hm (H_2O) a capacidade de ligação do tecnécio sofre uma diminuição de 0 a 10% e de 50 a 100% da concentração do composto enquanto na fração plasma (H_2O) ocorre o inverso. Em relação à fração plasma (H_2O) houve um aumento constante da ligação do tecnécio de 50 até 100% da concentração do composto. Na fração solúvel das hemácias houve uma variação na ligação do tecnécio com as células.

Entre as concentrações de 25 até 100% há um decréscimo na capacidade de ligação da benzoxazona com o tecnécio-99m. Observando a fração solúvel (FSC) houve uma tendência de ligação do tecnécio variável com as células. Isto se dá possivelmente quando a complexação do composto **benzoxazona** com os íons Sn^{2+} (estano) e TcO_4^- (pertecnetato) ocorre. Neste momento há liberação de espécies reativas de oxigênio que competem com o íon pertecnetato ao se reduzirem, impedindo que este se ligue à molécula da hemoglobina (Braga, 2000). Na fração solúvel do plasma possivelmente as moléculas do composto em estudo que se ligaram aos íons estano e pertecnetato, favoreceram a melhor fixação do pertecnetato nos sítios de ligação deste íon nas proteínas plasmáticas.

Os resultados, expressos nas **tabelas 9 e 10**, e nas curvas representativas, demonstram que a marcação da fração celular e da fração plasmática apontou para um percentual de ligação do ^{99m}Tc no início do processo de captação de 90,24%. Com o aumento da concentração da benzoxazona ocorre uma redução da ligação do ^{99m}Tc na fração celular (hemácias) e um aumento da fração plasmática. Na fração solúvel das células (hemácias) há um aumento da ligação do ^{99m}Tc em concentrações alternadas (entre 0 e 5%, entre 10 e 30% e entre 50 e 100% da concentração da benzoxazona). Na fração solúvel plasmática ocorre comportamento inverso. Na fração insolúvel ocorre um aumento da ligação do ^{99m}Tc apenas entre 0 e 10% da concentração da benzoxazona e uma diminuição crescente até 100%. O aumento da concentração da benzoxazona desfavorece progressivamente a ligação do ^{99m}Tc , tanto na fração celular quanto nas frações solúveis e insolúveis das células.

6. CONCLUSÃO

- Os novos compostos sintetizados substituídos nas posições 3 e 5 da tiazolidina-2,4-diona e na posição 5 da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona, tiveram suas estruturas confirmadas pelos métodos espectroscópicos tais como Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (1D), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13, Infravermelho e Massas.
- A atividade antimicrobiana dos sete compostos estudados foi boa frente a quase todos os microrganismos testados. Apenas para *Pseudomonas aeruginosas* não apresentaram atividade. Os compostos **III-a**, **III-b**, **V-d** e **VI-c** não desenvolveram nenhuma atividade frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Monilia sitophila*. A **benzoxazona** se destacou dos demais porque teve a melhor atividade antimicrobiana de modo geral, entre todos os compostos testados.
- A atividade citotóxica dos compostos testados foi eficiente frente as duas linhagens de células testadas (HEp-2 e NCI-H292. Apenas os composto **III-a** e **III-b** não tiveram atividade relevante a qual ficou abaixo de 10% e o composto **VIII-a** nas concentrações 1,25 e 2,5 µg/mL também não apresentou atividade.
O composto **VI-c** apresentou excelente inibição para as células da linhagem HEp-2.
- O composto **benzoxazona** mostrou baixa capacidade de ligação com o Tecnécio-99m (baixa ação antioxidante).

7. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

- Sintetizar novos compostos substituídos nas posições 3,5 e 3,4,5 a partir dos compostos iniciais obtidos com novos reagentes para formar séries de outros novos compostos.
- Realizar o estudo da CMI para todos os compostos sintetizados que apresentem halos significativos no teste em disco.
- Testar a atividade antioxidante para outros compostos obtidos.
- Realizar o estudo hipoglicemiante com os compostos deste trabalho, uma vez que a literatura mostra que a tiazolidina-2,4-diona tem grande poder de baixar o nível de açúcar no sangue.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J.F.C.; AZEVEDO, L. C.; GALDINO, S. L.; CHANTEGREL, J.; ROCHA PITTA, 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**, v. 53, n.5, p. 209-214, 1995.

ALBUQUERQUE, J.F.C.; GALDINO, S. L.; CHANTEGREL, J.; THOMASSON, F.; ROCHA PITTA, I. & LUU-DUC, C. Thio-arylidène thiazolidinones substituées: synthèse et étude structurale. **Ann. Pharm. Françaises**, v. 55, n.5, p. 201-205, 1997.

ALBUQUERQUE, J.F.C.; ALBUQUERQUE, A.; AZEVEDO, C. C.; THOMASSON, F.; GALDINO, S. L.; CHANTEGREL, J.; CATANHO, M.T. J.; ROCHA PITTA, I. & LUU-DUC, C. Substituted thiazolidinediones and thio-imidazolidinones: Synthesis, structural study and pharmacological activity. **Pharmazie**, v. 50 H. n.6, p.387-389, 1995.

ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; MACIEJ, J. C.; FINE, D.L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J.G.; SHOEMAKER, H.R. AND BOYD, M.R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor CellLines Using a Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer Research**, v.48, p. 589-601, 1988.

ANDRADE, A.M.C.; LIMA, W.T.; ROCHA, M.P.A.; M.C.A., LIMA; GALDINO, S.L.; BARBOSA FILHO, J.M.; GÓES, A.J.S.; PITTA, I.R. Synthesis and structural study of substituted thioxothiazolidinones and thioxoimidazolidinones. **Boll. Chim. Farmac.**- Anno 141- n. 6, p.428-433, 2002.

AYDOGAN, F.; ÖCAL, N.; TURGUT, Z. & YOLACAN, C. Transformation Of Aldimines Derived From Pyrrole-2-Carbaldehyde, Synthesis Of Thiazolidine-Fused Compounds. **Bull. Corean Chem. Soc.**, v. 22, n. 5, p. 476-480, 2001.

BHATT, B.R.; SHAH, H.P.; SHAH, P.B. TRIVED.; UNDAVIA, N.K .; DESAI, N.C. **Indian J. Chem.** v. 3B, p. 189-192, 1994. In: KUÇUKGÜZEL, G.S.; ORUÇ, E.E.; ROLLAS, S.; SAHIN, F.; ÖZBECK, A. Synthesis, Characterisation and biological Activity of Novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and Some Related Compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p.197-206, 2002.

BATLOUNI, M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 68, n.1, p.1-13, 1997. Disponível em: <<http://www.epub.org.br/abc/6801/tjan12.htm>>. Acesso em: 26 mar. de 2003.

BAUER, A. W.; KIRBY, W.M.M.; SHEVIS, J.C. & TURK, M. Antibiotic Susceptibility Testing By A Standardized Single Disc Method. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BERNARDO-FILHO, M. FREITAS, R.S.; GUTIFILEN, B.; FONSECA, L.M.B., da. Evaluation of ^{99m}Tc -radiopharmaceutical binding to blood elements using different trichloroacetic acid concentrations. **Yale Journal and Medicine**, v.69, n.6, p.483-488, 1996.

BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; FELICIANO, G.D.; REINIGER, I.W.; OLIVEIRA, J.F.; SILVA, C.R. The effect of drugs on the labeling of blood elements with ^{99m}Tc . **Current Pharmaceutical Design**, v.6, p.1179-1191, 2000.

BROWN, F. C. 4-Thiazolidinones. **Chem. Rev.** v. 61, n. 5, p. 463-521, 1961.

CAMPOS-TAKAKI, G. M. Atividade “in vitro” das Fluorquinolonas: Perfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin e Norfloxacin sobre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*. Recife, 1992, 380p. Tese de Concurso para Professor Titular (Departamento de Antibióticos), Universidade Federal de Pernambuco, 1992.

CHANDRAKANT, G. BONDE and GAIKWAD, NARESH J. Synthesis and Preliminary Evaluation of Some Pyrazine Containing Thiazolines and Thiazolidinones as Antimicrobial Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2151-2161, 2004.

CHANTEGREL, J.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; GUARDA, V.L.; PERRISSIN, M.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; BRANDÃO, S.S.; THOMASSON, F.; PITTA, I.R. & LUU-DUC, C. Travail Original Synthèse et étude Structurale de Nouvelles 4-thioxothiazolidin-2-ones Substituées. **Ann Pharm Fr**, v. 60, p. 403-409, 2002.

COSTA, D. L. B.; CHANTEGREL, J.; LIMA, M. C. A.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; LIMA, R. M. O. C.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; & LUU-DUC, C. Imidazolidinediones Et Thiazolidinediones Substituées: Synthèse, Étude Structurale et Activité Cytotoxique. **J. Pharm. Belg**. v. 50, n.1, p. 5-10, 1995.

COSTA, M.C.C.D. & NASCIMENTO, S.C. Atividade citóxica de *Plectractus barbatus* **Acta Farm. Bonaerense**, v.22, n.2, p.155-158, Argentina, 2003.

COSTA, P. & SOUSA, P. **A Biologia dos Elementos Não Biológicos. Lisboa, 1999. Monografia de conclusão do curso de Licenciatura em Química**, Faculdade de Ciências de Lisboa, 1999. Disponível em:

<<http://www.terravista.pt/enseada/5002/inorganica/elementos/BIOLOGIA.HTM#elementos>> Acesso em 25 de dez. de 2003.

EAGLE, H. Amino Acid Metabolism In Mammaliau Cell Culture. **Science**, Washington, v. 130, p. 432-437, 1959.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H. & JURGENS, G. The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Oxidative Modification of LDL. **Free Radic. Biol. Méd.**; v.13, p. 341-90, 1992.

FIORUCCI, A. R. A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. **Química Nova na Escola**, n. 17, p. 3-6, 2003.

FUJIWARA, T.; YOSHIOKA, S.; YOSHIDA, T.; USHIYAMA, I.; HORIKOSHI, H. Characterization of New Oral Antidiabetic Agent CS-045: Studies in KK and ob/ob mice Zucker Fatty Rats. **Diabetes**, v. 37, p.1595, 1988.

GÓES, A. J. S.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R. & LUU-DUCC. Synthèse et Activité Antifongique des Chlorobenzyl Benzylidène Thiazolidinediones et Imidazolidinediones Substituées. **Ann. Pharm. Françaises**, v. 49, n. 2, p. 92-98, 1991.

GÓES A. J. S., ALVES DE LIMA M. C., GALDINO S. LINS, ROCHA-PITTA I. & LUU-DUC.C. Synthèse et activité antimicrobienne des fluorobenzyl benzylidène thiazolidinediones et imidazolidinediones substituées. **J. Pharm. Belg.**, v. 46, n. 4, pp 236-240, 1991.

GOODMAN. GILMAN, A: HARDMAN, JOEL G.; LIMBIRD, LEE E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.

GRISHCHUK, A. P; BARANOV, S. N.; GORIZDRA, T. E. & KOMARITSA, I. D. Conversion of some heterocyclic oxo compounds to their thio analogs. **Zh. Prikl. Khim.**,v. 40, p. 1389-1392, 1967; **Chem. Abstr.**, 116869c, 1967.

GROSSMAN, R.B. **The Art of Writing Reasonable Organic Reaction Mechanisms**. (Corrected third printing, 2002). Ed. Springer-Verlag, New York, 1999.

GUARDA, V.L.M.; PEREIRA, M.A.; DE SIMONE, C.A.; J.F.C. ALBUQUERQUE; GALDINO, S.L.; CHANTEGREL, J.; PERRISSIN, M.; BENEY, C.; THOMASSON, F.; PITTA, I.R. and LUU-DUC, C. Synthesis and structural study of arylidene thiazolidine and benzothiazine compounds. **Sulfur Letters**, v. 26, p. 17-27, february 2003.

HARHASH, A. H., MOHAMMED, E., EI-DIN, S., ELNAGDI, H.; FODA, K. M. Cyanoethylation of some 4-thiazolidinones. **Egypt J. Chem.**, v. 15, p. 11-21, 1972.

HEINTZ (1865) In: SPRAGUE, J. M.; LAND, A. H.: **Heterocyclic Compound**. New York, v. **5**, p. 711, 1957.

HOLMERG (1909) In: KALLENBERG, S. Stereochemische Untersuchungen Der Diketo-Thiazolidine. **Ber.** v. 56, p. 316, 1923.

JESSUP, W.; RANKIN, S.M.; DE WHAKKEY, C.V.; HOULT, J.R.; SCOTT, J. e LEAKE, D.S. Alpha-tocopherol Consumption During Low –Density Lipoprotein Oxidation. **Biochem J**, 265:399405, 1990. In: BATLOUNI, M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 68, n.1, p.1-13, 1997. Disponível em: <<http://www.epub.org.br/abc/6801/tjan12.htm>>. Acesso em: 26 mar. de 2003.

KANDEEL, A. KAMAL & YOUSSEF, AHMED S. A. Reactions of 5-Aroylmethylene-3-Benzyl-4-Oxo-2-Thioxo-1,3-Thiazolidines with Nitrile Oxides. **Molecules**, v. 6, p. 510-518, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R.; JANDA, W. M.; SOMMERS, M. & WINN, C. W. W. **Diagnóstico Microbiológico**. México: J. B. Lippincott Co., 570p. 1997. Relations quantitatives structure-activité hypoglycémiant de quelques thiazolidine- et imidazolidine-2,4-diones. **Ann. Pharm. Françaises**, v. 51, n. 6, p. 283-291, 1993.

KUÇUKGÜZEL, G.S.; ORUÇ, E.E.; ROLLAS, S.; SAHIN, F.; ÖZBECK, A. Synthesis, Characterisation and Biological Activity of Novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and Some Related Compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p.197-206, 2002.

LIMA J. G., GALDINO S. LINS, ROCHA-PITTA I., CATANHO M. T. J., PERRISSIN M. & LUU-DUC.C. Relations Quantitatives Structure-Activité Hypoglycémiant de Quelques Thiazolidine- et Imidazolidine-2,4-diones. **Ann. Pharm. Françaises**, v. 51, n. 6, p. 283-291, 1993.

LIU, H.L. ; LI, Z. ; THORLEIF, A. Synthesis and Fungicidal Activity of 2-imino-3-(4-arylthiazol-2-yl)-thiazolidin-4-one and Their 5-Arylidene Derivatives. **Molecules**, v.5, p. 1055-1061, 2000.

LO, CHIEN-PEN & SHROPSHIRE, E. Y. The Alkylation of 2,4-Thiazolidinones. **J. Org. Chem.** v. 22, n. 8, p. 999-1001, 1957.

LORIAN, V. Antibiotics in Laboratory Medicine, 2 ed. Baltimore; Williams & Wilkins, p. 1259, 1986.

MARQUES; F. L. N., OKAMOTO, M.R. Y. & BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre Geradores e Radiofármacos de Tecnécio-99m e seus Controles de Qualidade. **Radiologia Brasileira**. v. 34, n.4, p. 233-239, 2001.

MINKA, A. F.: Synthesis of 4-Thiazolidone From Dicarboxylic Acids. **Farm. Zh.** v. 19, (3), 47-50, 1964; **Chem. Abstr**, v. 64, p. 3514e, 1966.

MISSBACH, M.; JAGHER, B.; SIGG, I.; NAYERIS, S.; CARLBERGS, C.; & WIESENBERG, I. Thiazolidine Diones, Specific Ligands of the Nuclear Receptor Retinoid Z Receptor/Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor α with Potent Antiarthritic Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.23 , p. 13515-13522, 1996.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAGASE, H.; **Chem. Pharm. Bull**, v.22, p.1661, 1974. In: KANDEEL, A. Kamal & YOUSSEF, AHMED S. A. Reactions of 5-Aroylmethylene-3-Benzyl-4-Oxo-2-Thioxo-1,3-Thiazolidines With Nitrile Oxides. **Molecules**, v. 6, p. 510-518, 2001.

NASCIMENTO, S.C. Reserche de L'Activite Antitumorale de Produits de Synthese ou D'origine Naturelle. Utilisation Du SAMBA Pour L'Analyse Des Modifications Cellulaires Induites. Thèse de Doctoral, Université Joseph-Fourier, Grenoble, France, 1993. 346 p.

NOGUCHI , N.; SAKAI, H.; KATO, Y.; TSUCHIYA, J.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; HORIKOSHI, H. & KODAMA, T. Inhibition of Oxidation of Low Density Lipoprotein by Troglitazone. **Atherosclerosis**, v. 123, p. 227-234, 1996.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, p.37-58. Ed. Atheneu São Paulo Ltda, 1996.

OLIVEIRA, J.F.; BRAGA, A.C.S.; AVILA, A.S.R.; GUTIFILEN, B.; BERNARDO-FILHO, M., Effect of thuya occidentalis on the labeling of red blood cells and plasma proteins with ^{99m}Tc. **Yale J. Biol. Med.**, v.69, pp.489-494, 1997.

OMAR, M.T.; KANDEEL, K.A. & YOUSSEF, A.S.A. **Monatsh. Chem.**, v. 126, p. 439, 1995. In: KANDEEL, A. KAMAL & YOUSSEF, AHMED S. A. Reactions of 5-Aroylmethylene-3-Benzyl-4-Oxo-2-Thioxo-1,3-Thiazolidines with Nitrile Oxides. **Molecules**, v. 6, p. 510-518, 2001.

PELCZAR, MICHAEL J; CHAN, E.C.S; KRIEG, NOEL. Microbiologia- Conceitos e aplicações. v. 2. Ed. MAKEON BOOKS, 1996- São Paulo.

PRABHAKAR, C.; MADHUSUDHAN, G.; SAHADEV, K; MAHEEDHARA REDDY, CH.; SARMA, M.R.; OM REDDY, G.; CHAKRABARTI, R.; SESHAGIRI RAO, C.; DILEEP KUMAR & RAJAGOPALAN, R. Synthesis and Biological Activity of Novel Thiazolidinediones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.8, p. 2725-2730, 1998).

RAGAB, F.A.; EID, N.M.; EL-TAWAB. Synthesis and anticonvulsant activity of new thiazolidinone and thioxoimidazolidinone derivatives derived from furochromones **Pharmazie**, 52, p. 926-929, 1997.

RAMAM, K.; PANDEY, B.R. Substituted oxothiazolyl acetic acids as antiinflammatory agents. **Res. Commun. Chem. Patho. Pharmacol.** v.21, n.1, p.177-180, 1978

REVISTA ELETRÔNICA do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Disponível em:

< <http://qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/nuclear/medicina.html> > acesso em 25 de dez. de 2003.

SINGH, S. P.; PARMAR, S. S.; RAMAN, K. & STENBERG, V. I. Chemistry and Biological Activity of The Thiazolidinones. **Chem. Rev.** v. 81, p. 175-203, 1981.

STRYER, L. Bioquímica. Cuarta Edición. TOMO II. p. 553-554. Ed. Reverte S.A. , Barcelona, Espanha, 3ª Reimpresión, 2001.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6. ed., Rio de Janeiro: Ed. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1996.

TRIVEDI, J. P.; CONTRACTOR, S. J., & SHAH, I. D. Studies In Thiazolidones. Part IV. Synthesis of 2-Imino-4-Oxo-5-Thiazolidine-Acetic Acids. **J. Indian Chem. Soc.**, v. 43, p. 265, 1966.

TUNÇBILEK, M.; ALTANLAR, N. Synthesis and antimicrobial evaluation of some 3-(substitutedphenacyl)-5-[4'-(4H-4-oxo-1-benzopyran-2-yl)-benzylidene]-2,4-thiazolidinedi-ones. **IL FARMACO**, v. 54, p. 475-478, 1999.

VIEIRA, E. C. ; FIGUEIREDO, E. A.; ALVAREZ-LEITE, J. I. & GOMEZ, M. V. Química Fisiológica. 2. ed., p. 277-280, 1995, p. 414, São Paulo, Ed. ATHENEU,

WEISENTHAL, L.M.; MARSDEN, J.A, DILL, P.L. & MACALUSO, C.K. Anovel Dye Exclusion Method For Testing *In Vitro* Chemosensitivity Of Human Tumors. **Cancer Res.** v. 43, p. 749-757, 1983.

WITZTUM, J.L. The Oxidation Hypothesis of Atherosclerosis. **Lancet**; v.344, p.793-795, 1994. In: BATLOUNI, M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 68, n.1, p.1-13, 1997. Disponível em: <http: // www.epub.org.br/abc/6801/tjan12.htm>. Acesso em: 26 mar. de 2003.

YAMAMOTO, Y.; NAKAJIMA, M.; YAMAZAKI, H.; YOKOI, T. Cytotoxicity and Apoptosis Produced by Troglitazone in Human Hematoma Cells. **Life Sciences**, v. 70, p. 471-482, 2001.

YOSHIDA, T.; FUJITA, T.; KANAI, T.; AIZAWA, Y.; KURUMADA, T.; HASEGAWA, K.; HORIKOSHI, H. Studies on hindered phenols and analogues. 1. Hypolipidemic and hypoglycemic agents with ability to inhibit lipid peroxidation. **J. Med. Chem**, v.32, p. 421, 1989.

“... As coisas antigas já passaram,
eis que tudo se fez novo”
(2Co.5.17)