

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Programa de Pós - Graduação em Bioquímica e  
Bioprospecção



Dissertação

**Atividade antifúngica e citotóxica de  
substâncias de origem sintética.**

Gabriela Henriques Marques

Pelotas, 2012

**GABRIELA HENRIQUES MARQUES**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA DE  
SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM SINTÉTICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia da Silva Nascente

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Wilson Cunico

Pelotas, 2012



**Dados de catalogação na fonte:**  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

M357a Marques, Gabriela Henriques

Atividade antifúngica e citotóxica de substâncias de origem sintética / Gabriela Henriques Marques ; orientador Patrícia da Silva Nascente; co-orientador Wilson Cunico .- Pelotas,2012.-63f.: il. - Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Fungos 2.Resistência 3.Citotoxicidade 4.Tiazolidinonas  
I.Nascente, Patrícia da Silva(orientador) II.Título.

CDD 540

**Banca examinadora:**

  
.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Marlete Brum Cleff

  
.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Renata Osório de Faria

  
.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Patrícia da Silva Nascente  
(orientadora)

Dedico este trabalho aos que dele participaram, desde quando era um sonho:

Meus pais, Mauro (saudades eternas!) e Carmen Lúcia, ninguém um dia recebeu mais amor e apoio incondicional do que eu tive de vocês.

Meu melhor amigo, é o meu amor! Meu esposo Wilson, muito obrigada por saber o meu ponto certo... Por calar, quando estou falando que nem

uma matraca... Por ficar em silêncio, quando eu me encontro em guerra... Por ser esta tranquilidade que eu não sou.

Meu filho, Bernardo, por me permitir viver o tipo de amor pelo qual as pessoas se dispõem a morrer.

Minha orientadora, Patrícia da Silva Nascente, obrigada pela amizade, ajuda e entusiasmo... Sem você este trabalho estaria inacabado.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Ele que conspirou para que este trabalho fosse realizado. Obrigada por ter me dado fé e saúde nas horas que procurei.

Ao meu esposo e filho, Wilson e Bernardo, por terem tido a maior paciência do mundo e amor também.

Aos meus pais Mauro e Carmen, por terem me proporcionado a viver em amor, saber respeitar o próximo e por terem me ensinado o significado de família.

Ao meu irmão, Bruno, que me ensinou a ser mais dedicada e mais responsável. Obrigada por você ser meu irmão. Tenho um enorme orgulho disso.

Aos meus avós Antônio e Adelaide, pelo testemunho de vida, de luta, de família e de sabedoria. Porque quando amamos o que fazemos, tudo é grandioso, é valioso, é eterno.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Wilson Cunico, pela valiosa colaboração, apoio e parceria constante neste estudo e no meu coração. Com certeza, você tem um papel especial nesta minha trajetória. Obrigada por me ajudar a acreditar mais na Gabriela e por torná-la uma pessoa bem melhor.

A minha orientadora, prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente, por me aceitar com todos os meus limites e assim, fazer a minha caminhada, bem mais tranquila.

A minha colega de mestrado, parceira em testes e amiga que eu tive o prazer em ganhar nestes dois anos, Alice Kunzler. De tudo que passou, ficará a saudade dos sábados fazendo inúmeros testes, do cafezinho que levava com maior carinho para nos ajudar nas horas sentadas naquele banquinho do lab e das nossas conversas super engraçadas. Muito obrigada por sua ajuda e com certeza, você teve um grande papel no sucesso deste trabalho. Lembre-se do final do filme “Procurando Nemo”, todos os peixinhos livres no mar e se perguntando, e agora? O que vamos fazer? E saiba, o caminho que você escolher, triunfará.

À todos os colegas do “lab da Paty”: Vini, Bel, Josy, Vivi, Graci, Paty Jacob e Cristina e as gurias do “lab do Wilson”: Dani, Bruna, Auri, Valéria, Juliano, Helen, Gabriele, Adriana e Roberta, o meu obrigada por cada

momento vivido. Obrigada pela ajuda, amizade, paciência nestes dois anos. Adorei conhecer vocês!

Aos professores, Sylvia e Fábio, pela estudo da citotoxicidade, muito obrigada pela disponibilidade, atenção e o ensinamento.

À UFPel e à coordenação do Programa de Pós-Graduação de Bioquímica e Bioprospecção, o meu muito obrigada, em especial para os profs: Rosélia, Elisandra, Francieli, Giovana, Adriana, Marlete, Patrícia, Lund, Wilson, Márcia, Geonir, Cláudio e Rogério pela oportunidade de aprender mais com as suas aulas e assim, me tornar uma profissional melhor. Levarei para sempre cada conhecimento obtido e cada momento vivido com vocês. E como diria Paulo Freire: “A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou essa pesquisa.

Enfim, deixo o meu muito obrigada à todos que de alguma maneira, fisicamente ou espiritualmente, me ajudaram na realização deste trabalho.

“Here comes the sun...

Se é verão, a gente torce pra vir o sol pra poder ir para a praia.  
Se é inverno, ele aparecer é ainda melhor, porque ameniza o frio e deixa  
o dia lindo.

Se é primavera, como agora, as flores ficam mais lindas ainda!  
E metaforicamente, o sol chegar, representa aquele bom momento que  
nossa vida tanto espera e que finalmente está a caminho.  
E ninguém melhor que os Beatles, para conseguir expressar em música,  
todo o meu otimismo.”

{Gabriela H. Marques}

## Resumo

MARQUES, Gabriela Henriques. Atividade antifúngica e citotóxica de substâncias de origem sintética. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS.

Ao longo dos últimos dez anos, a incidência de infecções causadas por fungos tem aumentado. Fungos podem causar doenças graves em humanos, várias delas fatais se não tratadas e entre estas incluem aquelas causadas por agentes filamentosos, leveduras e dimórficos. As pessoas com imunodeficiências são particularmente suscetíveis a doenças causadas por fungos oportunistas, principalmente dos gêneros como *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis* spp. Com o surgimento dos antimicrobianos, medicamentos utilizados no tratamento para doenças infecciosas, aumentou a expectativa de vida de pacientes com diferentes infecções e se combateu várias enfermidades, sendo esta descoberta de enorme importância não apenas na área de saúde, como também na economia. Entretanto a utilização excessiva ou a má utilização destes favorecem o desenvolvimento de cepas resistentes, tornando-se este um grande problema de saúde pública em todo o mundo e levando à necessidade da descoberta de novas alternativas de um fármaco antifúngico. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica contra *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum* spp., *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilhermodii*, *Trichosporum asahii* e *Rhodotorula* spp. de dezenove moléculas de origem sintética, da classe da tiazolidinonas e sua citotoxicidade. O estudo de atividade antifúngica foi realizado através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC), com a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) seguindo os protocolos da CLSI M27-A3. O estudo da citotoxicidade com células fibroblastos de ratos 3T3/NIH foi realizado através do ensaio com sal de tetrazolium (MTT). Dentre as leveduras testadas, *T. asahii* e *Rhodotorula* spp. apresentaram maior suscetibilidade a molécula de origem sintética, V58, com CIM 10,41µg/mL e 35µg/mL, respectivamente. Nenhuma das dezenove moléculas foram tóxicas na maior concentração testada (787µg/mL), com exceção da molécula B25 que apresentou redução de mais de 16% de viabilidade celular. Concluiu-se que a *Candida* spp. é o gênero menos suscetível a esta classe de tiazolidinonas do que os outros isolados fúngicos, *T. asahii* e *Rhodotorula* spp. Os resultados ora apresentados permitem antever que o conhecimento da compatibilidade das moléculas sintéticas não citotóxicas sobre o desenvolvimento dos fungos, é essencial para o desenvolvimento de um futuro fármaco antifúngico.

**Palavras-chave:** Fungos, Resistência, Citotoxicidade, Tiazolidinonas.

## Abstract

MARQUES, Gabriela Henriques. Antifungal and cytotoxic substances of synthetic origin. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS.

Over the last ten years, the incidence of fungal infections has increased. Fungi can cause serious diseases in humans, several of them fatal if untreated and among these include those caused by agents, yeasts and dimorphic. People with immune deficiencies are particularly susceptible to opportunistic fungal diseases, especially of the genera as *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Aspergillus* spp. and *Pneumocystis* spp. With the emergence of antimicrobial drugs used in the treatment of infectious diseases, increased life expectancy of patients with various infections and battled various ailments, and this discovery of enormous importance not only in health but also in the economy. However, the overuse or misuse of these favor the development of resistant strains, this becoming a major public health problem worldwide and leading to the need of finding new alternatives of a drug antifungal. This study aimed to evaluate the antifungal activity against *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum* spp., *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilhermodii*, *Trichosporum asahii* and *Rhodotorula* spp. nineteen molecules of synthetic origin class of thiazolidinones and its cytotoxicity. The study of antifungal activity was performed by the broth microdilution technique (MC), with the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) following the protocols of the CLSI M27-A3. The cytotoxicity study with mice fibroblast cells 3T3/NIH was performed using the tetrazolium salt assay (MTT). Among the yeasts tested, *T. asahii* and *Rhodotorula* spp. showed greater susceptibility molecule of synthetic origin, V58, MIC 10.41 mg / mL and 35µg/mL, respectively. None of the nineteen molecules were toxic at the highest concentration tested (787µg/mL), with the exception of B25 molecule that decreased by more than 16% cell viability. It was concluded that *Candida* spp. the genre is less susceptible to this class of thiazolidinones than other fungal isolates, *T. asahii* and *Rhodotorula* spp. The results presented herein allow to foresee that knowledge of the compatibility of non-cytotoxic synthetic molecules on the development of fungi is essential for the future development of an antifungal drug.

**Key-words:** Fungi, Resistance, Cytotoxicity, Thiazolidinones.

## Lista de Figuras

Figura 1. Diferentes alvos de ação na célula fúngica para diferentes princípios antifúngicos .....	23
Figura 2. Estrutura geral de tiazolidinonas .....	30
Figura 3. Estruturas de tiazolidinonas com atividade antifúngica .....	30

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Descrição dos antifúngicos sistêmicos e tópicos indicados no Formulário Terapêutico Nacional em 2008.....	22
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>15</b>
	Objetivo Geral .....	15
	Objetivos Específicos.....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	Fungos e Micoses.....	16
<b>3.2</b>	Leveduras e Leveduroses.....	18
<b>3.3</b>	Agentes Antifúngicos.....	22
<b>3.3.1</b>	Agentes Químicos Clássicos.....	23
<b>3.3.2</b>	Agentes Químicos Atuais.....	24
<b>3.3.3</b>	Antibióticos.....	27
<b>3.4</b>	Resistência Fúngica.....	28
	A importância das tiazolidinonas como fonte de potenciais antifúngicos.....	29
	Métodos de análise da atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	31
	Citotoxicidade .....	33
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enfermidades causadas por fungos passaram a receber maior atenção como as principais causas de doenças oportunistas humanas, especialmente entre imunodeprimidos, por exemplo: AIDS. Avanços nas terapêuticas de doenças de base, maior uso de antibacterianos, aprimoramento de técnicas de transplantes, são algumas das mudanças que favorecem as altas taxas de ocorrência, assim como o avanço na área médica o que levou a maior sobrevivência de pacientes de variadas enfermidades (BARBEDO et al., 2010). Um estudo recente de epidemiologia da sepse, constatou que o número anual de casos de sepsia causada por organismos fúngicos nos Estados Unidos aumentou em 207% entre 1979 e 2000, sendo um grande problema para a saúde pública (PFALLER et al., 2007).

Embora a maioria das infecções causadas por leveduras sejam por *Candida* spp., há outros gêneros de leveduras que podem causar infecções graves, como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e os fungos oportunistas, como *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp. que se aproveitam das condições desfavoráveis do paciente. As infecções causadas por estas leveduras menos comuns apresentam uma difícil questão de como proceder em relação ao tratamento. O conhecimento da epidemiologia e suscetibilidade dos fungos *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* frente a antifúngicos foi aprimorado via nacional e global, no entanto, o mesmo não pode ser dito para as outras leveduras que são patógenos oportunistas (PFALLER et al., 2009).

A incidência de fungemia é crescente e este aumento é claramente correlacionado com o início tardio da terapia antifúngica. Esta terapia é considerada inadequada quando o fármaco administrado não tem nenhuma atividade antifúngica contra o organismo infectante, ou quando a sua concentração terapêutica for baixa. Uma proporção crescente de *Candida* spp. isoladas de amostras de sangue reduziram a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos Fluconazol, Voriconazol e Equinocandinas, assim como pacientes com candidemia têm tido índices elevados de resistência para os mesmos antifúngicos, acarretando um prognóstico desfavorável. Conseqüentemente, a utilização sistemática e empírica dos antifúngicos de amplo espectro, leva a

considerável aumento no número de pessoas que não conseguem a cura da doença além de um aumento no custo do tratamento (GUINEA et al., 2010).

As infecções fúngicas de origem hospitalar passaram a ser de grande importância nos últimos anos, pelo seu aumento progressivo e pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Muitas dessas infecções são de origem endógena e outras podem ser adquiridas por via exógena, pelas mãos dos trabalhadores da área da saúde, infusos contaminados, biomateriais e fontes inanimadas ambientais (DINIZ et al., 2005).

Estudos tem demonstrado que aves silvestres que habitam regiões urbanas, têm sido importantes hospedeiros de patógenos humanos. Estas aves colonizam praças e parques, sendo potencialmente polinizadores destes patógenos oportunistas, principalmente na proximidade de áreas de risco, tais como hospitais, sendo um problema para a saúde pública (LORD et al., 2010).

Com o surgimento dos antimicrobianos, utilizados no tratamento de doenças infecciosas, aumentou-se a expectativa de vida dos pacientes e foi possível combater diversas doenças, sendo estes de enorme importância não apenas na área de saúde, como também na economia. Atualmente, diversos antimicrobianos têm sido indicados no tratamento de candidíases, no entanto a literatura tem demonstrado a ocorrência de cepas com sensibilidade diminuída e outras com resistência *in vivo* e *in vitro* a determinados quimioterápicos (DALAZEN et al., 2011). A introdução dos antifúngicos azólicos representou grande avanço no tratamento das infecções fúngicas, porém seu amplo emprego como profilaxia para pacientes imunocomprometidos, como no tratamento de leveduroses, tem favorecido a seleção de cepas resistentes a este grupo, principalmente por espécies de *Candida* não *albicans* (DALAZEN et al., 2011).

A utilização excessiva ou a má utilização de substâncias destinadas a destruir ou a inibir o desenvolvimento fúngico favoreceram o desenvolvimento de microrganismos resistentes, tornando-se um grande problema de saúde pública. Levando à necessidade da descoberta de novos candidatos a protótipo de um fármaco antifúngico (KATHIRAVAN et al., 2012). Nesse sentido, as propriedades antifúngicas de uma série de tiazolidinonas obtidas via síntese orgânica (GOUVÊA et al., 2012) farão parte do estudo desta dissertação.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

- Identificar um novo composto não citotóxico e farmacologicamente ativo *in vitro* contra fungos, a partir de uma série de moléculas de origem sintética.

### Objetivos Específicos:

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) de 19 moléculas de origem sintéticas da classe das tiazolidinonas frente às leveduras *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum* spp., *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon asahii* e *Rhodotorula* spp.;
- Avaliar o efeito citotóxico das moléculas de origem sintéticas, da classe tiazolidinonas frente às células fibroblastos de ratos 3T3/NIH.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### Fungos e Micoses

Existem na natureza mais de 250 mil espécies de fungos conhecidas, porém somente cerca de 300 aproximadamente foram identificadas em processos patológicos em seres humanos ou animais (SIDRIM et al., 2004).

Diversos fungos, presentes no meio ambiente ou integrantes da microbiota normal, podem em determinadas situações, passar de sapróbios para patógenos, provocando quadros clínicos variáveis, indo desde processos febris benignos, a septicemias algumas vezes fatais (LACAZ et al., 2002).

Os fungos são microrganismos que constituem um grupo diversificado e abundante na natureza. Pertencentes ao reino Fungi estão atualmente distribuídos em sete filos: Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Basidiomycota e Ascomycota, sendo estes dois últimos incluídos no sub-reino Dikarya (HIBBET et al., 2007). São caracterizados por estruturas unicelulares ou multicelulares e classificados de acordo com sua morfologia em filamentosos, leveduras e dimórficos (PRADO, 2007). Sendo classificados como seres heterotróficos por não possuírem pigmentos fotossintéticos, são seres eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo, possuem uma membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis. Demonstrando tanta similaridade com células dos mamíferos, um aspecto que representa um sério problema no tratamento das infecções fúngicas. (SIDRIM et al., 2004).

Os fungos também possuem parede celular, que é uma estrutura rígida responsável pela proteção da célula. A parede celular é composta de modo geral, por glucanas, mananas, quitinas, proteínas e lipídeos. As glucanas e mananas estão combinadas com proteínas, formando as glicoproteínas, manoproteínas e glicomanoproteínas (SCHAECHTER et al., 2002).

Estudos citoquímicos demonstraram que cada camada da parede celular possui um polissacarídeo dominante. As camadas mais internas contêm beta 1-3 glucanas e mananas, enquanto as mais externas contêm mananas e beta

1-6 glucanas, enquanto a primeira e a terceira camadas são mais ricas em mananas (TRABULSI et al., 2004).

As glucanas nas células fúngicas são normalmente polímeros de D-glucose, ligados através de pontes betaglicosídicas. As mananas, polímeros de manose, representam o material amorfo da parede. A quitina é o principal componente estrutural da parede celular fúngica. Os lipídeos estão presentes como compostos polares e apolares. Os principais lipídeos apolares são os triacilgliceróis e os esteróis, e os polares são os diacilglicerofosocolinas e diacilgliceroctanolaminas (SCHAECHTER et al., 2002; TRABULSI et al., 2004).

Outro componente da célula fúngica é a membrana plasmática, que atua como uma barreira semipermeável, no transporte ativo e passivo, para dentro e para fora da célula, sendo constituída por uma porção hidrofóbica e hidrofílica. As membranas das células dos fungos possuem em sua constituição química esteróis, que não são encontradas nas células bacterianas, e onde vai atuar a maioria dos antifúngicos (SCHAECHTER et al., 2002).

As infecções fúngicas são uma ameaça contínua e grave para a saúde. Estas infecções em seres humanos podem ser classificadas em:

1. reações alérgicas a proteínas fúngicas;
2. reações a toxinas produzidas por certos fungos;
3. infecções (micoses).

As micoses podem ser classificadas, segundo os tecidos e órgãos atingidos em micoses superficiais, de localização nas camadas mais superficiais da pele ou dos pêlos; micoses cutâneas ou dermatomicoses, localizadas na pele, no pêlo ou nas unhas; micoses subcutâneas; micoses sistêmicas e/ou profundas atingindo, principalmente, órgãos internos e vísceras, e as micoses oportunistas que atingem os pacientes imunocomprometidos por doença de base, como câncer, diabetes, ou aqueles que são submetidos a tratamentos com uso de corticoidoterapia, imunossupressores e antibioticoterapia (TRABULSI et al., 2004).

Durante as últimas décadas, as micoses passaram a ser uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos. Devido principalmente a infecções como a AIDS, quimioterapia cancerígena e transplantes, houve um aumento dramático das infecções fúngicas em

humanos. Existem também, as Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) produzidas por fungos em indivíduos com maior vulnerabilidade, como recém-nascidos, pacientes que recebem quimioterapia, transplantados, pacientes que sofreram queimaduras, além daqueles com imunodeficiência adquirida (AIDS). Estes pacientes, estão mais suscetíveis a mudança para as infecções provocadas por *Aspergillus* spp., *Candida* spp. entre outros resistentes aos antifúngicos disponíveis (ZACCHINO et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2012).

Indivíduos saudáveis são suscetíveis a uma série de infecções, cutâneas, subcutâneas e, em certos casos, sistêmicas que causam uma variedade de enfermidades que variam de “pé de atleta” até infecções fúngicas graves, como por exemplo: histoplasmose. Muitas infecções fúngicas são causadas por patógenos oportunistas que podem ser de origem endógena como no caso de infecções por *Candida* spp. ou adquiridas no ambiente, como por exemplo, causadas por *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp. (KATHIRAVAN et al., 2012). Estas infecções causadas pelos patógenos oportunistas ocorrem, por que o equilíbrio entre o microrganismo e os mecanismos de defesa do paciente é rompido. Isto pode ser provocado pela queda de resistência do paciente, utilização de procedimentos invasivos com destaques para sondas e cateteres, ou pelo emprego de antibióticos, que matam as bactérias que competem com os fungos no organismo (SCHAECHTER et al., 2002).

### **Leveduras e leveduroses**

A maioria dos fungos existe em uma das duas formas morfológicas básicas, isto é, como fungos filamentosos ou leveduras unicelulares. Porém, alguns são dimórficos e alternam as duas formas em resposta às condições ambientais, principalmente temperatura (FISHER et al., 2004).

As leveduras existem como populações de células esféricas únicas, não conectadas, de maneira semelhante a muitas bactérias, apesar de serem cerca de dez vezes maiores do que uma célula bacteriana típica e com características eucarióticas (FISHER et al., 2004).

*C. albicans* é o agente patogênico mais importante dentre as leveduras do gênero *Candida*, normalmente um comensal da cavidade oral e do trato gastrointestinal de seres humanos.

Para a identificação das espécies do gênero *Candida* spp. muitos aspectos são levados em consideração, como morfologia, capacidade de formar tubo germinativo, assimilação de carboidratos, assimilação de nitrogênio e fermentação de carboidratos (SIDRIM et al., 2004).

Em animais as leveduras do gênero *Candida* são isoladas em diferentes sítios, como o tubo digestivo, mucosas e pele, embora seja um microorganismo sapróbio em homens e animais, um desequilíbrio no binômio parasito-hospedeiro, pode torná-lo agente de infecções (BRITO, 2005).

Já em humanos, *Candida* spp. é um importante patógeno, tendo ocorrência cosmopolita, embora existam algumas diferenças regionais na prevalência de padrões de infecção. Estudos demonstram que existem numerosos fatores predisponentes à candidose e geralmente é possível encontrar-se uma causa para a infecção. Uma exceção bastante comum a essa regra é a candidose vaginal, onde a maioria das mulheres com essa condição não apresenta fator predisponente detectável (MIDGLEY et al., 1998). Entretanto outros estudos mostram que existem doenças bases que podem levar a candidose vulvovaginal, principalmente em pacientes grávidas, diabéticas, que receberam terapêutica microbiana prolongada ou que fazem uso de contraceptivos orais (DALAZEN et. al, 2011).

*C. albicans* também causa infecções crônicas e superficiais em indivíduos saudáveis, como exemplo da candidíase vaginal. Embora a *C. albicans* seja reconhecida como a mais patogênica do gênero, nos últimos anos, outras espécies de *Candidas* tiveram um importante envolvimento nas doenças como, as espécies não-*albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* são consideradas como microrganismos comuns da microbiota do corpo humano e atualmente, também responsáveis por infecções humanas (KATHIRAVAN et al., 2012). Estima-se que 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, sendo que, destas, 40% a 50% vivenciam novos surtos e em 5% a candidíase torna-se recorrente. Por outro lado, 20% a 25% das mulheres saudáveis e assintomáticas apresentam culturas positivas para leveduras (DALAZEN et. al, 2011).

Embora possa acometer todas as faixas etárias, crianças e idosos são particularmente susceptíveis à candidose superficial, refletindo provavelmente

a imaturidade ou senescência de suas respostas imunes (MIDGLEY et al., 1998).

A candidose oral ou sapinho é uma infecção comum de idosos, de usuários de próteses, de recém-nascidos e pacientes imunocomprometidos. É a manifestação infecciosa mais comum que ocorre como complicação na AIDS. Existem vários tipos diferentes de candidose orofaríngea que podem ser amplamente distinguidas por sua cronicidade e aspecto clínico (MIDGLEY et al., 1998). Nos últimos anos, o oportunismo das doenças causadas por fungos vem se tornando cada vez maior e de difícil tratamento, principalmente em virtude da emergência de novas espécies, bem como devido a diminuição da suscetibilidade aos antifúngicos (KATHIRAVAN et al., 2012).

Outra levedura “emergente” é *Rhodotorula* spp., um gênero que apresenta colônias cor-de-rosa, sendo comensais, das mucosas e trato digestório e urinário de seres humanos e animais, classificadas na família Cryptococcaceae. É um agente patogênico oportunista emergente e já foram isoladas de fezes humanas, urina, unhas, pele, escarro, no trato digestivo e adenoides. Embora o primeiro relato sobre fungemia de *Rhodotorula* spp. remonte a 1960, durante as duas últimas décadas, casos de fungemia tem aumentado consideravelmente em pacientes imunocomprometidos que fazem o uso de cateter e também, muitos casos de fungemia associados a endocardite, meningite, peritonite e endoftalmite (TUON et al., 2008). No projeto da Vigilância Sanitária, ARTEMIS, *Rhodotorula* spp. foi a quarta levedura isolada a partir de amostras clínicas, enquanto a *R. mucilaginosa* (antiga *R. rubra*) foi a causa mais comum de fungemia, com um caso fatal em paciente de UTI, seguido de *R. glutinis* e um caso fatal de *R. mucilaginosa* num paciente de UTI (PFALLER, et al., 2009).

As infecções fúngicas não associadas às espécies de *Candida* spp. tem aumentado significativamente nas últimas duas décadas. Dentre estas, as infecções por *Trichosporon asahii* podem apresentar grande variedade de manifestações clínicas, desde acometimento cutâneo superficial até quadros sépticos graves em pacientes imunodeprimidos. Desde o primeiro relato de caso de *T. asahii* disseminado em um paciente com leucemia em 1970, casos esporádicos são relatados todos os anos. O *T. asahii*, anteriormente conhecido como *Trichosporon beigelii* e tradicionalmente descrito como causador de

infecções oportunistas levando ocasionalmente a quadros disseminados em pacientes neutropênicos e imunossuprimidos (JÚNIOR et al., 2008).

Estudos mostram também infecções causadas por *Cryptococcus neoformans*, patógeno oportunista que normalmente infecta pacientes imunocomprometidos, incluindo portadores do vírus da AIDS. Neste mesmo estudo, foi relatado o aumento de infecções fúngicas causadas pelo *Cryptococcus gattii*, aparentemente um patógeno primário que afeta as pessoas imunocompetentes e tem causado significativos surtos em humanos no Canadá e em animais na Austrália. Dados clínicos sugerem que a resposta à terapia antifúngica é mais lenta na infecção por *C. gattii* que em *C. neoformans*. E constataram que *C. gattii* pode ser menos suscetíveis do que *C. neoformans* com agentes antifúngicos, em particular, ao fluconazol (CHONG et al., 2010).

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são agentes etiológicos da pneumonia criptocócica e meningite, síndromes potencialmente letais associadas à AIDS. Uma outra espécie, *Cryptococcus laurentii*, foi recentemente identificada em vários casos de doença humana. Os sintomas incluem hipotensão, febre e uma grande variedade de outros sintomas clínicos, dependendo dos órgãos afetados. A literatura também levanta a hipótese do envolvimento do ganso-do-canadá (*Branta canadensis*), que vive próximo ao homem e habita a zona rural e áreas suburbanas, podendo ser um importante reservatório de *C. laurentii*. Estes dados levantam preocupações com relação a este fungo, que pode apresentar-se como patógeno humano, causando uma série de doenças, como: meningite, doenças pulmonares e oftalmológicas (FILION et al., 2006).

*Geotrichum* spp. é um saprófita e encontra-se sobre uma variedade de frutas e legumes. Tem sido relatado como causador de doença em indivíduos imunocomprometidos, afetando principalmente pacientes com doenças sistêmicas como diabetes *mellitus* e aqueles com neoplasias. Clinicamente, é semelhante à candidíase e pode causar infecção oral, cutânea, vaginal ou infecção sistêmica (VERGHESE et al., 2003).

## Agentes Antifúngicos

Os antifúngicos são fármacos responsáveis pela inibição do crescimento ou destruição da célula fúngica. Eles podem ser de uso tópico ou de uso sistêmico (Tab. 1), usados em pacientes imunodeprimidos com o profilaxia, e terapêuticamente. Os agentes tópicos são a primeira opção para infecções localizadas, enquanto em infecções generalizadas e mais graves usam-se agentes sistêmicos.

Tabela 1. Descrição dos antifúngicos sistêmicos e tópicos indicados no Formulário Terapêutico Nacional em 2008.

<b>1. SISTÊMICOS</b>	<b>2. TÓPICOS</b>
<b><u>Caspofungina</u></b>	<b>Cetoconazol</b>
<b>Flucitosina</b>	<b><u>Ciclopirox</u></b>
<b><u>Griseofulvina</u></b>	<b><u>Haloproquina</u></b>
<b><u>Itraconazol</u></b>	<b>Miconazol</b>
<b>Fluconazol</b>	<b>Nistatina</b>
<b>Cetoconazol</b>	<b>Terbinafina</b>
<b>Anfotericina B</b>	<b><u>Tolnaftato</u></b>

Os antifúngicos são classificados em agentes químicos, clássicos e atuais, e antibióticos. A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de fármacos antibacterianos disponíveis. Como consequência das infecções fúngicas representarem o parasitismo de um organismo eucariótico sobre um outro eucariótico (humano e animal), com diferenças fisiológicas muito pequenas, quando comparado a infecções bacterianas, é necessário que os antifúngicos tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais importantes (LACAZ et al., 2002).

Os fármacos antifúngicos exercem ações fungistáticas ou fungicidas, direta ou indiretamente e têm características especiais quanto ao mecanismo de ação (Fig. 1), via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas. Podem ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química,

sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina), excetuando-se a flucitosina e a griseofulvina, que atuam na síntese do ácido nucleico (LACAZ et al., 2002) e as equinocandinas, constituem a classe mais nova de agentes antifúngicos que atuam na parede celular (MARTINEZ, 2006).

Nos últimos anos, o uso de novos e mais efetivos fármacos (antibacterianos e imunossupressores) aumentaram a sobrevivência dos pacientes, porém tornaram estes pacientes mais suscetíveis às infecções micóticas (MARTINEZ, 2006).

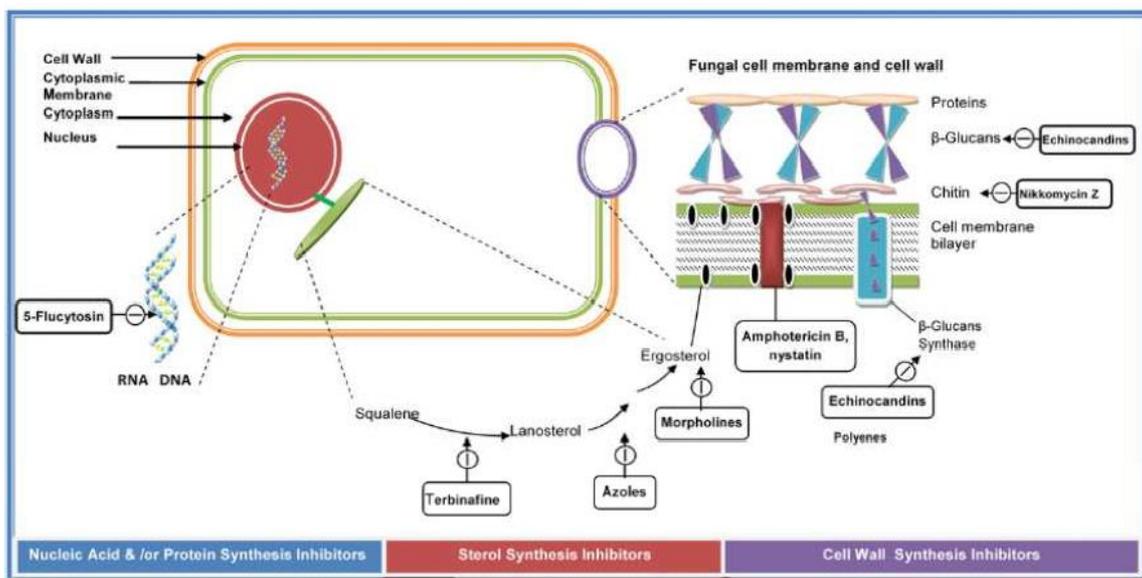


Figura 1. Diferentes alvos de ação na célula fúngica para diferentes princípios antifúngicos.

### Agentes Químicos Clássicos

No grupo dos agentes químicos estão incluídos aqueles medicamentos que apresentam, de maneira geral, espectro reduzido contra fungos, e outros que não são antimicóticos no sentido direto, mas atuam como fungistático de modo indireto ao modificar as condições locais. Entre esses últimos, estão sais de metais pesados (mercúrio, prata, zinco, cobre); substâncias contendo íons oxidantes (permanganato de potássio, água oxigenada e cromatos); derivados do anel benzênico (unguento de whitfield); sais quaternários de amônio; ácidos graxos orgânicos e derivados (ácido propiônico, undecilênico, butírico, láctico e caprílico); violeta genciana utilizada em solução aquosa ou alcoólica a

1%; tintura de castellani elaborada a base de fuccina e a cloroiodohidroxiquinoleína ou clioquinol; haloprogin; tolnaftato e tolciclato; compostos sulfurados, halógenos ou halogenóforos e derivados (iodo, cloro, bromo) (MARTINEZ, 2006).

## **Agentes Químicos Atuais**

### **Azóis**

Os azóis são antimicóticos, químicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras e bolores, apresentam um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1. Os imidazóis foram descobertos em 1949, sendo que o nitrato de imidazol foi utilizado experimentalmente pela primeira vez em 1967 (MARTINEZ, 2006).

Os imidazóis e triazóis compreendem um grande grupo de fungicidas sintéticos, incluindo o clotrimazol, o cetoconazol, o miconazol, itraconazol e o fluconazol. Este grupo parece afetar as membranas plasmáticas dos fungos, interrompendo a síntese dos esteróis da membrana. Todos estes agentes são usados topicamente, em cremes e soluções, para controlar infecções causadas por fungos superficiais e infecções causadas por *Candida* spp. na pele, unhas, boca e vagina. Assim como tratamento de infecções sistêmicas estes antifúngicos, dependendo da dose, podem ser fungistático (BLACK et al., 2002).

O principal mecanismo de ação dos azólicos é a redução na síntese do ergosterol, através da inibição de enzimas do Complexo Citocromo P450 da levedura, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular (PENILDON, 2006).

Dentre os imidazois, o cetoconazol foi o primeiro derivado azólico de uso oral usado em clínica. Também tem sido administrado por via oral e uso tópico, tendo amplo potencial terapêutico para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos, especialmente quando outros agentes antifúngicos não foram eficientes. Alguns pacientes, entretanto, apresentam irritações cutâneas de suaves a graves com tais agentes tópicos. A distribuição do cetoconazol é

limitada e sua penetração no líquido cefalorraquidiano é mínima. A resposta ao tratamento oral é relativamente lenta, sendo menos útil em infecções graves e agudas (PENILDON, 2006).

O econazol e o miconazol são imidazóis indicados para uso tópico devido a sua toxicidade. O econazol é considerado menos ativo contra as leveduras, mas o mais ativo para fungos filamentosos. O miconazol possui uma estrutura química semelhante ao econazol, sendo ativo contra todos os fungos patogênicos e oportunistas, exceto *Aspergillus* spp. e *Phycomycetes* spp. Raramente existe resistência a ele. Utilizado no tratamento da maioria das dermatofitoses, mas também nas candidíases cutâneas e vaginal. Apresenta várias formas farmacêuticas que propiciam tratamento em micoses de diferentes localizações (PENILDON, 2006).

O itraconazol é um derivado triazólico sintético, que apresenta um largo espectro de ação, eficaz em tratamento e prevenção de recorrência de histoplasmose em pacientes imunocomprometidos, sendo o método prático e menos tóxico do que anfotericina B. Apresenta maior espectro de ação que cetoconazol e fluconazol, podendo ser ativo contra cepas de *Candida* spp. resistentes, *Aspergillus* spp. e *Sporothrix* spp.. Geralmente é bem tolerado, sendo referidos efeitos adversos em 5% a 8%, principalmente náuseas, tonturas, cefaléia e dor abdominal (PENILDON, 2006).

O fluconazol é um antifúngico triazólico, que age na inibição da síntese de esteróide fúngico e praticamente não altera a síntese do ergosterol dos mamíferos, sendo menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis, estando disponível em formulações oral e intravenosa. Eficiente para prevenção de Infecções Fúngicas Invasivas (IFI), este antifúngico tem sido utilizado rotineiramente em pacientes humanos com micoses superficiais e sistêmicas, levando a problemas de resistência de cepas fúngicas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, portadores de candidose por *Candida krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (PENILDON, 2006).

O posaconazol pertence a nova classe dos azóis e apresenta potente inibição, eles inibem enzimas do complexo citocromo P-450, inibindo a síntese do ergosterol na membrana plasmática do fungo, tendo um potente espectro de ação atuando contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces*

*dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides immitis* e *Aspergillus* spp. (MANAVATHU et al., 2000; TORRES et al., 2005).

O voriconazol é um novo antifúngico triazólico com potente ação e largo espectro de atividade *in vitro*, atua como outros antifúngicos azólicos inibindo a enzima 14 alfa-desmetilase, dependente do citocromo P-450, essencial para a biossíntese de ergosterol. O voriconazol é ativo *in vitro* frente a uma série de infecções fúngicas em modelos animais, incluindo infecções sistêmicas com *Aspergillus* spp., *Candida* spp., menos sensíveis a outros azólicos e *C. neoformans* (MANAVATHU et al., 2000; PENILDON, 2006).

### **Alilaminas**

A terbinafina é um antifúngico químico, do grupo das alilaminas, que inibe a ação da esqualeno epoxidase, enzima importante para a formação do ergosterol na membrana fúngica, resultando em morte celular. O princípio ativo tem ação fungicida em dermatófitos e no gênero *Candida* spp. apresenta efeito fungicida ou fungistático dependendo da espécie considerada. O fármaco não interfere no metabolismo de hormônios ou outros mecanismos. Liga-se fortemente as proteínas plasmáticas, difundindo-se rapidamente através da derme e concentra-se no estrato córneo lipofílico. Os efeitos colaterais são leves ou moderados e temporários e os sintomas mais frequentes são gastrointestinais ou reações cutâneas sem gravidade (PENILDON, 2006).

### **Flucitosina**

É um análogo hidrossolúvel da pirimidina, relacionado com o fármaco quimioterápico fluorouracil. O espectro antifúngico da flucitosina é muito mais estreito do que o da anfotericina B (PENILDON, 2006). A flucitosina é um fungicida diferente dos outros em relação ao sítio de ação, pois tem como alvo o DNA dos fungos. O fármaco é captado por células fúngicas através da enzima citosina permease, e transformado intracelularmente em fluorouracil e, depois, em monofosfato de 5-fluoruridina que, respectivamente, inibem a síntese do DNA e do RNA dos fungos. O fármaco é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, distribuindo-se amplamente pelo corpo, atingindo concentrações elevadas no líquido cefalorraquidiano. Os efeitos colaterais

podem ser anemia, leucopenia e trombocitopenia, náuseas, vômitos, diarreia e enterocolite grave e hepatomegalia (PENILDON, 2006).

### **Equinocandinas**

Constituem a classe mais nova dos agentes antifúngicos como: caspofungina. Tratam-se de grandes peptídeos cíclicos ligados a um ácido graxo de cadeia longa e diferentemente da anfotericina B e dos azólicos, as equinocandinas têm como alvo a parede celular, inibindo a formação de componentes da parede celular ( $\beta$  - 1,3 glucano) (MARTINEZ, 2006).

### **Antibióticos**

#### **Poliênicos**

A anfotericina B agrupa-se, juntamente com a nistatina e natamicina, aos antibióticos poliênicos, cuja estrutura é macrocíclica e caracterizada por átomos de carbono divalentes dispostos em série. Atua como fungicida ligando-se ao ergosterol, esteróide presente na membrana de fungos sensíveis, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos (BLACK et al., 2002; MARTINEZ, 2006).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico derivado do *Streptomyces nodosus*, utilizado contra agentes causadores de micoses profundas. É eficaz contra fungos patogênicos e oportunistas, porém ineficiente em relação à dermatoses superficiais. Indicado principalmente para o controle de infecções fúngicas sistêmicas graves. Suas principais desvantagens são: dificuldades de administração e nefrotoxicidade. Porém, continua sendo um fármaco de primeira escolha para micoses sistêmicas devido a sua eficácia e baixo custo (PENILDON, 2006). Seu mecanismo de ação se baseia na ligação com os esteróis da membrana celular, provocando uma alteração funcional com saída de metabólitos essenciais, nucleotídeos e proteínas, levando à morte celular. A anfotericina B, por se ligar aos esteróis das membranas das células dos pacientes humanos, ocasiona uma grande toxicidade (PENILDON, 2006).

A nistatina, isolada do *Streptomyces noursei*, também pertence ao grupo dos antibióticos poliênicos e é levemente hidrossolúvel. Atua lesando a membrana citoplasmática dos fungos sensíveis e sua ação pode ser tanto

fungicida como fungistática, estando indicada como terapia tópica em micoses superficiais, de pele e mucosa, principalmente na candidose, sendo extremamente tóxica para uso parenteral. Nas doses terapêuticas, por via oral, a absorção pelo trato gastrointestinal é praticamente inexistente. Outros fungos causadores de micoses superficiais não respondem à nistatina, pois esta não penetra suficientemente na pele para atingir o foco de infecção (PENILDON, 2006).

### **Não Poliênicos**

Griseofulvina é um medicamento antifúngico isolado do *Penicillium griseofulvum*, de ação fungistática e ativo frente a dermatófitos. Utilizada em terapêutica tanto humana como animal, no combate a micoses superficiais e nas unhas. A griseofulvina inibe a mitose de células fúngicas produzindo ruptura da estrutura do fuso acromático mitótico, inibindo a metáfase da divisão celular, afetando o sistema microtubular dos fungos. Deposita-se em graus variáveis nas células precursoras de queratina da pele, cabelo e unhas em graus variáveis, o que aumenta a resistência da queratina ante a invasão fúngica (KATHIRAVAN et al., 2012).

### **Resistência Fúngica**

A resistência de leveduras aos antifúngicos, assim como em qualquer outro microrganismo, pode ser qualificada como intrínseca, natural ou adquirida. A resistência intrínseca caracteriza-se quando todos os membros da espécie são resistentes a certo fármaco ou classe de agente antifúngico antes de serem expostos a este, devido à expressão genética dessa condição. A resistência natural, por sua vez, caracteriza-se quando algumas cepas de determinada espécie apresentam resistência. Já a resistência secundária ou adquirida se desenvolve em resposta à exposição ao fármaco (DALAZEN et al., 2011).

Num estudo realizado no Sul do Brasil com isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais, observou-se um predomínio da resistência adquirida, pois boa parte dos isolados clínicos era oriunda de pacientes que foram tratados com antifúngicos anfotericina B, fluconazol e miconazol, mas que recidivaram à candidíase. Atualmente, diversos antifúngicos têm sido

indicados no tratamento de candidíases oral e vaginal, no entanto a literatura tem demonstrado a ocorrência de cepas com sensibilidade diminuída e outras resistentes *in vivo* e *in vitro* a determinados quimioterápicos (DALAZEN et. al, 2011).

Devido a problemas como seletividade, toxicidade e perfis de resistência dos fungos aos antifúngicos disponíveis, atualmente os fármacos comumente utilizados na terapia antifúngica são os poliênicos e os agentes azólicos, e no caso da terapia para as micoses invasivas o armamento quimioterápico é ainda mais reduzida, sendo a anfotericina B, itraconazol e voriconazol as drogas mais indicadas. Apesar da anfotericina B ser considerada o fármaco padrão ouro para essas infecções, o seu uso tem sido limitado devido ao seu alto grau de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (KATHIRAVAN et al., 2012).

Embora o arsenal de fármacos antifúngicos tenha se expandido, atualmente fármacos antifúngicos disponíveis não atendem à crescente requisição de infecções mais complexas. O desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos tem sido constantemente requerido na terapia clínica (KATHIRAVAN et al., 2012).

## **A importância das tiazolidinonas como fonte de potenciais antifúngicos**

Muitas classes de compostos orgânicos têm demonstrado promissores efeitos biológicos e a literatura científica relata um crescimento significativo de novas moléculas com potência similar ou superior aquela de um fármaco, sendo que muitos deles encontram-se em estudos pré-clínicos e clínicos avançados e pormenorizados (KATHIRAVAN et al., 2012). Dentre estas inúmeras moléculas biologicamente ativas que contém heteroátomos diversos, tais como enxofre, nitrogênio e oxigênio sempre chamaram a atenção do químico ao longo dos anos, principalmente devido à sua importância biológica. As tiazolidinonas são uma classe de heterociclos biologicamente ativos formados por um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonilo na posição 4, conforme a (Fig. 2).

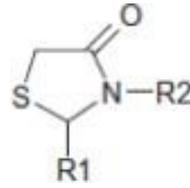


Figura 2. Estrutura geral de tiazolidinonas.

Na literatura existem inúmeros estudos mostrando as propriedades biológicas das tiazolidinonas como compostos antituberculosos, agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e como antiviral, especialmente como agente anti-HIV (CUNICO et al., 2008; JAIN et al., 2012). A figura 3 apresenta alguns exemplos de substâncias que possuem em sua estrutura o anel tiazolidinônico com atividade antifúngica comprovada.

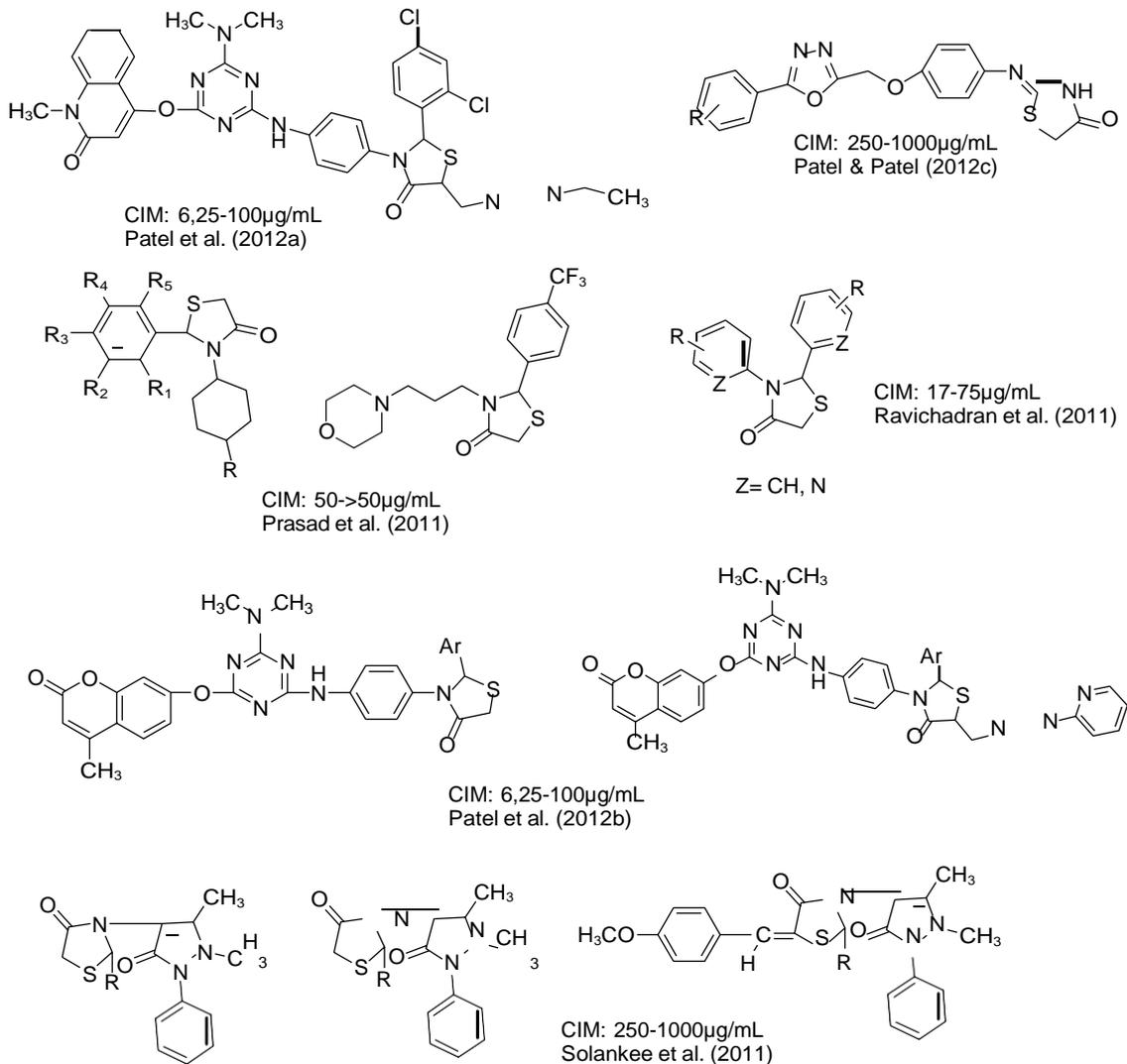


Figura 3. Estruturas de tiazolidinonas com atividade antifúngica.

### **Métodos de análise da atividade antifúngica *in vitro***

A atividade antifúngica *in vitro* é realizada através de antifungigrama, a fim de determinar a potência de um fármaco em solução, sua concentração em líquidos e tecidos corporais e a sensibilidade de um determinado microrganismo a concentrações conhecidas deste fármaco (JAWETZ et al., 2005).

Os microrganismos variam em suas sensibilidades a diferentes agentes quimioterápicos e as susceptibilidades podem mudar com o decorrer do tempo. Em condições ideais, o antifúngico apropriado para tratar uma infecção específica deveria ser testado e determinado antes que qualquer fármaco fosse administrado. Frequentemente, são necessários testes para mostrar qual o antifúngico que atua no microrganismo. Diversos métodos - difusão em ágar, método de diluição e métodos automatizados – estão disponíveis para este fim (BLACK et al., 2002).

No método de difusão em ágar ou método de Kirby-Bauer, uma quantidade padrão do microrganismo patogênico é semeada uniformemente sobre uma placa contendo meio de cultivo específico e filtros impregnados com concentrações específicas de agentes quimioterápicos selecionados são colocados na superfície do ágar e a cultura com os discos antifúngicos é incubada (BLACK et al., 2002).

Durante a incubação, cada agente quimioterápico se difunde, a partir do disco, em todas as direções. Os agentes com pesos moleculares mais baixos se dispersam mais depressa do que aqueles com peso molecular mais alto. Áreas claras denominadas zonas de inibição aparecem no ágar em volta dos discos onde os agentes inibem o crescimento do microrganismo no ágar em volta dos discos. Foram estabelecidas medidas padronizadas de diâmetros de zonas para os meios individuais, quantidades de microrganismos e concentrações do fármaco, correlacionadas aos diâmetros das zonas, a fim de se determinar se os organismos são sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes ao fármaco (BLACK et al., 2002).

Mesmo quando a inibição é adequadamente interpretada em um teste de difusão em disco, o agente quimioterápico testado pode não curar uma infecção *in vivo*. O fármaco inibirá provavelmente o microrganismo causador, mas poderá não matar quantidade suficiente do organismo para controlar a

infecção. Um agente fungicida é, frequentemente, necessário para eliminar um organismo infeccioso, e o método de difusão em disco não garante que o agente fungicida seja identificado. Ainda mais, resultados obtidos *in vivo* diferem com frequência dos que são obtidos *in vitro*. Os processos metabólicos em organismos vivos podem inativar ou inibir o composto antifúngico (BLACK et al., 2002).

O método de diluição em caldo para testar a sensibilidade antifúngica foi praticado, pela primeira vez, em tubos de caldos de cultura; entretanto hoje é realizado em orifícios rasos ou microplacas padronizadas. Neste método, uma quantidade constante de inóculo fúngico (espécime) é introduzida em meios de cultura contendo concentrações decrescentes de um agente quimioterápico. Após incubação, os tubos ou os orifícios são examinados, e é determinada a mais baixa concentração do fármaco que impede o crescimento visível do microrganismo (indicado pela turbidez ou depósitos em pontos dos organismos em crescimento). Esta concentração é a concentração inibitória mínima (MIC) para um determinado fármaco atuando sobre um microrganismo específico. Este teste pode ser feito para diversos fármacos simultaneamente, usando-se diversos conjuntos de tubos ou orifícios (BLACK et al., 2002).

A diferença entre realizar o método de diluição em tubos e o método de diluição em microplacas, seria que, em tubos leva mais tempo e, portanto, é dispendioso. E a diferença entre este método e o método da difusão em ágar, é que o primeiro faz a distinção entre agentes fungicidas, que matam microrganismos, e agentes fungitáticos que apenas inibem seu crescimento. Amostras provenientes dos orifícios onde não houve crescimento, mas que podem conter microrganismos inibidos, podem ser usadas para inocular meios que não contenham agente quimioterápico. Neste teste, a concentração mais baixa do quimioterápico que não permita qualquer crescimento na segunda inoculação ou subcultura constitui a Concentração Fungicida Mínima (MFC). Assim, pode ser determinado tanto um eficiente agente quimioterápico quanto a concentração apropriada para controlar uma infecção. Esta concentração deve ser mantida nos locais da infecção, pois é a concentração mínima que vai curar a doença (BLACK et al., 2002).

O CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, entidade responsável pela normatização de técnicas de laboratório clínico nos Estados

Unidos, padronizou em um documento (M27-A3) os testes de sensibilidade de leveduras frente à drogas antimicóticas específicos, definindo variáveis como método e preparação de inóculo, composição, pH do meio a ser utilizado, temperatura, tempo de incubação e determinação dos critérios de leitura do teste (COLOMBO et al., 2004).

Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (AFST-EUCAST), foi formado em 1997 com a intenção de trabalhar com CLSI para alcançar um consenso internacional, constituído por vários comitês, Escmid, ECDC e comitês europeus. EUCAST não lida com políticas de antibióticos, de vigilância ou de contenção de resistência ou de controle de infecção. Possuem uma subcomissão de testes de susceptibilidade antifúngica e sobre os métodos de detecção dos mecanismos de resistência de importância clínica e / ou epidemiológica. O Comitê Gestor é o órgão de decisão. É apoiado por uma Comissão Geral, com representantes de países europeus e outros, FESCI e ISC. O Comitê Gestor também consulta sobre as propostas EUCAST com especialistas nas áreas de doenças infecciosas e microbiologia, empresas farmacêuticas e fabricantes de dispositivos de testes de susceptibilidade (STOPPA et al., 2009).

Os testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas podem ser usados não só nas pesquisas de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca de novos fármacos pela atividade antifúngica de amostras complexas, como extratos vegetais e de amostras puras (STOPPA et al., 2009).

### **Citotoxicidade**

A procura por substâncias dotadas de propriedades biológicas tem se intensificado nas últimas décadas e os ensaios de avaliação da citotoxicidade permitem averiguar os efeitos tóxicos ou proliferativos da amostra-teste em culturas celulares, sendo de extrema importância durante o desenvolvimento de produtos (químicos, farmacêuticos, alimentos, biológicos e físicos) destinados ao uso humano ou em animais (ROGERO et al., 2003).

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos,

principalmente aqueles de aplicação clínica. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a compatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. Estudos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO et al., 2003).

Inicialmente a citotoxicidade das moléculas estudadas, tiazolidinonas, foram realizadas em cultura de células fibroblastos de ratos 3T3/NIH, através do ensaio com sal de tetrazolium (MTT), para avaliar a função metabólica celular por atividade da desidrogenase mitocondrial. Estas células serão avaliadas pela observação microscópica de alterações caracterizadas pela desorganização do tapete celular, bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células, e conseqüentemente aparecimento de alterações morfológicas.

#### **4 ARTIGO**

Texto elaborado conforme as normas da Revista *Mycoses* qualis B2 em Ciências Biológicas II e fator de impacto igual a 2,247.

## **Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone derivatives**

Gabriela H. Marques<sup>b</sup>, Alice Kunzler<sup>a</sup>, Valéria D.O. Bareño<sup>a</sup>, Bruna B. Drawanz<sup>a</sup>, Fabio R.M. Leite,<sup>c</sup> Gustavo G. Nascimento,<sup>c</sup> Patrícia S. Nascente<sup>b</sup>, Geonir M. Siqueira<sup>a</sup>, Wilson Cunico<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Química Aplicada à Bioativos (LaQuiABio). Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – CCQFA, Campus Universitário s/nº, Pelotas, 96010-900, RS, Brazil.*

<sup>b</sup> *Laboratório de Micologia. Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia*

<sup>c</sup> *Núcleo de Biologia Celular e Tecidual (NCTBio). Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia*

Short title (running head): Antifungal activity of thiazolidinones

*Keywords:* thiazolidinones, antifungal activity, cytotoxic activity.

\* Corresponding author.

Professor Wilson Cunico

Universidade Federal de Pelotas

CCQFA

R. Gomes Carneiro 1, caixa postal 354

CEP: 96001-970

Tel.: +55 (53) 3275-7358; fax: +55 (53)3275-7354.

*e-mail address:* wjcunico@yahoo.com.br

## Summary

Thiazolidinones synthesized from multicomponent reaction of 2-heteroarylmethylamine, arenealdehydes and mercaptoacetic acid were tested against the six yeast *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilhermodii*, *Cryptococcus laurentis*, *Trichosporum asahii* and *Rhodotorula* spp. The activities were expressed by the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) and the compounds showed better results to *Rhodotorula* spp and *T. asahii* than other yeasts. The cytotoxicity activity of thiazolidinones against the fibroblast 3T3/NIH cell lines was also described. The antifungal results and the low cytotoxicity observed in this work, guide us for further structural modifications to keep studying this heterocyclic class.

## 1. Introduction

Fungi are one of the major causes of human disease, especially among the immunocompromised and patients with underlying disease. The epidemiologic study in USA showed that the annual number of cases of sepsis caused by fungal organisms increased by 207% between 1979 and 2000. This information associated with the morbidity and mortality of the fungi infections, showed the fungal diseases are an important public health problem.[1]

*Candida* spp. remains the major number of infections caused by yeasts, but there are other yeasts that may be also considered pathogens (i.e., *Cryptococcus neoformans*) or opportunists (e.g., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp. and *Rhodotorula* spp.) that have taken advantage, especially in immunocompromising conditions. Life-threatening infections caused by these fungi might be difficult. The knowledge of the antifungal susceptibilities of *Candida* and *C. neoformans* has been enhanced through global surveillance, however others opportunistic yeast pathogens do not.[2]

The incidence of fungemia also continues to rise and *Candida* spp. is one of the most pathogens isolated from blood. Amphotericin B and fluconazole have been widely used for this treatment. Voriconazole, posaconazole, the echinocandins and currently under investigation azoles have been also used to the treatment of fungemia. However, the mortality rate remains high (30%) especially due the delay initiation or inappropriate antifungal therapy.[3]

Currently, several antifungals have been indicated in the treatment of candidiasis, however the literature has demonstrated the occurrence of strains with reduced sensitivity and other resistant to certain chemotherapeutics both *in vivo*

and *in vitro*. The introduction of azole antifungals represented a breakthrough in the treatment of fungal infections, but their widespread use as prophylaxis for immunocompromised patients and the treatment of yeast infections, has favored the selection of strains resistant to azoles, especially *C. non-albicans* species.[4] Many classes of organic compounds have shown promising biological effects and the literature reports a significant growth of new molecules with similar or greater potency than commercially available drugs, many of them under preclinical and clinical tests.[5,6]

Thiazolidinones are five-membered heterocycles that could be synthesized by two main routes: 1) reaction of  $\alpha$ -haloacetic acid or  $\alpha$ -haloacetic esters with thioamides, thioureas or thiocyanates;[7] 2) multicomponent reaction of mercaptoacetic acid, primary amines and aldehydes or ketones.[8] The second one is the most common protocol and has afforded a huge number of functionalized biologically active thiazolidinones [9] against a broad number of diseases like: antimalarial,[10] antitumoral,[11] antimicrobial,[12] anti-HIV,[13] anti-Alzheimer,[14] anti-inflammatory[15] and antitubercular[16] among others.

So, in continuation of our studies concerning thiazolidinones,[17-20] the aim of this work is to explore the potential of heteroarylthiazolidinones as antifungal agents against five yeasts and explore their cytotoxicity properties against a fibroblast cell lineage.

## **2. Materials and Methods**

### *Chemistry*

All common reagents and solvents were used as obtained from commercial suppliers without further purification. The progress of reactions were monitored by TLC (hexane:ethyl acetate 3:1) and/or by a Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010, Column I.D., 0.25 mm; Column length, 30 meters; Column Head Pressure, 14 psi, program:  $T_0 = 50^\circ\text{C}$ ;  $t_0 = 2.0$  min; rate  $16.0^\circ\text{C}/\text{min}$ ;  $T_f = 250^\circ\text{C}$ ;  $t_f = 10.0$  min; Inj. =  $250^\circ\text{C}$ ; Det. =  $270^\circ\text{C}$ . The melting points were determined using open capillaries on a Fisatom model 430 apparatus and are uncorrected.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker Ac-200F spectrometer ( $^1\text{H}$  at 200 MHz and  $^{13}\text{C}$  at 50 MHz) in  $\text{CDCl}_3$  containing TMS as in internal standard. The mass spectra were obtained on a Hewlett Packard 6890/MSD5973 GC-MS with a split-splitless injector and equipped with a HP-Innowax capillary column (30 m  $\times$  250  $\mu\text{m}$ ); helium was used as the carrier gas (56 Kpa).

#### *General procedure for 3-(pyridin-2-ylmethyl)-2-arylthiazolidin-4-ones 5*

The thiazolidinones **5a-r** were synthesized according to previously paper published by us.[20]

#### *2-(4-hydroxyphenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one (5l).*

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz,  $\delta$  ppm,  $J_{\text{H-H}}=\text{Hz}$ ): 8.57 (m, 1H); 7.63 (m, 1H); 7.28 (dd, 1H,  $^3J=7.8$ ,  $^4J=1.8$ ); 7.31 (d, 2H,  $^3J=8.6$ ); 6.99 (d, 2H,  $^3J=8.6$ ); 5.93 (d, 1H,  $^4J=1.2$ , H2); 5.10 (d, 1H,  $^2J=14.8$ ,  $\text{CH}_2\text{a}$ ); 3.87 (d, 2H,  $^2J=14.6$ ,  $\text{CH}_2\text{b}$  and H5a); 3.74 (d, 1H,  $^2J=15.0$ , H5b).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\cdot$  (50 MHz, ppm): 171.6 (C4); 148.2, 141.9, 132.1, 129.4, 124.4, 121.9 and 116.3 (aryl); 62.1 (C2); 48.8 ( $\text{CH}_2$ ); 32.5 (C5).

#### *2-(2-cyanophenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one (5p).*

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz,  $\delta$  ppm,  $J_{\text{H-H}}=\text{Hz}$ ): 8.46 (d, 1H,  $^3J=5.1$ ); 8.14 (t, 1H,  $^4J=2.0$ ); 7.97 (d, 1H,  $^3J=8.2$ ); 7.59 (m, 2H); 7.48 (t, 1H,  $^3J=8.2$ ); 7.30 (m, 2H); 5.88 (d, 1H,  $^4J=1.2$ , H2); 5.01 (d, 1H,  $\text{CH}_2\text{a}$ ,  $^2J=14.8$ ); 3.93 (dd, 1H, H5a,  $^2J=15.6$ ,  $^4J=1.4$ ); 3.88 (d, 1H,  $\text{CH}_2\text{b}$ ,  $^2J=15.0$ ); 3.77 (d, 1H, H5b,  $^2J = 15.6$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\cdot$  (50

MHz, ppm): 169.9 (C4); 153.9, 148.7, 141.5, 137.2, 132.9, 130.1, 123.3 and 113.2 (aryl); 115.4 (CN); 62.3 (C2); 47.5 (CH<sub>2</sub>); 32.6 (C5).

*2-(2,6-dichlorophenyl)-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one (5r).*

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, δ ppm, J<sub>H-H</sub>=Hz): 8.53 (d, 1H, <sup>3</sup>J=4.0); 7.69 (m, 1H); 7.64 (td, 1H, <sup>3</sup>J=7.0, <sup>4</sup>J=1.4); 7.35 (m, 1H); 7.12 (m, 2H); 7.01 (d, 1H, <sup>3</sup>J=7.6); 5.88 (d, 1H, <sup>4</sup>J=1.4, H2); 5.01 (d, 1H, <sup>2</sup>J=14.2, CH<sub>2</sub>a); 3.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>b and H5a); 3.70 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.0, H5b). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, ppm): 170.2 (C4); 161.3, 158.8, 149.5, 136.2, 130.8, 129.4, 129.2, 126.8, 122.6 and 122.5; 60.8 (C2); 47.1 (CH<sub>2</sub>); 33.0 (C5).

*General procedure for 2-aryl-3-(furan-2-ylmethyl)thiazolidin-4-ones 6*

A mixture of furfurilamine **2** (1 mmol) and corresponding arenaldehyde **3** (1 mmol) was heated for two hours in toluene (30 mL) at 110 °C with a Dean–Stark trap. After this time, the mercaptoacetic acid **4** (3 mmol) was added and the mixture was heated for more 18 h. The organic layer was washed with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 mL), dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated to give the products. When necessary, the compounds were washed with a hot solution of hexane:ethyl acetate (9:1) to furnished the pure products.

*2-(3-fluorophenyl)-3-(furan-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one (6b)*

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, δ ppm, J<sub>H-H</sub>=Hz): 7.35 (m, 2H); 7.06 (m, 3H); 6.29 (2d, 1H, <sup>3</sup>J = 3.1); 6.13 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 3.1); 5.52 (s, 1H, H2); 4.99 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 15.4, CH<sub>2</sub>a); 3.86 (dd, 1H, <sup>2</sup>J = 15.6, <sup>4</sup>J= 1.5, H5a); 3.72 (2d, 2H, <sup>2</sup>J = 15.5 H5b and CH<sub>2</sub>b). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz, δ ppm, J<sub>C-F</sub>=Hz): 170.9 (C4); 148.4, 145.2 (d, <sup>1</sup>J = 295.4), 141.7, 130.6 (d, <sup>3</sup>J = 8.1), 122.8, 122.7, 116.6 (d, <sup>2</sup>J = 21.4), 114.0 (d, <sup>2</sup>J = 22.4), 110.4 and 109.3 (aryl); 62.5 (C2); 39.1 (CH<sub>2</sub>); 32.7 (C5).

*2-(4-chlorophenyl)-3-(furan-2-ylmethyl)thiazolidin-4-one (6f) [21]*

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, δ ppm, J<sub>H-H</sub>=Hz): 7.34 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8.6); 7.30 (m, 1H); 7.24 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8.6); 6.26 (d, 1H, <sup>3</sup>J=3.4); 6.18 (2d, 1H, <sup>3</sup>J=3.2); 5.65 (d, 1H, <sup>4</sup>J=1.2, H2); 4.99 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.4, CH<sub>2</sub>a); 3.86 (dd, 1H, <sup>2</sup>J=15.6, <sup>4</sup>J=1.2, H5a); 3.74 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.2, CH<sub>2</sub>b); 3.72 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.6, H5b). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz, δ ppm): 169.9 (C4); 148.0; 142.4, 138.4, 134.7, 129.2, 128.3, 111.9 and 108.6 (aryl); 61.2 (C2); 39.5 (CH<sub>2</sub>); 32.3 (C5).

*3-(furan-2-ylmethyl)-2-(4-nitrophenyl)thiazolidin-4-one (6i)*

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, δ ppm, J<sub>H-H</sub>=Hz): 8.27 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8.8); 7.46 (d, 2H, <sup>3</sup>J=8.7); 7.33 (m, 1H); 6.28 (d, 1H, <sup>3</sup>J=3.2); 6.12 (2d, 1H, <sup>3</sup>J=3.2); 5.62 (d, 1H, <sup>4</sup>J=1.4, H2); 4.95 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.4, CH<sub>2a</sub>); 3.88 (dd, 1H, <sup>2</sup>J=15.6, <sup>4</sup>J=1.8, H5a); 3.78 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.4, CH<sub>2b</sub>); 3.75 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.6, H5b). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz, δ ppm): 170.9 (C4); 148.3, 148.2, 146.5, 142.8, 127.9, 124.2, 110.5 and 109.6 (aryl); 62.1 (C2); 39.4 (CH<sub>2</sub>); 32.6 (C5).

*3-(furan-2-ylmethyl)-2-(4-methoxyphenyl)thiazolidin-4-one (6o) [21]*

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, δ ppm, J<sub>H-H</sub>=Hz): 7.35 (2d, 1H, <sup>3</sup>J=1.8, <sup>4</sup>J=1.8); 7.25 (2H, d, <sup>3</sup>J=8.7); 6.91 (2H, d, <sup>3</sup>J=8.7); 6.29 (2d, 1H, <sup>3</sup>J=3.2); 6.11 (d, 1H, <sup>3</sup>J=3.1); 5.52 (s, 1H, H2); 4.96 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.4, CH<sub>2a</sub>); 3.82 (m, 5H, H5a, CH<sub>2b</sub> and OMe); 3.64 (d, 1H, <sup>2</sup>J=14.9, H5b). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz, δ ppm): 170.8 (C4); 160.2, 148.9, 142.6, 130.4, 128.8, 114.3, 110.3 and 109.0 (aryl); 62.8 (C2); 55.3 (OMe); 38.8 (CH<sub>2</sub>); 32.9 (C5).

*3-(furan-2-ylmethyl)-2-(4-methylphenyl)thiazolidin-4-one (6q)*

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, δ ppm, J<sub>H-H</sub>=Hz): 7.29 (2H, d, <sup>3</sup>J=8.8); 7.02 (2H, d, <sup>3</sup>J=8.8); 6.29 (d, 1H, <sup>3</sup>J=3.2); 6.10 (2d, 1H, <sup>3</sup>J=3.1); 5.70 (d, 1H, <sup>4</sup>J=1.4, H2); 5.01 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.4, CH<sub>2a</sub>); 3.87 (dd, 1H, <sup>2</sup>J=15.6, <sup>4</sup>J=1.4, H5a); 3.75 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.2, CH<sub>2b</sub>); 3.71 (d, 1H, <sup>2</sup>J=15.6, H5b); 2.34 (s, 3H, Me). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz, δ ppm): 170.9 (C4); 150.7; 148.0; 141.9; 131.8; 128.3; 128.0; 125.8; 115.1; 110.4 and 108.9 (aryl); 61.9 (C2); 38.5 (CH<sub>2</sub>); 32.3 (C5); 20.8 (Me).

*Antifungal assay*

After the synthesis, we explore the potential antifungal activity of thiazolidinones by measure of the Minimal Concentration Inhibitory (MIC) and the Minimal Fungicidal Concentration (MFC) determined according to the method of M27A3 document.[22] The compounds **5a-q**, **6b**, **6e**, **6h**, **6n** and **6p** were tested against: *C. albicans*, *C. laurentii*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *T. asahii* and *Rhodotorula* sp. using the fluconazole as the standard drug. The tested fungal were obtained from the Laboratory of Micology from Department of Microbiology and Parasitology at the Federal University of Pelotas. Identification of yeasts was

performed with the VITEK2 system - Biomerriex (YST-cards) according to the manufacturer's instructions. Vitek 2 yeast cards were inoculated with 24–48 h cultures and were analyzed using the instrument (database v.3.01).

### *Fungal culture*

Fungal strains were maintained on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and cultures were subcultured (1% inoculum) in SDA at 35°C for at least two days before used in the screening assays. The isolates were suspended in saline solution with the turbidity adjusted to level 1 of the McFarland scale and dilutes in 1:50 and 1:20 in RPMI. After that, they were diluted in RPMI medium and a volume of 100 µL was dispensed into the wells, which contained 100 µL of twice the final concentrations of the antifungal. The antifungal susceptibility test by Broth Microdilution (BM) was carried out in sterile microdilution plates (Nuclon®) with 96 flat bottomed wells, composed of eight series identified from A to H, each one with twelve wells.

### *Minimal Inhibitory Concentration (MIC)*

From the stock-solution of the compounds (1600 mg/mL) and fluconazole (160 mg/mL), diluted according to the methodology recommended by the CLSI,[\[22\]](#) ten successive dilutions were prepared and 100 µl aliquots were sequentially dispensed into the microdilution plates, filling the wells in the columns numbered from 2 to 11. The columns 1 and 12 were reserved as controls. The positive control was composed of 100 µL of RPMI and 100 µL of the half-inoculum solution. The negative control was composed of 200 µL of the same culture medium. The plates

were incubated at 37°C for 48h. The readings were made visually, comparing the growth of the yeast in the wells numbered one to ten (with varying concentrations of antifungal) with the wells that had the positive control (cavity 12). The lowest concentration that produced an inhibition of the growth of the yeast in comparison with the positive control was identified as the MIC.

#### *Minimal Fungicidal Concentration (MFC)*

The *in vitro* fungicidal activities were determined for each drug-isolate-medium combination. After 48 h of incubation, 10 µL was subcultured from each well that showed complete inhibition (100% or an optically clear well) and from the last positive well (growth similar to that for the growth the control well) onto Sabouraud dextrose agar plates; the contents of the wells were not agitated prior to removal of the specified volumes. The plates were incubated at 35°C until growth was seen in the growth control subculture (usually before 48 h). The MFC was the lowest drug concentration that showed no growth.

#### *Citotoxicity Assay*

##### *Mouse fibroblasts 3T3/NIH culture*

The cell lineage was maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air until confluency.

##### *MTT cell viability assay*

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase

activity. 3T3/NIH fibroblasts ( $2 \times 10^4$ /well) were maintained in DMEM in 96-well plates for 24h for adherence. Cytotoxicity produced was assessed in a 24h-cell exposure to different concentrations of the synthesized thiazolidinones. Molecules were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Gibco) and tested at the concentrations of 787, 394 and 197  $\mu\text{g/mL}$  based on MIC results. Control group was treated with pure DMSO. Supernatant was aspirated and the cells washed with phosphate-buffered saline (PBS). Immediately, 180  $\mu\text{L}$  of DMEM with 20  $\mu\text{L}$  of MTT solution (Gibco, Grand Island, 5 mg of MTT/mL PBS) was added to each well. Plates were maintained for 3h at  $37^\circ\text{C}$  in darkness, aspirated and 200 $\mu\text{L}$ /well of DMSO was added. The absorption at 540 nm was determined spectrophotometrically. All experiments were performed in quadruplicate independently at least four times.

### 3. Results and Discussion

#### *Chemistry*

The target 3-(2-picoliamine)thiazolidinones **5a-q** were prepared according to the recently publication by our research group.[20] So, the thiazolidinones were obtained via sonochemistry by reaction of 2-picolilamine **1**, arenealdehydes **3a-q** and mercaptoacetic acid **4** for 10 minutes in good yields without any further purification (Scheme 1). The new compounds **5k**, **5p** and **5q** were fully characterized by NMR  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and mass spectroscopy (Table 1).

#### **Scheme 1.**

The multicomponent reaction of furfurilamine **2**, corresponding arenealdehydes **3** and mercaptoacetic acid **4** using the conventional methodology furnished the thiazolidinones **6b**, **6e**, **6h**, **6n** and **6p** in good to excellent yields. These reactions were carried out firstly by reaction of furfurilamine **2** with

arenealdehydes (**3b**, **3e**, **3h**, **3n** and **3p**) in reflux of toluene for 2 hours. After that, the mercaptoacetic acid **4** was added and the mixture was heated for more 18 hours in a Dean-Stark apparatus. The new compounds were fully characterized by NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C and mass spectroscopy. The Table 1 shows the yields and selected physical properties for the new compounds.

## Scheme 2.

### Table 1.

#### *Biological activity*

The synthesized thiazolidinones were tested against six fungi: *C. albicans*, *C. laurentii*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *T. asahii* and *Rhodotorula* sp. The results are expressed as the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) to inhibit the growth of the yeasts (Table 2 and Table 3). We used the widespread antifungal drug fluconazole as the standard drug. The thiazolidinones were also evaluated as their cytotoxic properties against the Mouse fibroblasts 3T3/NIH culture cells shown in Table 2 and Table 3.

We clearly observed that *Rhodotorula* and *T. asahii* are more sensitive to thiazolidinones than other fungi, showing the lowest MIC and MFC values. The lowest MIC was found for thiazolidinone **5i** (MIC and MFC = 10.4 µg/mL) against *T. asahii* yeast. The same compound also showed the best MIC and MFC value (35 µg/mL) against the *Rhodotorula*, only 1.3 times less active than fluconazole (MIC 26.5 µg/mL). According to Table 2, all the thiazolidinones showed low activity against the candida species with the best MIC and MFC equal to 84 µg/mL (for *C. parapsilosis*) in comparison to fluconazole (MIC = 1-16 µg/mL). Also, the

compounds did not show good activity against *C. laurentii*, however, the best MIC was 70.8 µg/mL for thiazolidinones **5m**.

**Table 2.**

To gain more scope to the work, the evaluation of antifungal activity of furfurylthiazolidinones **6** were also studied (Table 3). The classic bioisosteric replacement of a 6π system pyridine ring of thiazolidinone **5** to a 6π system furfuryl of thiazolidinone **6** did not influence the activity, since both showed similar results to the same fungi. They also showed better results against *Rhodotorula* sp than the other tested yeast. In both series, the electron-withdrawing and the electron-releasing groups, as well the position of the substituent at phenyl ring, did not affect the MIC and MFC values. The Figure 1 shows the results of antifungal screening of all compounds tested against the *Rhodotorula* sp yeast.

**Table 3.**

**Fig. 1.**

The result of the cytotoxicity study showed low toxicity of all the tested compounds (Table 2 and Table 3). The *in vitro* activity was evaluated against fibroblasts 3T3/NIH cells culture in three different concentrations (787, 393 and 197 µg/ml) using the MTT cell viability assay. All compounds were not toxic at the highest concentration tested (787 µg/mL), with exception for thiazolidinone **6h** that decreased 16% of the cell viability, respectively and thus considered toxic at this concentration. Besides the low toxicity, some thiazolidinones showed an increase in the number of fibroblasts after a 24h-cell exposure test, especially the

thiazolidinone derivatives **6** which at the lowest concentration (197  $\mu\text{g/ml}$ ) showed an increase of 51-62% in cell viability.

#### **4. Conclusion**

In conclusion, the antifungal properties of heteroarylmethylthiazolidinones were reported and the compounds showed low to good MIC and MFC values against the five tested fungi. The lowest MIC and MFC value was found to thiazolidinone **5i** against *T. asahii* (MIC and MFC 10.4  $\mu\text{g/mL}$ ) and against *Rhodotorula* sp (MIC and MFC 35  $\mu\text{g/mL}$ ). The cytotoxic study showed an important result with all thiazolidinones preserving fibroblasts viability even at the higher concentration (787  $\mu\text{g/ml}$ ). The new heterocycles were obtained in good yields and identified by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR and by GC-MS. More antifungal studies with this class of heterocycles are ongoing.

#### **5. Acknowledgements**

We thank UFPel, CAPES, FAPERGS and CNPq for financial support.

## 6. References

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20: 133-163.
2. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. *J Clin Microbiol* 2009;47: 117-123.
3. Guinea J, Recio S, Escribano P, et al. Rapid Antifungal Susceptibility Determination for Yeast Isolates by Use of Etest Performed Directly on Blood Samples from Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol* 2010;48,:2205-2212.
4. Dalazen D, Zanrosso D, Wanderley L, Lopes da Silva N, Fuentefria A M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. *J Bras Patol Med Lab* 2011;47: 33-38.
5. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem* 2012;20: 5678-5698.
6. Shalini K, Kumar N, Drabu S, Sharma PK. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beilstein J Org Chem* 2011;7: 668-677.
7. Liesen AP, de Aquino TM, Góes AJS, de Lima JG, de Faria AR, Alves AJ. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. *Quim Nova* 2008;31: 369-376.
8. Cunico W, Gomes CRB, Vellasco Júnior WT. Chemistry and Biological Activities of 1,3-Thiazolidin-4-ones. *Mini-Rev Org Chem* 2008;5: 336-344.
9. Jain AK, Vaidya A, Ravichandran V, Kashaw SK, Agrawal RK. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. *Bioorg Med Chem* 2012;20: 3378-3395.
10. Ruiz FAR, García-Sánchez RN, Estupiñan SV et al. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. *Bioorg Med Chem* 2011;19: 4562-4573.
11. Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Vasylenko O, Gzella A, Lesyk R. Synthesis of new 4-thiazolidinone-, pyrazoline-, and isatin-based conjugates with promising antitumor activity. *J Med Chem* 2012;55: 8630-8641.

12. Patel D, Kumari P, Patel N. Synthesis and biological evaluation of some thiazolidinones as antimicrobial agents. *Eur J Med Chem* 2012;48: 354-362.
13. Tian Y, Zhan P, Rai D, Zhang J, De Clercq E, Liu X. Recent advances in the research of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidin-4-one derivatives as potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Curr Med Chem* 2012;19: 2026-2037.
14. Malviya M, Kumar YCS, Mythri RB, Venkateshappa C, Subhash MN, Rangappa KS. Muscarinic receptor 1 agonist activity of novel N-aryl carboxamide substituted 3-morpholino arecoline derivatives in Alzheimer's presenile dementia models. *Bioorg Med Chem* 2009;17: 5526-5534.
15. Deep A, Jain S, Sharma PC, Phogat P, Malhotra M. Synthesis of 2-(aryl)-5-(arylidene)-4-thiazolidinone derivatives with potential analgesic and anti-inflammatory activity. *Med Chem Res* 2012;21: 1652-1659.
16. Malipeddi H, Karigar AA, Malipeddi VR, Sikarwar MS. Synthesis and Antitubercular Activity of Some Novel Thiazolidinone Derivatives. *Trop J Pharm Res* 2012;11; 611-620.
17. Neuenfeldt PD, Drawanz BB, Siqueira GM et al. Efficient solvent-free synthesis of thiazolidin-4-ones from phenylhydrazine and 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Tetrahedron Lett* 2010;51: 3106-3108.
18. Neuenfeldt PD, Duval AR, Drawanz BB et al. Efficient sonochemical synthesis of thiazolidinones from piperonilamine. *Ultrason Sonochem* 2011;18: 65-67.
19. Neuenfeldt PD, Drawanz BB, Aguiar ACC, Figueiredo Jr. F, Krettli AU, Cunico W. Multicomponent Synthesis of New Primaquine Thiazolidinone Derivatives. *Synthesis* 2011: 3866-3870.
20. Gouvêa DP, Bareño VDO, Bosenbecker J et al. Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolilamine. *Ultrason Sonochem* 2012;19: 1127-1131.
21. Rawal RK, Prabhakar YS, Katti SB, De Clercq E. 2-(Aryl)-3-furan-2-ylmethyl-thiazolidin-4-ones as selective HIV-RT Inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2005;13: 6771-6776.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method of Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard, NCCLS Document M27-A3, Wayne, USA, 2008.

**Table 1.** Yields and selected physical properties of thiazolidinones **5k,p,q** and **6b,e,h,n,p**.

Comp	R	Yields (%) <sup>a</sup>	m.p. (°C) <sup>b</sup>	GC-MS <i>m/z</i> (%)
<b>5k</b>	4-OH	78	oil	286 (M, 41); 138 (52); 122 (20); 92 (100)
<b>5p</b>	2-CN	66	oil	295 (M, 55); 221 (18); 147 (30); 92 (100)
<b>5q</b>	2,6-Cl	82	oil	338 (M, 15); 264 (23); 189 (44); 158 (10); 92 (100)
<b>6b</b>	3-F	71	Oil	277 (M, 31); 154 (10); 137 (69); 109 (56); 81 (100)
<b>6e</b> [21]	4-Cl	70	Oil	293 (M, 20); 171 (5); 137 (85); 109 (40); 81 (100)
<b>6h</b>	4-NO <sub>2</sub>	73	98-102	304 (M, 20); 137 (85); 122 (10); 109 (43); 81 (100)
<b>6n</b> [21]	4-OMe	94	Oil	289 (M, 15); 166 (22); 137 (80); 109 (33); 81 (100)
<b>6p</b>	4-Me	78	Oil	273 (M, 25); 205 (5); 137 (95); 91 (20); 81 (100)

<sup>a</sup> Yields of isolated compounds. <sup>b</sup> Melting points are uncorrected

**Table 2:** Antifungal and cytotoxic activities of thiazolidinones **5a-q**

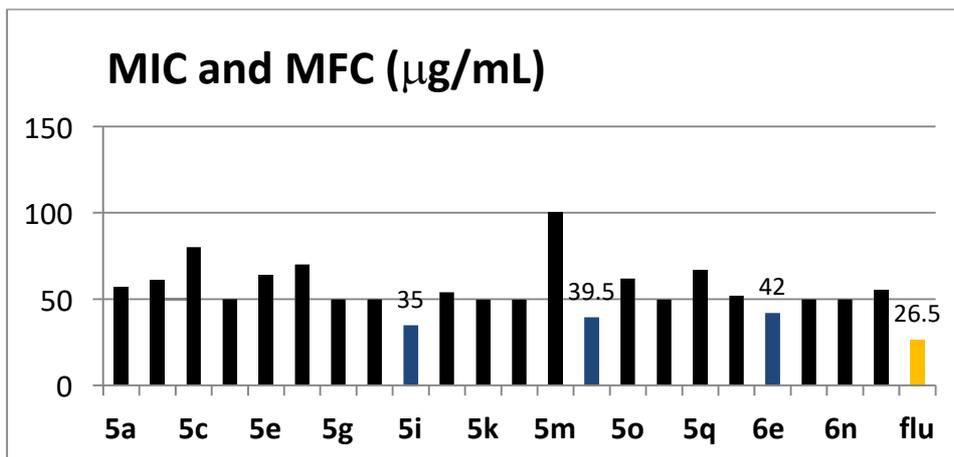
comp.	R	M.W.	MIC and MFC ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>						Cytotoxicity ( $\mu\text{g/mL}$ ) % <sup>b</sup>		
			<i>C. laurentii</i>	<i>C. Parapsilosis</i>	<i>C. Guilliermondii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>Rhodotorula ssp.</i>	<i>C. albicans</i>	787	394	197
<b>5a</b>	2-F	288.3	233.3	100	166.6	-	56.5	140	96.6 $\pm$ 11.0	107.9 $\pm$ 7.1	127.7 $\pm$ 11.9
<b>5b</b>	3-F	288.3	100	100	100	-	61	163,5	88.4 $\pm$ 9.0	90.7 $\pm$ 8.0	96.6 $\pm$ 11.8
<b>5c</b>	4-F	288.3	133.3	91.7	100	66.6	80	200	108.8 $\pm$ 13.4	120.8 $\pm$ 15.4	135.9 $\pm$ 14.8
<b>5d</b>	3-Cl	304.8	141.7	133.3	133.3	58.3	50	200	91.1 $\pm$ 9.0	96.3 $\pm$ 9.8	115.8 $\pm$ 11.1
<b>5e</b>	4-Cl	304.8	100	200	112.5	-	64	200	89.3 $\pm$ 9.1	91.5 $\pm$ 7.6	97.6 $\pm$ 11.8
<b>5f</b>	2-NO <sub>2</sub>	315.3	166.7	200	133.3	-	70	180	93.7 $\pm$ 13.3	104.6 $\pm$ 11.5	125.3 $\pm$ 27.6
<b>5g</b>	3-NO <sub>2</sub>	315.3	100	200	133.3	50	50	133	95.7 $\pm$ 10.9	106.8 $\pm$ 7.0	126.6 $\pm$ 13.7
<b>5h</b>	4-NO <sub>2</sub>	315.3	150	150	150	62.5	50	100	109.,8 $\pm$ 12.2	122.0 $\pm$ 15.6	137.2 $\pm$ 14.9
<b>5i</b>	2-OH	286.3	100	200	166.6	10.4	35	133	98.9 $\pm$ 9.1	108.9 $\pm$ 14.3	144.7 $\pm$ 17.9
<b>5j</b>	3-OH	286.3	100	100	166.6	-	54	200	95.5 $\pm$ 9.0	101.7 $\pm$ 10.4	102.3 $\pm$ 7.9
<b>5k</b>	4-OH	286.3	143.8	166.6	100	110	50	140	96.4 $\pm$ 9,0	102.7 $\pm$ 10.5	103.4 $\pm$ 8.0
<b>5l</b>	2-OMe	300.4	166.7	150	166.6	-	50	154	87.5 $\pm$ 9.0	89.8 $\pm$ 7.5	95.7 $\pm$ 11.5
<b>5m</b>	3-OMe	300.4	70.8	116.6	150	48.0	100	133	92.1 $\pm$ 10.4	98.2 $\pm$ 13.4	107.5 $\pm$ 14.4
<b>5n</b>	4-OMe	300.4	150	118.7	250	83.3	39,5	133	87.0 $\pm$ 6.6	100.2 $\pm$ 8.7	124.0 $\pm$ 13.8
<b>5o</b>	4-CN	295.3	100	200	100	37.5	62	150	98.3 $\pm$ 9.2	104.7 $\pm$ 10.8	105.3 $\pm$ 8.2
<b>5p</b>	4-Me	284.4	180	166.6	129.1	100	50	133	89.6 $\pm$ 10.0	93.0 $\pm$ 10.4	115.3 $\pm$ 13.9
<b>5q</b>	2,6-Cl	339.2	100	200	100	-	66.5	200	92.7 $\pm$ 9.5	95.0 $\pm$ 8.0	101.3 $\pm$ 12.2
	FLZ <sup>c</sup>	306.1	1	1	16	1	26.5	1			

<sup>a</sup> – MIC means the minimal inhibitory concentration to inhibit the fungi growth; MFC means the minimal fungicidal concentration that shows no growth of the fungi. <sup>b</sup> – Express as the percentage of cell viability of fibroblast 3T3/NIH cell lines. <sup>c</sup> – fluconazole.

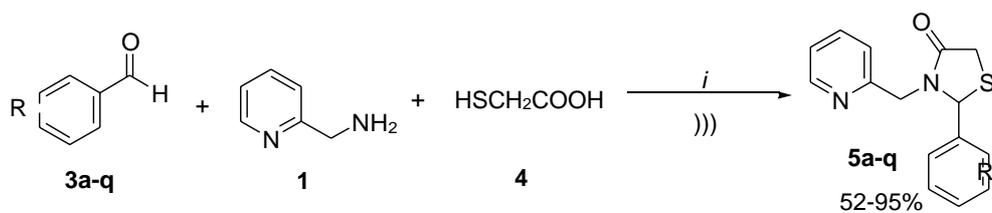
**Table 3:** Antifungal and cytotoxic activities of thiazolidinones **6b**, **6e**, **6h**, **6n** and **6p**.

comp.	R	M.W.	MIC and MFC ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>					Cytotoxicity ( $\mu\text{g/mL}$ ) % <sup>b</sup>		
			<i>C. laurentii</i>	<i>C. Parapsilosis</i>	<i>C. Guilliermondii</i>	<i>Rhodotorula ssp.</i>	<i>C. albicans</i>	787	394	197
<b>6b</b>	3-F	277.06	59	100	100	52	200	108.6 $\pm$ 13.3	129.4 $\pm$ 15.6	156.8 $\pm$ 22.4
<b>6e</b>	4-Cl	293.03	100	100	100	42	100	104.3 $\pm$ 16.4	128.1 $\pm$ 13.2	151.0 $\pm$ 23.5
<b>6h</b>	4-NO <sub>2</sub>	304.05	84	150	100	50	100	84.2 $\pm$ 12.4	84.6 $\pm$ 12.1	151.7 $\pm$ 14.8
<b>6n</b>	4-OMe	289.08	100	234	100	50	100	101.3 $\pm$ 13.5	135.8 $\pm$ 16.7	154.1 $\pm$ 23.9
<b>6p</b>	4-CH <sub>3</sub>	273.08	100	150	100	55	84	119.9 $\pm$ 12.6	142.9 $\pm$ 17.5	162.2 $\pm$ 25.2
	FLZ <sup>c</sup>	306.1	1	1	16	26.5	1			

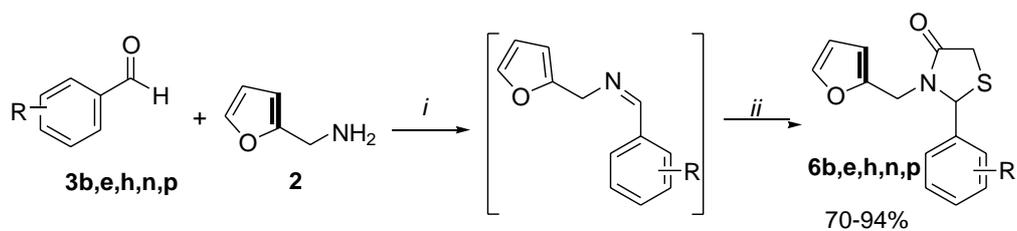
<sup>a</sup> – MIC means the minimal inhibitory concentration to inhibit the fungi growth; MFC means the minimal fungicidal concentration that shows no growth of the fungi. <sup>b</sup> – Express as the percentage of cell viability of fibroblast 3T3/NIH cell lines. <sup>c</sup> – fluconazole



**Figure 1:** MIC and MFC values of all thiazolidinones tested against *Rhodotorula* sp.



**Scheme 1.** Reagents and Conditions: *i*. toluene, ultrasound irradiation, 10 min.



**Scheme 2.** Reagents and Conditions: *i*. toluene, reflux, 2h; *ii*. HSCH<sub>2</sub>COOH **4**, reflux 18h.

## 5 CONCLUSÃO

A utilização da metodologia de microdiluição em caldo baseada no documento do CLSI M27-A3 adaptada às substâncias orgânicas a sete diferentes espécies fúngicas leveduriforme, mostrou ser rápida, fácil execução, reprodutível e segura para as 19 moléculas de tiazolidinonas.

Nas condições em que o estudo foi realizado, as sete leveduras testadas apresentaram diferentes graus de suscetibilidade às dezenove moléculas testadas.

Os isolados fúngicos *T. asahii* e *Rhodotorula* spp., apresentaram maior suscetibilidade as tiazolidinonas. *Candida* spp. foi a menos suscetível a esta classe do que as outras leveduras.

Nenhuma das dezenove moléculas da classe das tiazolidinonas testadas foram citotóxicas na maior concentração, 787µg/mL, com exceção da molécula B25 que apresentou redução de mais de 16% de viabilidade celular nesta concentração.

## 6 PERSPECTIVAS

Mais investigações são necessárias para o desenvolvimento de um novo composto antifúngico.

Os resultados ora apresentados permitem antever que o conhecimento da compatibilidade das moléculas sintéticas sobre o desenvolvimento dos fungos, é essencial para o desenvolvimento de um futuro fármaco antifúngico. Todavia, pesquisas avaliando a atuação dos fármacos frente aos fungos *in vivo* são necessárias. Portanto existem perspectivas para estudo:

- Estudo das 19 moléculas, frente a microrganismos procariontes: bactérias GRAM negativas e GRAM positivas;
- Estudo das 19 moléculas frente a organismos eucariontes: ecto e endoparasitos.
- Estudo da atividade antiviral das 19 moléculas, frente a vírus de origem veterinária.
- Testes *in vivo* com cobaias.

## 7 REFERÊNCIAS

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, p. 22-38, 2010.

BLACK, J. G. **Microbiologia fundamentos e perspectivas**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2002. 500p.

BRITO, E. H. S. **Caracterização fenotípica e perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de *Candida* spp e *Malassezia pachydermatis*, oriundas de cães**. 2005. Dissertação (mestrado em ciências veterinárias)- Universidade Estadual do Ceará, Ceará.

CHONG, H. S.; DAGG, R.; MALIK, R.; CHEN, S.; CARTER, D. *In vitro* susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4115-4120, 2010.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Teste de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 408p.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRIA, A. M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Journal Brazilian Pathology Medicine Laboratory**, v. 47, p. 33-38, 2011.

DINIZ, J. N. M.; SILVA, R. A. M.; MIRANDA, E. T.; GIANNINI, M. J. S. M. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Revista Saúde Pública**, v. 39, p. 398-405, 2005.

FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia**, v. 162, p. 363–368, 2006.

FISHER, B. D.; ROUSE, H.; STROHL, W. A. **Microbiologia ilustrada**. 2ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., 2004. 498p.

GOUVÊA, D. P.; BAREÑO, V. D.; BOSENBECKER, J.; DRAWANZ, B. B.; NEUENFELDT, P. D.; SIQUEIRA, G. M.; CUNICO, W. Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolilamine. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 19, p. 1127-31, 2012.

GUINEA, J.; RECIO, S.; ESCRIBANO, P.; NARBONA, M. T.; PELÁEZ, T.; CARRILLO, C. S.; CRÉIXEMS, M. R.; BOUZA, E. Rapid antifungal susceptibility determination for yeast isolates by use of Etest performed directly on blood samples from patients with fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2205-2212, 2010.

HIBBET, J.; SMADJA, H. K. Chemical Composition and *in Vitro* Antimicrobial Activities of the JAWETZ, E.; MELNICK, L. J.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 7ed. Rio de Janeiro: Ed. Artmed, 2007. 568p.

JAIN, A. K.; VAIDYA, A.; RAVICHANDRAN, V.; KASHAW, S. K.; AGRAWAL, R. K. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3378-3395, 2012.

JAWETZ, E.; MELNICK, L. J.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 7ed. Rio de Janeiro: Ed. Artmed, 2005. 568p.

JÚNIOR, A. A. P. F.; CARVALHO, R. T.; FOCACCIA, R.; FERNANDEZ, J. G.; ARAÚJO, H. B. N.; STRABELLI, T. M. V.; KOPEL, L.; LAGE, S. G. Emergência de Infecção por *Trichosporon Asahii* em Pacientes Portadores de Insuficiência Cardíaca em Unidade de Terapia Intensiva Cardiológica. Relato de Caso e Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, p. 106-109, 2008.

KAPPE, R. Antifungal activity of the new azole UK-109,496 (voriconazole). **Mycoses**, v.42, p.83-86, 1999.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOYHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 5678-5698, 2012.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Tratado de microbiologia médica**. 9ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1120p.

LORD, A. T. K.; MOHANDAS, K.; SOMANATH, S.; AMBU, S. Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, p. 2-5, 2010.

MANAVATHU, E.K.; CUTRIGHT, J.L.; LOEBENBERG, D. A comparative study of the *in vitro* susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). *J Antimicrob Chemother*, v.46, p.229-234, 2000.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 449-460, 2006.

MIDGLEY, G.; CLAYTON, Y. M.; HAY, R. J. **Diagnóstico em cores micologia médica**. 1ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998. 150p.

a) PATEL, D.; KUMARI, P.; PATEL, N. Synthesis and biological evaluation of some thiazolidinones as antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 354-362, 2012.

(b) PATEL, D.; KUMARI, P.; PATEL, N. Synthesis of 3-{4-[4-dimethylamino-6-(4-methyl-2-oxo-2Hchromen-7-yloxy)-[1,3,5]triazin-2-ylamino]-phenyl}-2-phenyl-5-(4-pyridin-2-yl-piperazin-1-ylmethyl)-thiazolidin-4-one and their biological evaluation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 2926-2944, 2012.

(c) PATEL, N.B.; PATEL, S.D. Synthesis and in vitro antimicrobial studies of 4-thiazolidinone incorporated 1,3,4-oxadiazoles. **Chemistry & Biology Interface**, v.2, nº3, 183-198, 2012.

PENILDON, S. **Farmacologia**, 7<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006. 1352p.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, V. A.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; BRU, V. L.; LISALOVA, M.; MUEHLETHALER, K.; RENNISON, C.; ZAIDI, M. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: 105-Year Analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 117-123, 2009.

PRADO, M. R. **Isolamento de *Microsporum canis*, *Malassezia spp.* e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de *malassezia pachydermatis in vitro***. 2007. 143f. Tese (doutorado em ciências veterinárias)-Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará.

PRASAD, D.; KUMAR, A.; SHUKLA, P.K.; NATH, M. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel 2-aryl-thiazolidin-4-one derivatives. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v.1, p. 4/1-4/7, 2011.

RAVICHANDRAN, V.; JAIN, A.; KUMAR, K.S.; RAJAK, H.; AGRAWAL, R.K. Design, Synthesis, and Evaluation of Thiazolidinone Derivatives as Antimicrobial and Anti-viral Agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v.78, p. 464–470, 2011.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKETA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, p.317-320, 2003.

SCHAECHTER M, ENGLEBERG NC, EISENSTEIN BI, MEDOFF G.. **Microbiologia: Mecanismo das Doenças Infecciosas**, 3ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002. 642p.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A. Biologia dos fungos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 408p.

SOLANKEE, A.N.; PATEL, K.P.; PATEL, R.B. A facile synthesis and studies of some new 4-thiazolidinones and 5-arylidenes. **Advances in Applied Science Research**, v. 3, nº1, p. 117-122, 2012.

SPILIOPOULOU, A.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. *Rhodotorula* fungemia of na intensive care unit patient and review of published cases. **Mycopathologia**, v. 174, p. 301-309, 2012.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; ANDRADE, M. L. S.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, p.498-502, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos**. 2ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1999. 1214p.

TORRES, H. A.; HACHEM, R. Y.; CHEMALY, R. F.; KONTOVIANNIS, D. P.; RAAD, I. I. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 775-85, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 720p.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 135-140, 2008.

VERGHESE, S.; RAVICHANDRAN, P. Geotrichum candidum infection in a renal transplant recipient. **The Indian Society of Nephrology**, v. 13, p. 72-74, 2003.

ZACCHINO, S. A., YUNES, R. A., et al. The Need for New Antifungal Drugs: Screening for Antifungal Compounds with a Selective Mode of Action with Emphasis on the Inhibitors of the Fungal Cell Wall. In: RAI, M., MARES, D. (Editors) Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects. **The Haworth Press**, p. 1-41, 2003.