UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

Dissertação

Síntese e Avaliação Antifúngica de Tiazolidinonas Derivadas da 2- Aminoetilpiperidina

Alice Kunzler

Pelotas, 2012

ALICE KUNZLER

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE TIAZOLIDINONAS DERIVADAS DA 2-AMINOETILPIPERIDINA

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, 06 de dezembro de 2012.

Universidade Federal de Pelotas
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE TIAZOLIDINONAS DERIVADAS DA 2-AMINOETILPIPERIDINA

elaborada por
Alice Kunzler

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho - Presidente/ Orientador –UFPel

_____

Profª. Drª. Rosélia Maria Spanevello - UFPel

_____

Drª. Luciana Piovesan- FURG

Pelotas, dezembro de 2012.

Aos meus pais, por todo amor, vocês são fundamentais em minha vida.

Ao Prof. Dr. Wilson Cunico pela oportunidade
e preciosa orientação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Olvídio e Loni, por todo amor, carinho, compreensão e por sempre me incentivarem, não medindo esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Orgulho-me muito de vocês, pessoas em quem me espelho pelo exemplo de dedicação, trabalho e honestidade;

A minha irmã Aline e meu cunhado Magnos por todo amor, carinho e apoio;

Ao meu sobrinho que amo Théo, que só me traz alegrias e me enche de felicidade;

A minha prima Letícia, pela recomendação do mestrado e a todos os demais familiares pela torcida;

Ao meu orientador Wilson, pela amizade, oportunidade, confiança, pelos conselhos, ensinamentos e por ser sempre atento e preocupado. Foi muito bom conviver com um exemplo de profissional pela dedicação e por ser uma pessoa rara na disponibilidade demonstrada em ajudar os demais. Não tenho palavras para agradecer por tudo que fizestes por mim durante esta jornada;

A colega de mestrado Gabriela Marques, pela amizade, carinho e convivência. Com certeza te levarei como uma grande amiga que este mestrado me proporcionou, e só tenho a agradecer toda tua paciência nos momentos difíceis, e todo teu companheirismo. Jamais esquecerei nossos sábados de muito trabalho e de muitas risadas;

A professora Patrícia, do laboratório de Micologia, por toda ajuda e orientação na realização dos testes de avaliação antifúngica;

A professora Silvia, do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária, pela realização dos testes de citotoxicidade;

A todos os docentes do programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, em especial aos que foram meus professores, pelos ensinamentos, por toda ajuda e paciência;

As professoras Francieli, Rosélia, Elizandra, Giovana e Márcia pelo carinho, paciência e valiosos conselhos;

Aos alunos do LaQuiABio, pela ajuda, paciência, todos os ensinamentos e companheirismo. Sem vocês teria sido muito mais difícil a realização deste trabalho: Daniela, Adriana, Gabriele, Auri, Juliano, Bruna, Hellen, Roberta, Carol. Tenho muito orgulho de ter feito parte deste grupo pela união e coleguismo que demonstram em todos os momentos;

A Valéria, que além de colega de laboratório, se transformou em uma grande amiga, sempre me ajudando e dando força;

Aos demais alunos de laboratório, Marisani, Camila e Liane.

A todos os colegas de mestrado pela união demonstrada para enfrentar os desafios de ser a primeira turma do programa;

Aos colegas José e Marco, por toda ajuda nos espectros de CG e pela amizade;

A colega Lucimar, pela amizade e carinho;

Aos alunos do laboratório de Micologia, Patrícia, Josy, Vivi, Bel e Vini, por todo carinho e ajuda;

Aos funcionários do departamento de química orgânica, Hélio, Elba, Daiane e Isabel;

Aos meus amigos pelo carinho, em especial a Cláudia, pela paciência, pelos conselhos, por estar sempre ao meu lado me proporcionando momentos de muita alegria. Tua amizade significa muito para mim;

As minhas amigas Ana Paula e Jaqueline, pela excelente convivência, carinho, confiança e respeito a individualidade que sempre demonstraram;

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela oportunidade;

A CAPES pelo auxílio financeiro;

A Universidade Federal de Santa Catarina pelos espectros de RMN;

A Universidade Federal de Pelotas pelos Espectros de CG/CG-MS;

A Deus pela força e coragem concedidas para trilhar meu caminho.

RESUMO

KUNZLER, Alice. **Síntese e avaliação antifúngica de tiazolidinonas derivadas da 2-aminoetilpiperidina.** 2012. 105f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Uma série de dezesseis 1,3-tiazolidin-4-onas foi sintetizada a partir da 2-aminoetilpiperidina, benzaldeídos substituídos e ácido mercaptoacético. As tiazolidinonas foram sintetizadas através da metodologia convencional com o uso de *Dean Stark* para remoção azeotrópica da água. A reação ocorreu em cinco horas e foi realizada em duas etapas, com a formação inicial do intermediário imina, e posterior ciclização intramolecular e formação dos produtos. Todas as substâncias são inéditas na literatura e foram identificadas através de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-MS) e ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C (RMN). Posteriormente, a série de compostos foi submetida à avaliação antifúngica contra sete leveduras, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. Os resultados encontrados foram relatados em valores de concentração inibitória mínima (CIM): *Candida albicans* (45-150 µg/mL), *C. parapsilosis* (50-100 µg/mL), *C. guilliermodii* (25-200 µg/mL), *Criptococcus laurentii* (66-200 µg/mL), *Geotrichum* sp (25-100 µg/mL), *Trichosporum asahii* (50-100 µg/mL), e *Rhodutorula* sp (50-100 µg/mL). Os melhores resultados foram encontrados contra o fungo *Rhodotorula* sp, sendo que os compostos **4l** e **4h** apresentaram os menores valores de CIM, com mais atividade que o fármaco padrão fluconazol. A substância **4g** também mostrou boa atividade contra *Geotrichum* sp e *C. guilliermondii*. Todos os compostos apresentaram os mesmos valores para concentração fungicida mínima (CFM) que os encontrados para a CIM. Assim, as tiazolidinonas **4a-p** foram sintetizadas com alto grau de pureza e bons rendimentos com o uso da metodologia convencional. Os resultados da avaliação biológica revelaram um potencial efeito dos compostos contra fungos leveduriformes, principalmente contra *Rhodotorula* sp.

Palavras-chave: Tiazolidinonas, piperidina, avaliação antifúngica, citotoxicidade

ABSTRACT

KUNZLER, Alice. **Síntese e avaliação antifúngica de tiazolidinonas derivadas da 2-aminoetilpiperidina.** 2012. 105f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A series of sixteen novel thiazolidinone derivatives was synthesized from the efficient multicomponent reaction of 2-(piperidin-1-yl)ethylamine 1, arenealdehydes 2a-p and mercaptoacetic acid 3 in good yields. Identification and characterization of products were achieved by NMR and GC-MS techniques. The in vitro antifungal activities of all synthesized compounds were evaluated against seven fungi: *Candida albicans, C. parapsilosis, C. guilliermodii, Criptococcus laurentii, Geotrichum* sp, *Trichosporum asahii* and *Rhodutorula* sp. The results are expressed as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and the best results were found against the *Rhodutorula* sp yeast. Two thiazolidinones (**4h** and **4l**), MIC/MFC 16.5 μg/mL) proved to be 1.6 times more active than fluconazole and four of them (**4b**, **4e**, **4g** and **4k** (MIC/MFC 25 μg/mL) showed similar activity of standard drug to *Rhodutorula* sp. In addition, the cytotoxicity of thiazolidinones **4a-p** was evaluated on cultured Vero cells and most of them displayed low toxicity (above 98 μg/mL). These preliminary and important results could be considered a starting point for the development of new antifungal agents.

Key-words: thiazolidinones, multicomponent reaction, antifungal activity, cytotoxicity, Rhodotorula sp.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS..... 16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 18
2.1. Infecções Fúngicas..... 18
2.2. Agentes Antifúngicos..... 22
2.2.1. Agentes Sistemicamente Ativos..... 22
2.2.2. Agentes Antifúngicos Tópicos..... 28
2.2.3. Mecanismo de Resistência aos Agentes Antifúngicos..... 28
2.3. Síntese de Tiazolidinonas em Refluxo, Ultrassom e Micro-ondas..... 29
2.4. Tiazolidinonas com Atividade Antifúngica..... 32
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 37
3.1. Reagentes Utilizados..... 37
3.1.1. Reagentes e Solventes Não-Purificados..... 37
3.2. Equipamentos Utilizados..... 38
3.2.1. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear..... 38
3.2.2. Espectrômetros de CG e CG/MS..... 38
3.2.3. Ponto de Fusão……..... 38
3.3. Métodos Experimentais..... 38
3.3.1. Procedimento Geral de Síntese das Tiazolidinonas 4a-p..... 38
3.3.2. Procedimento para Avaliação Antifúngica..... 39
3.3.2.1. Concentração Inibitória Mínima..... 39
3.3.2.2. Concentração Fungicida Mínima..... 42
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS..... 43
4.1. Síntese das Substâncias..... 43
4.1.1. Numeração e Nomenclatura dos Compostos Sintetizados..... 43
4.1.2. Planejamento Estrutural..... 44
4.1.3. Condições Reacionais, Rendimentos e Ponto de Fusão..... 45
4.1.4. Identificação das Substâncias Sintetizadas..... 47
4.2. Avaliação Antifúngica..... 58
4.2.1. Concentração Inibitória Mínima..... 58
4.2.2. Concentração Fungicida Mínima..... 58
4.3. Estudo Relação Estrutura-Atividade..... 60

4.4. Importância Clínica dos Resultados..... 60
4.5.Citotoxicidade..... 66
5.CONCLUSÕES..... 69
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 70
ANEXO I. Espectros de RMN de ^{13}C e ^{1}H..... 75
ANEXO II. Espectros de CG/ CG-MS..... 92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral de 1,3-tiazolidin-4-onas..... 16
Figura 2. Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos..... 23
Figura 3. Estrutura da Anfotericina B e Nistatina..... 24
Figura 4. Antifúngicos Azólicos..... 25
Figura 5. Estrutura geral das Equinocandinas..... 26
Figura 6. Estrutura da Flucitosina..... 26
Figura 7. Estrutura da Morfolina e Terbinafina..... 27
Figura 8. Estrutura da Griseofulvina..... 27
Figura 9. Estrutura dos fármacos Sordarins, Nicomicina e Polioxina..... 28
Figura 10. Mecanismo geral da síntese de tiazolidinonas..... 30
Figura 11. Estrutura da tiazolidinona **1**..... 32
Figura 12. Estrutura das tiazolidinonas **5** e **6**..... 34
Figura 13. Estrutura das tiazolidinonas **7** e **8**..... 34
Figura 14. Estrutura da tiazolidinona **9**..... 35
Figura 15. Estrutura das tiazolidinonas **10**, **11** e **12**..... 35
Figura 16. Estrutura das tiazolidinonas **13**, **14** e **15**..... 35
Figura 17. Estrutura das tiazolidinonas **16** e **17**..... 36
Figura 18. Estrutura da tiazolidinona **18**..... 36
Figura 19. Subcultura (repique) dos fungos..... 40
Figura 20. Microplaca de 96 poços para o teste de microdiluição..... 41
Figura 21. Demonstração de leitura do CIM..... 41
Figura 22. Estratégia de planejamento e estrutura dos fármacos fluconazol, miconazol..... 44
Figura 23. Espectro de RMN ^{1}H da tiazolidinona **4l**..... 48
Figura 24. RMN ^{1}H da tiazolidinona **4l.** Expansão da região 4 a 1 ppm..... 49
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C da tiazolidinona **4i**..... 49
Figura 26. Espectro de cromatografia de massas da tiazolidinona **4d**..... 50
Figura 27. Fragmentos de massas das tiazolidinonas..... 51
Figura 28. CIM e CFM das tiazolidinonas **4a-p** contra *C.albicans*..... 61
Figura 29. CIM e CFM das tiazolidinonas **4a-p** contra *C.parapsilosis*..... 61

Figura 30. CIM e CFM das tiazolidinonas **4a-p** contra *C.guilliermondii*..... 62
Figura 31. CIM e CFM das tiazolidinonas **4a-p** contra *C.laurentii*..... 62
Figura 32. CIM e CFM das tiazolidinonas **4a-p** contra *T. asahii*..... 63
Figura 33. CIM e CFM das tiazolidinonas **4a-p** contra *Geotrichum*..... 64
Figura 34. CIM e CFM das tiazolidinonas **4a-p** contra *Rhodotorula*..... 65
Figura 35. Citotoxicidade das tiazolidinonas **4a-p**..... 67
Figura 36. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4a** em $CDCl_3$..... 76
Figura 37. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4a** em $CDCl_3$..... 76
Figura 38. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4b** em $CDCl_3$..... 77
Figura 39. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4b** em $CDCl_3$..... 77
Figura 40. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4c** em $CDCl_3$..... 78
Figura 41. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4c** em $CDCl_3$..... 78
Figura 42. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4d** em $CDCl_3$..... 79
Figura 43. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4d** em $CDCl_3$..... 79
Figura 44. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4e** em $CDCl_3$..... 80
Figura 45. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4e** em $CDCl_3$..... 80
Figura 46. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4f** em $CDCl_3$..... 81
Figura 47. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4f** em $CDCl_3$..... 81
Figura 48. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4g** em $CDCl_3$..... 82
Figura 49. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4g** em $CDCl_3$..... 82
Figura 50. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4h** em $CDCl_3$..... 83
Figura 51. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4h** em $CDCl_3$..... 83
Figura 52. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4i** em $CDCl_3$..... 84
Figura 53. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4i** em $CDCl_3$..... 84
Figura 54. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4j** em $CDCl_3$..... 85
Figura 55. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4j** em $CDCl_3$..... 85
Figura 56. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4k** em $CDCl_3$..... 86
Figura 57. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4k** em $CDCl_3$..... 86
Figura 58. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4l** em $CDCl_3$..... 87
Figura 59. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4l** em $CDCl_3$..... 87
Figura 60. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4m** em $CDCl_3$..... 88
Figura 61. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4m** em $CDCl_3$..... 88
Figura 62. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4n** em $CDCl_3$..... 89

Figura 63. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4n** em $CDCl_3$..... 89
Figura 64. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4o** em $CDCl_3$..... 90
Figura 65. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4o** em $CDCl_3$..... 90
Figura 66. Espectros de RMN de ^{1}H da tiazolidinona **4p** em $CDCl_3$..... 91
Figura 67. Espectros de RMN de ^{13}C da tiazolidinona **4p** em $CDCl_3$..... 91
Figura 68. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4a**.. 93
Figura 69. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4b**.. 94
Figura 70. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4c**.. 95
Figura 71. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4d**.. 96
Figura 72. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4e**.. 97
Figura 73. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4f**... 98
Figura 74. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4h**.. 99
Figura 75. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4i**... 100
Figura 76. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4l**... 101
Figura 77. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4m**. 102
Figura 78. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4n**.. 103
Figura 79. Espectro de cromatografia gasosa e massas da tiazolidinona **4o**.. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tiazolidinonas 2, 3 e 4 e seus substituintes..... 33
Tabela 2. Nomenclatura das substâncias 43
Tabela 3. Rendimento e ponto de fusão das tiazolidinonas sintetizadas.... 47
Tabela 4. Dados de RMN e CG-MS..... 52
Tabela 5. Resultados dos testes de microdiluição em CIM e CFM..... 59
Tabela 6: Resultados dos testes de citotoxicidade das tiazolidinonas..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

CCF	cromatografia de camada fina
DMSO	Dimetilsulfóxido
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
RMN	ressonância magnética nuclear
CG/MS	do inglês *Gas Chromatography/ Mass Spectrometry*
MOP'S	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
SDA	ágar Sabouraud Dextrose
CLSI	do inglês *Clinical Laboratory Standard International*
CIM	concentração inibitória mínima
CFM	concentração fungicida mínima
UFC	unidade formadora de colônia
RPMI	do inglês *Roswell Park Memorial Institute*

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Nos últimos anos, a incidência de infecções fúngicas, especialmente micoses oportunistas, tem aumentado devido à expansão da população em condições médicas específicas, como cirurgias, transplante de medula óssea e órgãos, terapia imunossupressiva, nascimento prematuro, idade avançada, e doenças como AIDS e câncer (NUCCI et al., 2010).

Um número limitado de classes de antifúngicos está disponível para o tratamento de infecções fúngicas. Dentre estes, os azóis são amplamente utilizados devido a sua boa tolerabilidade e biodisponibilidade. Entretanto, o uso indiscriminado destes fármacos no tratamento de fungemias tem resultado em um aumento de cepas resistentes, especialmente ao fluconazol. O aumento da resistência aos agentes antifúngicos em associação com o aumento na incidência de infecções fúngicas tem provocado um sério problema à saúde pública (TOBUDIC et al., 2011; PFALLER, 2012).

Por esta razão, torna-se urgente o desenvolvimento de novas classes de antifúngicos a fim de aperfeiçoar a farmacodinâmica dos agentes existentes, e desenvolver fármacos com novos mecanismos de ação para o tratamento destas infecções. Estes novos fármacos devem ser eficientes, menos tóxicos e preferencialmente mais baratos (SHALINI et al., 2011; PRASAD et al., 2011)

Neste sentido, existem numerosos heterociclos que apresentam inúmeras atividades biológicas. Dentre estas, estão as tiazolidinonas, substâncias cíclicas de cinco membros que possuem dois heteroátomos - um átomo de enxofre, um átomo de nitrogênio-, e uma carbonila (Figura 1). Assim como os demais heterociclos, as tiazolidinonas também apresentam uma grande quantidade de aplicações na química medicinal, como a atividade antirretroviral (CHEN et al., 2011), antimalárica (RUIZ et al., 2011), antioxidante (SAUNDANE et al., 2012), anti-inflamatória (DEEP et al., 2012), antineoplásica (WANG et al., 2011), e por fim, antimicrobiana (PATEL et al., 2012a).

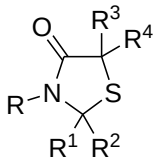


Figura 1. Estrutura geral de 1,3-tiazolidin-4-onas

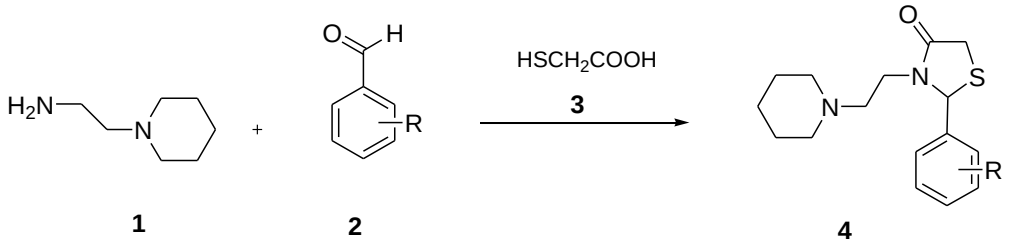
Desta forma, em continuação aos estudos desenvolvidos no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), a proposta deste trabalho é sintetizar tiazolidinonas derivadas da 2-aminoetilpiperidina, e verificar a sua atividade antifúngica. Assim, os objetivos específicos são:

- Estudo das condições reacionais para a obtenção das 2-(aril)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-onas **4a-p,** por meio do uso da metodologia convencional, através da reação da 2-aminoetilpiperidina **1,** benzaldeídos substituídos **2** e ácido mercaptoacético **3** (Esquema 1). A variação estrutural das diferentes tiazolidinonas será feita a partir da utilização de diferentes benzaldeídos, que apresentam tanto grupos retiradores quanto grupos doadores de elétrons como seus substituintes;

- Identificar a estrutura dos compostos sintetizados, através da interpretação dos dados de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H) e de carbono (RMN ^{13}C), e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS);

- Avaliação antifúngica dos produtos **4a-p**, através da metodologia de microdiluição em caldo, contra sete fungos leveduriformes, *Criptococcus laurentii; Geotrichum* sp*., Candida parapsilosis, Candida guilliermondii, Trichosporum asahii, Rhodotorula* sp*.* e *Candida albicans*.

- Avaliação citotóxica dos produtos **4a-p** contra células da linhagem Vero (rins de macaco), através da metodologia de Vermelho Neutro;



R
- Grupos retiradores de elétrons: NO_2, F, Cl
- Grupos doadores de elétrons: OH, OCH_3, CH_3

Esquema 1. Proposta para a síntese das tiazolidinonas **4a-p**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica serão mencionados apenas artigos relacionados ao trabalho desenvolvido na presente dissertação. Inicialmente serão abordados trabalhos relacionados às infecções fúngicas, fármacos antifúngicos e fatores relacionados à resistência a estes agentes. Após será comentada a síntese de tiazolidinonas, através de metodologias convencionais, e metodologias não convencionais como reações assistidas por ultrassom e micro-ondas. Por fim, serão apresentados estudos das propriedades antifúngicas de tiazolidinonas.

2.1. Infecções Fúngicas

Os fungos representam um grupo de organismos diverso, cujo propósito principal é degradar matéria orgânica, apresentando, portanto, uma existência heterotrófica. Estes organismos também são usados na produção de alimentos importantes como, por exemplo, pão, queijo, vinho e cerveja, e produzem derivados dos hormônios esteróides e antibióticos, como a penicilina. Com efeito, os fungos exercem uma influência importante na saúde e no modo de vida das pessoas em todo o mundo, pois além das aplicações anteriores, causam um amplo espectro de doenças clínicas, incluindo desde problemas simples até infecções sistêmicas potencialmente letais (SCHAECHTER et al., 2009).

Os fungos são classificados em seu próprio reino, Reino Fungi, e são classificados entre si com base no seu modo de reprodução - sexuada ou assexuada-, morfologia - leveduras ou fungos filamentosos-, e ciclo de vida. Estes micro-organismos são eucariotos, contendo o núcleo bem definido circundado por uma membrana nuclear, apresentando também uma membrana celular que contem lipídios, glicoproteínas e esteróis; mitocôndrias; aparelho de Golgi; ribossomos ligados ao retículo endoplasmático; e um citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários (LEVINSON & JAWETZ, 2005). Naturalmente, essa descrição também se aplica às células animais, um aspecto que representa um sério problema no tratamento das infecções fúngicas. Os micro-organismos infectantes são tão semelhantes às células hospedeiras que se torna difícil elaborar estratégias terapêuticas específicas dirigidas contra o parasita, sem danos ao hospedeiro.

A única distinção destes para os outros eucariotos é a parede celular rígida composta de quitina, um polissacarídeo composto de longas cadeias de N-acetilglicosamina, e o β-glicano, um longo polímero de D-glicose, com uma membrana celular na qual o colesterol é substituído por ergosterol como o componente principal de esterol (MURRAY et. al, 2006; SCHAECHTER et al., 2009).

Os fungos emergiram nas duas décadas passadas como causas principais de doenças no homem atuando como patógenos oportunistas. A incidência global de micoses invasivas continua a aumentar a cada ano assim como a lista de patógenos fúngicos. O aumento destas infecções pode ser atribuído ao número crescente de pacientes em risco, incluindo imunocomprometidos, tais como transplantados, indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pacientes com câncer e submetidos à quimioterapia, além daqueles hospitalizados com outras sérias condições subjacentes e que se submetem a procedimentos invasivos (NUCCI & MARR, 2005; MURRAY et al., 2006).

A *Candida albicans* tem sido considerada como o agente mais comum de infecções fúngicas invasivas causadas por leveduras. Com a introdução, ampla distribuição e uso do fluconazol, a incidência geral de candidemia por *C. albicans* descresceu, porém houve um aumento de infecções causadas por outras espécies de *Candida*, como a *C. glabrata e C. guiliermondii*. Um grande problema relacionado com infecções por *C. glabrata* é sua baixa sensibilidade ao fluconazol. Além disso, existem muitas evidências que infecções sistêmicas causadas por espécies de *Candida* vem se tornando um grande problema em hospitais terciários de todo o mundo (NUCCI & MARR, 2005; COLOMBO et al., 2006).

Em algumas partes do mundo, especialmente em países da América Latina, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* assumem a segunda posição como maior causa de candidemias. Embora as razões para esta emergência ainda sejam desconhecidas, fatores de risco como o uso de cateteres intravenosos e a contaminação dos profissionais de saúde são as prováveis explicações para as infecções. A *C. rugosa* é raramente a causa de infecções em humanos (NUCCI & MARR, 2005).

Embora a incidência destas infecções entre pacientes hospitalizados tenha aumentado durante os anos 80, dados mais recentes revelam que este índice se estabilizou. No entanto, as taxas de candidemia apresentam variações geográficas, e estas diferenças na epidemiologia entre os países deve ser monitorada para

averiguar tendências na incidência, distribuição de espécies e perfil de resistência a fármacos antifúngicos (COLOMBO et al., 2006).

Frente à falta de dados em relação à incidência de candidemias no Brasil, Colombo et al. (2006) realizaram um estudo prospectivo baseado em dados de vigilância laboratorial em 11 hospitais terciários, representativos do sistema público de saúde de 9 grandes cidades do Brasil. O objetivo foi avaliar a incidência, distribuição de espécies, frequência de resistência aos antifúngicos e fatores de risco para candidemia devido a espécies resistentes ao fluzonazol. *Candida albicans* foi a espécie mais comum representando 41% dos casos, seguida da *C. tropicalis* (21%), *C. parapsilosis* (21%) e *C. glabrata* compondo 5% dos casos. Entre os adultos, a espécie mais comum foi *C. albicans* (41%), seguida de *C. tropicalis* (24%) e *C. parapsilosis* (21%). Nos pacientes pediátricos a espécie mais comum foi *C. albicans* (40%), seguida de *C. parapsilosis* (21%) e *C. tropicalis* e *C. pelliculosa* (15%).

Além de espécies de *Candida* outras leveduras emergiram nos últimos anos como causa de infecções. Entre estas, algumas espécies de *Trichosporon* ssp e *Geotrichum* ssp. tem sido associadas com fungemia desde o final dos anos 1980. As leveduras do gênero *Trichosporon* frequentemente causam infecções disseminadas em pacientes neutropênicos com câncer. No entanto, infecções por este agente também foram encontradas em pacientes que faziam uso de cateteres e em neonatos (NUCCI & MARR, 2005). Frente a alguns isolados do fungo *Geotrichum* ssp. foi observada uma potência reduzida do fluconazol (THOMPSON et al., 2009).

Atualmente, também tem aumentado o número de infecções fúngicas causadas pelos fungos do gênero *Criptococcus* ssp, como o *C. neoformans* e o *C. gattii,* que atingem principalmente pessoas imunocomprometidas (NUCCI & MARR, 2005). Dentre estes, o *C. neoformans* é uma causa frequente de meningoencefalite em pessoas imunocomprometidas, embora o *C. gattii* tenha emergido como agente infeccioso nos últimos anos. Estes dois fungos apresentam três fatores de virulência que contribuem para a sua capacidade de causar doenças: a produção de uma cápsula polissacarídica, habilidade de crescer a 37°C e deposição de melanina na parede celular. Entre estes, a cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência, visto que ela promove proteção contra a fagocitose e tem propriedades imunomodulatórias (KRONSTAD et al., 2012).

Outros exemplares de fungos emergentes, são as espécies de *Rhodotorula* ssp que são leveduras amplamente reconhecidas durante as últimas duas décadas como importantes patógenos causadores de infeções em humanos, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Os fatores de risco relatados para o desenvolvimento de infecções por *Rhodotorula* ssp são o uso de cateteres e dispositivos internos, neutropenia, administração de fármacos imunossupressivos e doenças malignas, especialmente malignidades hematológicas. Entre os pacientes com patologias hematológicas, aqueles submetidos a transplante de células tronco, são os que apresentam maior risco para infecção por *Rhodotorula* ssp devido ao uso inevitável e prolongado de cateteres, em tratamento com agentes imunossupressivos e quimioterápicos, com severa neutropenia (ZAAS et al., 2003).

Lunardi et al. (2006) relataram em um estudo feito em hospital terciário, que as infecções por *Rhodotorula* ssp estavam associadas com a exposição a fármacos citotóxicos, e também a pessoas submetidas a cirurgias com a posterior utilização de alimentação parenteral, pacientes com leucemia e fazendo uso de corticosteroides, presença de neutropenia devido ao uso de antibióticos de largo-espectro e uso de cateter venoso central. No caso deste estudo, as fungemias por *Rhodotorula* ssp foram descritas em pacientes cujas amostras de cateter venoso central não resultaram em culturas positivas para espécies *Rhodotorula* ssp, ou em pacientes que não faziam uso de cateteres. Com base nessas considerações, foi possível presumir que os fungos foram introduzidos no sistema sanguíneo devido à ruptura da mucosa gastrointestinal por agentes citotóxicos. Algumas espécies de *Rhodotorula* ssp estão presentes na flora gastrointestinal normal, e o uso de antibióticos de largo-espectro pode contribuir para sua superabundância. O tratamento para estas infecções fúngicas é baseado na retirada do cateter, e do uso de agentes antifúngicos como anfotericina- B e 5-flucitosina. Embora muito utilizado como medida profilática, o uso disseminado dos triazóis como agentes antifúngicos em pacientes imunocomprometidos, pode permitir o aparecimento de mais fungos resistentes, como espécies de *Rhodotorula*.

Além destas leveduras em emergência, também existem alguns fungos filamentosos de grande preocupação médica. A epidemiologia das infecções por fungos filamentosos tem mudado substancialmente nos últimos anos.

A incidência de Aspergilosis invasiva tem aumentado, assim como as infecções causadas por patógenos que apresentam resistência aos agentes

antifúngicos convencionais, como espécies de *Fusarium* e Zygomicetes (NUCCI & MARR, 2005).

2.2 Agentes Antifúngicos

Os agentes antifúngicos, em sua maioria, possuem mais afinidade pelos fungos do que pelas células hospedeiras, embora a distinção não seja muito grande. Assim, a toxicidade pode representar um problema no tratamento dessas doenças. Além disso, muitos agentes antifúngicos possuem valor terapêutico limitado, devido a problemas de solubilidade, estabilidade e absorção. Em comparação com os agentes antibacterianos, o número de agentes antifúngicos eficazes é muito pequeno. No entanto, devido à emergência de outros fungos patogênicos, a pesquisa de novos agentes antifúngicos vem evoluindo (SCHAECHTER et al., 2009).

Em termos de classificação geral, existem os antifúngicos de uso sistêmico, e os antifúngicos de uso tópico. Os fármacos de uso sistêmico exibem uma variedade de mecanismos de ação, que vão desde ao dano à membrana celular até intervenção do metabolismo. Os antifúngicos de uso tópico também apresentam variedade de mecanismos de ação, no entanto, seu uso é restrito à superfície corpórea (KATHIRAVAN et al., 2012).

2.2.1. Agentes sistemicamente ativos

Os mecanismos de ação dos agentes antifúngicos disponíveis atualmente variam, embora de maneira geral pertençam a duas categoriais, aqueles que afetam as membranas celulares dos fungos, como polienos, azóis, equinocandinas e alilaminas, e aqueles que são capturados pela célula e interrompem os processos celulares, como antimetabólitos e a griseofulvina. A Figura 2 apresenta o mecanismo e local de ação dos atuais agentes antifúngicos, demonstrando onde ocorre a sua interferência e a que processo está relacionado (SCHAECHTER et al., 2009)

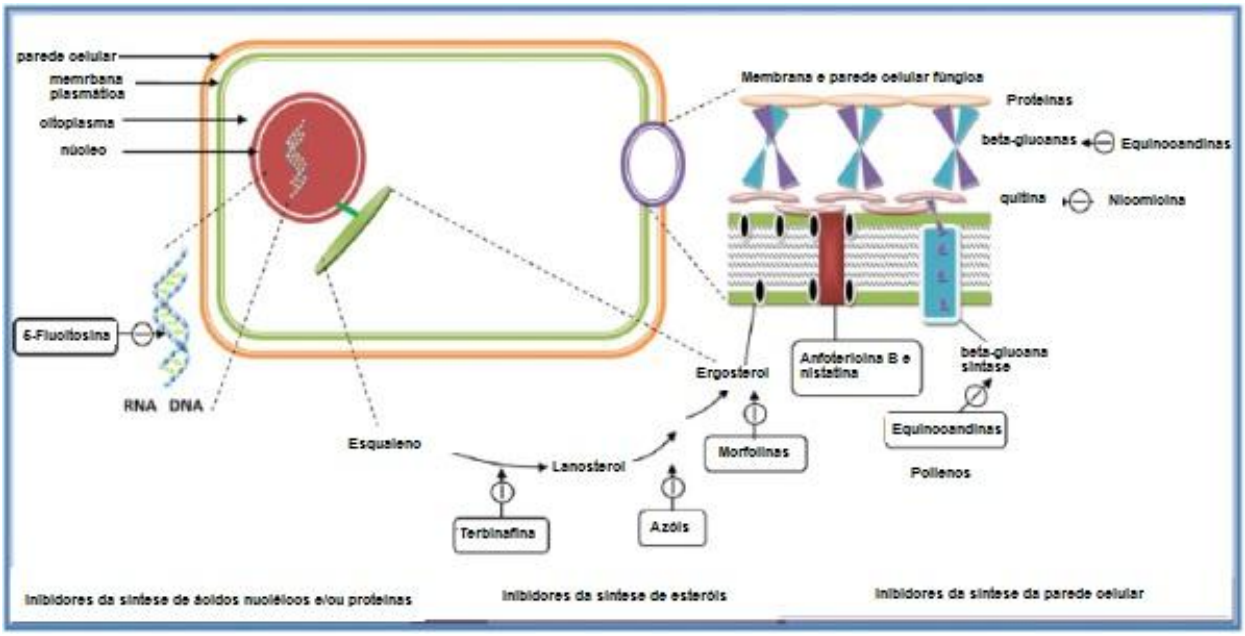


Figura 2: Mecanismo de ação dos atuais agentes antifúngicos. **Fonte:** Adaptado de Kathiravan et al., 2012.

- Lesão na membrana plasmática

Os agentes polienos são representados pela anfotericina B (Figura 3) e suas formulações, e caracterizam-se como agentes antifúngicos utilizados no tratamento de micoses graves com risco de vida, pois apresentam ação fungicida e possuem amplo espectro de ação. A estrutura básica dos polienos consiste em um grande anel lactâmico, com uma cadeia lipofílica rígida contendo três a sete ligações duplas, e uma porção hidrofílica flexível sustentando vários grupos hidroxilas. Seu mecanismo de ação primário envolve a ligação da anfotericina B ao ergosterol, o principal esterol da membrana do fungo. Esta ligação produz canais iônicos que destroem a integridade osmótica da membrana celular fúngica e levam a perda dos constituintes intracelulares e à morte celular. Um mecanismo de ação adicional da anfotericina B envolve dano direto da membrana causado pela geração de uma cascata de reações oxidativas deflagradas pela oxidação da própria anfotericina B. Este processo pode ser o principal contribuinte para uma atividade fungicida rápida da anfotericina B via geração de radicais livres tóxicos. A anfotericina B é considerada fungicida contra a maioria dos fungos. A nistatina é outro exemplo de agente desta classe, mas seu uso sistêmico é restrito a formulações lipossomais devido a sua toxicidade (MURRAY et al., 2006; KATHIRAVAN et al., 2012; TALAVIYA et al., 2012)

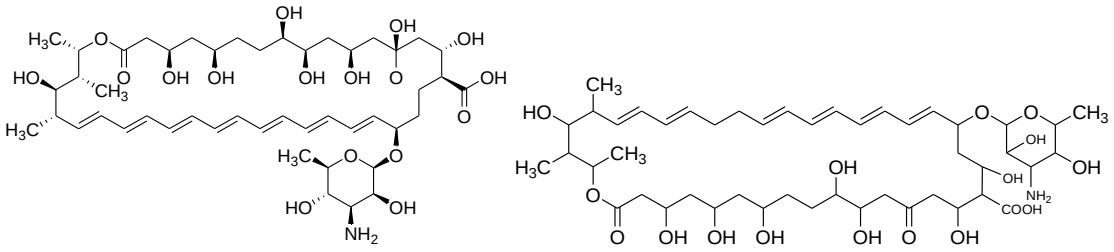


Figura 3: Estrutura da Anfotericina B e Nistatina

- Inibidores da síntese do ergosterol

A classe dos azóis pode ser dividida em termos de estrutura em imidazóis (duas moléculas de nitrogênio no anel azólico) e triazóis (três moléculas de nitrogênio no anel azólico) e são estruturas sintéticas. O principal representante dos imidazóis, o cetoconazol, é principalmente utilizado no tratamento de micoses superficias, assim como outros representantes como miconazol e clotrimazol. Todos os triazóis tem atividade sistêmica e incluem o fluconazol e o itraconazol da primeira geração, e voriconazol, posaconazol e o ravuconazol da segunda geração de triazóis (Figura 4). Tanto os imidazóis quanto os triazóis agem por inibição da enzima 14-α-demetilase do lanosterol dependente do citocromo fúngico P-450. Esta enzima remove oxidativamente o grupo 14-α-metil do lanosterol, e está envolvida, portanto, na conversão do lanosterol em ergosterol, e sua inibição interrompe a síntese da membrana da célula fúngica (KATHIRAVAN et al., 2012). Dependendo do organismo e do azol específico, a inibição da síntese do ergosterol resulta na inibição do crescimento da célula fúngica (fungistático) ou na morte celular (fungicida) (MURRAY et al., 2006). Embora a enzima alvo dos azóis esteja presente nas células humanas, os fármacos são seletivos aquelas pertencentes ao fungo. Esse mecanismo de seletividade pode ser explicado devido aos muitos anos de evolução das espécies, que resultou em enzimas com significativas mudanças estruturais (PATRICK, 2009). Atualmente existem outros azóis em estudos clínicos, como o isavuconazol e o albaconazol (TALAVIYA et al., 2012).

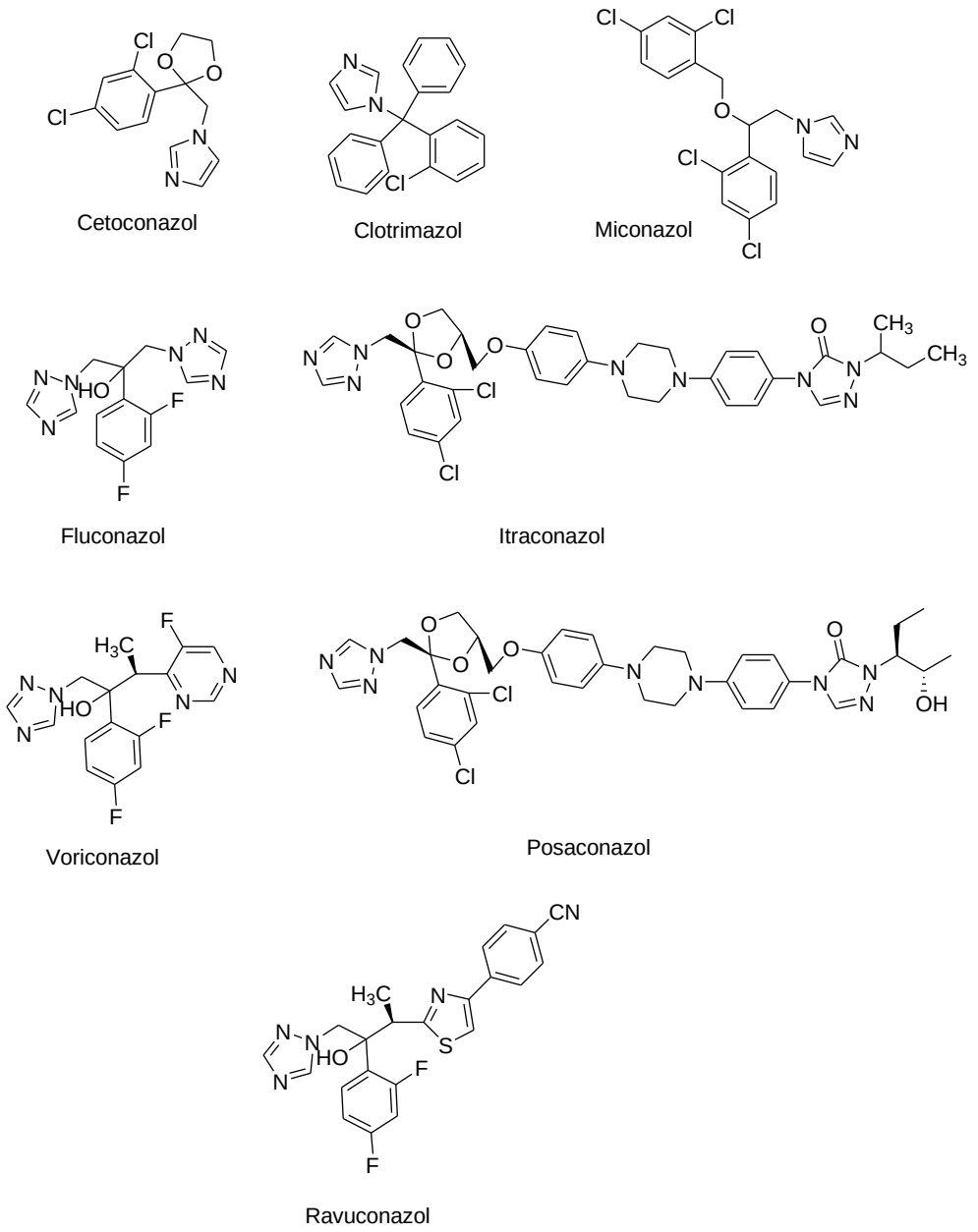


Figura 4: Estrutura dos antifúngicos azólicos: imidazóis (cetoconazol, clotrimazol e miconazol); triazóis de 1ª geração (fluconazol e itraconazol) e triazóis de 2ª geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol).

- Inibidores da síntese de glucano

As equinocandinas (Figura 5) são uma nova classe altamente seletiva de lipopeptídeos semi-sintéticos que inibem a síntese das β-(1,3)- D-glucanas, constituintes importantes da parede celular fúngica, levando a disrupção desta estrutura, resultando em instabilidade e morte dos fungos.

Visto que as células mamíferas não contem β-(1,3)- D-glucanas, esta classe de agentes antifúngicos é seletiva em sua toxicidade aos fungos. Atualmente existem três equinocandinas em vários estágios de desenvolvimento: a caspofungina, anidulafungina e micafungina (MAYR et al., 2011; KATHIRAVAN et al., 2012).

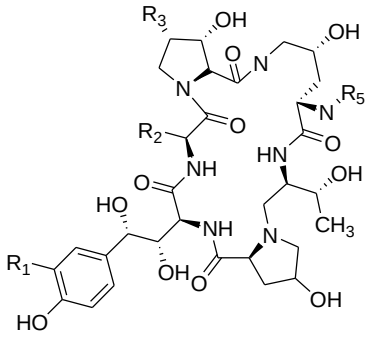


Figura 5: Estrutura geral das equinocandinas

- Inibidores da síntese de ácido nucléico

A flucitosina (5-fluorocitosina, 5FC) é o único agente antifúngico disponível que atua como um antimetabólito, inibidor da síntese de ácido nucléico (Figura 6). É um análogo da pirimidina fluorada, que exerce atividade antifúngica pela interferência com a síntese de DNA, RNA e proteínas na célula antifúngica. A flucitosina entra na célula fúngica via citosina permease e é deaminada em 5-fluoruracil (5-FC) no citoplasma. O 5-FU é convertido em ácido 5-fluoruridílico, que então é incorporado na síntese do RNA, resultando em RNA defeituoso e inibição do DNA e consequentemente, da síntese protéica. Atualmente a flucitosina é utilizada como terapia adjunta a Anfotericina B (MURRAY et al., 2006; KATHIRAVAN et al., 2012).

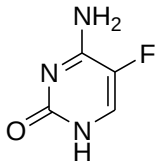


Figura 6: Estrutura da Flucitosina

- Inibidores da esqualeno epoxidase

A classe das morfolinas e alilaminas (Figura 7) atuam através da inibição da enzima esqualeno epoxidase, que participa da conversão de esqualeno a ergosterol.

Incluem-se nesta classe a amorolfina, cuja principal aplicação é voltada para a agricultura, sendo também utilizada para o tratamento de micoses superficiais, e a terbinafina, que age sistemicamente (MURRAY et al., 2006; KATHIRAVAN et al., 2012).

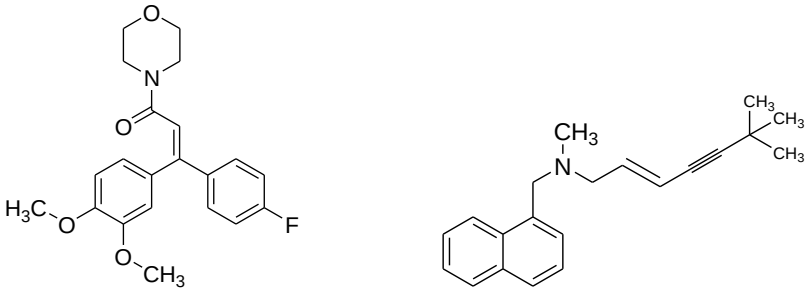


Figura 7: Estrutura da amorolfina e terbinafina

- Inibidores da síntese de microtúbulos

A griseofulvina é um agente oral utilizado no tratamento de infecções causadas pelos dermatófitos (Figura 8). Ela inibe o crescimento fúngico pela interação com microtúbulos dentro da célula fúngica, resultando numa inibição da mitose (MURRAY et al., 2006; KATHIRAVAN et al., 2012).

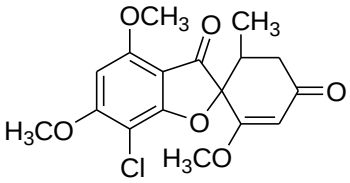


Figura 8: Estrutura da griseofulvina

- Inibidores de proteínas e da síntese de quitina

Além destes ainda existe outra classe de agentes antifúngicos, os inibidores da síntese protéica e os inibidores a síntese de quitina. Os primeiros atuam bloqueando a tradução do DNA fúngico através da inibição da movimentação do ribossomo pelo RNA mensageiro, e os segundos inibem a quitina constituinte importante da parede celular fúngica. Como exemplos das classes encontram-se o sordarins, e nicomicina e polioxina, respectivamente (Figura 9) KATHIRAVAN et al., 2012; TALAVIYA et al., 2012).

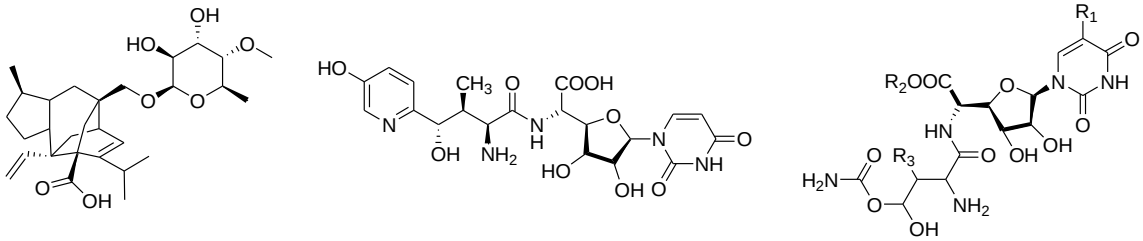


Figura 9: Estrutura do sordarinos, nicomicina e polioxina.

2.2.2. Agentes antifúngicos tópicos

Atualmente existem vários antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas superficiais e de mucosa. Os preparados tópicos estão disponíveis para a maioria das classes de agentes antifúngicos, incluindo polienos como a nistatina, alilaminas como a naftifina, e numerosos imidazóis (MURRAY et al., 2006).

Dentre os azóis, o clotrimazol e o miconazol não são utilizados via parenteral devido a sua baixa biodisponibilidade e absorção oral, sendo utilizados no tratamento de micoses superficiais. Os tiocarbamatos, da classe dos inibidores da esqualeno epoxidase, exemplificados pelo tolnaftato e são considerados agentes promissores no tratamento de infecções por dermatófitos (TALAVIYA et al., 2012).

2.2.3. Resistência aos agentes antifúngicos

A resistência microbiológica é definida como a falta de suscetibilidade de um micro-organismo frente a um fármaco antifúngico, detectada através de testes de suscetibilidade *in vitro*, na qual o CIM (Concentração Inibitória Mínima) do fármaco excede o limite máximo superior para o organismo (TOBUDIC et al., 2011).

Os mecanismos de resistência aos antifúngicos revelam-se diferentes daqueles utilizados por outros organismos, como as bactérias, que destroem ou modificam os agentes como meio de adquirir resistência. Os principais meios utilizados pelos fungos para burlar o tratamento são modificação da quantidade ou qualidade das enzimas-alvo, acesso reduzido do medicamento no alvo, ou combinações destes mecanismos. Em contrapartida à rápida emergência e disseminação da resistência que ocorre nas bactérias, a resistência antifúngica

desenvolve-se, em geral, lentamente e envolve a emergência das espécies intrinsicamente resistentes ou uma alteração gradual, das estruturas ou funções celulares, o que resulta na resistência a um agente que tenha sido exposto. Da mesma forma, os genes da resistência antifúngica não são transmissíveis de célula a célula da mesma maneira que ocorre com muitos genes da resistência bacteriana (MURRAY et al., 2006).

Assim, frente a cada vez mais emergente e crescente resistência aos agentes antifúngicos, é de fundamental importância o desenvolvimento de novos fármacos. Estes novos agentes, além de eficazes, devem, preferencialmente, apresentar também mecanismos de ação diferentes dos antifúngicos já existentes, para que não ocorra uma rápida adaptação dos fungos e o consequente surgimento de resistência.

2.3. Síntese de Tiazolidinonas em Refluxo, Ultrassom e Micro-ondas

Atualmente, existem vários métodos para a síntese de 1,3-tiazolidin-4-onas, e a principal rota sintética envolve reações multicomponentes entre um aldeído ou cetona, uma amina primária e ácido mercaptoacético. Estas reações podem ser realizadas em uma etapa (reação *one-pot*) ou duas etapas (isolamento da imina) (CUNICO et al., 2008a; NEUENFELDT et al., 2011a).

A proposta do mecanismo da reação está demonstrada na Figura 10. A reação inicia com a formação da imina pelo ataque do nitrogênio da amina à carbonila do aldeído ou da cetona. Posteriormente ocorre o ataque nucleofílico do enxofre do ácido mercaptoacético ao carbono parcialmente positivo da imina, e finalmente a reação termina com a ciclização intramolecular promovida pelo ataque do nitrogênio a carbonila do ácido mercaptoacético. De acordo com Srivastava et al. (2002), o último passo que consiste na eliminação da H_2O é importante para a obtenção de altos rendimentos.

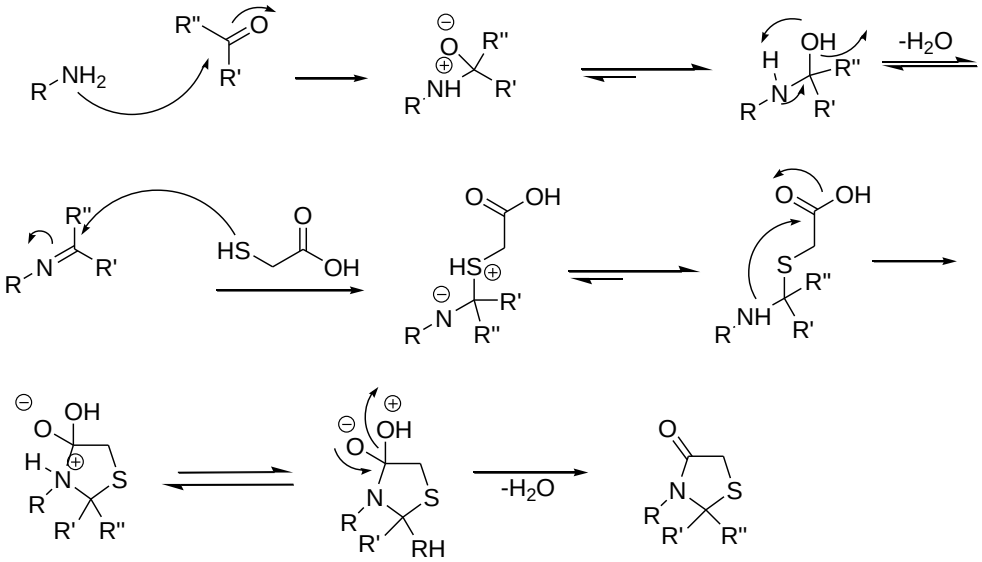
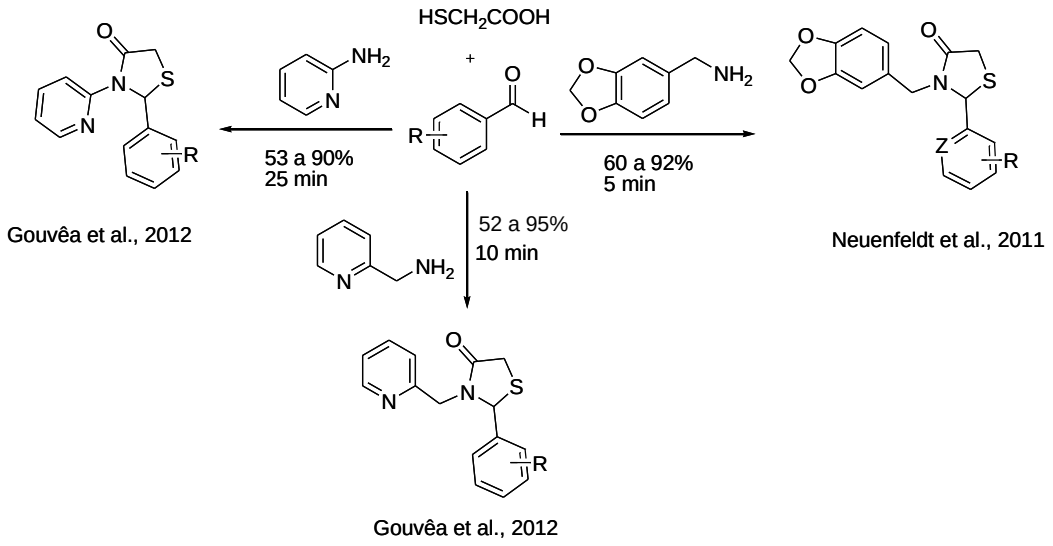


Figura 10: Mecanismo geral de síntese das tiazolidinonas

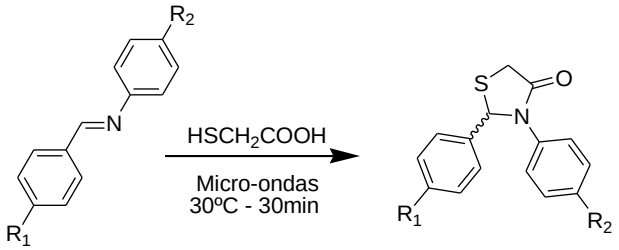
Recentemente, foram desenvolvidos métodos alternativos de síntese na área da síntese orgânica. Entre estes novos métodos sintéticos, destacam-se as reações envolvendo ultrassom e irradiação micro-ondas.

A irradiação ultrassônica tem sido utilizada para acelerar reações sintéticas, especialmente na química de heterociclos. Nesta metodologia, ocorre o crescimento e colapso de bolhas, fornecendo energia à reação devido ao processo de cavitação. As vantagens da metodologia ultrassônica são menores tempos reacionais que nas rotas sintéticas convencionais, com a manutenção de bons rendimentos e bons níveis de pureza. O grupo de pesquisa LaQuiABio foi o primeiro a demonstrar o potencial da reação por ultrassom para tiazolidinonas (Esquema 2) (NEUENFELDT et al., 2011b; GOUVÊA et al., 2012)



Esquema 2: Síntese de tiazolidinonas através de irradiação ultrassônica

Já nas reações utilizando a irradiação por micro-ondas, o método é baseado na habilidade de alguns componentes de transformar energia eletromagnética em calor. Este método alternativo de aquecimento, o qual aumenta as taxas de rendimento reacionais, também proporciona produtos “limpos” em um tempo reduzido (CUNICO et al., 2008a). Um exemplo destas reações é a formação de tiazolidinonas descrita por Bolognese et al. (2004), em que a utilização do micro-ondas reduziu o tempo reacional de 2 horas para 10 minutos, além de obter produtos com rendimentos maiores quando comparados com a metodologia convencional (Esquema 3).

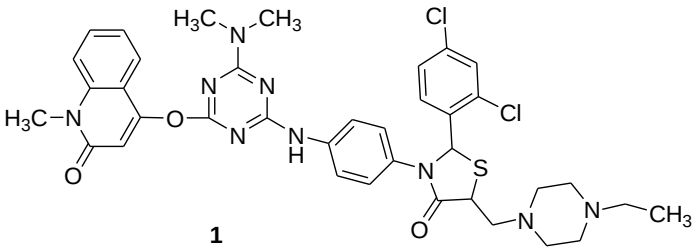


Esquema 3: Síntese de tiazolidinonas através de irradiação micro-ondas.

2.4. Tiazolidinonas com Atividade Antifúngica

Nos últimos anos, as 4-tiazolidinonas vem ganhando um lugar proeminente na química de heterociclos devido à ampla variedade de atividades biológicas associadas com esta classe de compostos. Ações biológicas como antihiperglicêmica, bactericida, pesticida, fungicida, anticonvulsivante, tuberculostática e anti-inflamatória tem sido associadas com os derivados de tiazolidinonas (CUNICO et al., 2008a; JAIN et al., 2012). As diferentes possibilidades de modificações no anel heterocíclico revelam um amplo alcance de atividades farmacológicas, e são as mais importantes áreas de investigação desta classe de substâncias (PRAKASH et al., 2012).

Patel et al. (2012a) sintetizaram tiazolidinonas e estudaram a atividade antifúngica contra os fungos *A. niger, A. fumigatus, A. clavatus* e *C. albicans,* utilizando a técnica de disco difusão. O fármaco cetoconazol foi utilizado como padrão. Os compostos apresentaram uma grande variação nos valores de CIM encontrados de 6,25 a 100 μg/mL contra todos os fungos testados, sendo o composto **1** (Figura 11) o mais potente.



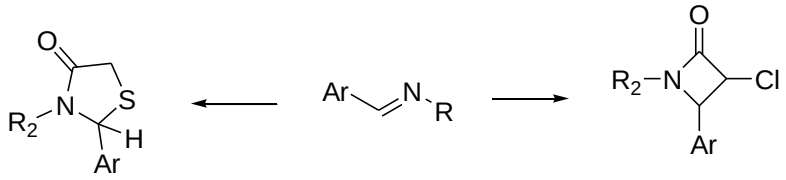
CIM: 6,25*ug*/mL
contra *A. niger*

Figura 11: Estrutura da tiazolidinona **1**

Em três estudos, foram sintetizadas azetidinonas que possuem um anel β-lactâmico, estrutura esta já utilizada em muitos fármacos antimicrobianos, e também tiazolidinonas. Os compostos foram submetidos à avaliação antifúngica, com a determinação dos valores de CIM realizados através da técnica de microdiluição em caldo e/ou disco difusão em ágar, com a utilização de cetoconazol ou cotrimazol como padrão. As substâncias foram avaliadas contra os fungos: *A. niger*, *A. awamori*, *C. albicans*, *Alternaria alternate*, *Microsporum canis*, *Rhizoctonia solani*, *Trichophyton longiformis*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Fusarium solani* e *Trichoderma viride*. Frente aos resultados encontrados, pode-se concluir que as tiazolidinonas apresentaram resultados semelhantes aos encontrados às azetidinonas. Os

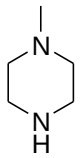
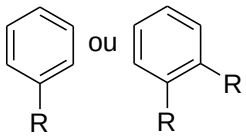
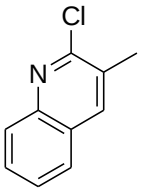
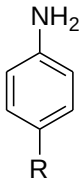
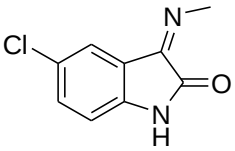
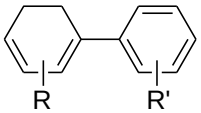
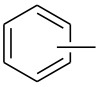
resultados foram relatados como valores de concentração inibitória mínima, sendo que as tiazolidinonas com melhor atividade, seu respectivo CIM e contra que fungo foi testado estão apresentados da Tabela 1.

Tabela 1: Estrutura das tiazolidinonas **2**, **3** e **4**



Tiazolidinona

Azetidinona

	R_2	Ar	CIM (µg/mL)	Fungo	Referência
2		 R = OH, OCH_3	9,37	*A. awamori* *C. albicans* *M. canis* *R. solani* *A. fumigatus*	SHINGADE & BARI, 2012.
3		 R= NO_2, Cl, F	12,5	*A. niger*	MISTRY et al., 2012.
4		 R= OCH_3, Cl, OH R'= Cl, OCH_3, F, $(CH_3)_2NC_6H_5$  R"= NO_2, OH	4,68	*A. niger* *A. awamori* *C. albicans* *A. flavus* *A. fumigatus*	SHINGADE et al., 2012.

Patel et al. (2012b) sintetizaram tiazolidinonas e as submeteram a testes de atividade antifúngicas, que foram realizados com os seguintes fungos *A. niger, A. fumigatus, A. clavatus,* e *C. albicans,* utilizando a técnica de disco-difusão. Os

resultados de CIM encontraram-se na faixa de 6,25 a 100 μg/mL, sendo que as tiazolidinonas **6** foram mais ativas que as tiazolidinonas **5** (Figura 12).

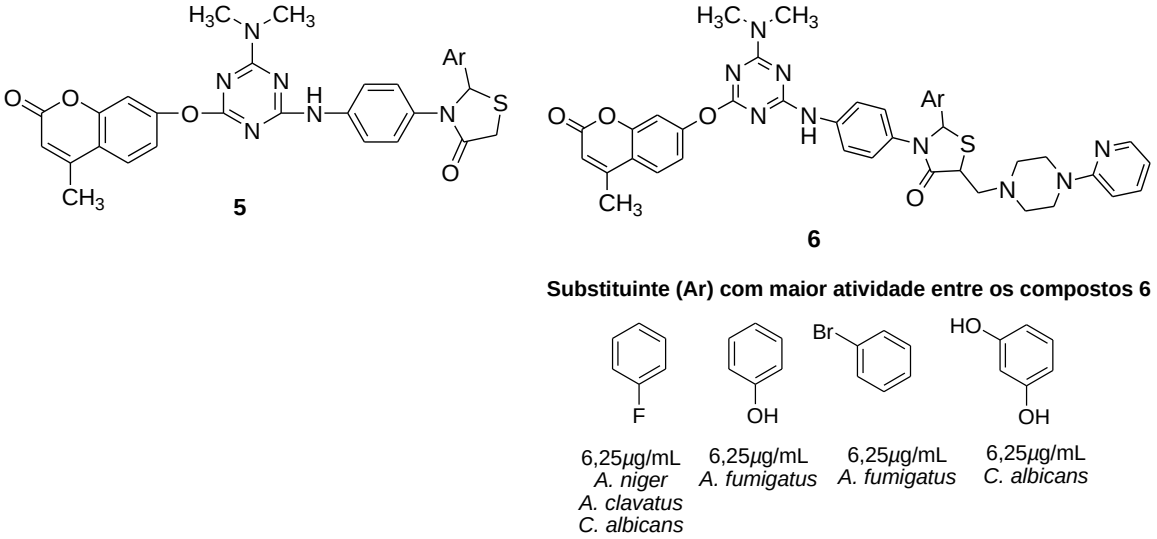


Figura 12: Estrutura das tiazolidinonas **5** e **6**

Prasad et al. (2011) sintetizaram tiazolidinonas e às submeteram a avaliação antifúngica *in vitro* utilizando cetoconazol e fluconazol como padrões. Foram utilizados os fungos *C. albicans, Cryptococcus neoformans, Sporothrix schenckii, Trichophyton mentagrophytes, A.s fumigatus,* e *C. parapsilosis* foram utilizados com o uso da técnica de microdiluição em caldo. Os compostos com melhor resultado apresentaram CIM de 50 μg/mL (Figura 13).

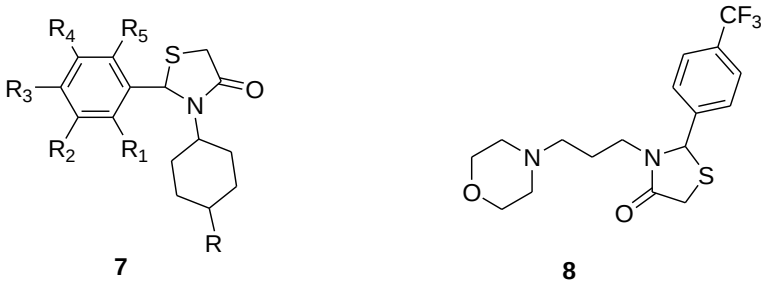
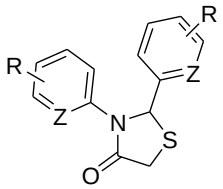


Figura 13: Estrutura das tiazolidinonas **7** e **8**

Ravichandran et al. (2011) estudaram o potencial antifúngico de tiazolidinonas (Figura 14) utilizando a metodologia de diluição em ágar contra três fungos, *C. albicans, A.s niger* e *Penicillium notatum*. Os resultados foram expressos em CIM, e se encontraram na faixa de 17 a 75 *µ*g/mL.



Z= CH, N

9

Figura 14: Estrutura da tiazolidinona **9**

Solankee et al. (2012) sintetizaram tiazolidinonas e a CIM dos compostos foi realizada através do método de microdiluição em caldo, contra três fungos *C. albicans, A. niger* e *A. clavatus.* O agente antifúngico padrão utilizado foi a griseofulvina, e os valores de CIM foram na faixa de 250 a > 1000 *µ*g/mL. Os três compostos apresentaram atividades antifúngicas semelhantes (Figura 15).

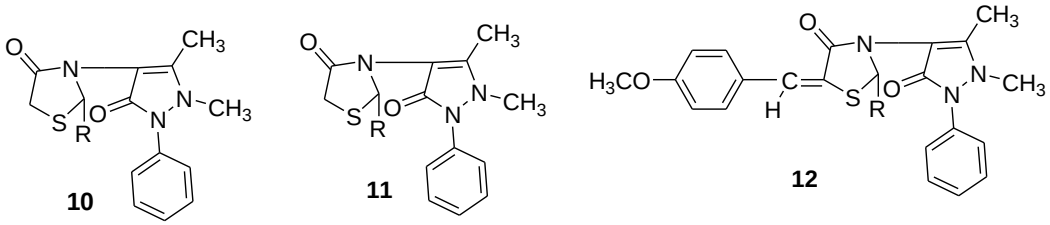


Figura 15: Estrutura das tiazolidinonas **10**, **11** e **12**

Bhatt & Sharma (2012), sintetizaram uma série de tiazolidinonas, e os produtos foram submetidos à avaliação antifúngica contra três fungos: *C. albicans*, *A. niger*, e *A. clavatus.* Os valores de CIM encontrados ficaram na faixa de 200 a >1000 *µ*g/mL. O composto **15** foi mais ativo em relação à atividade antifúngica que seus precursores **13** e **14** (Figura 16).

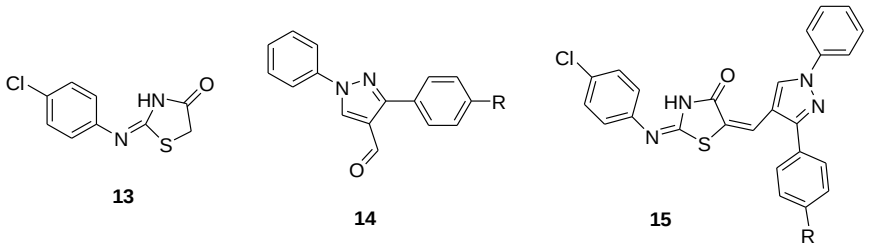
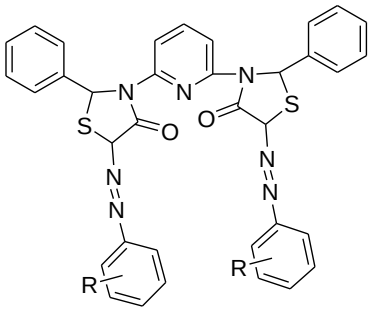
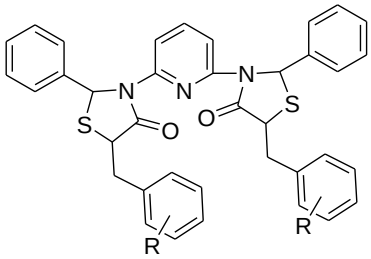


Figura 16: Estrutura das tiazolidinonas **13**, **14** e **15**

Shrivastava et al. (2012) realizaram a avaliação antifúngica de tiazolidinonas derivadas da 2,6- diaminopiridina (Figura 17) contra três fungos, *B. fabae, F. oxysporam* e *T. viridae,* com a utilização do método de disco difusão em ágar, utilizando o cloranfenicol como padrão. Os resultados foram expressos em CIM e encontraram-se na faixa de 6,25 a 200 *µ*g/mL para ambos os compostos.



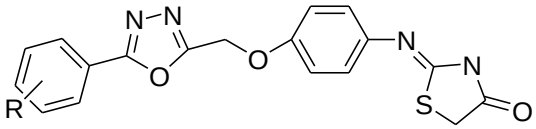
16



17

Figura 17: Estrutura das tiazolidinonas **16** e **17**

Em outro estudo realizado, foram sintetizadas 4-tiazolidinonas (Figura 18) e os compostos foram submetidos à avaliação antifúngica contra *C. albicans, A. niger* e *A. clavatus,* utilizando a técnica de microdiluição em caldo. Os resultados foram relatados em CIM, com a utilização de griseofulvina como agente padrão, e se encontram na faixa de 250 a 1000 *µ*g/mL (PATEL & PATEL, 2012c).



18

Figura 18: Estrutura da tiazolidinona **18**

Desta forma, observa-se que a literatura apresenta vários estudos demonstrando a importância das tiazolidinonas como agentes antifúngicos. Ainda assim mais estudos estão em desenvolvimento a fim de encontrar substâncias mais ativas contra os fungos. Nesse projeto visamos também estudar as propriedades antifúngicas das dezesseis novas tiazolidinonas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes utilizados

- RPMI
- MOP'S
- DMSO
- SDA

3.1.1 Reagentes e solventes não purificados

- Acetato de Etila
- Hexano
- Tolueno
- Ácido mercaptoacético
- Sulfato de Magnésio
- 2-aminoetilpiperidina
- 2- clorobenzaldeído
- 3- clorobenzaldeído
- 4- clorobenzaldeído
- 2- fluorbenzaldeído
- 3- fluorbenzaldeído
- 4- fluorbenzaldeído
- 3- metóxibenzaldeído
- 4- metóxibenzaldeído
- 2- nitrobenzaldeído
- 3- nitrobenzaldeído
- 4- nitrobenzaldeído
- 3-hidroxibenzaldeído
- *p*- tolualdeído
- salicilaldeído

3.2. Equipamentos utilizados

3.2.1. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de H^1 foram obtidos utilizando o espectrômetro Varian Oxford AS-400 em $CDCl_3$, contendo trimetilsilano como padrão interno. Os espectros de C^{13} (MHz) foram obtidos utilizando aparelho Bruker Ac-200F. As análises foram obtidas na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O processamento dos espectros ocorreu por meio do arquivo FID utilizando o programa Magnetic Ressonance Companion (MestReC) 1D NMR Manager e 2D-NMR Manager (COSY, HSQC and HMBC).

3.2.2. Espectrômetro de Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

Os cromatogramas foram obtidos em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu CG-2010. Os espectros de massas foram obtidos em um aparelho de CG2010-plus, com injetor automático CG-MS-QP2010SE System AOC-20i, na Universidade Federal de Pelotas.

3.2.3. Ponto de fusão

Os pontos de fusão das tiazolidinonas derivadas da 2-aminopiridina, foram determinados em um aparelho da marca Fisatom, com três tubos capilares, modelo 430, 230 V, 60 Hz, 50 W. Termômetro até 360 °C.

3.3 Métodos experimentais

3.3.1 Procedimento geral de síntese das tiazolidinonas 4a-p

Em um balão, de 50 mL, conectado num sistema *Dean-Stark*, foi adicionado 1 mmol da 2-aminoetilpiperidina **1**, 1 mmol do benzaldeído substituído **2a-p**, sob agitação e refluxo de tolueno (35 mL) por 2 horas. Após, adicionou-se o ácido mercaptoacético **3** e a reação foi mantida sob agitação e refluxo por mais 3 horas. A mistura reacional foi lavada com solução saturada de $NaHCO_3$ (3 x 10 mL), sendo

recolhida a fase orgânica, a qual foi seca com $MgSO_4$ e o solvente removido em um evaporador rotatório. A purificação do produto bruto foi feita por meio de lavagem com hexano a quente.

3.3.2. Procedimento para a avaliação antifúngica

Todos os compostos sintetizados foram submetidos à avaliação antifúngica contra sete fungos leveduriformes, *Criptococcus laurentii; Geotrichum* sp*., Candida parapsilosis, Candida guilliermondii, Trichosporum asahii, Rhodotorula* sp*.* e *Candida albicans*. As leveduras foram obtidas da micoteca do Laboratório de Micologia da UFPel, isoladas de cabelo e canal auditivo da microbiota fúngica de gatos (ALBANO et al. 2011; ALBANO et al., 2012). A determinação da atividade antifúngica dos compostos foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo para leveduras, de acordo com o CLSI M27-A3 (CLSI, 2008) e expressa em CIM.

3.3.2.1. Concentração Inibitória Mínima

As tiazolidinonas foram solubilizadas em DMSO, na relação de 4,8 mg de composto para 3 mL do solvente, produzindo uma solução mãe de 1,6 mg/mL. Como fármaco padrão, foi utilizado o fluconazol, respeitando-se a mesma concentração dos demais compostos.

Para a realização dos testes, primeiramente preparou-se o inóculo através da subcultura (repique) dos organismos (Figura 19), em placas estéreis com ágar Sabouraud dextrose ou ágar batata-dextrose, com temperatura de incubação de 35° C. O inóculo foi preparado escolhendo-se colônias isoladas de culturas de 48 horas para a maioria dos fungos e 72 horas para a *Rhodotorula* sp. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%).

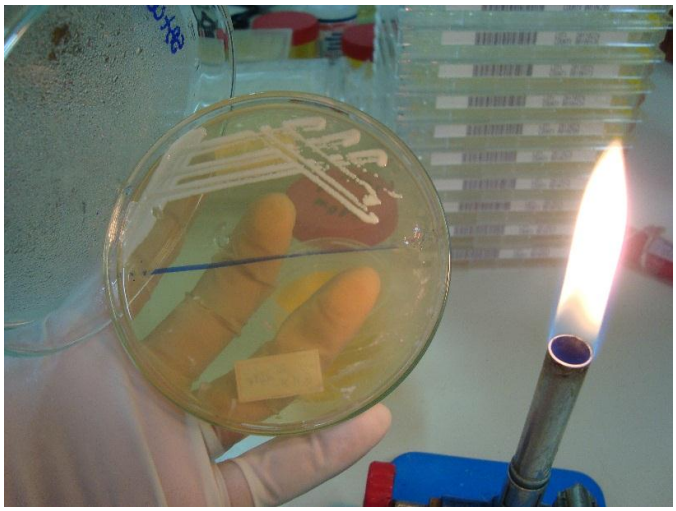


Figura 19: Subcultura (repique) dos fungos

A suspensão resultante foi colocada em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 1 x 10^6 a 5 x 10^6 células por mL. A suspensão padrão de levedura foi diluída 1:50 e depois 1:20 com o meio de cultura, para se obter o inóculo usado no teste (de 1 x 10^3 a 5 x 10^3 UFC/mL). O inóculo foi diluído a 1:1 quando os poços forem inoculados, chegando-se à concentração final desejada de 0,5 x 10^3 a 2,5 x 10^3 UFC/mL.

O teste de microdiluição foi realizado em microplacas estéreis, descartáveis, com múltiplos poços (96 poços) (Figura 20). Os compostos são dispensados nos poços das fileiras 2, e diluídos até a fileira 11 das placas, em volumes de 100 μL, com uma pipeta multicanal. A fileira 1 foi utilizada como controle negativo, e contem somente o meio estéril, isento do composto e do inóculo. A fileira 2 contem a maior concentração da substância (400 μg/mL) e a fileira 11 a menor concentração (0,78 μg/mL). Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado com 100 μL do inóculo, o que leva às diluições das drogas e à concentração do inóculo antes mencionados. Os poços controle de crescimento, fileira 12, contêm 100 μL de meio estéril, isento da substância, e foram inoculados com 100 μL do inóculo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

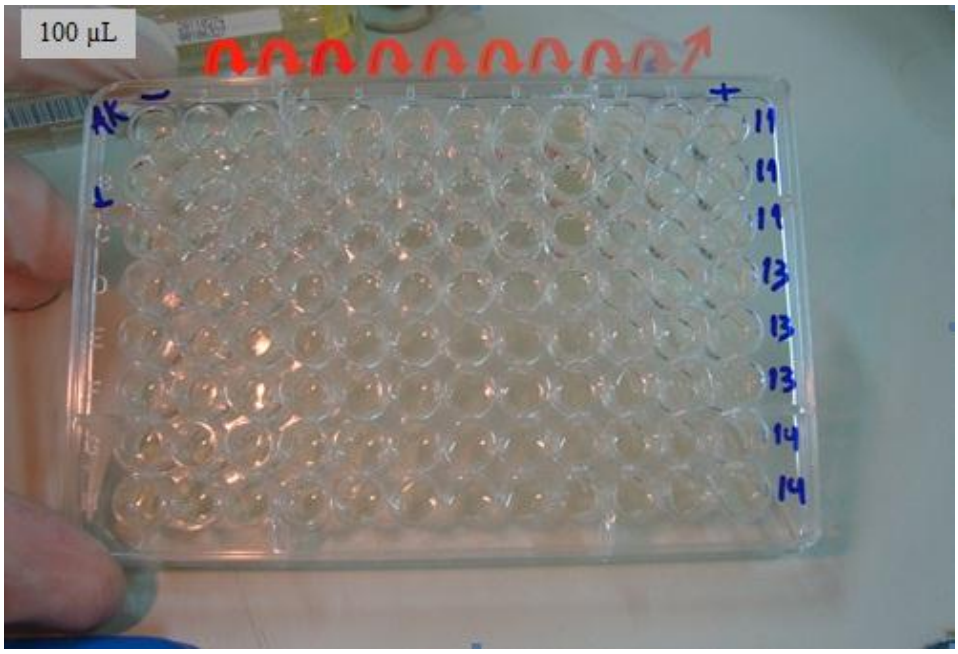


Figura 20: Microplacas de 96 poços para a realização do teste de microdiluição

As microplacas foram incubadas por 48 horas a 35ºC, antes de serem determinados os resultados. Após este período, foi efetuada a leitura dos testes, com a observação da presença ou ausência de crescimento visível, com a configuração de CIM (concentração inibitória mínima) como sendo o último poço em que não ocorreu crescimento do fungo (Figura 21). Os resultados encontram-se na Tabela 4.

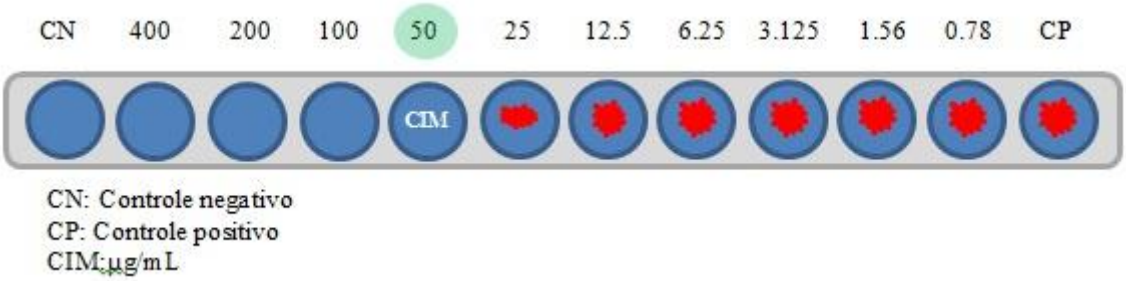


Figura 21: Demonstração da leitura através do crescimento fúngico visível e determinação do CIM.

Para a realização dos testes utilizou-se o meio de cultura sintético denominado RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol). O mesmo foi tamponado a pH 7,0 ± 0,1, em temperatura de 25° C. A solução-tampão considerada satisfatória nos testes de sensibilidade a antifúngicos

que não antagoniza os agentes antifúngicos, é o MOPS (concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0).

3.3.2.2. Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A atividade fungicida foi determinada para cada substância de forma isolada em ágar Sabouraud dextrose. Após 48 horas de incubação, foi retirado 10 μL de três poços de cada amostra, e repicados em placas de Petri. A escolha dos poços ocorreu de acordo com os resultados obtidos, sendo estes: o poço em que ocorreu a inibição completa, o poço anterior ao que ocorreu a inibição completa, e o último poço com crescimento positivo. Os conteúdos das placas não foram agitados previamente a remoção dos volumes e as mesmas foram incubadas a 35 ºC por 24 horas. A CFM foi definida como a menor concentração da substância que não apresentou crescimento.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Síntese das substâncias

Neste capítulo será explicada a numeração e a nomenclatura das substâncias sintetizadas no trabalho. Logo após, será apresentada a rota sintética empregada onde serão discutidos as condições reacionais, metodologia utilizada, purificação, rendimentos e caracterização das substâncias.

4.1.1. Numeração e nomenclatura dos compostos sintetizados

De modo geral foi estabelecida a seguinte numeração para os reagentes e produtos obtidos: **1** para amina (2-aminoetilpiperidina), **2** para benzaldeídos substituídos, **3** para ácido mercaptoacético e **4** para as tiazolidinonas. A nomenclatura utilizada para as substâncias está de acordo com as regras da IUPAC e está presente na Tabela 2.

Tabela 2. Nomenclatura das substâncias sintetizadas.

	Nomenclatura
4a	2-(2-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4b	2-(3-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4c	2-(4-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4d	2-(2-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4e	2-(3-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4f	2-(4-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4g	2-(2-nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4h	2-(3-nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4i	2-(4-nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4j	2-(3-hidróxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4k	2-(4-hidróxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4l	2-(2-metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4m	2-(3-metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona
4n	2-(4-metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona

Tabela 2. Nomenclatura das substâncias sintetizadas (cont.)

	Nomenclatura
4o	3-(piperidin-2-il)-2-(*p*-toluil)etil-tiazolidin-4-ona
4p	2-(2,6-diclorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona

A proposta desta etapa do trabalho é estudar as condições reacionais para a síntese das tiazolidinonas **4a-p** em refluxo de tolueno com o uso do aparelho *Dean Stark*. A síntese pode ocorrer em duas etapas, com a reação de amina, aldeído e posterior adição de ácido mercaptoacético, ou através da reação "*one pot*", a qual ocorre em uma única etapa por meio da adição de todos os componentes no início da reação.

4.1.2. Planejamento estrutural

Para atingir o objetivo principal do trabalho - a obtenção de substâncias para avaliação biológica-, foi escolhida como um dos reagentes de partida o precursor amina 2-aminoetilpiperidina, cuja estrutura é relatada com importantes ações biológicas, como por exemplo, atividade antimicrobiana (RAMALINGAN et al., 2006; UMAMATHESWARI et al., 2010; SIWEK et al., 2011). Somando-se a este fato, as tiazolidinonas também apresentam várias ações biológicas, incluindo antifúngicas e antibacterianas. Neste sentido, a união destes dois núcleos através de uma hibridação molecular originaria uma substância com grandes potenciais biológicos e que também apresenta semelhanças estruturais com antifúngicos já disponíveis comercialmente, principalmente o miconazol (Figura 22).

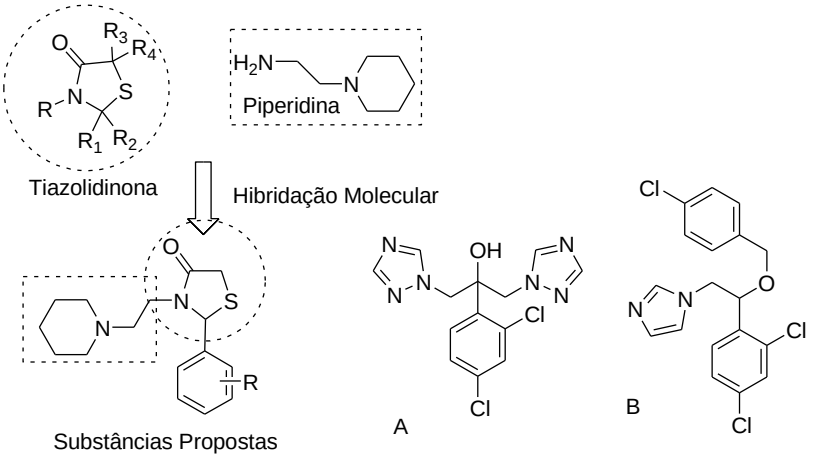


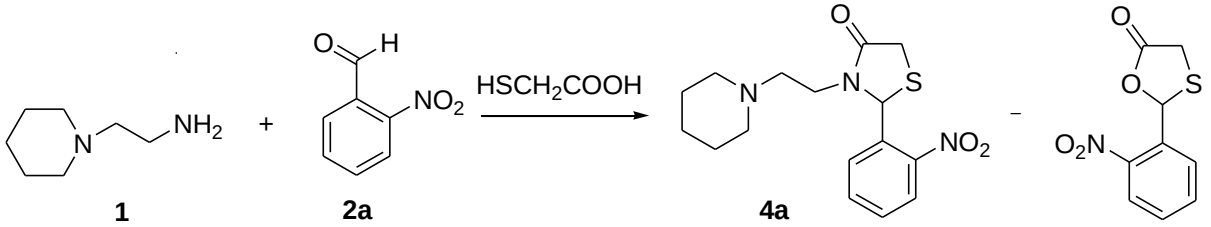
Figura 22: Estratégia de planejamento através de hibridação molecular e estrutura dos fármacos fluconazol (A) e miconazol (B).

4.1.3. Condições reacionais, rendimentos e ponto de fusão das substâncias

Desta forma, utilizando o *know-how* do grupo de pesquisa LaQuiABio, o estudo da condição reacional foi iniciado com a escolha aleatória da reação a partir da amina **1** e do 2-nitrobenzaldeído **2a**, a fim de se obter os produtos com melhores rendimentos possíveis e maior grau de pureza. Foram testadas três condições para formação da tiazolidinona correspondente, ambas utilizando refluxo de tolueno.

Para auxiliar na eliminação de duas moléculas de água, sendo uma da formação da imina e a outra da ciclocondensação, utilizou-se o a destilação azeotrópica com o uso do aparelho *Dean-stark*.

Na primeira condição (condição A, Esquema 4) foi realizada a reação "one pot", a qual ocorre em uma única etapa com a adição de todos os reagentes no início da reação, na proporção de 1:2:3 de amina (**1**), 2-nitrobenzaldeído (**2a**) e ácido mercaptoacético (**3**), respectivamente (HOLMES et al., 1995). A segunda condição, uma otimização da condição A (condição B, Esquema 4) também foi realizada "*one pot*", porém na proporção 1:1:3. Ambas as reações foram acompanhadas de hora em hora por cromatografia de camada fina (CCF [eluente hexano/acetato de etila 3:1] e/ou CG), e após 6 horas, além do produto foi observado a presença de subproduto oxatiolona (5-10%), através da análise de CG com o uso de banco de dados de subprodutos.

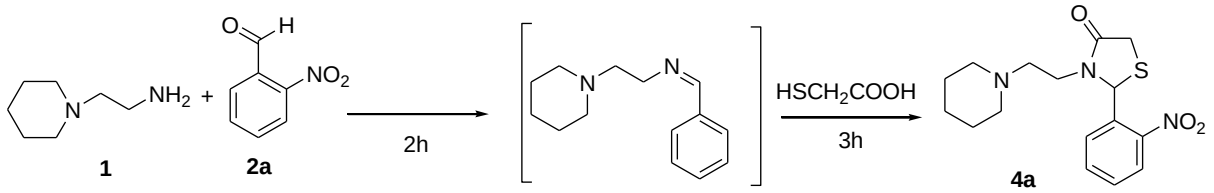


condição A e B - Em uma única etapa*;* tolueno, refluxo, 6 h.

Esquema 4: Condição A e B testadas para síntese das tiazolidinonas

A síntese em duas etapas, sem isolamento do intermediário, com a proporção equimolar de reagentes 1:1+3, também foi testada (condição C, Esquema 5) com o intuito de evitar a formação do subproduto. Primeiramente ocorreu a reação da amina e do aldeído para a formação da imina, e 2 horas após o início da reação foi adicionado o ácido mercaptoacético, para a ciclização intramolecular. Também houve o acompanhamento por CCF de hora em hora, e após mais 3 horas de

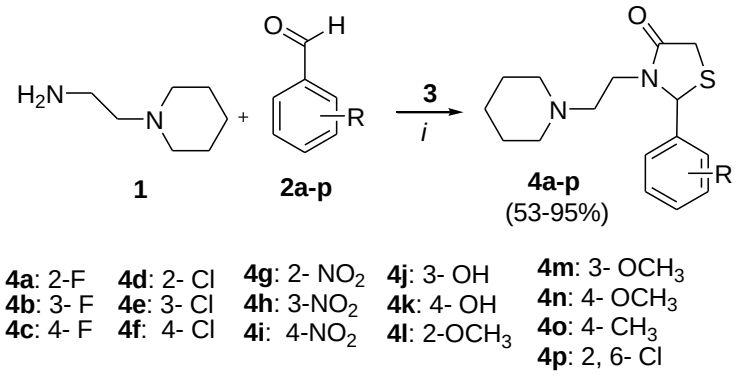
reação, foi constatada que houve a formação completa do produto, com a confirmação da pureza através de cromatografia gasosa.



condição C - Em duas etapas; tolueno, refluxo, 5 horas

Esquema 5: Condição C testada para a síntese das tiazolidinonas

Baseado nesses resultados, as tiazolidinonas **4a-p** foram sintetizadas sob refluxo de tolueno (110 ºC) pelo período total de 5 horas, na proporção de 1:1+3 (Esquema 6). Após o tempo reacional a mistura foi tratada com solução saturada de bicarbonato de sódio, ocorrendo a formação de uma fase orgânica e outra aquosa. Sendo que a primeira passou pelo processo de secagem com $MgSO_4$ anidro, filtragem e posterior remoção de solvente por meio da utilização de um evaporador rotatório. Quando necessários, os produtos foram purificados através de lavagem com hexano à quente.



i: $HSCH_2COOH$ **3** Tolueno, refluxo, 5 horas.

Esquema 6: Esquema geral da síntese das tiazolidinonas **4a-p** .

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, as tiazolidinonas **4a-p** apresentaram bons rendimentos (53 - 97%) com o uso da metodologia convencional. Além disso, com dados da análise de CG e através da determinação do ponto de fusão dos sólidos (cuja variação da temperatura foi de 1 a 3 ºC), pode- se constatar a pureza dessas substâncias.

Tabela 3. Rendimentos e pontos de fusão dos compostos sintetizados **4a-p**.

Produto	R	F.M	P.M (g/mol)	Rendimento[a](%)	p.f.[b](°C)
4a	2-F	$C_{16}H_{21}FN_2OS$	308,41	91	71-74
4b	3-F	$C_{16}H_{21}FN_2OS$	308,41	83	57-61
4c	4-F	$C_{16}H_{21}FN_2OS$	308,41	74	70-73
4d	2-Cl	$C_{16}H_{21}ClN_2OS$	324,87	75	óleo
4e	3-Cl	$C_{16}H_{21}ClN_2OS$	324,87	64	óleo
4f	4-Cl	$C_{16}H_{21}ClN_2OS$	324,87	55	75-78
4g	2-NO_2	$C_{16}H_{21}N_3O_3S$	335,42	94	78-81
4h	3-NO_2	$C_{16}H_{21}N_3O_3S$	335,42	95	óleo
4i	4-NO_2	$C_{16}H_{21}N_3O_3S$	335, 42	88	óleo
4j	3-OH	$C_{16}H_{22}N_2O_2S$	306,42	86	109-115
4k	4-OH	$C_{16}H_{22}N_2O_2S$	306,42	53	210-214
4l	2-OCH_3	$C_{17}H_{24}N_2O_2S$	320,47	59	57-59
4m	3-OCH_3	$C_{17}H_{24}N_2O_2S$	320,47	75	óleo
4n	4-OCH_3	$C_{17}H_{24}N_2O_2S$	320,47	97	óleo
4o	4-CH3	$C_{17}H_{24}N_2OS$	304,45	86	43-46
4p	2,6-Cl	$C_{16}H_{21}Cl_2N_2OS$	359,31	91	88-92

[a] Rendimento dos compostos isolados. [b] Equipamento não calibrado

4.1.4. Identificação das substâncias sintetizadas

As estruturas das tiazolidinonas derivadas da 2-aminoetilpiperidina, inéditas na literatura, foram confirmadas por meio da análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H) e carbono (RMN ^{13}C) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS) (Tabela 4). Os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C foram obtidos em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), em tubos de 5 mm, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. É importante ressaltar que a numeração do grupo etilpiperidinico foi efetuada de maneira aleatória apenas para a identificação dos sinais.

Os sinais do espectro de RMN ^{1}H que confirmam a formação do produto são os hidrogênios H2 e H5 do anel da tiazolidinona. Para a maioria das substâncias, ocorre uma sobreposição de sinais na região de 3,7 a 4,2 ppm correspondente a um

dos hidrogênios diasterotópicos H5 e um dos também hidrogênios diasterotópicos do H6, no entanto, eles podem ser claramente observados na tiazolidinona **4l** (Figura 23) com o H5a que aparece como um dubleto de dubleto em 3,73 ppm acoplando com ambos os hidrogênios H5b e H2 (^{2}J=15,6 Hz e ^{4}J=1,6 Hz) e H5b que aparece como um dubleto (^{2}J=15,6 Hz) a 3,61 ppm. O hidrogênio H2 aparece como um dubleto em 6,20 ppm (em alguns casos como singleto) com uma pequena constante de acoplamento de ^{4}J=1,5 Hz com o H5a. Os hidrogênios diasterotópicos do H6 e H7 aparecem como quatro sinais de dubletos de tripletos, tendo constantes de acoplamento com valores de ^{2}J= 14,0 e ^{3}J= 6,6 para o H6b, e ^{2}J= 12,8 e ^{3}J= 7,0 para o H7a.O hidrogênio H6a está sobreposto a metoxila e o H7b sobreposto ao sinal do hidrogênio 8. Na região de 1,55 a 1,41 ppm encontram-se os sinais do H8, H8', H9, H9' e H10, referentes aos hidrogênios do anel da piperidina (Figura 24).

A Figura 25 exemplifica o espectro de ^{13}C RMN para o composto **4i**. O espectro exibe a 171,3 ppm o sinal do grupo carbonila (C4), em 62,7 ppm encontra-se o C2, a 53,3 ppm e 54,5 ppm os carbonos metilênicos da porção etila C6 e C7, respectivamente. A 32,8 ppm o sinal do carbono metilênico C5 e os demais sinais 39,9, 25,6 e 24,0 pertencem ao anel da piperidina.

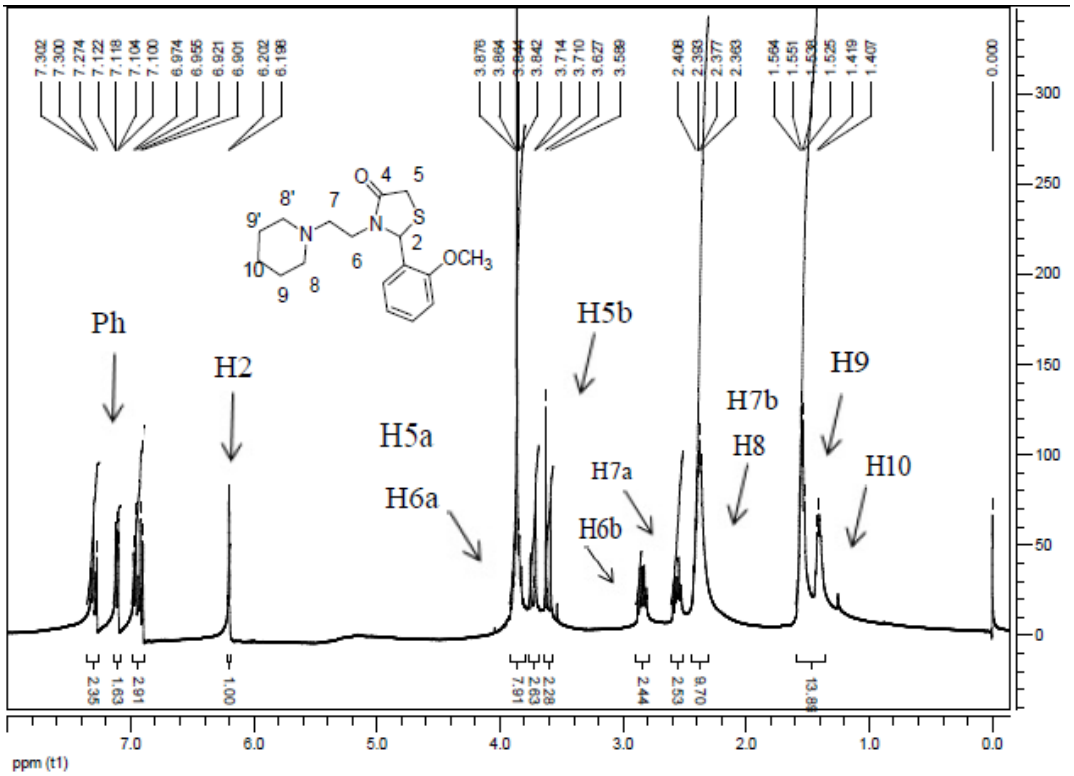


Figura 23: Espectro de RMN ^{1}H do composto **4l** (200 MHz).

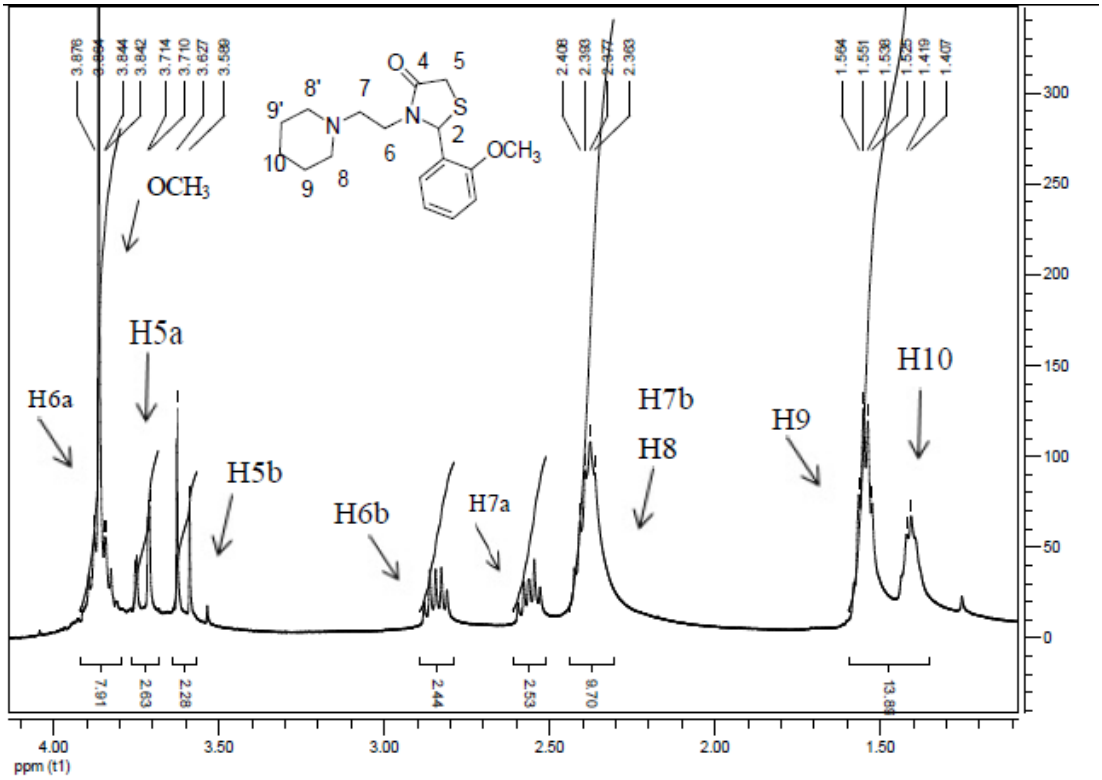


Figura 24: Espectro de RMN ^{1}H do composto **4l** (200 MHz). Expansão da região de 4 a 1 ppm.

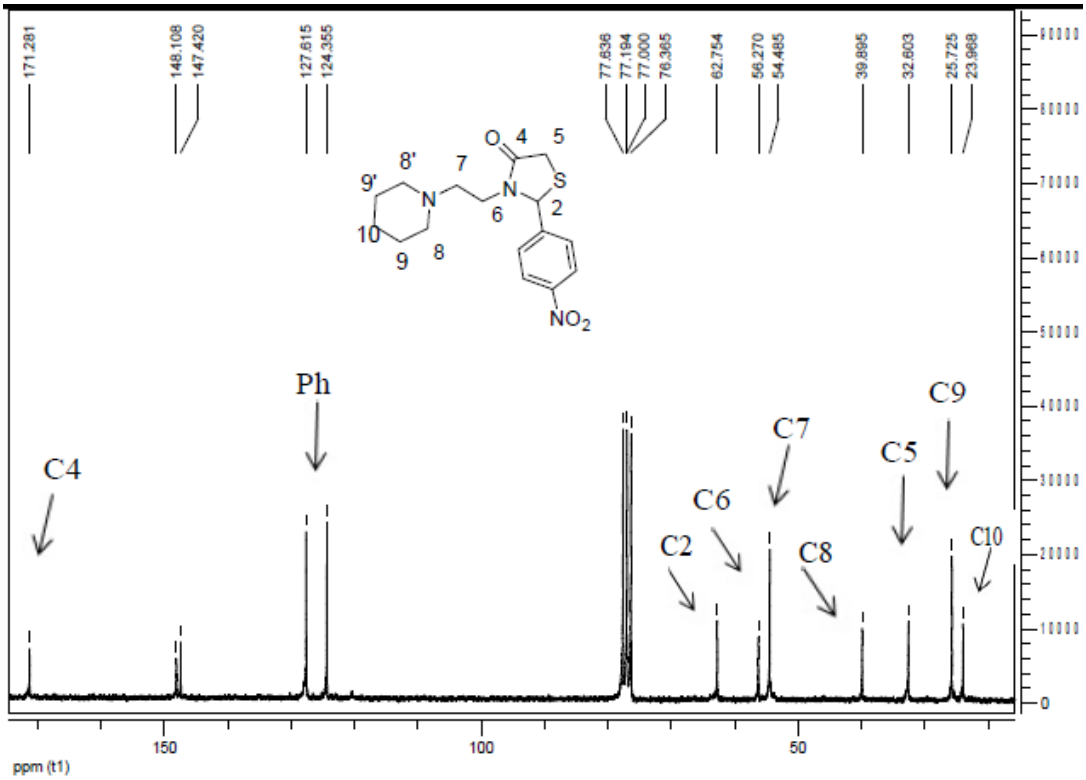


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C do composto **4i** (50 MHz)**.**

As novas tiazolidinonas também foram identificadas por espectrometria de massas conforme exemplificado para a substância **4d** na Figura 26.

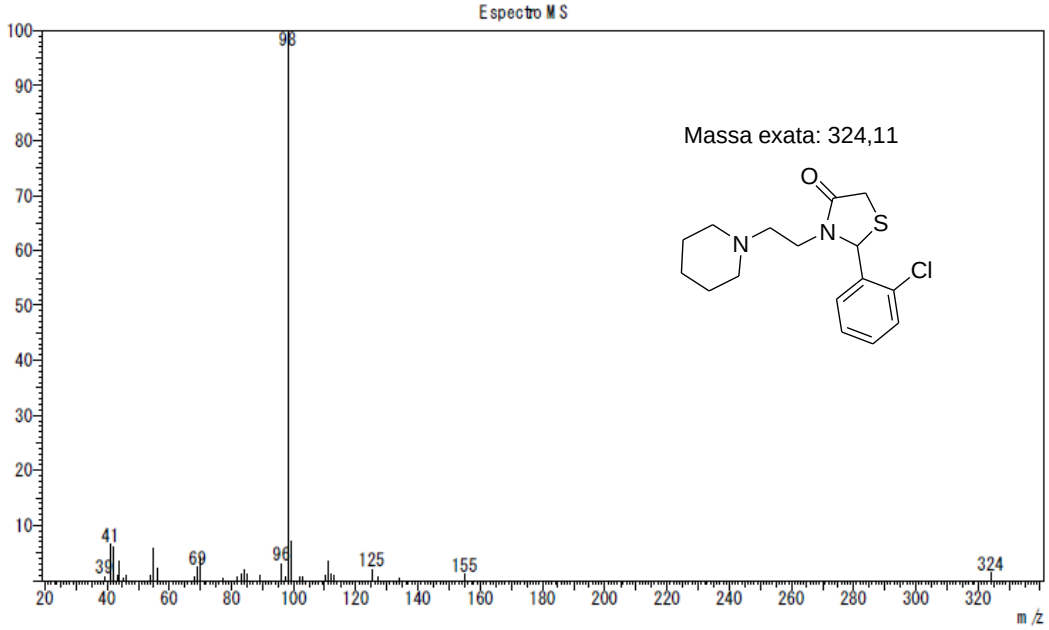


Figura 26. Espectro de massas da substância **4d.**

De maneira geral, todos os espectros mostraram um mesmo padrão de sinais, apresentando baixas intensidades para todos os fragmentos com exceção do pico base.

Na análise de do espectro de MS da substância **4d** observa-se a quebra tiazolidinonas derivadas da 2-aminopiperidina (Figura 26). Através destes resultados, é possível constatar um padrão de quebras, sendo o pico base o fragmento 98 com intensidade de 100% correspondente a 1-metilpiperidina, e o íon molecular referente ao peso molecular da substância com intensidade de aproximadamente 5%. Desta forma, primeiramente ocorre a quebra do grupo etil resultando na formação do pico base 98 (Estrutura I, Figura 27), com posterior quebra do da tiazolidinona de massa 155 (Estrutura II, Figura 27). O restante dos fragmentos exibidos na espectrometria de massas da substância **4d** estão ilustrados na Figura 27.

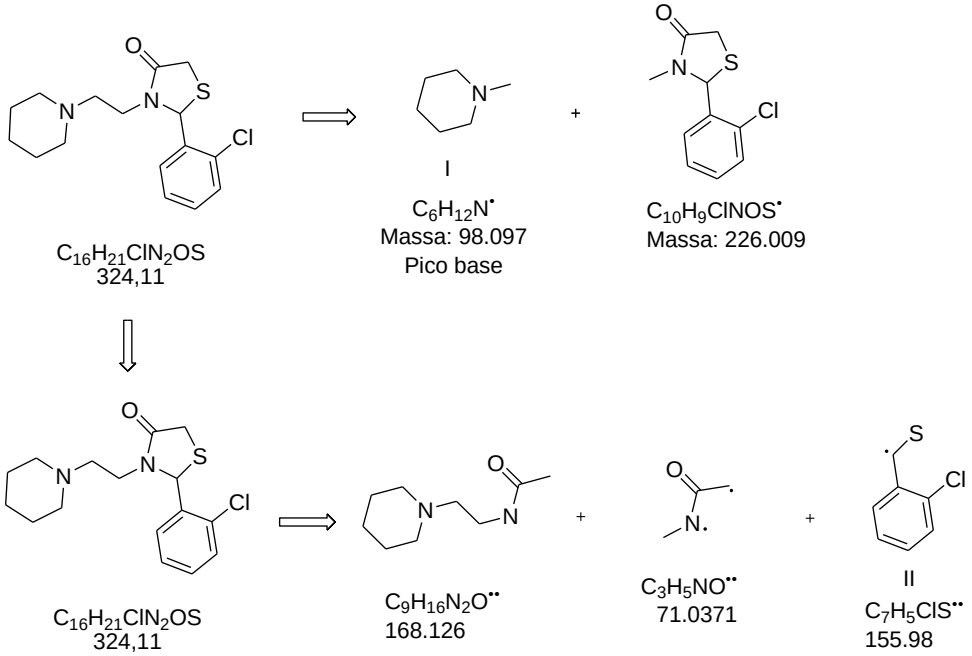


Figura 27: Proposta de fragmentação de massas da tiazolidinona **4d.**

Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C e de massas das tiazolidinonas **4a-p**.

	RMN ^{1}H δ (ppm) J_{H-H} (Hz)	RMN ^{13}C δ (ppm) J_{C-F} (Hz)	CG-MS m/z(%)
4a	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,33 (m, 1H); 7,26 (td, 1H, ^{3}J=7,4, ^{4}J=1,5); 7,17 (t, 1H, ^{3}J=7,4); 7,08 (t, 1H, ^{3}J=8,6); 6,19 (d, 1H, ^{4}J=1,5 Hz, H2); 3,86 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,80 (dd, 1H, ^{2}J=15,6, ^{4}J=1,5, H5a); 3,67 (d, 1H, ^{2}J=15,2, H5b); 2,87 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,61 (dt, 1H, ^{2}J=12,5, ^{3}J=6,2, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,44 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,58 (m, 4H); 1,43 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ. 171,4 (C4); 160,4 (d, $^{1}J_{C-F}$=249); 130,4 ($^{3}J_{C-F}$=8,4); 127,9 (d, $^{4}J_{C-F}$=3,1); 124,7 (d, $^{4}J_{C-F}$=3,6); 116,1 (d, $^{2}J_{C-F}$=21,1) (Ph); 57,6 (C2); 55,7 e 54,3 (-NCH_2CH_2N-); 39,7; 32,5 (C5); 25,4; 23,9.	308 (M, 2); 153 (1); 139 (2); 113 (4); 98 (100); 69 (4)
4b	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,34 (m, 1H); 7,27 (s, 1H); 7,05 (m, 4H); 5,91 (s, 1H, H2); 3,82 (m, 2H, H5a e -$NCH_2CH_2N(C=O)$-); 3,71 (d, 2H, J=15,2, H5b e -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,83 (dt, 1H, ^{2}J=13,6, ^{3}J=6,6, ^{3}J=7,0, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,58 (dt, 1H, ^{2}J=12,8, ^{3}J=6,6, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,41 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,59 (m, 4H); 1,44 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ. 171,3 (C4); 160,6 (d, $^{1}J_{C-F}$=251); 130,6 (d, $^{3}J_{C-F}$=8,1); 122,5 (d, $^{4}J_{C-F}$=2,9); 116,0 (d, $^{2}J_{C-F}$=21,3) e 113,8 (d, $^{2}J_{C-F}$=22,1) (Ph); 63,2 (C2); 55,9 e 54,4 (-NCH_2CH_2N-); 39,6; 32,7 (C5); 25,5; 23,9	308 (M, 2); 224 (1); 153 (1); 139 (2); 113 (4); 98 (100); 96 (5); 69 (4)

4c	^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ. 7,31 (m, 2H); 7,08 (t, 2H, ^{3}J=8,6); 5,91 (s, 1H, H2); 3,77 (m, 2H, H5a e -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,72 (d, 1H, ^{2}J=15,6, H5b); 2,79 (dt, 1H, ^{2}J=14,6, ^{3}J=6,6, ^{3}J=6,2, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,55 (dt, 1H, ^{2}J=12,9, ^{3}J=6,6, ^{3}J=6,2, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,38 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,58 (m, 4H); 1,44 (m, 2H).	^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz): δ. 171,2 (C4); 162,9 (d, $^{1}J_{C-F}$=248), 135,4 (d, $^{4}J_{C-F}$=2,9), 128,9 (d, $^{3}J_{C-F}$=8,8) e 116,0 (d, $^{2}J_{C-F}$=21,3) (Ph); 63,3 (C2); 55,8 e 54,4 (NCH_2CH_2N-); 39,5; 32,8 (C5); 25,5; 23,9.	308 (M, 2); 153 (1); 139 (2); 113 (3); 98 (100); 96 (4); 69 (3)
4d	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,40 (dd, 1H, ^{2}J=7,8 e ^{3}J=1,9); 7,29 (m, 2H); 7,17 (dd, 1H, ^{2}J=7,0, ^{3}J=2,3, ^{3}J=1,9); 6.37 (s, 1H, H2); 3,92 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=5,8, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,72 (d, 1H, ^{2}J=15,6, H5a); 3,64 (d, 1H, ^{2}J=15,2, H5b); 2,83 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,56 (dt, 1H, ^{2}J=12,9, ^{3}J=6,6, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,38 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,54 (m, 4H); 1,41 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 171,9 (C4); 137,3, 132,7, 130,2, 129,5 e 127,4 (Ph); 60,2 (C2); 56,1 e 54,5 (-NCH_2CH_2N-); 40,1; 32,0(C5); 25,7; 24,1.	324 (M, 2); 155 (2); 125 (3); 98 (100); 96 (5); 69 (5)
4e	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.30 (m, 3H); 7,18 (m, 1H); 5,90 (d, 1H, ^{4}J=1,6, H2); 3,81 (m, 2H, H5a e -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,71 (d, 1H, ^{2}J= 15,2, H5b); 2,79 (dt, 1H, ^{2}J=13,6, ^{3}J=5,8, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,53 (dt, 1H, ^{2}J=13,2, ^{3}J=5,8, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,33 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,56 (m, 4H); 1,43 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171,2 (C4); 142,1; 134,9; 130,3, 129,2, 127,0 e 125,0 (Ph); 63,3 (C2); 56,2 e 54,5 (-NCH_2CH_2N-); 39,8; 32,7 (C5); 25,8; 24,1.	324 (M, 1); 155 (2); 127 (2); 113 (3); 98 (100); 96 (4); 69 (4)

4f	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,34 (d, 2H, ^{3}J=8,2); 7,26 (d, 2H, ^{3}J=8,6); 5,90 (s, 1H, H2); 3,84 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,77 (d, 1H, ^{2}J=16,0, H5a); 3,72 (d, 1H, ^{2}J=16,0, H5b); 2,82 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,61 (dt, 1H, ^{2}J=12,5, ^{3}J=6,6, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,50 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,45 (m, 4H); 1,25 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 171,1 (C4); 138,4, 134,7, 129,2 e 128,3 (Ph); 63,3 (C2); 56,3 e 54,5 (-NCH_2CH_2N-); 39,8; 32,8 (C5); 25,9; 24,1.	324 (M, 2); 155 (2); 125 (3); 98 (100); 96 (4); 69 (5)
4g	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8,13 (d, 1H, ^{3}J=8.2); 7,70 (t, 1H, ^{3}J=7,4); 7,51 (t, 1H, ^{3}J=8,2); 7,30 (m, 1H); 6,59 (s, 1H, H2); 3,98 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=5,8, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 3,70 (d, 1H, ^{2}J=15,6, H5a); 3,61 (d, 1H, ^{2}J=16,0, H5b); 2,87 (dt,1H, ^{2}J=13,6, ^{3}J=6,2, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,67 (dt, 1H, ^{2}J=12,8, ^{3}J=6,6, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,45 (dt, 1H, ^{2}J=12,8, ^{3}J=5,8, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,39 (m, 4H); 1,51 (m, 4H); 1,41 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ172,4 (C4); 147,0, 136,7, 134,4; 129,0, 125,8 e 125,7 (Ph); 58,9 (C2); 55,8 e 54,3 (-NCH_2CH_2N-); 39,8; 31,4 (C5); 25,0; 23,6.	335 (M, 2); 166 (5); 113 (2); 98 (100); 69 (4)
4h	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8,20 (m, 2H); 7,67 (d, 1H, ^{3}J=7,8); 7,59 (t, 1H, ^{3}J=7,8); 6.08 (d, 1H, ^{4}J=1,6, H2); 3,85 (m, 2H, H5a, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,75 (d, 1H, ^{2}J=15,6); 2,78 (dt, 1H, ^{2}J=12,5, ^{3}J=7,4, ^{3}J=5,7, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,59 (dt, 1H, ^{2}J=12,8, ^{3}J=6,2, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,38 (m, 5H, (-$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,58 (m, 4H); 1,44 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171,2 (C4); 142,5, 132,9, 130,2, 123,9, 122,0 e 104,9 (Ph); 62,9 (C2); 56,1 e 54,5 (-NCH_2CH_2N-); 39,7; 32,7 (C5); 25,6; 23,9.	335 (M, 2); 166 (1); 113 (2); 98 (100); 69 (5)

4i	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8,26 (d, 2H, ^{3}J=9,0); 7,48 (d, 2H, ^{3}J=8,6); 6,09 (s, 1H, H2); 3,86 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=5,4, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,78 (d, 1H, ^{2}J=15,2, H5a); 3,74 (d, 1H, ^{2}J=15,2, H5b); 2,77 (dt, 1H, ^{2}J=14,4, ^{3}J=5,2, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,57 (dt, 1H, ^{2}J=12,9, ^{3}J=5,8, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,35 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,56 (m, 4H); 1,44 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 171,3 (C4); 148,1, 147,4, 127,6 e 124,3 (Ph); 62,7 (C2); 56,3 e 54,5 (-NCH_2CH_2N-); 39,9; 32,6 (C5); 25,7; 23,9.	335 (M, 2); 251 (1); 166 (1); 134 (1); 117 (1); 98 (100); 84 (5); 69(5)
4j	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,16 (t, 1H, ^{3}J=7,8); 6,73 (t, 2H, ^{3}J=7,4); 6,66 (s, 1H); 5,72 (s, 1H, H2); 3,82 (dt, 1H, ^{2}J=13,6, ^{3}J=7,4, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,76 (d, 1H, ^{2}J=15,6, H5a); 3,67 (d, 1H, ^{2}J=15,6, H5b); 2,88 (dt, 1H, ^{2}J=13,6, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,58 (dt, 1H, ^{2}J=10,9, ^{3}J=7,8, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,46 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,59 (m, 4H); 1,43 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 171,7 (C4); 157,6, 140,6, 130,2, 118,0, 116,6, 116,5 e 113,4 (Ph); 63,8 (C2); 55,2 e 54,4 (-NCH_2CH_2N-); 39,6; 32,8 (C5); 25,2; 23,7.	306 (M, 2); 195 (2); 151 (1); 113 (4); 98 (100); 69 (4)
4k	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,14 (d, 2H, ^{3}J=8,6); 6,82 (d, 2H, ^{3}J=8,2); 5,80 (s, 1H, H2); 3,69 (m, 3H, H5a, H5b e -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,79 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,47 (dt, 1H, ^{2}J=12,9, ^{3}J=6,6, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,32 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,54 (m, 4H); 1,42 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 170,2 (C4); 157,4, 128,7, 127,8 e 115,1 (Ph); 63,1(C2); 55,2 e 53,7 (-NCH_2CH_2N-); 39,1; 32,2 (C5); 25,1; 23,4.	306 (M, 1); 151 (3); 113 (5); 98 (100); 69 (5)

4l	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,28 (td, 1H, ^{3}J=8,2, ^{4}J=1,6); 7,11 (dd, 1H, ^{3}J=7,8, ^{4}J=1,6); 6,95 (t, 1H, ^{3}J=7,4); 6,92 (t, 1H, ^{3}J=8,2); 6,20 (d, 1H, ^{4}J=1,5, H2); 3,86 (m, 4H, OCH_3 e -$NCH_2\underline{CH_2}N(C{=}O)$-); 3,73 (dd, 1H, ^{2}J=15,6, ^{4}J=1,6, H5a); 3,61(d, 1H, ^{2}J=15,6, H5b); 2,84 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, $NCH_2\underline{CH_2}N(C{=}O)$-); 2,56 (dt, 1H, ^{2}J=12,8, ^{3}J=7,0, $N\underline{CH_2}CH_2N(C{=}O)$-); 2,39 (m, 5H, $N\underline{CH_2}CH_2N(C{=}O)$-); 1,55 (m, 4H); 1,42 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 171,9 (C4); 156,8, 129,7, 127,7, 126,5; 120,7 e 110,9 (Ph); 58,3 (C2); 55,8 e 54,3 (-NCH_2CH_2N-); 55,4 (OCH_3); 39,9; 32,5 (C5); 25,6; 24,0	320 (M, 4); 112 (5); 98 (100); 84 (9); 69 (8)
4m	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,28 (dd, 1H, ^{3}J=7,7, ^{4}J=2,6); 6,88 (dd, 2H, ^{3}J=7,9, ^{4}J= 2,1); 6,82 (d, 1H, ^{4}J=1,9); 5,88 (s, 1H, H2); 3,79 (m, 5H, H5a, OMe, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C{=}O)$-); 3,70 (d, 1H, ^{2}J=15.4, H5b); 2,82 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C{=}O)$-); 2,52 (dt, 1H, ^{2}J=12,6, ^{3}J=7,0 -$N\underline{CH_2}CH_2N(C{=}O)$-); 2,32 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C{=}O)$-)); 1,55 (m, 4H); 1,42 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 171,3 (C4); 160,0; 141,2, 130,0; 119,1; 114,4; 112,3 (Ph); 63,8 (C2); 55,8 (OMe); 55,2 e 54,4 (-NCH_2CH_2N-); 39,6; 32,8 (C5); 25,6; 23,9	320 (M, 3); 151 (2); 113 (9); 98 (100); 84 (9); 69 (8)

4n	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,24 (d, 2H, ^{3}J=8,6); 6,89 (d, 2H, ^{3}J=8,6); 5,85 (s, 1H, H2); 3,82 (m, 4H, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$- e OCH_3); 3,76 (m, 2H, H5a e H5b); 2,80 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,50 (dt, 1H, ^{2}J=12,5, ^{3}J=7,0, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,28 (m, 5H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,55 (m, 4H), 1,42 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 171,1 (C4); 160,0, 131,3, 128,5 e 114,3 (Ph); 63,7 (C2); 56,1 e 54,5 (-NCH_2CH_2N-); 55,3 (OCH_3); 39,7; 32,9 (C5); 25,8; 24,1.	320 (M, 2); 151 (3); 113 (5); 98 (100); 84 (8); 69 (5)
4o	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 7,18 (m, 4H); 5,86 (s, 1H, H2); 3,73 (m, 3H, H5a, H5b e -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,79 (m, 1H, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 2,49 (m, 1H, -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 2,34 (m, 8H, CH_3 e -$N\underline{CH_2}CH_2N(C=O)$-); 1,53 (m, 4H); 1,41 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 171,2 (C4); 139,0, 136,6, 129,6 e 126,9 (Ph); 63,8 (C2); 56,1 e 54,5, (-NCH_2CH_2N-); 39,7; 32,9 (C5); 25,8; 24,1 (CH_3); 21,2.	304 (M, 2); 135 (3); 113 (4); 98 (100); 84 (5); 69 (3)
4p	^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7,38 (m, 3H); 7,26 (2d, 1H, ^{3}J=8,2, ^{3}J=7,4); 6,80 (s, 1H, H2); 3,98 (dt, 1H, ^{2}J=14,0, ^{3}J=6,6, -$NCH_2\underline{CH_2}N(C=O)$-); 3,81 (s, 2H, H5a e H5b); 2,80 (m, 7H, -$N\underline{CH_2}\underline{CH_2}N(C=O)$-); 1,72 (m, 4H); 1,50 (m, 2H).	^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 172,1 (C4); 161,2, 157,8, 135,0, 130,9, 130,4, e 129,0 (Ph); 67,7 (C2); 54,5 e 53,7 (-NCH_2CH_2N-); 38,4; 34,0 (C5); 23,9, 23,0.	359 (M, 3); 189 (5); 113 (4); 98 (100); 84 (5); 69(2)

4.2. Avaliação Antifúngica

Neste capítulo serão apresentados os resultados do teste de microdiluição em caldo das tiazolidinonas contra os seguintes fungos, *Criptococcus laurentii; Geotrichum* sp*., Candida parapsilosis, Candida guilliermondii, Trichosporum asahii, Rhodotorula* sp*.* e *Candida albicans*.

4.2.1. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima

Os resultados dos testes antifúngicos foram relatados como concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) e encontram-se na Tabela 5. Todos os compostos apresentaram os mesmos valores de CFM que os encontrados para CIM. Os resultados encontrados serão discutidos nos tópicos 4.3 e 4.4.

Tabela 5: Atividade antifúngica das tiazolidinonas **4a-p** expressas como concentração inibitória mínima CIM e CFM (μg/ml)

Amostra	Peso Molecular	R	*C. albicans*	*Rhodotorula* sp.	*C. laurentii*	*Geotrichum* sp.	*C. Parapsilosis*	*C. Guiiliermondii*	*T. asahii*
4a	308,41	2-F	100	36	100	>400	100	133	>400
4b	308,41	3-F	150	33,5	100	>400	100	100	>400
4c	308,41	4-F	45	25	100	50	100	100	100
4d	324,87	2-Cl	75	33	100	50	100	100	66,5
4e	324,87	3-Cl	62	25	100	50	100	100	100
4f	324,87	4-Cl	62	50	100	50	100	100	50
4g	335,42	2-NO_2	55	25	100	25	50	25	100
4h	335,42	3-NO_2	50	16,5	100	100	100	100	>400
4i	335,42	4-NO_2	62	30	100	50	100	100	100
4j	306,42	3-OH	81	33,5	100	>400	67	100	>400
4k	306,42	4-OH	100	25	100	50	100	100	50
4l	320,47	2-OMe	100	16,5	100	41,5	100	100	50
4m	320,47	3-OMe	100	33,5	100	>400	100	100	>400
4n	320,47	4-OMe	75	33,5	100	>400	50	100	>400
4o	304,45	4-Me	62	37,5	66	100	100	100	50
4p	359,31	2,6-Cl	75	30	200	50	100	200	50
FLU	306,27		1	26,5	1	8	1	16	1

4.3. Estudo da relação estrutura-atividade

.

Os resultados dos testes antifúngicos não permitiram a determinação da relação estrutura-atividade das tiazolidinonas **4a-p**, uma vez que o efeito eletrônico do substituinte não contribuiu significativamente para a atividade. Ambos os grupos retiradores e doadores de elétrons apresentaram valores similares de CIM e CFM. A posição do substituinte no anel fenílico (2, 3 ou 4) e a presença de dois substituintes (**4p**) também não tiveram influência na atividade.

4.4. Importância clínica dos resultados

A causa predominante de infecções fúngicas invasivas causadas por leveduras continua sendo a *C. albicans*. No entanto, a epidemiologia das infecções fúngicas vem rapidamente mudando e evoluindo de modo que espécies de *Candida* não-albicans e outras leveduras tem surgido como agentes oportunistas. Dentre as espécies de *Candida*, a *C. parapsilosis* é considerada como uma importante causa de infecção invasiva, que afeta principalmente neonatos e pacientes em unidades de tratamento intensivo (MICELI et al., 2011).

A resistência das espécies de *Candida* não-albicans aos atuais fármacos antifúngicos é um grande desafio para o estabelecimento de tratamentos e profilaxia. A levedura *C. guilliermondii* apresenta susceptibilidade reduzida ao fluconazol (75% suscetível), mas é altamente suscetível ao voriconazol (91%). Da mesma maneira, *C. rugosa* apresenta 45% de suscetibilidade ao fluconazol e 61,4% ao voriconazol, e as espécies *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis* podem desenvolver resistência à anfotericina e ao fluconazol, respectivamente. A *C. parapsilosis* é normalmente suscetível as equinocandinas, embora frequentemente possa apresentar altos valores de CIM para a caspofungina, associados com a falência do tratamento. A resistência ao fluconazol é determinada com valores de CIM > 64 μg/mL (MICELI et al., 2011).

Outro estudo permitiu verificar que o posaconazol apresenta boa atividade contra espécies de *Candida*, incluindo aquelas menos suscetíveis ao fluconazol (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, e *C. dubliniensis*), com valores de CIM de 1 µg/mL. De acordo com Lemos et al. (2009), a caspofungina e a anfotericina B foram

altamente ativos contra *C. albicans,* com faixas de CIM de 0,015-1 *µ*g/mL e 0,06-1 *µ*g/mL, respectivamente (SABATELLI et al., 2006).

Neste sentido, as tiazolidinonas **4a-p** demonstraram atividade antifúngica moderada contra as espécies de *Candida* testadas. Contra a *C. albicans* os valores de CIM e CFM encontram-se na faixa de 45-150 *µ*g/mL, sendo que o menor valor de CIM foi apresentado pela **4c** (Figura 29). As substâncias apresentaram pouca atividade contra *C. parapsilosis* (CIM e CFM = 50-100 *µ*g/mL, Figura 30) e *C. guilliermondii* (CIM e CFM = 25-200 *µ*g/mL, Figura 31). A exceção foi o composto **4g** que mostrou bons valores CIM e CFM de 25 *µ*g/mL contra a levedura *C. guilliermondii*, aproximadamente 1,5 vezes menos ativo que o fluconazol (CIM e CFM = 16 *µ*g/mL).

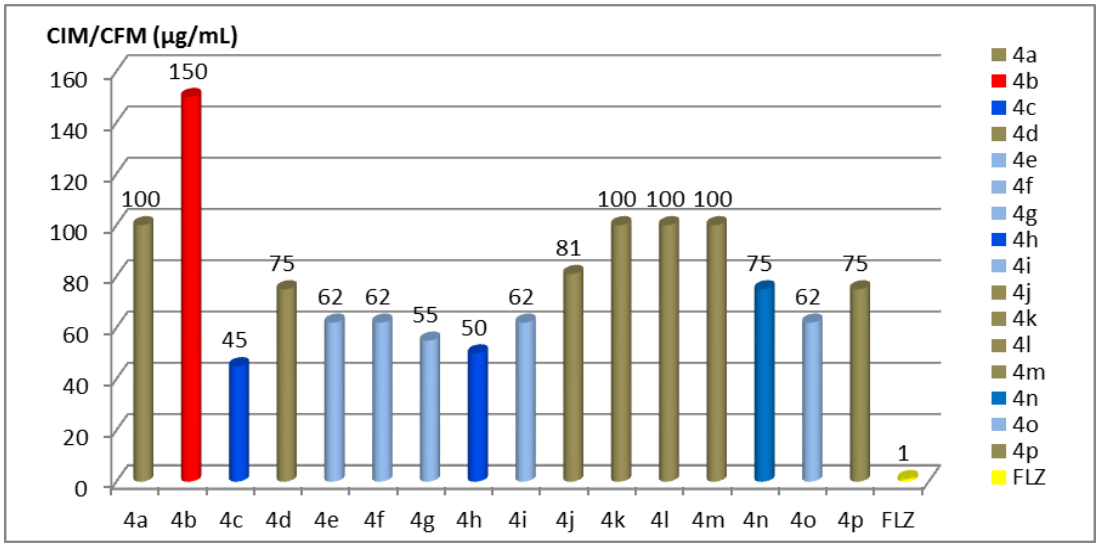


Figura 28. CIM e CFM (*µ*g/mL) das tiazolidinonas **4a-p** contra *C. albicans*

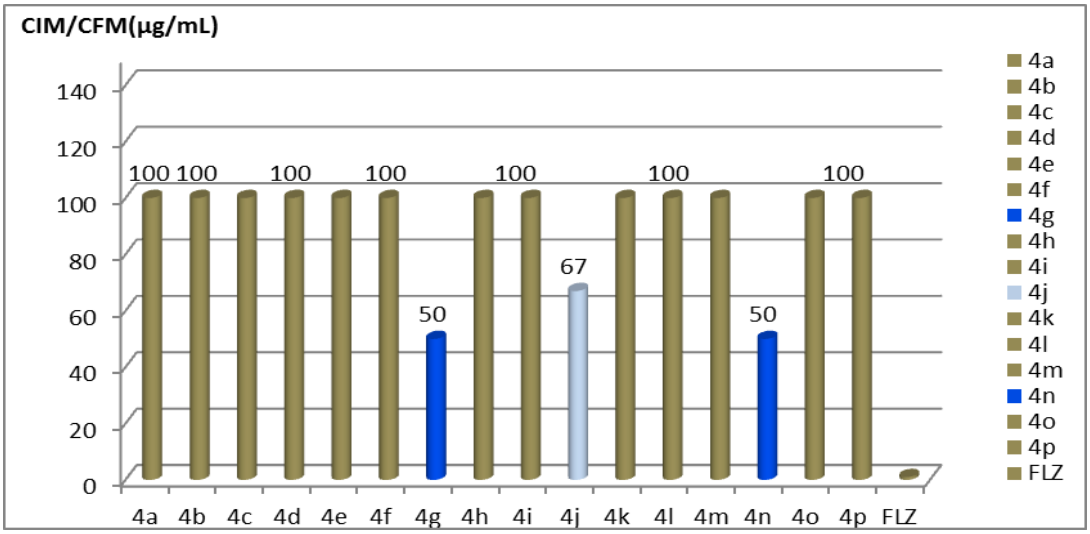


Figura 29. CIM e CFM (*µ*g/mL) das tiazolidinonas **4a-p** contra *C. parapsilosis*

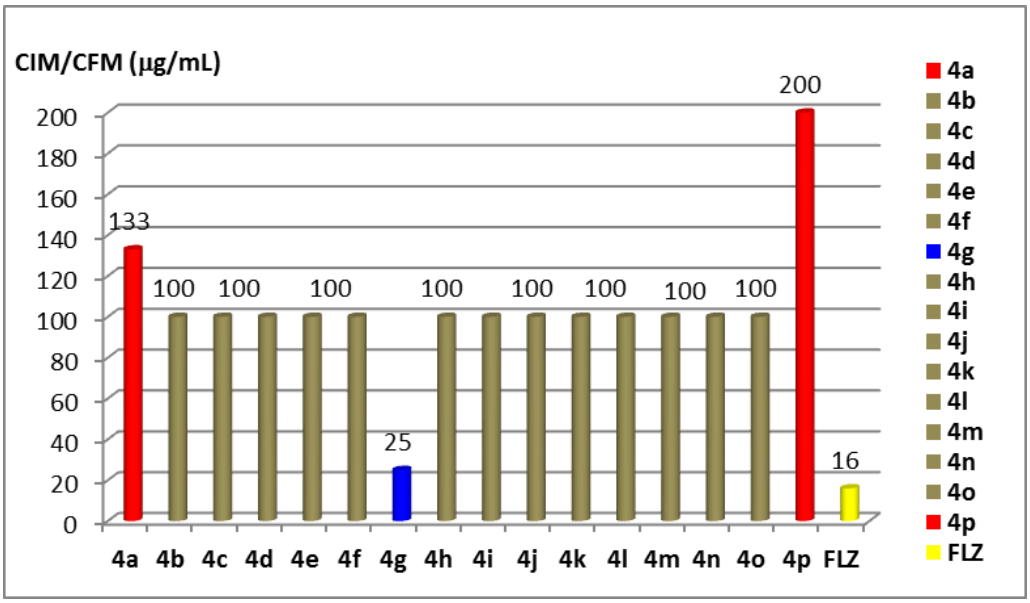


Figura 30. CIM e CFM (*µ*g/mL) das tiazolidinonas **4a-p** contra *C. guilliermondii*

Infecções causadas por outras espécies de *Criptococcus*, que não o *C. neoformans*, não são frequentes, mas elas podem ocorrer em pacientes imunocomprometidos portadores do vírus HIV, ou outras doenças como malignidades hematológicas ou oncológicas. Entre as espécies infectantes, apenas três são consideradas patógenos humanos, *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. uniguttulatus.*

A partir dos dados obtidos neste trabalho contra *C. laurentii* é possível concluir que as tiazolidinonas **4a-p** não apresentaram atividade relevante, visto que os valores de CIM e CFM encontrados encontram-se na faixa de 66 a 200 *µ*g/mL (Figura 32) (THOMPSON et al., 2009).

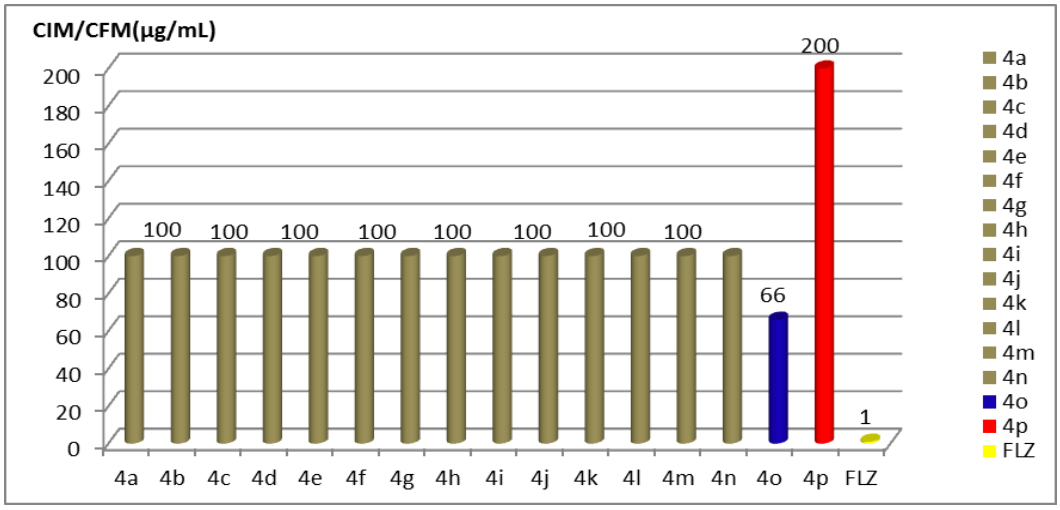


Figura 31. CIM e CFM (*µ*g/mL) das tiazolidinonas **4a-p** contra *C. laurentii*

A emergência de patógenos fúngicos clinicamente importantes, mas menos comuns tem contribuído com as taxas de morbidade e mortalidade observadas nas últimas décadas, principalmente na crescente população de imunocomprometidos. Dentre estes patógenos, estão as leveduras *Trichosporon, Geotrichum, Saccharomyces, Pichia e Rhodotorula*. Fatores relevantes associados com estes fungos incluem-se a resistência aos polienos pelas espécies de *Trichosporon*, e elevados valores de CIM para anfotericina B em espécies de *Rhodotorula* e *Geotrichum.* Os fungos *Trichosporon* e *Geotrichum* também apresentam altos valores de CIM para as equinocandinas. Somando-se a estes fatos, ainda é relatada existência de potência reduzida do fluconazol contra isolados clínicos de *Trichosporon, Geotrichum e Rhodotorula* (THOMPSON et al., 2009).

Assim, de acordo com os resultados encontrados neste estudo, as tiazolidinonas **4a-p** demonstraram moderada atividade contra *T. asahii*, pois os resultados encontrados estão na faixa de CIM e CFM = 50–100 *µ*g/mL (Figura 33). Foram encontradas também substâncias inativas contra esta levedura (**4a**, **4b**, **4j**, **4m** e **4n**) com valores de CIM e CFM acima de 400 *µ*g/mL.

De acordo com dados da literatura, o valor de CIM de 50 *µ*g/mL encontrado com os compostos **4k**, **4l**, **4f**, **4o** e **4p** também se aproximam dos valores encontrados para o fluconazol (0,25 - > 64 *µ*g/mL).

.

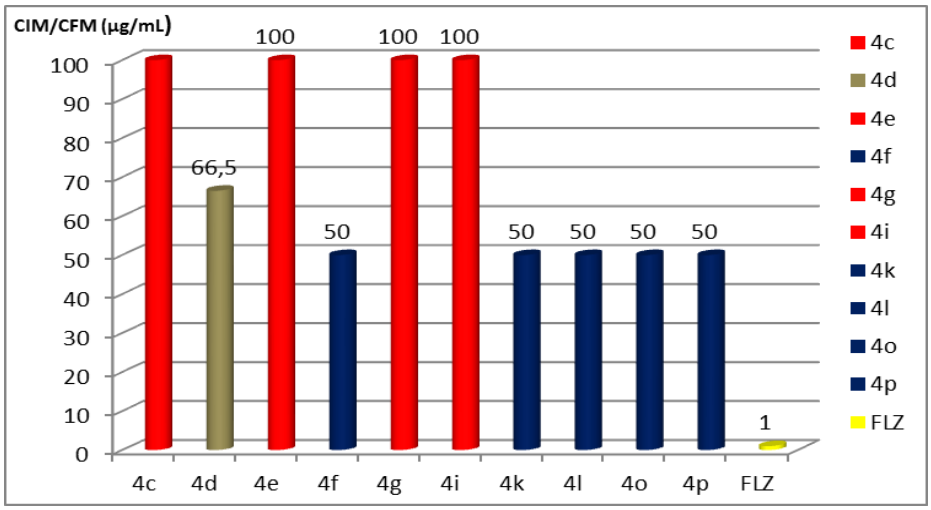


Figura 32. CIM e CFM (*µ*g/mL) das tiazolidinonas **4c-g, 4i, 4k-l, 4o-p** contra *Trichosporon asahii*

Testes de avaliação de *in vitro* para a levedura *Geotrichum capitatum* demonstrou suscetibilidade aos agentes antifúngicos, com valores baixos de CIM para isavuconazol, voriconazol posaconazol, fluconazol, anfotericina B e flucitosina (THOMPSON et al., 2009).

Em comparação com os fármacos já utilizados, as tiazolidinonas apresentaram boa atividade contra *Geotrichum* sp, com faixa de CIM e CFM de 25–100 *µ*g/mL. Contra esta levedura também foram relatados compostos inativos (**4a**, **4b**, **4h**, **4j**, **4m** e **4n**) com valores de CIM e CFM acima de 400 *µ*g/mL. Entretanto, destaca-se a substância **4g** que mostrou o menor valor de CIM e CFM de 25 *µ*g/mL, sendo apenas três vezes menos ativo que o fármaco padrão fluconazol, cujo valor de CIM e CFM encontrado no teste *in vitro* foi de 8 *µ*g/mL (Figura 34).

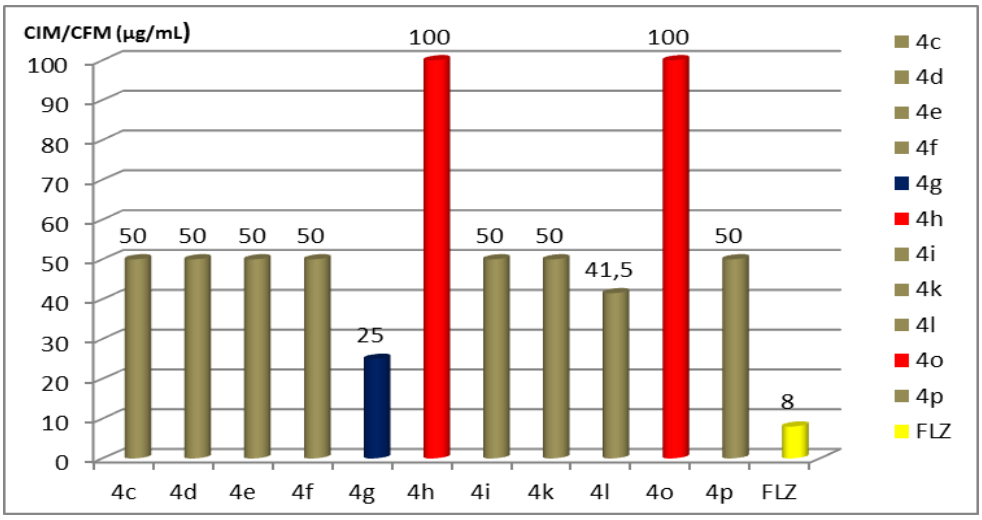


Figura 33. CIM e CFM (*µ*g/mL) das tiazolidinonas **4c-i, 4k-l, 4o-p** contra *Geotrichum* sp

As espécies de *Rhodotorula* ssp parecem ser menos virulentas que as leveduras mais comuns como *Candida* e *Criptococcus neoformans*, mas as infecções por esta levedura tem sido associadas com altas taxa de mortalidade além de poder causar septicemia e outras complicações. Testes de suscetibilidade mostraram valores baixos de CIM para anfotericina B e flucitosina, e ausência de suscetibilidade para fluconazol e caspofungina (DIEKEMA et al., 2005). Já em outro estudo de suscetibilidade *in vitro* aos agentes antifúngicos contra espécies de *Rhodotorula*, foram encontrados valores de CIM na faixa de 0,03- 0,125 *µ*g/mL para isavuconazol, 0,03-0,25 *µ*g/mL para voriconazol, 0.03-1 *µ*g/mL para posaconazol,

0,125-> 64 µg/mL para fluconazol, 0,25-0,5 µg/mL para anfotericina B e 0,125 µg/mL para flucitosina (THOMPSON et al., 2009).

As tiazolidinonas **4a-p** apresentaram os melhores resultados quando testadas contra a levedura *Rhodoturola* sp (Figura 35). Todos os valores de CIM e CFM apresentados foram menores que 37,5 µg/mL, e com exceção da amostra **4f**, quatro tiazolidinonas (**4c**, **4e**, **4g**, **4k**) apresentaram aproximadamente o mesmo valor de CIM que o fármaco padrão utilizado fluconazol (CIM = 26,5 µg/mL). Além disso, as substâncias **4h** e **4l** apresentaram os melhores valores de CIM e CFM de 16,5 µg/mL, caracterizando-se como 1.6 vezes mais ativos que o fluconazol.

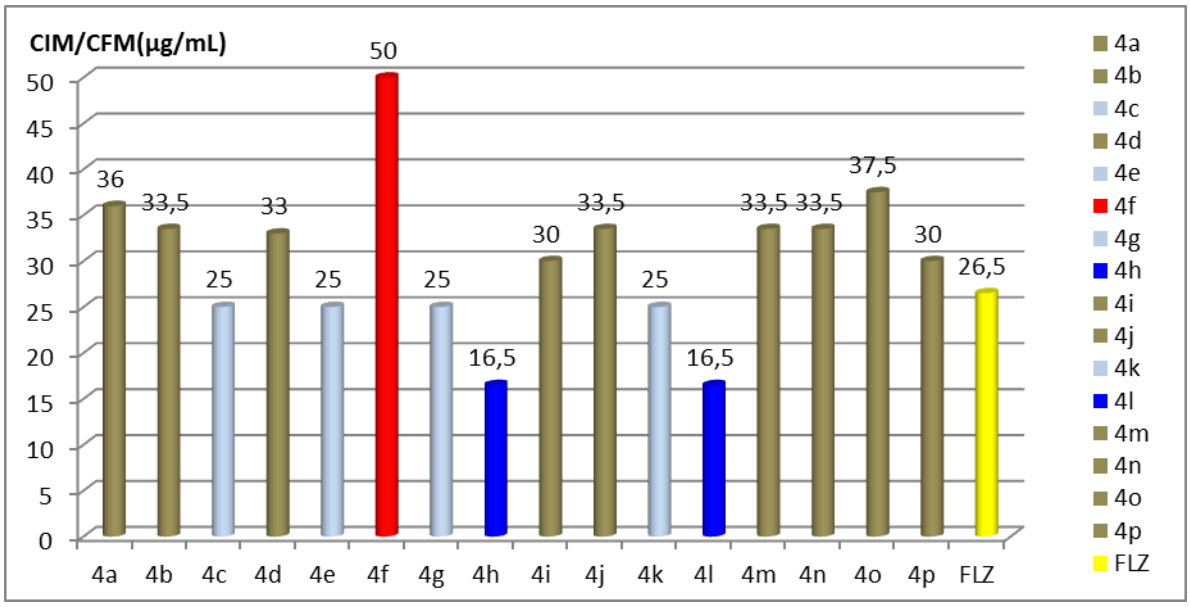


Figura 34. CIM e CFM (µg/mL) das tiazolidinonas **4a-p** contra *Rhotodorula* sp.

Estudos desenvolvidos por outros autores trazem valores de CIM para tiazolidinonas na faixa de 4,68->1000 µg/mL, e alguns destes trazem a análise da relação estrutura-atividade. Patel e cols (2012) testaram tiazolidinonas contra algumas espécies de fungos filamentosos e contra *C. albicans* e encontraram CIM = 12,5–100 µg/mL para a levedura. Shingade & Bari (2012) realizaram avaliação da ação antifúngica de tiazolidinonas contra vários fungos, incluindo *C. albicans*. Para esta levedura os valores de CIM encontrados foram na faixa de 9,37–300 µg/mL. Em outro trabalho, as tiazolidinonas foram testadas contra cinco fungos, incluindo *C. albicans* e *C. parapsilosis*, e para estas leveduras os valores de CIM encontrados foram de > 50 µg/mL. O estudo relação estrutura- atividade revelou que o perfil de

atividade antifúngica destas substâncias parece estar relacionado com o substituinte da posição 3 do anel da tiazolidinona. Ravichadran e cols (2011) testaram tiazolidinonas contra a levedura *C. albicans*, obtendo valor de CIM = 17-75 μg/mL. No estudo relação-estrutura atividade os resultados demonstram que grupos arila ou heterociclos como substituintes nas posições 2 e 3 tendem a aumentar a ação antifúngica. Desta forma, comparativamente, as tiazolidinonas sintetizadas no trabalho proposto tiveram ação semelhante às demais relatadas na literatura, embora frente aos resultados obtidos não tenha sido possível determinar a sua relação- estrutura atividade. É importante mencionar também que não foi possível identificar através de dados da literatura o mecanismo de ação das tiazolidinonas contra fungos.

4.5. Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados pelo Laboratório de Virologia e Imunologia, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. A técnica utilizada foi a vermelho neutro, e as substâncias foram submetidas à avaliação citotóxica contra células da linhagem Vero (rins de macaco). Os resultados obtidos em relação à toxicidade dos compostos estão representados na Tabela 6.

Os resultados da avaliação de viabilidade celular indicaram que a toxicidade das tiazolidinonas foi observada na concentração acima de 98 μg/mL. Entretanto, os compostos **4a**, **4m** e **4p** reduziram acima de 16% das células a 98 μg/mL, e, portanto, foram consideradas tóxicas. O composto **4f** foi especialmente tóxico quando comparado com as outras substâncias, pois se observou 90% de viabilidade celular na menor concentração analisada (12,3 μg/mL). As tiazolidinonas **4g** e **4j** apresentaram as menores toxicidades, não sendo tóxicas nas concentrações de 787 μg/mL e 394 μg/mL, respectivamente (Figura 35).

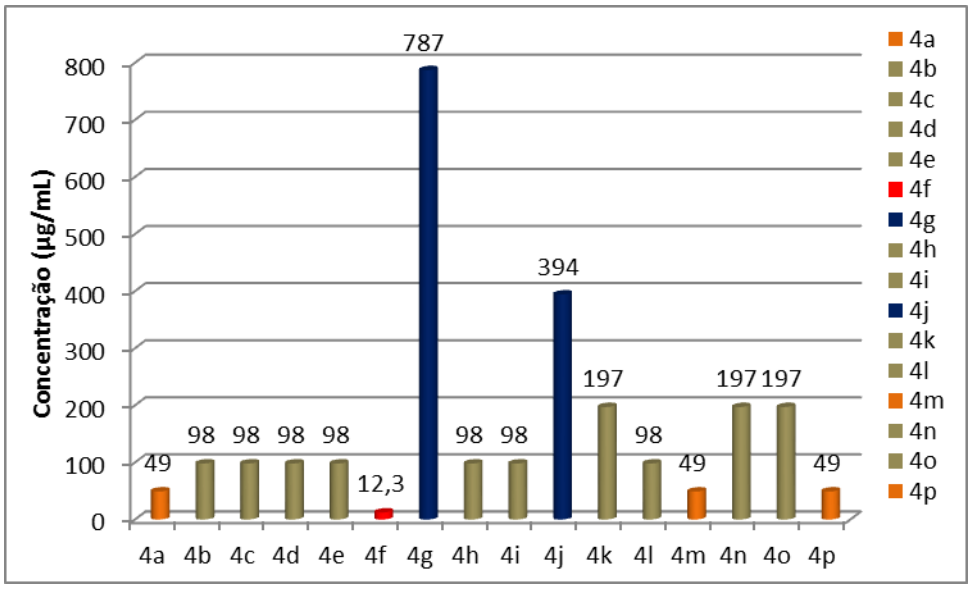


Figura 35: Concentração das tiazolidinonas **4a-p** necessária para reduzir 0-15% das células.

De acordo com a avaliação antifúngica, todos os compostos apresentaram certa atividade contra os fungos, com destaque para os compostos **4h** e **4l** com valores de CIM de 16,5 μg/mL contra a levedura *Rhodotorula* sp. No entanto, a avaliação citotóxica destes compostos revelou que na concentração de até 98 μg/mL estas substâncias apresentavam toxicidade às células. Unindo estas duas informações, pode-se obter um fator semelhante ao índice de seletividade, o qual demonstra a relação entre a concentração terapêutica, ou seja, a concentração necessária para se obter o efeito antifúngico, e a concentração tóxica. O valor obtido para este índice para as tiazolidinonas **4h** e **4l** foi de 6 (98/16,5 = 6), ou seja, a concentração antifúngica é muito próxima da concentração tóxica.

Outra substância que se destacou na avaliação antifúngica foi a tiazolidinona **4g**, com valor de CIM de 25 μg/mL contra as leveduras *Rhodotorula* sp., *Geotrichum* sp. e *C. guilliermondii.* A avaliação citotóxica demonstrou ser necessária uma concentração de 787 μg/mL para reduzir 0-15% da viabilidade celular. Assim, o fator seletivo para este composto foi de 31,5 (787/25 = 31,5), demonstrando uma concentração terapêutica segura, visto a alta concentração necessária para apresentar citotoxicidade.

Desta forma, frente aos dados da avaliação antifúngica e citotóxica, observa-se uma grande relevância do composto **4g**, destacando também a importância da realização de testes citotóxicos em compostos com potenciais atividades biológicas.

Tabela 6: Atividade citotóxica das tiazolidinonas contra a linhagem celular Vero, de rins de macaco, expresso como % de viabilidade celular.

	R	Viabilidade celular %								
		3150 μg/mL	**1575** μg/mL	**787** μg/mL	**394** μg/mL	**197** μg/mL	**98** μg/mL	**49** μg/mL	**25** μg/mL	**12,3** μg/mL
4a	2-F	10	10	10	45	65	82	95	100	100
4b	3-F	13	17	27	60	84	92	97	100	100
4c	4-F	11	14	17	52	73	87	100	100	100
4d	2-Cl	22	16	38	31	71	94	100	100	100
4e	3-Cl	15	20	31	45	77	100	100	100	100
4f	4-Cl	11	13	15	28	68	74	84	84	90
4g	2-NO_2	30	24	100	100	100	100	100	100	100
4h	3-NO_2	2	7	15	60	75	94	100	100	100
4i	4-NO_2	10	15	21	66	72	87	100	100	100
4j	3-OH	11	13	60	100	100	100	100	100	100
4k	4-OH	10	12	57	76	87	94	96	100	100
4l	2-OMe	5	17	30	67	72	100	100	100	100
4m	3-OMe	6	11	19	57	66	84	90	97	100
4n	4-OMe	11	11	33	73	87	89	100	100	100
4o	4-Me	12	13	17	51	85	100	100	100	100
4p	2,6-Cl	7	10	11	32	75	76	100	100	100

CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos deste trabalho, e frente aos resultados, pode-se verificar que:

- Foram sintetizadas 16 novas tiazolidinonas **4a-p** derivadas da 2-aminoetilpiperidina, com rendimentos de 53 - 95% e alto grau de pureza, sendo a identificação e caracterização de todos os novos compostos realizada por meio das análises de CG-MS e RMN de ^{1}H e ^{13}C;

- Os melhores resultados antifúngicos foram obtidos quando as tiazolidinonas **4a-p** foram testadas contra a levedura *Rhodotorula* sp. Destaque para as substâncias **4h** e **4l** que apresentaram valores de CIM (16,5 μg/mL) inferiores ao CIM do fluconazol, portanto mais potentes que o fármaco padrão;

- A maioria das tiazolidinonas não mostrou citotoxicidade na concentração de 98 μg/mL. Os melhores resultados foram obtidos para a molécula **4g** (787 μg/mL) e **4j** (394 μg/mL);

- A substância mais promissora foi a tiazolidinona **4g** que além de apresentar bons valores de CIM e CFM (25 μg/mL) contra os fungos *Rhodotorula* sp., *Geotrichum* sp. e *C. guilliermondii* a menor citotoxicidade (787 μg/mL);

- A avaliação antifúngica das tiazolidinonas **4a-p** reforçam que este núcleo possui atividade antimicrobiana. A diferença de resultados entre as substâncias consiste nos variados substituintes ligados ao anel da tiazolidinona. Os trabalhos envolvendo estes compostos publicados nos últimos anos trazem valores de CIM na faixa de 4,68 - >1000 μg/mL, ressaltando o fato de que as substâncias sintetizadas neste trabalho apresentaram boa atividade antifúngica;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, A.P.N.; MENDES, J.F.; FELICIO, A.P.; COIMBRA, M.A.A.; LEITE, A.M.; MINELLO, L.F.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A. Microbiota fúngica de felídeos silvestres hígidos encaminhados a centros de triagem no Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. **MEDVEP - Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.9, p.1-6, 2011.

ALBANO, A.P.N.; NASCENTE, P.S.; LEITE, A.M.; XAVIER, M.O.; SANTIN, R.; MATTEI, A.S.; HUMBERG, R.M.P.; COIMBRA, M.A.A.; MINELLO, L.F.; MEIRELES, M.C.A. Dermatofitosis in wild felids from screening centers. **Brazilian Journal of Microbiology** *In press*, 2012.

B'BHATT, H.; SHARMA, S. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Novel 2-(4-Chlorophenylimino thiazolidin-4-one Derivatives. **Journal of the Korean Chemical Society**, v.56, nº 3, p. 341 – 347, 2012.

BOLOGNESE, A.; CORREALE, G,; MANFRA, M.; LAVECCHIA, A.; NOVELLINOB, E.; BARONEC, V. Thiazolidin-4-one formation: Mechanistic and synthetic aspects of the reaction of imines and mercaptoacetic acid under microwave and conventional heating. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, p. 2809- 2813, 2004.

CHEN, H.; GUO, Z.; YIN, Q.; DUAN, X.; GU, Y.; LI, X. Design, synthesis and HIV-RT inhibitory activity of novel thiazolidin-4-one derivatives. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v.5, p.231–237, 2011.

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.

a) CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; VELLASCO, W. T. Jr. Chemistry and Biological Activities of 1,3-Thiazolidin-4-ones. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.5, p. 336- 344, 2008.

b) CUNICO, W. VELLASCO, W.T. Jr.; MORETH, M.; GOMES, C.R.B. Microwave-assisted synthesis of 1,3-thiazolidin-4-ones and 2-aryl-1,3-oxathiolan-5-ones. **Letters in Organic Chemistry**, v.5, p. 349-352, 2008.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUE´R, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A. da; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, nº 8, p. 2816–2823, 2006.

DEEP, A.; JAIN, S.; SHARMA, P.C.; PHOGAT, P.; MALHOTRA, M. Synthesis of 2-(aryl)-5-(arylidene)-4-thiazolidinone derivatives with potential analgesic and anti-inflammatory activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 1652–1659, 2012.

DIEKEMA, D.J.; PETROELJE, B.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A. Activities of Available and Investigational Antifungal Agents against *Rhodotorula* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, nº1, p. 476–478, 2005.

GOUVÊA, D.P.; BAREÑO, V.D.O.; BOSENBECKER, J.; DRAWANZ, B.B.; NEUENFELDT, P.D.; SIQUEIRA, G.M.; CUNICO, W. Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolilamine. **Ultrasononic Sonochemitry**, In Press: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.03.004.

HOLMES, C.P.; CHINN, J.P.; LOOK, G.C.; GORDON, E.M.; GALLOP, M.A. Strategies for Combinatorial Organic Synthesis: Solution and Polymer-Supported Synthesis of 4-Thiazolidinones and 4-Metathiazanones Derived from Amino Acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, p. 7328-7333, 1995.

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.

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, p. 5678 – 5698, 2012.

KUMAR, S.; KUMAR, N.; DRABU, S.. Synthesis & Biological Evaluation of 2-Amino-3-chloroquinoxaline based Azetidinones & Thiazolidinones as Antibacterial & Antifungal Agents. **Chemistry & Biology Interface**,v.1, nº 2, 228-241, 2011.

KRONSTAD, J.; SAIKIA, S.; NIELSON, E.D.; KRETSCHMER, M.; JUNG, W.; HU, G.; GEDDES, J.M.H.; GRIFFITHS, E.J.; CHOI, J.; CADIEUX, B.; CAZA, M.; ATTARIANA, R. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to Mammalian Hosts: Integrated Regulation of Metabolism and Virulence. **Eukaryotic Cell**, v.11, nº 2, p.109-118, 2012.

LEMOS, J.A.; COSTA, C.R.; ARAÚJO, C.R.; SOUZA, L.K.H.; SILVA, M.R.R. Susceptibility Testing of Candida albicans Isolated from Oropharyngeal Mucosa of HIV+ Patients to Fluconazole, Amphotericin B and Caspofungin Killing Kinetics of Caspofungin and Amphotericin B against Fluconazole Resistant and Susceptible Isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 163-169, 2009.

LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia médica e Imunologia**. Trad. José Procópio M. Senna. 7ª ed. Porto alegre: Artmed, 2005.

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.

MAYR, A.; AIGNER, M.; LASS-FLÖRL, C.. Caspofungin: when and how? The microbiologist's view. **Mycoses**, v. 55, p. 27–35, 2011.

MICELI, M.H.; DÍAZ, J.A.; LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infectious Disease**, v.11, p.142–51, 2011.

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**, In Press: DOI 10.1007/s00044-012-0060-8.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAl, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. Trad. Claudia Adelino Espanha [et al.]. 5ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

a) NEUENFELDT, P.D.; DRAWANZ, B.B.; AGUIAR, A.C.C.; FIGUEIREDO F. Jr.; KRETTLI, A.U.; CUNICO, W. Multicomponent synthesis of new primaquine thiazolidinone derivatives, **Synthesis**, p. 3866-3870, 2011.

b) NEUENFELDT, P.D.; DUVAL, A.R.; DRAWANZ, B.B.; ROSALES, P.F.; GOMES, C.R.B.; PEREIRA, C.M.P.; CUNICO, W. Efficient sonochemical synthesis of thiazolidinones from piperonilamine, **Ultrasononics Sonochemistry**, v.18, p. 65-67, 2011.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBON, A.M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v.51, p. 561–570, 2010.

NUCCI, M.; MARR, K.A. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Disease**, v.41, p. 521–526, 2005.

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**, In Press: DOI 10.1007/s00044-011-9822-y.

(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.

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4ª ed. New York: Oxford University Press Inc, 2009.

PRAKASH, O.; ANEJA, D.K.; ARORA, S.; SHARMA, C.; ANEJA, K.R. Synthesis and antimicrobial activities of some new 5-((3-(aryl)-1- phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)-3-phenylthiazolidine-2,4-diones. **Medicinal Chemistry Research**, v. 2, p. 10–15, 2012.

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.

RAMALINGAN, C.; PARK, Y.T.; KABILAN, S. Synthesis, stereochemistry, and antimicrobial evaluation of substituted piperidin-4-one oxime ethers. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p.683-696, 2006.

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.

RUIZ, F.A.R.; GARCÍA-SÁNCHEZ, R.N.; ESTUPIÑAN, S.V.; GÓMEZ-BARRIO, A.; AMADO, D.F.T.; PÉREZ-SOLÓRZANO, B.M.; NOGAL-RUIZ, J.J.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; KOUZNETSOV, V.V. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4562-4573, 2011.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P.A.; MENDRICK, C.A.; NORRIS, C.C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T.A.; MCNICHOLAS, P.M. In Vitro Activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a Large Collection of Clinically Important Molds and Yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, nº 6, p. 2009–2015, 2006.

SAUNDANE, A.R.; YARLAKATTI, M.; WALMIK, P.; KATKARF, V. Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of thiazolidinone, azetidinone encompassing indolylthienopyrimidines. **Journal of Chemical Sciences,** v.124, p. 469–481, 2012.

SCHAECHTER, Moselio; ENGLEBERG, N. Cary; EISENSTEIN, Barry I.; MEDOFF, Gerald. **Microbiologia**: Mecanismos das Doenças Infecciosas. Trad. Patricia Lydie Voeux, Patricia Sá de Paula Machado. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SHALINI, K.; KUMAR, N.; DRABU, S.; SHARMA, P.K. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles, Beilstein. **Journal of Organic Chemistry**, v. 7, p. 668-677, 2011.

SHINGADE, S.G.; BARI, S.B. Synthesis and antimicrobial screening of 4-thiazolidinone and 2-azetidinone derivatives of piperazine. **Medicinal Chemistry Research**, In press: DOI 10.1007/s00044-012-0063-5.

SHINGADE, S.G.; BARI, S.B.; WAGHMARE, U.B. Synthesis and antimicrobial activity of 5-chloroindoline-2,3-dione derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p.1302–1312, 2012.

SHRIVASTAVA, S.P.; SEELAM, N.; RAI, R. Synthesis and Antimicrobial Activity of New Thiazolidinone Derivatives With the use of γ-Ferrite Catalyst. **E-Journal of Chemistry**, v. 9, nº 2, p. 825-831, 2012.

SIWEK, A.; STEFANSKA, J. Antimicrobial activity and SAR study of some novel thiosemicarbazide derivatives bearing piperidine moiety. **Medicinal Chemistry**, v.7, p. 690-696, 2011.

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.

SRIVASTAVA, T.; HAQ, W.; KATTI, S.B. Carbodiimide mediated synthesis of 4-thiazolidinones by one-pot three-component condensation. **Tetrahedron,** v. 58, p. 7619–7624, 2002.

TALAVIYA, S.; MAJMUDAR, F. Recent developments in antifungal agents, International **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** (Int J Pharm Pharm Sci,) v.4, p. 4-10, 2012.

THOMPSON, G.R.; WIEDERHOLD, N.P.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.; PATTERSON, T.F. *In vitro* activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Pichia* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v.64, p.79–83, 2009.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. – emerging pathogens? **Mycoses**, v. 55, p. 24–32, 2012.

UMAMATHESWARI, S.; BALAJI, B.; RAMANATHAN, M.; KABILAN, S. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of novel piperidin-4-yl-5-spiro-thiadiazoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**., v.20, p. 6909-6914, 2010.

ZAAS, A.K.; BOYCE, M.; SCHELL, W.; LODGE, B.A.; MILLER, J.L.; PERFECT, J.R. Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility Testing of *Rhodotorula* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, nº 11, p. 5233–5235, 2003.

WANG, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, G.; LV, Y.; ZHANG, N.; GONG, P. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent. **European Journal of Medicinal Chemistry**., v. 46, p. 3509–3518, 2011.

.

ANEXO I – Espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C.

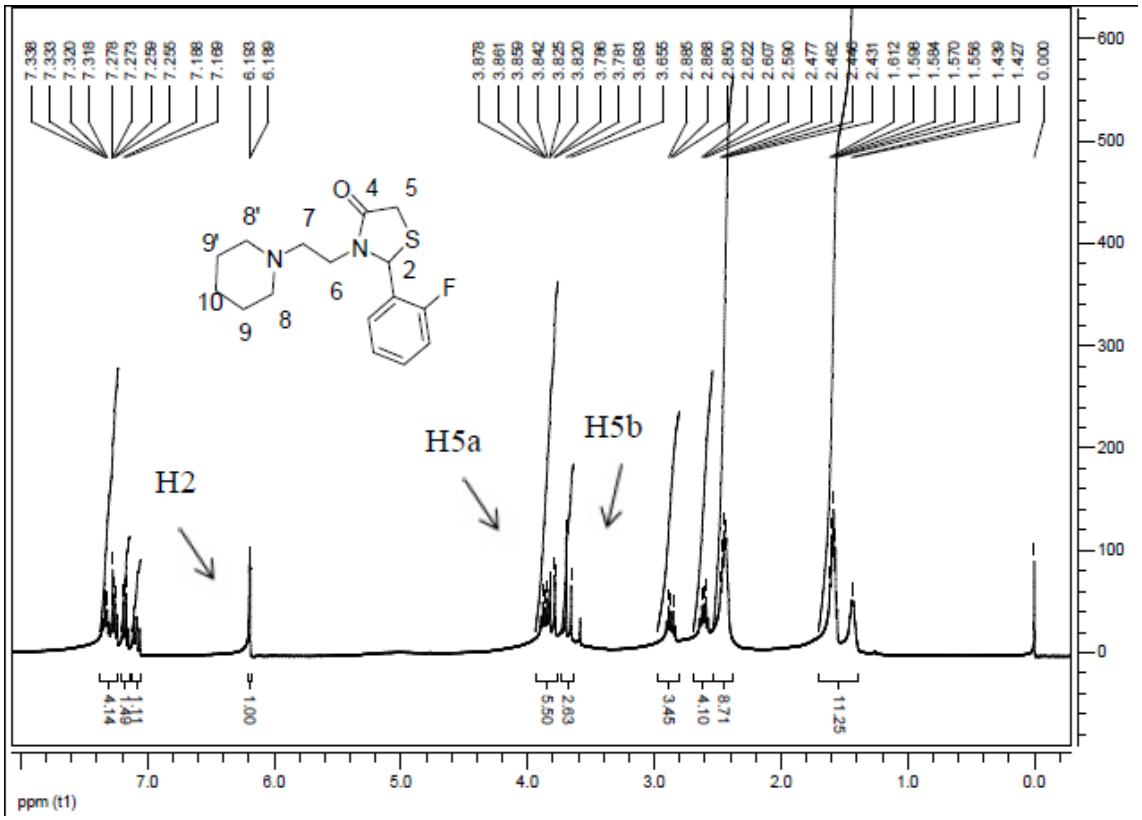


Figura 36. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(2-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4a** em $CDCl_3$.

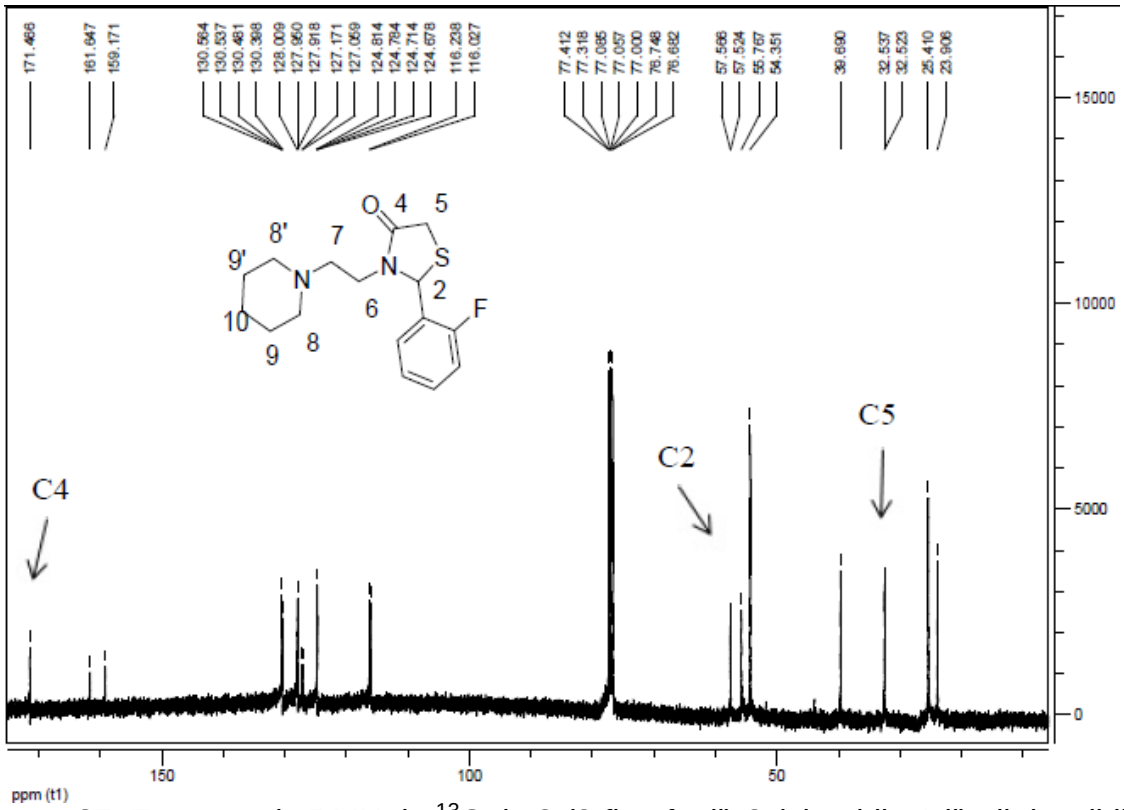


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(2-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4a** em $CDCl_3$.

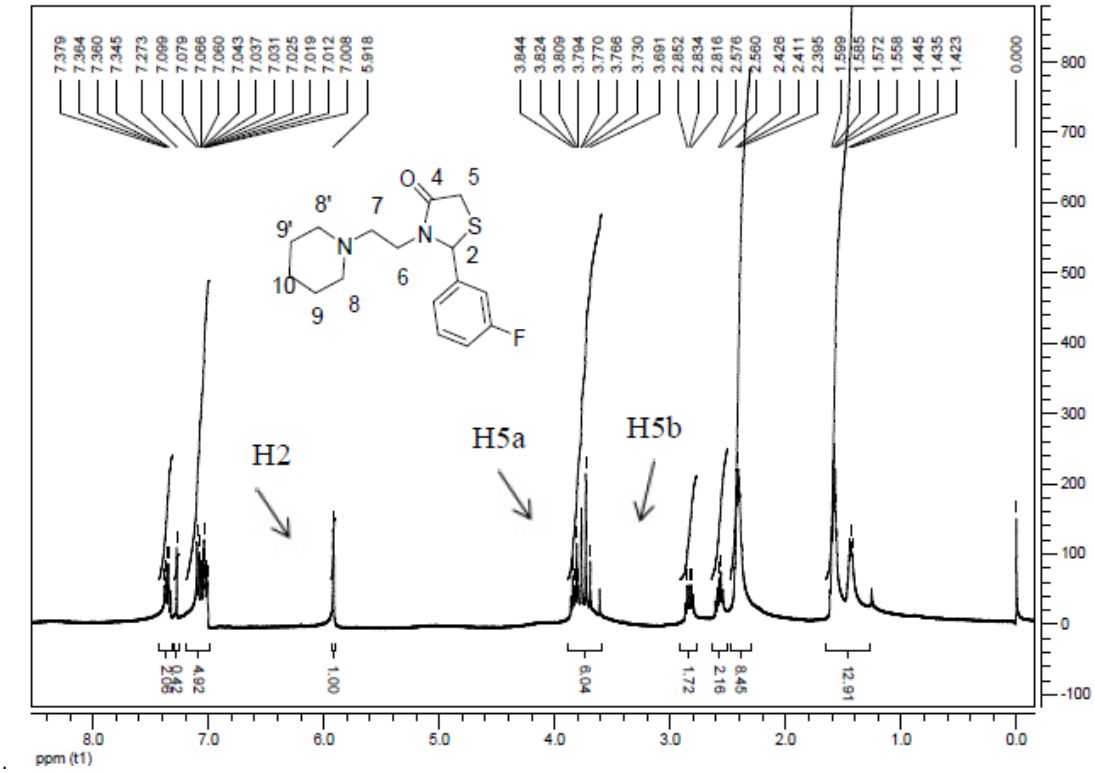


Figura 38. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(3-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4b** em $CDCl_3$.

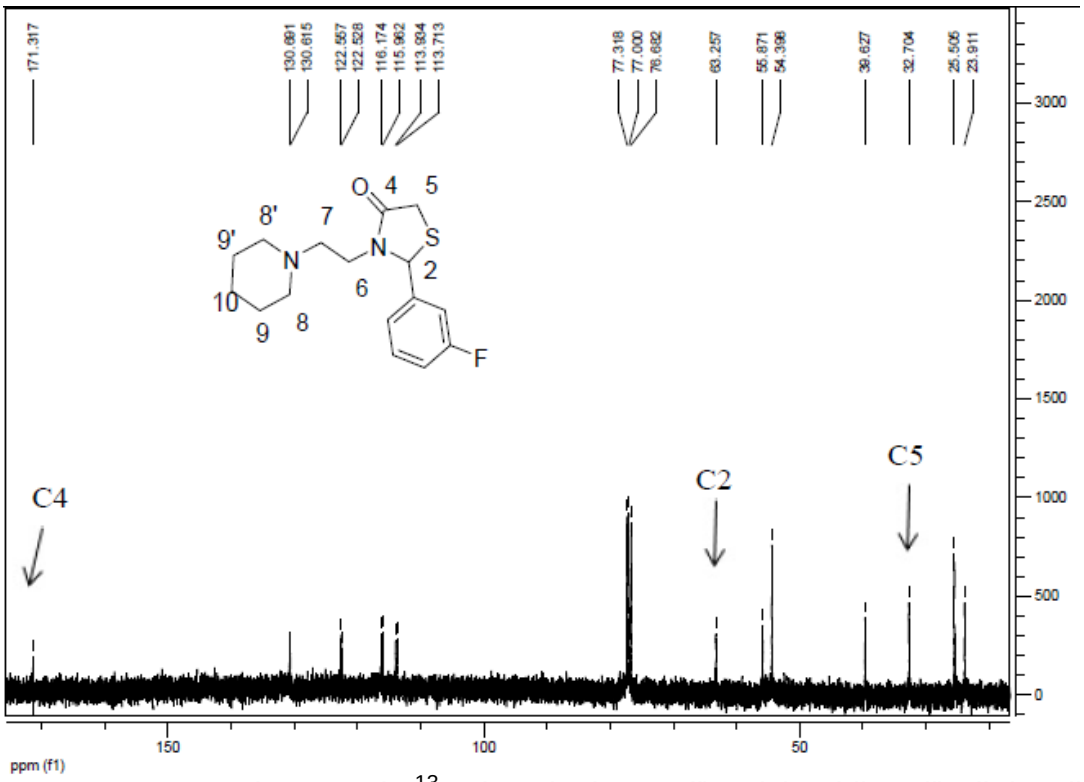


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(3-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4b** em $CDCl_3$.

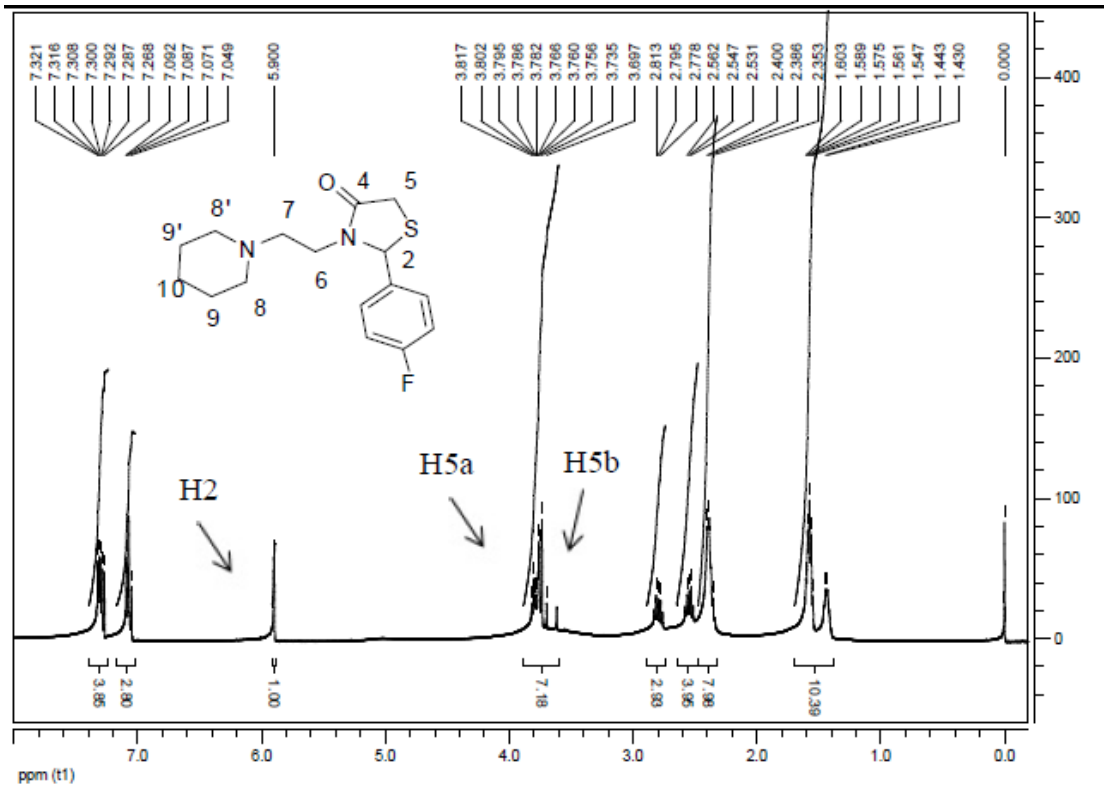


Figura 40. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(4-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4c** em $CDCl_3$.

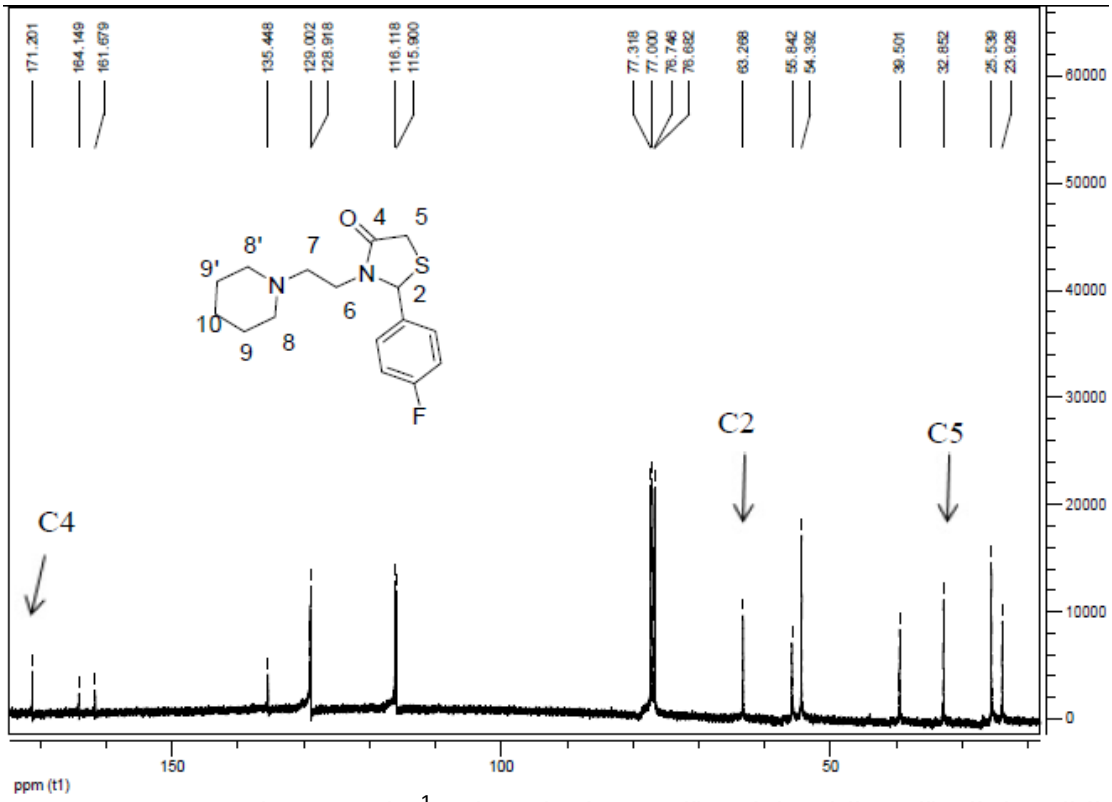


Figura 41. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(4-fluorfenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4c** em $CDCl_3$.

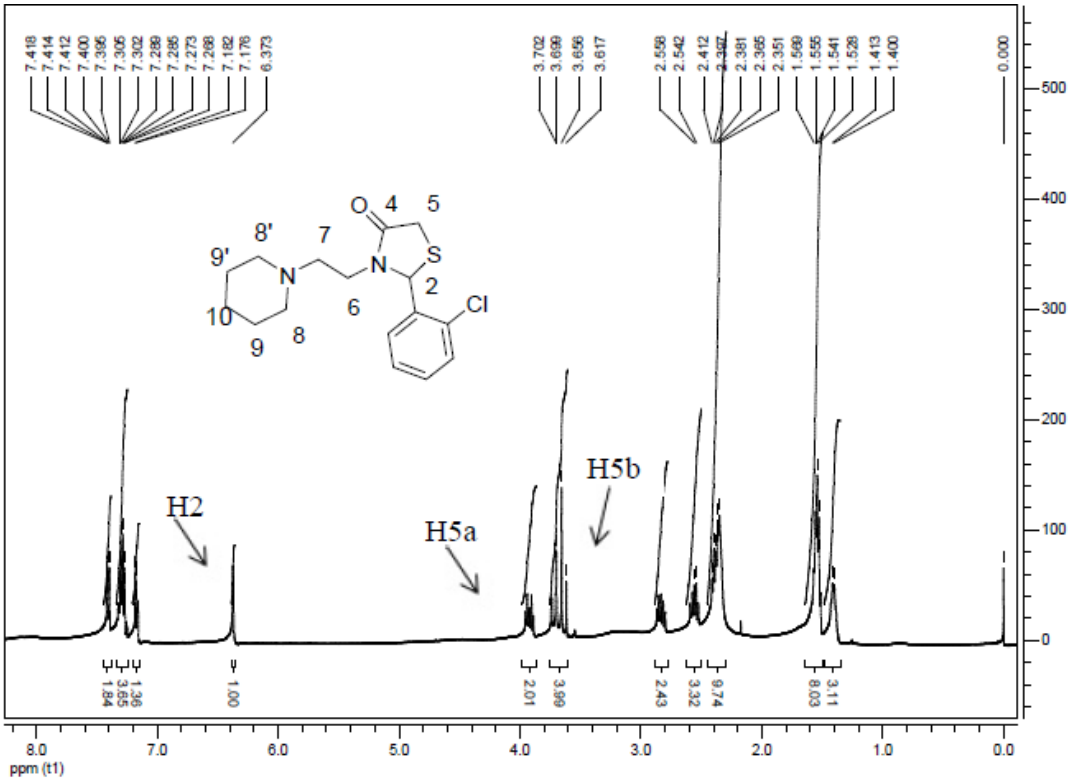


Figura 42. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(2-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4d** em $CDCl_3$.

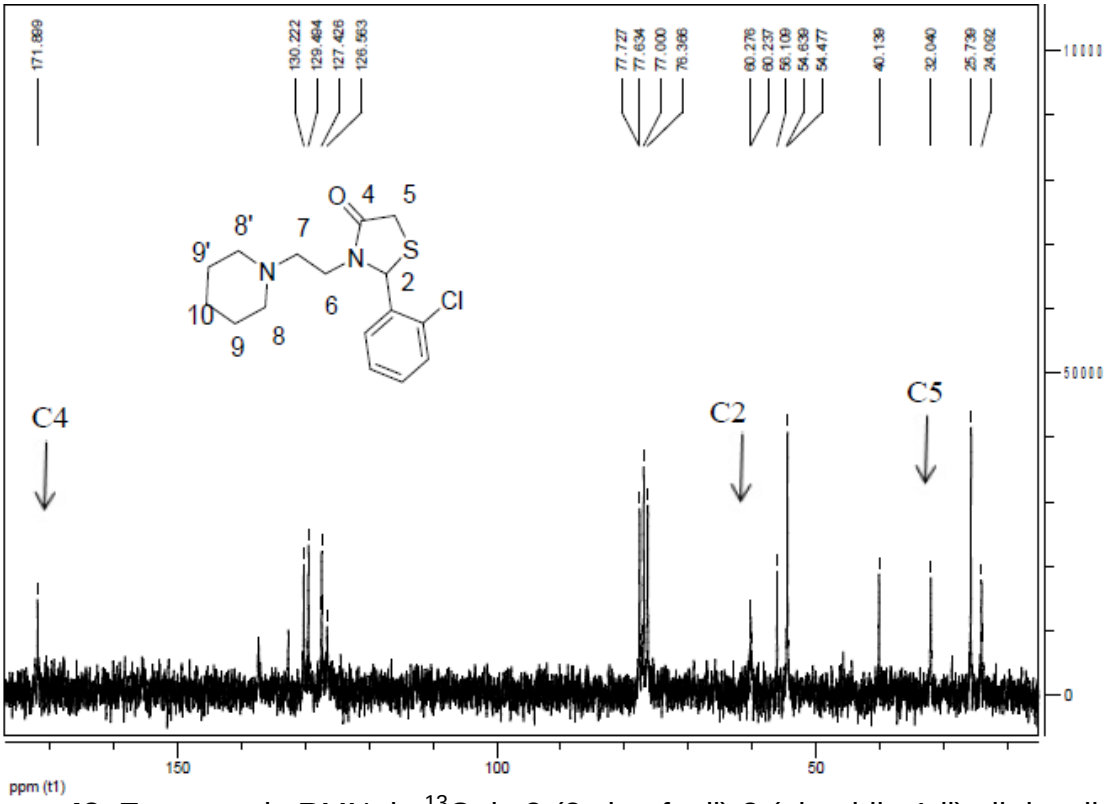


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(2-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4d** em $CDCl_3$.

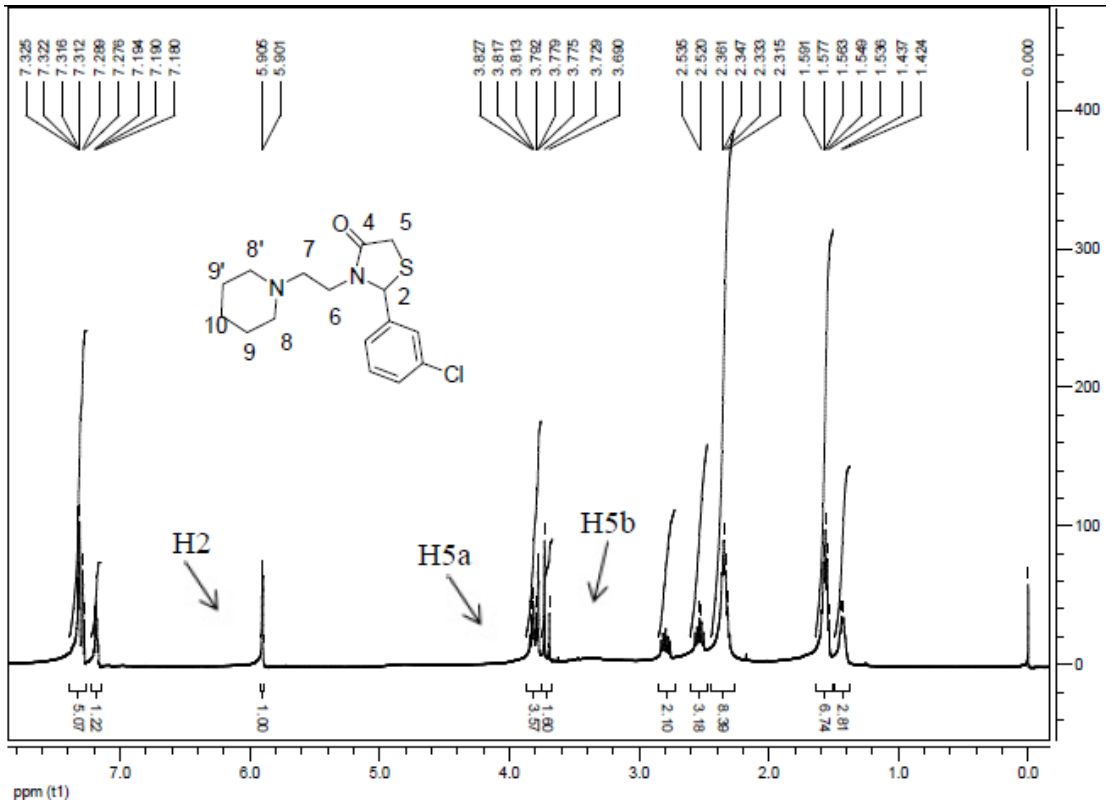


Figura 44. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(3-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4e** em $CDCl_3$.

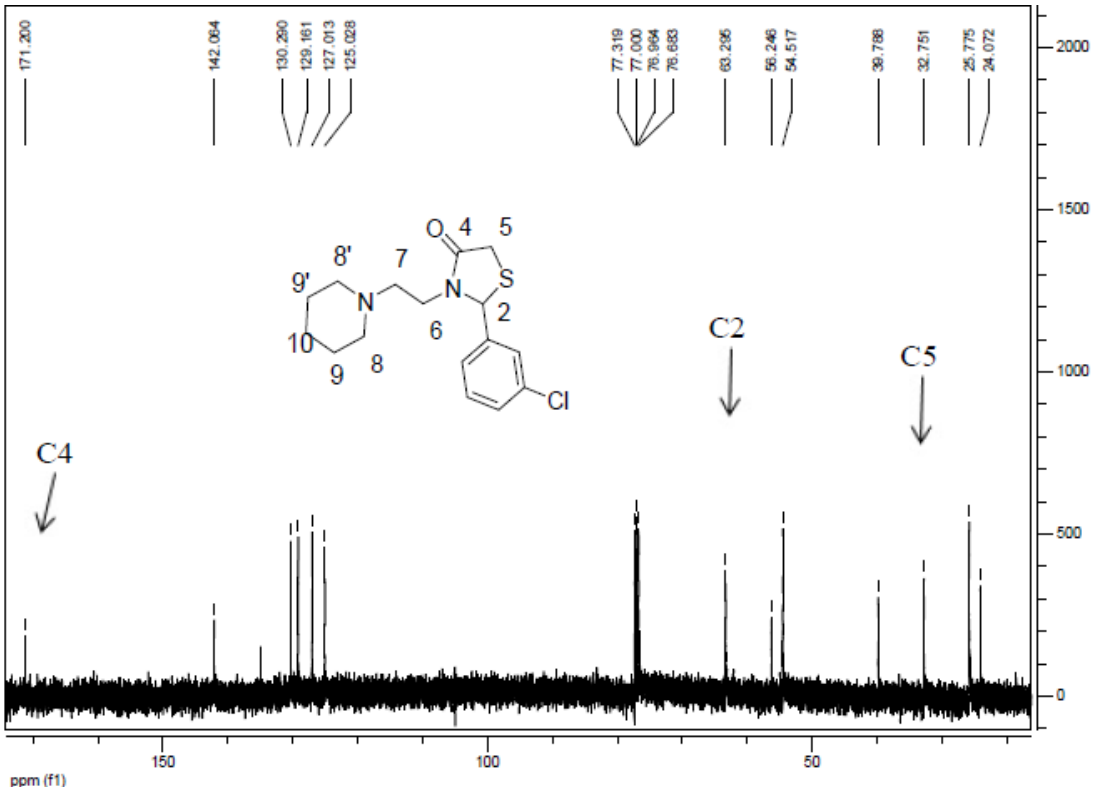


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(3-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4e** em $CDCl_3$.

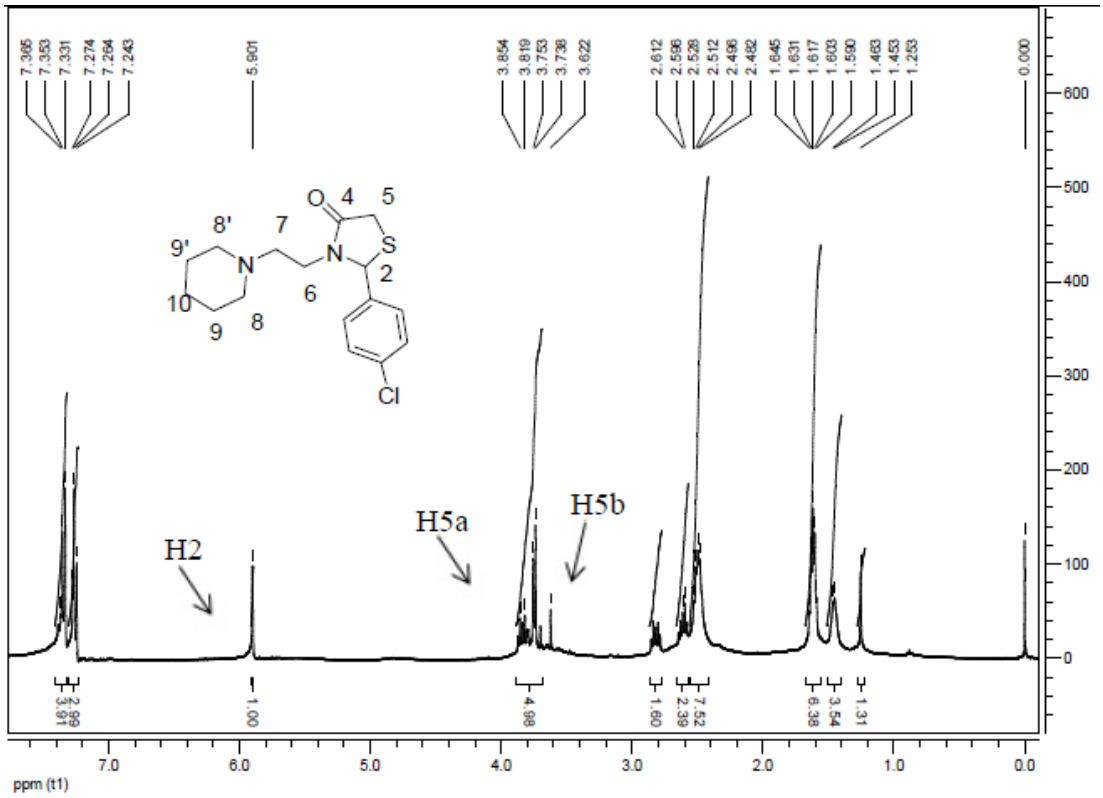


Figura 46. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(4-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4f** em $CDCl_3$.

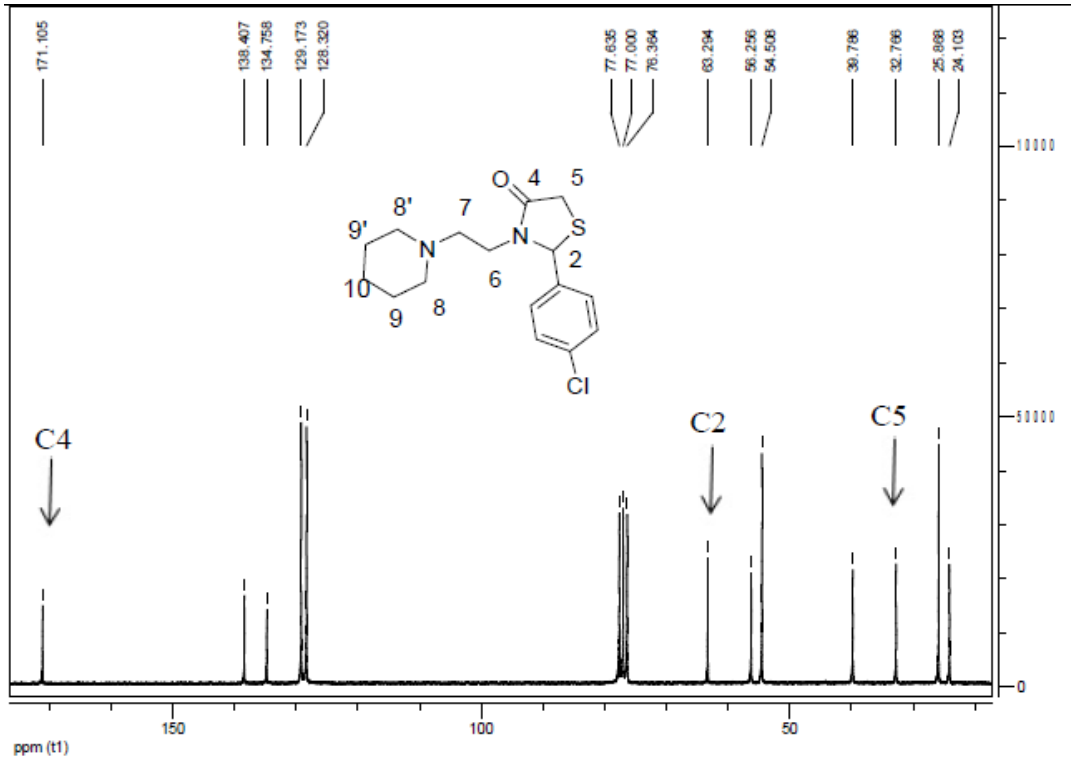


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(4-clorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4f** em $CDCl_3$.

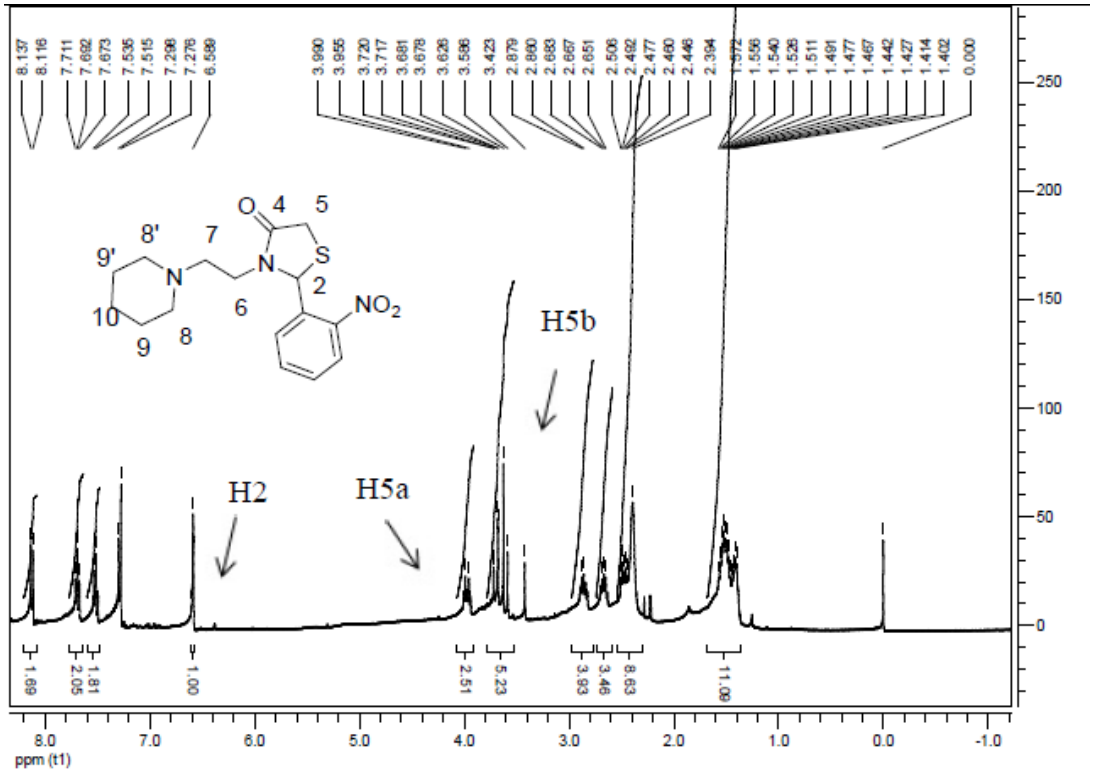


Figura 48. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(2- nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4g** em $CDCl_3$.

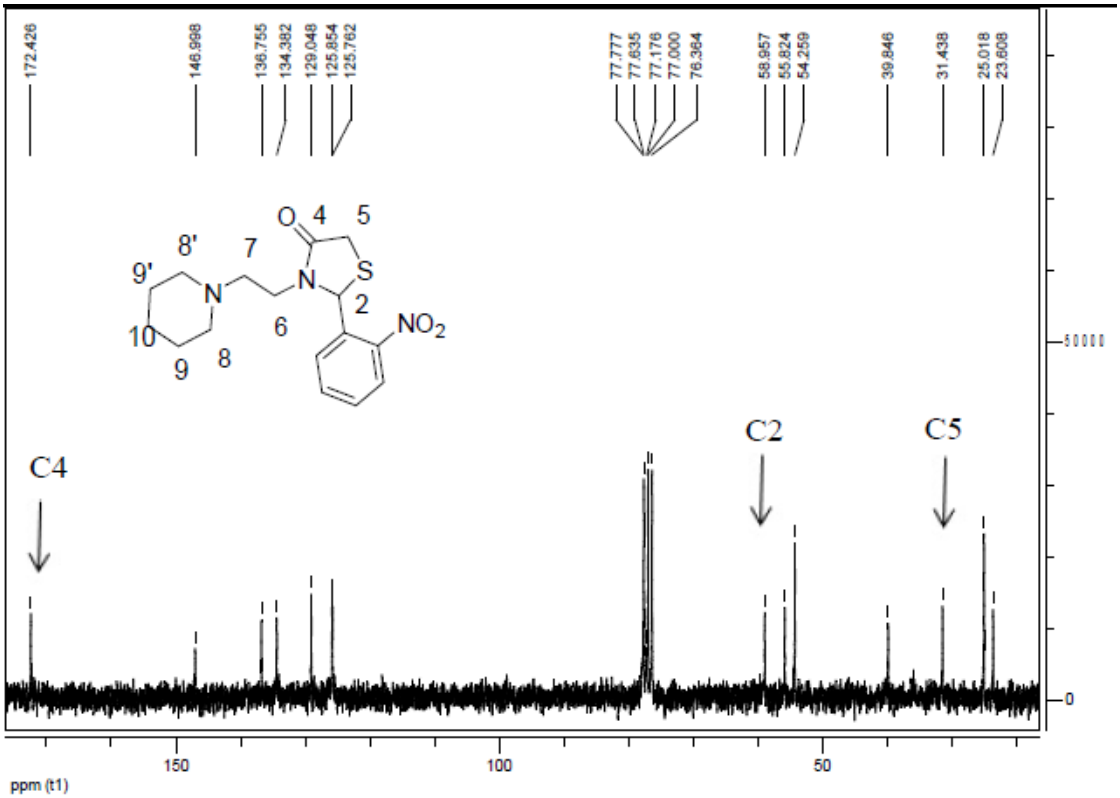


Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(2- nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4g** em $CDCl_3$.

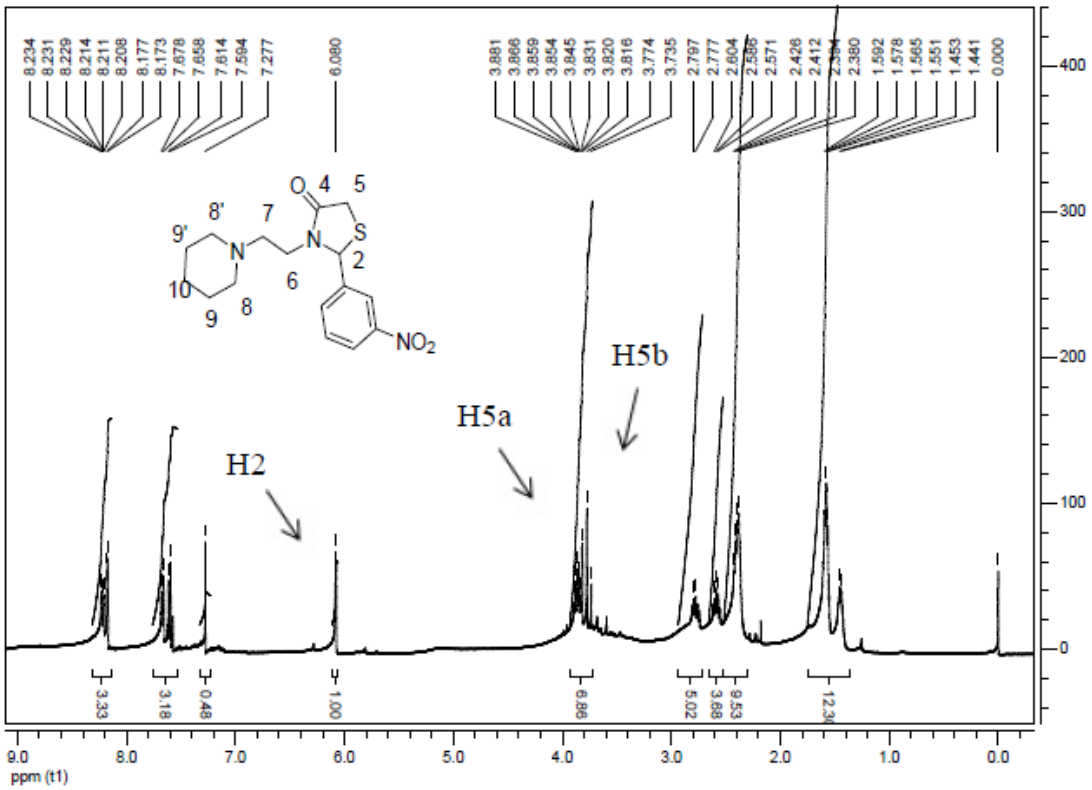


Figura 50. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(3-nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4h** em $CDCl_3$.

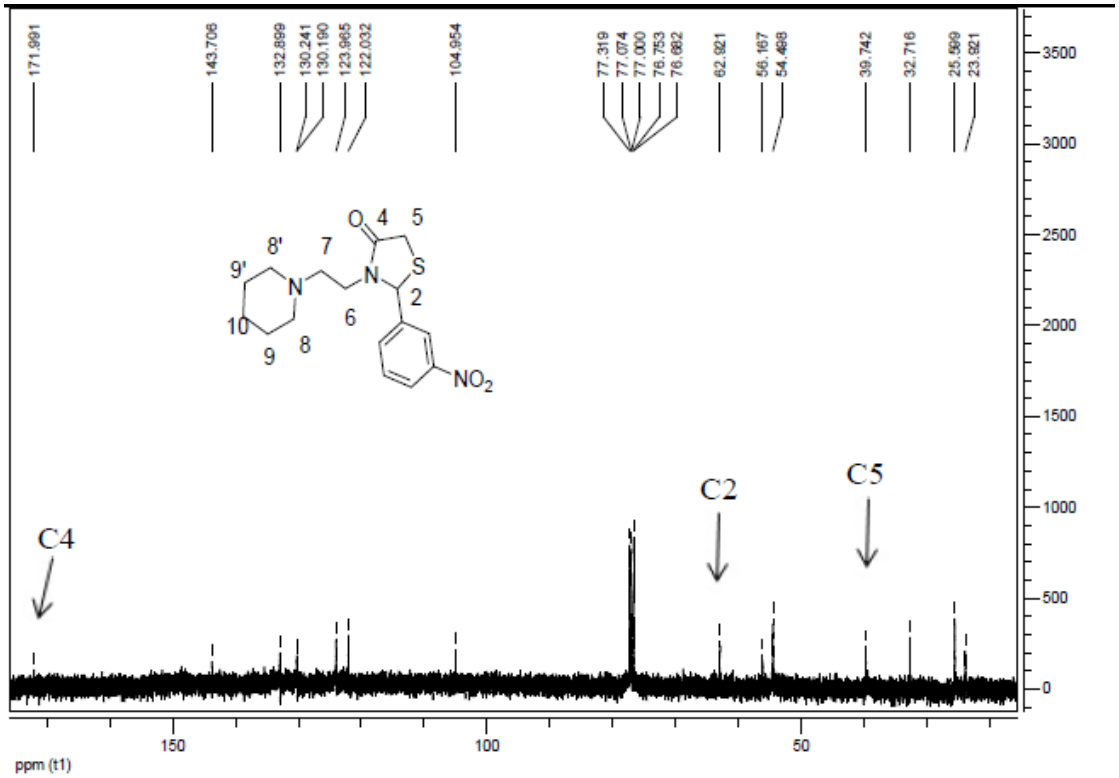


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(3-nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4h** em $CDCl_3$.

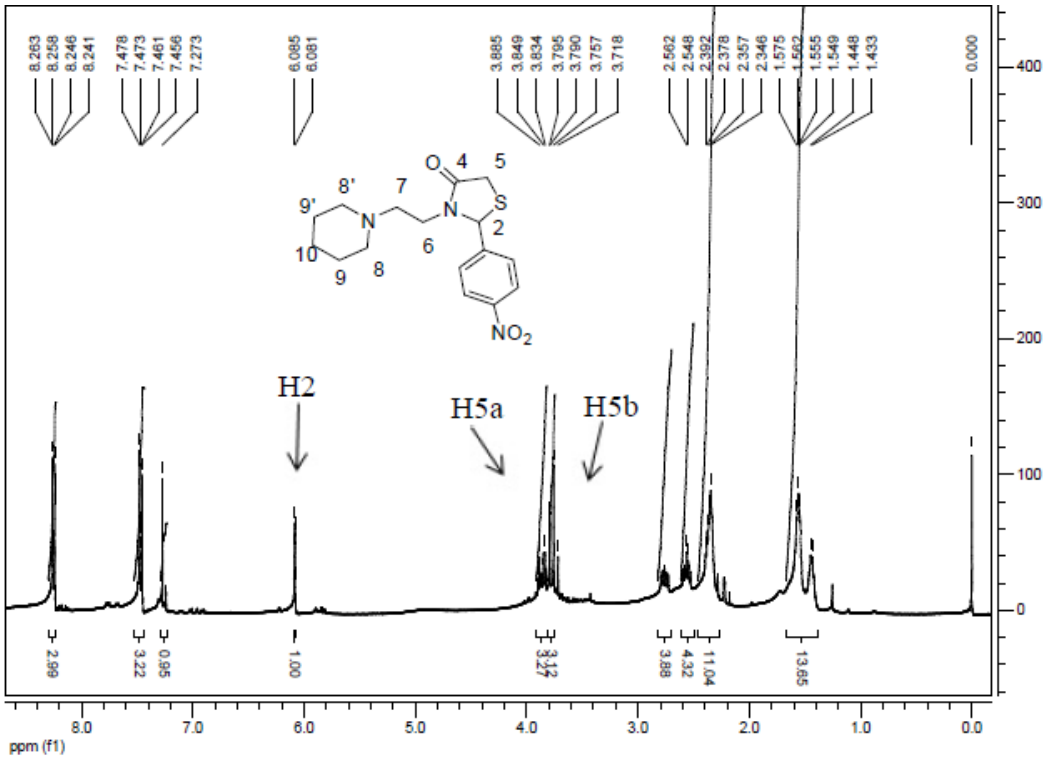


Figura 52. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(4- nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4i** em $CDCl_3$.

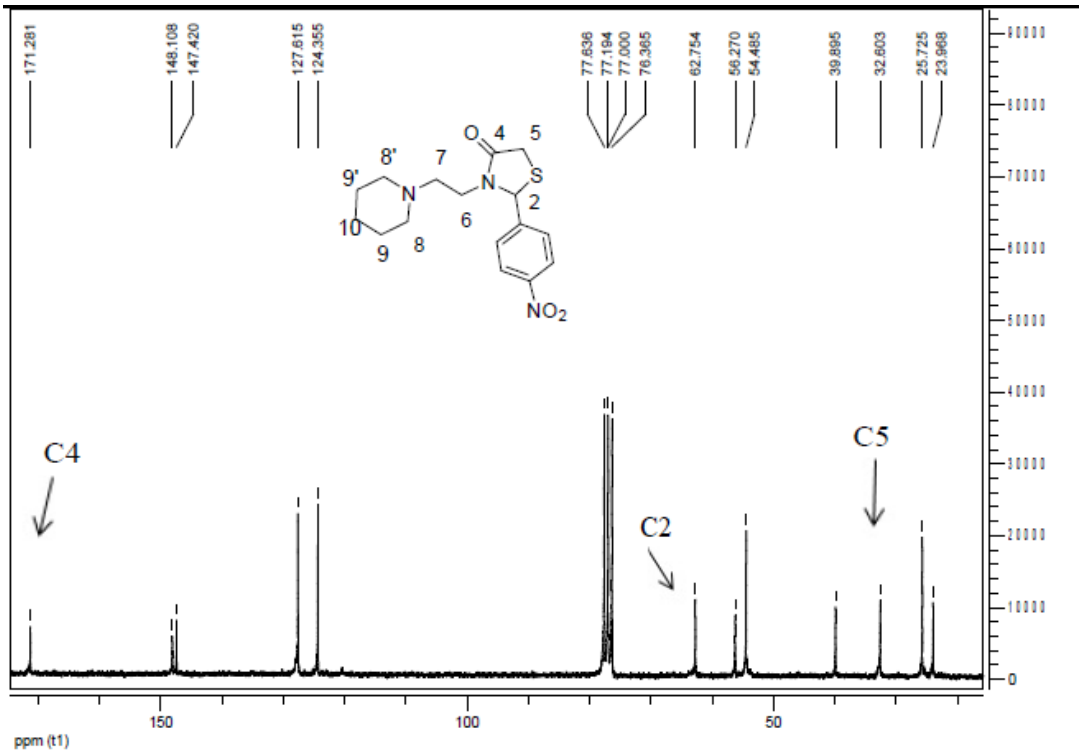


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(4- nitrofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4i** em $CDCl_3$.

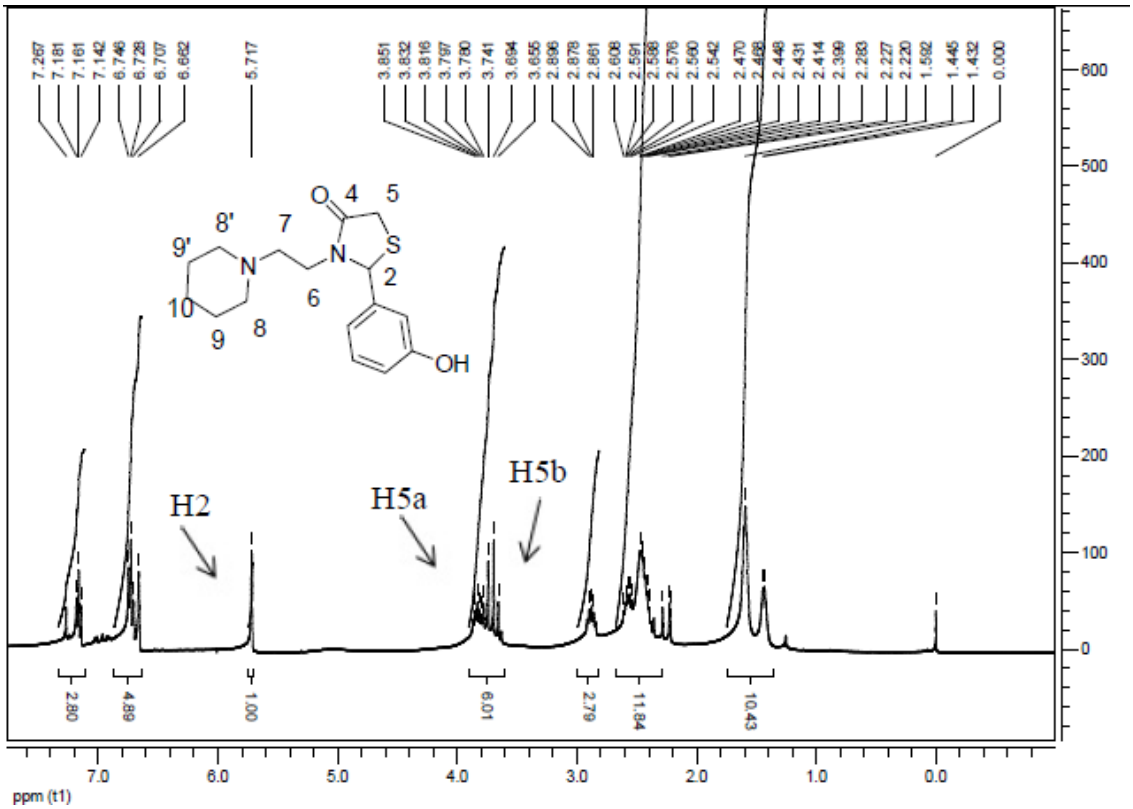


Figura 54. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(3- hidróxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4j** em $CDCl_3$.

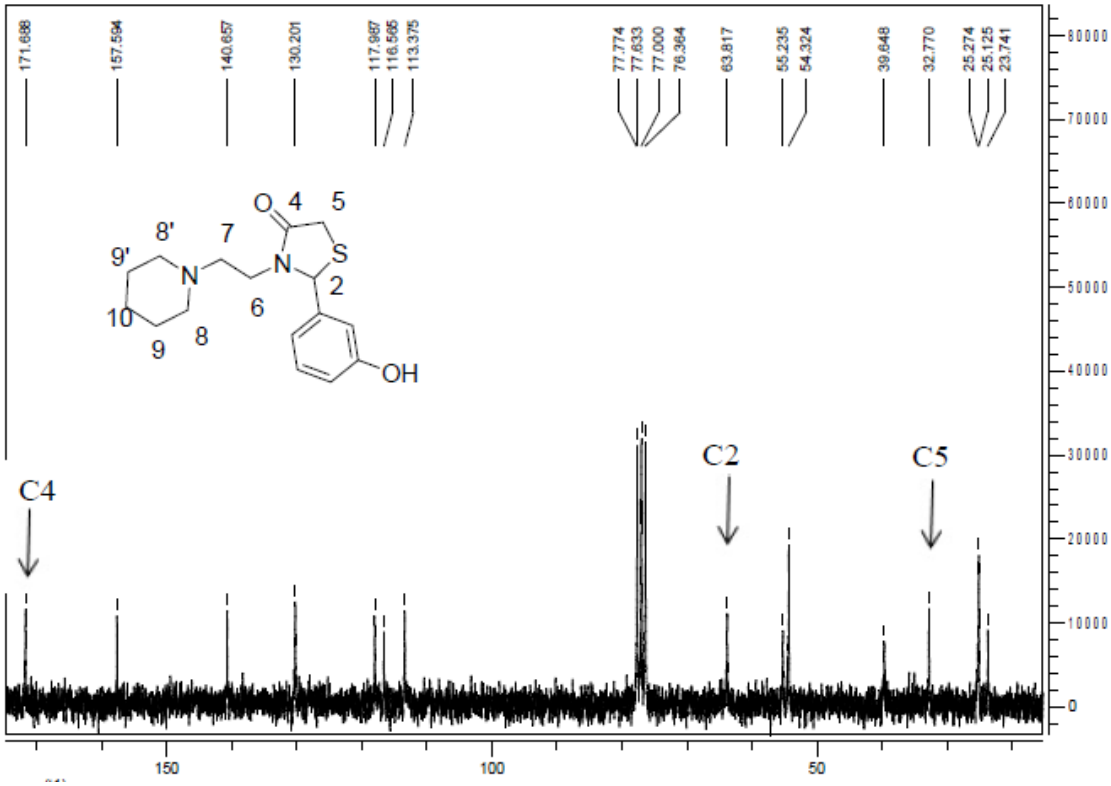


Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(3- hidróxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4j** em $CDCl_3$.

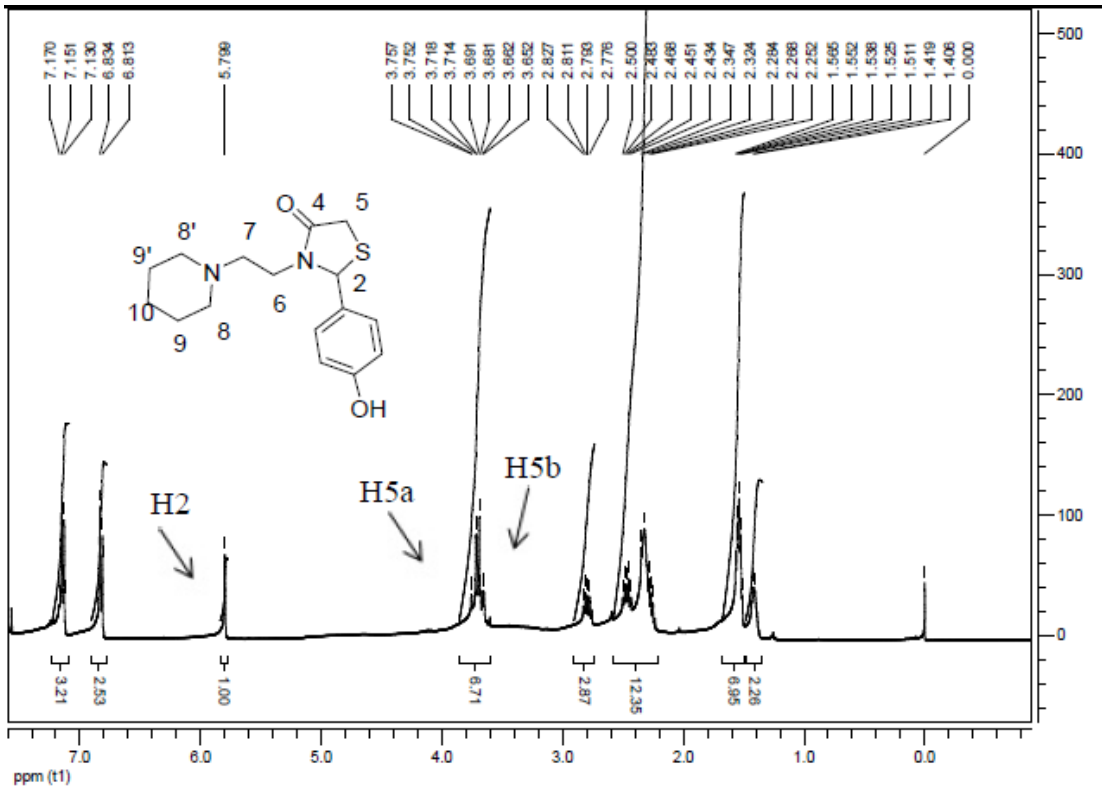


Figura 56. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(4- hidróxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4k** em $CDCl_3$.

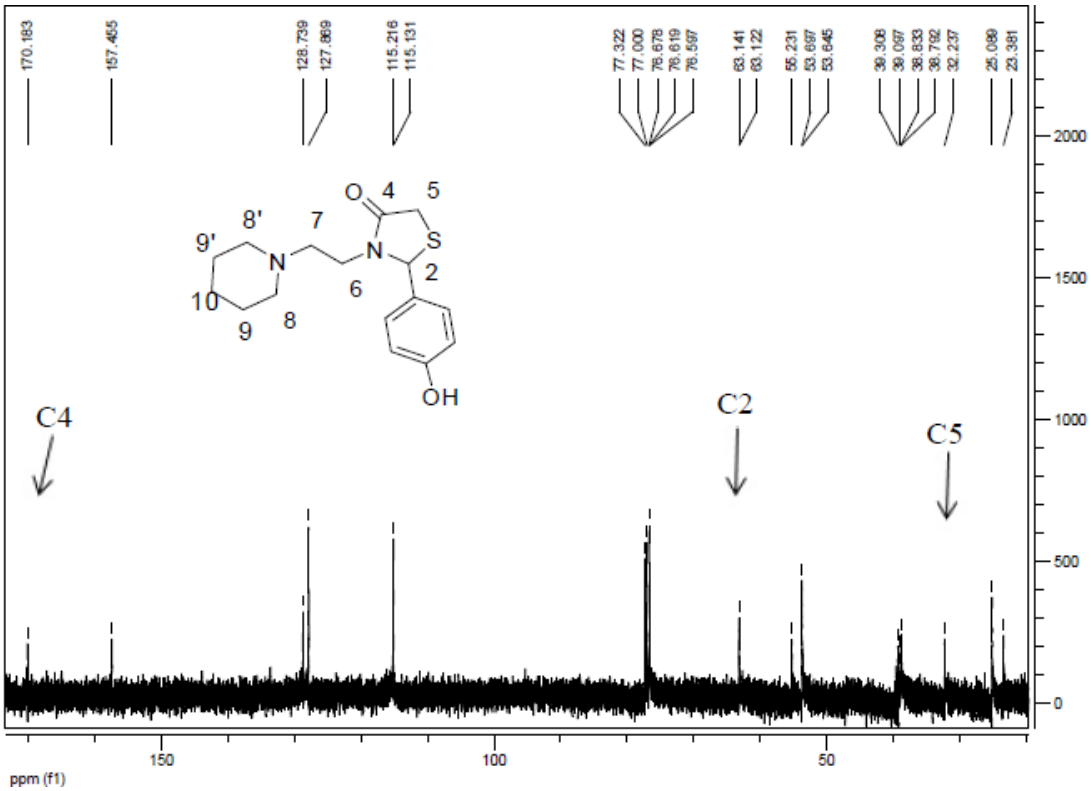


Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(4- hidróxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4k** em $CDCl_3$.

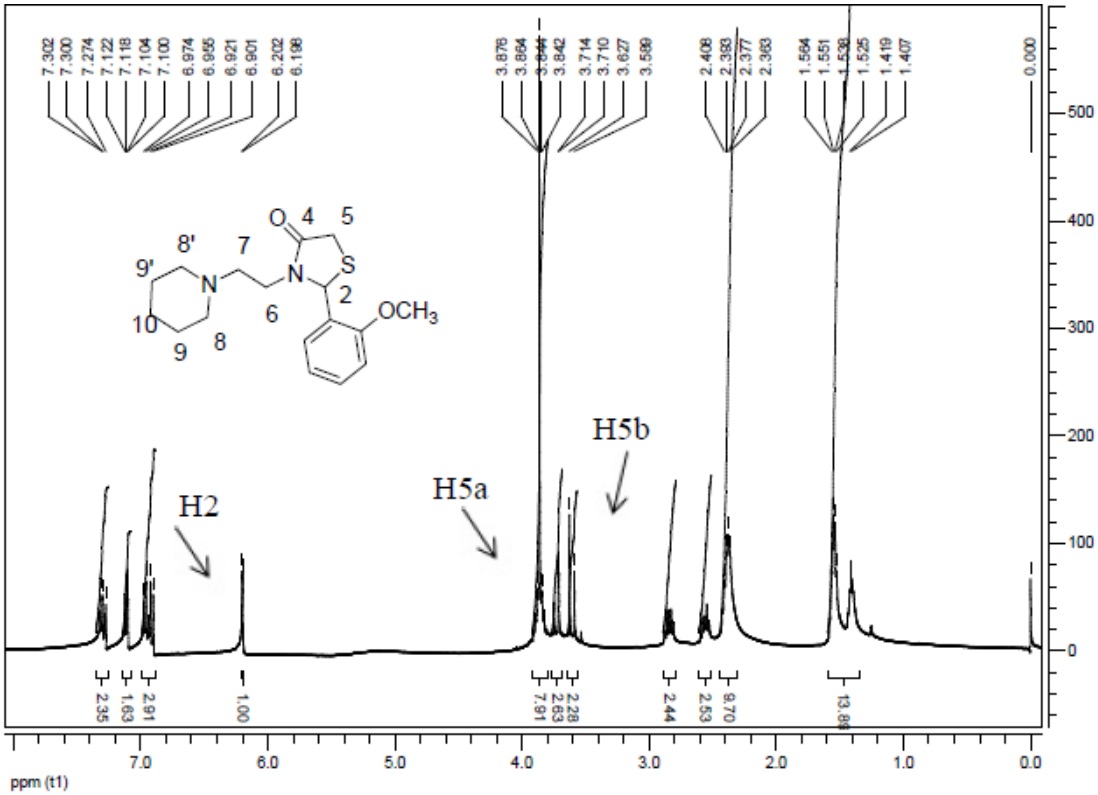


Figura 58. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(2- metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4l** em $CDCl_3$.

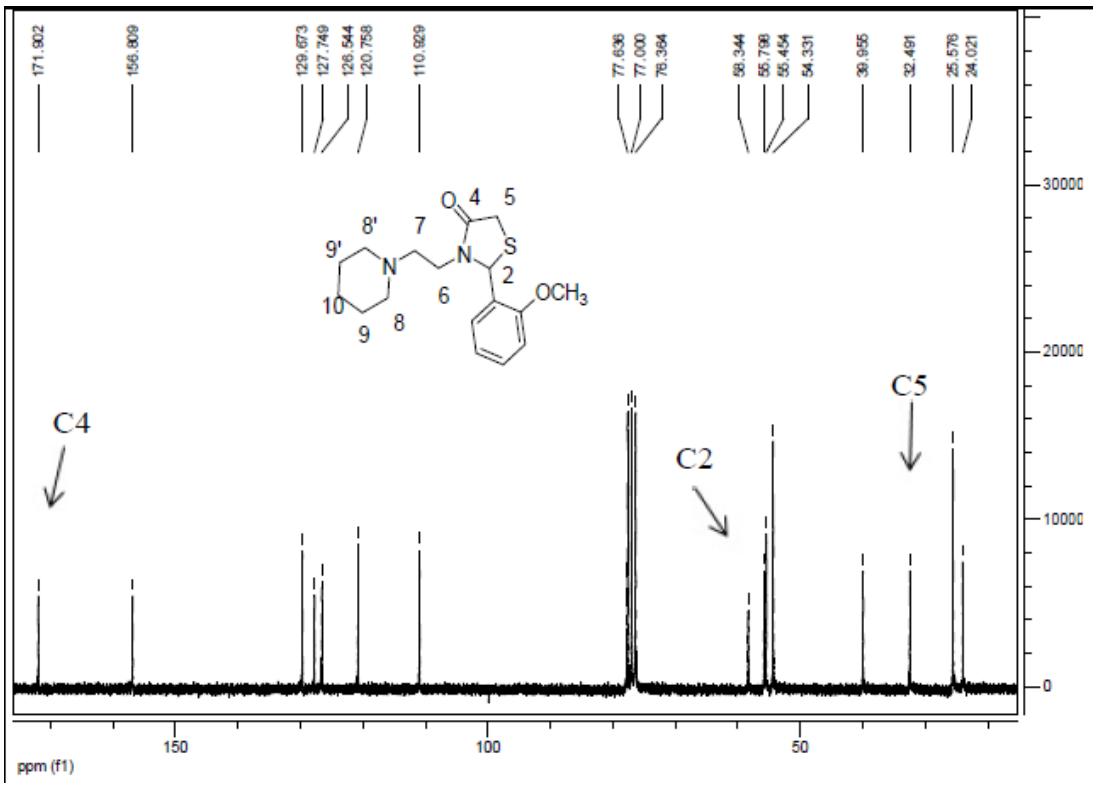


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(2- metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4l** em $CDCl_3$.

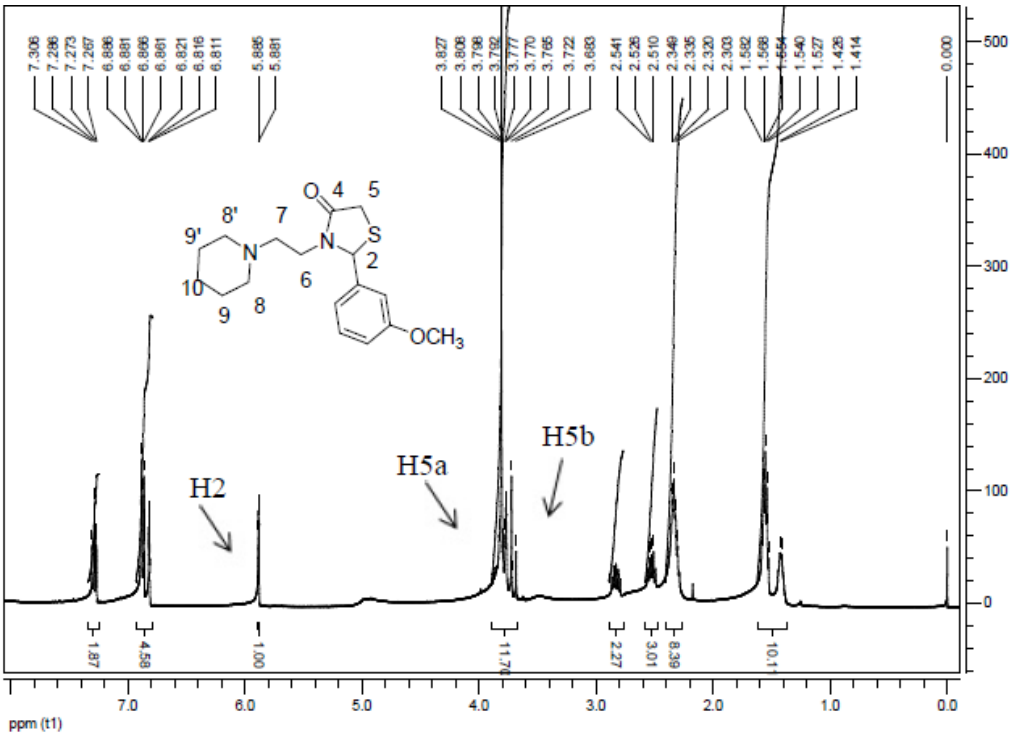


Figura 60. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(3- metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4m** em $CDCl_3$.

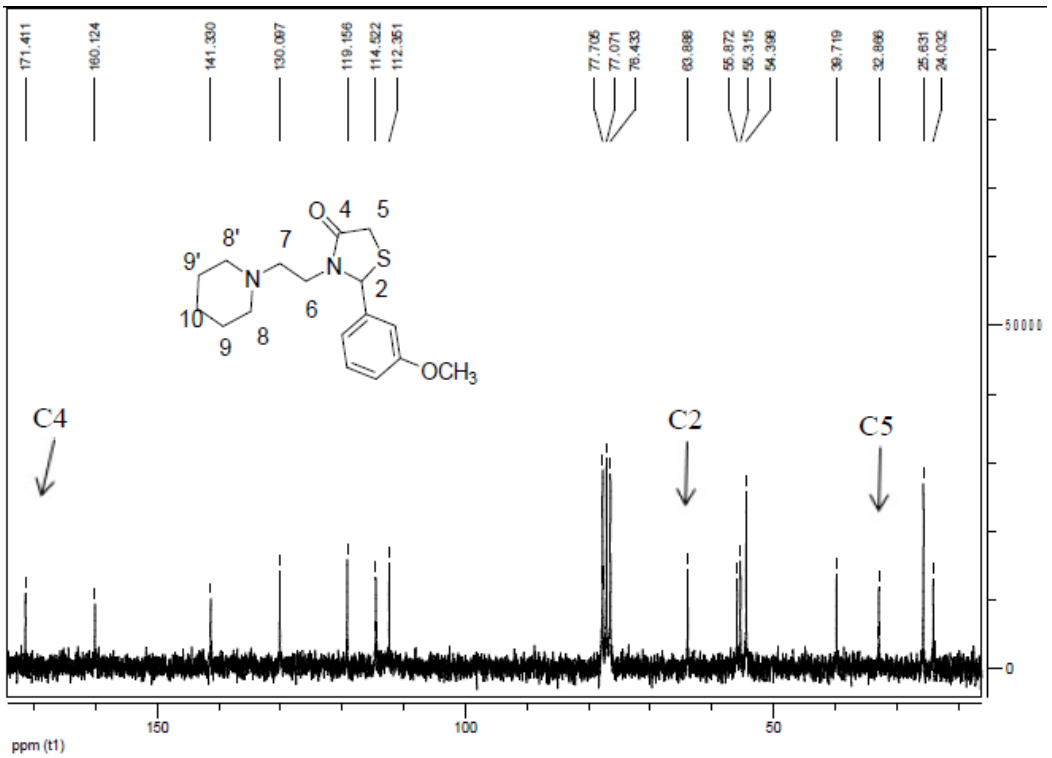


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(3- metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4m** em $CDCl_3$.

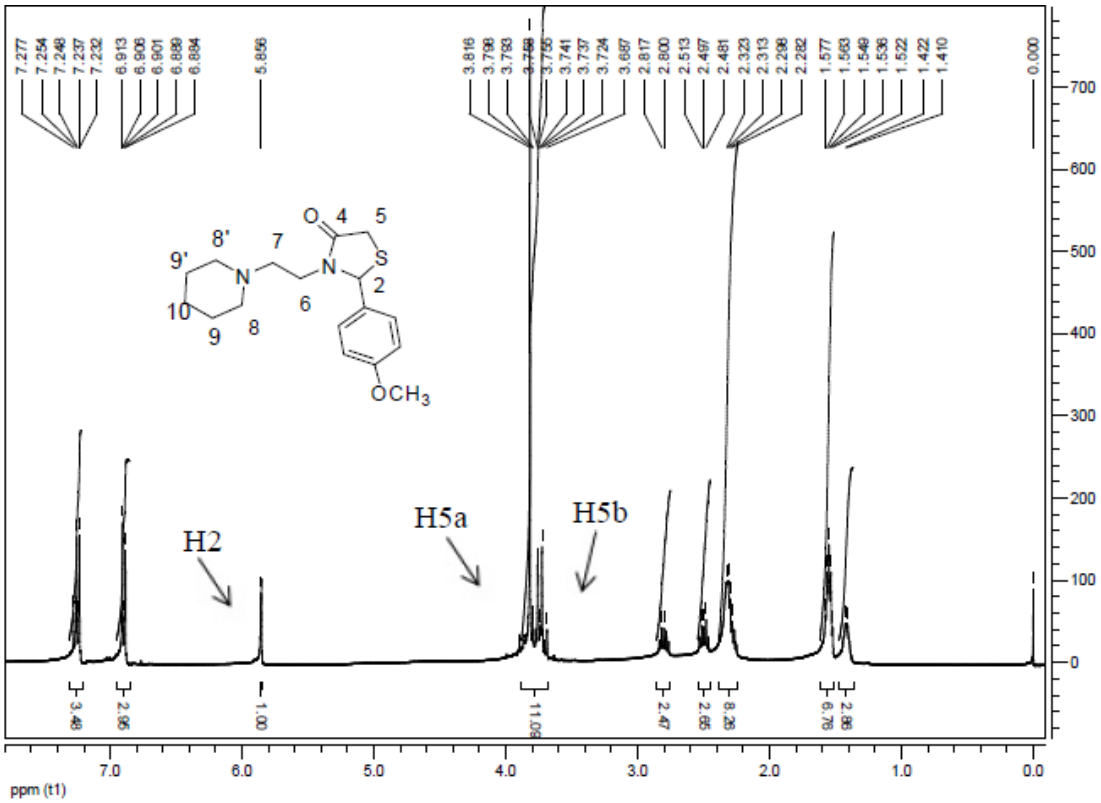


Figura 62. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(4- metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4n** em $CDCl_3$.

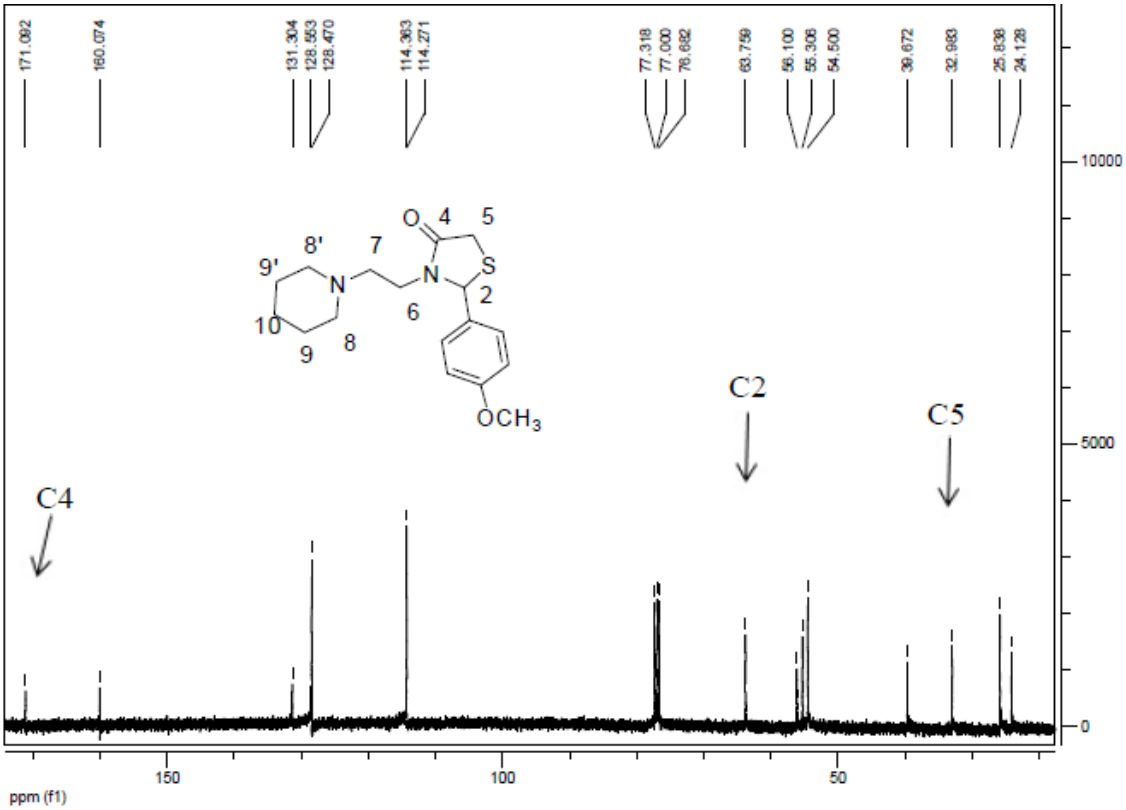


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(4- metóxifenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4n** em $CDCl_3$.

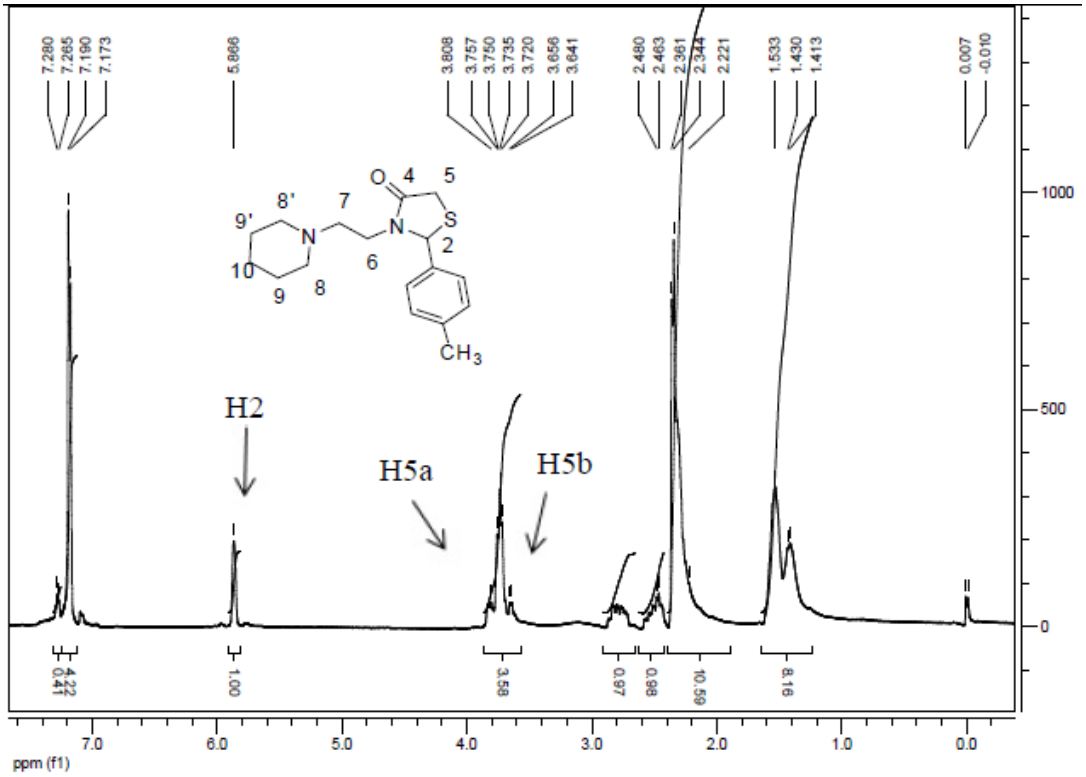


Figura 64. Espectro de RMN de ^{1}H da 3-(piperidin-2-il)-2-(*p*-toluil)etil-tiazolidin-4-ona **4o** em $CDCl_3$.

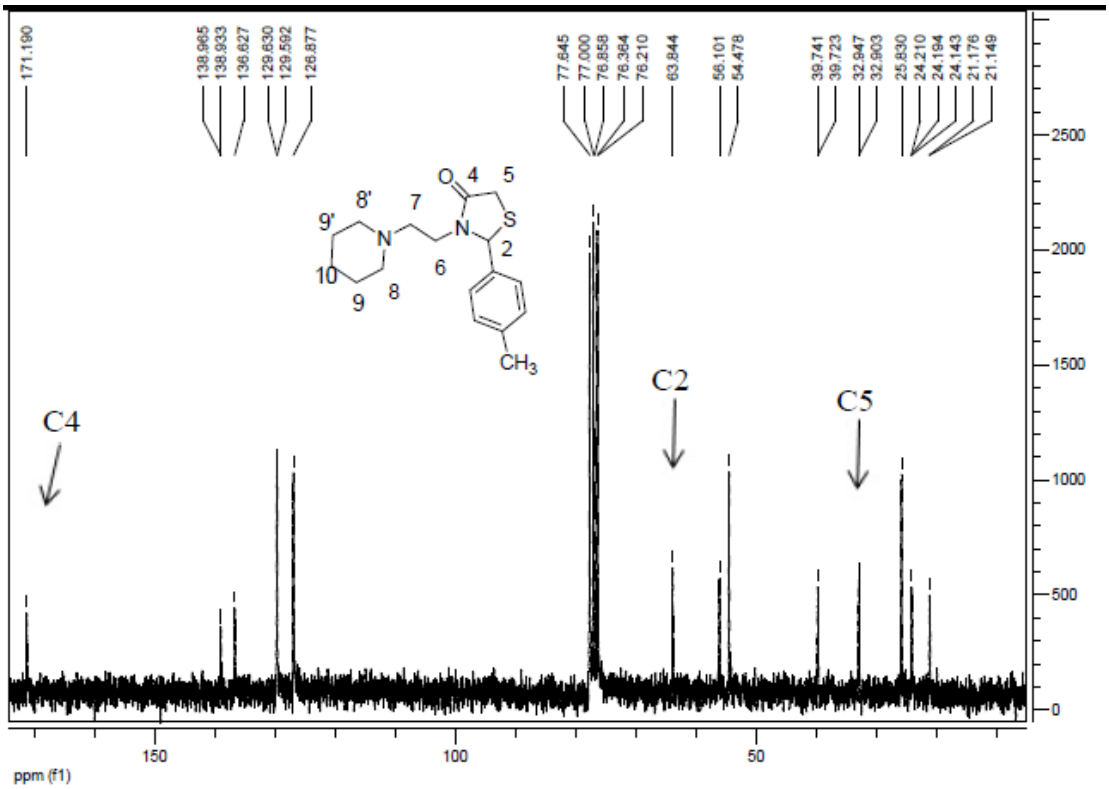


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C da 3-(piperidin-2-il)-2-(*p*-toluil)etil-tiazolidin-4-ona **4o** em $CDCl_3$.

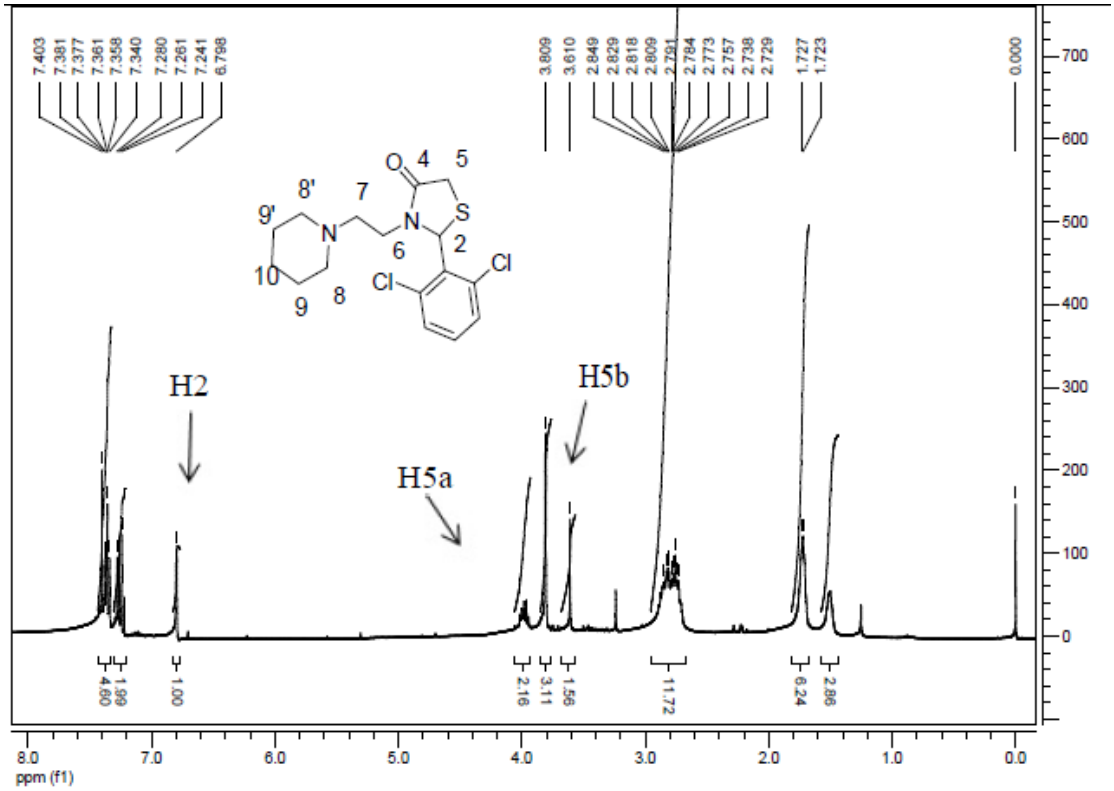


Figura 66. Espectro de RMN de ^{1}H da 2-(2,6-diclorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4-ona **4p** em $CDCl_3$.

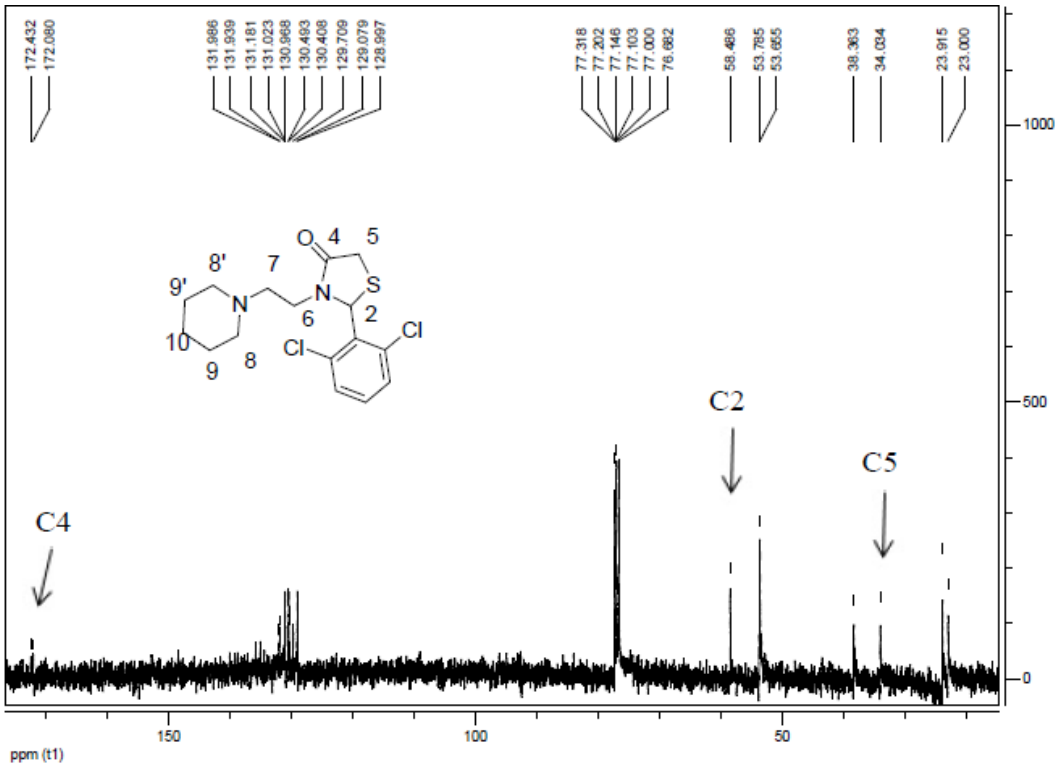
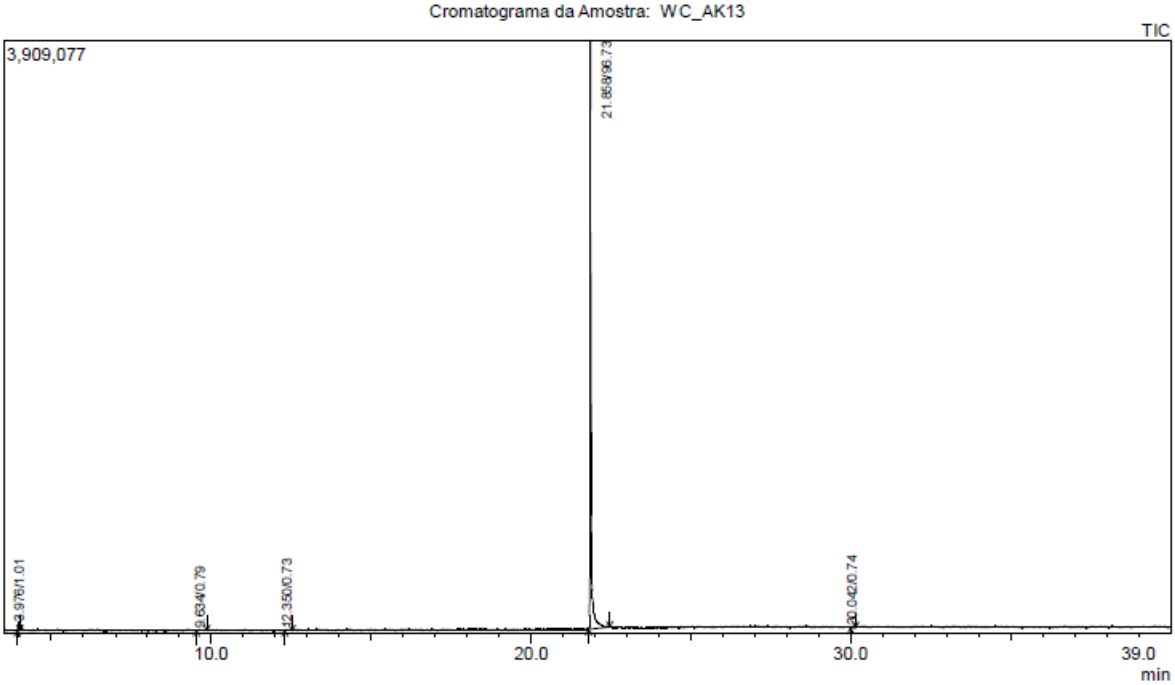


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(2,6-diclorofenil)-3-(piperidin-1-il)etil-tiazolidin-4 ona **4p** em $CDCl_3$.

ANEXO II – Espectros de CG/ CG-MS

Cromatograma da Amostra: WC_AK13



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	3.976	3.933	4.017	88412	1.01	59647	1.50	1.48	V	
2	9.634	9.542	9.867	69393	0.79	8116	0.20	8.55	V	
3	12.350	12.300	12.525	63810	0.73	9006	0.23	7.09	V	
4	21.858	21.800	22.458	8472219	96.73	3881752	97.83	2.18	S	
5	30.042	30.000	30.158	64635	0.74	9310	0.23	6.94		
				8758469	100.00	3967831	100.00			

Peak#:4 R.Time:21.858(Scan#:2204)
MassPeaks:29
RawMode:Averaged 21.800-22.458(2197-2276)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

Espectro MS

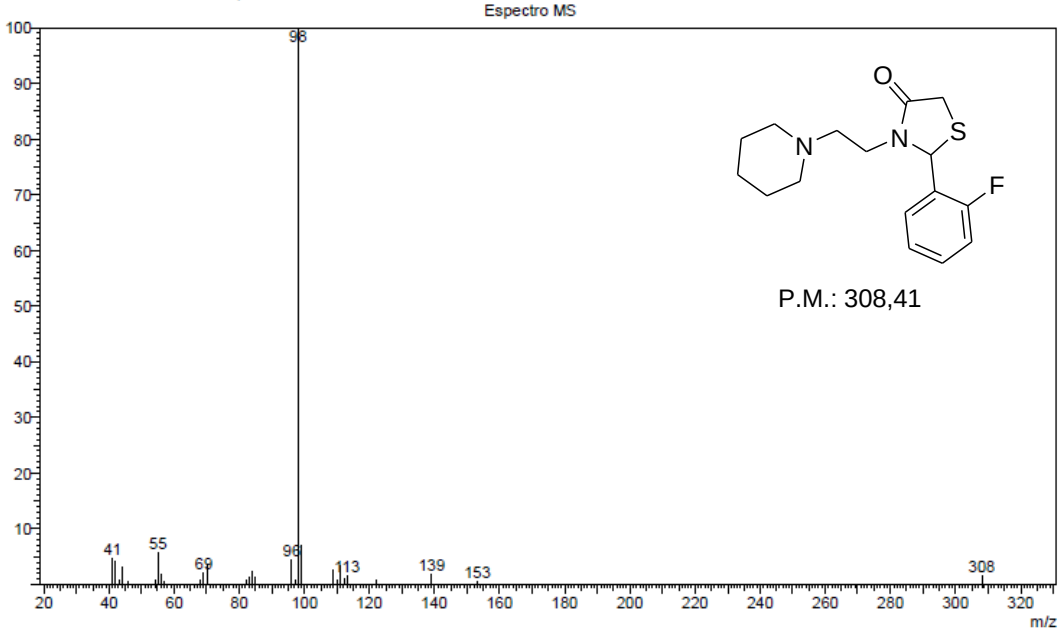
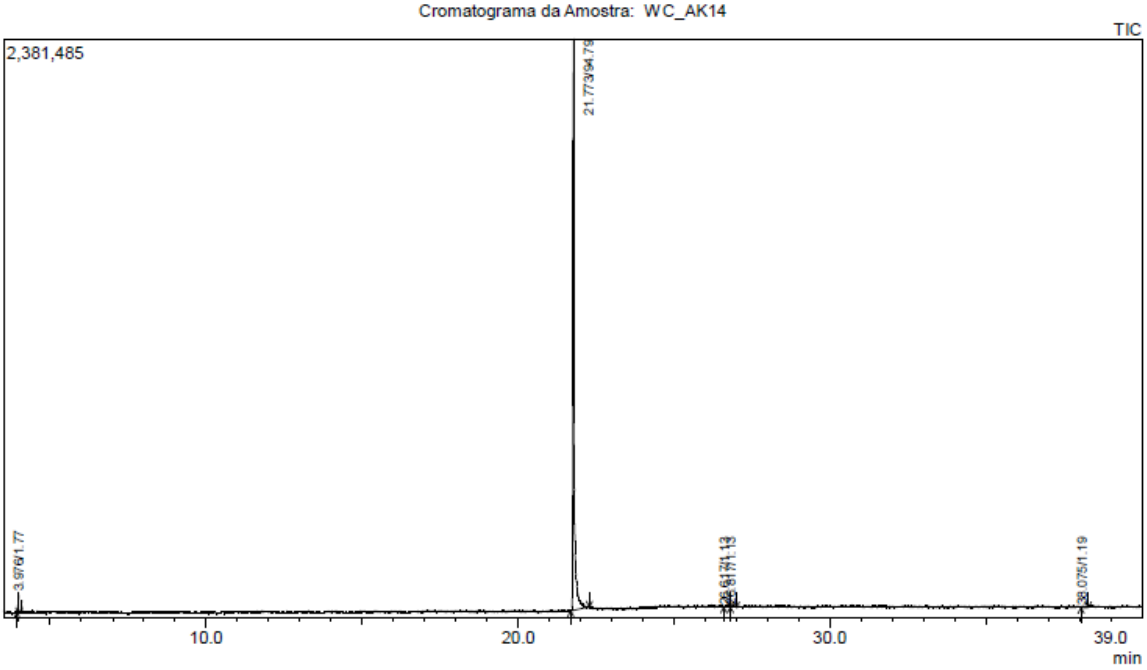


Tabela de Massas
Peak#:4 R.Time:21.858(Scan#:2204)
Massa Pico:29
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	41	4.73	6	54	0.83	11	69	2.11	16	85	1.45	21	109	2.72	26	122	0.67			
2	42	4.08	7	55	5.75	12	70	3.60	17	96	4.51	22	110	0.92	27	139	1.76			
3	43	0.80	8	56	1.85	13	82	0.68	18	97	0.83	23	111	3.48	28	153	0.57			
4	44	3.15	9	57	0.63	14	83	1.42	19	98	100.00	24	112	1.00	29	308	1.55			
5	46	0.52	10	68	0.65	15	84	2.45	20	99	7.05	25	113	1.56						

Figura 68: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4a**

Cromatograma da Amostra: WC_AK14



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	3.976	3.933	4.000	102806	1.77	85683	3.49	1.20		
2	21.773	21.683	22.283	5510277	94.79	2350837	95.72	2.34	S	
3	26.617	26.592	26.800	65409	1.13	4813	0.20	13.59		
4	26.817	26.800	27.008	65479	1.13	7687	0.31	8.52	V	
5	38.075	38.050	38.283	69218	1.19	6945	0.28	9.97		
				5813189	100.00	2455965	100.00			

Espectro MS

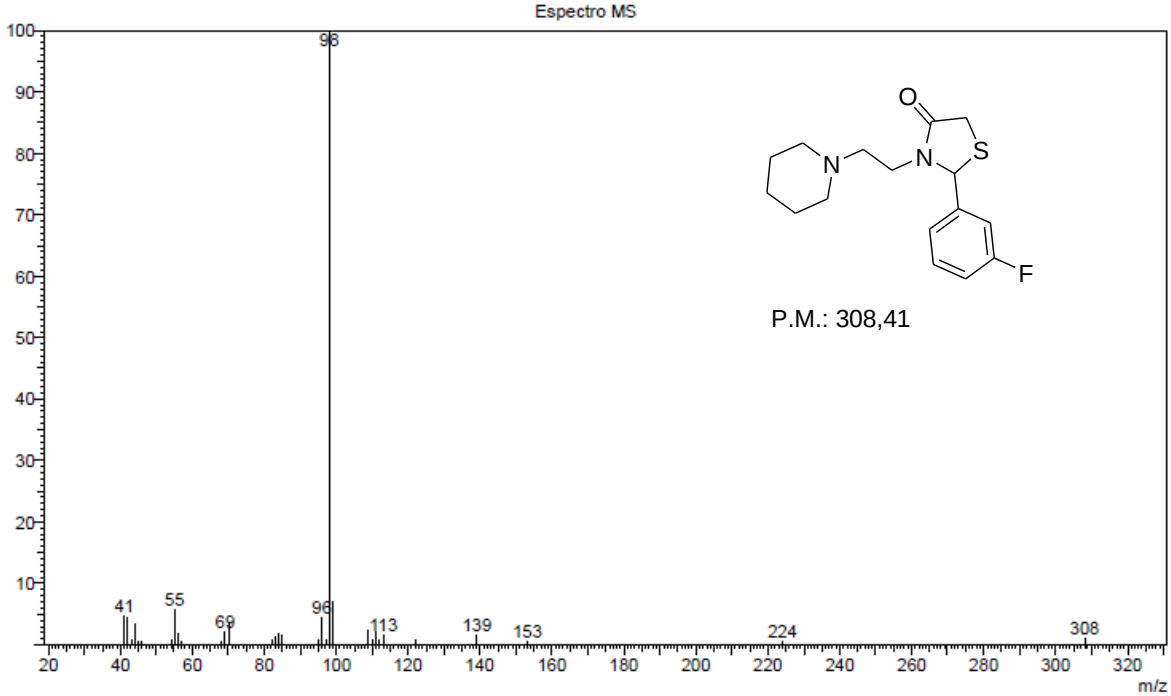
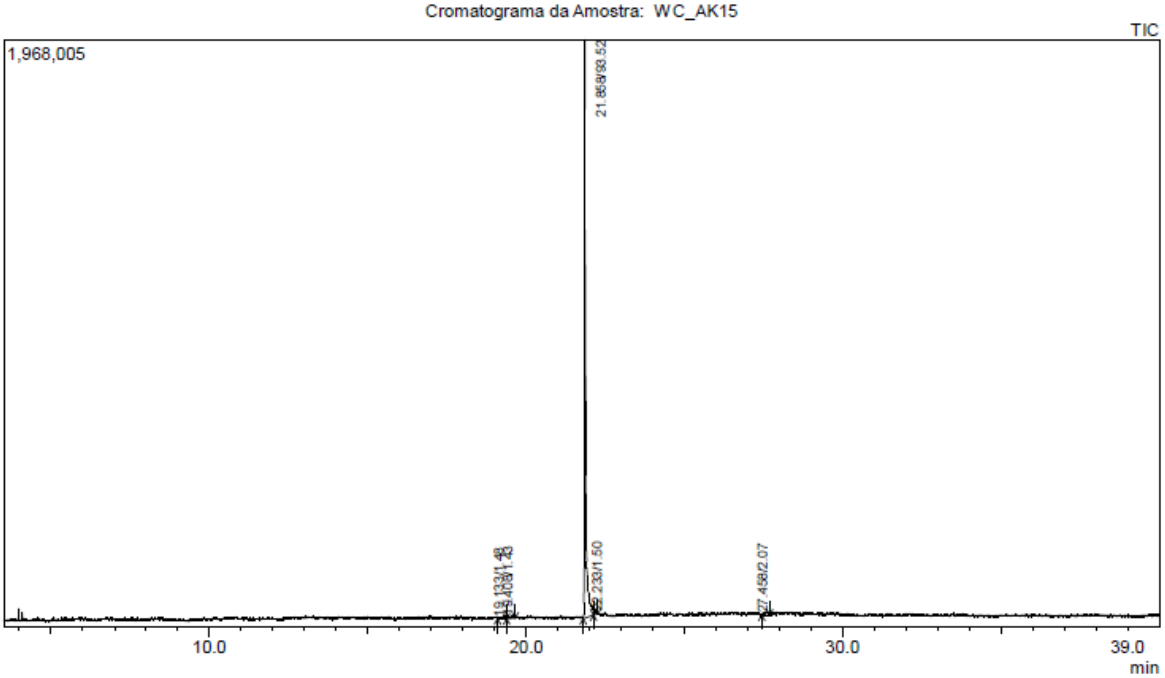


Tabela de Massas
Peak#:2 R.Time:21.775(Scan#:2194)
Massa Pico:32
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	41	4.85	7	54	0.77	13	70	3.69	19	96	4.42	25	111	2.18	31	224	0.52
2	42	4.30	8	55	5.84	14	82	0.67	20	97	0.83	26	112	0.77	32	308	1.01
3	43	0.79	9	56	1.88	15	83	1.43	21	98	100.00	27	113	1.65			
4	44	3.29	10	57	0.62	16	84	1.93	22	99	6.92	28	122	0.66			
5	45	0.51	11	68	0.58	17	85	1.69	23	109	2.38	29	139	1.53			
6	46	0.53	12	69	2.16	18	95	0.68	24	110	0.86	30	153	0.51			

Figura 69: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4b**

Cromatograma da Amostra: WC_AK15



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	19.133	19.092	19.383	73086	1.48	4401	0.22	16.61	V	
2	19.408	19.383	19.650	70550	1.43	7723	0.39	9.14	V	
3	21.858	21.800	22.133	4621889	93.52	1937699	98.80	2.39		
4	22.233	22.133	22.258	74343	1.50	7268	0.37	10.23	V	
5	27.458	27.442	27.700	102215	2.07	4061	0.21	25.17		
				4942083	100.00	1961152	100.00			

Espectro MS

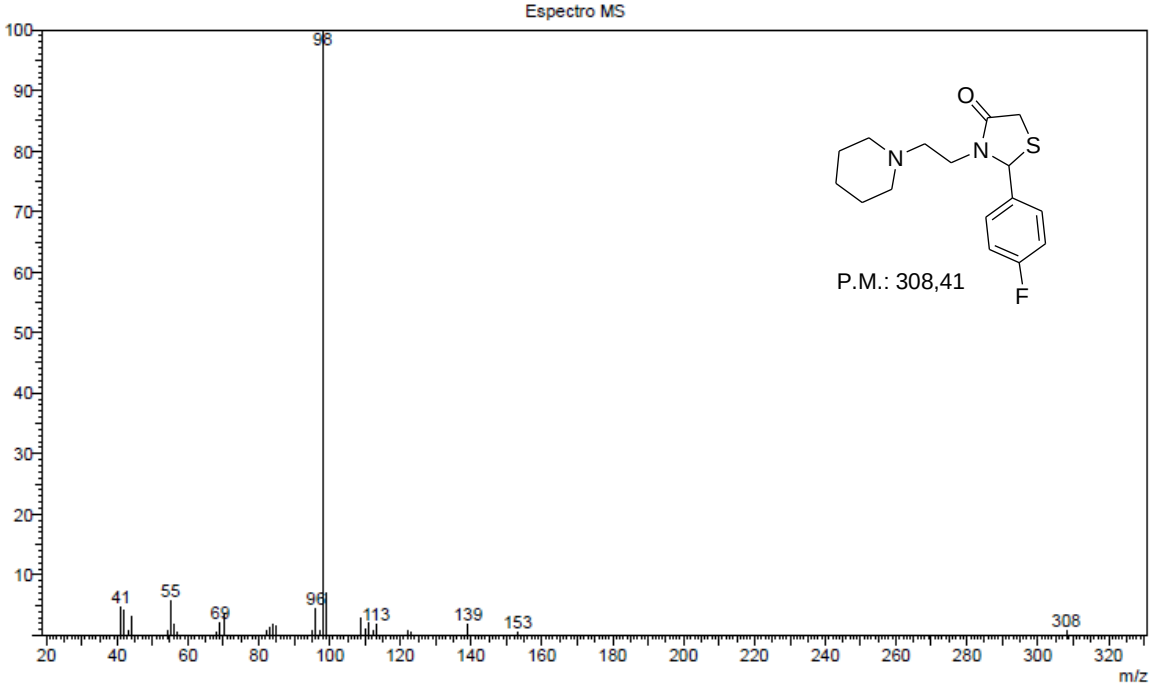


Tabela de Massas
Peak#:3 R.Time:21.858(Scan#:2204)
Massa Pico:30
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	41	4.83	6	55	5.83	11	70	3.67	16	95	0.77	21	109	2.89	26	122	0.75
2	42	4.25	7	56	1.86	12	82	0.68	17	96	4.40	22	110	0.97	27	123	0.55
3	43	0.78	8	57	0.65	13	83	1.41	18	97	0.82	23	111	2.24	28	139	1.77
4	44	3.22	9	68	0.63	14	84	1.87	19	98	100.00	24	112	0.88	29	153	0.60
5	54	0.85	10	69	2.13	15	85	1.71	20	99	6.87	25	113	1.93	30	308	0.91

Figura 70: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4c**

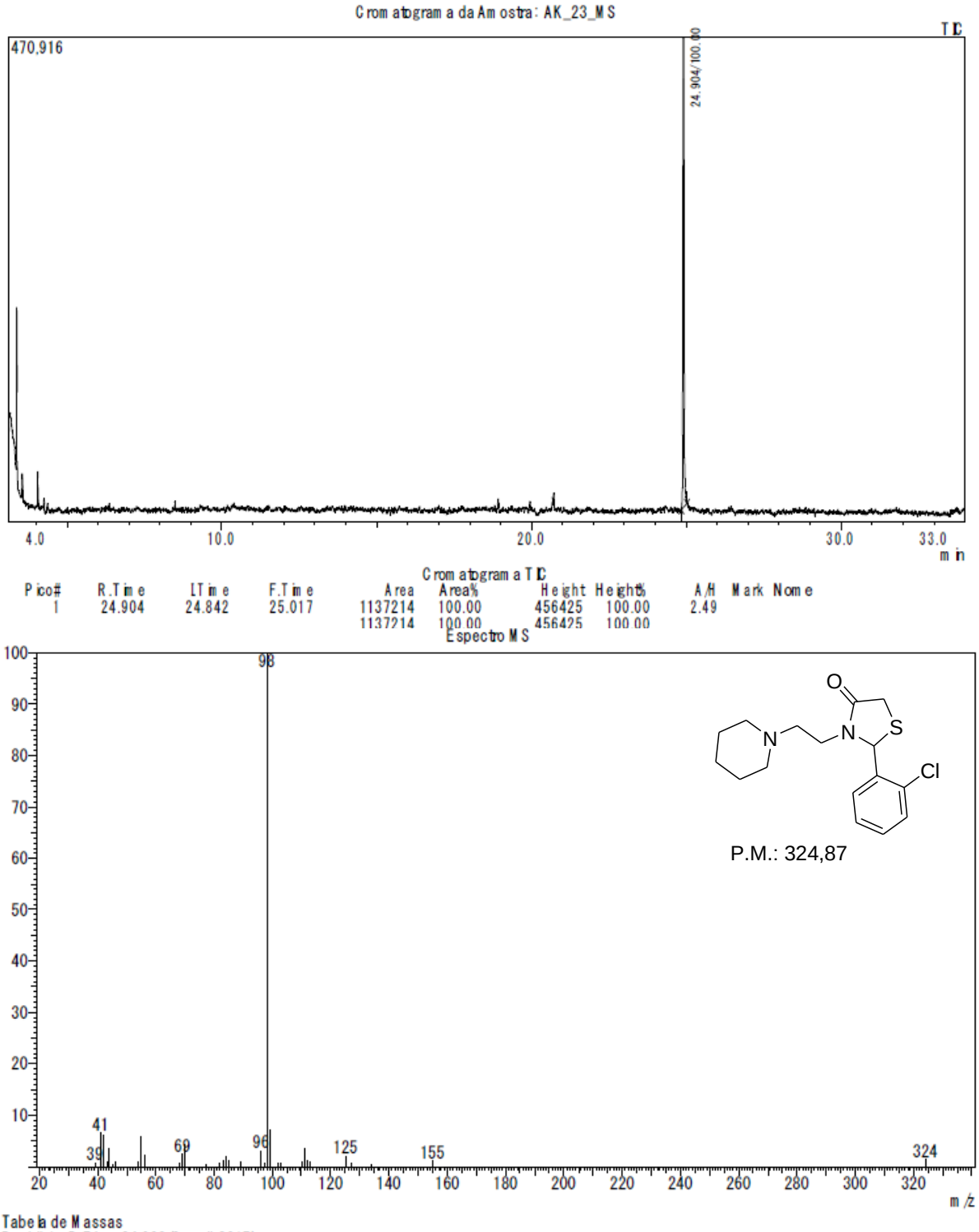
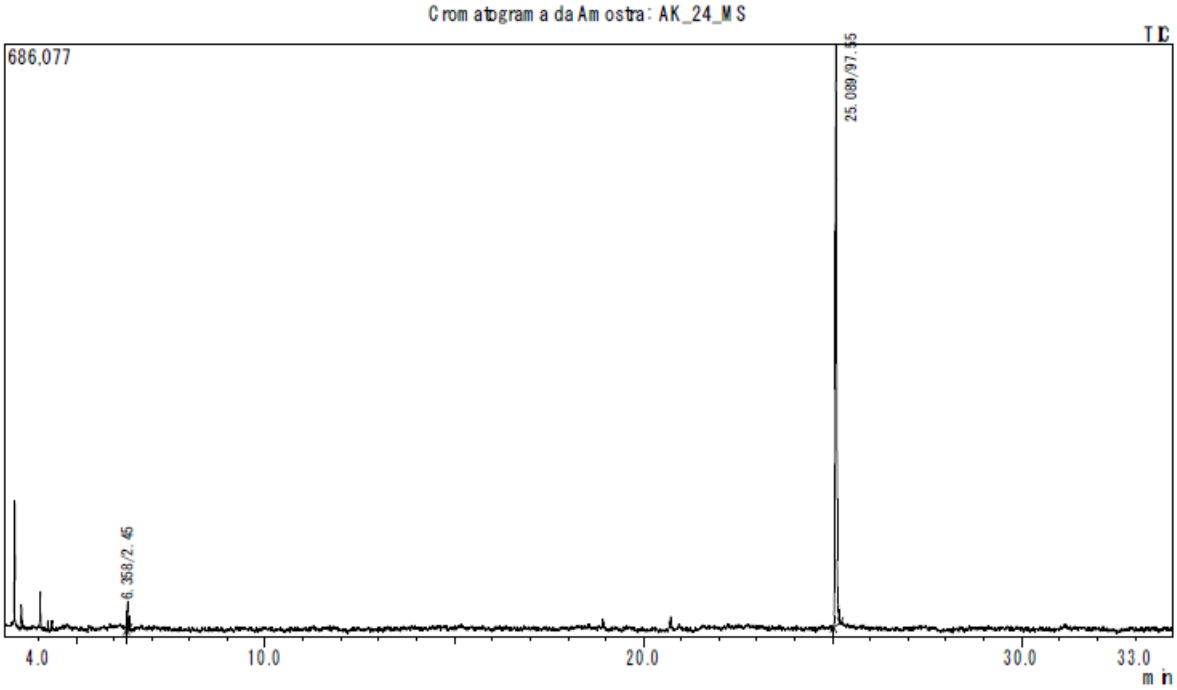


Tabela de Massas
Peak#:1 R.Time:24.900 (Scan#:2617)
Massa Pico:34
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.
1	39	0.74	7	46	1.03	13	70	4.23	19	89	1.00	25	103	0.70	31	127	0.59
2	41	6.60	8	54	1.00	14	77	0.54	20	96	3.11	26	110	0.75	32	134	0.52
3	42	6.04	9	55	5.91	15	82	0.71	21	97	0.67	27	111	3.36	33	155	1.13
4	43	1.02	10	56	2.07	16	83	1.08	22	98	100.00	28	112	1.08	34	324	1.28
5	44	3.53	11	68	0.63	17	84	1.95	23	99	7.09	29	113	0.85			
6	45	0.50	12	69	2.38	18	85	1.05	24	102	0.57	30	125	1.98			

Figura 71: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4d**



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	6.358	6.333	6.392	42560	2.45	32216	4.58	1.32	MI	
2	25.089	25.017	25.200	1693581	97.55	671754	95.42	2.52		
				1736141	100.00	703970	100.00			

Espectro MS

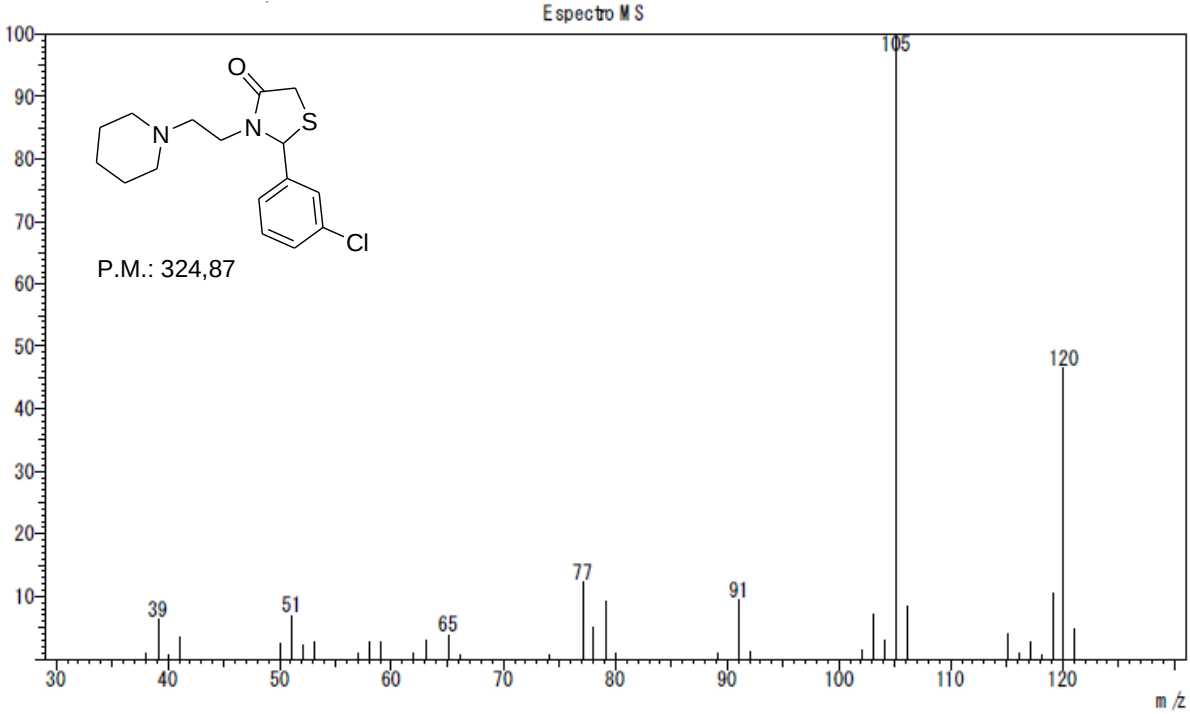
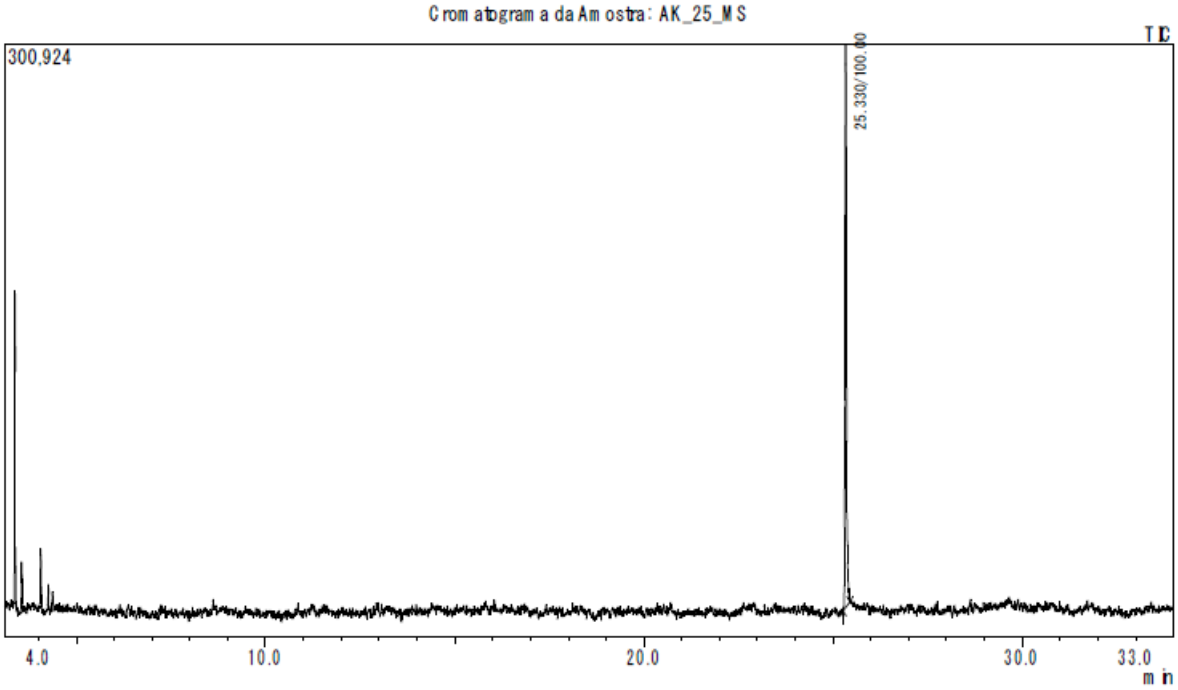


Tabela de Massas
Peak#:1 R.Time:6.358 (Scan#:392)
Massa Pico:35
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.
1	38	1.03	7	52	2.30	13	63	2.89	19	79	9.34	25	103	6.98	31	117	2.83
2	39	6.32	8	53	2.64	14	65	3.76	20	80	0.97	26	104	2.89	32	118	0.69
3	40	0.69	9	57	0.93	15	66	0.70	21	89	0.90	27	105	100.00	33	119	10.45
4	41	3.36	10	58	2.84	16	74	0.66	22	91	9.38	28	106	8.51	34	120	46.45
5	50	2.41	11	59	2.71	17	77	12.24	23	92	1.15	29	115	3.96	35	121	4.71
6	51	6.86	12	62	0.82	18	78	5.14	24	102	1.26	30	116	0.79			

Figura 72: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4e**



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	25.330	25.275	25.442	761288	100.00	285862	100.00	2.66		
				761288	100.00	285862	100.00			

Espectro MS

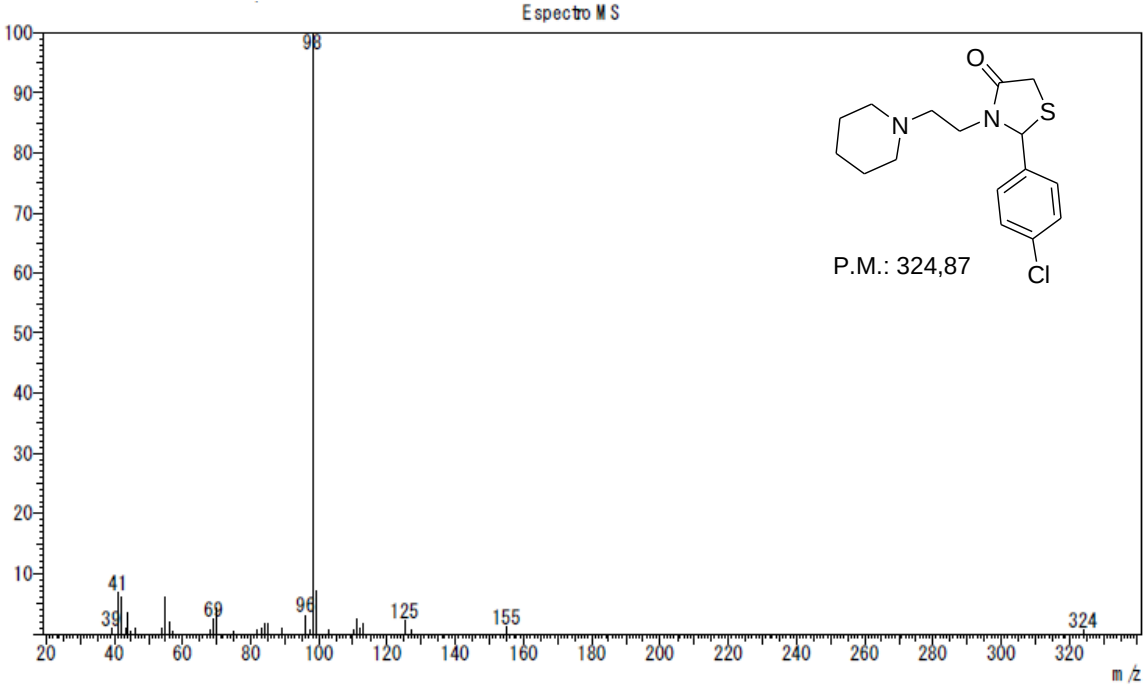
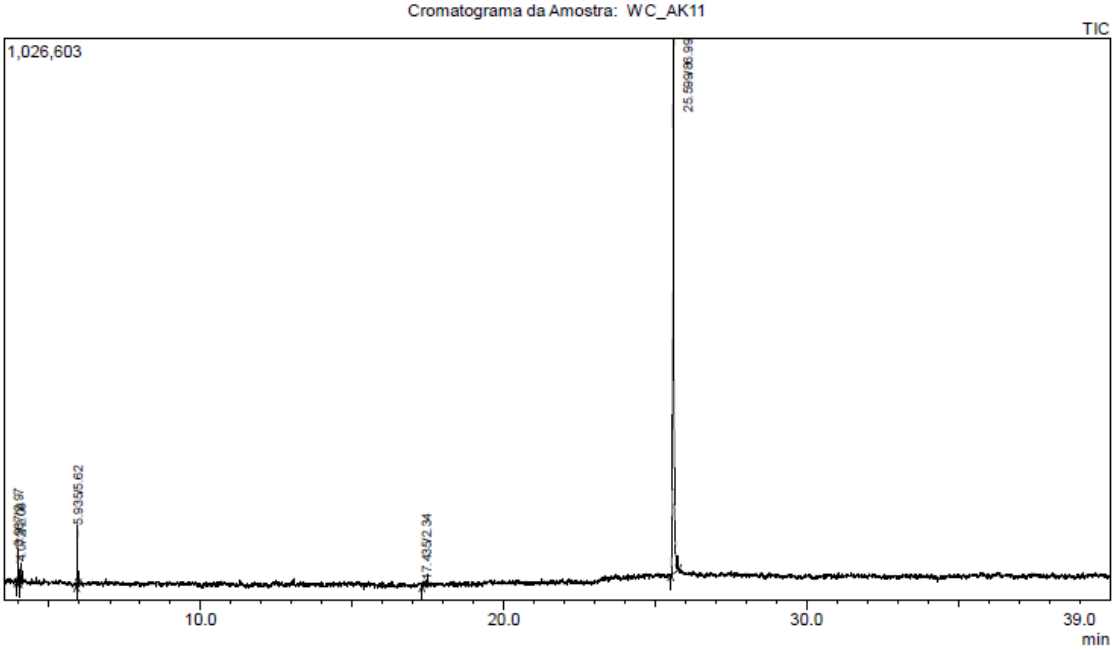


Tabela de Massas
Peak#:1 R.Time:25.333 (Scan#:2669)
Massa Pico:33
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.
1	39	0.77	7	46	0.92	13	69	2.45	19	85	1.63	25	103	0.66	31	127	0.68
2	41	6.82	8	54	0.95	14	70	4.26	20	89	1.04	26	110	0.68	32	155	1.06
3	42	6.20	9	55	6.05	15	75	0.50	21	96	3.03	27	111	2.43	33	324	0.56
4	43	1.03	10	56	2.05	16	82	0.71	22	97	0.60	28	112	0.92			
5	44	3.57	11	57	0.51	17	83	1.01	23	98	100.00	29	113	1.70			
6	45	0.53	12	68	0.66	18	84	1.77	24	99	7.08	30	125	2.20			

Figura 73: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4f**

Cromatograma da Amostra: WC_AK11



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	3.967	3.925	4.017	79789	2.97	62830	5.24	1.27		
2	4.072	4.017	4.108	56001	2.08	37234	3.11	1.50		
3	5.935	5.900	5.967	150908	5.62	108572	9.06	1.39		
4	17.435	17.308	17.475	62944	2.34	11769	0.98	5.35		
5	25.599	25.517	25.758	2337686	86.99	978084	81.61	2.39		
				2687328	100.00	1198489	100.00			

Espectro MS

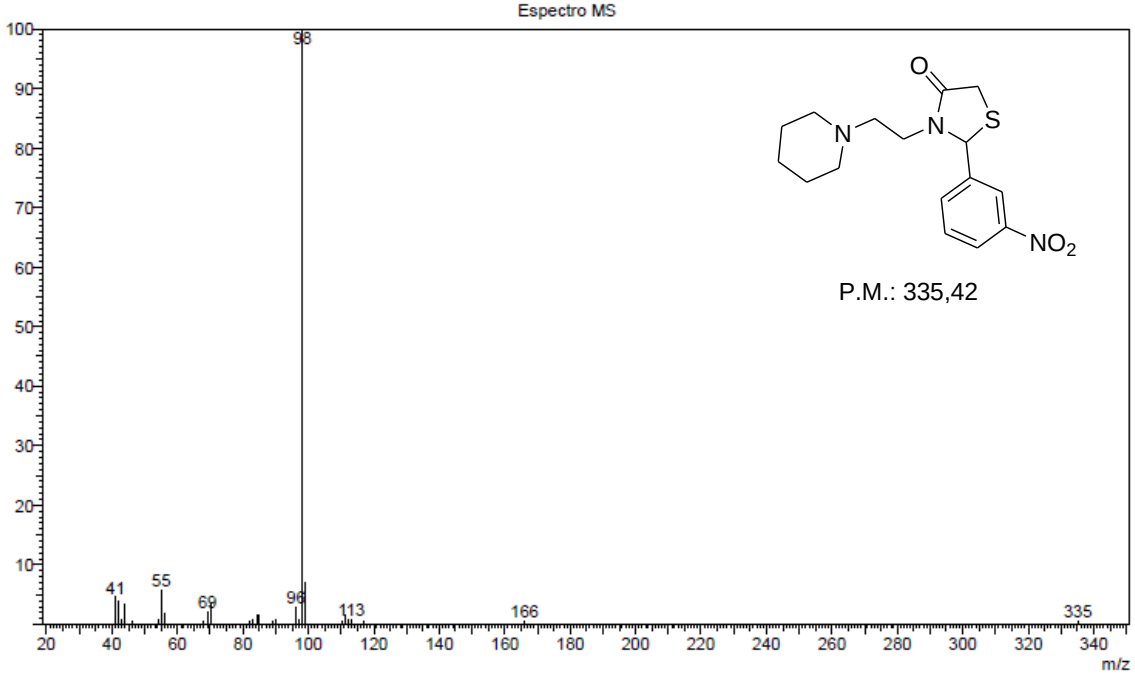
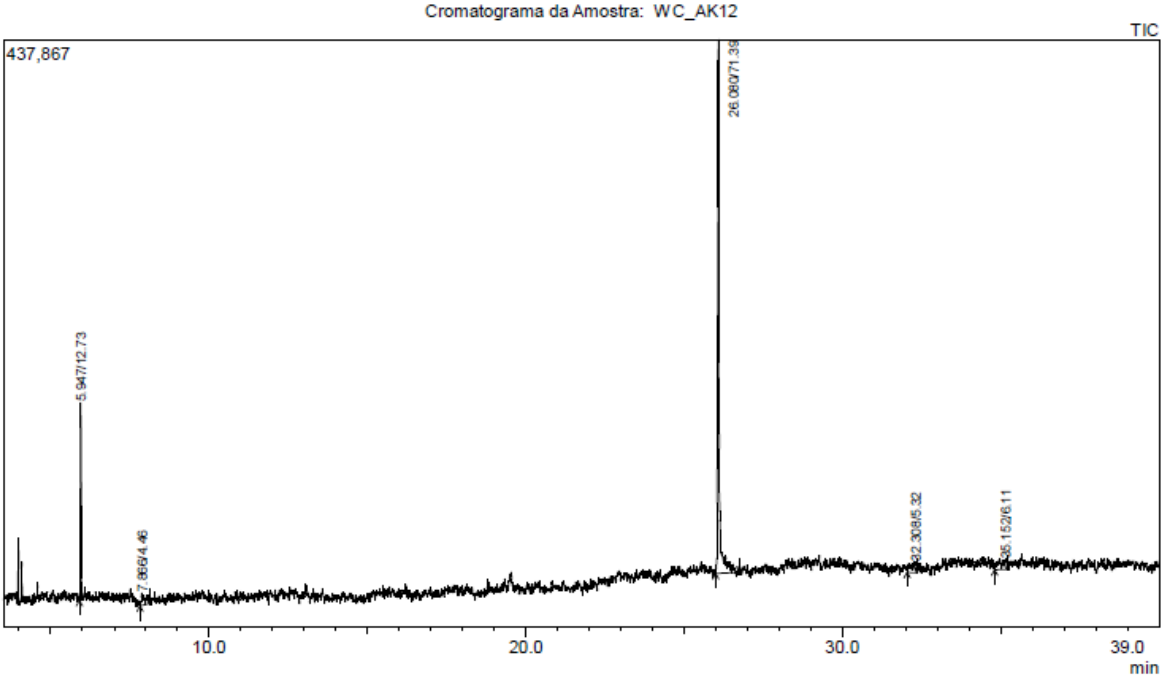


Tabela de Massas
Peak#:5 R.Time:25.600(Scan#:2653)
Massa Pico:28
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	41	4.61	6	54	0.74	11	70	3.68	16	89	0.64	21	99	6.92	26	117	0.57
2	42	4.00	7	55	5.77	12	82	0.62	17	90	0.94	22	110	0.54	27	166	0.58
3	43	0.85	8	56	1.82	13	83	0.92	18	96	2.96	23	111	1.46	28	335	0.58
4	44	3.53	9	68	0.59	14	84	1.51	19	97	0.67	24	112	0.70			
5	46	0.56	10	69	2.09	15	85	1.48	20	98	100.00	25	113	0.83			

Figura 74: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4h**

Cromatograma da Amostra: WC_AK12



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	5.947	5.900	5.983	214662	12.73	147560	25.88	1.45		
2	7.866	7.825	8.100	75246	4.46	9269	1.63	8.12		
3	26.080	25.992	26.742	1204230	71.39	397915	69.79	3.03	S	
4	32.308	32.042	32.358	89670	5.32	8009	1.40	11.20	V	
5	35.152	34.808	35.183	103101	6.11	7386	1.30	13.96	V	
				1686909	100.00	570139	100.00			

Peak#:3 R.Time:26.080(Scan#:2711)
MassPeaks:41
RawMode:Averaged 25.992-26.742(2700-2790)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

Espectro MS

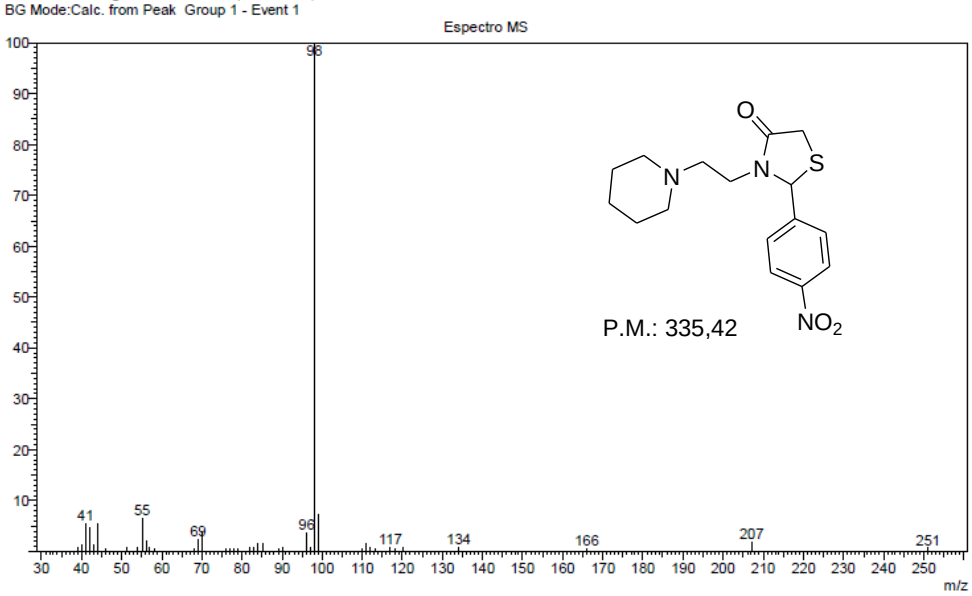
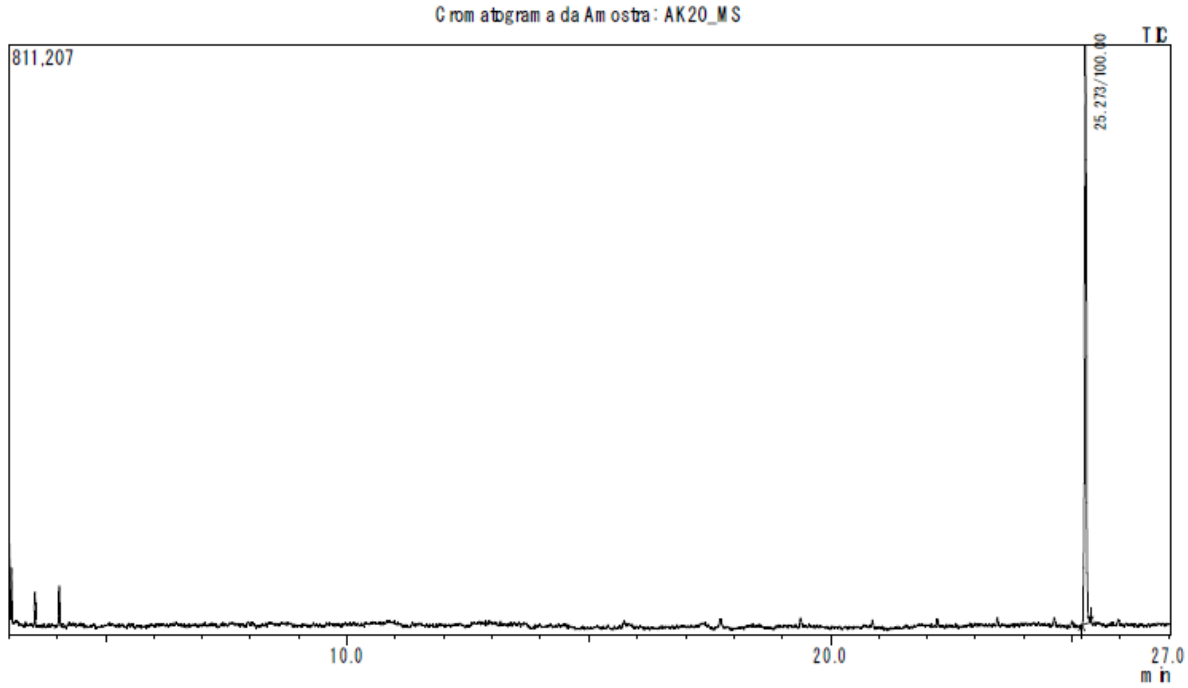


Tabela de Massas
Peak#:3 R.Time:26.083(Scan#:2711)
Massa Pico:41
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	39	0.72	8	51	0.74	15	69	2.38	22	83	0.84	29	98	100.00	36	118	0.59
2	40	1.26	9	54	0.84	16	70	3.71	23	84	1.72	30	99	7.21	37	120	0.70
3	41	5.43	10	55	6.66	17	76	0.57	24	85	1.50	31	110	0.60	38	134	0.91
4	42	4.80	11	56	2.10	18	77	0.63	25	89	0.58	32	111	1.58	39	166	0.64
5	43	1.28	12	57	0.76	19	78	0.64	26	90	0.93	33	112	0.74	40	207	1.81
6	44	5.44	13	58	0.53	20	79	0.64	27	96	3.75	34	113	0.52	41	251	0.68
7	46	0.59	14	68	0.53	21	82	0.81	28	97	0.70	35	117	0.93			

Figura 75: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4i**



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	25.273	25.200	25.375	2052561	100.00	794657	100.00	2.58		
				2052561	100.00	794657	100.00			

Espectro MS

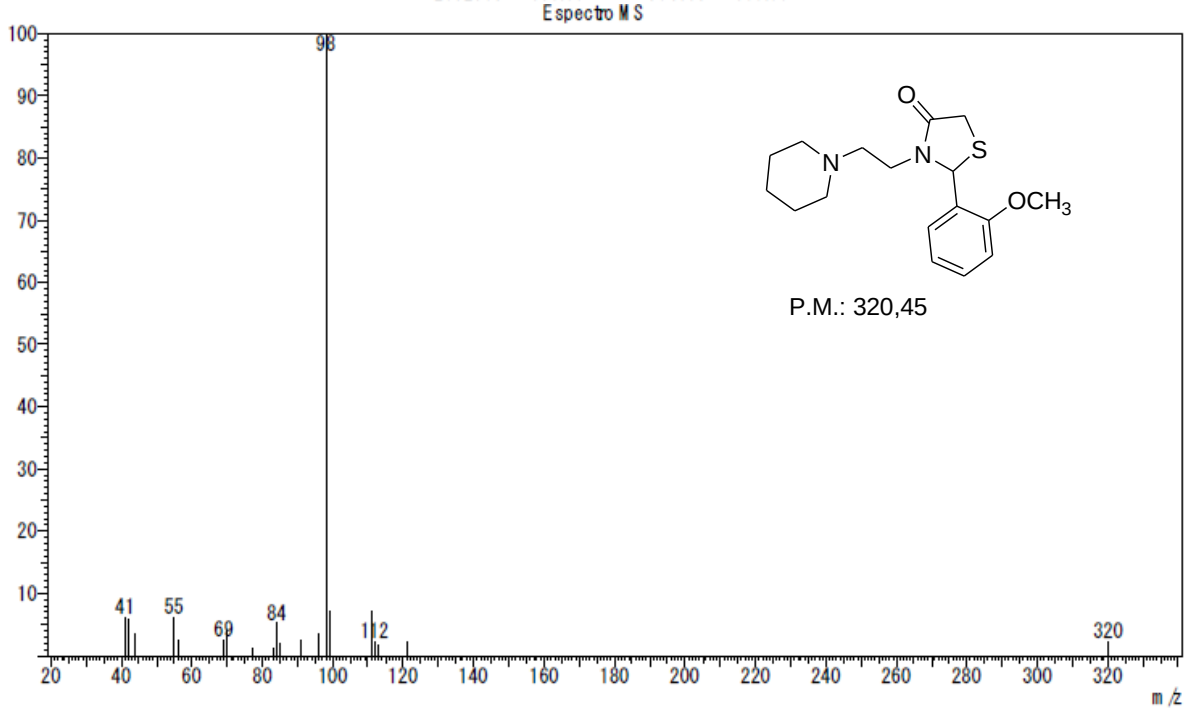
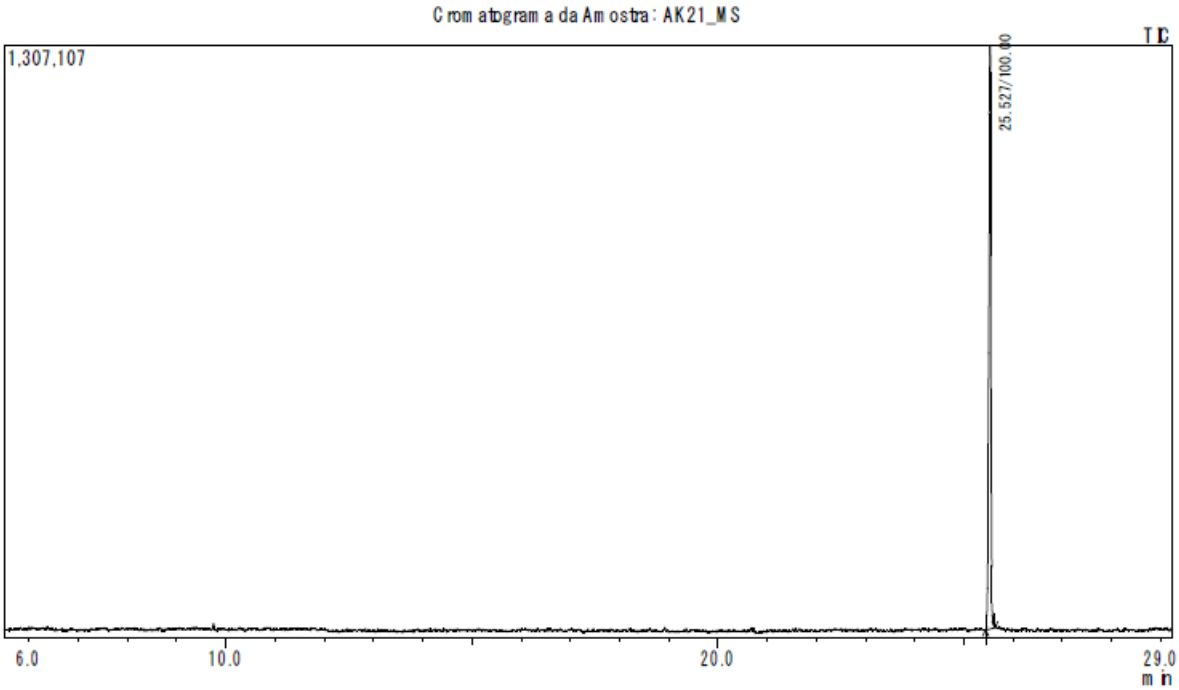


Tabela de Massas
Peak#:1 R.Time:25.275 (Scan#:2674)
Massa Pico:20
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int
1	41	6.07	5	56	2.43	9	83	1.17	13	96	3.42	17	112	2.30
2	42	5.79	6	69	2.50	10	84	5.28	14	98	100.00	18	113	1.73
3	44	3.63	7	70	4.10	11	85	1.98	15	99	6.96	19	121	2.25
4	55	6.11	8	77	1.15	12	91	2.45	16	111	7.06	20	320	2.31

Figura 76: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4l**



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	25.527	25.442	25.625	3647884	100.00	1285137	100.00	2.84		
				3647884	100.00	1285137	100.00			

Espectro MS

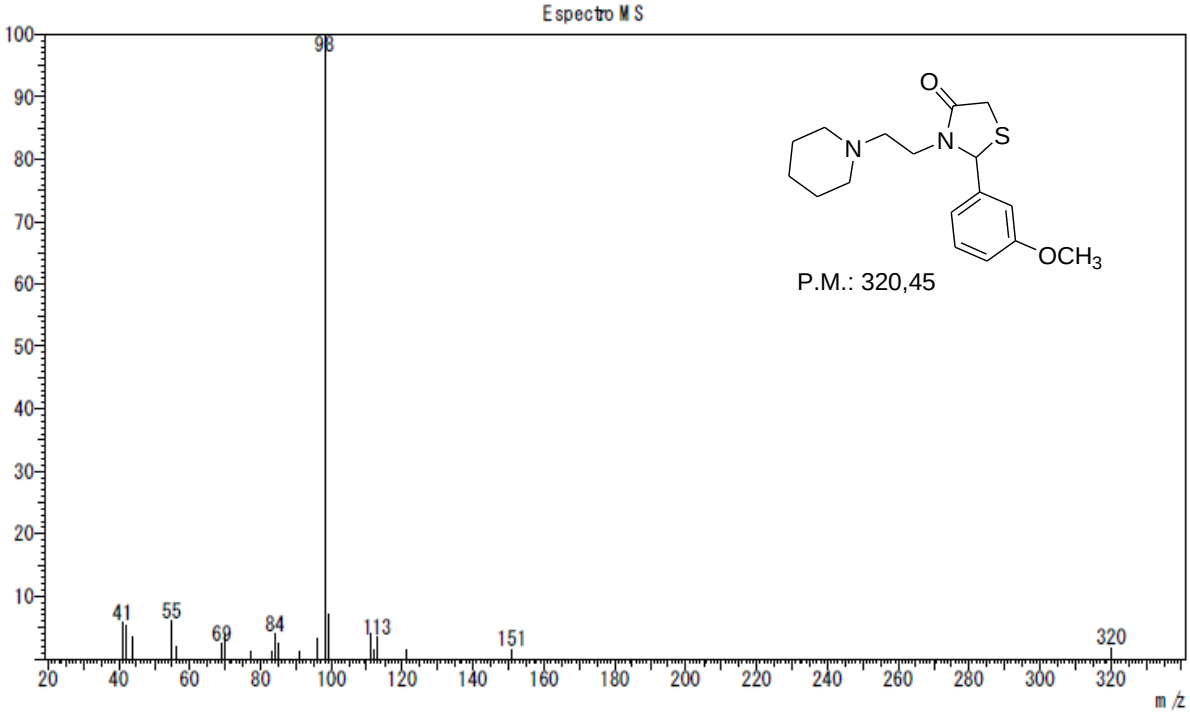
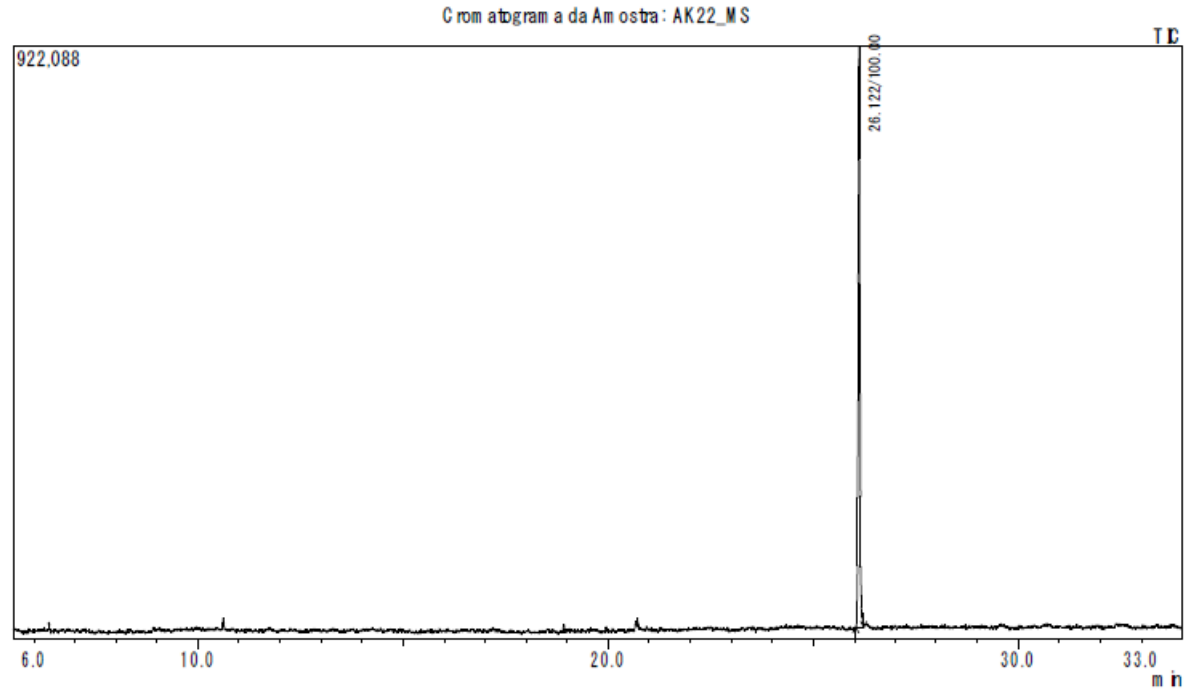


Tabela de Massas
Peak#:1 R.Time:25.525 (Scan#:2404)
Massa Pico:21
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int	#	m/z	Rel.Int
1	41	5.82	6	69	2.39	11	85	2.38	16	111	4.00	21	320	1.81
2	42	5.18	7	70	3.98	12	91	1.10	17	112	1.43			
3	44	3.46	8	77	1.06	13	96	3.18	18	113	3.43			
4	55	6.03	9	83	1.12	14	98	100.00	19	121	1.40			
5	56	2.00	10	84	3.88	15	99	7.12	20	151	1.53			

Figura 77: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4m**



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	26.122	26.042	26.233	2673292	100.00	902581	100.00	2.96	MI	
				2673292	100.00	902581	100.00			

Espectro MS

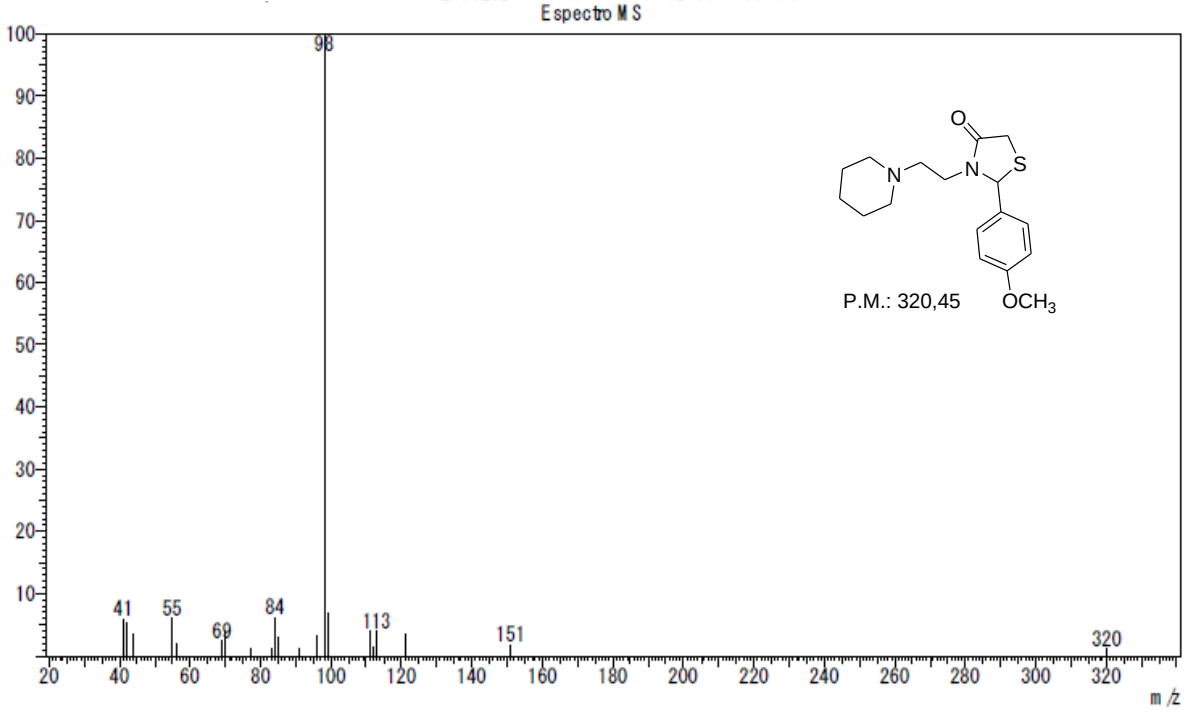
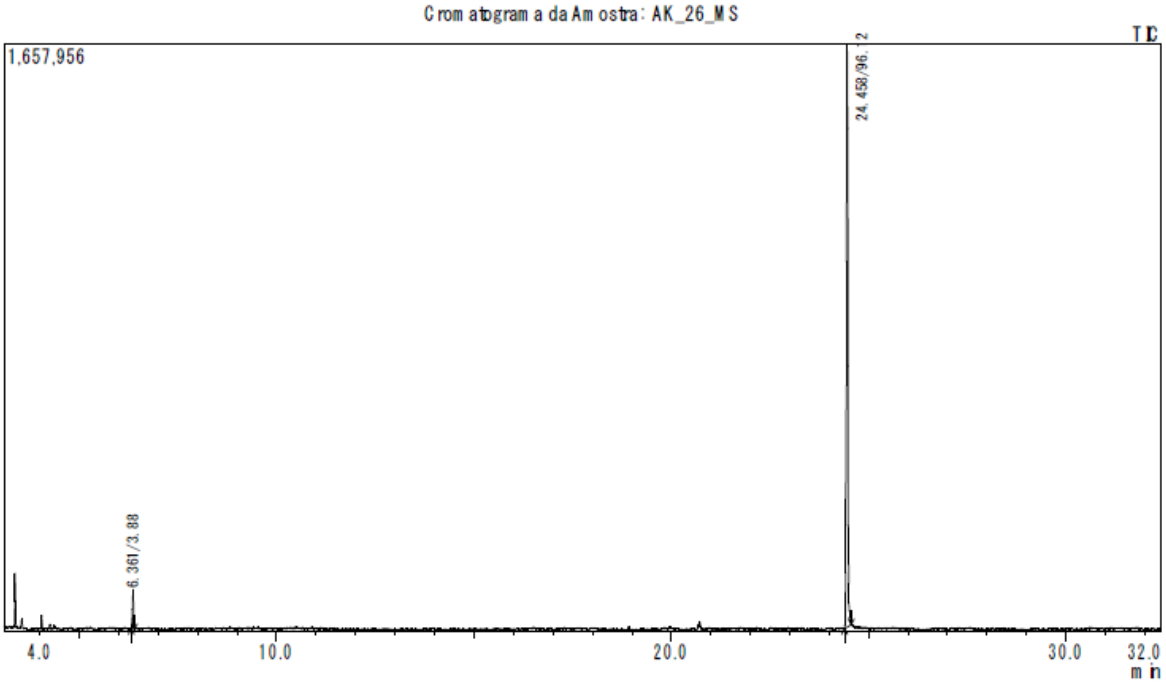


Tabela de Massas
Peak#:1 R.Time:26.125 (Scan#:2476)
Massa Pico:21
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.	#	m/z	Rel.Int.
1	41	5.91	6	69	2.41	11	85	3.01	16	111	3.95	21	320	1.14
2	42	5.24	7	70	4.06	12	91	1.22	17	112	1.50			
3	44	3.54	8	77	1.16	13	96	3.21	18	113	3.98			
4	55	5.97	9	83	1.08	14	98	100.00	19	121	3.43			
5	56	1.95	10	84	6.13	15	99	6.90	20	151	1.78			

Figura 78: Espectro de CG/ CG-MS da tiazolidinona **4n**



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Nome
1	6.361	6.325	6.400	163023	3.88	111243	6.34	1.47		
2	24.458	24.383	24.567	4035136	96.12	1643239	93.66	2.46		
				4198159	100.00	1754482	100.00			

Espectro MS

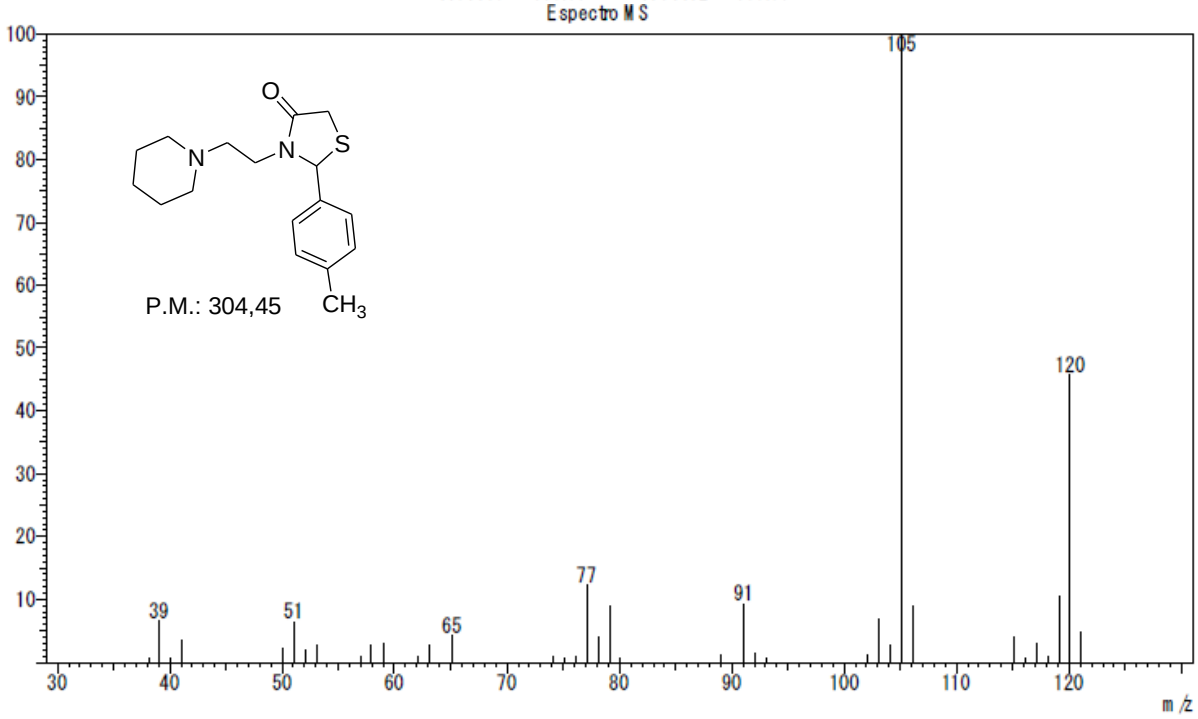


Tabela de Massas
Peak#:1 R.Time:6.358 (Scan#:392)
Massa Pico:37
Group 1 - Event 1

#	m/z	Rel Int	#	m/z	Rel Int	#	m/z	Rel Int	#	m/z	Rel Int	#	m/z	Rel Int	#	m/z	Rel Int
1	38	0.59	8	53	2.71	15	74	0.75	22	89	1.23	29	105	100.00	36	120	45.64
2	39	6.53	9	57	0.86	16	75	0.70	23	91	9.34	30	106	8.86	37	121	4.67
3	40	0.75	10	58	2.65	17	76	0.76	24	92	1.27	31	115	3.95			
4	41	3.57	11	59	3.07	18	77	12.17	25	93	0.55	32	116	0.75			
5	50	2.11	12	62	0.79	19	78	4.04	26	102	1.10	33	117	3.15			
6	51	6.43	13	63	2.85	20	79	8.91	27	103	6.88	34	118	0.84			
7	52	1.86	14	65	4.16	21	80	0.60	28	104	2.66	35	119	10.65			

Figura 79: Espectro de CG/ CG-MS tiazolidinona **4o**