

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DE
2-ARIL-3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-IL) TIAZOLIDIN-4-ONAS**

Silvana Pereira de Souza

Pelotas, 2016

SILVANA PEREIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DE
2-ARIL-3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-IL) TIAZOLIDIN-4-ONAS**

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 (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Wilson João Cunico Filho

Pelotas, 2016.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S719a Souza, Silvana Pereira de

Avaliação in vitro das atividades antimicrobianas de 2-
aril- 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il) tiazolidin-4-onas / Silvana
Pereira de Souza ; Wilson João Cunico Filho, orientador. —
Pelotas, 2016.

46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências
Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade
Federal de Pelotas, 2016.

1. 4-tiazolidinonas. 2. 1,3-benzodioxol. 3. Candida
albicans. 4. Candida parapsilosis. 5. Rhodotorula
mucilaginosa. I. Cunico Filho, Wilson João, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Silvana Pereira de Souza

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DE
2-ARIL-3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-IL) TIAZOLIDIN-4-ONAS**

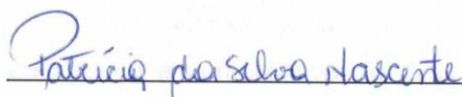
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 29/02/2016

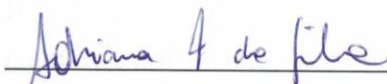
Banca examinadora:



Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho (Orientador). Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.



Profª. Drª. Patricia da Silva Nascente - Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Profª. Drª. Adriana Fernandes da Silva - Doutora em Biologia Buco-Dental (Histologia e Embriologia) pela Universidade Estadual de Campinas.

Pelotas, 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom precioso da vida, por não me deixar desistir nos momentos de fraqueza, ter dado a certeza de estar sempre ao meu lado, por ser abrigo e consolo. A minha mãe pela vida, e por ser um exemplo a ser seguido, que jamais conseguirei descrever o amor que sinto. Ao meu namorado Jorge, e a minha família que teve muita paciência e compreensão pelos momentos que deixei de estar presente, para que conseguisse finalizar esse trabalho.

Ao professor Wilson, agradeço pela orientação deste trabalho, pela paciência e reconhecimento das minhas limitações.

Agradeço ao meu amigo Daniel que foi mais que um orientador neste trabalho, pela dedicação, amizade e principalmente paciência. Por suas palavras e atitudes seguras, sempre incentivando, com muita disposição para que tudo desse certo. A amiga Kennia pela ajuda em seminário II, se não fosse por sua paciência, dedicação não teria vencido.

Aos meus amigos, principalmente ao Tiago, à Renata e à Tamara, por estarem sempre ao meu lado, torcendo e me ajudando, por acreditarem ou não, mas estando sempre presente nos bons e maus momentos que passamos juntos.

Faço um agradecimento especial aos companheiros do Sindicato ASUFPel, pelo apoio e compreensão e pela torcida que demonstraram no período do meu afastamento para a realização de um sonho.

Agradeço aos amigos do LaQuiABio (Wilson, Geonir, Daniel, Gabriele, Tais, Adriana, Daniela, Auri, José, Juliano, Hellen, Bruna, Marizane, Caroline, Roberta, Camila, Liane, Andressa e César) pelo companheirismo, aprendizado e auxílio em vários momentos, obrigado por me deixarem fazer parte desta grande equipe, e me fazer acreditar que amizade é a coisa mais importante no mundo. Em especial a Adriana que ajudou e incentivou com aquela frase “nada pode ser tão ruim que não possa melhorar”.

Agradeço ao prof. Rafael Guerra Lund, a Juliana Ribeiro e as laboratoristas Lizangela e Carmem - Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia/

UFPel - pela realização dos testes de avaliação da atividade antimicrobiana e por toda ajuda, e por terem entrado no meu círculo de amizade.

Agradeço a CAPES, CNPQ e a FAPERGS pelo auxílio financeiro, na qual é indispensável na realização deste e de outros trabalhos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, a Universidade Federal de Pelotas.

*“Não é o que você faz,
mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa”.*

Madre Tereza de Calcutá

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o manual de normas para dissertações, teses e trabalhos científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o nível de descrição 4 – estruturas em artigos, que conta no apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: http://sisbi.ufpel.edu.br/arquivos/PDF/Manual_Normas_UFPel_trabalhos_acad%C3%AAmicos.pdf

RESUMO

SOUZA, Silvana Pereira. **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DE 2-ARIL-3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-IL) TIAZOLIDIN-4-ONAS**. 2016, 46F. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Esse estudo avaliou as propriedades biológicas de doze 1,3-tiazolidin-4-onas derivadas da 3,4-(metilenodioxo)anilina, estudando a atividade antifúngica e antibacteriana desses compostos. No ensaio antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 e *Escherichia coli* ATCC 29214, demonstrou-se que esses compostos não possuem efeito significativo na inibição do crescimento bacteriano. O composto **1b** mostrou o melhor resultado antifúngico contra *C. albicans* ATCC 6257 em 100 µg/ml (61,23% de inibição em 24h e 53,75% em 48h), incluindo diferença estatística em relação ao controle de crescimento na menor concentração testada, 25 µg/ml. Ainda, o composto **1h** apresentou o maior percentual de inibição do crescimento fúngico contra *C. parapsilosis* em 100 µg/ml (84,73% em 24h e 41,06% em 48h), inclusive sendo similar ao fármaco fluconazol em 24h (85,72%). Além disso, **1h** demonstrou atividade já na menor concentração testada, 25 µg/ml. No ensaio antifúngico contra *Rhodotorula*, verificou-se dois compostos com boas atividades antifúngicas em 100 µg/ml em 48h, **1f** (82,65% de inibição) e **1i** (68,22%). Ainda, é importante notar que ambos compostos apresentaram-se estatisticamente similares ao fluconazol (89,30%). No entanto, analisando diferentes concentrações, apenas o composto **1f** apresentou diferença significativa em relação ao controle. Esses estudos descobriram pelo menos três potenciais agentes antifúngicos para três diferentes cepas com resultados significativos em baixas doses. Portanto, entende-se que esses resultados criaram perspectivas para novas pesquisas com o intuito de aumentar as possibilidades terapêuticas a fim de combater a resistência microbiana e as doenças causadas pelos microrganismos, e enfatiza-se o desenvolvimento da síntese das 4-tiazolidinonas e o subsequente estudo de sua atividade farmacológica.

Palavras-chave: 4-tiazolidinonas, 1,3-benzodioxol, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, astrócitos.

ABSTRACT

SOUZA, Silvana Pereira. **ANTIMICROBIAL IN VITRO ACTIVITY OF 2-(ARYL)-3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-YLTHIAZOLIDIN-4-ONE**. 2016, 46F. Dissertation - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting - Federal University of Pelotas, Pelotas.

This study evaluated the biological properties of twelve 1,3-thiazolidin-4-ones derivated from 3,4-(methylenedioxy)aniline, assessing the antifungal and antibacterial activity of these compounds. The antibacterial assay against *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 and *Escherichia coli* ATCC 29214 showed that these compounds have no significant effect to inhibit the bacterial growth. The compound **1b** showed the best antifungal results against *C. albicans* ATCC 62342 at 100 µg/ml (61.23% inhibition in 24h and 53.75% in 48h), including demonstrating statistical difference from growth control at lowest concentration used, 25 µg/ml. Thus, the compound **1h** was the greatest percentage of growth inhibition against *C. parapsilosis* at 100 µg/ml (84.73% in 24h and 41.06% in 48h), including being similar to fluconazole in 24h (85.72%). Besides, **1h** demonstrated activity since the lowest concentration tested, 25 µg/ml. In antifungal *Rhodotorula* assay, it was verify two compounds with good antifungal activity at 100 µg/ml in 48h, **1f** (82.65% of inhibition) and **1i** (68.22%). It is also important to note that both compounds were statistically similar to fluconazole (89.30%). However, analyzing different concentrations, only the compound **1f** presented statistical difference from control group. These studies discover at least three potential antifungal agents for three different strains with significant results at low concentrations. Therefore, it is understood that the results create perspectives for further research in order to increase the therapeutic possibilities to fight microbial resistance and diseases caused by microorganisms, and it is emphasized the development of synthesis of 4-thiazolidinones and subsequent evaluation of the pharmacological activity.

Keywords: 4-thiazolidinones; 1,3-benzodioxol, *Candida albicans*; *Candida parapsilosis*; *Rhodotorula mucilaginosa*; astrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fármacos com presença de estrutura heterocíclica.....	15
Figura 2	Estrutura química geral de 1,3-tiazolidin-4-onas.....	16
Figura 3	Obtenção da tiazolidinona 4 derivada da 3,4-(metilenodioxí) anilina 1	17
Figura 4	(A) Bactéria gram negativa com apenas uma camada de peptidoglicano e (B) Bactéria gram positiva com uma camada espessa de peptidoglicano.....	21

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1	General structure of tested thiazolidinones 1a-l	36
Figura 2	Antifungal activity screening of thiazolidinones at 100 µg/mL in 48h.....	37
Figura 3	Antifungal activity screening of thiazolidinones 1a-1l at 100 µg/mL in 48h against <i>C. parapsilosis</i>	37
Figura 4	Antifungal activity screening of thiazolidinones 1a-1l at 100 µg/mL in 48h against <i>R. mucilaginosa</i>	37
Figura 5	Concentration-response of antifungal activity of thiazolidinones.....	38

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1	Minimum Inhibitory Concentration (MIC ₅₀) expressed in µg/mL of thiazolidinones against <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S. aureus</i> and <i>E.coli</i>	36
Tabela 2	Cytotoxicity of thiazolidinones in primary astrocytes in 48h.....	38

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1	Tiazolidinonas.....	14
3.2	Resistência microbiana.....	17
3.3	Bactérias.....	19
3.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.3.2	<i>Escherichia coli</i>	21
3.4	Agentes antibacterianos.....	22
3.5	Fungos.....	24
3.5.1	<i>Candida albicans</i>	25
3.5.2	<i>Rhodotorula</i>	26
3.6	Agentes antifúngicos.....	27
4.	ARTIGO.....	29
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
6	REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, alterações químicas na estrutura de agentes quimioterápicos ou farmacológicos consagrados vêm sendo objetivo de desenvolver novos compostos bioativos. A química orgânica tem contribuído para descobrir novos compostos sintéticos para o uso clínico e a indústria farmacêutica tem sido amplamente motivada a dar continuidade ao desenvolvimento de novos fármacos, com destaque aos antimicrobianos (KATHIRAVAN, 2012). Pesquisadores de várias partes do mundo estão estudando esses compostos por conta de sua biodiversidade, e devido as suas propriedades de interesse a indústria farmacêutica (VINAY et al., 2011).

Nesse sentido, compostos heterocíclicos como as tiazolidinonas, vem ganhando destaque devido às atividades biológicas, na qual é bem demonstrado na literatura que o anel 4-tiazolidinona possui vários sítios de substituição, representando uma classe de compostos de grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e atividades biológicas (JAIN et al., 2012; TRIPATHI et al., 2014).

É importante salientar que o heterocíclico 1,3 benzodioxol possui atividades biológicas como, atividade anticâncer (LEITE et al., 2004), anticonvulsivante (ABOUL-ENEIN et al., 2012), anti-inflamatória (LOPES et al., 2012) e antioxidante (HIMAJA et al., 2011). Em continuação aos trabalhos do Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), MASTELOTO et al., 2015, sintetizaram uma série de 4-tiazolidinonas utilizando o reagente 3,4 (metilenodioxo)anilina, que possui o heterocíclico 1,3 benzodioxol.

Tendo em vista que as doenças infecciosas são umas das principais causas de morte no mundo, a população de uma maneira geral necessita da produção de novos fármacos antimicrobianos de amplo espectro para combater a mortalidade ao redor do mundo (QUEIROZ et al., 2012). Com isso, a busca por novos fármacos teve um crescimento, a fim de dar novas opções e combater os casos de resistência microbiana. Nesse sentido, os compostos 4-tiazolidinonas têm revelado importantes

atividades antimicrobianas e vêm sendo propósito de estudo contra vários microrganismos, como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e outros (JAIN et al., 2012; TRIPATHI et al., 2014).

O número de agentes patogênicos microbianos, resistentes a múltiplos fármacos tornam os tratamentos de infecções bacterianas um problema terapêutico importante e difícil de controlar. A medicina dispõe de um grande número de antibióticos, porém com a resistência bacteriana a novos e antigos antibióticos, faz-se necessário a criação de novas classes de agentes antibacterianos (GUERRA et al., 2015; QUEIROZ, et al., 2012).

Neste sentido, fica evidente a relação da resistência dos microrganismos frente aos antibacterianos. Um dos fatores pode ser causado pela mutação genética destes patógenos provocada pela administração de vários fármacos em pacientes hospitalizados, principalmente em pacientes imunocomprometidos (GUERRA et al., 2015; JAIN et al., 2012).

Algumas leveduras são responsáveis pelas infecções fúngicas oportunistas, com destaque às infecções invasivas (SANTANA et al., 2013). Estas têm sido incidentes nos últimos anos devido ao aumento da população em condições médicas específicas, como em casos de cirurgias, transplante de medula óssea e órgãos, além do grande número de pacientes imunocomprometidos, como portadores de endocrinopatias, pacientes que sofrem de estresse, e principalmente pacientes HIV positivo (PEIXOTO et al., 2014; SANTANA et al, 2013).

O fungo *Candida* spp é responsável pela maioria das infecções causadas por levedura, porém existem outros gêneros de leveduras que se aproveitam das condições comprometidas dos pacientes podendo causar infecções graves, como por exemplo, *Rhodotorula* spp. que é um patógeno oportunista emergente (PEIXOTO et al., 2014; GARCÍA-SUÁREZ et al., 2011).

Neste contexto pesquisadores se esforçam para descobrir novos agentes potencialmente ativos para combater microrganismos resistentes aos fármacos em uso clínico. Com isso, uma série de 1,3-tiazolidin-4-onas contendo o grupo 1,3-benzodioxol (MASTELOTO et al., 2015) foi alvo deste trabalho como potenciais agentes antimicrobianos. Assim, o intuito dessa pesquisa é testar os dois grupamentos (tiazolidinona e benzodioxol) como potencial para atividade biológica.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de tiazolidinonas derivados do metilenodioxianilina *in vitro* frente a bactérias e fungos.

Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* de diferentes tiazolidinonas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Avaliar a atividade antifúngica das tiazolidinonas *in vitro* frente a cepas de leveduras *Candida albicans*, *Candida não albicans* (*Candida parapsilosis*) e *Rhodotorula mucilaginosa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TIAZOLIDINONAS

A química orgânica e medicinal tem como objetivo a síntese de moléculas bioativas que possam ter valor na descoberta de novos fármacos (DUVAL et al., 2011). Os estudos dedicados a combinações de estruturas vêm crescendo na última década, em especial os que se utilizam de estruturas formadas por heterocíclicos, como a tiazolidinona, uma classe de compostos que é amplamente estudada na química medicinal (TRIPATHI et al., 2014).

Dentre as atividades biológicas já relatadas na literatura para as 4-tiazolidinonas, destaca-se a atividade antimicrobiana (JAIN et al., 2012). Na figura 1 são apresentados alguns exemplos de fármacos comerciais que exibem em sua estrutura um ou mais anéis heterocíclicos.

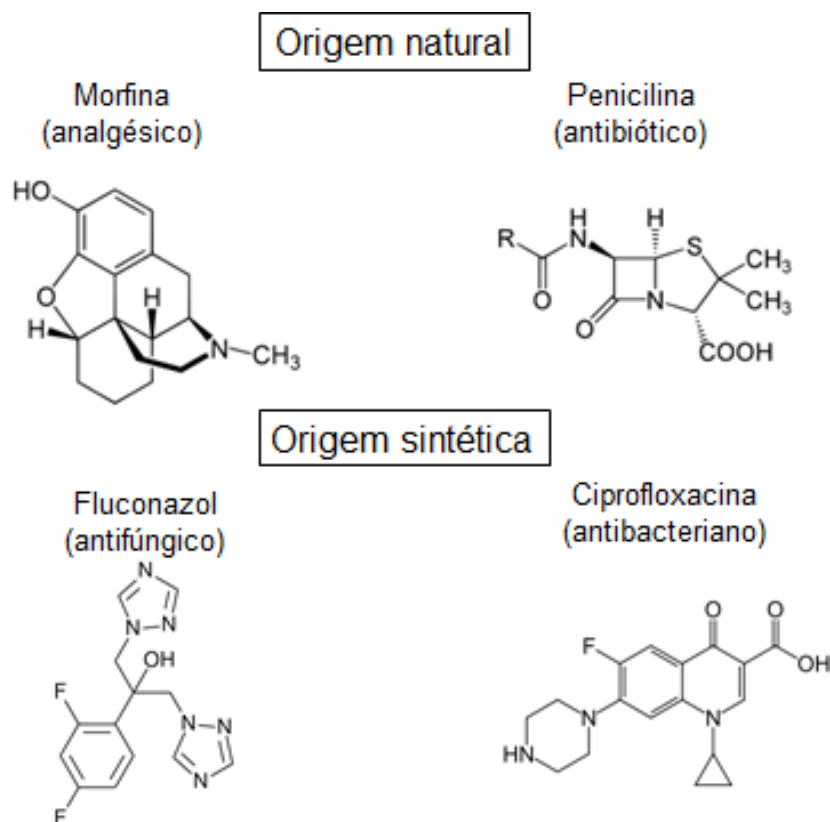


Figura 1: Fármacos com presença de estrutura heterocíclica.

Encontramos na literatura estudos que cita, a importância científica dos compostos contendo o anel 4-tiazolidinona. Estes compostos heterocíclicos representam uma ampla possibilidade de pesquisas devido a sua vasta possibilidade de apresentar diversos grupamentos substituintes em diferentes posições. Conforme autores, as tiazolidinonas são derivadas da tiazolidina, porém com um grupo carbonila em sua estrutura. O primeiro reconhecimento do anel da tiazolidina na natureza foi sua presença na molécula da penicilina (ALEGAON & ALAGAWADI, 2011; JAIN et al., 2012; MISTRY & JAUHARI, 2013).

As 4-tiazolidinonas são constituídas de um anel de 5 membros, contendo um átomo de enxofre e um de nitrogênio nas posições 1 e 3, respectivamente, uma carbonila na posição 4, e diversos substituintes nas posições 2, 3 e 5. As diferentes atividades biológicas podem estar atribuídas aos diferentes substituintes, que podem promover modificações nos parâmetros físico-químicos e estruturais, conforme figura 2 (JAIN et al., 2012; MASTELOTO et al., 2014; MISTRY & JAUHARI, 2013).

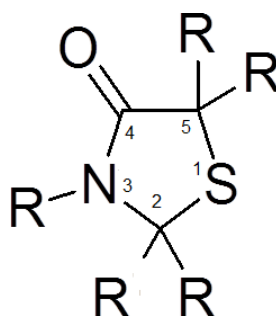


Figura 2: Estrutura química geral de 1,3-tiazolidin-4-onas

As tiazolidinonas são relatadas na literatura por apresentarem diversas atividades biológicas, com uma variedade de aplicações na química medicinal, como por exemplo, a atividade antiretroviral, a antimalárica, a antitumoral, a anti-inflamatória, a antibacteriana (SHRIVASTAVA et al., 2012), além de atividades exploradas dentro do grupo de pesquisa LaQuiABio, como antioxidante (CAMPOS et al., 2013; NEVES et al., 2015) e antifúngica (KUNZLER et al., 2013; MARQUES et al., 2013).

O Laboratório LaQuiABio, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), realiza estudos com heterocíclicos, destacando-se as 4-tiazolidinona como principal foco. As metodologias utilizadas para a obtenção destas moléculas são aquecimento

térmico convencional e as metodologias alternativas de irradiação ultrassônica (GOUVÊA, et al., 2012; NEVES et al., 2015). Além disso, outra metodologia para a síntese destes compostos descritas na literatura é a irradiação por micro-ondas (HASSAN et al., 2014; SHINDE et al., 2015).

MASTELOTO et al., 2015 elaboraram a síntese de uma série de 22 compostos derivados da metilenodioxianilina por meio da metodologia por aquecimento térmico convencional. A obtenção dos compostos ocorreu através de uma reação one-pot entre a 3,4-(metilenodioxi) anilina **1**, benzaldeídos mono e dissustituídos **2** nas posições orto, meta e para por grupos doadores (OCH_3 , OH, CH_3) e retiradores de elétrons (NO_2 , F, Cl), com a formação do intermediário imina **I** e após 3 horas adicionou-se o ácido mercaptoacético **3**. A reação ocorreu em refluxo de tolueno por 22 horas utilizando um aparelho Dean-Stark. Nestas condições, os tiazolidinonas propostas **4** foram obtidas em sua maioria na forma de sólidos ou óleos densos, apresentando rendimentos de 47-90% após purificação.

A figura 3 ilustra a reação de obtenção dessa série de compostos derivados da 3,4-(metilenodioxi)anilina.

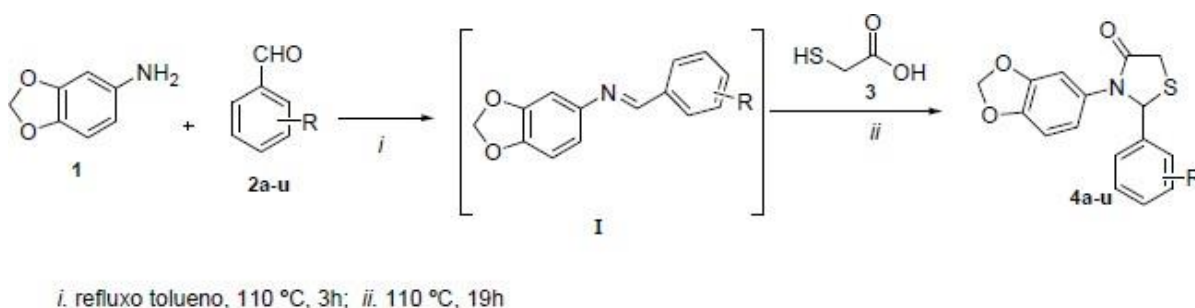


Figura 3: Obtenção da tiazolidinona **4** derivada da 3,4-(metilenodioxi)anilina **1**

Existem várias metodologias sintéticas para a obtenção das 1,3-tiazolidin-4-onas. A mais usual envolve uma reação multicomponente entre um aldeído ou cetona, uma amina primária e o ácido mercaptoacético. A reação pode ser realizada em uma etapa, com adição do ácido mercaptoacético no início da reação junto aos demais reagentes ou adicionando-o após um tempo reacional, caracterizando uma reação one-pot. Ainda, a reação também pode ser realizada em duas etapas, caracterizada pelo isolamento do intermediário imina (JAIN et al., 2012; KUNZLER et al., 2013).

Estudos demonstram a atividade antibacteriana e antifúngica de amplo espectro das 4-tiazolidinonas com diferentes substituintes, podendo levar a uma série de compostos com essa atividade. Neste contexto, SHRIVASTAVA et al em 2012, realizaram estudos das atividades antibacteriana e antifúngica de treze (13) compostos de tiazolidinonas derivadas da 2,6-diaminopiridina, utilizando Estreptomicina, Cloranfenicol e Triflucan como padrão de referência. Os resultados obtidos revelaram claramente que quatro (4) compostos sintetizados exibiram atividade antibacteriana contra os organismos testados e quatro (4) compostos revelou um forte inibidor do crescimento fúngico.

Patil & Bhatt em 2010 sintetizaram uma série de 4-tiazolidinonas substituídas. Os compostos foram testados *in vitro* para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica. A atividade antibacteriana foi conduzida contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) como um microrganismo Gram-positivo e *Escherichia coli* (ATCC 8739) como um microrganismo Gram-negativo. Foram utilizados ampicilina e penicilina como um padrão de referência. Este trabalho apresentou três compostos com atividade contra as cepas de microrganismos testados. Onde os valores da concentração inibitória mínima (MIC) foram encontrados no intervalo de 2 a 64 mg/ml.

Nos últimos anos, a resistência dos microrganismos às substâncias antimicrobianas vem crescendo, representando uma preocupação para a comunidade científica. O elevado número de estudos para a realização da síntese de compostos contendo heterocíclicos de potencial com atividade biológica, sendo mais eficientes, seguros e menos tóxicos, propõem a necessidade da descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana (TRIPATHI et al., 2014).

RESISTÊNCIA MICROBIANA

Alexander Fleming em 1929 observou a inibição em placa de uma cultura de estafilococos contaminada por um fungo identificado como *Penicillium notatum*. Ainda que por acaso, estava sendo criado o primeiro antibiótico da história da humanidade - a penicilina. A nova droga tinha capacidade de diminuir infecções como pneumonia, infecções aéreas superiores, septicemias e outras. Porém, alguns anos depois se descobriram a resistência microbiana (GUIMARÃES et al., 2010; WILSON, 2015).

A resistência microbiana foi descrita por Aporaham e Chain, 1940, que demonstrou o uso clínico da penicilina, na qual obteve sensibilidade em testes com extrato de plantas em amostras de *Escherichia coli* e atualmente, a penicilina é o tratamento de escolha para infecções causadas por *S. aureus* de amostras sensíveis (LEWIS et al., 2013; MADDOX et al., 2015).

A produção de novos fármacos eficientes no combate a infecções microbianas revolucionou o tratamento médico, reduzindo drasticamente a mortalidade causada por doenças microbianas. Entretanto, a disseminação e o uso abusivo dos antibióticos infelizmente fizeram com que os microrganismos também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antimicrobianos, surgindo à resistência bacteriana que é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (LING, et al., 2015; DEL FIOLE et al., 2010; WHO, 2014).

Nos fungos os genes da resistência antifúngica não são transmissíveis de célula a célula da mesma forma que ocorre com muitos genes de resistência bacteriana, não existe evidências de que são capazes de destruir ou modificar os agentes antifúngicos como meio de adquirir resistência, atualmente a formação do biofilme (formação de comunidades microbianas aderidas a diversas superfícies) tem sido descrita como o principal mecanismo de resistência microbiana. (KAGAN et al., 2013; SANTANA et al., 2013).

Uma das principais causas de morte no mundo ao longo da história são as doenças infecciosas, a gravidade dessa mortalidade se dá devido ao surgimento de microrganismos multirresistentes, encontrados em infecções hospitalares e comunitárias. A resistência dos microrganismos aos antibióticos disponíveis clinicamente, tornou-se um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo autores no Brasil, o uso indiscriminado de medicamentos em geral, causa situações cada vez mais preocupantes, como o crescimento de cepas resistentes (DEL FIOLE et al., 2010; WHO, 2014).

A resistência antimicrobiana a um fármaco pode ser classificada como resistência intrínseca e resistência adquirida. A resistência intrínseca faz parte das características naturais, fenotípicas e da herança genética do microrganismo. Por exemplo, quando a bactéria produz uma enzima capaz de degradar o fármaco, como a enzima β -lactamase, trata-se de uma resistência intrínseca. A resistência adquirida

ocorre quando um microrganismo que sofreu mutação passa a informação da resistência para outro microrganismo, ou seja, o DNA alterado é envolvido dentro de um plasmídeo que pode ser transferido a outros organismos (DEL FIOLE et al., 2010; OLIVEIRA & SILVA, 2009).

A resistência aos antifúngicos tem sido motivo de preocupação, por exemplo: a resistência aos azóis, em especial o fluconazol, por ser o fármaco antifúngico padrão em muitos países; a resistência as equinocandinas, que é uma nova classe antifúngica que vem substituindo o fluconazol como terapia empírica nos países desenvolvidos, e onde pouco se sabe sobre o mecanismo envolvido no desenvolvimento da resistência; e as infecções da corrente sanguínea multirresistentes para as quais pode não existir quaisquer opções de tratamento disponível (NEVILLE et al., 2011; WHO, 2014).

BACTÉRIA

Bactérias são organismos procariontes, unicelulares simples, com membrana plasmática, fosfolipídica, cromossomo único, plasmídeos, parede celular e ribossomos como a única organela existente na qual é responsável pela produção de proteínas. Reproduzem-se por divisão assexuada (bipartição ou cissiparidade) ou sexuada (transdução, transformação e conjugação). De uma forma geral esses microrganismos podem medir de 0,2 a 2 μm de diâmetro e de 1 a 6 μm de comprimento. Podem ser classificadas em Gram positivas e Gram negativas, conforme técnica de coloração (KONEMAN et al., 2001).

As funções da membrana plasmática das bactérias são descritas pelo transporte de solutos, produção de energia, biossíntese, duplicação do DNA e secreção (SCHAECHTER et al., 2002).

A parede celular desempenha a função de divisão celular. Os peptidoglicanos proporcionam uma rigidez na parede celular devido a uma camada composta, determina a forma da bactéria e proporciona proteção. A diferença de uma bactéria Gram positiva para uma Gram negativa é a quantidade de peptidoglicanos, onde as Gram positivas possuem uma camada mais espessa. Sendo assim, agentes antimicrobianos atravessam com mais facilidade a parede celular das Gram positivas, enquanto, nas Gram negativas devem atravessar os canais de porinas (ALEGAON & ALAGAWADI, 2011).

Organismos Gram positivo possuem membrana plasmática, fosfolipídios, proteínas, uma única e espessa camada de peptidoglicano na sua parede celular, e quando submetidos à técnica de Gram obtém uma coloração violeta ou azul. Enquanto que os organismos Gram negativos possuem membrana interna, espaço periplasmático, membrana plasmática, fosfolipídios, lipoproteínas, proteínas, porinas, uma parede celular mais delgada e uma segunda membrana lipídica, na parte exterior da parede celular (PURVES et al., 2002), conforme na figura 4:

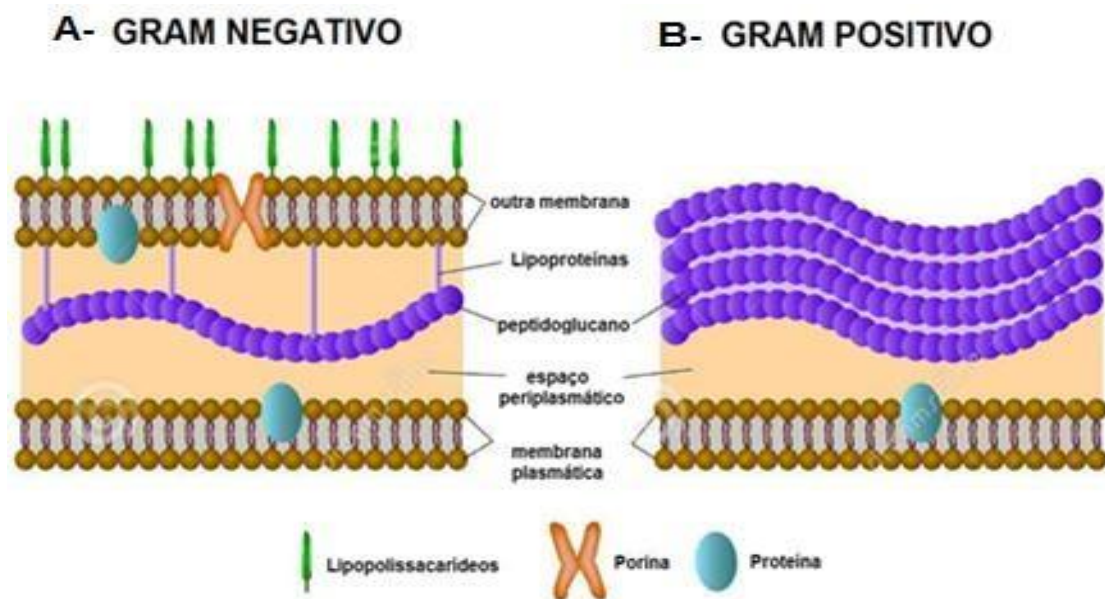


Figura 4: (A) Bactéria gram negativa com apenas uma camada de peptidoglicano e (B) Bactéria gram positiva com uma camada espessa de peptidoglicano

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica (cocos), apresenta-se em cadeias curtas, em cachos ou em grupos. Classificada como Gram positiva, é encontrada na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e da mucosa humana, podendo causar infecções superficiais e/ou disseminadas. É de importância clínica devido ao elevado potencial patogênico (SOUZA et al., 2015; KONEMAN et al., 2001).

S. aureus possui uma parede celular espessa e rígida que consiste em até 50 camadas de peptidoglicano, juntamente com lipoproteínas e outros constituintes. É responsável por infecções simples na pele, podendo evoluir para infecções graves

em pacientes debilitados com doenças imunossupressoras, com elevada incidência em processos de infecção hospitalar (GUERRA et al.; 2015; WHO, 2014).

É considerado um importante patógeno envolvido na etiologia das infecções humanas, causando várias doenças e é encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis (GUERRA et al., 2015). As infecções mais comuns acometem a pele, manifestando-se como espinhas, furúnculo e celulite, e as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, entre outras (MADDOX et al., 2015; SOUZA et al., 2015).

S. aureus foi uma das primeiras bactérias a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, porém sua capacidade de adaptação e resistência a tornou uma das espécies de maior importância no âmbito das infecções hospitalares e comunitárias. Esta resistência foi mediada pela produção de uma enzima beta-lactamase que inativa os fármacos como a penicilina. As cepas de *S. aureus* que apresentam resistência à meticilina são denominadas *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Esta resistência ocorre devido a alterações genéticas que reduzem a ação de antimicrobianos β -lactâmicos, e pela aquisição de um novo gene (*mecA*) que codifica uma nova proteína de ligação à penicilina. São considerados importantes patógenos nosocomiais (QUEIROZ et al., 2012; WHO, 2014).

Escherichia coli

No gênero *Escherichia* a espécie mais comum é a *Escherichia coli*. Este microrganismo pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, e habita o intestino de humanos e animais (MADDOX et al., 2015; SOUZA et al., 2015). Possui uma relação de simbiose com o hospedeiro, desempenhando um papel importante na estabilidade microbiana e mantendo a homeostase intestinal. Quando ocorre um desequilíbrio nesta relação a *E. coli* assume um comportamento patogênico (GUERRA et al., 2015).

Este microrganismo tem como habitat natural o trato intestinal de mamíferos, podendo ser encontrada na água, solo, ar, resíduos orgânicos de origem animal, produtos alimentares de origem vegetal e animal, em fezes de animais domésticos e selvagens, tendo essas como principais fontes de infecções os alimentos e a água (CROXEN et al., 2013). É o principal agente etiológico de infecções da corrente sanguínea em todas as idades, seja comunitária ou nosocomial, sendo responsável

por várias doenças dentre elas: meningite em recém-nascidos, gastroenterite (diarreias), infecção urinária, cistite (inflamação no trato urinário), peritonite (inflamação na membrana que reveste a cavidade abdominal). Considerado um dos principais agentes causadores de infecções de origem alimentar em todo o mundo (SOUZA et al., 2015; WHO, 2014).

E. coli é causadora de várias patologias em seres humanos e animais. Podemos citar algumas das categorias mais conhecidas dessa bactéria em relação às infecções intestinais, são os patótipos: *Escherichia coli* enteroinvasora, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Escherichia coli* entero-hemorrágica (CROXEN et al., 2013).

As bactérias Gram negativas possuem formas de bastonete, e são constituídas por uma parede celular que atua como proteção, na qual forma uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana exterior que contém porinas, lipopolissacarídeos, lipídeos e proteínas (GUERRA et al., 2015).

AGENTES ANTIBACTERIANOS

Segundo Oliveira e colaboradores em 2011 os antibióticos foram classificados quanto sua origem, como:

- Naturais:
 - *Penicillium* - Penicilinas;
 - *Streptomyces* - Tetraciclinas
 - *Cephalosporium* - Cefalosporinas
- Semi- sintéticos:
 - Penicilinas e Cefalosporinas
- Sintéticos:
 - Cloranfenicol
 - Quinolonas
 - Aminoglicosídeos
 - Macrolídeos e outros

As Penicilinas pertencem a um grupo de amplo espectro de ação microbiana e possuem uma baixa toxicidade. Porém apresentam problemas na penetração da parede das bactérias gram-negativas. São obtidas de culturas de fungos *Penicillium notatum* e *Penicillium chrysogenum*. Classificadas como bactericidas. Seu

mecanismo de ação envolve a deformação da parede celular (GUIMARÃES et al., 2010).

As Cefalosporinas apresentam uma maior atividade contra bactérias gram-negativas, ao contrário da Penicilina, elas são obtidas do *Cephalosporium acremonium* e *Streptomyces lactamdurans*. Seu mecanismo de ação consiste na redução da permeabilidade dos poros da membrana, e produção de beta-lactamases, ou seja, inativação hidrolítica dos antibióticos. São classificadas em gerações como 1°, 2°, 3° e 4° geração, levando em consideração a semelhança do fármaco e o seu amplo espectro de atividade antibacteriano (GUIMARÃES et al., 2010).

As tetraciclinas possuem um amplo espectro de ação, baixa toxicidade, baixo custo, e na maioria dos casos pode ser administrada por via oral, possuindo uma ação bacteriostática. Abrange microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Atualmente é descrito seu uso em humanos e também na terapia animal. Seu mecanismo de ação consiste na ligação de um sítio na subunidade 30s do ribossomo bacteriano impedindo que o RNAm se ligue ao sítio aceptor, impedindo assim a síntese proteica (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

Quanto à ação biológica as bactérias são classificadas como bactericidas ou bacteriostáticas, ou seja, a ação bactericida é a capacidade de matar ou lesar irreversivelmente o microrganismo, ex: Penicilinas, Cefalosporinas; a ação bacteriostática é a capacidade de inibir o crescimento e a duplicação de um microrganismo, podendo voltar a crescer com a suspensão do tratamento, ex: Cloranfenicol (OLIVEIRA et al., 2011).

Os antimicrobianos podem atuar sobre a parede celular das bactérias, na membrana citoplasmática, na síntese de proteínas e na síntese de ácidos nucleicos.

- Ação sobre parede celular: o fármaco age no momento da formação dessa parede, deixando a bactéria sem proteção, causando um efeito bactericida.
- Ação sobre a membrana citoplasmática: os antibióticos atuam desorganizando a sua estrutura e alterando sua permeabilidade, produzindo um efeito bactericida.
- Ação sobre a síntese de proteínas: os antimicrobianos dificultam a tradução de informação genética e também induz a formação de proteínas defeituosas, efeito bactericida.

- Ação sobre a síntese de ácidos nucleicos: os antibióticos agem na síntese de DNA, interferindo na replicação da informação genética, e na síntese de RNA impedindo a transcrição da informação genética por bloqueio da enzima RNA-Polimerase. Efeito bactericida (OLIVEIRA et al., 2011).

FUNGOS

Os fungos estão entre os principais agentes de infecções, principalmente em pacientes hospitalizados (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; VOLTAN et al., 2014). Existem cerca de 150 mil espécies de fungos causadoras de doenças, se manifestando principalmente quando os mecanismos de defesa do hospedeiro estão comprometidos. Porém são encontrados no meio ambiente 1,5 milhões de espécies (PEIXOTO et al., 2014; GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

O fungo é um microrganismo eucariótico, na qual o núcleo é bem definido envolto por uma membrana nuclear, com organelas presentes, características que também são observadas em células animais (KUNZLER, et al., 2013). Esta semelhança dos microrganismos com as células do hospedeiro representa a maior dificuldade em elaborar estratégias terapêuticas específicas contra os fungos, sem causar danos ao hospedeiro tornando o tratamento de infecções fúngicas um sério problema (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; KUNZLER, et al., 2013).

As infecções fúngicas podem causar desde reações alérgicas a proteínas fúngicas, bem como reações a toxinas presentes em certos fungos, até infecções apresentadas como micoses. Podemos ter infecções endógenas como, por exemplo, as candidoses, ou infecções adquiridas a partir do meio ambiente, como as infecções por *Cryptococcus* e *Aspergillus* (KATHIRAVAN et al., 2012)

Os fungos na sua estrutura são constituídos de uma parede celular, responsável pela proteção da célula, na qual contém ergosterol na sua membrana celular em vez de colesterol. Os fungos por serem organismos eucarióticos, fazem parte de diferentes estudos em diversas áreas da biologia celular, genética, fisiologia e bioquímica (MARQUES et al., 2014; SCHAECHTER et al., 2002).

Candida albicans

Taxonomicamente o gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, da família *Cryptococcaceae* (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

As espécies do gênero *Candida* são consideradas oportunistas, quando ocorre um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, sendo assim, representam uma das principais causas de infecções fúngicas (PEIXOTO et al., 2014). *Candida albicans* corresponde um dos principais fungos patogênicos predominante nos seres humanos, cerca de 20 a 50% da população predomina na cavidade bucal. São comensais, fazendo parte do trato gastrointestinal, da microbiota vaginal, da uretra e dos pulmões dos seres humanos (SANTANA et al., 2013; VOLTAN et al, 2014).

Este microrganismo é diploide, uma vez que a fase assexuada é representada pela produção de conídios e a sexuada pela produção de brotos, de blastoporos ou blastoconídeos, ocorrendo à formação de hifas (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010). Assim, o gênero *Candida*, ao possuir uma característica de dimorfismo, quando inoculado, apresenta-se na forma inicial de levedura e posteriormente na forma de hifa patogênica (SANTANA et al., 2013).

Segundo autores, a produção de hifas aumenta a capacidade de aderência da levedura aos tecidos do hospedeiro devido ao aumento da superfície de contato do mesmo (PEIXOTO et al., 2014). Deste modo as hifas têm sido relacionadas como as formas mais virulentas, sendo invasiva e patogênica, justificada pela resposta da *Candida albicans* às variações nutricionais e ambientais (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; SANTANA et al., 2013).

Existem várias espécies do gênero *Candida*, sendo a mais predominante à espécie *Candida albicans*. Seguido, então, pelas espécies não-albicans. Estas têm sido cada vez mais relacionadas em processos infecciosos de humanos, são algumas das mais importantes: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida norvegensis*, *Candida lipolytica* (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; KATHIRAVAN et al., 2012; SANTANA et al., 2013).

Alguns autores relatam que em algumas partes do mundo, notadamente nos países da América Latina, *Candida não-albicans* em principal as *C.parapsilosis* e *C. tropicalis* podem ser isoladas e responsáveis por mais de 50% de casos de infecção, estando na segunda posição como maior causa de candidemias (KATHIRAVAN et al., 2012). Porém, as razões para tal problema ainda são desconhecidas, fatores de risco como uso de cateteres intravenoso e a contaminação dos profissionais de saúde são as prováveis justificativas para as infecções (SHAPIRO et a., 2011; VOLTAN et al., 2014).

Rhodotorula

Rhodotorula é um fungo patógeno oportunista emergente, reconhecido nas últimas décadas como um causador de infecção em humanos, especialmente em pacientes imunocomprometidos (DUGGAL et al., 2011). Esta levedura apresenta baixa virulência, porém na clínica se torna mais agressiva, principalmente em pacientes hospitalizados. Os fatores de risco incluem cateteres venosos centrais, neoplasias malignas, e pacientes que fazem uso de antibióticos de largo-espectro, assim contribuindo para a resistência deste fungo (LUNARDI et al., 2006; ZHOU et al., 2014).

Este microrganismo pertence ao gênero *Rhodotorula*, família *Cryptococceae*, são organismos transportados pelo ar e podem estar presentes na pele e na expectoração, urina e fezes. Sua reprodução caracteriza-se por brotamento multilateral. Existem muitas espécies de *Rhodotorura*, porém as três espécies que causam doenças em seres humanos são *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, e *Rhodotorula minuta* (LUNARDI et al., 2006 ; SPILIOPOULOU et al., 2012).

Rhodotorula sp está presente na flora gastrointestinal normal. Entretanto, a maioria das infecções causadas por esta espécie tem sido associada com cateteres intravenosos e acompanhamento de pacientes com tumores sólidos, doenças linfoproliferativas, insuficiência renal crônica, diabetes, endocardites, doenças pulmonares e HIV. A retirada do cateter desses pacientes pode ser um mecanismo de tratamento para as infecções fúngicas, também o uso de agentes antifúngicos como anfotericina B e o fluconazol (DUGGAL et al., 2011; ZHOU et al., 2014).

Este microrganismo também pode causar infecções em animais. Há relatos de infecções de pele em galinhas e animais marinhos, além de infecções pulmonares e otite em ovinos e bovinos (MADDOX et al., 2015).

AGENTES ANTIFÚNGICOS

Os antifúngicos podem ser administrados por via sistêmica ou tópica. Os de uso sistêmico exibem uma variedade de mecanismo de ação, podendo ocasionar danos à membrana celular e intervenção do metabolismo. Entretanto, os antifúngicos de uso tópico apresentam variedade de mecanismo de ação, na qual seu uso é relacionado à superfície corpórea (KATHIRAVAN et al., 2012).

Nos casos de infecção fúngica causadas por *Rhodotorula* sp, os fármacos como a anfotericina B e o fluconazol são recomendados, no entanto algumas cepas deste gênero tem demonstrado certa resistência ao fluconazol ((LUNARDI et al., 2006).

As principais classes de antifúngicos disponíveis atualmente para tratar graves infecções fúngicas são os azóis, os polienos, as equinocandinas e as flucitosinas. O mecanismo de ação dos antifúngicos possuem várias rotas de atividade, dentre elas a síntese do ergosterol, síntese de quitina, síntese de ácido nucleico e síntese de proteínas (KATHIRAVAN et al., 2012; WHO, 2014).

A anfotericina B é o medicamento de escolha para o tratamento da candidíase sistêmica. É um antifúngico polieno obtido de *actinomiceto* encontrado no solo e exerce atividade fungicida e fungistática, dependendo da concentração administrada com um amplo espectro de atividade, é administrada por via endovenosa e não é absorvida pela pele ou pelas membranas de mucosas. Os efeitos adversos provocados pela anfotericina B são irritação local, distúrbios gastrintestinais leves, febre, calafrios e náuseas (ELLEPOLA e SAMARANAYAKE, 2000; NEVILLE et al., 2011).

Este fármaco liga-se a membrana celular e interfere na permeabilidade e nas funções de transporte, formando um poro na membrana e consequentemente criando um canal iônico na parte central hidrofílica da molécula, ocorrendo assim a perda de íons de potássio e alterando o metabolismo da célula. A anfotericina B possui uma afinidade maior pelo ergosterol da membrana dos fungos, que é o principal esteroide encontrado na membrana plasmática de células animais (SCHAECHTER et al., 2002).

O mecanismo de ação dos azóis consiste em bloquear a síntese do ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular fúngica. Os principais fármacos que pertencem ao grupo de agentes sintéticos dos azóis são: fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e econazol (VOLTAN et al., 2014).

Como alternativa viável para o tratamento de candidíase tem-se administrado por via oral ou intravenosa o fluconazol, especialmente para os casos de candidíase disseminada, devido à sua eficácia e baixa toxicidade. É um antifúngico que inibe a síntese de esteróide fúngico e praticamente não altera a síntese do esterol (colesterol) dos mamíferos. Como consequência, apresenta alterações na 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 (PEIXOTO et al., 2014; VOLTAN et al., 2014).

O fluconazol possui um amplo espectro de atividade antifúngica, sendo importante principalmente no tratamento de pacientes imunocomprometidos. Sua alta absorção sistêmica tem sido útil no tratamento de pacientes com AIDS e é eficaz no tratamento de candidíase em mucosa incluindo a candidíase orofaríngea e esofágica. Seus efeitos secundários são geralmente leves, podendo causar náusea, dor gástrica, cefaleia e desconforto abdominal (ELLEPOLA e SAMARANAYAKE, 2000; NEVILLE et al., 2011).

Futuramente, os antifúngicos deverão abranger um maior espectro de atividade fungicida, serem seguro e não tóxico para as células do hospedeiro. Todavia, não podendo apenas depender da síntese de novos compostos, faz-se necessário o aprimoramento das técnicas de diagnóstico e de tratamento, possibilitando assim, uma maior rapidez na identificação da patologia e maior eficácia no combate da mesma (PEIXOTO et al., 2014; SANTANA et al., 2013).

4 ARTIGO

ANTIMICROBIAL *IN VITRO* ACTIVITY OF 2-(ARYL)- 3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-YL THIAZOLIDIN-4-ONE

Silvana Pereira de Souza, Hellen G. Masteloto, Daniel S. da Silva, Juliana H. Azambuja, Elizandra Braganhol, Juliana S. Ribeiro, Rafael Guerra Lund, Wilson Cunico

Os resultados obtidos a partir dos experimentos propostos para o desenvolvimento da dissertação de mestrado resultaram na elaboração de um artigo intitulado ANTIMICROBIAL *IN VITRO* ACTIVITY OF 2-(ARYL)- 3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-Y-THIAZOLIDIN-4-ONE, no qual foi submetido à revista *Medicinal Chemistry*, conforme as normas da mesma.

**ANTIMICROBIAL *IN VITRO* ACTIVITY OF
2-(ARYL)- 3-(BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-YL THIAZOLIDIN-4-ONE**

Silvana Pereira de Souza-*silpersouza@yahoo.com.br*

Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences - Federal University of
Pelotas (CCQFA-UFPel)

Postal address: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário Capão do Leão, s/n°,
P.O Box: 354, Jardim America, Capão do Leão, ZIP: 96160-000, Rio Grande do Sul,
Brazil.

Phone: +55 (53) 84426844

Wilson Cunico - *wjcunico@yahoo.com.br*

Center for Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food -
Federal University of Pelotas

Antimicrobial in vitro activity of 2-(aryl)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)thiazolidin-4-ones

Silvana P. Souza^a, Hellen G. Masteloto,^a Daniel S. da Silva^a, Juliana H. Azambuja,^b Elizandra Braganhol,^b Juliana S. Ribeiro^c, Rafael G. Lund^c and Wilson Cunico^{*a}

^a Laboratório de Química Aplicada a Bioativos, Centro Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. ^b Laboratório de Neuroquímica Inflamação e Câncer ^c Laboratório de Microbiologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Abstract: This study evaluated the biological properties of twelve 1,3-thiazolidin-4-ones by assessing antifungal and antibacterial activities. All compounds were tested against three fungi and two bacteria. The lowest concentration that produced a $\geq 50\%$ inhibition of the growth of yeast in comparison with positive control was identified as MIC₅₀. Compound **1b** showed the best antifungal result against *Candida albicans* with MIC₅₀ 100 $\mu\text{g/ml}$ (52.38% of growth inhibition). In antifungal *Rhodotorula* assay, two compounds showed good antifungal activity with MIC₅₀ 100 $\mu\text{g/ml}$ (**1f**: 82.91% and **1i**: 61.91%). For *C. parapsilosis* compound **1i** has MIC₅₀ 200 $\mu\text{g/ml}$. No antibacterial activity was found for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* at the highest concentration tested (400 $\mu\text{g/ml}$). The cytotoxicity study for three compounds was carried out against primary astrocyte cells and no toxic effect was found at 400 μM . This study discovered at least two potential compounds that will guide further chemical modification for searching better results.

Keywords: 4-thiazolidinones; 1,3-benzodioxol, *Candida albicans*; *Candida parapsilosis*; *Rhodotorula mucilaginosa*; astrocytes.

1. INTRODUCTION

In recent years, chemical alterations on the structure of established agents have had the objective of developing new bioactive compounds. In this sense, heterocyclic compounds such as thiazolidinones, have been highlighted due to the biological activities. Researchers are studying these compounds by reason of their biodiversity and the properties of interest to the pharmaceutical industry, especially antimicrobial [1].

Organic chemistry has contributed to discover new synthetic compounds for clinical use while the pharmaceutical industry has been richly motivated to continue the development of new drugs [2]. It is well demonstrated in the literature that the 4-thiazolidinone ring has multiple substitution sites, representing a class of compounds of great scientific interest also due to their chemical properties [3]. It is emphasized that the heterocyclic 1,3-benzodioxol also was related in the literature with different biological properties such as antitumor [4], anticonvulsant [5], anti-inflammatory [6] and antioxidant [7].

Given the fact that infectious diseases are a major cause of death in the world, people in general necessitate the production of new broad spectrum antimicrobial drugs for combating worldwide mortality [8]. Thus, the search for new drugs increased in order to give new options and combat cases of microbial resistance.

Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungus [3,9,10].

Some yeast are responsible for opportunistic fungal infections, with emphasis on invasive infections [11]. Its infections have been frequent in recent years due to the increasing population on specific medical conditions, such as in cases of surgery, bone marrow and organ transplantation, in addition to the large number of immunocompromised patients, such as those with endocrine diseases, suffering from stress, and mostly positive HIV patients. The fungus *Candida* spp is responsible for most infections [11,12], however there are other kinds of yeast that take advantage of the compromised conditions of the patients being able to cause serious infections, such as *Rhodotorula* spp. that are an emergent opportunistic pathogen [13].

In this context, our research program has been working with thiazolidinones, studying their chemical [14,15] and biological properties [16-18]. With this, a series of 1,3-thiazolidin-4-ones containing the 1,3-benzodioxole group was the target of this work as potential antimicrobial agents.

2. MATERIALS AND METHOD

Antimicrobial

The antifungal and antibacterial assays were carried out using 12 thiazolidinones obtained from previously works [14]. Five dilutions in DMSO were prepared with different concentrations: 400 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$.

2.1.2. Strains Culture Conditions

Tests were carried out with strains of *Candida albicans* (ATCC 62342), *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula*

*Address correspondence to this author at the CCQFA, Federal University of Pelotas, P.O. Box: 354, Pelotas, Brazil; Tel/Fax: +55-53-3275-7358, +55-53-3275-7354; E-mails: wilson.cunico@ufpel.edu.br.

Accordingly, the 4-thiazolidinones compounds have revealed significant antimicrobial activity and have been purpose of study against various microorganisms, such as

mucillaginosa, *Staphylococcus aureus* (ATCC 19095) and *Escherichia coli* (ATCC 29214). These strains were collected from denture user patients with Chronic Atrophic Candidiasis (CAC), enrolled in the Center for Diagnosis of Diseases of the Mouth (CDDDB), School of Dentistry, Federal University of Pelotas (FOP-UFPEL). To fungal study, samples were kept under -80°C , reactivated at room temperature and a 20 μL aliquot was cultivated aerobically on SDA (Sabouraud dextrose agar) (Acumedia Manufactures, Inc, Michigan, USA) with 0,01% chloramphenicol added for 24h at 37°C . To bacterial study, samples were kept under -80°C , reactivated at room temperature and a 20 μL aliquot was cultivated aerobically on Mueller-Hinton Broth (MHB) (ISOFA) supplemented with saccharose to 1% for 24h at 37°C [19,20].

Inoculum

The strains were sub-cultured on Sabouraud Dextrose Agar with 0.2 mg/mL of chloramphenicol at 36°C for 24 h for fungal and Brain and Heart Infusion Agar (BHI), at 37°C for 24h for bacterial. After incubation, these strains were individually inoculated into tubes containing 5 mL of a sterile 0.85% saline solution and the yeast suspension was adjusted to a 0.5 McFarland standard (which is approximately 10^8 colony forming units CFU/mL). The inoculum was then resuspended to obtain a final concentration in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) buffered to pH 7.0 with 165 mmolL⁻¹ of morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil) for fungal and MHB to bacterial [19].

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC₅₀)

MIC₅₀ of the 1,3-thiazolidin-4-ones were determined by using the broth microdilution techniques described by the European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). For yeasts, the MIC₅₀ value was determined as the lowest concentration of the compound in the broth medium that resulted in maintenance or reduction of the inoculum. Spectrophotometric readings on each well were performed with a automatic plate reader Thermo Plate (USA) set at 490 nm for fungal assays and 630 nm for bacterial. Antifungal susceptibility test by Broth Microdilution (BM) was carried out in sterile microdilution plates (KASVI) with 96 flat bottomed wells, composed of eight series identified from A to H, each one with twelve wells. For the test, 20 μL of each concentration of each compound were collected, and 1980 μL of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma) were added for fungal and Heart Infusion Broth (Mueller Hinton) for bacterial. After preparation and dissolution of the above-mentioned compounds, 100 μL of each compound were pipetted into each well of the test plate, to which another 100 μL of the inoculum were added. Five successive dilutions were prepared and 100 μL aliquots were sequentially dispensed into the microdilution plates, filling the wells in the columns numbered from 1 to 5. The columns 6 and 7 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 for fungal and 24h bacterial. The readings were made spectrophotometric, comparing the growth of the yeast in the wells numbered one to five with the wells that had the positive control (cavity 6). The lowest concentration that produced an

inhibition $\geq 50\%$ of the growth of the yeast in comparison with the positive control was identified as the MIC₅₀ [20].

Cytotoxicity

Animals

Experiments were performed using 1-2 day-old male Wistar rats. These animals were obtained from the Central Animal Facility of Universidade Federal de Pelotas (Brazil) and were maintained in temperature controlled environment ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), light/dark cycle of 12h, and the diet both solid as water is provided ad libitum to the animals. The protocol was approved by the Ethics Committee and Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pelotas, Brazil under the protocol number (CEEA 9219).

General cell culture procedure

The culture of primary astrocyte were prepared as described by Da Frola et al, 2009 [21]. In summary, the cortex of neonatal Wistar rats (1-2 days old) were removed and mechanically dissociated in a salt solution with Ca⁺² and Mg⁺² free balanced, pH 7.4. After 10 min of centrifugation (1000 rpm), the pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS. Then, the cells (3×10^4) were plated in 96-well plates. After 4 hours, plates were carefully stirred and washed with phosphate buffered saline (PBS) and the medium was changed. Cultures were allowed growing up to confluence by 20–25 days and the medium was replaced every 4 days.

MTT cell viability assay

The compounds **1b**, **1f**, **1h** and **1i** were carried out to cytotoxicity assay. Then, each compound was solubilized in dimethylsulphoxide (DMSO) and prepared in DMEM at final concentration of 100 μM , 200 μM and 400 μM . The primary astrocytes cells were seeded at 3×10^4 cells/well in DMEM/10% FBS and the cultures were exposed to compounds for 48h and the control cells were treated with vehicle. To analyze the cytotoxicity in primary astrocytes cells, was chosen the method to assess the cell viability, by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT to formazan. The MTT solution was added in the wells with medium in plates with 96 wells at final concentration of 0.5 mg/mL. Then, these plates are brought to the incubator for 90 min at 37°C and a humidified atmosphere with 5% CO₂. After, the medium was removed and the formazan precipitate was shaken with DMSO for 30 min. At 492nm, was measured the optical density of each well, and the results were expressed as percentage of cell viability, considering the growth of the control group as 100%.

Statistical analyses

Data were analyzed by using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons in the softwares Graphpad Prism 5 or Statistics 8. Furthermore, the antifungal activity data were expressed as absorbance and demonstrated as mean $\pm$ standard error and the differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

The general structure of twelve 1,3-thiazolidin-4-ones, synthesized from 3,4-(methylenedioxy)aniline,

arenealdehydes and mercaptoacetic acid according previous work [14] are shown in **Figure 1**. These compounds were carried out to evaluate its antibacterial and antifungal activities against two bacteria (*S. aureus* and *E. coli*) and three fungi (*C. albicans*, *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa*). Tetracycline and fluconazole were used as standard drugs for antibacterial and antifungal assays, respectively

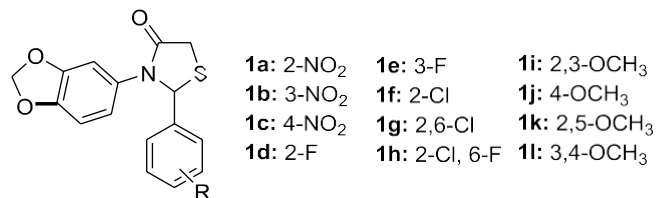


Figure 1. General structure of tested thiazolidinones **1a-l**.

First of all, the MIC₅₀ of thiazolidinones against all tested microorganisms were measured. The **Table 1** shows these MICs considering the lowest concentration that inhibit at least 50% of microbial growth, compared to control. None compound tested showed 100% of inhibitory effect for fungi or bacteria.

The antibacterial assay against *S. aureus* and *E. coli* showed that none compound is able to inhibit the bacterial growth at the highest concentration used 400 µg/mL. In this sense, it is understood that these compounds have no antibacterial action.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC₅₀) expressed in µg/mL of thiazolidinones against *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa*, *S. aureus* and *E.coli*.

Comp.	R	Molecular weight	MIC ₅₀ (µg/mL) (% of growth inhibition)				
			<i>C. albicans</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
			48h	48h	48h	24h	24h
1a	2-NO ₂	344.34	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
1b	3-NO ₂	344.34	100 (52.38)	> 400	> 400	> 400	> 400
1c	4-NO ₂	344.34	> 400	200 (66.92)	> 400	> 400	> 400
1d	2-F	317.33	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
1e	3-F	317.33	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
1f	2-Cl	333.79	> 400	100 (82.91)	400 (65.98)	> 400	> 400
1g	2,6-Cl	368.23	200 (51.56)	> 400	> 400	> 400	> 400
1h	2-Cl, 6-F	351.78	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
1i	2,3-OCH ₃	359.40	> 400	100 (61.91)	200 (67.97)	> 400	> 400
1j	4-OCH ₃	329.37	200 (51.44)	200 (98.07)	> 400	> 400	> 400
1k	2,5-OCH ₃	359.40	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
1l	3,4-OCH ₃	359.40	200 (61.94)	200 (61.64)	> 400	> 400	> 400
Fluconazole		306.27	<25	<25	<25	<25	<25
Tetracycline		444.43	<25	<25	<25	<25	<25

The results of all thiazolidinones at 100 µg/mL were compared by one way analysis of variance. In the assay with *C. albicans* (Figure 2), it turns out that all of the tested compounds showed statistical difference compared with the control group, except for compounds **1d** and **1h**. The compound **1b** (R=3-NO₂) the best antifungal result against *C. albicans* (52.38%). It is noted that the thiazolidin-4-one with NO₂ group at 4-position (**1c**; 45.13%) also presented good results, suggesting that this group is important for activity. Besides, compounds with two methoxy groups (**1i**; 42.20%) and (**1k**; 43.00%) exhibited to be interesting as well as one methoxy group (**1j**; 39.17%).

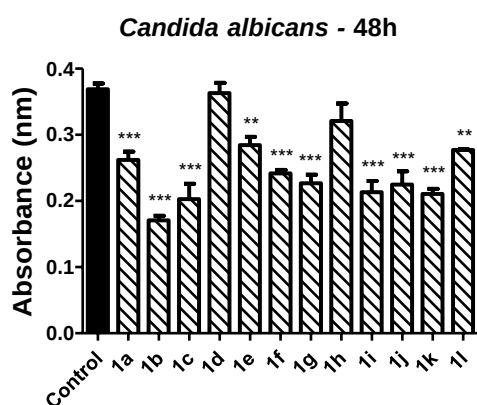


Figure 2. Antifungal activity screening of thiazolidinones at 100 µg/mL in 48h. Bars represent means $\pm$ SEM; * represents statistical difference from water control group, considering $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test, $n = 3$).

Similarly, all compounds were compared at concentration 100 µg/mL against *C. parapsilosis* and none of them had MIC₅₀ (Figure 3). Five (**1b**, **1f**, **1g**, **1h** and **1i**) of twelve compounds showed statistical difference in relation to the growth control in this trial. The best results were found for compounds **1h** and **1g** that are disubstituted at the same position, having R=2-Cl, 6-F and R=2,6-Cl, respectively.

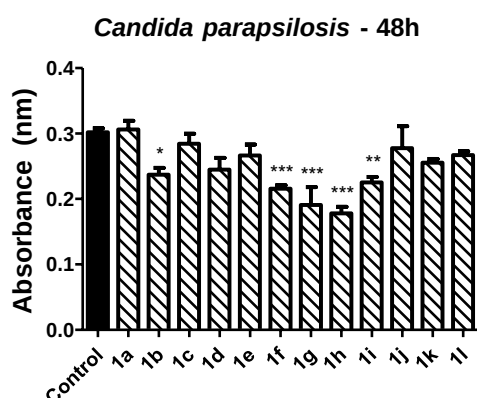


Figure 3. Antifungal activity screening of thiazolidinones **1a-1l** at 100 µg/mL in 48h against *C. parapsilosis*. Bars represent means $\pm$ SEM; *

represents statistical difference from water control group, considering $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test, $n = 3$).

Besides that, it was also evaluated the antifungal potential of thiazolidinones against *R. mucilaginosa* (Figure 4). In this test was verify the fungal growth in 48h, and from twenty tested compounds, only two presented statistical difference from control group. These two compounds showed good antifungal activity at 100 µg/mL, **1f** (R=2-Cl, 82.91%) and **1i** (R=2,3-OCH₃, 61.91%). It is important to highlight that these compounds (**1f** and **1i**) presented the best percentage of fungus growth inhibition in this work.

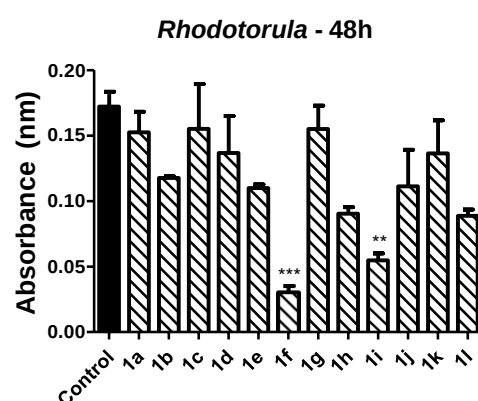


Figure 4. Antifungal activity screening of thiazolidinones **1a-1l** at 100 µg/mL in 48h against *R. mucilaginosa*. Bars represent means $\pm$ SEM; * represents statistical difference from water control group, considering $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test, $n = 3$).

The compounds that have MIC₅₀ at 100 µg/mL for each fungus were analyzed by variance at different concentrations to verify the dose-respondering and the lowest effective dose. According to the Figure 5 (A), it can be observed the importance of the concentration on the antifungal response for compound **1b**. Importantly, with the lowest concentration used (25 µg/mL; 32.65% in 48 h), the compound **1b** appeared to be different from the growth control. The percentage of growth inhibition of **1b** range from 32.65% (25 µg/mL) to 56.91% (200 µg/mL). Beyond that, the concentration of 400 µg/mL was not used due to insolubility in DMSO. Further, in Figure 5 (B), the compounds **1f** and **1i** were tested at concentrations of 25, 50 and 100 µg/mL for 48 hours against *R. mucilaginosa*. The concentrations of 200 and 400 µg/mL were not used in the test for problems of DMSO solubility. In general, the two-way analyses of variance demonstrated that the compound **1f** (B) presented different from control group (A), while the compound **1i** did not (AB). Moreover, analyzing the results of growth inhibition for compound **1f**,

each concentration was considered different from each other: at 50 µg/mL, 47.61% (b); at 100 µg/mL 82.91% (c); and at 25 µg/mL did not present a relevant inhibition (a).

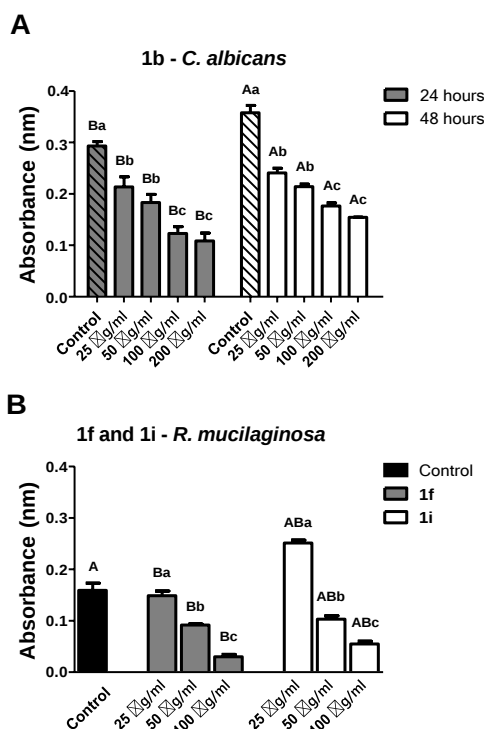


Figure 5. Concentration-response of antifungal activity of thiazolidinones. **A)** compound **1b** against *C. albicans*. Capital letters represents statistical difference between time and small letters represents difference between concentrations, considering $P < 0.05$; **B)** compounds **1f** and **1i** against *R. mucilaginosa* in 48h. Capital letters represents statistical difference between all groups (treatment and control) and small letters represents difference between concentrations, considering $P < 0.05$ (Two-way ANOVA followed by Tukey's test, $n=3$). Bars represent means $\pm$ SEM.

Evaluating the cytotoxicity assay, it was verified that the three thiazolidinone tested (**1b**, **1f** and **1i**) maintained the cell growth similar to control group, according statistical analyses (**Table 2**). It represent that these compounds did not show toxicity. However, in the highest concentration (400 µM), compound **1i** showed the lowest percentage of cell viability (70.1%).

Table 2. Cytotoxicity of thiazolidinones in primary astrocytes in 48h.

Compound	Cytotoxicity (% of cell viability $\pm$ Std. Error) ^a		
	100 µM ^b	200 µM ^c	400 µM ^d
1b	92.7 $\pm$ 4.996	90.8 $\pm$ 7.205	91.4 $\pm$ 7.823
1f	112.2 $\pm$ 3.991	103.5 $\pm$ 4.081	88.7 $\pm$ 5.405
1i	91.3 $\pm$ 1.425	100.4 $\pm$ 23.00	70.1 $\pm$ 15.57

^a The results were expressed as percentage of cell viability, considering the growth of the control group as 100%. One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test, $n=4$; ^b the concentration range from 33.38 to 35.94 µg/mL; ^c range from 66.76 to 71.88 µg/mL; ^d range from 133.51 to 143.76 µg/mL.

4. CONCLUSION

From twelve different 1,3-thiazolidin-4-ones tested against three fungi, we highlight the activity of two compounds with MIC₅₀ 100 µg/mL: **1b** had a good activity against *C. albicans*; and **1f** with potential activity against *R. mucilaginosa*. However, the twelve compounds tested showed no activities against *S. aureus* and *E. coli*. It is known that this is only a preliminary work, however, it is understood that the results of this study create perspectives for further research. It is important to highlight the development of the heterocyclic organic compounds synthesis from the core of the 4-thiazolidinones and the consequent evaluation of pharmacological activity, specially the antifungal with the aim of increasing the therapeutic possibilities to fight diseases caused by microorganisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- [1] Kathiravan, M. K.; Salake, A. B.; Chothe, A. S.; Dudhe, P. B.; Watode, R. P.; Mukta, M. S.; Gadhwhe, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20(19), 5678-5698.
- [2] Patrick, G. L. An introduction to medicinal chemistry. 4 ed. New York, Oxford University Press, **2009**.
- [3] Tripathi, A. C.; Gupta, S. J.; Fatima, G. N.; Sonar, P. K.; Verma, A.; Saraf, S. K. 4-Thiazolidinones: the advances continue... *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 72, 52-77.
- [4] Leite, A. C. L.; da Silva, K. P.; de Souza, I. A.; de Araujo, J. M.; Brondani, D. J. Synthesis, antitumor and antimicrobial activities of new peptidyl derivatives containing the 1,3-benzodioxole system. *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, 39, 1059-1065.
- [5] Aboul-Enein, M. N.; El-Azzouny, A. A.; Attia, M. I.; Maklad, Y. A.; Amin, K. M.; Abdel-Rehim, M.; El-Beairy, M. F. Design and synthesis of novel stiripentol analogues as potential anticonvulsants. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 47, 360-369.
- [6] Lopes, R.; Romeiro, N. C.; de Lima, C. K. F.; da Silva, L. L.; de Miranda, A. L. P.; Nascimento, P. G. B. D.; Cunha, F. Q.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M. Docking, synthesis and pharmacological activity of novel urea-derivatives designed as p38 MAPK inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 54, 264-271.
- [7] Himaja, M.; Vandana, K.; Ranjitha, A.; Ramana, M. V.; Asif, K. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of 1,3-Benzodioxole-5-carboxyl amino acids and dipeptides. *Int. Res. J. Pharm.*, **2011**, 2, 57-61.
- [8] Queiroz, G. M. D.; Silva, L. M. D.; Pietro, R. C. L. R.; Salgado, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. *Rev. Soc. Bras. Clín. Med.*, **2012**, 10(2), 132-138.
- [9] Vinay, V.; Lakshika, K. A review on anti microbial activity of 4-thiazolidinone derivatives. *International*

- Journal of Research in Pharmacy and Science*, **2011**, *1*, 17-27.
- [10] Haroun, M.; Tratat, C.; Tsolaki, E.; Geronikaki, A. Thiazole-based thiazolidinones as potent antimicrobial agents: design, synthesis and biological evaluation. *Comb. Chem. High T. Scr.* **2016**, *19*(1), 51-57.
- [11] Santana, D. P.; Ribeiro, E. L.; Menezes, A. C. V.; Faleiro P. L. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, **2013**, *12*(2), 229-233.
- [12] Peixoto, J. V.; Rocha, M. G.; Nascimento, R. T. L.; Moreira, V. V.; Kashiwabara, T. G. B. Candidíase - uma revisão de literatura. *Braz. J. Surg. Clin. Res.*, **2014**, *8*(2), 75-82.
- [13] García-Suárez, J.; Gómez-Herruz, P.; Cuadros, J. A.; Burgaleta, C. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. *Mycoses*, **2011**, *54*(4), 318-324.
- [14] Masteloto, H. G.; Drawanz, B. B.; Berwaldt, G. A.; Neuenfeldt, P. D.; Siqueira, G. M.; Cunico, W. 3,4-(Methylenedioxy) aniline as precursor to the synthesis of thiazolidin-4-ones. *Monatsh. Chem.*, **2015**, *146*(2), 327-334.
- [15] Neves, A. M.; Duval, A. R.; Berwaldt, G. A.; Gouvêa, D. P.; Flores, N. P.; Silva, P. G.; Stefanello, F. M.; Cunico, W.. Thiazolidin-4-ones from 3-(aminomethyl)pyridine, arenealdehydes and mercaptoacetic acid: Synthesis and radical scavenger activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*(2), 381-388.
- [16] Marques, G. H.; Kunzler, A.; Bareno, V. D. O.; Drawanz, B. B.; Masteloto, H. G.; Leite, F. R. M.; Nascimento, G. G.; Nascente, P. S.; Siqueira, G. M.; Cunico, W. Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl)thiazolidinone derivatives. *Med. Chem.*, **2014**, *10*(4), 355-360.
- [17] Kunzler, A.; Neuenfeldt, P. D.; Neves, A. M.; Pereira, C. M. P.; Marques, G. H.; Nascente, P. S.; Fernandes, M. H. V.; Hubner, S. O.; Cunico, W. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl) thiazolidinones. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 74-80.
- [18] Gouvea, D. P.; Vasconcellos, F. A.; Berwaldt, G. A.; Neto, A. C. P. S.; Fischer, G.; Sakata, R. P.; Almeida, W. P.; Cunico, W. 2-Aryl-3-(2-morpholinoethyl)thiazolidin-4-ones: Synthesis, anti-inflammatory in vivo, cytotoxicity in vitro and molecular docking studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 259-265.
- [19] Stein, E. M.; Colepicolo, P.; Afonso, F. A.; Fujii, M. T. Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Rev. Bras Farmacogn.* **2011**, *21*(2), 290-295.
- [20] Oliveira, S.; Pizzuti, L.; Quina, F.; Flores, A.; Lund, R.; Lencina, C.; Pacheco, B.; Pereira, C. M. P.; Piva, E. Anti-Candida, Anti-Enzyme Activity and Cytotoxicity of 3, 5-Diaryl-4, 5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamides. *Molecules*, **2014**, *19*(5), 5806-5820.
- [21] da Frota Jr, M. L. C.; Braganhol, E.; Canedo, A. D.; Klamt, F.; Apel, M. A.; Mothes, B.; Lerner, C.; Battastini, A. M.; Henriques, A. T.; Moreira, J. C. F. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. *Invest. New Drugs*, **2009**, *27*, 13-20.

Received:

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em consideração esses aspectos e com o intuito de aumentar as possibilidades terapêuticas no combate à resistência microbiana e as doenças causadas por microrganismos, destaca-se o desenvolvimento de sínteses de compostos orgânicos heterocíclicos a partir do núcleo das 4-tiazolidinonas e a consequente avaliação da atividade farmacológica.

Neste trabalho, dentre os doze derivados de 4-tiazolidinonas testados, ressaltamos que os compostos **1b** apresentou boa atividade contra *C. albicans*, **1h** com potencial de atividade contra *C.parapsilosis* e **1f** com potencial de atividade contra *Rhodotorula*. Os compostos testados não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

Os resultados sugerem uma complementação e aprofundamento dos estudos em relação a novos testes que devem ser realizados, a fim de determinar o mecanismo da ação antifúngica desses compostos, bem como testes *in vivo* e testes de citotoxicidade. Considerando a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos faz-se necessário a descoberta de fármacos que combatam essa resistência.

REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, M. N.; EL-AZZOUNY, A. A.; ATTIA, M. I.; MAKLAD, Y. A.; AMIN, K. M.; ABDEL-REHIM, M.; EL-BEHAIRY, M. F. Design and synthesis of novel stiripentol analogues as potential anticonvulsants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p.360-369, 2012.

ALEGAON, S. G.; & ALAGAWADI, K. R. New thiazolidine-2, 4-diones as antimicrobial and cytotoxic agent. **Medicinal Chemistry Research**, v.21, n.10, p.3214-3223, 2012.

CAMPOS, J. C.; GOUVÊA, D. P.; RIBEIRO, C. D. S.; DUTRA, F. S.; STEFANELLO, F. M.; PEREIRA, C. M.; SIQUEIRA, G. M. Efficient Synthesis and Antioxidant Evaluation of 2-Aryl-3-(Pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v.27, n.9, p.445-450, 2013.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v.26, n.4, p.822-880, 2013.

DEL FIOL, F. D. S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I. D.; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.1, p.68-72, 2010.

DUGGAL, S.; JAIN, H.; TYAGI, A.; SHARMA, A.; CHUGH, T. D. Rhodotorula fungemia: two cases and a brief review. **Medical mycology**, v.49, n.8, p.879-882, 2011.

DUVAL, A. R.; CARVALHO, P. H.; SOARES, M. C.; GOUVÊA, D. P.; SIQUEIRA, G. M.; LUND, R. G.; CUNICO, W. 7-Chloroquinolin-4-yl Arylhydrazones Derivatives: Synthesis and Antifungal Activity. **The Scientific World Journal**, vol.11, p.1489-1495, 2011.

ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral Candidal Infections and Antimycotics. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.11, n.2, p.172-198, 2000.

GARCÍA-SUÁREZ, J.; GÓMEZ-HERRUZ, P.; CUADROS, J. A.; BURGALETA, C. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. **Mycoses**, v.54, n.4, p.318-324, 2011.

GIOLO, M.P.; & SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, n.3, p.225-234, 2010.

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, n.6, p.1127-1131, 2012.

GUERRA, P. A.; DA SILVA, R. A. A.; QUEIROZ, A. F.; FIGUEIREDO, T. B.; MARQUES, L. M.; LIMA, L. L.; DOS SANTOS, D. P. Comparison between inflammatory profiles during infections with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in a murine air pouch model. **Scientia Plena**, v.11, n.9, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; MONESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova, Ribeirão Preto**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HASSAN, A. A.; MOHAMED, S. K.; MOHAMED, N. K.; EL-SHAIEB, K. M.; ABDEL-AZIZ, M.; ABDEL-AZIZ, A. T. Synthesis and antibacterial activity of new substituted ethylidenehydrazinylidene-1, 3-thiazol-4-ones. **Journal of Chemical Research**, v.38, n.11, p.673-678, 2014.

HIMAJA, M.; VANDANA, K.; RANJITHA, A.; RAMANA, M. V.; ASIF, K. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of 1,3-Benzodioxole-5-carboxyl amino acids and dipeptides. **International Research Journal of Pharmacy**, v.2, p.57-61, 2011.

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, n.11, p.3378-3395, 2012.

KAGAN, S.; JABBOUR, A.; SIONOV, E.; ALQUNTAR, A. A.; STEINBERG, D.; SREBNIK, M.; NIR-PAZ, R.; WEISS, A.; POLACHECK, I. Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p.416-427, 2014.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, 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, n.19, p.5678-5698, 2012.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed. Medsi: Rio de Janeiro, p.796-809, 2001.

KUNZLER, A.; NEUENFELDT, P. D.; DAS NEVES, A. M.; PEREIRA, C. M.; MARQUES, G. H.; NASCENTE, P. S.; MAUREEN, H.V.; FERNANDE, S.C.; HÜBNER, S.O.; CUNICO, W. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl) ethyl) thiazolidinones. **European journal of medicinal chemistry**, v.64, p.74-80, 2013.

LEITE, A. C. L.; DA SILVA, K. P.; DE SOUZA, I. A.; DE ARAUJO, J. M.; BRONDANI, D. J. Synthesis, antitumor and antimicrobial activities of new peptidyl derivatives containing the 1,3-benzodioxole system. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 1059-1065, 2004

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v.12, n.5, p.371-387, 2013.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; & JONES, M. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v.517, n.7535, p.455-459, 2015.

LOPES, R.; ROMEIRO, N. C.; DE LIMA, C. K. F.; DA SILVA, L. L.; DE MIRANDA, A. L. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CUNHA, F. Q.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Docking, synthesis and pharmacological activity of novel urea-derivatives designed as p38 MAPK inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 264-271, 2012.

LUNARDI, L.W.; AQUINO, V.R.; ZIMERMAN, R.A.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. **Clinical Infectious Disease**, v. 43, p. e60-63, 2006.

MADDOX, T. W.; CLEGG, P. D.; WILLIAMS, N. J.; PINCHBECK, G. L. Antimicrobial resistance in bacteria from horses: Epidemiology of antimicrobial resistance. **Equine veterinary journal**, v.47, n.6, p.756-765, 2015.

MARQUES, G.H.; KUNZLER, A.; BARENO, V.D.O.; DRAWANZ, B.; G MASTELLOTO, H.; LEITE, F. R.M; NASCIMENTO, G.G.; NASCENTE, P.S.; GEONIR, S.M.; CUNICO, W. Antifungal Activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl) thiazolidinone Derivatives. **Medicinal Chemistry**, v.10 n.4, p.355-360, 2014.

MASTELOTO, H. G.; DRAWANZ, B. B.; BERWALDT, G. A.; NEUENFELDT, P. D.; SIQUEIRA, G. M.; CUNICO, W. 3,4-(Methylenedioxy) aniline as precursor to the synthesis of thiazolidin-4-ones. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v.146, n.2, p.327-334, 2015.

MISTRY, B. M.; & JAUHARI, S. Synthesis and in vitro antimicrobial and anti-tubercular evaluation of some quinoline-based azitidinone and thiazolidinone analogues. **Medicinal Chemistry Research**, v.22, n.2, p.635-646, 2013.

NEVES, A. M.; DUVAL, A. R.; BERWALDT, G. A.; GOUVÊA, D. P.; FLORES, N. P.; SILVA, P. G. D.; STEFANELLO, F.M.; CUNICO, W. Thiazolidin-4-ones from 3-(Aminomethyl) pyridine, Arenealdehydes and Mercaptoacetic Acid: Synthesis and Radical Scavenger Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26, n.2, p.381-388, 2015.

NEVILLE, B.W.; ALLEN, C.M.; DAMM, D.D. **Patologia: Oral & Maxilofacial**. 2° Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

OLIVEIRA, A.C.; & DA SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.10, n.1, 2009.

OLIVEIRA, I. L. M. D.; FERREIRA, A. C. D. A.; MANGUEIRA, D. F. B.; MANGUEIRA, L. F. B.; MANGUEIRA, L.F.B.; FARIAS, I. A. P. Antimicrobianos de uso odontológico: informação para uma boa prática. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v.10, n.3, p.217-220, 2011.

PATIL, S. T.; BHATT, P. A. Synthesis and biological evaluation of some novel 2-(4-substituted phenyl)-3-(4-substituted phenyl)-5-methylthiazolidin-4-ones. **International Journal of Pharmacy and Technology**, v.2, n.3, p.674-682, 2010.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. D.; SANTOS, H. D.; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v.33, n.3, p.700-706, 2010.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.8, n.2, p.75-82, 2014.

QUEIROZ, G. M. D.; SILVA, L. M. D.; PIETRO, R. C. L. R.; & SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v.10, n.2, 2012.

SANTANA, D.P.; RIBEIRO, E.L.; MENEZES, A.C.V.,I.; FALEIRO P. L. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.2, p.229-233, 2013.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismo das Doenças Infecciosas**, 3ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.642, 2002.

SHINDE, A. T.; ZANGADE, S.; CHAVAN, S.; TIWDE, S. Synthesis and antioxidant activity of some novel derivatives of bis-2-azetidinones and bis-4-thiazolidinones. **Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry**, v.2, n.4, p.22-31, 2015.

SHRIVASTAVA, S. P.; SEELAM, N.; RAI, R. Synthesis and antimicrobial activity of new thiazolidinone derivatives with the use of γ -ferrite catalyst. **Journal of Chemistry**, v.9, n.2, p.825-831, 2012.

SOUZA, A. P. O.; OLIVEIRA, R. M.; DE OLIVEIRA, S. F.; FORTUNA, J. L. Atividade antimicrobiana dos sumos de alecrim, aroeira, guiné e mastruz sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, v.11, n.7, p.9, 2015.

SPILIOPOULOU, A.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. *Rhodotorula* fungemia of an intensive care unit patient and review of published cases. **Mycopathologia**, v.174, n.4, p.301-309, 2012.

TRIPATHI, A. C.; GUPTA, S. J.; FATIMA, G. N.; SONAR, P. K.; VERMA, A.; SARAF, S. K. 4-Thiazolidinones: the advances continue. **European journal of medicinal chemistry**, v.72, p.52-77, 2014.

VOLTAN, A. R.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Candiduria: Epidemiology, Resistance, Classical and Alternative Antifungals Drugs. **SOJ Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.2, p.1-7, 2014.

WHO. Global strategy for containment of antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, p.105, 2014.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and bacterial resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v.12, p.35-48, 2014.

ZHOU, J.; CHEN, M.; CHEN, H.; PAN, W.; LIAO, W. Rhodotorula minuta as onychomycosis agent in a Chinese patient: first report and literature review. **Mycoses**, v.57, n.3, p.191-195, 2014.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S719a Souza, Silvana Pereira de

Avaliação in vitro das atividades antimicrobianas de 2-aril- 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il) tiazolidin-4-onas / Silvana Pereira de Souza ; Wilson João Cunico Filho, orientador. — Pelotas, 2016.

46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. 4-tiazolidinonas. 2. 1,3-benzodioxol. 3. Candida albicans. 4. Candida parapsilosis. 5. Rhodotorula mucilaginosa. I. Cunico Filho, Wilson João, orient. II. Título.

CDD : 574.192