

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS
TIAZOLIDINÔNICOS**

Ivanildo Mangueira da Silva

RECIFE – 2005

Ivanildo Mangueira da Silva

SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS TIAZOLIDINÔNICOS

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

Área de concentração: Química de Produtos Bioativos.

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

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Jansen de Almeida
Catanho

RECIFE – 2005

Silva, Ivanildo Mangueira da

Síntese e avaliação biológica de derivados tiazolidinônicos / Ivanildo Mangueira da Silva. – Recife : O Autor, 2005.

xxiii, 98 : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Biotecnologia de Produtos Bioativos. 2. Derivados tiazolidinônicos – Síntese e caracterização – Atividade antimicrobiana *in vitro* - Avaliação citotóxica nas células HPe-2 e NCI-H292. 3. Marcação de hemácias *in vitro* - Potencial radiofármaco e antioxidante. I. Título.

547.72

CDU (2.ed.)

UFPE

547.59

CDD (22.ed.)

BC2006-330

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE Mestrado APRESENTADA POR IVANILDO MANGUEIRA DA SILVA 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 05 DE JULHO DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:


Dra. SIMONE MARIA DA CRUZ GONÇALVES
Departamento de Química Fundamental - UFPE


Dra. ALDA DE ANDRADE CHIAPPETA
Departamento de Antibióticos - UFPE


Dra. JULIANNA FERREIRA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE
Departamento de Antibióticos - UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edimar Gonçalves

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Míriam Camargo Guarniere

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dra. Maria das Graças Cunha

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Prof^a. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Prof^a. Dra. Norma Buarque de Gusmão

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

Prof^a. Dra. Ana Maria Souto Maior

VICE-COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

Prof. Dr. Alexandre José da Silva Goes

Epigrafe

“O amor é o único e grande alimento de Deus”.

Frei Antônio Moser

“Ninguém é digno de pódio se não reconhecer seu fracasso”.

Augusto Cury

A minha esposa Luzia, pelo amor, apoio e incentivo.

A Raquel minha filha que tanto abdicou de minha presença.

Aos meus Pais José Francisco e Djanira, minhas irmãs, cunhados e amigos que caminharam comigo em oração e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dar-me paciência, perseverança, força física e mental para elaborar este trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. **Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque**, pela orientação, incentivo, confiança e amizade.

As Prof^{as}. Dr^ª. **Alda de Andrade Chiappeta e Kêsia Xisto Fonseca Ribeiro Sena** do Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela realização dos testes microbiológicos.

A Prof^ª. Dr^ª. **Maria Teresa Jansen de Almeida Catanho** e estagiários de iniciação científica, **Marília, Breno e Jailson** do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Biofísica e Radiologia da UFPE, pela ajuda nos testes de marcação de hemácias.

A Prof^ª. Dr^ª. **Silene Carneiro do Nascimento** do Laboratório de Cultura de Células no Departamento de Antibióticos da UFPE pelo auxílio nos testes de citotoxicidade dos compostos.

A Prof^ª. Dr^ª. **Maria do Carmo A. de Lima**, Doutoranda **Leila** e Mestrando **Ricardo** do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela amizade cultivada.

Ao corpo docente do Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, que muito contribuíram para minha formação.

Aos técnicos **Ricardo**, da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental pela realização dos espectros e **Orlando Silva** do Departamento de Antibióticos da UFPE pela preparação dos meios de cultura.

Aos estagiários de iniciação científica, **Diogo, Rafael, Kauê, Érika, Juliano e Fred** pela inestimável colaboração.

À secretária **Suely Cavalcante** do Curso de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos pelo auxílio nas diretrizes burocráticas.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1	INTRODUÇÃO 01
2	OBJETIVOS 02
2.1	Objetivo geral 02
2.2	Objetivos específicos 02
3	REVISÃO DE LITERATURA 03
3.1	Tiazolidinas 04
3.1.1	Preparação da tiazolidina-2,4-diona 05
3.1.2	Reações de alquilação..... 07
3.1.2.1	Reações de alquilação da tiazolidina-2,4-diona 07
3.1.2.2	Reações de alquilação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona 09
3.1.3	Reações de condensação 09
3.1.3.1	Reação de condensação da tiazolidina-2,4-diona 09
3.1.3.2	Reações de condensação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona 12
3.2	Atividade biológica de derivados tiazolidínicos 13
3.2.1	Atividade antimicrobiana de derivados tiazolidínicos 13
3.3	Célula neoplásica 15
3.3.1	Mecanismo de resistência 15
3.4	Marcação de hemácias com tecnécio 17

3.4.1	Potencial antioxidante	19
3.4.1.1	Ação antioxidante de derivados tiazolidínicos	20
4	METODOLOGIA	22
4.1	Estudo Químico	22
4.2	Diagrama de síntese	23
4.2.1	Nomenclatura dos derivados tiazolidínicos sintetizados	24
4.2.2	Mecanismo reacional da tiazolidina-2,4-diona	25
4.2.3	Mecanismo de derivados 5-benzilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	26
4.2.4	Mecanismo de síntese dos derivados 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona e do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona	27
4.3	Síntese dos derivados tiazolidínicos	28
4.3.1	Obtenção da tiazolidina-2,4-diona	28
4.3.2	Obtenção da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona	28
4.3.3	Obtenção dos derivados 5-benzilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	28
4.3.4	Obtenção dos derivados 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona e do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona	29
4.4	Atividade Biológica	31
4.4.1	Avaliação da atividade antimicrobiana dos derivados tiazolidinônicos....	31
4.4.2	Procedimento Experimental	31
4.4.3	Meios de cultura	32
4.4.4	Preparo dos meios de cultura	32

4.4.4.1	Microorganismos-teste e padronização dos inóculos	33
4.4.5	Testes de atividade antimicrobiana	34
4.4.6	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	35
4.5	Avaliação da atividade citotóxica de novos derivados tiazolidínicos	37
4.5.1	Linhagens celulares.....	37
4.5.2	Viabilidade celular	37
4.5.3	Determinação da atividade citotóxica	37
4.6	Avaliação de derivados tiazolidinônicos sobre a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com tecnécio-99m	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Estudo Químico.....	41
5.1.1	Estrutura química dos derivados tiazolidinônicos sintetizados	42
5.1.2	Dados físico-químicos dos derivados tiazolidínicos sintetizados	43
5.1.3	Resultados espectroscópicos de RMN ¹ H da tazolidinadiona I, da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona e seus derivados 5-substituídos	44
5.1.3.1	Espectros de RMN ¹ H dos derivados tiazolidinônicos III - V	44
5.1.4	Resultados espectroscópicos de RMN ¹³ C do 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	46
5.1.5	Resultados espectroscópicos de Infravermelho dos derivados tiazolidinônicos	47
5.1.6	Resultados espectroscópicos de Massas dos derivados tiazolidinônicos III e V	48
5.1.6.1	Espectro de massa dos derivados tiazolidinônicos III e V	49
5.1.6.2	Fragmentação de Massas do derivado tiazolidinônico III	50

5.1.6.3	Fragmentação de Massas do derivado tiazolidinônico V	51
5.1.7	Resultados espectroscópicos de RMN ¹ H dos derivados tiazolidinônicos N-alquilados	52
5.1.7.1	Espectros de RMN ¹ H dos derivados tiazolidinônicos VI e VII.....	53
5.1.7.2	Espectros de Infravermelho dos derivados tiazolidinônicos VI e VII.....	54
5.1.8	Resultados espectroscópicos de Massas dos derivados tiazolidinônicos N-alquilados	55
5.1.8.1	Espectros de Massa dos derivados tiazolidinônicos VI e VII.....	56
5.1.8.2	Fragmentação de Massas do derivado tiazolidinônico VI	57
5.1.8.3	Fragmentação de Massas do derivado tiazolidinônico VII	58
5.2	Análises espectroscópicas da tiazolidina-2,4-diona (I).....	60
5.2.1	Análise espectroscópica de RMN ¹ H da tiazolidina-2,4-diona (I).....	60
5.2.2	Análise espectroscópica de Infravermelho da tiazolidina-2,4-diona (I)...	60
5.2.3	Análise espectroscópicas da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (II).....	60
5.2.3.1	Análise espectroscópica de RMN ¹ H da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (II).....	60
5.2.3.2	Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (II)	61
5.2.4	Análise espectroscópica de RMN ¹ H do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)	61
5.2.4.1	Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III).....	61
5.2.4.2	Análises espectroscópicas de RMN ¹³ C do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III).....	62
5.2.4.3	Análises espectroscópicas de Massa do composto 5-(3-	

	clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)	62
5.2.5	Análise espectroscópica do composto 5-(3-metoxi-4-hidróxi-benzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV)	63
5.2.5.1	Análise espectroscópica de RMN ¹ H do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV)	63
5.2.5.2	Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV).....	64
5.2.6	Análise espectroscópica do composto 5-(2-hidróxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V).....	64
5.2.6.1	Análise espectroscópica de RMN ¹ H do composto 5-(2-hidróxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V)	64
5.2.6.2	Análise espectroscópica de Massa do composto 5-(2-hidróxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V)	65
5.2.7	Análise espectroscópica do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)	66
5.2.7.1	Análise espectroscópica de RMN ¹ H do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)	66
5.2.7.2	Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)	66
5.2.7.3	Análise espectroscópica de Massa do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)	67
5.2.8	Análise espectroscópica do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	67
5.2.8.1	Análise espectroscópica de RMN ¹ H do composto 5-(3-	

	bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	68
5.2.8.2	Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	68
5.2.8.3	Análise espectroscópica de Massa do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	68
5.3	Atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados.....	71
5.3.1	Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração mínima bactericida (CMB)	74
5.4	Atividade citotóxica de derivados tiazolidinônicos	75
5.5	Avaliação de derivados tiazolidinônicos sobre a marcação de hemácias e potencial atividade antioxidante	78
6	CONCLUSÕES	84
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
8	ANEXOS	86
8.1	Material utilizado	86
8.1.1	Reagentes e solventes	86
8.1.2	Equipamentos	87
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Diagrama de síntese dos derivados tiazolidínicos 3, 4, 5-trissubstituídos.....	23
FIGURA 2	Representação esquemática do mecanismo reacional da síntese da tiazolidina-2,4-diona	25
FIGURA 3	Representação esquemática do mecanismo reacional da síntese dos derivados 5-benzilideno substituídos-4-tioxi-tiazolidina-2-ona.....	26
FIGURA 4	Representação esquemática do mecanismo reacional de síntese dos derivados 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxi-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI) e do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxi-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	27
FIGURA 5	Esquema metodológico para determinação da CMI e CMB do composto-teste contendo diferentes concentrações do composto em caldo Müller-Hinton inoculados com microrganismo Teste	36
FIGURA 6	Estrutura química dos compostos sintetizados	42
FIGURA 7	Espectro de RMN ¹ H do 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III)	44
FIGURA 8	Espectro de RMN ¹ H do 5-(3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV).....	45
FIGURA 9	Espectro de RMN ¹ H do 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)	45

FIGURA 10	Espectro de RMN ^{13}C do 5-(2-hidróxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V).....	46
FIGURA 11	Espectro de Infravermelho do 5-(3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV)	47
FIGURA 12	Espectro de Massa do 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)	49
FIGURA 13	Espectro de Massa do 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V)	49
FIGURA 14	Fragmentação do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)	50
FIGURA 15	Fragmentação do composto 5-(2-hidróxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V)	51
FIGURA 16	Espectro de RMN ^1H do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI).....	53
FIGURA 17	Espectro de RMN ^1H do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	53
FIGURA 18	Espectro de Infravermelho do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (VI)	54
FIGURA 19	Espectro de Infravermelho do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (VII)	54
FIGURA 20	Espectro de Massas do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)	56
FIGURA 21	Espectro de Massas do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	56

FIGURA 22	Fragmentação do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)	57
FIGURA 23	Fragmentação do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	58
FIGURA 23 A	Fragmentação do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	59
FIGURA 24	Halos de inibição formados por diferentes compostos para o <i>Staphilococcus aureus</i>	72
FIGURA 25	Halos de inibição formados por diferentes compostos para o <i>Micrococcus luteus</i>	72
FIGURA 26	Halos de inibição formados por diferentes compostos para o <i>Bacillus subtilis</i>	73
FIGURA 27	Gráfico comparativo da atividade antimicrobiana dos compostos testados e dos padrões utilizados	73
FIGURA 28	Determinação da CI_{50} para o composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III) frente a célula HEp-2 a partir da regressão linear, relacionando o percentual de inibição em função da concentração logarítma das concentrações testadas..	76
FIGURA 29	Determinação da CI_{50} para o composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV) frente a célula HEp-2 a partir da regressão linear, relacionando o percentual de inibição em função da concentração logarítma das concentrações testadas	76
FIGURA 30	Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas	

- frações plasma e hemácia em água usando variadas concentrações do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV) 79
- FIGURA 31** Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações insolúveis do plasma e hemácia usando variadas concentrações do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV) 79
- FIGURA 32** Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações solúveis do plasma e hemácia usando variadas concentrações do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV) 79
- FIGURA 33** Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações plasma e hemácia em água usando variadas concentrações do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III) 80
- FIGURA 34** Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações insolúveis do plasma e hemácia em variadas concentrações do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III) 80
- FIGURA 35** Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações solúveis do plasma e hemácia em variadas concentrações do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III) 80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Nomenclatura dos derivados tiazolidínicos sintetizados	24
TABELA 2	Meios de cultura utilizados no experimento	32
TABELA 3	Condições de crescimento dos microrganismos utilizados nos testes de antagonismo para diferentes compostos	34
TABELA 4	Dados e constantes físico-química dos compostos sintetizados ...	43
TABELA 5	Dados de RMN ¹ H (DMSO) (δ ppm) dos compostos tiazolidinônicos de I-V	44
TABELA 6	Dados Espectroscópicos de RMN ¹³ C (δ ppm) da 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona	46
TABELA 7	Dados de Infravermelho (ν cm ⁻¹), KBr (1%) dos derivados tiazolidinônicos	47
TABELA 8	Dados de Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiazolidinônico 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)	48
TABELA 9	Dados Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiazolidinônico 5-(2-hidróxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V)	48
TABELA 10	Dados de RMN ¹ H do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI) e do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)	52
TABELA 11	Dados Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiazolidinônico 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-	

tiiazolidina-2-ona (VI)	55
TABELA 12 Dados Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiiazolidinônico 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)- tiiazolidina-2-ona (VII)	55
TABELA 13 Atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados frente a diferentes microrganismos-teste (diâmetro de halo de inibição em mm)	68
TABELA 14 Concentração bacteriostática (CMI) e bactericida (CMB) dos compostos IV e V, frente a diferentes microrganismos ($\mu\text{g/mL}$)	74
TABELA 15 Atividade citotóxica dos derivados tiiazolidinônicos frente às linhagens HEP-2 e NCI-H292	75
TABELA 16 Médias e desvios padrões dos grupos controle DMSO e solução salina	78

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	- deslocamento químico de hidrogênio
cm^{-1}	- frequência de absorção
s	- singlete
d	- duplete
dd	- duplo dublete
t	- triplete
q	- deslocamento químico de hidrogênio
m	- multiplete
J	- constante de acoplamento
γ	- comprimento de onda
m/e	- massa/carga
M^+	- íon molecular
DMSO	- dimetil sulfóxido
DMSO_{d6}	- dimetil sulfóxido deuterado
CDCl_3	- clorofórmio deuterado
MHz	- megahertz
Hz	- hertz
Ppm	- ppm
Rf	- razão de frente
IV	- infravermelho
RMN^1H	- ressonância magnética nuclear de prótons
RMN^{13}C	- ressonância magnética nuclear de carbono ¹³

S _N 2	- substituição nucleofílica bimolecular
THF	- tetrahidrofurano
DAUFPE	- Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
CMI	- Concentração Mínima Inibitória
CMB	- Concentração Mínima Bactericida
MH	- Mueller Hinton
BDA	- batata-dextrose-ágar
μg	- micrograma
μL	- microlitro
nm	- nanômetro
Rpm	- rotação por minuto

RESUMO

Tiazolidinas são substâncias heterocíclicas com anel de 5 membros, contendo nitrogênio e enxofre como heteroátomos apresentando interessantes propriedades biológicas. Neste trabalho foram introduzidos substituintes em diferentes posições do anel heterocíclico por reações de alquilação, tionação e condensação e avaliado as atividades, antimicrobiana, citotóxica e o potencial radiofármaco. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em disco, frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes, levedura e fungo filamentosos e determinada a CMI e CMB. A atividade citotóxica foi avaliada em linhagens celulares HEp-2, e NCI-H292. A marcação de hemácias com Tc-99m averiguou o potencial radiofármaco e antioxidante, utilizado sangue heparinizado de ratos adultos Wistar in vitro, incubado com SnCl₂ e Tc-99m. Plasma e células foram isolados e precipitados com ácido tricloroacético. As estruturas químicas foram determinadas por métodos espectroscópicos de Infravermelho RMN¹H, RMN¹³C e Massas. Os compostos apresentaram atividade antimicrobiana sendo dois com amplo espectro de ação, para bactérias Gram-positivas. Aqueles com halos maiores apresentaram baixa concentração bactericida para *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*. Os resultados de citotoxicidade mais significativos foram para a linhagem de células HEp-2 sendo determinada a CI₅₀. Os compostos não interferiram no processo de ligação do Tc-99m com os elementos do sangue revelando o potencial antioxidante.

ABSTRACT

Thiazolidine are heterocyclic compounds with a ring of 5 members, including nitrogen and sulfur in the structure. They illustrate interesting biological properties. This study shows the effect of substitutions, introduced by alkylation and condensation reactions on different positions of the heterocyclic ring. Diffusion method in plate, against Gram-positive and Gram-negative bacteria, resistant alcohol-acid, yeast, and filamentous fungi were used to evaluate the antimicrobial properties and to determine CMI and CMB. Citotoxic activity was tested on two cellular lineages, cells HEP-2 (Cancer Epidermoid of Larynx) and cells NCI-H292, derivatives of Mucoepidermoid carcinoma. Demarcation of red blood cells with Tc-99m to investigate the radiopharmacology and antioxidant potential *in vitro* was verified in two compounds of heparinized blood drawn from adult Wistar rats incubated with SnCl₂. The plasma and cells were isolated and precipitated with 5% trichloroacetic acid. The chemical structures were determined using spectroscopic methods RMN¹H, RMNC¹³ Infrared and Mass. The antimicrobial tests presented inhibition halos in all the compounds. Two of them demonstrated a wide spectrum for the action of Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis*. The citotoxic activity indicated the most significant results from the lineage HEP-2 cells, analyzed through CI₅₀ for the best positive results. In the red cells demarcation showed that the compound did not interfere in the connection process of ^{99m}Tc to the blood elements, suggesting the antioxidant potential of these compounds.

1 INTRODUÇÃO

O estudo de compostos bioativos atualmente, não é apenas um processo empírico surgido da necessidade de extrair ou sintetizar substâncias que produzam efeitos terapêuticos para suprimir uma doença, mas a obtenção de compostos que fazem parte de um estudo racional e planejado, integrando um programa de síntese e atividade.

O surgimento de diferentes formas de manifestações infecciosas, a necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes no combate a essas doenças e principalmente a resistência microbiana tem desencadeado um avanço das pesquisas de compostos bioativos. O resultado tem sido a produção de novos fármacos com largo espectro de atividade biológica.

Na pesquisa de novos fármacos, a síntese de análogos estruturais de substâncias bioativas busca o aumento da atividade biológica e a diminuição de efeitos colaterais.

A literatura descreve as tiazolidinas como substâncias que vêm sendo sintetizadas e avaliadas durante as últimas décadas, por apresentarem interessantes propriedades biológicas. Núcleos do tipo tiazolidínicos tem despertado interesse em centros de pesquisas de vários países, devido principalmente, a sua capacidade de atuar em diversos alvos biológicos.

Neste estudo foram introduzidos diversos substituintes em diferentes posições do anel heterocíclico levando a estudos comparados das propriedades antimicrobianas, citotóxica e antioxidante, desses compostos, buscando uma melhor atividade biológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Sintetizar e testar a atividade biológica de novos compostos heterocíclicos derivados da tiazolidina-2,4-diona potencialmente ativos de interesse biológico, com enfoque para a 4-tioxo-tiazolidina-2-ona.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar novos compostos derivados do núcleo tiazolidínico com substituições nas posições 3, 4 e 5 do anel heterocíclico.
- Determinar suas estruturas químicas através de métodos espectroscópicos de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e ou de carbono treze e espectrometria de massas.
- Testar a atividade antimicrobiana dos derivados tiazolidinônicos obtidos, frente a representantes dos grupos de microrganismos.
- Determinar a CMI (concentração mínima inibitória) e a CMB (concentração mínima bactericida) para o composto com melhor ação antimicrobiana.
- Verificar a atividade citotóxica de derivados tiazolidinônicos, frente a células NCI-H292 (obtidas de carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e HEp-2 (derivadas de carcinoma epidermóide de laringe).
- Avaliar o potencial radiofármaco e antioxidante de derivados tiazolidinônicos sintetizados através da marcação de hemácias com Tc^{99m}.

3 REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com os objetivos desse trabalho a revisão da literatura abordará a parte química e biológica, abrangendo antimicrobianos, citotoxicidade (células neoplásicas), radiofármaco que incluem marcação de hemácias com tecnécio e antioxidantes.

Entre os métodos de produção de fármacos na terapêutica, o isosterismo e bioisosterismo têm sido largamente utilizado pelos químicos medicinais para síntese de moléculas potencialmente bioativas (GRAHAN, 1988).

Os compostos isósteros possuem o mesmo número de elétrons com a mesma disposição. A substituição do enxofre tiazolidínico pelo NH ou pelo oxigênio, permite fazer previsão sobre a reatividade química e eventuais efeitos biológicos destes núcleos (LANGMUIR, 1909). No entanto, análogos isósteros podem ter um tipo de atividade totalmente diferente de seu protótipo (THOMAS, 2003).

O bioisosterismo é utilizado para modificar a estrutura dos compostos bioativos, mediante a substituição de grupos químicos em uma cadeia, conferindo a estes compostos atividades biológicas semelhantes a do composto matriz. (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982). Este processo baseia-se na necessidade de se potencializar determinada atividade biológica, simultaneamente reduzindo os efeitos colaterais indesejáveis.

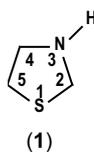
Foi verificado também através da literatura onde e quem está trabalhando com os derivados tiazolidínicos, para ver em que campos de pesquisas estão sendo aplicados esses conhecimentos e quais tecnologias estão sendo desenvolvidas.

A semelhança estrutural dos derivados tiazolidinônicos usando compostos que possuem atividades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana já descrita na literatura, fundamentou e direcionou esse trabalho para esses campos de pesquisa.

3.1 Tiazolidinas

As tiazolidinas (**1**) são compostos formados por anel heterocíclico pentagonal, possuindo átomos de enxofre e nitrogênio nas posições 1 e 3 do anel.

De acordo com Langmuir (1909), as tiazolidinas são isósteros das imidazolidinas e das oxazolidinas, possuindo assim propriedades semelhantes.



De acordo com Lo e Shropshire (1957), desde o século XIX, vários pesquisadores vêm se preocupando em introduzir diversas substituições no anel heterocíclico e testando suas atividades biológicas.

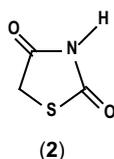
Em meados do século XX, ficou evidenciada a busca por novos métodos de síntese que viabilizassem a produção dos compostos tiazolidínicos substituídos (CRAWHALL e ELLIOTT, 1952). Em 1961 Brown relatou a atividade antimicrobiana de vários derivados tiazolidínicos substituídos.

Entre as atividades biológicas apresentadas por derivados tiazolidínicos, Singh (1981), destacou ação: antiinflamatória, anticonvulsivante, antitumoral, tuberculostática, bactericida, fungicida e inseticida. John *et al.* (1981), relataram a

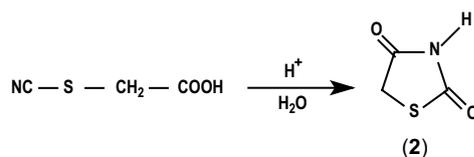
atividade antimicrobiana descrevendo seu uso no combate a fungos fitopatogênicos, destacando sua importância agrícola quando substituído na posição 5 por ArCH.

3.1.1 Preparação da tiazolidina-2,4-diona

Entre os derivados tiazolidínicos encontram-se as tiazolidinonas com destaque para a tiazolidina-2,4-diona (**2**), que apresenta vários sítios reativos facilitando substituições no anel heterocíclico. Através de reações de condensação e alquilação, pesquisadores buscam ampliar sua atividade biológica e farmacológica (HU *et al.* 2001).

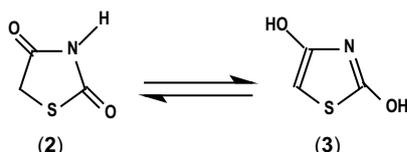


Tunçbilek e Altanlar (1999), em seus estudos observaram atividade agonista antimicrobiana para *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Hu *et al.* (2001), descreveram a partir de suas pesquisas com a tiazolidina-2,4-diona, que a condensação na posição 5 do anel heterocíclico com aldeídos, produziram um potente e seletivo agonista. Os estudos das tiazolidinas foram iniciados por volta de 1865 quando Heintz sintetizou a tiazolidina-2,4-diona (**2**) a partir da isomerização do ácido tiocianoacético em meio aquoso.

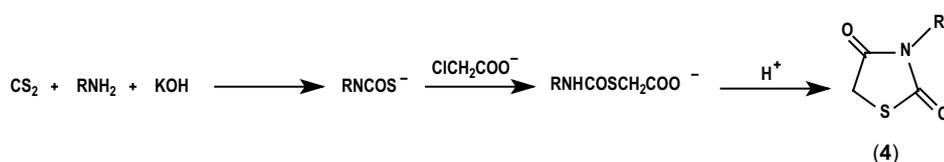


SILVA, I. M.

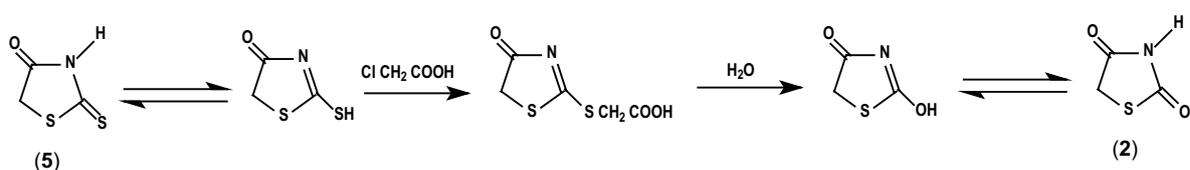
Liberman e Lange (1881), estudaram sua estrutura e Hantzsch e Webers (1887), observaram que a tiazolidina-2,4-diona (**2**) reagia sob a forma de 2,4-dihidroxitiazol (**3**) propondo um tautomerismo com a tiazolidina-2,4-diona (**2**) conforme relata BROWN (1961).



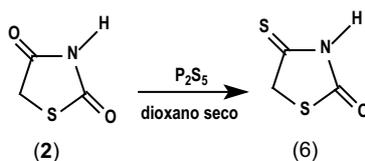
A tiazolidina-2,4-diona foi sintetizada reagindo dissulfeto de carbono com aminas primárias em meio básico, formando um alquil carbonato, que reagindo com o cloroacetato em meio ácido, produziu a 3-substituída-tiazolidina-2,4-diona (**4**) (KALLENBERG apud BROWN, 1961).



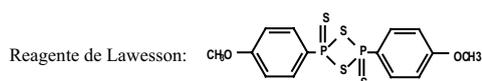
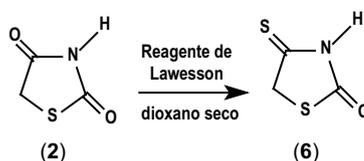
Croxall *et al.* (1953), realizando estudos com a rodanina (**5**) conseguiram convertê-la em tiazolidina-2,4-diona (**2**) pelo tratamento com ácido cloroacético e água sob refluxo, por 40 horas, processando da seguinte maneira:



A 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**6**) foi obtida a partir da tiazolidina-2,4-diona (**2**) em presença de pentassulfeto de fósforo (P_2S_5) e dioxano seco em atmosfera inerte (GRISHCHUK *et al.* 1967).



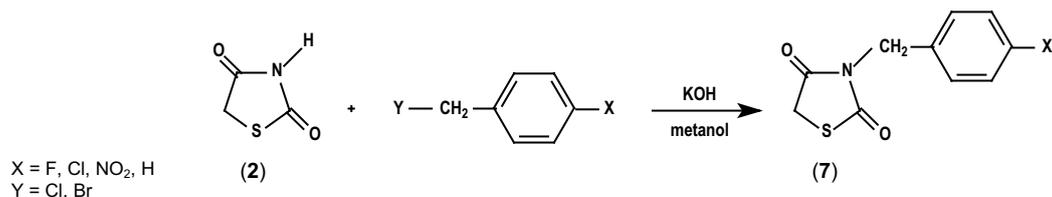
A tiazolidina-2,4-diona (**2**) em dioxano seco e Reagente de Lawesson (2,4-bis-(4-metoxifenil)-1,3-ditiadifosfatano-2,4-dissulfeto), também promove a tionação na posição 4 do anel produzindo a 4-tioxi-tiazolidina-2-ona (**6**) (ANDRADE, *et al.*, 2002).



3.1.2 Reações de alquilação

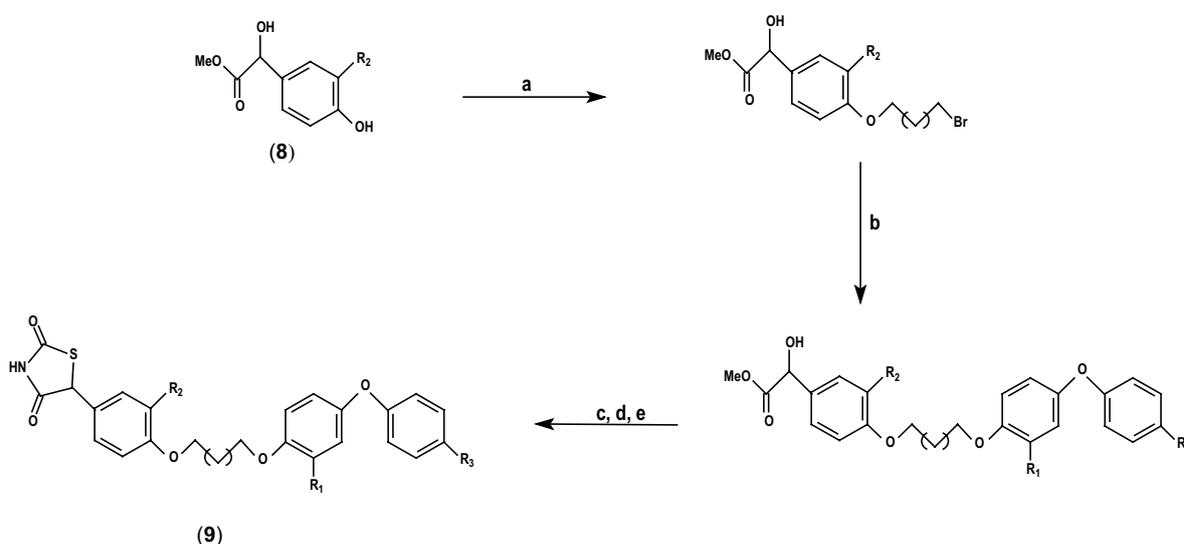
3.1.2.1 Reações de alquilação da tiazolidina-2,4-diona

Amorim *et al.* (1992), obtiveram derivados N-alkilados de tiazolidina-2,4-diona a partir da tiazolidina-2,4-diona (**2**) utilizando cloretos e brometos de fluorbenzila, clorobenzila, benzila e nitrobenzila (**7**) em meio básico.

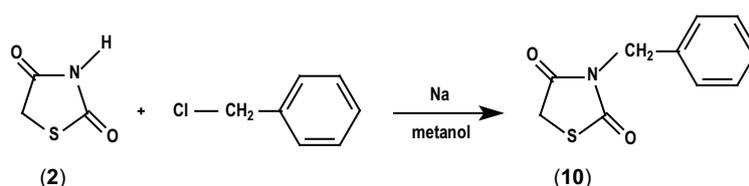


SILVA, I. M.

Koyama *et al.* (2003), sintetizaram uma série de novos 5-*aryl*-tiazolidina-2,4-diona (**9**), com potente e seletiva atividade agonista PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) utilizando vários reagentes (a) Br(CH $_2$) $_{3-4}$ Br, Cs $_2$ CO $_3$, DMF(dimetilformamida); (b) Cs $_2$ CO $_3$, DMF, fenoxifenol, ou 2-isobutil-4- fenoxifenol, 71-82%; (c) SOCl $_2$, 85-90%; (d) tiouréia, NaOAc, EtOH; (e) HCl $_{aq}$, EtOH, 75-83%, com ácido carboxílicos substituídos (**8**).

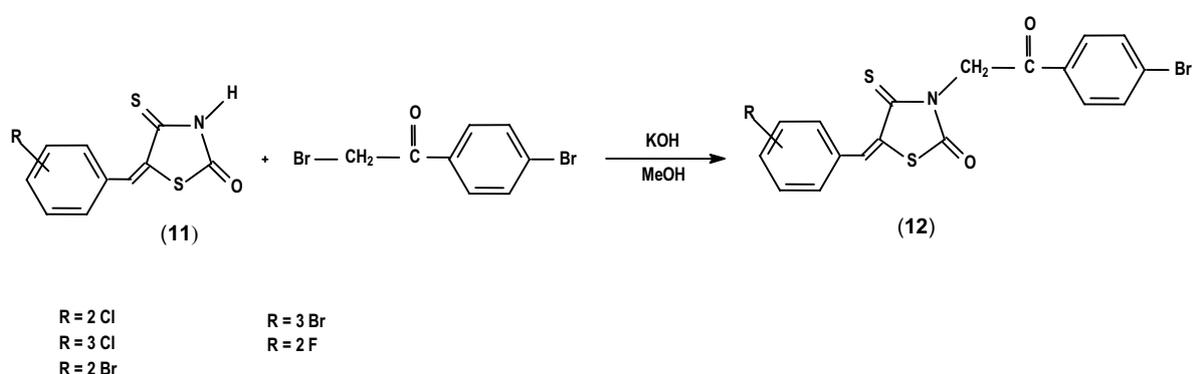


Bradsher *et al.* (1956), também obtiveram tiazolidina-2,4-diona N alquilada (**10**) através da reação da tiazolidina-2,4-diona (**2**) com cloreto de benzila, substituindo a base por sódio metálico.



3.1.2.2 Reações de alquilação da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona

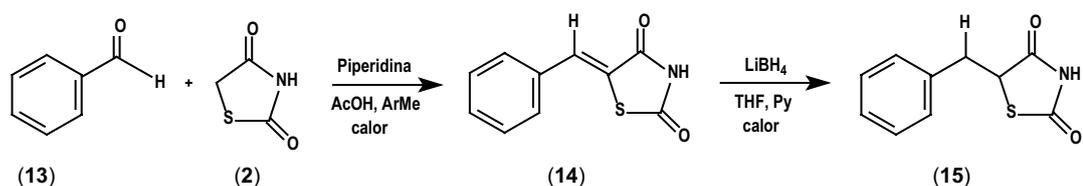
Derivados da 4-tioxi-5-arylideno-tiazolidina-2-ona (**11**) foram alquilados por brometo de bromofenacila em presença de hidróxido de potássio e metanol obtendo 3-(4-bromofenacil)-4-tioxi-5-arylideno-tiazolidina-2-ona (**12**) (ALBUQUERQUE *et al.* 1997, CHANTEGREL *et al.* 2002).



3.1.3 Reações de condensação

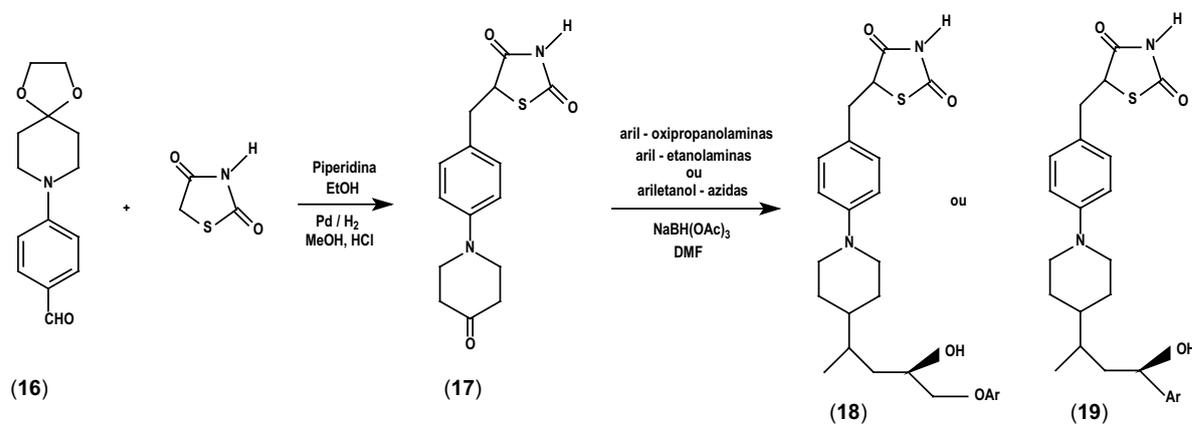
3.1.3.1 Reação de condensação da tiazolidina-2,4-diona

Giles *et al.* (2000), utilizaram uma rota de síntese destacando a importância de uma redução regioespecífica. A síntese foi iniciada com a reação de benzaldeído (**13**) com a tiazolidina-2,4-diona (**2**), ácido acético e piperidina obtendo o composto (**14**), que reduzido produziu o 5-benzil-tiazolidina-2,4-diona (**15**).

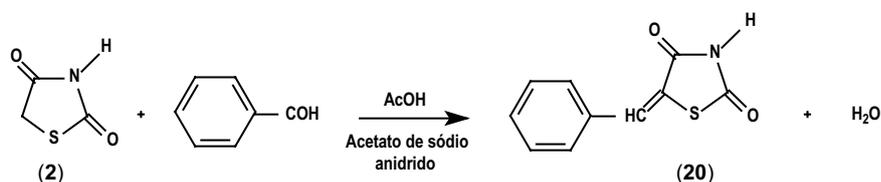


SILVA, I. M.

Hu *et al.* (2001), com o objetivo de verificar o efeito antagonista da β_3 -Ar (receptor adrenérgico β_3), promoveram a síntese de derivados da tiazolidina-2,4-diona com vários aminoálcoois. A síntese procedeu com a condensação proposta por Knoevenagel entre aldeído (16) e tiazolidina-2,4-diona (2) seguido de hidrogenação catalítica e hidrólise ácida obtendo o composto (17) que reduzido e aminado rendeu o produto final (18) ou (19).



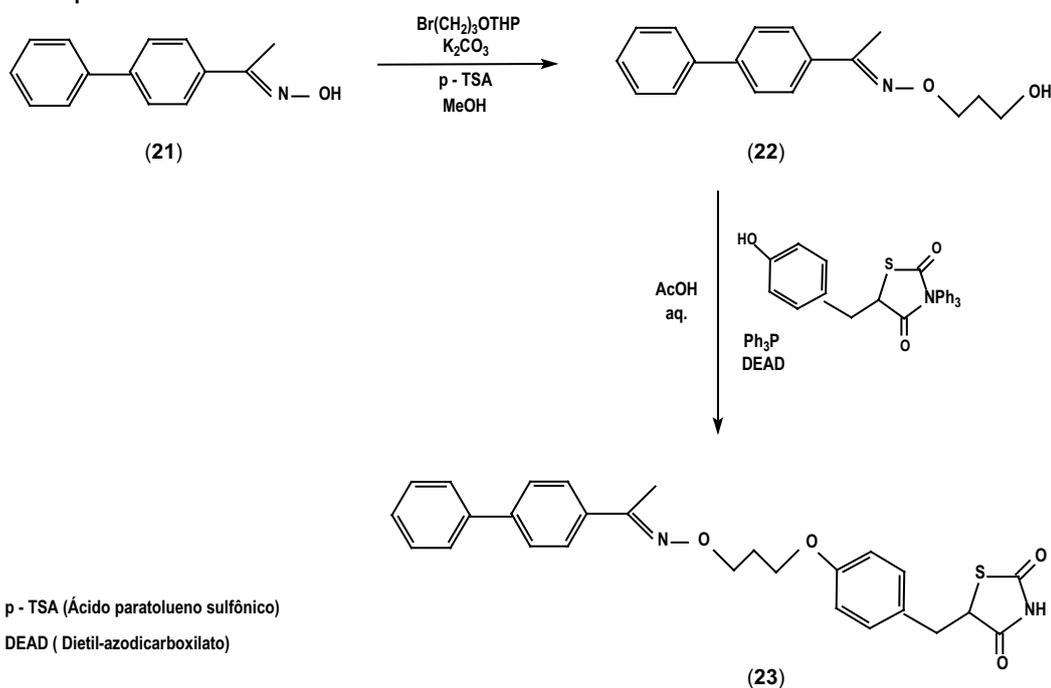
Batanov e Komaritsa (1965), promoveram a condensação da tiazolidina-2,4-diona (2) com benzaldeído na posição 5 em ácido acético glacial na presença de acetato de sódio anidro obtendo a 5-benzilideno-tiazolidina-2,4-diona (20).



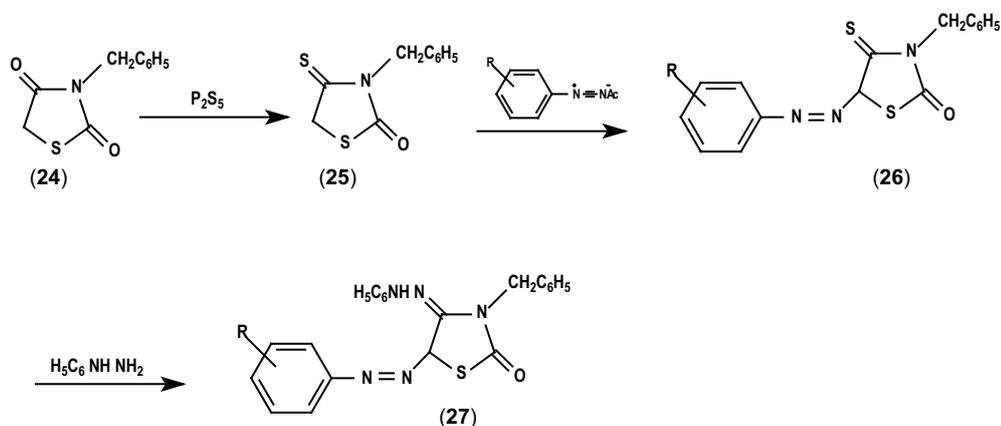
Yanagisawa *et al.* (2000), prepararam o iminopropox pela alquilação da oxima (21) seguido da remoção do grupo THP (Tetrahidropiranyl) produzindo o álcool (22) que foi convertido pelo mesmo procedimento para a oxima-5-benzil-tiazolidina-2,4-

SILVA, I. M.

diona (**23**). Esta substância teve sua atividade antiglicêmica testada apresentando resultado positivo.

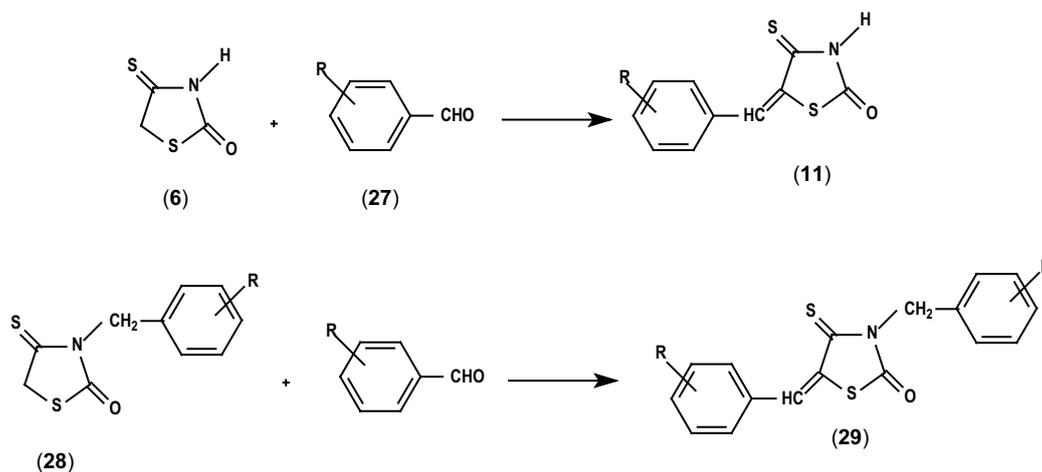


Labouta *et al.* (1987), reagiu o 3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (**24**) com o pentassulfeto de fósforo obtendo o intermediário 3-benzil-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**25**) que a seguir reagiu com acetato de arildiazônio em dioxano produzindo o 5- arilazo-3-benzil-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**26**). Este intermediário foi condensado com o fenilhidrazina em ácido clorídrico formando o 5-(4-sulfamoilfenilazo)-3-benziltiazolidina-2-ona-4-fenilhidrazona (**27**).



3.1.3.2 Reações de condensação da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona

Chantegrel *et al.* (2002), conseguiram a condensação da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona de duas maneiras, uma com o 4-tioxi-tiazolidina-2-ona não substituída na posição 5 (**6**), e outra já substituída por um grupo benzil (**29**).



3.2 Atividade biológica de derivados tiazolidínicos

Trabalhos descritos na literatura evidenciam as propriedades biológicas dos derivados tiazolidínicos e tiazolidinônicos. A tiazolidina e seus derivados apresentam atividades biológicas tais como: bactericida, antiinflamatória, anticonvulsivante, pesticida, tuberculostática entre outras (BROWN & BRADSHER, 1961; SINGH *et al.*, 1981).

Vários derivados tiazolidínicos têm sido resultados da substituição de radicais em diferentes posições do anel, conferindo-lhe importantes propriedades biológicas, entre estas destacam-se as farmacológicas como: cardiotônica (ANDREANI *et al.* 1993), analgésica (LIMA *et al.* 1994), anticonvulsivante (EL-FEKY, 1993). A atividade antimicrobiana também foi evidenciada por diversos autores, (RIDA *et al.* 1986; EID *et al.* 1994; KOCABALKANLI *et al.* 2001; KÜÇÜKGÜZEL *et al.* 2002).

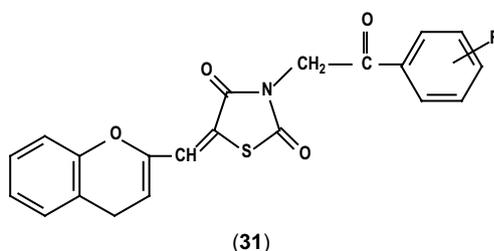
3.2.1 Atividade antimicrobiana de derivados tiazolidínicos

Os fármacos que possuem atividade antimicrobiana interferem no crescimento dos microrganismos, muitas vezes dentro do organismo infectado. Porém o ideal é que a droga combata o microrganismo nocivo sem causar danos ao hospedeiro (TORTORA, *et al.* 2000).

Os antimicrobianos têm salvado vidas e aliviado o sofrimento de milhões de pessoas ajudando a manter sob controle muitas doenças infecciosas. Estes fármacos também contribuíram nos últimos anos para aumentar a expectativa de vida (WHO, 2002).

O avanço nas pesquisas de compostos bioativos tem resultado na produção de novos fármacos com largo espectro de atividades biológicas. A síntese desses compostos surgiu da necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes, no combate a novas doenças e principalmente a resistência microbiana.

O composto 3-(fenacil)-5-[4-(4*H*-4-oxo-1-benzopirano-2-il)-benzilideno]-tiazolidina-2,4-diona (**31**) foi sintetizado por Tunçbilek e Altanlar (1999), e testado em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e levedura apresentando atividade positiva.



Outros derivados da thiazolidina-2,4-diona foram sintetizados e testados *in vitro*, contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Todos os compostos testados apresentaram moderada ação apenas para *S. aureus*. Nenhum foi ativo para *E. coli*. A atividade antifúngica contra *Candida albicans* foi comparável a do Fluconazol (ibid, 1999).

Muitos derivados tiazolidínicos foram sintetizados e testados por Bonde & Gaikwad (2004), contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *Mycobacterium tuberculosis*, obtendo resultados satisfatórios para a maior parte dos produtos testados.

3.3 Célula neoplásica

Considerando o objetivo deste trabalho foi destacado também o estudo de células neoplásica através da ação citotóxica, marcação com tecnécio e potencial antioxidante dos compostos testados.

De acordo com Oliveira & Alves (2002), o câncer é basicamente uma doença de células, caracterizada por um desvio do mecanismo de controle que dirige a proliferação e a diferenciação celular. Um grande número de produtos citotóxicos mais potentes atuam em fases específicas do ciclo celular e, conseqüentemente, só exercem ação contra células que se encontram em processo de divisão. Portanto as neoplasias malignas mais susceptíveis ao tratamento quimioterápico são as que possuem um alto percentual de células em divisão (Ibid, 2002).

Estudos recentes revelaram que apesar da troglitazona (um derivado da tiazolidina) ser um agente antidiabético oral efetivo, apresenta efeito apoptótico (morte celular programada) em hepatoma (o mais freqüente câncer originado no fígado) humano. O uso clínico de troglitazona tem sido restringido nos EUA e Japão por causa da indução severa de lesão hepática (YAMAMOTO *et al.* 2001).

O grande desafio é buscar novas drogas e novas formas de utilização que minimizem os efeitos tóxicos, tornando-os menos agressivos, especialmente para o coração, pulmão, rins e sistema nervoso.

3.3.1 Mecanismo de resistência

Um dos fatores que explica a resistência dos tumores sólidos à quimioterapia é a dificuldade do fármaco em alcançar células em hipóxia (células encontradas entre

o centro do tumor e a sua região periférica). Por se encontrar numa região de baixa oxigenação possuem um ciclo celular prolongado e permanecem indefinidamente em repouso, dificultando a ação dos fármacos que atuam principalmente em células de rápida divisão celular (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

A resistência a citotóxicos é resultado de um fenômeno multifatorial, porém, ao ocorrer isoladamente a resistência às múltiplas drogas (MDR) torna-se um fenômeno específico. “A resistência clínica pode surgir por exposição a concentrações inadequadas da droga. Quando células tornam-se resistentes a drogas naturais, freqüentemente também ocorre resistência a outras drogas” (MELO, 2001).

Entre as alterações nas células resistentes a agentes alquilantes estão: a permeação diminuída de drogas transportadas ativamente, a produção aumentada de substâncias nucleófilas, capazes de competir com o DNA-alvo pela alquilação, atividade aumentada das enzimas de reparação do DNA e a elevação das taxas de metabolismo das formas ativadas de ciclofosfamida para seus metabólitos inativos ceto e carbóxi pela enzima aldeído desidrogenase (GOODMAN *et al.*, 2003),.

3.4 Marcação de hemácias com tecnécio

O tecnécio pode atingir o estado de oxidação 7^+ , caso perca os elétrons da camada de valência, 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 seu estado de oxidação para o estado de oxidação mais baixo. O agente redutor utilizado para esse fim é o cloreto estanoso (BRAGA *et al.* 2000).

Este agente redutor nos sistemas biológicos, tem sido referido em algumas investigações por apresentar efeitos nocivos (tóxicos) (Bernardo-Filho *et al.* 1996). Desta forma os pesquisadores buscam 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. Isto acontece 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 empregados em diagnóstico, fornecem informações sobre o tipo ou extensão da doença. O radioisótopo ideal para o uso de diagnóstico deveria possuir algumas qualidades: emitir partículas gama (pois estas têm um grande poder de penetração, e podem ser eliminadas 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 ainda exista atividade após o diagnóstico.

O tecnécio-99m (Tc-99m) 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 porque o átomo ^{99m}Tc emite uma partícula gama e se torna o átomo Tc-99 estável (REVISTA ELETRÔNICA DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DA UFSC, 2004)



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).

Em medicina nuclear o tecnécio é largamente utilizado devido as suas características que justificam seu emprego, tem meia-vida de 6 horas, marcação de diferentes moléculas, estruturas celulares e energia corpuscular desprezível. A fonte de tecnécio-99m é o molibidênio-99, que é produzido pelo bombardeamento do molibdênio-98 por nêutrons no reator nuclear. Muitos laboratórios de radiologia têm um pequeno gerador de radioisótopo contendo molibidênio-99, que decai para formar o tecnécio-99m, o qual pode ser produzido em hospitais através do decaimento β de ^{99}Mo (COSTA & SOUSA, 1999).



3.4.1 Potencial antioxidante

O antioxidante é um potente redutor que inibe o processo oxidativo nas células, ou seja, protege os sistemas biológicos contra os efeitos danosos da ação dos radicais livres, formados como subprodutos resultantes de processos bioquímicos (RANG, *et al.* 2003).

A principal função do sistema de defesa antioxidante do organismo consiste em inibir ou reduzir os danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio. Pode-se classificar os antioxidantes de acordo com sua origem e ou localização em dietéticos e intracelulares ou extracelulares: os que impedem a formação de radicais livres (prevenção), os que impedem os ataque dos radicais livres à célula (varredores) e os que favorecem a remoção de danos do DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (de reparo) (KOURY & DONANGELO, 2003).

O estresse oxidativo é provocado pelo desequilíbrio entre a liberação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidantes. A liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio é componente do mecanismo intermediário de várias doenças como: isquemia, inflamação, trauma, doenças degenerativas e morte celular por ruptura da membrana (lipoperoxidação) e inativação enzimática (Ibid, 2003).

Vollhardt & Schore (2004), definiram radicais livres como espécie química que possui elétron desemparelhado, que pode ser formado pela cisão homolítica de uma ligação, pela perda de um elétron ou pela radiação ionizante.

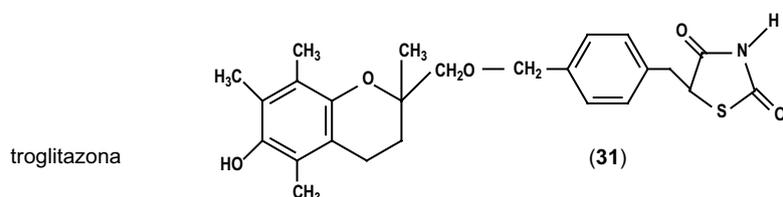
Os estudos de radicais livres foram motivados pela descoberta de sua ação sobre o envelhecimento, agindo nas células alterando suas membranas e dando-lhes aspecto de velhas. Normalmente essas células seriam eliminadas pelo sistema imunológico, mas a quantidade de células alteradas é aumentada pelo excesso de radicais livres, promovendo o envelhecimento cronológico do organismo. Essas células podem ter seu código genético alterado, multiplicado-se desordenadamente, propiciando o aparecimento de tumores, doenças pulmonares, cataratas entre outras (RADICAIS LIVRES, 2004).

3.4.1.1 Ação antioxidante de derivados tiazolidínicos

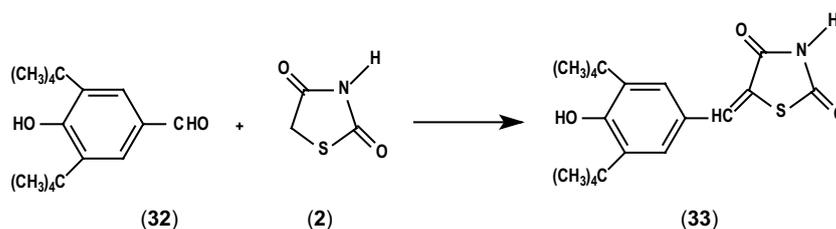
Essa ação tem sido pesquisada e os resultados tem apontado para inibição de proteína de baixa densidade (LDL) pela troglitazona (**31**), 5-[4-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromona-2-il-metóxi)-benzil]-tiazolidina-2,4-diona (NOGUCHI *et al.* 1996). A troglitazona foi selecionada após muitos testes de derivados fenólicos com anel

SILVA, I. M.

tiazolidínico para selecionar uma droga que possuísse dupla atividade; como hipoglicêmica e antioxidante (FUJIWARA *et al.* 1988; YOSCHIDA *et al.* 1989).



Jeong *et al.* (2004), sintetizam por condensação do tipo Knoevenagel a 5-(3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (**33**) a partir do 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeído (**32**) com a tiazolidina-2,4-diona (**2**) e observando sua atividade antioxidante.



Várias pesquisas sobre a ação antioxidante de compostos nas células podem ser feitas utilizando a 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 β da hemoglobina (BRAGA *et al.* 2000).

Através dessa revisão foi observada a importância de sintetizar os derivados tiazolidínicos, utilizando grupos reagentes e rotas mais favoráveis, tanto visando a síntese quanto a atividade biológica e farmacológica desses compostos. Foram destacadas as atividades dos derivados tiazolidinônicos como antimicrobiano citotóxicos, antioxidantes e biológico de modo geral.

4 METODOLOGIA

4.1 Estudo Químico

A síntese dos derivados tiazolidinônicos descritos neste trabalho ocorreu pela substituição de hidrogênios do anel heterocíclico através da alquilação com cloretos de benzila, tionação com P_2S_5 e condensação com aldeídos aromáticos nas posições 3, 4 e 5 respectivamente (**Figura 1**).

As reações foram iniciadas com a condensação da tiouréia e o ácido monocloroacético, em meio aquoso originando a tiazolidina-2,4-diona (**I**). Em seguida ocorreu a reação de tionação da tiazolidina-2,4-diona (**I**) na posição 4, em presença de dioxano seco e pentassulfeto de fósforo formando a 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**II**).

Na etapa seguinte houve a condensação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona (**II**) com benzaldeídos substituídos, na posição 5 do anel heterocíclico em meio ácido e acetato de sódio.

A condensação com benzaldeídos produziu três produtos (**III-V**) substituídos na posição 5 e dois produtos (**VI-VII**) produzidos por alquilação e condensação nas posições 3 e 5 do anel respectivamente.

4.2 Diagrama de síntese

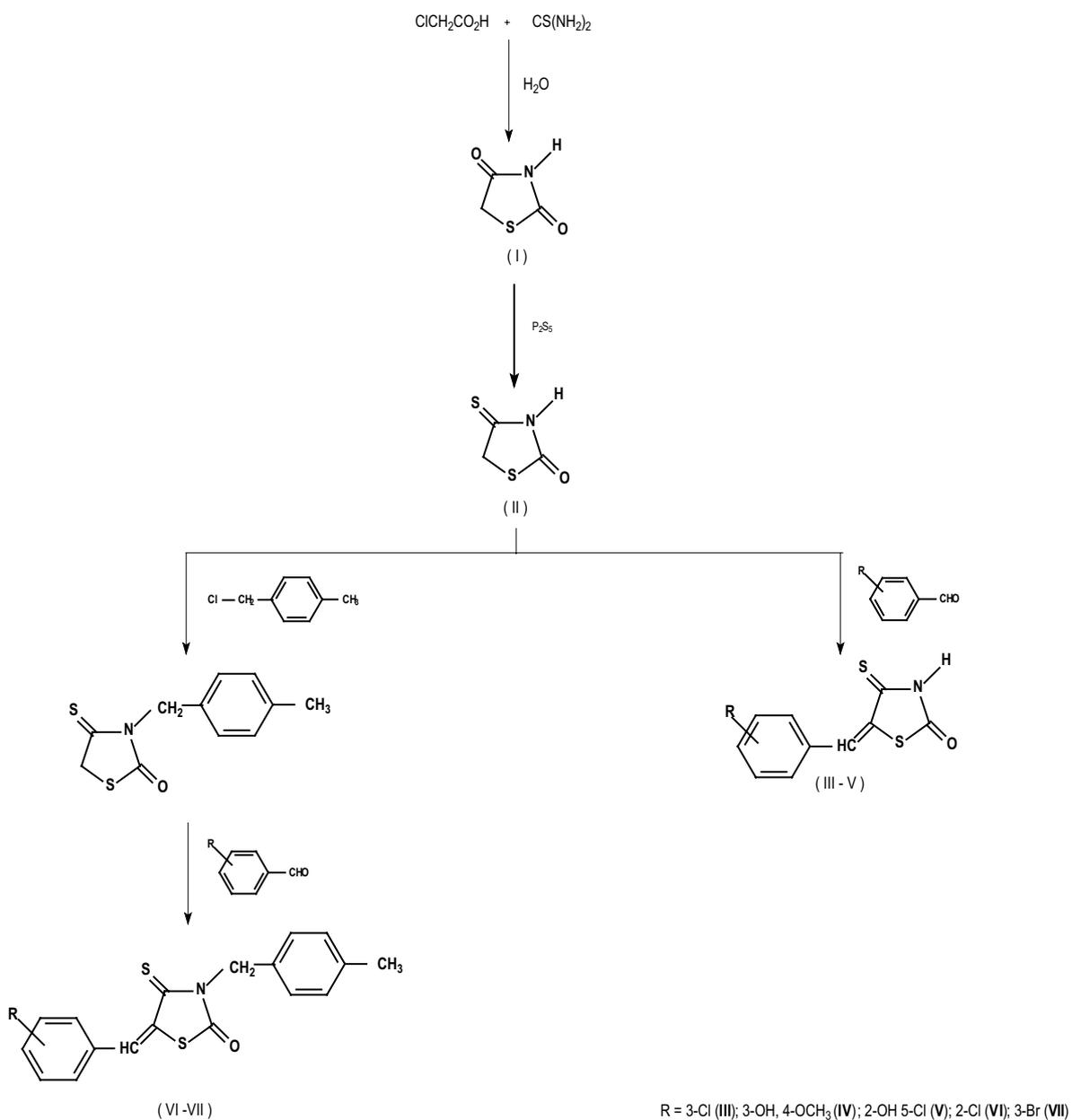


Figura 1- Diagrama de síntese dos derivados tiazolidínicos 3, 4, 5-trissubstituídos

4.2.1 Nomenclatura dos derivados tiazolidínicos sintetizados

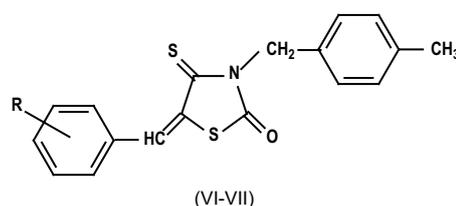
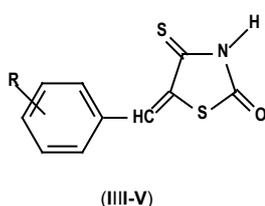
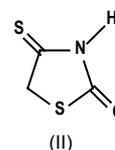
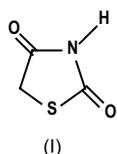


Tabela 1: Nomenclatura dos derivados tiazolidínicos sintetizados

Composto	Sigla	R	Nomenclatura
I	Ju-32	-	Tiazolidina-2,4-diona
II	Ju-33	-	4-tioxi-tiazolidina-2-ona
III	HRJ-20	3-Cl	5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona
IV	HRJ-26	3-OCH ₃ 4-OH	5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona
V	HRJ-37	2-OH 5-Cl	5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona
VI	Ju-96	2-Cl	5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxi-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona
VII	Ju-99	3-Br	5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxi-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2-ona

4.2.2 Mecanismo reacional da tiazolidina-2,4-diona

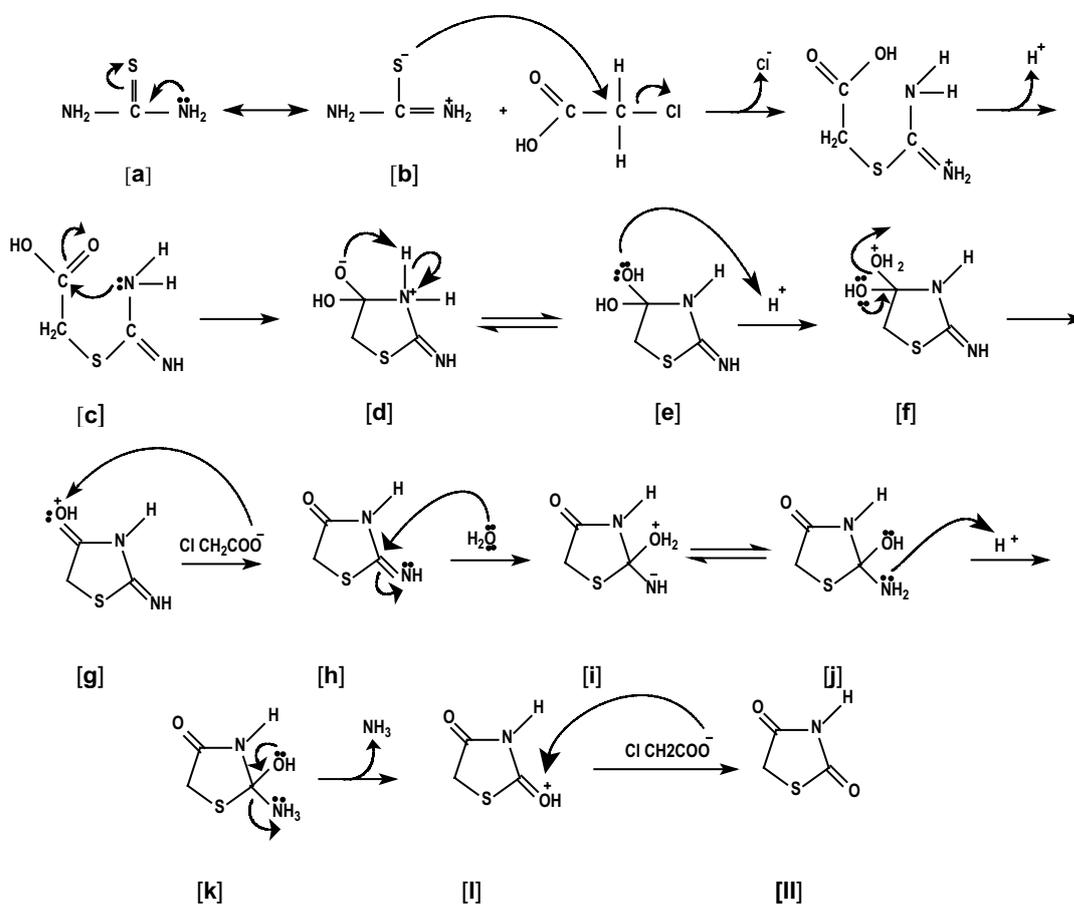


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo reacional da síntese da tiazolidina-2,4-diona

Observando a ressonância da tiouréia (**a**) temos o ataque do átomo de enxofre da estrutura (**b**) ao átomo de carbono α do ácido monocloroacético, liberando o ânion cloreto, pelo mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$. Na etapa seguinte, ocorre perda de um próton do intermediário formado, levando a estrutura (**c**), que sofre ataque intramolecular pelos pares de elétrons livres do nitrogênio à carboxila, formando a ciclização do anel (**d**), que entra em equilíbrio, transferindo o próton do nitrogênio positivo, para o oxigênio negativo, favorecendo a estrutura (**e**). Esta é protonada e perde água,

levando à estrutura (g) que perde um próton formando a carbonila estrutura (h) que é atacada por uma molécula de água formando (i), esta entra em equilíbrio com (j) que é protonada e perde uma molécula de amônia, produzindo o intermediário (k) que é atacado pela base $\text{ClCH}_2\text{COO}^-$ para formar a tiazolidina-2,4-diona (II).

4.2.3 Mecanismo de derivados 5-benzilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-ona

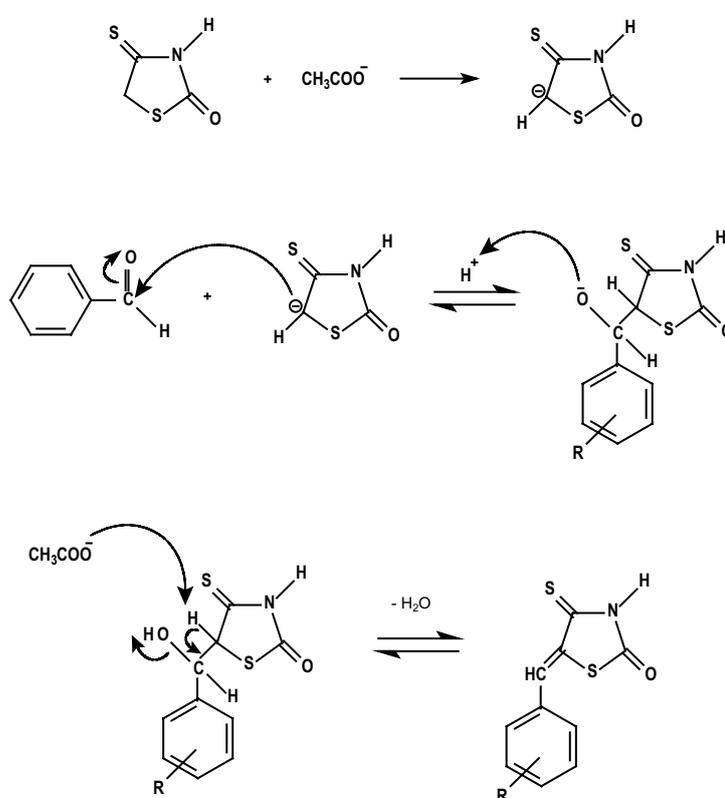


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo reacional da síntese dos derivados 5-benzilideno substituídos-4-tioxo-tiazolidina-2-ona

O átomo de hidrogênio do carbono da posição 5 é atacado pela base para formação do carbânion, pela perda de um próton. O carbânion originado ataca a carbonila do benzaldeído, formando o intermediário que captura um próton do meio reacional e em seguida desidrata formando o produto desejado.

4.2.4 Mecanismo de síntese dos derivados 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona e do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona

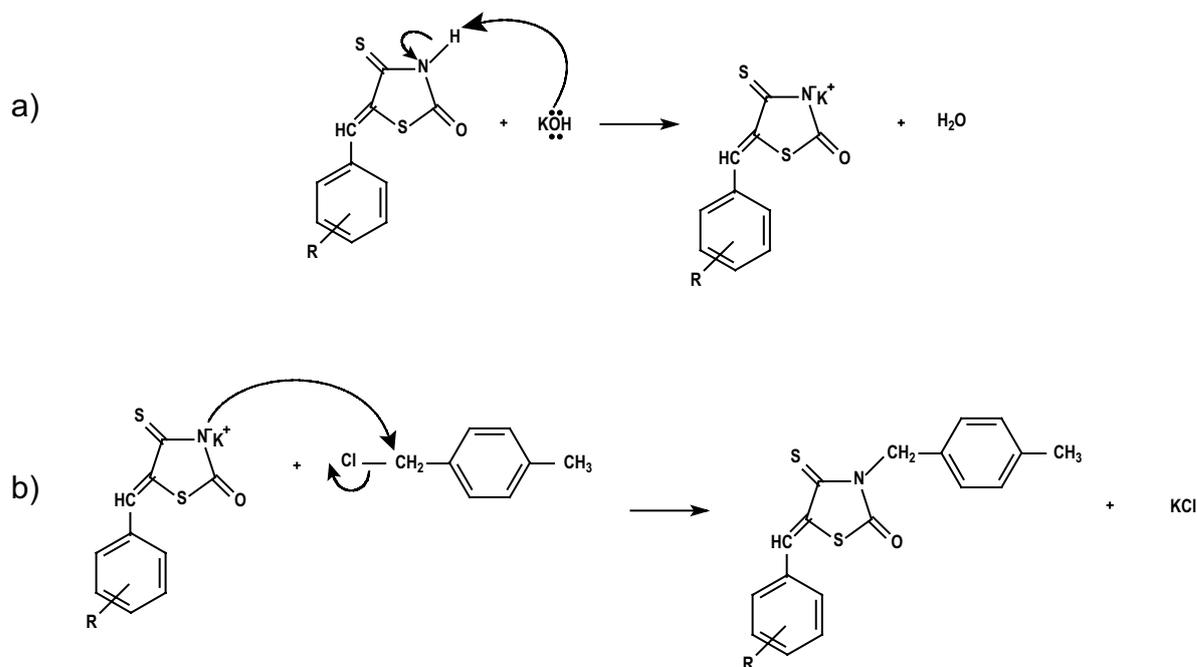
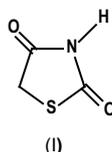


Figura 4: Representação esquemática do mecanismo reacional de síntese dos derivados 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI) e do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

O próton ligado ao nitrogênio da posição 3, do composto 5-benzilideno-4-tioxo-tiazolidina-2-ona tem caráter levemente ácido, pois o nitrogênio está hibridizado em sp^3 , conferindo ao hidrogênio o caráter parcialmente positivo. Dessa maneira facilita a remoção do hidrogênio pela base. O intermediário formado ataca o carbono α do grupo benzil, através de mecanismo SN_2 , formando o produto final.

4.3 Síntese dos derivados tiazolidínicos

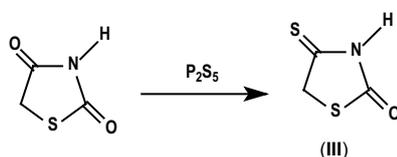
4.3.1 Obtenção da tiazolidina-2,4-diona



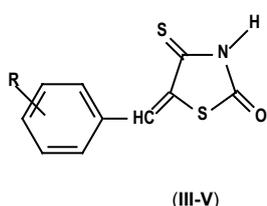
A tiazolidina-2,4-diona (I) foi obtida de acordo com o método proposto por Liberman *et al.* (1948), por apresentar melhores rendimentos. Quantidades equimolares de tiouréia 5.0g (6.57×10^{-2} mol) e ácido monocloroacético 6.17g (6.57×10^{-2} mol) foram misturadas em meio aquoso, sob refluxo, promovendo a ciclização da molécula.

4.3.2 Obtenção da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona

Foram adicionados 5g ($4,27 \times 10^{-2}$ mol) da tiazolidina-2,4-diona (I) em 35 ml de dioxano seco com sódio, seguido da adição de 9,5g ($4,27 \times 10^{-2}$ mol) de P_2S_5 . A mistura foi aquecida a 90°C sob agitação magnética, durante 11:30h. O solvente foi reduzido à metade e o produto cristalizado a frio, filtrado e lavado com água.



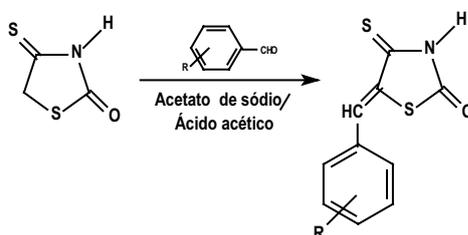
4.3.3 Obtenção dos derivados 5-benzilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-ona



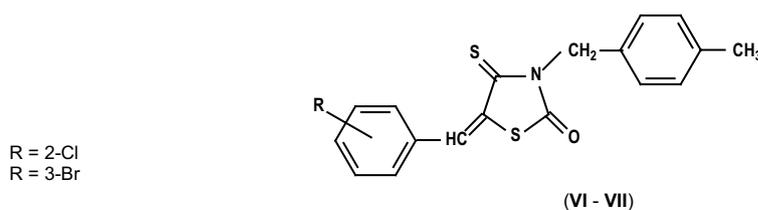
R = 3-Cl
R = 3-OCH₃, 4-OH
R = 2-OH, 5-Cl

SILVA, I. M.

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,300g ($2,25 \times 10^{-3}$ mol) de 4-tioxi-tiazolidina-2-ona (II) e 7ml de ácido acético glacial sob agitação e 0,184g ($2,25 \times 10^{-3}$ mol) de acetato de sódio e em seguida colocado $2,25 \times 10^{-3}$ mol do benzaldeído. A mistura foi aquecida a 80°C sob agitação magnética. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até seu término. Os compostos 5-benzilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-ona substituídos (III-V) foram purificados por cristalização e coluna cromatográfica.



4.3.4 Obtenção dos derivados 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxi-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI) e do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxi-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)



Quantidades equimolares de $3,3 \times 10^{-3}$ mol de 5-benzilideno-4-tioxi-tiazolidina-2-ona substituídos foram dissolvidos em 15 mL de metanol e adicionado gota a gota $3,3 \times 10^{-3}$ mol de uma solução de KOH em metanol. A mistura foi agitada a frio durante 1 hora para formação do ânion. Após esse período foi acrescentado $3,3 \times 10^{-3}$ mol de cloreto de 4-metilbenzila, e levado ao banho de óleo a 55°C durante 2

SILVA, I. M.

horas. As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada e cristalizada em metanol.

4.4 Atividade Biológica

Nessa pesquisa foi utilizado o teste de difusão em disco e posterior determinação da CMI (concentração mínima inibitória) e CMB (concentração mínima bactericida) para determinação da atividade antimicrobiana. Os compostos foram testados com células de carcinoma de mucoepiderme de pulmão (NCI-H292) e epiderme de laringe (HEp-2) para verificar a atividade citotóxica. Também foi feita a marcação de hemácias utilizando o Tc-99m para posterior verificação do potencial radiofármaco e antioxidante desses compostos.

4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos derivados tiazolidinônicos

A atividade antimicrobiana foi avaliada *in vitro*, pelo método convencional de difusão em disco de papel preconizado por Bauer *et al.* (1966). Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.2 Procedimento Experimental

A análise qualitativa dos derivados tiazolidinônicos sintetizados e testados para esta atividade foi realizada envolvendo a medida da inibição do crescimento de microrganismos representativos de diferentes grupos.

4.4.3 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados na avaliação antimicrobiana dos compostos sintetizados foram: Sabouraud-ágar, Müller Hinton ágar, Glicose-extrato de levedura-ágar (**tabela2**).

Para preparação dos inóculos, manutenção dos microrganismos, teste bacteriostático (CMI) e teste Bactericida (CMB), foram utilizados os meios sólidos e líquidos.

4.4.4 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura foram solubilizados em água destilada estéril, e tiveram os pHs ajustados, de acordo com as normas preconizadas pelos fabricantes. Os meios obtidos foram distribuídos em Erlenmayer e esterilizados em autoclave por 15 minutos à temperatura de 121 °C.

Tabela 2 – Meios de cultura utilizados no experimento

Meio de cultura	Utilização no experimento
Müller-Hinton ágar (MH)	Realização de experimentos com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (exceto <i>Enterococcus faecalis</i>) e <i>Mycobacterium smegmatis</i> .
Glicose extrato de levedura agar (GL)	Manutenção e realização de experimentos com <i>Mycobacterium smegmatis</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> .
Sabouraud agar	Manutenção e realização de experimentos com <i>Candida albicans</i> e <i>Monilia sitophila</i> .

4.4.4.1 Microrganismos-teste e padronização dos inóculos

Os testes foram realizados frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes, uma levedura e um fungo filamentoso, pertencentes à Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

- Bactérias Gram-positivas

Staphylococcus aureus DAUFPE 01

Bacillus subtilis DAUFPE 16

Micrococcus luteus DAUFPE 06

Enterococcus faecalis DAUFPE 138

- Bactérias Gram-negativas

Pseudomonas aeruginosa DAUFPE 39

Escherichia coli DAUFPE 224

Serratia marcescens DAUFPE 398

- Bactérias álcool-ácido resistentes

Mycobacterium smegmatis DAUFPE 71

- Levedura

Candida albicans DAUFPE 1007

- Fungo filamentoso

Monilia sitophila DAUFPE 2083

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes dos microrganismos-teste, utilizando suspensões padronizadas pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da

escala de McFarland, em solução fisiológica (MURRAY *et al.*, 1995), correspondente a aproximadamente 10^7 UFC (Unidade Formadora de Colônia) para bactérias e 10^6 UFC para fungos e leveduras.

4.4.5 Testes de atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em disco de papel no meio gelosado Müller Hinton (Oxoid). As suspensões padronizadas dos microrganismos-teste foram semeadas em placas de Petri contendo 10 mL do meio, com auxílio de alça de Drigalsky (100 μ l/placa). Foram utilizados discos de papel (Whatman nº 2) com 6mm de diâmetro, embebidos em solução a 15.000 μ g /mL das substâncias em estudo, ficando cada disco, com uma concentração de 300 μ g. Após a colocação dos discos, as placas foram deixadas na geladeira (≈ 10 °C), durante 20 minutos, para difusão da substância no meio, antes de serem incubados à temperatura adequada ao crescimento do microrganismo-teste (**tabela3**).

Tabela 3: Condições de crescimento dos microrganismos utilizados nos testes de antagonismo para diferentes compostos.

Microrganismo	Meio de cultura	Temp. (°C)	Tempo (h)
Staphylococcus aureus	Müller Hinton ágar	35	24
<i>Micrococcus luteus</i>	Müller Hinton ágar	35	24
<i>Bacillus subtilis</i>	Müller Hinton ágar	35	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Müller 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

SILVA, I. M.

<i>Escherichia coli</i>	Müller Hinton ágar	35	24
<i>Serratia marcescens</i>	Müller Hinton ágar	27	24
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud ágar	30	48
<i>Manilia sitophila</i>	Sabouraud ágar	30	48

As placas de *Serratia marcescens*, cuja temperatura ótima é em torno de 27°C, foram deixadas à temperatura ambiente, durante 24 horas.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mm, pela média aritmética do diâmetro do halo de inibição formado ao redor dos discos nas 3 repetições. O teste controle foi realizado com discos embebidos em DMSO.

Como padrão foram utilizados cetoconazol (Neoquímica), para fungos e leveduras e cefalexina (Eurofarma), para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, nas mesmas concentrações das substâncias testadas.

4.4.6 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória (CMI) corresponde a menor concentração do produto expressa em µg/mL, em presença da qual não ocorre crescimento microbiano visível a olho nu.

A determinação da CMI (concentração bacteriostática), foi feita por inoculação de uma série de tubos contendo um determinado volume de Caldo Mueller Hinton e diferentes concentrações do antibiótico a ser testado, com um volume conhecido da suspensão do microrganismo-teste. A CMI foi considerada a concentração do composto do primeiro tubo onde não ocorreu crescimento visível (turvação do meio) após 24 horas de incubação.

SILVA, I. M.

A partir de uma solução-mãe da substância, de concentração igual a 1280 $\mu\text{g/mL}$, foram realizadas diluições sucessivas nas concentrações de 128 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$ em caldo Muller Hinton, a fim de obter uma série de: 128 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,250 $\mu\text{g/mL}$ e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1). Foi utilizado um tubo testemunho (T), contendo apenas o meio de cultura, para comparação do crescimento microbiano (figura 6).

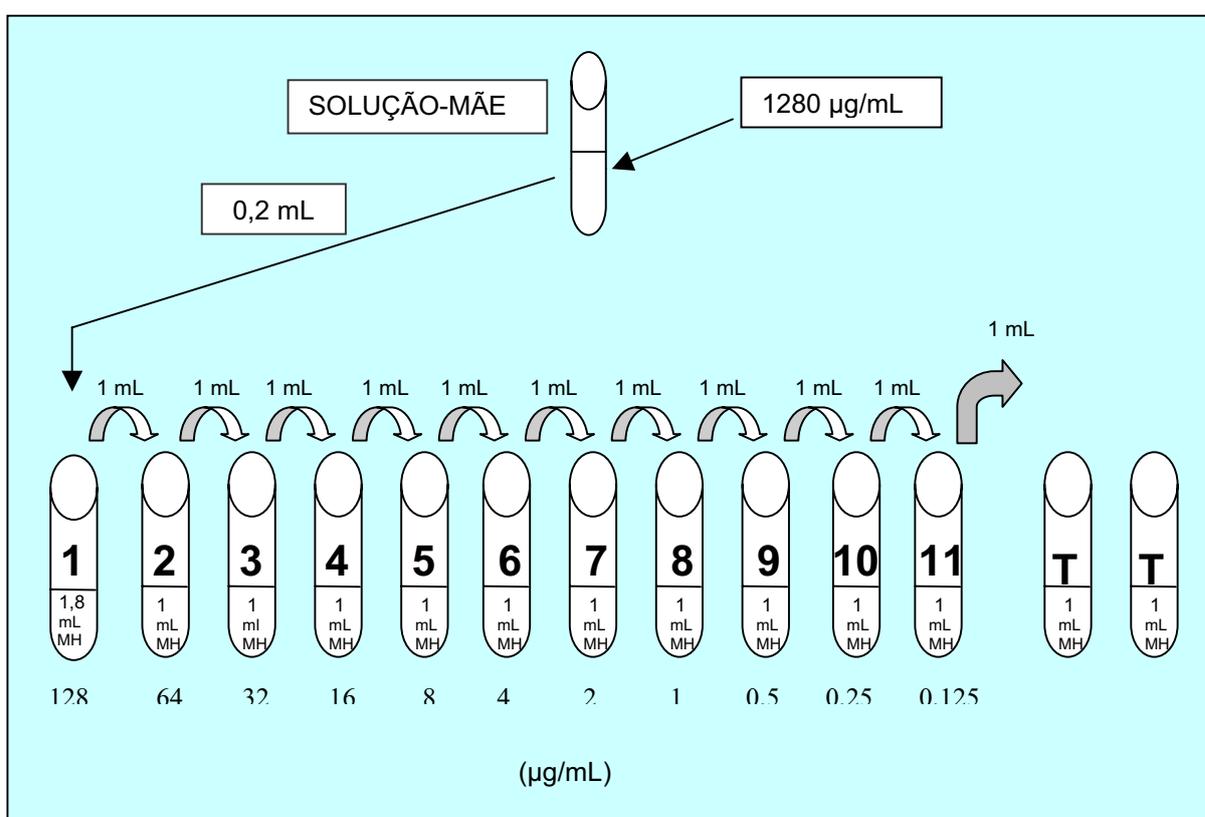


Figura 5: Esquema metodológico para determinação da CMI do composto-teste contendo diferentes concentrações do composto em caldo Muller-Hinton inoculados com o microrganismo-teste

4.5 Avaliação da atividade citotóxica de novos derivados tiazolidínicos

4.5.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas células NCI-H292 (obtidas de carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e HEP-2 (derivadas de carcinoma epidermóide de laringe), 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 200mM.

4.5.2 Viabilidade celular

Para determinar a viabilidade celular, foi utilizado o corante vital Azul Tripano (Merck) 0,4% em PBS (solução tampão de fosfato padrão), 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 hemocítmetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizadas.

4.5.3 Determinação da atividade citotóxica

Para determinação da citotoxicidade uma 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 (225µL 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 foram adicionadas (23 µl/poço) as substâncias testes e as placas foram reincubadas a 37°C (COSTA *et al.* 2004).

O método do MTT brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983), é baseado 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 72h de contato das células com o produto teste, foi adicionado a cada poço, 25µL de MTT a uma concentração de 5mg/mL em PBS. As placas foram deixadas por duas horas em estufa a 37°C. Ao final desse período o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT foi aspirado 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 e a CI₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular) a leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas do tipo Multiskan a 540nm. A densidade óptica (DO) média dos poços testes foi comparada com a (DO) média dos poços controle.

4.6 Avaliação de derivados tiazolidinônicos sobre a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com tecnécio-99m

Com a finalidade de investigar o efeito dos compostos sintetizados em elementos sanguíneos, foram realizados a marcação com os derivados (III) 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona e (IV) 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona, utilizando modelo *in vitro*. O tecnécio e o agente redutor SnCl_2 (cloreto estanoso) integram um dos métodos mais comuns de marcação em medicina nuclear.

O sangue heparinizado de ratos Wistar adultos foi dividido em alíquotas (0,5 mL), sendo incubadas com NaCl (0,9%), com o DMSO como solvente e com os produtos testados nas variadas concentrações.

O primeiro tubo foi o controle (C_1) com solução salina a 0,9%, contendo apenas solução salina e o sangue. O segundo tubo foi o controle (C_2) com sangue e o DMSO que foi o solvente previamente testado com células sanguíneas e diluído a 2% com água, para não destruí-las durante o experimento. Os demais tubos continham o sangue e diferentes concentrações do compostos $2\mu\text{g/mL}$ (100%); $1\mu\text{g/mL}$ (50%); $0,5\mu\text{g/mL}$ (25%); $0,25\mu\text{g/mL}$ (12,5%) e $0,125\mu\text{g/mL}$ (6,25%), nos quais foram adicionados 0,5 ml de SnCl_2 ($1,2\mu\text{g/mL}$). Os tubos foram deixados à temperatura ambiente ($28^\circ\text{C} \pm 2$).

Após uma hora de incubação foi adicionado 0,1 mL de Tc-99m na forma de pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4\text{Na}$), mantendo as mesmas condições por 10 minutos. Para obtenção da fração solúvel e insolúvel das células (FSC) e (FIC) do plasma (FSP) e (FIP) foi utilizado o ácido tricloroacético (TCA a 5%) seguido de

SILVA, I. M.

centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm. A fim de obter o percentual de radioatividade foi procedida a contagem em contador gama (DPC Gamgyt Cr).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Químico

Os resultados apresentados estão descritos na seguinte ordem: estrutura química (**figura 6**), dados físico-químicos (**tabela 4**) e resultados espectroscópicos de RMN ^1H (**tabelas 5 e 10**) e (**figuras 7- 9 e 16-17**), RMN ^{13}C (**tabela 6**) e (**figura 10**), IV (infravermelho) (**tabela 7**) e (**figuras 11, 18 e 19**) e massa (**tabelas 8, 9, 11 e 12**) e (**figuras 12-15 e 20-23**). Em alguns casos não foi possível a verificação completa dos dados em decorrência de problemas de ordem técnica.

Os espectros de absorção de RMN ^1H foram obtidos em espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear protônica UNITY plus-300 MHz-VARIAN, utilizando o tetrametil-silano (TMS), como composto de referência interna. O solvente utilizado foi o dimetil-sulfóxido deuterado ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$) para todos os compostos.

Os deslocamentos químicos dos prótons (δ) dos derivados listados nas tabelas estão expressos em ppm (parte por milhão). A multiplicidade dos sinais estão representadas por s (singlete), d (dublete), dd (duplo dublete), t (triplete), q (quadriplete) e m (multiplete) e as constantes de acoplamentos (J) estão expressas em Hz (Hertz).

Sinais na região 3 e 4 ppm revelaram a absorção de água em alguns compostos. Prótons residuais do $\text{DMSO}_{\text{d}6}$ também foram observados na região entre 2 e 3 ppm, já os picos de absorção observados na região entre 1 e 2 ppm, foram devido a provável impureza do solvente.

5.1.1 Estrutura química dos derivados tiazolidinônicos sintetizados

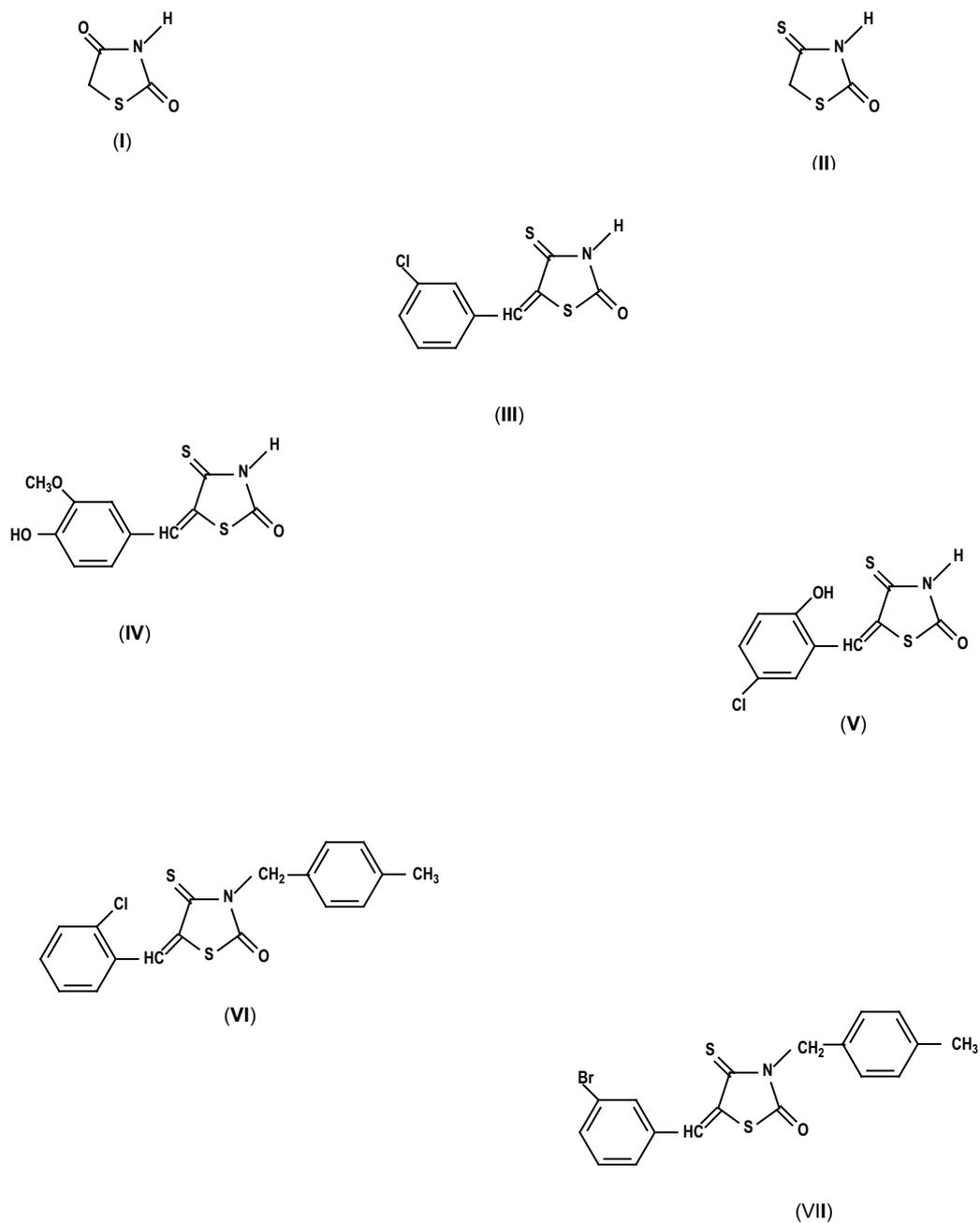


Figura 6: Estrutura química dos compostos sintetizados

5.1.2 Dados físico-químicos dos derivados tiazolidínicos sintetizados

Tabela 4: Dados e constantes físico-químicos dos compostos sintetizados

Composto	Fórmula	PM	Rdt.(%)	PF. (°C)	Rf	Eluente
I	C ₃ H ₃ O ₂ NS	117	78	118-120°	0,48	CHCl ₃ /MeOH (0,9:0,1)
II	C ₃ H ₃ ONS ₂	133	79	127-129°	0,49	CHCl ₃ /EtOH (0,98:0,02)
III	C ₁₀ H ₆ ONS ₂ Cl	255,5	61	*165,5-167°	0,46	CHCl ₃ /EtOH (0,96:0,04)
IV	C ₁₁ H ₉ O ₃ NS ₂	281	35	206°	0,44	CHCl ₃ /EtOH (0,96:0,04)
V	C ₁₀ H ₆ O ₂ NS ₂ Cl	271,5	53	211°	0,61	CHCl ₃ /MeOH (0,98:0,02)
VI	C ₁₈ H ₁₄ S ₂ NOCl	359,5	20	180-181°	0,51	CHCl ₃ /MeOH (0,97:0,03)
VII	C ₁₈ H ₁₄ OS ₂ NBr	404	45	149-150°	0,49	CH ₂ Cl ₂ /Hex. (0,5:0,5)

* Composto sintetizado anteriormente por ALBUQUERQUE *et al.*, 1997.

SILVA, I. M.

5.1.3 Resultados espectroscópicos de RMN¹H da tiazolidinadiona I, da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona e seus derivados 5-substituídos

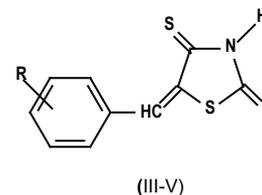
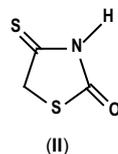
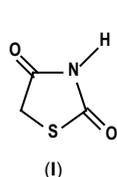


Tabela 5: Dados de RMN¹H dos compostos I-V

Composto	Substituinte R	CH ₃	CH ₂	CH	NH	OH	Prótons aromáticos benzilideno	
I	-	-	4,11 (s, 2H)	-	12,00 (s, 1H)	-		
II	-	-	4,60 (s, 2H);	-	13,54 (s, 1H)	-		
III	3-Cl	-	-	8,04 (s, 1H)	13,01 (s, 1H)	-	7,73 (s, 1H); 7,57 (m, 3H)	
IV	3-OCH ₃ 4-OH	3,83 (s, 3H)	-	8,05 (s, 1H)	13,69 (s, 1H)	10,22 (s, 1H)	7,24 (s, 1H); 7,18 (d, 1H); 6,94 (d, 1H);	J = 8,40 Hz; J = 8,40 Hz
V	2-OH 5-Cl	-	-	8,30 (s, 1H)	13,86 (s, 1H)	10,99 (s, 1H)	7,34 (d, 1H); 7,37 (d, 1H); 7,40 (d, 1H);	J = 2,70 Hz; J = 2,70 Hz; J = 2,70 Hz;

Solvente: DMSO

Deslocamento: (δ ppm)

5.1.3.1 Espectros de RMN¹H dos derivados tiazolidinônicos III-V

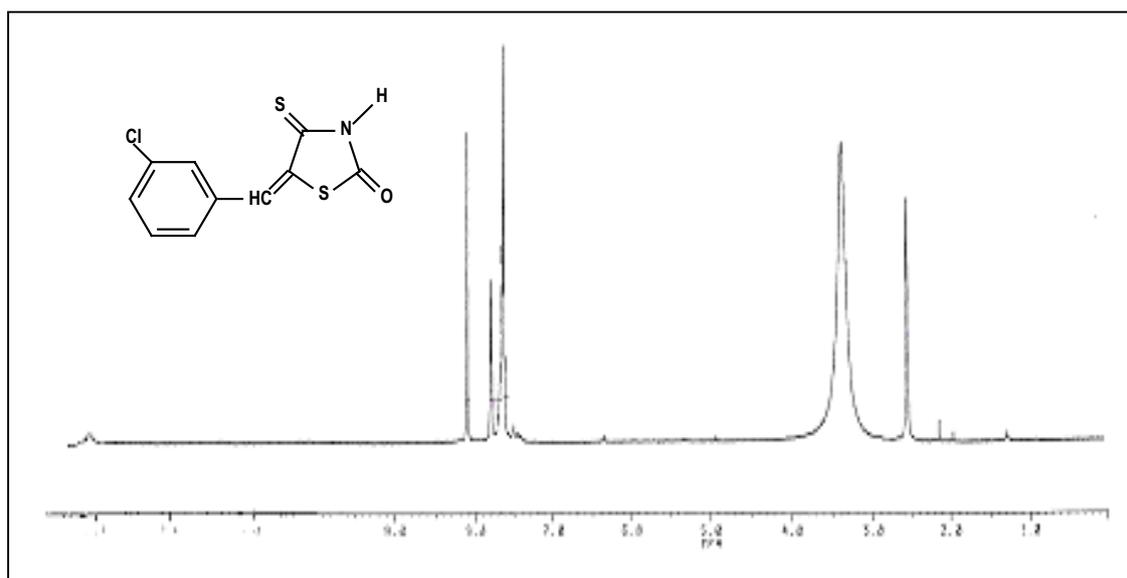
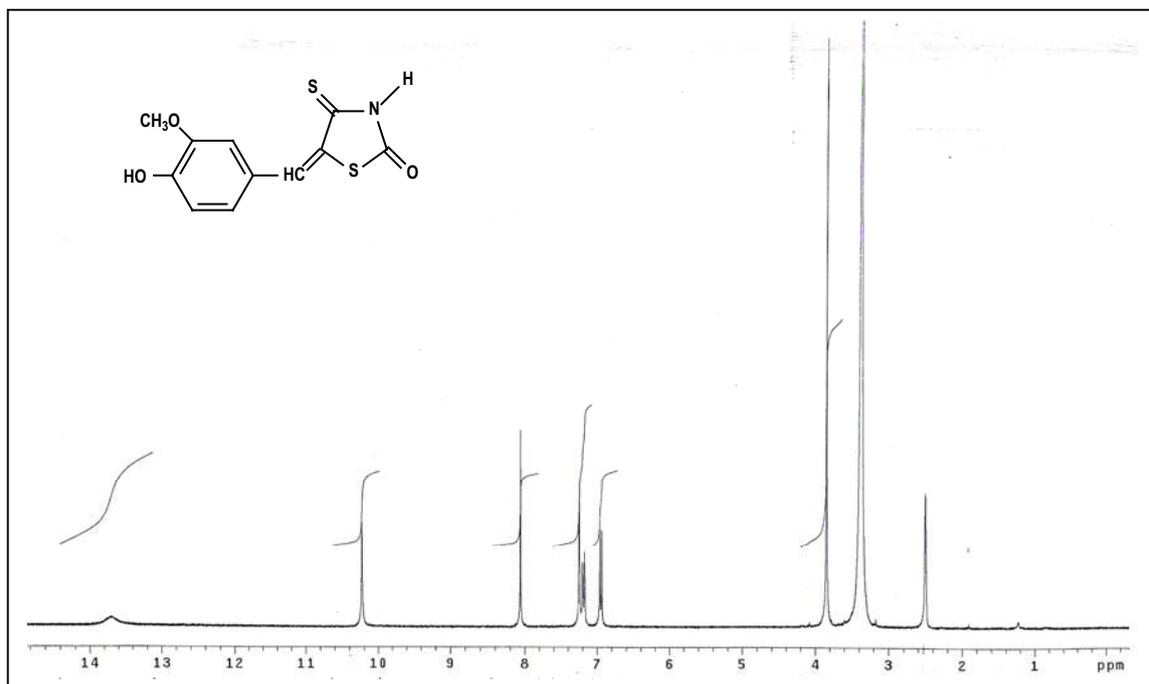
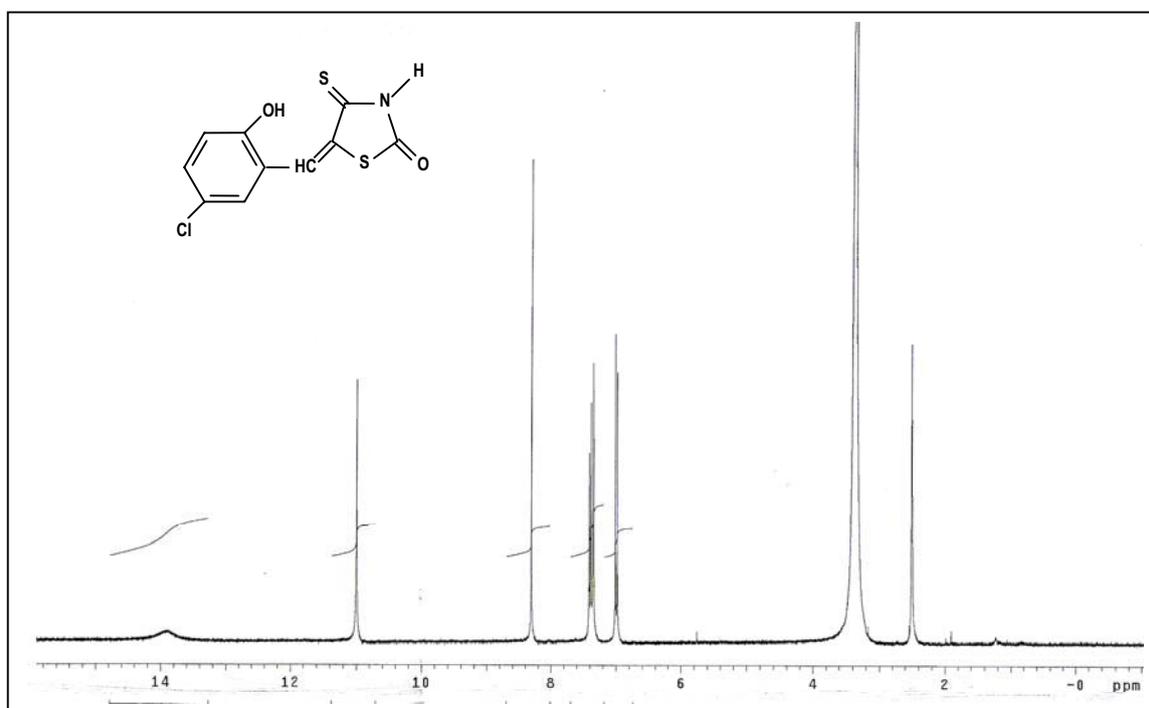


Figura 7: Espectro de RMN¹H do 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III)

SILVA, I. M.

**Figura 8:** Espectro de RMN ^1H do 5-(3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV)**Figura 9:** Espectro de RMN ^1H do 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V)

SILVA, I. M.

5.1.4 Resultados espectroscópicos de RMN¹³C do 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)

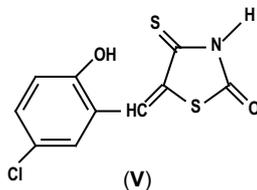


Tabela 6: Dados espectroscópicos de RMN¹³C (δ ppm) da 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)

Composto	Substituinte	C=O	C=S	=C-S	HC =	Benzilideno
V	2-OH; 5-Cl	170,4	195,4	157,0	132,3	(C1) 118,0; (C2) 129,9; (C3) 122,3; (C4) 123,3; (C5) 129,8; (C6) 127,2;

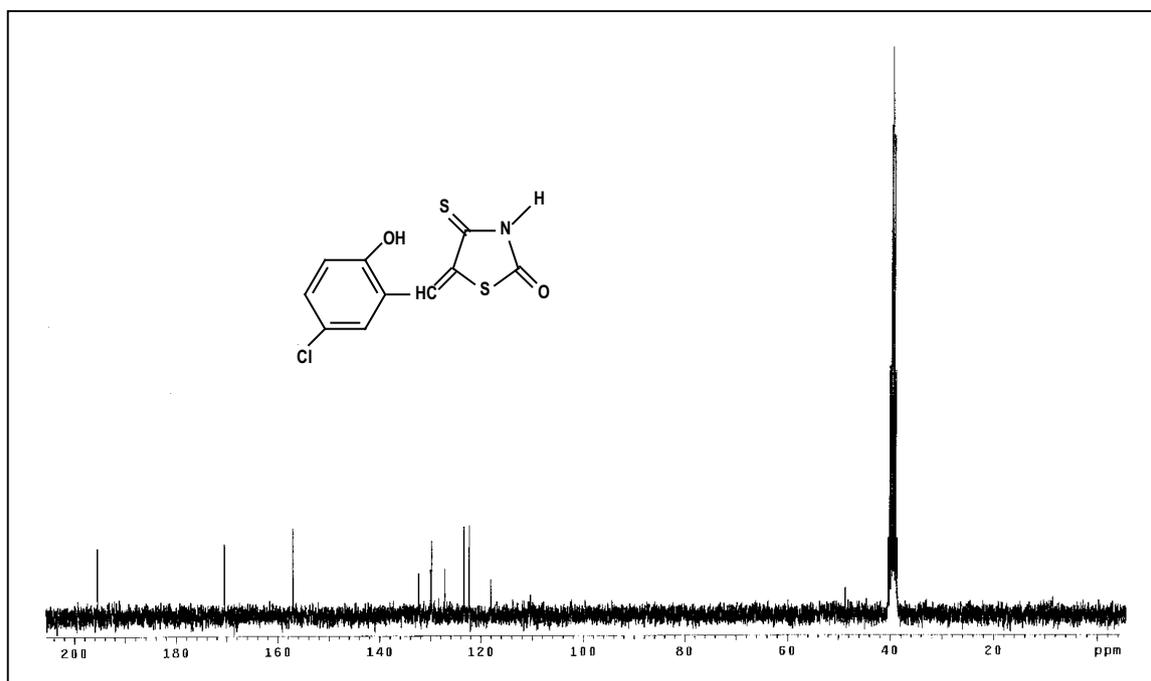


Figura 10: Espectro de RMN¹³C do 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)

SILVA, I. M.

5.1.4 Resultados espectroscópicos de Infravermelho dos derivados tiazolidinônicos

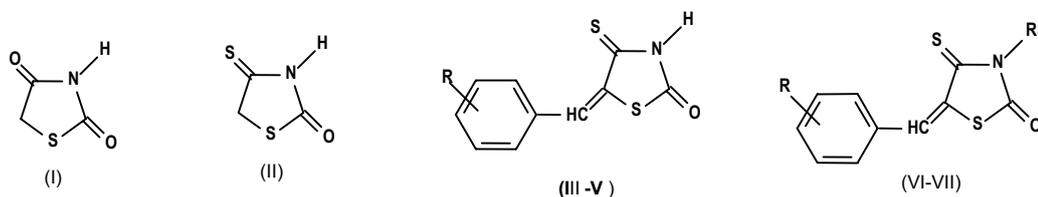


Tabela 7: Dados de Infravermelho ($\nu \text{ cm}^{-1}$), KBr (1%) dos derivados tiazolidinônicos

Composto	Substituinte	Fórmula	IV ($\nu \text{ cm}^{-1}$) (KBr 2%)				
			C = C	C = O	C = S	NH	OH
I	-	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2\text{NS}$	1735-1670	1685	-	3115	-
II	-	$\text{C}_3\text{H}_3\text{ONS}_2$	1710	1683	1460	3115	-
III	3-Cl	$\text{C}_{10}\text{H}_6\text{ONS}_2\text{Cl}$	1590	1688	1470	3130-3080	-
IV	3-OCH ₃ , 4-OH	$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_3\text{NS}_2$	1585	1688	1570	3169	3443
V	2-OH, 5Cl	$\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_3\text{NS}_2\text{Cl}$	1680	1725	1470-1450	3130-3080	-
VI	2-Cl	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{S}_2\text{NOCl}$	1582	1706	1482-1437	-	-
VII	3-Br	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{OS}_2\text{NBr}$	1584-1596	1732	1492-1422	-	-

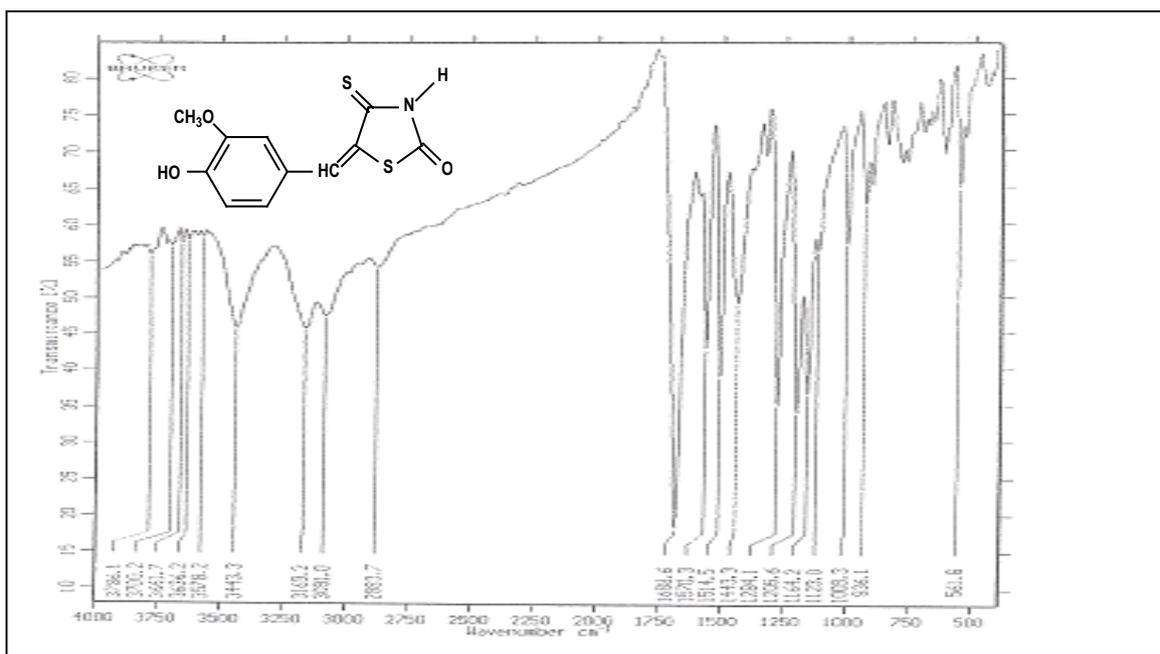


Figura 11: Espectro de Infravermelho do 5-(3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV)

SILVA, I. M.

5.1.5 Resultados espectroscópicos de Massa dos derivados tiazolidinônicos III e V

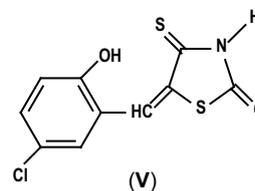
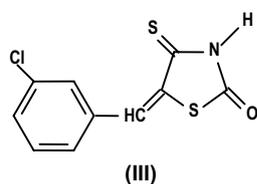


Tabela 8: Dados de Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiazolidinônico, 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III)

Fragmentos	%	Fragmentos	%	Fragmentos	%	Fragmentos	%
m/e 255	99,80	m/e 76	4,31	m/e 254	100,00	m/e 211	13,76
m/e 220	21,75	m/e 168	37,38	M/e 194	3,99	m/e 100	5,96
m/e 192	11,25	m/e 133	9,90	m/e 69	24,04	m/e 194	3,99
m/e 145	0,66	m/e 75	10,74			m/e 159	7,19

Tabela 9: Dados de Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiazolidinônico, 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)

Fragmentos	%	Fragmentos	%	Fragmentos	%
m/e 271	2,56	m/e 239	26,39	m/e 211	10,96
m/e 236	62,86	m/e 237	100,00	m/e 210	26,05
m/e 235	21,76	m/e 236	62,86	m/e 209	17,10
m/e 207	8,43	m/e 182	28,91	m/e 183	32,12
m/e 190	4,08	m/e 150	4,25	m/e 192	21,76
m/e 176	6,48	m/e 206	5,69	m/e 164	4,17
m/e 100	2,01				

SILVA, I. M.

5.1.5.1 Espectro de massa dos derivados tiazolidinônicos III e V

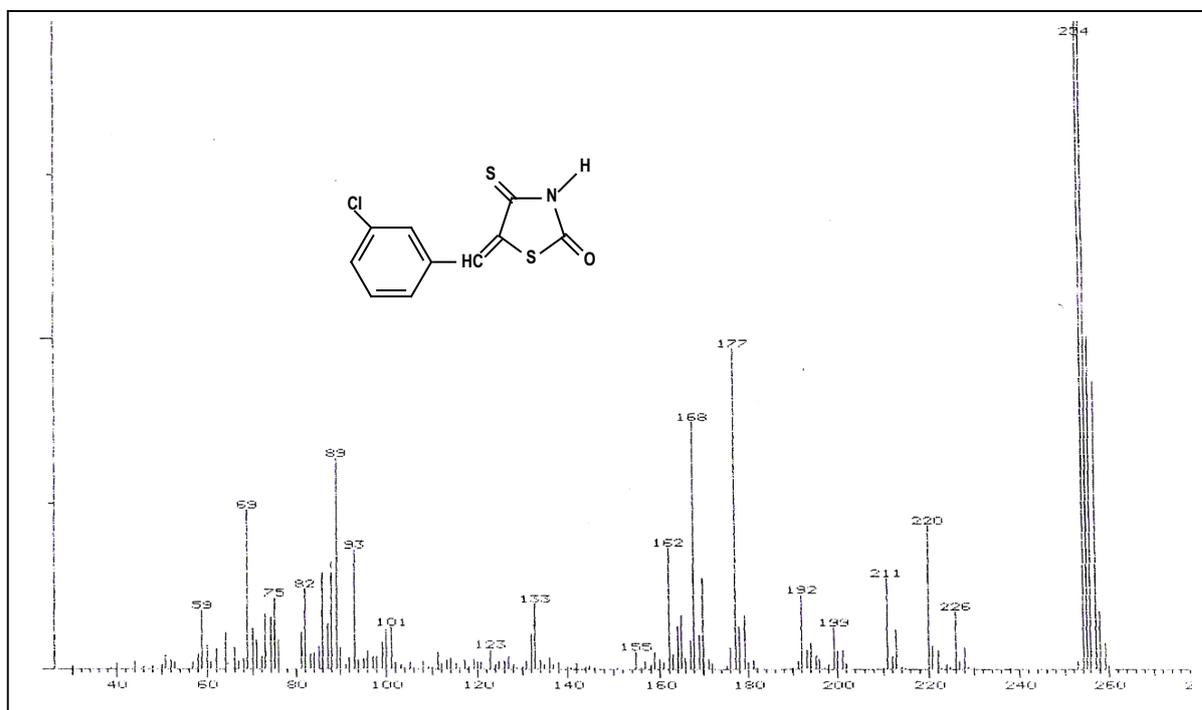


Figura 12: Espectro de Massa do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)

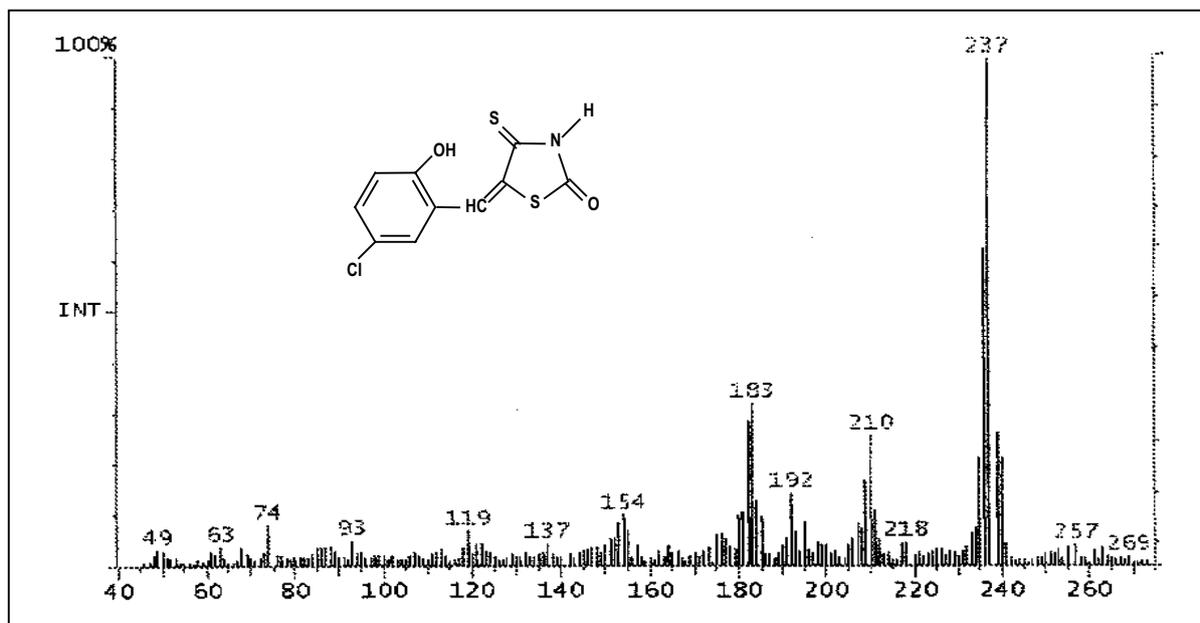


Figura 13: Espectro de Massa do composto 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (V)

5.1.6.2 Fragmentação de Massas do derivado tiazolidinônico III

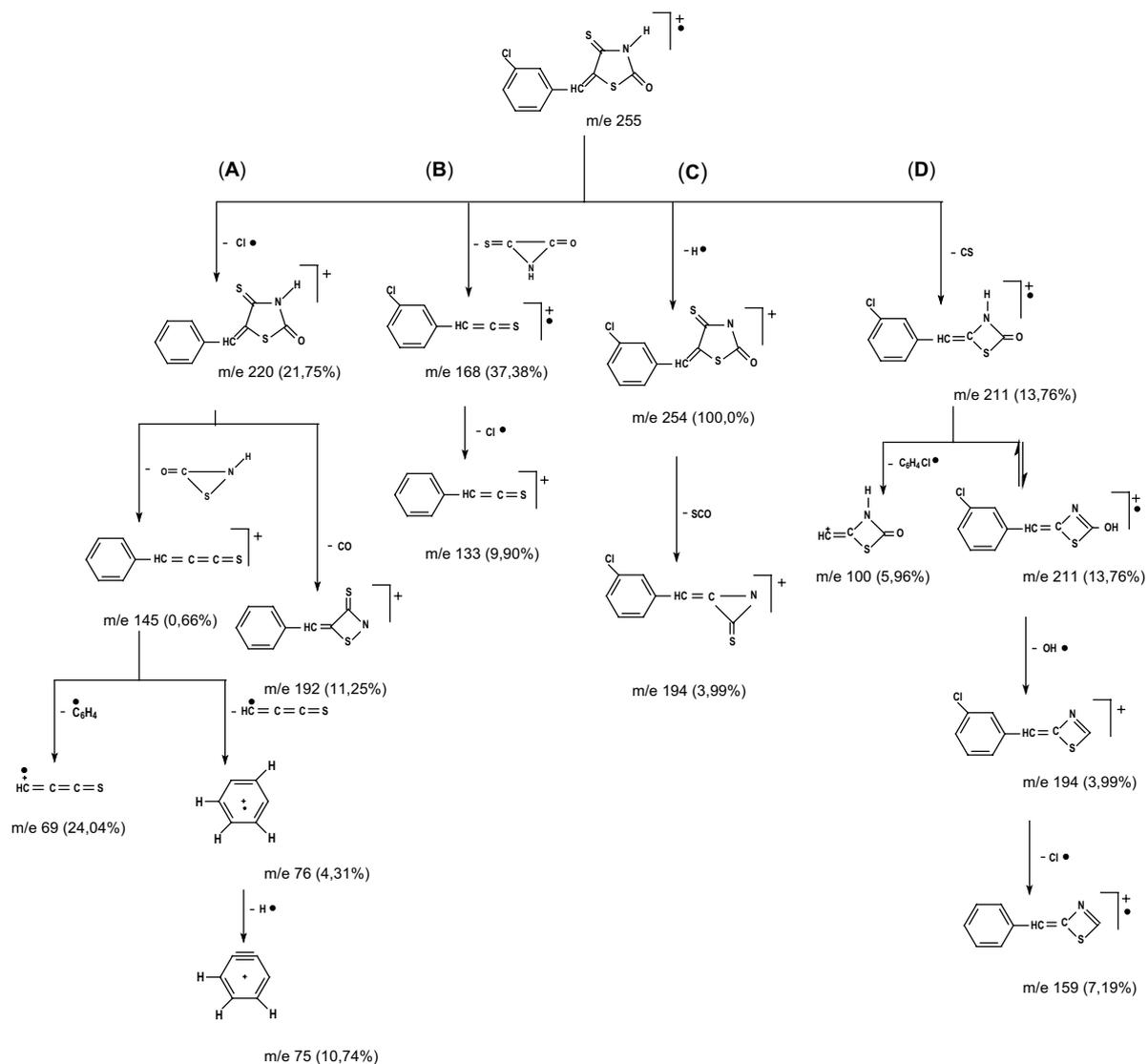


Figura 14: Fragmentação do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III)

SILVA, I. M.

5.1.6.3 Fragmentação de Massas do derivado tiazolidinônico V *

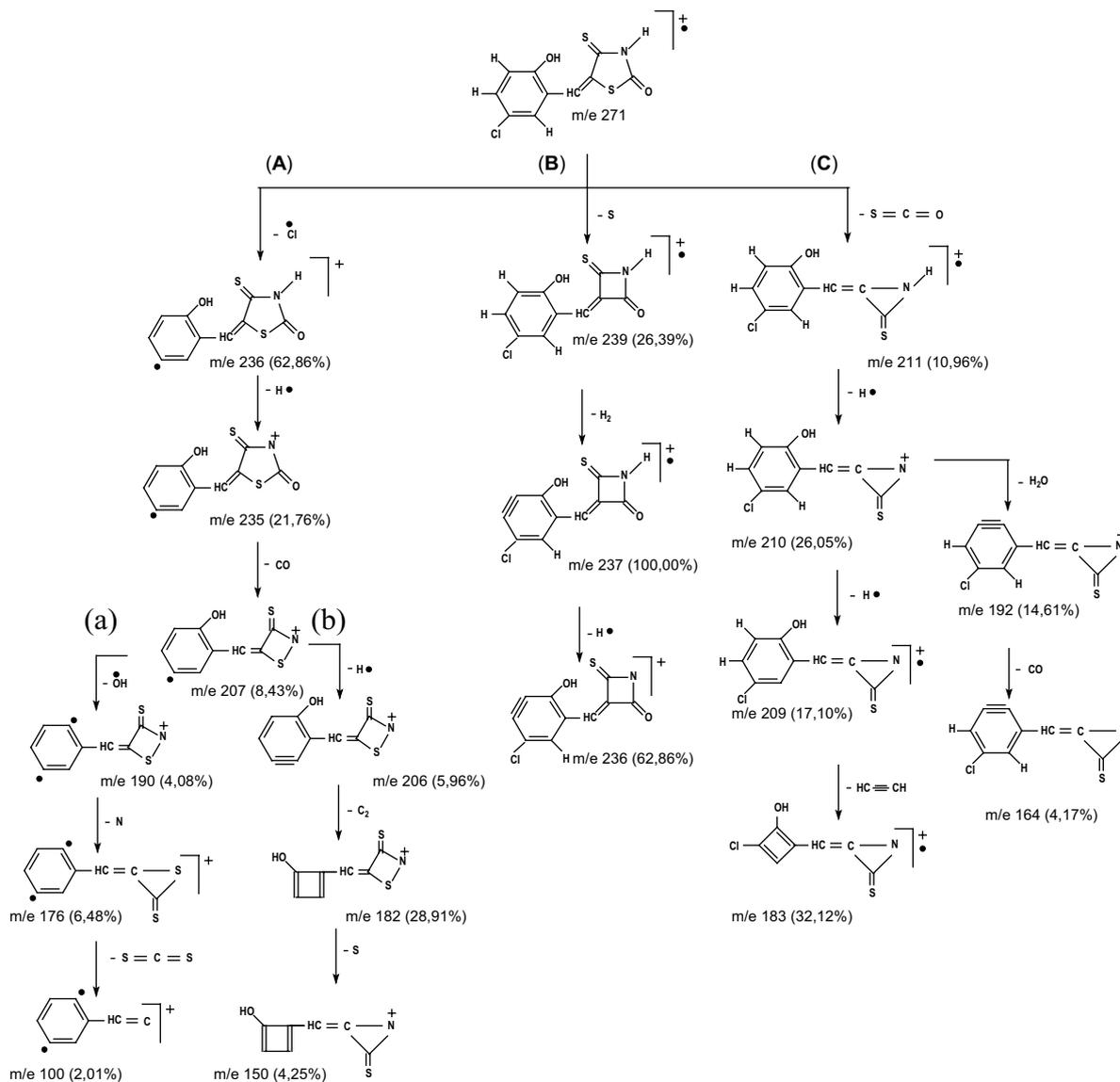


Figura 15: Fragmentação do composto 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)

* Fragmentação com formação de birradical (KURZER, 1994/1995)

SILVA, I. M.

5.1.7 Resultados espectroscópicos de RMN¹H dos derivados tiazolidinônicos N-alkilados

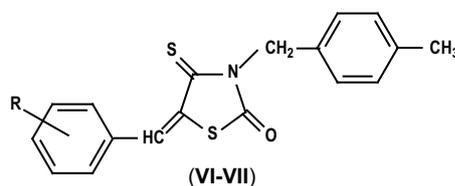
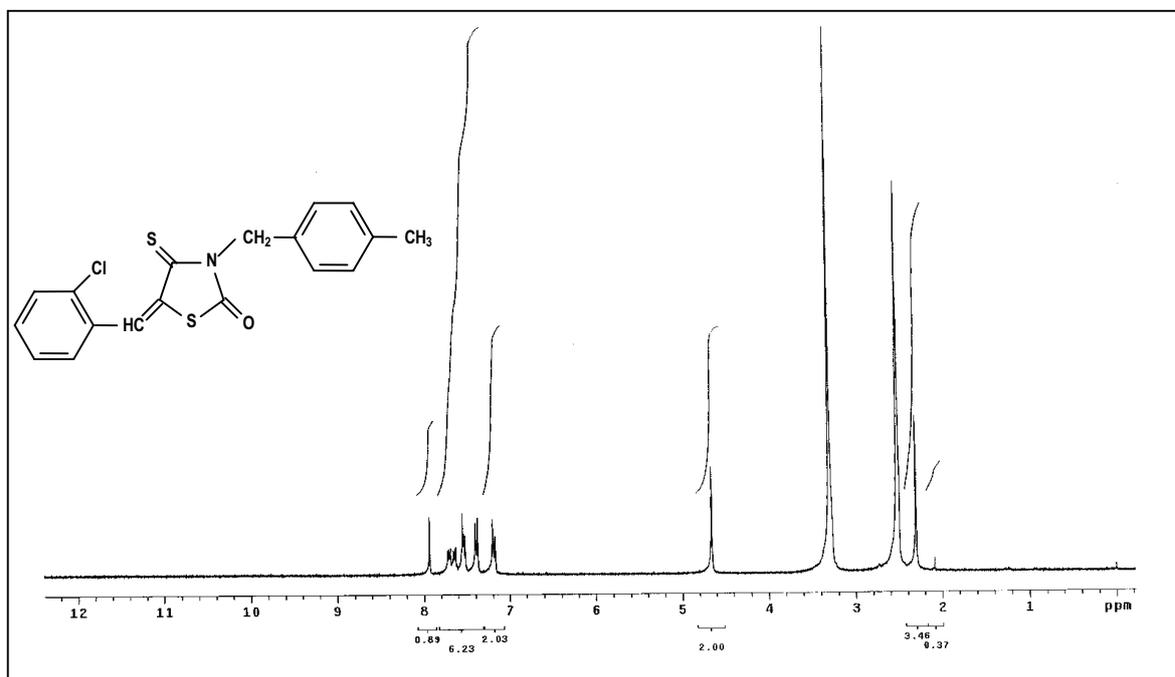
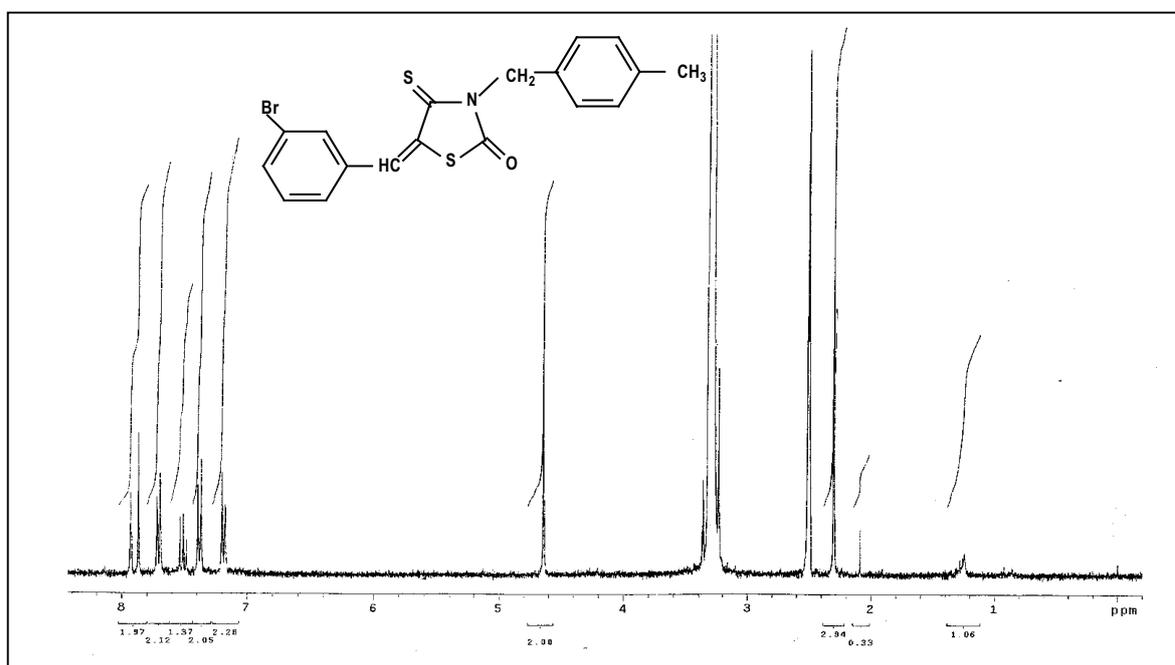


Tabela 10: Dados de RMN¹H do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI) e do 5-(2-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

Composto	Substituinte R	CH ₃	CH ₂	CH	Prótons aromáticos	
					benzilideno	benzil
VI	2-Cl	2,50 (s, 3H)	4,65 (s, 2H)	7,93 (s, 1H)	7,51-7,72 (m, 4H)	7,38 (d, 2H) J = 8,09 Hz 7,18 (d, 2H) J = 8,09 Hz
VII	3-Br	2,08 (s, 3H)	4,63 (s, 2H)	7,86 (s, 1H)	7,92 (d, 1H) 7,70 (dd, 2H) J = 7,79 Hz e J = 2,09 Hz 7,50 (t, 1H) J = 7,79 Hz	7,38 (d, 2H) J = 8,09 Hz 7,18 (d, 2H) J = 8,09 Hz

Solvente: DMSO

Deslocamento: (δ ppm)

5.1.7.1 Espectros de RMN¹H dos derivados tiazolidinônicos VI e VIIFigura 16: Espectro de RMN ¹H do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)Figura 17: Espectro de RMN ¹H do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

5.1.7.2 Espectros de Infravermelho dos derivados tiazolidinônicos VI e VII

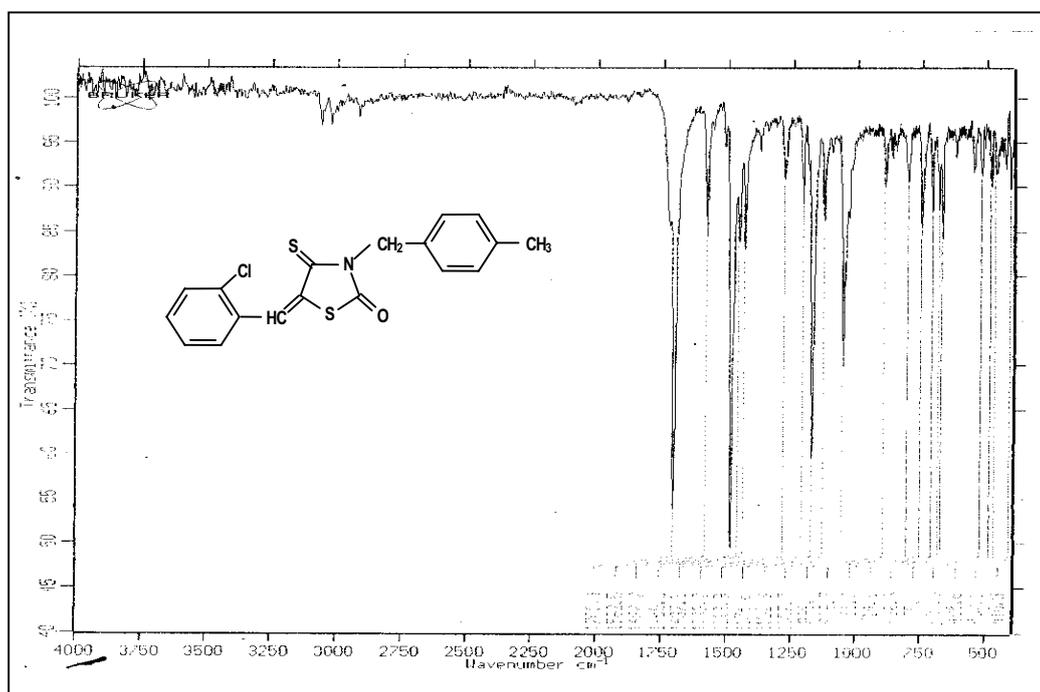


Figura 18: Espectro de Infravermelho do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)

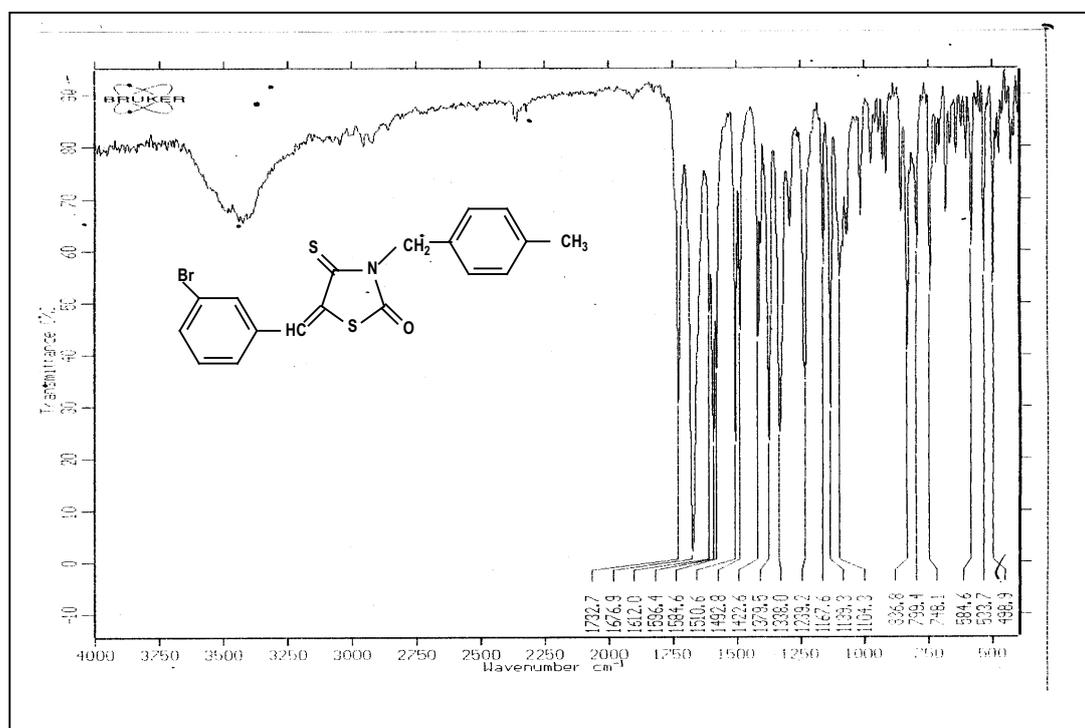


Figura 19: Espectro de Infravermelho do 5-(2-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilfenil)-tiazolidina-2-ona (VII)

5.1.8 Resultados espectroscópicos de Massas dos derivados tiazolidinônicos N-alkilados

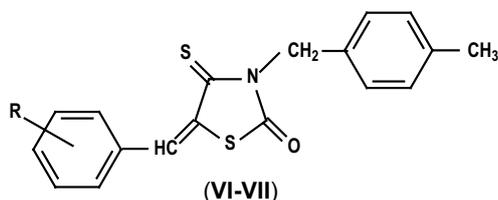


Tabela 11: Dados Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiazolidinônico 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)

Fragmentos	%	Fragmentos	%	Fragmentos	%
m/e 359	22,43	m/e 89	9,60	m/e 75	4,86
m/e 105	100,00	m/e 65	10,29	m/e 51	9,81
m/e 104	5,77	m/e 63	13,32	m/e 324	11,21
m/e 103	13,93	m/e 62	3,49	m/e 254	0,26
m/e 91	6,71	m/e 77	44,31	m/e 86	61,72

Tabela 12: Dados Espectrométricos de Massa (fragmentações) do derivado tiazolidinônico 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

Fragmentos	%	Fragmentos	%	Fragmentos	%
m/e 403	29,37	m/e 51	17,75	m/e 299	7,40
m/e 105	100,00	m/e 191	3,30	m/e 219	16,29
m/e 104	8,94	m/e 86	32,64	m/e 202	5,81
m/e 103	30,43	m/e 58	4,93	m/e 201	40,83
m/e 90	3,97	m/e 324	2,38	m/e 177	21,02
m/e 89	9,60	m/e 292	13,73	m/e 298	9,39
m/e 91	18,50	m/e 291	69,81	m/e 281	28,41
m/e 65	4,10	m/e 248	9,35	m/e 280	8,73
m/e 64	2,44	m/e 216	26,49	m/e 279	26,72
m/e 63	6,78	m/e 215	23,44	m/e 312	11,69
m/e 77	37,06	m/e 371	9,75	m/e 232	3,28
m/e 75	4,01	m/e 370	26,86	m/e 231	13,26

5.1.8.1 Espectros de massa dos derivados tiazolidinônicos VI e VII

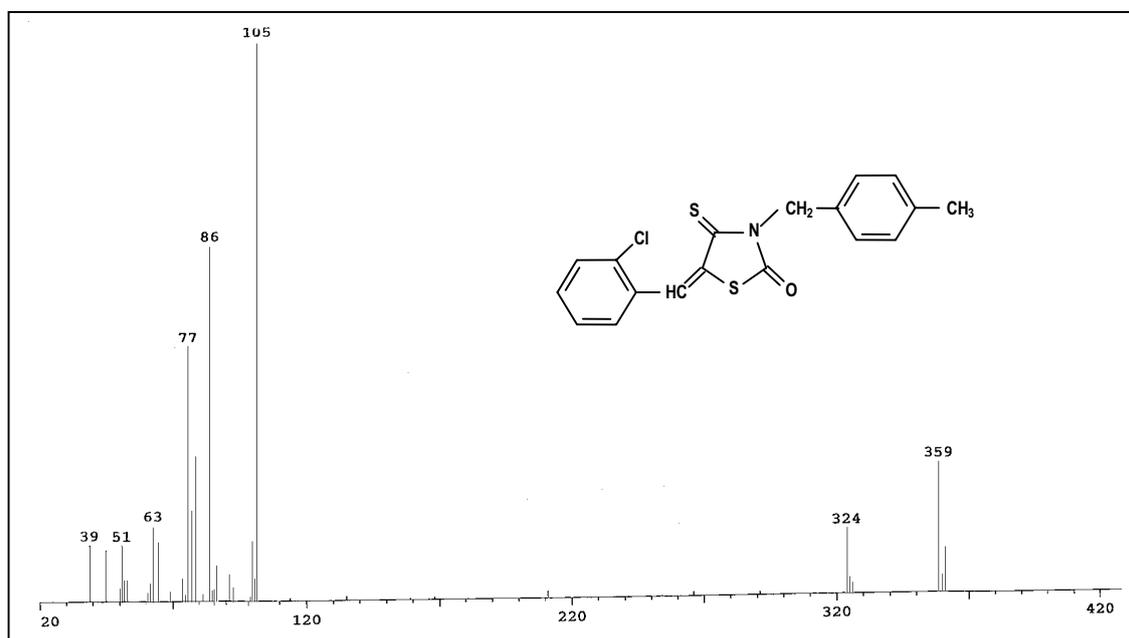


Figura 20: Espectro de Massa do 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)

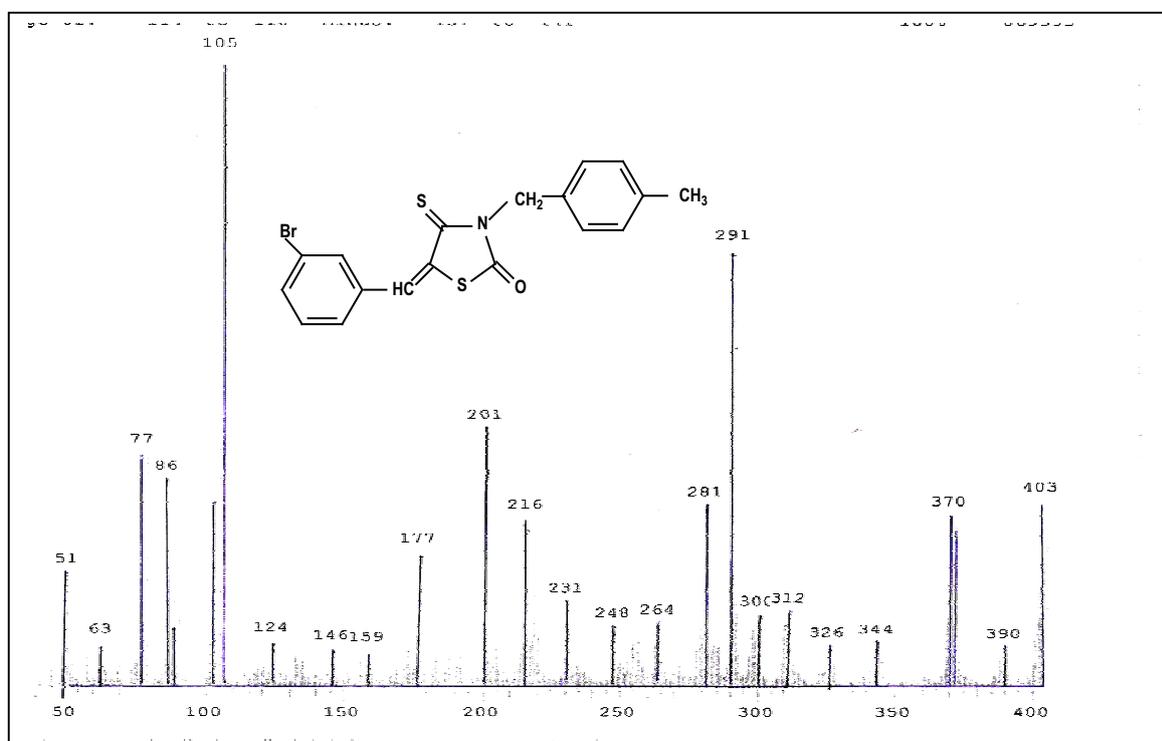


Figura 21: Espectro de Massa do 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

SILVA, I. M.

5.1.8.2 Fragmentação de Massas do derivado tiazolidinônico VI

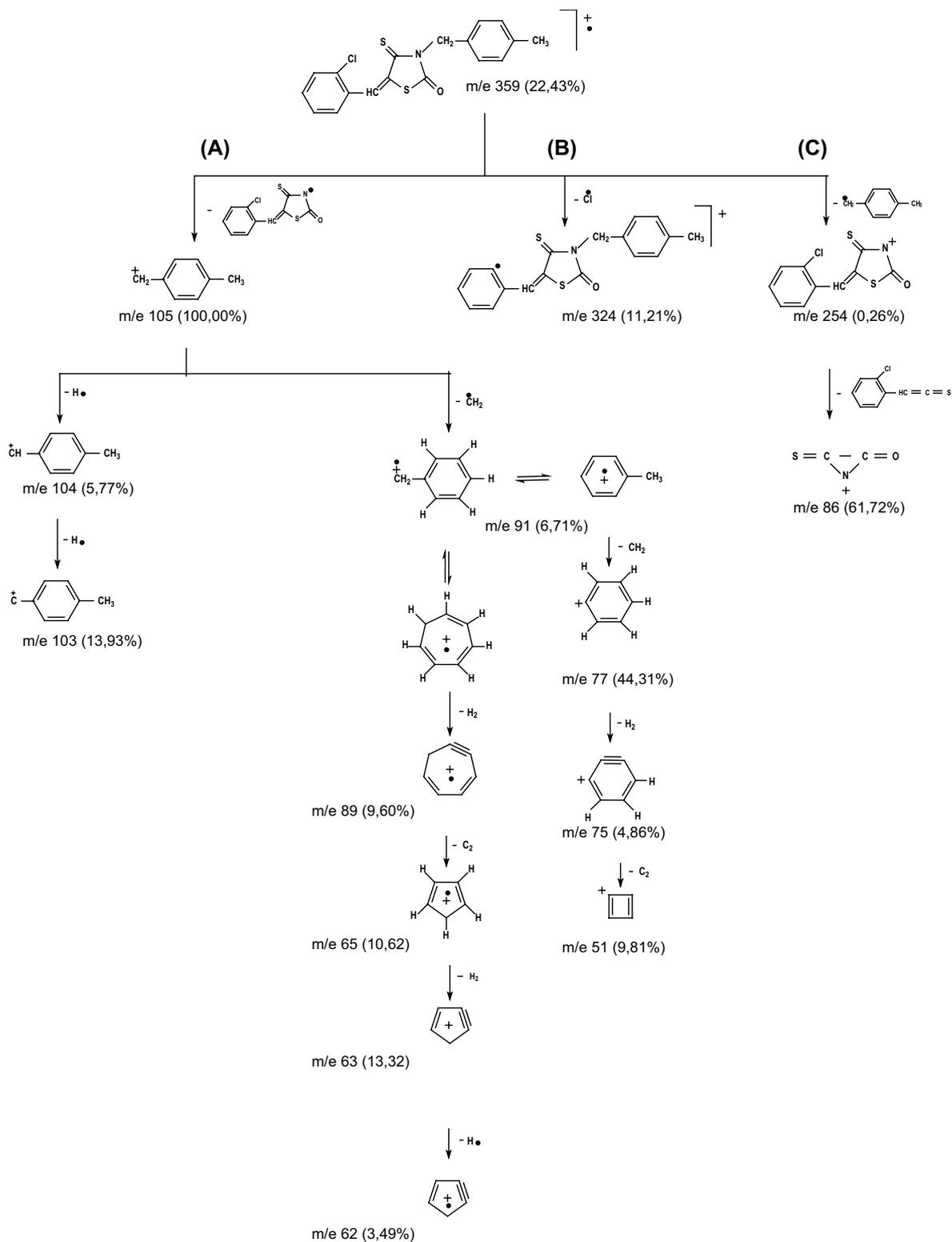


Figura 22: Fragmentação do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)

5.1.8.3 Fragmentação de Massa dos derivados tiazolidinônicos VII

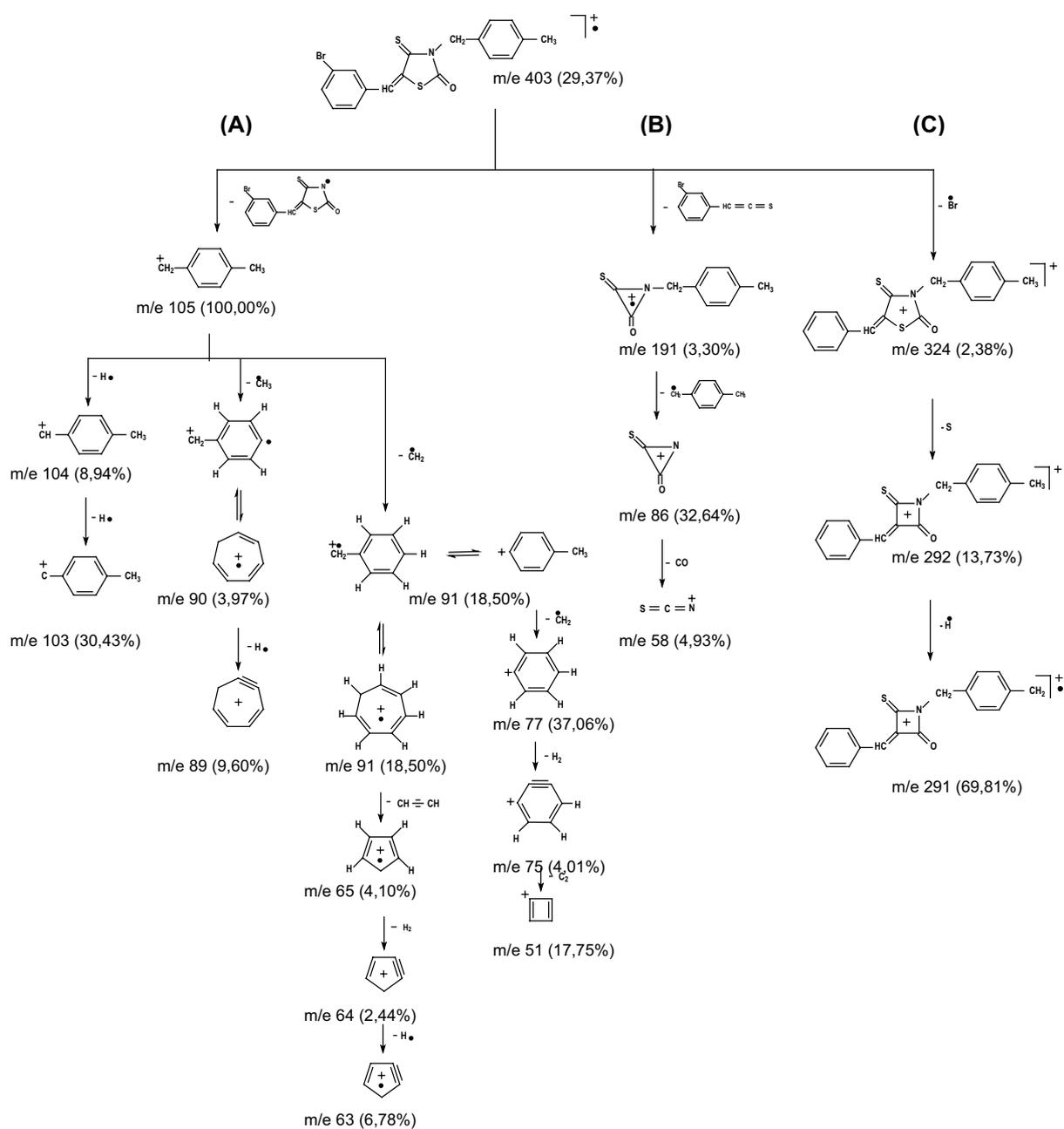
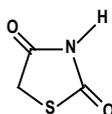


Figura 23: Fragmentação do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

5.2 Análises espectroscópicas da tiazolidina-2,4-diona (I)



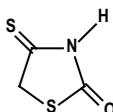
5.2.1 Análise espectroscópica de RMN¹H da tiazolidina-2,4-diona (I)

Os hidrogênios metilênicos da tiazolidina-2,4-diona aparecem como singlete em 4,11 ppm e o próton do grupo NH, apresenta um singlete largo em 12,00 ppm.

5.2.2 Análise espectroscópica de Infravermelho da tiazolidina-2,4-diona (I)

O espectro de Infravermelho revelou bandas de absorção correspondentes às vibrações de deformação das carbonilas, na região entre 1735 e 1670 cm⁻¹. A deformação axial do grupo NH ficou evidenciada na frequência de absorção observada na região de 3300 – 3050 cm⁻¹.

5.2.3 Análises espectroscópicas da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona (II)



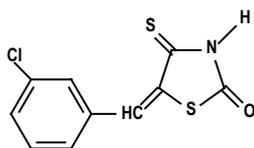
5.2.3.1 Análise espectroscópica de RMN¹H da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona (II)

Os hidrogênios metilênicos aparecem como singlete em 4,60 ppm e o hidrogênio do grupo NH como singlete largo em 13,54 ppm.

5.2.3.2 Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 4-tioxi-tiazolidina-2-ona (II)

A deformação axial do grupo NH foi observada nas frequências de absorção na região de 3300 – 3050 cm^{-1} . Foram detectadas também vibrações de deformação das carbonilas na região de 1710 cm^{-1} e foi observada a presença de bandas de absorção referente ao grupo tioxi na região de 1460 cm^{-1} .

5.2.4 Análises espectroscópicas de RMN¹H do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III)



Foi observado singlete em 8,04 ppm, correspondente ao hidrogênio do CH, o pico de absorção do grupo NH apareceu em 13,10 ppm (s, 1H). Os deslocamentos químicos observados em 7,73 ppm (s, 1H) do H2 e 7,57 ppm multiplete correspondem aos hidrogênios aromáticos H4, H5 e H6.

5.2.4.1 Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III)

O espectro revelou deformação axial do grupo NH nas frequências de absorção na região entre 3130–3080 cm^{-1} , as vibrações de deformação da carbonila foram detectadas na região de 1590 cm^{-1} . Foram observadas ainda bandas de absorção do

C=C na região 1730. As bandas de absorção na região 1470 cm^{-1} são referentes ao grupo tioxo.

5.2.4.2 Análises espectroscópicas de RMN¹³C do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)

O sinal da C=O aparece em 195,43 ppm, a tiocarbonila foi observada em 170,40 ppm, o carbono duplamente ligado ao anel aromático apareceu em 157,00 ppm, os carbonos aromáticos ficaram compreendido na faixa entre 132,33 –118,03 ppm e o carbono do anel heterocíclico ligado ao enxofre (C-S) foi observado em 48,5 ppm.

5.2.4.3 Análise espectroscópica de Massa do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)

O composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona apresentou fragmentações oriundas da incidência de um feixe de elétrons sobre os impactos em fase gasosa formando o íon molecular. Este por sua vez perde fragmentos diversos dando origem a quatro grandes quebras **A**, **B**, **C** e **D** (figura 14).

Na quebra **A** o íon m/e 220 proveniente do íon molecular m/e 255, perdeu parte do anel heterocíclico levando ao fragmento m/e 145 e este aos íons m/e 69 e m/e 76 que por perda de um radical hidrogênio formou o íon m/e 75. Ainda do m/e 220 houve perda da carbonila originando o íon m/e 192.

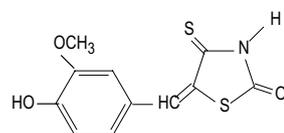
SILVA, I. M.

A quebra **B** foi oriunda da perda de parte do anel heterocíclico levando ao íon radical *m/e* 168 que perdeu o radical cloro originando o íon *m/e* 133.

O pico base foi formado pela perda de um radical hidrogênio, proveniente do íon molecular. Do pico base houve a quebra do núcleo, perdendo a parte SCO e gerando o íon *m/e* 194.

Em **D** a quebra molecular da tiocarbonila do íon molecular formou o fragmento *m/e* 211, que sofreu duas quebras, formando primeiro o fragmento *m/e* 100 e no segundo um equilíbrio molecular levou a saída do radical OH originando o *m/e* 194, que também sofreu quebra do radical cloro resultando no fragmento *m/e* 159.

5.2.5 Análises espectroscópicas do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV)



5.2.5.1 Análise espectroscópica de RMN¹H do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV)

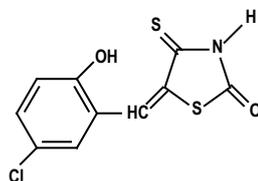
Foram detectados singletes em 3,83 ppm que correspondem aos hidrogênios do grupo metóxi. O pico em 8,05 ppm é referente ao hidrogênio do benzilidênico CH duplamente ligado. Foram apresentados singletes para a hidroxila com absorção em 10,22 ppm e o hidrogênio do NH 13,69 ppm. O anel aromático revelou singletes em 7,24 ppm para o hidrogênio ligado ao C2 e dubletes em 6,94 ppm e 7,18 ppm para

os hidrogênios ligados ao C5 e C6 do anel aromático, ambos com constantes de acoplamento $J = 8,40$ Hz.

5.2.5.2 Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (IV)

A frequência de absorção do grupo carbonila é de 1688 cm^{-1} e do grupo tiocarbonila é de 1570 cm^{-1} . A região de 3443 cm^{-1} corresponde à hidroxila e o pico em 3169 cm^{-1} ao NH.

5.2.6 Análises espectroscópicas do composto 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)



5.2.6.1 Análise espectroscópica de RMN¹H do composto 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)

Neste composto o hidrogênio metilênico aparece como singlete em 8,29 ppm. A hidroxila apresenta absorção em 10,50 ppm e o hidrogênio do NH em 13,93 ppm. Os deslocamentos químicos dos prótons aromáticos aparecem em 6,98 ppm como dublete para o hidrogênio H3, 7,37 ppm (duplo dublete) H4 e 7,32 ppm (dublete) do H5 com $J = 8,99$ Hz; $J = 2,40$ Hz para ambos (**tabela 5**).

5.2.6.2 Análise espectroscópica de Massa do composto 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (V)

O composto 5-(2-hidroxi-5-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona apresentou fragmentações oriundas da incidência de um feixe de elétrons sobre os impactos em fase gasosa formando o íon molecular. Este por sua vez perde fragmentos diversos dando origem a três grandes quebras **A**, **B** e **C**.

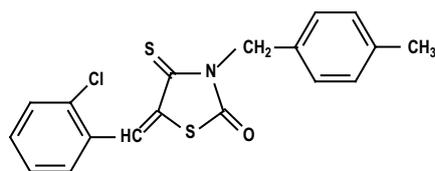
Na quebra **A** o íon m/e 236 originado do íon molecular m/e 271, perdeu um radical hidrogênio formando o íon m/e 235, este perdeu a carbonila originando o íon m/e 207 que sofreu uma quebra dupla levando ao fragmento m/e 190 com formação de fragmento birradical (KURZER, 1994/1995), e m/e 206. O primeiro passa por duas quebras, a perda do nitrogênio e o dissulfeto de carbono, ambos na forma molecular formando os fragmentos m/e 176 e m/e 100 respectivamente (**figura 15**). O segundo sofre quebras sucessivas como a do radical hidrogênio, formando o m/e 206, este perde C_2 do anel aromático, seguido do enxofre, formando os fragmentos m/e 182 e m/e 150.

A quebra **B** foi oriunda da perda do enxofre como íon molecular levando ao íon radical m/e 239 que perdeu a molécula de hidrogênio, dando origem ao pico base m/e 237 (pico base) que perdeu um radical hidrogênio formando o m/e 236.

A fragmentação **C** originou o fragmento m/e 211 através da perda de SCO, que ao perder dois radicais hidrogênio consecutivos formou os fragmentos m/e 210 e m/e 209, esse último através da retirada da molécula de etino conduziu ao fragmento m/e 183. O m/e 210 também sofreu duas outras quebras pela perda da molécula de

água e uma carbonila para formar os fragmentos m/e 192 e m/e 164 respectivamente.

5.2.7 Análise espectroscópica do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)



5.2.7.1 Análise espectroscópica de RMN¹H do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos do radical benzil e benzilideno aparecem nas faixas de absorção de 7,38 – 7,18 ppm com as constantes de acoplamento de $J = 8,09$ Hz para os dubletes e 7,73 – 7,53 ppm respectivamente com as constantes de acoplamento de $J = 8,89$ Hz para o duplo-dublete. Os sinais dos grupos $-CH_3$, $-CH_2$ e $-CH$ aparecem como singletes com picos característicos nas regiões 2,5 ppm, 4,65 ppm e 7,93 ppm respectivamente.

5.2.7.2 Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)

A frequência de absorção do grupo carbonila foi detectada em 1706 cm^{-1} e da tiocarbonila na faixa de absorção de $1482\text{-}1437\text{ cm}^{-1}$, e a banda de absorção em 1582 cm^{-1} corresponde ao C=C.

5.2.7.3 Análise espectroscópica de Massa do composto 5-(2-clorobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VI)

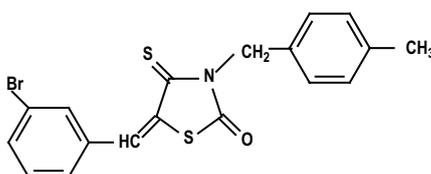
Os compostos VI e VII apresentam algumas quebras já conhecidas (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; ALBUQUERQUE *et al.*, 2004), outras novas estão descritas no composto VII.

O íon molecular m/e 359 ao sofrer a quebra **A**, leva ao pico base m/e 105, que perdendo dois hidrogênios consecutivos leva aos íons m/e 104 e m/e 103. O pico base em outra quebra perdeu o radical CH_2 e dois hidrogênios produzindo os íons radicais m/e 91 e m/e 89. Este último perdendo C_2 seguido de uma molécula e de um radical hidrogênio formou os fragmentos m/e 65, m/e 63 e m/e 62. O íon m/e 91, também perde CH_2 seguido de uma molécula de hidrogênios e C_2 formando os fragmentos m/e 77, m/e 75 e m/e 51.

Em **B** a fragmentação que originou a saída do radical cloro formou o íon m/e 324.

A quebra C deu origem ao íon m/e 254 através da quebra da ligação nitrogênio-carbono. Uma nova quebra originou o íon m/e 86 pela perda da massa 168 (**figura 22 e tabela 11**).

5.2.8 Análise espectroscópica do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)



5.2.8.1 Análise espectroscópica de RMN¹H do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos do radical benzil apresentam-se como dubletes na faixa de absorção de 7,38 – 7,18 ppm com as constantes de acoplamento de $J = 8,09$ Hz. Os hidrogênios aromáticos do radical benzilideno estão na faixa de absorção de 7,92 – 7,50 ppm com as constantes de acoplamento de $J = 7,79$ Hz e $J = 2,09$ Hz para o duplo-dublete e $J = 7,79$ Hz para o triplete. Os sinais dos grupos $-CH_3$, $-CH_2$ e $-CH$ aparecem como singletes com picos característicos nas regiões 2,08 ppm, 4,63 ppm e 7,86 ppm respectivamente.

5.2.8.2 Análise espectroscópica de Infravermelho do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

A frequência de absorção do grupo carbonila foi detectada em 1732 cm^{-1} e da tiocarbonila na faixa de absorção de $1492\text{-}1422\text{ cm}^{-1}$, e a banda de absorção compreendida entre $1596\text{-}1584\text{ cm}^{-1}$ corresponde a $C=C$. A absorção do NH foi observada em $3190\text{-}3080\text{ cm}^{-1}$.

5.2.8.3 Análise espectroscópica de Massa do composto 5-(3-bromobenzilideno)-4-tioxo-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2-ona (VII)

O íon molecular m/e 403, apresentou sete interessantes quebras, **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** e **G**, algumas já conhecidas. O íon molecular ao sofrer a quebra **A** deu origem ao

pico base m/e 105 que perdendo dois radicais hidrogênicos, leva aos íons m/e 104 e m/e 103. O pico base perdeu o radical CH_3 produzindo o íon radical m/e 90 que em equilíbrio com o íon tropílio perdeu um radical hidrogênio formou o m/e 89. O pico base também perdeu o radical CH_2 produzindo o íon radical m/e 91, este perdendo uma molécula de etino seguido de uma molécula e de um radical hidrogênio formou os fragmentos m/e 65, m/e 64 e m/e 63. O íon m/e 91, também perde CH_2 seguido de uma molécula de hidrogênicos e C_2 formando os fragmentos m/e 77, m/e 75 e m/e 51.

Em **B** a fragmentação do íon molecular originou o íon m/e 191 que perdendo o de massa 105 e CO formou os fragmentos m/e 86 e m/e 58.

A quebra **C** originou a saída do radical bromo formando o íon m/e 324 que perdendo enxofre, seguido de um radical hidrogênio formou os fragmentos m/e 292 e m/e 291 (**figura 23**).

A saída do radical $\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}$ do íon molecular originou o fragmento m/e 248 na quebra **D**, que perdendo enxofre, e um radical hidrogênio formou os fragmentos m/e 216 e m/e 215 (**figura 23 A**).

Em **E** a quebra do íon molecular provocou a saída de enxofre, e um radical hidrogênio resultou nos fragmentos m/e 371 e m/e 370.

O fragmento m/e 299 resultante da quebra **F**, produziu duas novas quebras, sendo **F'** a perda da molécula de HBr, formando m/e 219, que perdendo os radicais hidroxila e hidrogênio seguido de C_2 levou aos fragmentos m/e 202, m/e 201 e m/e 177. Na quebra **F''** o equilíbrio m/e 298, formado pela quebra de um radical hidrogênio sofreu perdas consecutivas dos radicais, hidroxila e dois hidrogênicos formando os íons m/e 281, m/e 280 e m/e 279.

SILVA, I. M.

O íon m/e 312, resultante da quebra **G**, que perdeu uma molécula de HBr e um radical hidrogênio originando os fragmentos m/e 232 e m/e 231.

As percentagens dos fragmentos estão descritas nas tabelas **11** e **12**.

5.3 Atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados

A série de compostos desse estudo, além de comprovar sua atividade antimicrobiana, revelou também um largo espectro de ação, com formação de evidentes halos.

A atividade antimicrobiana dos compostos 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III) e 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV). Trata-se de moléculas pequenas que revelaram eficácia contra os microrganismos testados (**tabela 13**).

Tabela 13: Atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados frente a diferentes microrganismos-teste. (diâmetro de halo de inibição em mm).

Classe de Microrganismos	Microrganismos-Teste*	Compostos		Padrão	
		III	IV	Cf	Ct
Bactérias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> (DAUFPE 1)	19	17	35	nt
	<i>Micrococcus luteus</i> (DAUFPE 6)	35	48	54	nt
	<i>Bacillus subtilis</i> (DAUFPE 16)	10	25	45	nt
	<i>Enterococcus faecalis</i> (DAUFPE 138)	20	20	24	nt
Bactérias Gram-negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DAUFPE 39)	10	10	0	nt
	<i>Escherichia coli</i> (DAUFPE 224)	10	11	24	nt
	<i>Serratia marcescens</i> (DAUFPE 398)	0	10	0	nt
Bactérias Álcool-ácido resistentes	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (DAUFPE 71)	22	24	0	nt
Levedura	<i>Candida albicans</i> (DAUFPE 1007)	0	20	nt	24
Fungo filamentoso	<i>Monilia sitophila</i> (DAUFPE 2083)	0	10	nt	nt

Cf = Cefalexina

Ct = Cetoconazol

nt = não testado

Os compostos testados apresentaram resultados positivos, destacando-se o 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona (III) e o 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-(ona) (IV), com os maiores espectros de ação antimicrobiana. O composto (IV) inibiu 100% dos microrganismos testados e o composto (III) também mostrou eficácia para os microrganismos testados, sendo que apenas *Serratia marcescens* (DAUFPE-398) não foi inibida.

As figuras 24, 25 e 26 mostram os maiores halos formados pelos produtos testados, frente a alguns dos microrganismos utilizados.

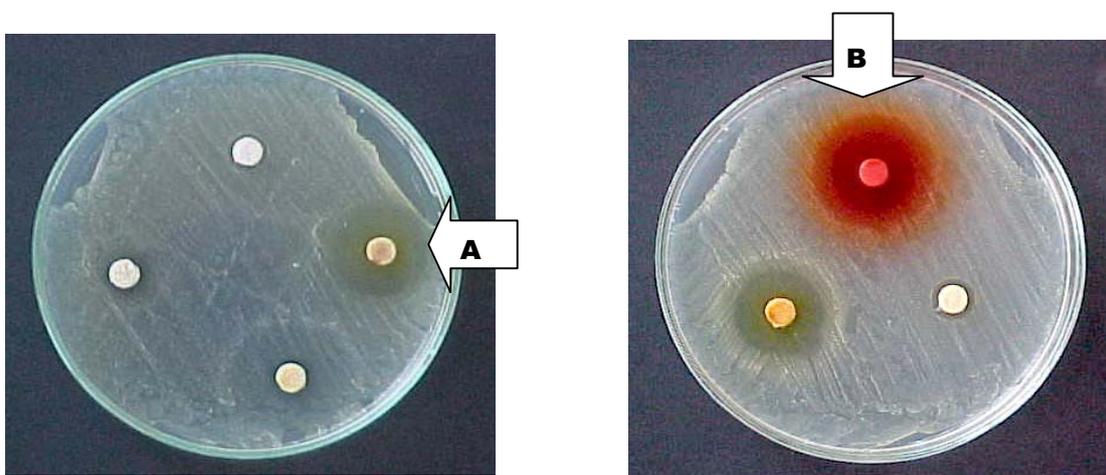


Figura 24: Halos de inibição formados por diferentes compostos frente ao *Staphylococcus aureus*. A Seta (A) representa o composto III e a Seta (B) o composto IV

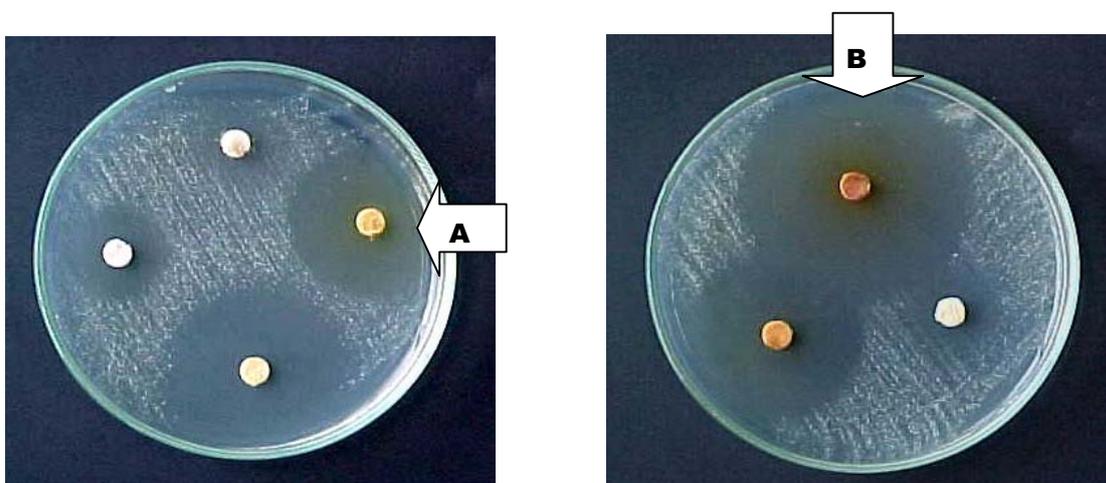


Figura 25: Halos de inibição formados por diferentes compostos frente ao *Micrococcus luteus*. A Seta (A) representa o composto III e a Seta (B) o composto IV

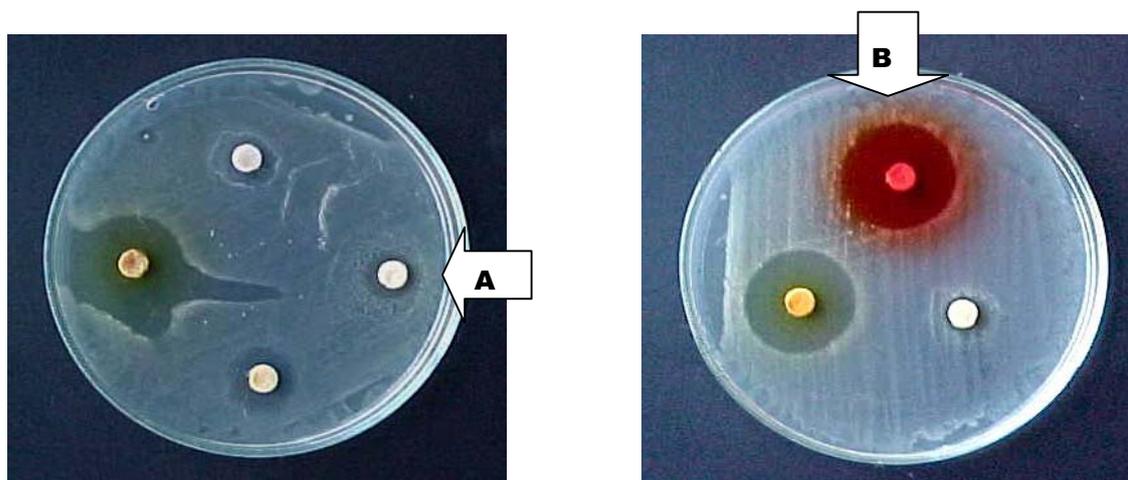


Figura 26: Halos de inibição formados por diferentes compostos para o *Bacillus subtilis*. A Seta (A) representa o composto III e a Seta (B) o composto IV

A análise desses dados indicou uma relevante atividade antimicrobiana dos compostos testados, especialmente frente à bactérias Gram-positivas.

Através da (figura 27) é possível verificar o diâmetro do halo formado pelo composto IV frente ao *Micrococcus luteus* muito próximo ao formado pelo padrão utilizado, o compostos IV formou inclusive halo frente a *Monilia sitophila*.

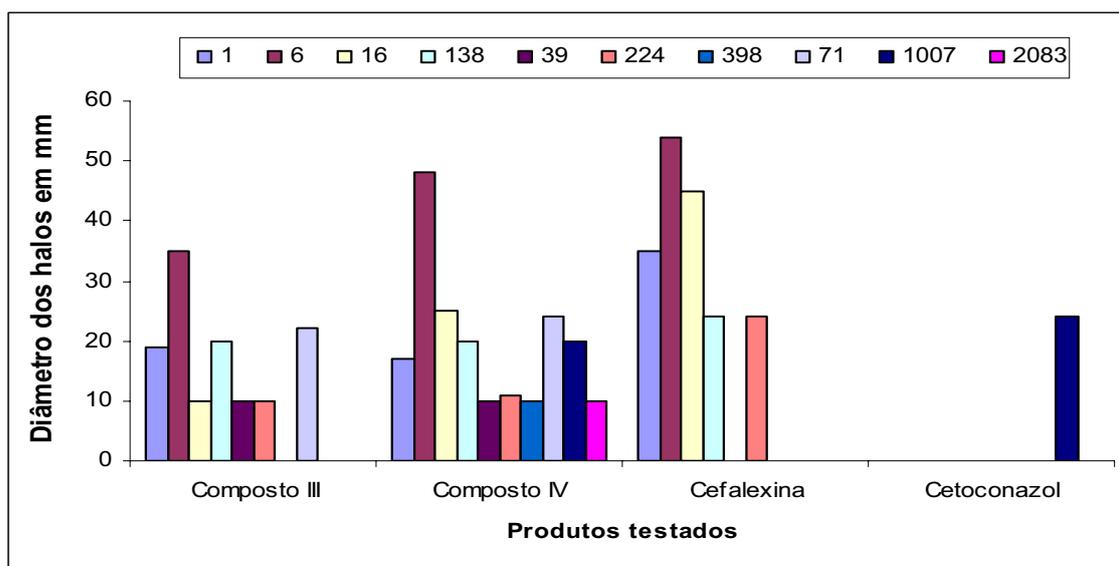


Figura 27: Gráfico comparativo da atividade dos compostos e dos padrões utilizados

SILVA, I. M.

O composto (IV) apresentou maior espectro de ação que um dos compostos utilizados como padrão (Cefalexina), frente a *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria Gram-positiva) , *Serratia marcescens* (bactéria Gram-negativa) e *Mycobacterium smegmatis* (bactéria àcool-ácido resistentes), ainda apresentou halos de inibição muito próximos para *Micrococcus luteus* (bactéria Gram-positiva). Tendo como base o outro composto padrão (cetoconazol) e revelou halo frente a *Candida albicans* muito próximo (**tabela 13**).

5.3.1 Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração mínima bactericida (CMB)

Foi determinado a CMI e CMB para o produto testado que obteve maior espectro de ação antimicrobiana. O composto (IV) revelou baixa concentração bacteriostática para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*.

Há indicação de possível aplicação contra o grupo de bactérias gram-positivas, pois o composto (IV) apresentou baixa concentração bactericida para *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*, respectivamente (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Concentração bacteriostática (CMI) e bactericida (CMB) do composto IV frente a diferentes microrganismos ($\mu\text{g/mL}$).

Microrganismos-teste	Compostos	
	IV	
	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	> 128
<i>Micrococcus luteus</i>	16	16
<i>Bacillus subtilis</i>	16	> 128
<i>Enterococcus faecalis</i>	32	> 128

5.4 Atividade citotóxica de derivados tiazolidinônicos

Os derivados tiazolidinônicos sintetizados e testados mostraram atividade citotóxica para apenas um tipo de célula utilizada nesse estudo. De acordo com o percentual de inibição mostrado na **tabela 15**, ficou evidente que os compostos tiazolidinônicos exercem uma ação citotóxica preferencial por células HEP-2, como já relatado por (Silva *et al.* 2004).

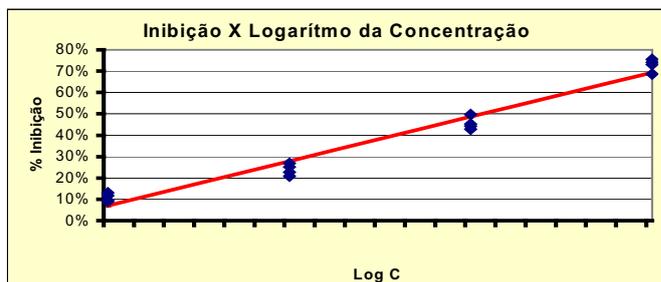
Tabela 15: Atividade citotóxica dos derivados tiazolidinônicos frente às linhagens HEP-2 e NCI-H292.

Linhagem Celular	Concentração μmL	Derivados tiazolidinônicos (% de inibição)	
		III	IV
Linhagem HEP-2	10,0	73,1	68,6
	5,0	46,1	55,7
	2,5	23,7	28,9
	1,25	12,4	11,8
Linhagem NCI-H292	10,0	20,4	-
	5,0	5,9	-
	2,5	5,4	-
	1,25	3,1	-

Com base nos resultados preliminares encontrados por cálculos do percentual de inibição das células foi realizado o cálculo da CI_{50} , dos compostos que apresentaram resultados frente as células HEP-2. Foi feita uma regressão linear, relacionando o percentual de inibição em função da concentração logarítmica das concentrações testadas, admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ($p < 0.01$), para a reta obtida (**figuras 28 e 29**).

SILVA, I. M.

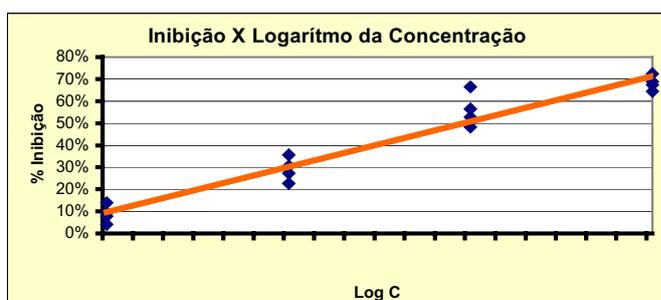
$$\text{Equação da Reta } y = 0,004296 + 0,68983159 * \text{LogC}$$



Cálculo da CI-50		
CI 50	Log CI 50	Inibição
5,23	0,7186	50%

Figura 28: Determinação da CI_{50} para o composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona III frente a célula HEP-2 a partir da regressão linear, relacionando o percentual de inibição em função da concentração logarítma das concentrações testadas.

$$\text{Equação da Reta } y = 0,0311 + 0,6822 * \text{LogC}$$



Cálculo da CI-50		
CI 50	Log CI 50	Inibição
4,87	0,6873	50%

Figura 29: Determinação da CI_{50} para o composto 5-(3-metóxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona IV frente a célula HEP-2 a partir da regressão linear, relacionando o percentual de inibição em função da concentração logarítma das concentrações testadas.

De acordo com o Protocolo do National Cancer Institute (NCI), valores de CI_{50} , \leq a $4\mu\text{g/mL}$, devem ser considerados significativos para substâncias puras (ALLEY *et al.*, 1988).

Comparando esses dados com os resultados obtidos, os compostos IV e VII frente às células HEP-2 foram os que mais se aproximaram do valor considerado significativo para substâncias puras. Assim como o fármaco comercial vincristina, esses produtos também se apresentaram mais ativos frente a células HEP-2.

SILVA, I. M.

De acordo com os resultados obtidos é possível perceber que os percentuais de inibição calculados pela média dos quatro testes realizados estão próximos dos valores da CI_{50} de todos os compostos testados, validando os resultados obtidos.

A regressão linear, relacionando o percentual de inibição em função da concentração logarítma em todas as concentrações verificadas para células tipo HEp-2 revelou uma excelente ação citotóxica de todos os derivados tiazolidinônicos testados, ressaltando o composto **IV**, que apresentou a CI_{50} igual a $4,87 \mu/mL$, valor considerado significativo.

5.5 Avaliação de derivados tiazolidinônicos sobre a marcação de hemácias e o potencial atividade antioxidante

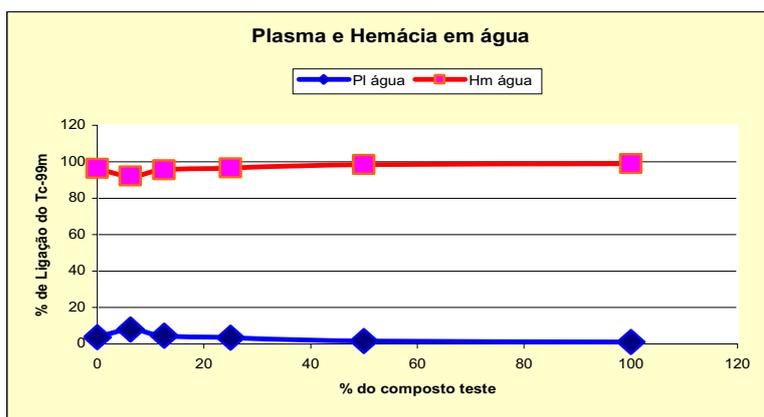
A molécula de hemoglobina fixada no interior das hemácias é sítio de ligação do Tecnécio-99m. Para verificar o potencial antioxidante dos compostos em estudo foi utilizado o Tc-99m e o potente redutor SnCl₂ (cloreto estanoso) na marcação de hemácias.

Como podem ser observados na **Tabela 16**, os dados do controle com o DMSO não apresentaram alterações na marcação de hemácias e plasma indicando ter um percentual de ligação próximo ao do controle salina, com isto, os resultados das marcações, demonstrados a seguir foram realizados com compostos dissolvidos em DMSO (**figuras de 30 a 35**).

Tabela 16: Médias e desvios padrões dos grupos controle DMSO e solução salina

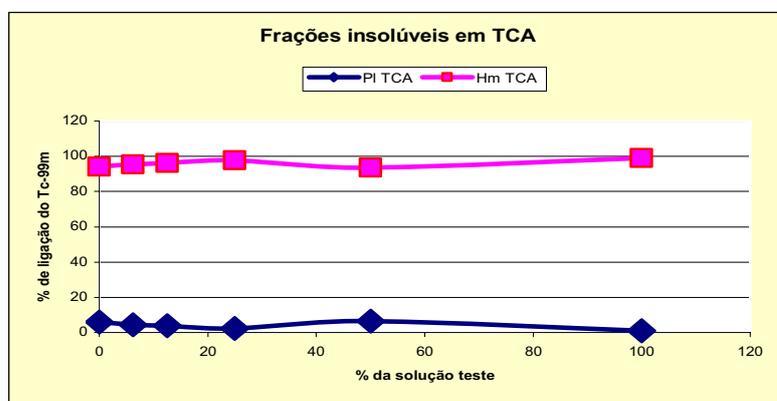
	CONTROLE DMSO			CONTROLE SALINA		
	DMSO água	DMSO TCA	DMSO sol	Salina água	Salina TCA	Salina sol
Ligação Média	96,202	94,142	85,196	97,686	96,801	68,444
Desvio Padrão	0,713	1,575	13,041	0,821	2,219	17,861
teste T				0,127	0,246	0,349

SILVA, I. M.



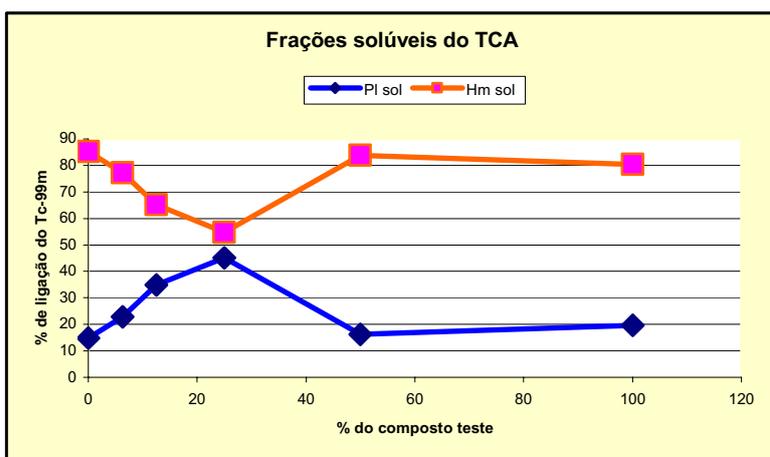
Conc. %	PI água	Hm água
0	3,797304	96,202696
6,25	7,768962	92,231038
12,5	4,503548	95,496452
25	3,321151	96,678849
50	1,589588	98,410412
100	0,970192	99,029808

Figura 30: Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações plasma e hemácia em água usando variadas concentrações do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV)



Conc. %	PI TCA	Hm TCA
0	5,857604	94,142396
6,25	4,505884	95,494116
12,5	3,961407	96,038593
25	2,418007	97,581993
50	6,445852	93,554148
100	0,929438	99,070562

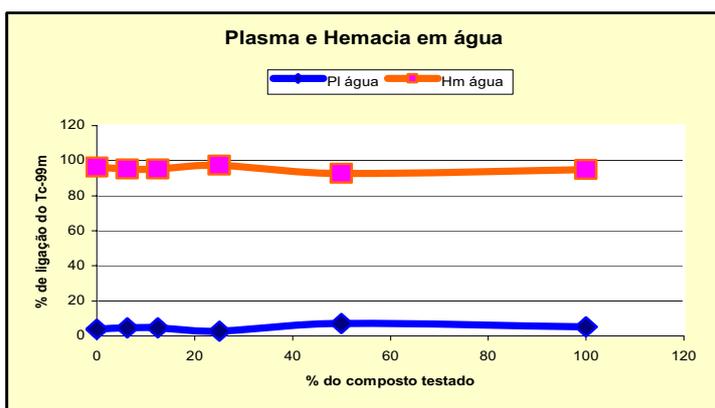
Figura 31: Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações insolúveis do plasma e hemácia usando variadas concentrações do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV)



Conc. %	PI sol	Hm sol
0	14,80321	85,19679
6,25	22,82747	77,172532
12,5	34,87987	65,120134
25	45,19866	54,801335
50	16,26756	83,732445
100	19,5978	80,402203

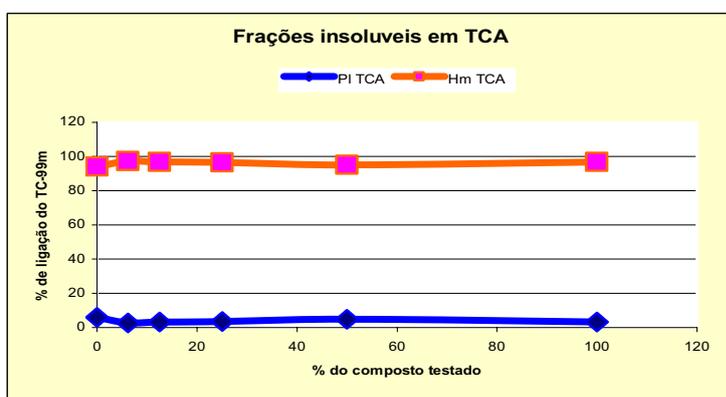
Figura 32: Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações solúveis do plasma e hemácia usando variadas concentrações do composto 5-(3-metóxi-4-hidroxibenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (IV)

SILVA, I. M.



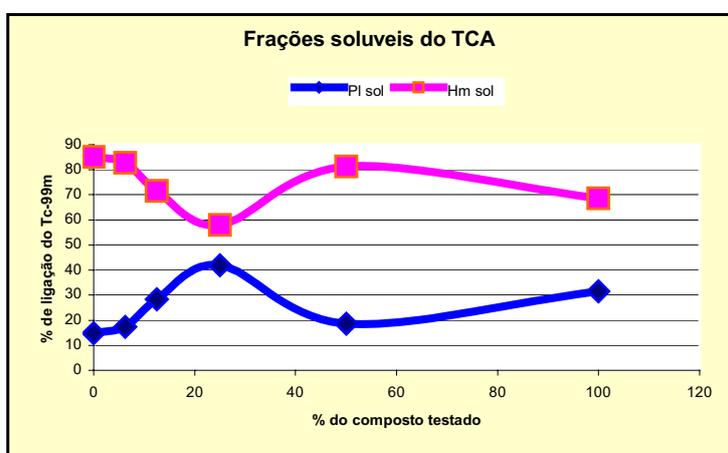
Conc.	PI água	Hm água
0	3,797304	96,2027
6,25	4,744058	95,25594
12,5	4,701005	95,299
25	2,633319	97,36668
50	7,174018	92,82598
100	5,183013	94,81699

Figura 33: Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações plasma e hemácia em água usando variadas concentrações do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)



Conc.	PI TCA	Hm TCA
0	5,857604	94,1424
6,25	2,82868	97,17132
12,5	3,370524	96,62948
25	3,415685	96,58432
50	4,842511	95,15749
100	3,176305	96,8237

Figura 34: Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações insolúveis do plasma e hemácia em variadas concentrações do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)



Conc.	PI sol	Hm sol
0	14,80321	85,19679
6,25	17,30323	82,69677
12,5	28,44061	71,55939
25	41,94519	58,05481
50	18,72804	81,27196
100	31,46843	68,53157

Figura 35: Curva representativa do percentual de ligação do Tc-99m nas frações solúveis do plasma e hemácia em variadas concentrações do composto 5-(3-clorobenzilideno)-4-tioxo-tiazolidina-2-ona (III)

A marcação de hemácias não apresentou variações significativas nas diferentes concentrações do composto em relação ao percentual de ligação do Tc-99m no controle **figura 30**. Foi percebido ainda que a ligação do Tc-99m no plasma é na ordem de 7,7% na concentração 6,25% do composto e 0,97% na concentração 100% do composto.

Na **figura 31**, a fração insolúvel da hemácia e do plasma após a precipitação com TCA, mostrou que os valores obtidos na marcação de hemácia foram de 95,49% na concentração 6,25% do composto, e 99% na concentração 100% do composto.

No entanto, nas frações solúveis de hemácia e plasma **figura 32** os dados mostraram que na concentração 6,25% ocorreu um aumento na capacidade de ligação do Tc-99m no plasma que foi reduzida nas concentrações de 50 e 100%. Por outro lado, na fração solúvel de hemácia nas concentrações de 6,25 a 25% houve um desligamento do Tc-99m das hemácias, porém a partir da concentração de 50% isso não ocorreu.

Na **figura 33** a marcação de hemácias também não apresentou variações significativas nas diferentes concentrações do composto em relação ao percentual de ligação do Tc-99m frente ao controle. Foi verificado, porém, que a ligação do Tc-99m nas hemácias é na ordem de 95,2% na concentração de 6,25% do composto e no plasma foi 5,18% em 100% da concentração do composto.

Como mostra a **figura 34**, a fração insolúvel hemácia e plasma após a precipitação com TCA, de modo geral apresentaram baixo percentual de ligação do Tc-99m ao plasma e elevado percentuais de ligação às hemácias não havendo

muita variação dos valores obtidos. Foi notado ainda que a ligação do Tc-99m no plasma é na ordem de 2,8% e 3,1% nas concentrações 6,25% e 100% do composto.

No entanto, nas frações solúveis de hemácia e plasma (**figura 35**), foi observado uma diminuição na capacidade de ligação do Tc-99m nas hemácias à 6,25%, porém foi verificado o aumento na capacidade de ligação do Tc-99m, atingindo o máximo a 50% e diminuindo novamente a concentração de 100%.

O provável mecanismo para o Tc-99m se fixar no interior das hemácias segue o seguinte trajeto. O tecnécio entra na célula na forma de íons pertecnetato (TcO_4^-) por transporte ativo através do sistema de transporte “banda 3” para se ligar à hemoglobina, e simultaneamente os íons estano através dos canais iônicos fazem o mesmo percurso para promoverem a ligação do íon TcO_4^- à hemoglobina assumindo assim a forma de Tecnécio ligado a hemoglobina para marcação (OLIVEIRA *et al.*, 1997).

O composto testado na marcação das hemácias pelo Tc-99m pode inibir a entrada dos íons Sn^{2+} e TcO_4^- através da quelação com o mesmo causando dano à membrana plasmática, ou competindo pelos mesmos sítios de ligação dos íons Sn^{2+} e TcO_4^- na cadeia β da hemoglobina (ibid, 1997).

A diminuição no percentual de ligação do Tc-99m nas hemácias pode ter sido em função do composto testado na marcação com o Tc-99m ter liberado espécies reativas de oxigênio com maior poder oxidante, sendo assim mais facilmente reduzida do que o íon TcO_4^- , pois não sendo reduzido o íon pertecnetato não poderá se ligar à molécula de hemoglobina (BRAGA *et al.*, 2000).

Quando o percentual de ligação do Tc-99m nas Hemácias teve um declínio é provável que o composto testado tenha competido com o íon TcO_4^- pelo sítio de

ligação do Tc-99m na hemoglobina ou danificado a membrana celular provocando sua lise e aumentando o percentual de ligação no plasma.

Todavia o aumento do percentual de ligação nas hemácias pode indicar que o composto testado competiu pelo sítio de ligação do cloreto estano em na forma de íons Sn^{2+} revelando assim o potencial antioxidante do composto.

Outro fato observado nas **figuras 32 e 35** foi à diminuição do percentual de ligação nas hemácias nas frações solúveis de hemácias e plasma em concentrações de 6,25 a 25% e aumento desse percentual nas concentrações de 50 e 100% para os dois compostos testados. Esses resultados apontam para uma possível interferência da água nas ligações do Tc-99m às hemácias, ou seja as baixas concentrações dificultam o choque efetivo entre as moléculas do Tecnécio e a hemoglobina. Ainda pode ser que o aumento do tempo de reação em função das baixas concentrações tenha dificultado a redução dos íons TcO_4^- a Tecnécio dificultando a ligação nas hemácias.

6 CONCLUSÕES

- Os derivados tiazolidinônicos sintetizados neste trabalho foram obtidos por condensação e alquilação da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona apresentando rendimentos satisfatórios. As estruturas químicas foram comprovadas por espectrometria de ressonância magnética nuclear protônica (RMN ^1H), e de carbono-13 (RMN ^{13}C), espectrometria de infravermelho (IV) e de massas.
- Compostos derivados da 4-tioxo-tiazolidina-2-ona apresentaram atividade antimicrobiana com largo espectro de ação para bactérias Gram-Positivas, Gram-negativas, álcool ácido resistente, levedura e fungo filamentoso. O compostos com maior espectro de ação apresentou também baixa CMI (Concentração Mínima Inibitória) e CMB (Concentração Mínima Bactericida).
- A atividade citotóxica desses compostos revelaram resultados satisfatórios em células do Tipo HEP-2. A CI_{50} , variou entre 4,87 μmL e 5,23 μmL .
- Os compostos foram avaliados sobre a marcação de hemácias com Tc-99m e cloreto estanoso e não diminuíram o percentual de ligação do tecnécio nas hemácias apontando assim para um potencial radiofármaco com ação antioxidante.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Diante dos resultados biológicos apresentados pelos compostos *in vitro*, Foi sugerida a possibilidade de testar estes compostos para diferentes atividades farmacológicas como: antiinflamatória, antiglicemiante, anticonvulsivante etc, que já possuem comprovada atividade descrita na literatura.

- Utilização do anel heterocíclico da 4-tioxi-tiazolidina-2-ona para novas substituições com diferentes reagentes nas posições 2, 3, 4 e 5, objetivando melhorar a atividade biológica e investigar novas atividades farmacológicas.

- Repetir os mesmos teste realizados nesta pesquisa com os produtos alquilados desta rota de síntese e estabelecer um comparativo de atividade pela substituição na posição 3 do anel com os compostos já testados para verificar a relação entre tamanho da molécula, absorção molecular e atividade biológica.

8 ANEXOS

8.1 Material utilizado

8.1.1 Reagentes e solventes

- Ácido acético glacial
- Ácido monocloroacético
- Acetato de sódio
- Acetona
- Acetato de etila
- Benzaldeídos substituídos
- Cloretos de alquila
- Clorofórmio
- Diclorometano
- Dioxano
- Etanol
- Éter etílico
- Hexano
- Hidróxido de potássio
- Metanol
- Pentassulfeto de fósforo
- Piperidina
- Tolueno
- THF (tetrahidrofurano)
- DMSO (Dimetil sufóxido)

8.1.2 Equipamentos

- Espectrofotômetro de infravermelho – Perkin-Elmer 1310
- Espectrofotômetro de massa HEWLETT-PACKARD 5890. Série II modelo 5988^A
- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear- Perkin-Elmer (Hitachi) R24A
- Balança analítica modelo E. Mettler
- Placa de aquecimento com agitador magnético FANEM e FARNING
- Estufas modelos diversos, marca FANEM
- Freezer modelo 340 Praticce – marca CÔNSUL
- Cilindro de argônio – WHITE MARTINS
- Lâmpada ultravioleta
- Rotovaporador – 802 FISATON
- Aparelho para ponto de fusão modelo 340.23 marca QUIMIS.
- Balança analítica modelo E. METTLER
- Balança semi-analítica modelo P 115, KERN
- Autoclave - FANEM
- Estufa incubadora para BOD modelo 347F - FANEM
- Forno de microondas, modelo Giropratic, PANASONIC
- Micropipetas automáticas (P 1000, P 100, P 20), GILSON MEDICAL ELETRONICS
- Estufas de cultura modelo 002 CB, FANEM

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, J. F. C.; GALDINO, S. L.; THOMASSON, F.; CHANTEGREL, J.; CATANHO, M. T. J.; PITTA, I. R.; LUU-DUC, C. Thio-arilideno thiazolidines substituées, synthese et etude structurale. **Ann. Pharm. Fr.**, v.55, n.5, p.201-205, 1997.
2. ALBUQUERQUE, J. F. C.; GRANDER, V. L. M.; BOYO, C.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A.; SILVA, J. B. P.; LEITE, L. F. C.; PITTA, I. R. Mass spectrometry of some arylidene thioxobenzyl or thioxobiphenyloxyethyl thiazolidinone compounds. **Spectroscopy an International Journal**, v.18, n.4, p. 613-619, 2004.
3. ALBUQUERQUE, J. F. C.; GALDINO, S. L.; CHANTEGREL, PITTA, I. R.; LUU-DUC, C. Mass spectrometry of some bromophenacyl thiothiazolidinones and thiazolidinediones. **Spectroscopy Letters**, v.28, n.4, p. 539-546, 1995.
4. ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility Of Drug Screening With Panels Of Human Tumor Cell Lines Using A Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer Research.**, v.48, p.589-601, 1988.
5. AMORIM, E. L. C.; BRANDÃO, S. S. F.; CAVALCANTI, C. O. M.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; LUU-DUC, C. Synthèse et struture des bromo et nitrobenzyl benzyldène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. **Ann. Pharm. Fr.**, v.50, n.2, p.103-111, 1992.

SILVA, I. M.

6. ANDRADE, A. M. C.; LIMA, W. T.; ROCHA, M. P. A.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; GÓES, A. J. S.; PITTA, I. R. Synthesis and structural study of substituted thioxothiazolidinones and thioxoimidazolidinines. **Boll. Chim. Farmac.** v.141, n.6, p.428-433, 2002.
7. ANDREANI, A.; RAMBALDI, M.; LOCATELI, A.; LEONI, A.; BOSSA, M. C.; GALATULAS, I.; SALVATORE, G. Synthesis of lactams with potential cardiotonic activity. **Eur. J. Med. Chem.** v.28, p.825-829, 1993.
8. BATANOV, N.; KOMARITSA, I. D. Study of the reactivity of methylene hydrogen atoms of some azolidines. Kinetics of the reactions of azolidines-4 with benzaldehyde, **Mriya beterotsiklicheskih soedinenii**, v.1, n.1, p.69-73, 1965.
9. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHEVIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Amer. J. Clin. Pathol**, v.45, p.493-496, 1966.
10. BERNARDO-FILHO, M.; GUTIFILEN, B.; FONSECA, L. M. B. 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.
11. BONDE, C. G.; GAIKWAD, N. J. Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.2151-2161, 2004.
12. BRADSHAW, C. K.; BROWN, F. C.; SINCLAIR, E. F. Some analogs of 3-benzylrhodanine. **J. Amer. Soc.** v.78, p. 6189-6192, 1956.

SILVA, I. M.

13. BRAGA, A. C. S.; OLIVEIRA, M. B. N.; FELICIANO, G. D.; REININGER, 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.
14. BROWN, F. C. 4-thiazolidinones. **Chem. Rev.** v.61, n.5, 463-521, 1961.
15. 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.
16. 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/inorgânica/elementos/BIOLOGIA.HTM#elementos>. Acesso em 25 de out. de 2004.**
17. COSTA M. C. C. D.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C. Atividade Citotóxica de Extratos Brutos de Lippia Alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Acta Farm. Bonaerence**. v.23, n.3, p.349-352, 2004.
18. CRAWHALL, J. C.; D. F. ELLIOTT, Cyclisation, Ring-fission, and Acyl-migration Reactions in the Thiazoline Field. **Receivel**, v.593, p.3094-3102, 1952.
19. CROXALL, W. J.; LO, C. P.; SHROPSHIRE, E. Y. 3-Trichloromethane-sulfonyloxazoline and thiazolidine-2,4-diones. **J. Am. Chem. Soc.** v.75, p.5419, 1953.

SILVA, I. M.

20. DABOUN H. A.; ABDEL AZIZ, M. A.; ABDEL AZIZ, F. A. Reactions with thiohidantoin: a novel synthesis of thiopyrane-(2,3-d) imidazole. **Heterocycles** v.19, n.4, p.677-80, 1982.
21. EID A. I.; RAGAB F. A.; EL-ANSARY S. L.; GAZAYERLY S. M.; MOURAD F. E. Synthesis of new 7-substituted 4-methylcoumarin derivatives of antimicrobial activity. **Arch. Pharm. (Weinheim)**, v.327, p.211-213, 1994.
22. EL-FEKY, S. A. H. Synthesis and anticonvulsant properties of some quinazolinone thiazolidine and 4-thiazolidinone derivatives, **Pharmazie**, v.48, p.894-896, 1993.
23. FUJIWARA, T.; YOSHIOCA, 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.
24. GILES, R. G.; LEWIS, N. J.; QUICK, J. K.; SASSE, M. J.; URQUHART, M. W. J.; YOUSSEF, L. Regiospecific Reduction of 5-benzylidene-2,4-Thiazolidinediones and 4-Oxo-2-thiazolidinethiones using Lithium Borohydride in Pyperidine and Tetrahydrofuran. **Tetrahedron**. v.56, p.4531-4537, 2000.
25. GOODMAN, GILMAN A.; HARDMAN, JOEL G.; LIMBIRD, LEE L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, McGraw Hill, 2003.
26. GRAHAM, L. P. An. **Introduction to Medical Chemistry**. New York: Oxford University Press, p.82-102, 128-153, 1988.

SILVA, I. M.

27. 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. Abst.**, 116869c, 1967.
28. HANTZSCH, A.; WEBER, J. H. **Ber.** v.20, p.3118, 1887. *In*: BROWN, F. C. 4-thiazolidinones. **Chem. Rev.** v.61, n.5, p.464, 1961.
29. HEINTZ (1865) *In*: SPRAGUE, J. M.; LAND, A. H. **Heterocyclic Compound**. New York. v.5, p.711, 1957.
30. HU, B.; EILINGBOE, J.; GUNAWAN, I.; HAN, S.; LARGIS, E.; LI, Z.; MALAMAS, M.; MULEY, R.; OLIPHANT, A.; SUN, FUK-WAH; TILLET, J.; WONG, V. 2,4-Thiazolidinediones as Potent and Selective Human P₂U₁ Agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, p.757-760, 2001.
31. JEONG, TS.; KIM, JR.; KIM, K. S.; CHO, KH.; BAE KH.; LEE, W. S. Inhibitory effects of multi-substituted benzylidenethiazolidine-2,4-diones on LDL oxidation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.4017-4023, 2004.
32. JOHN, F.R.; WILSON, R. G.; GRAVESTOCK, M. B.; POYSER, J. P. Experimental Approaches to Antifungal Chemotherapy. **Pharmacology and Chemotherapy**, v.18, p.96-97, 1981.
33. KALLENGER, S.; **Ber.** v.56, p.316, 1923.
34. KOCABALKANLI, A.; ATES, Ö.; ÖTÜK, G. Synthesis of Mannich Bases of Some 2,5-Disubstituted 4-Thiazolidinones and Evaluation of Their Antimicrobial Activities. **Archiv der Pharmazie**, v.334, p.35-39, 2001.

35. KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Ver. Nutr.**, Campinas, v.16, n.4, p.433-441, 2003.
36. KOYAMA, H.; BOUERES, J. K.; HAN, W.; METZGER, E. J.; BERGMAN, J. P.; GRATALE, D. F.; MILLER, D. J.; TOLMAN, R. L.; MACNAUL, K. L.; BERGER, J. P.; DOEBBER, T. W.; LEUNG, K.; MOLLER, D. E.; HECK, J. V.; SAHOO, S. P. 5-Aryl Thiazolidine-2,4-diones as Seletive PPAR γ Agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p.1801-1804, 2003.
37. KOROLKOVAS, A. I.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Dois, 1982, 783 p.
38. KÜÇÜKGÜZEL, S. G.; ORUÇ, E. E.; ROLLAS, S.; SAHIN, F.; ÖZBEK, A. Synthesis, characterization and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. **Eur. J. Med. Chem**, v.37, p.197-206, 2002.
39. KURZER, F. Fragmentation of the Bicyclo [2.2.2.] octane-2-Spirocyclohexane Ring System Under Electron Impact. **Spectroscopy an International Journal**, v. 12 p. 117-137, 1994/1995.
40. LABOUTA, I. M.; SALAMA, H. M.; ESHBA, N. H.; KADER, O.; EL-CHRBIN, E. Potencial anti-microbial: syntheses and *in vitro* anti-microbial evolution of some 5-arylo-thiazolidones and related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.22, p.485-489, 1987.

SILVA, I. M.

41. LANGMUIR, I. Isomorphism, isosterism and covalence. **J. Am. Chem. Soc.**, v.41, p.1943-1559, 1909.
42. LIBERMANN, C.; LANGE, A. **Ann.** v.207, p.121, 1881. **Chem. Rev.** v.61, n.5, p.464, 1961.
43. LIBERMANN, J.; HIMBERT, J. and HENGL, L. La Thiazolidione, point de depart d'une synthèse des acides thiopyruviques et thioglyxyliques substitues **Mémoires présentées à la société Chimique**, p.1120-1124, 1948.
44. LIMA, J. G.; PERRISSIN, M.; CHANTEGREL, J.; LUU-DUC, C.; ROUSSEAU, A., NARCISSE, G. Synthesis and pharmacological evaluation of some 3-phenacyl-5-benzylidene-thiazolidine-2,4-diones. **Arzneim. Forsh. Drug Res.** 44, 831-834. 1994.
45. LO, CHIEN-PEN; ELWOOD, Y. SHROPSHIRE. The Alkylation of 2,4-Thiazolidinedione, **J. Am. Chem. Soc.**, p.999-1001, 1957.
46. 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.
47. MELO, M. V. Reações de detoxicação no desenvolvimento de resistência a quimioterápicos antineoplásicos, **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, Ano IV, n.14, 2001. <http://www.rsbcancer.com.br/rsbc>, acessado em fev.2005.

SILVA, I. M.

48. 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.
49. URRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. Washington, American Society for Microbiology. Sixth Edition, 1995.
50. NOGHUSHI, NORIKO; SAKAI, HIROKAZU; KATO, YOSHINORI; TSUCHIYA, JYUNICHI; YAMAMOTO, YUKO; NIKI, ETSUO; HORIKOSHI, HIROYOSHI; KODAMA, TATSUHIKO. Inhibition of oxidation of low density lipoprotein by troglitazone. **Atherosclerosis**, v.123, p.227-234, 1996.
51. OLIVEIRA, J. F.; BRAGA, A. C. S.; AVILA, A. S. R.; GUTFILEN, 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, p. 489-494, 1997.
52. OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma Nova Alternativa Para o Tratamento de Tumores Sólidos. **Quim. Nova**, v. 25, n.6, p.976-984, 2002.
53. PEREIRA, V. R. R. **Síntese e Avaliação Biológica de Derivados Benzilidênicos Tiazolidinônicos Substituídos**, 2000. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

-
54. **RADICAIS LIVRES**. Net. 2004. Disponível em: <http://química.fe.usp.br/global/ca8/radica.htm>. acessado em 15 out. 2004.
55. RANG, H. P.; DALE, M. M. RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.
56. **REVISTA ELETRÔNICA** do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Disponível em: <http://qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/nuclear/medicine.html> acesso em 18 de nov. 2004.
57. RIDA S. M.; LABOUTA I. M.; SALAMA H. M.; A-GHANY Y. S.; EL-GHAZZAUI E.; KADER O. Syntheses and in vitro antimicrobial evaluation of some benzimidazol-2-ylmethylthioureas, benzimidazol-2-ylacetylthiosemicarbazides and products of their condensation with monochloroacetic acid. *Pharmazie*, v.41, p.475-478, 1986.
58. SILVA, M. M.; BARROS, C. D.; GUEDES, F. L.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. 3-(4-cloro-2-nitro-benzil)-5-(4-cloro-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona: síntese e elucidação estrutural. In. XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2004, Fortaleza, Química e Humanismo, **Anais**, Fortaleza, ABQ, 2004. 1 CD-ROM.
59. SILVA FILHO, J. **Estudo Químico e Biológico de Derivados da Tiazolidina-2,4-diona e 4-tioxo-tiazolidina-2-ona**, 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

SILVA, I. M.

60. SINGH, S. P.; PARMAR, S. S.; RAMAN, K.; STENBERG, V. I., **Chem. Rev.** v.81, p.175-203, 1981.
61. THOMAS, G. **Química Medicinal Uma Introdução**.ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2003, p.36-37.
62. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Drogas Antimicrobianas**. In: Microbiologia, ed. Artmed. Porto Alegre, 2000, p.531-553.
63. TUNNÇBILEK, M.; ALTANLAR, N. Synthesis and antimicrobial evolution of some 3-(substituted phenacyl)-5-[4`-(4*H*-oxo-1-benzopyran-2yl)-benzylidene]-2-4-thiazolidine-diones. **II Farmaco**, v.54, p.475-478, 1999.
64. OLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. **Química Orgânica Estrutura e Função** 4^ªed. Bookman, Porto Alegre, 2004.
65. WEISENTHAL, L. M.; MARSDEN, J.; DILL, P. L.; MACALUSO, C. K. A Novel Dye Exclusion Method for Testing In Vitro Cheosensitivity of Human Tumors. **Cancer Res.**, v.43, p.749-757, 1983.
66. **WORLD HEALTH ORGANIZATION** (2002), Antimicrobial resistance. Fact sheet 194. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/. accessed in 06 of January 2005.
67. YANAGISAWA, H.; ISOBE, A.; HAGISAWA, Y. Novel oximes having 5-benzyl-2,4-thiazolidinedione as antihyperglycemic agents: synthesis and structure-activity relationship. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.10, p.373-375, 2000.

SILVA, I. M.

68. YAMAMOTO, Y.; NAKAJIMA, M.; YAMAZAKI, H.; YOKOI, T. Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. **Life Sciences**, v.70, p.471–482. 2001.
69. YOSCHIDA, T.; FUJITA, T.; AIZAWA, Y.; KURUMADA, T.; HASEGAWA, K.; HORIKOSHI, H. STUDIES ON HINDERED PHENOLS AND ANALOGUES. 1. Hypolipodemic and hipoglicemic agents with ability to inhibit lipid peroxidation. **J. Med. Chem**, v.32, p.421, 1989.