



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS ARILIDENOS-TIAZOLIDÍNICOS

Raíssa Kelly Corrêa de Paiva^{1*}(PG), Luciana Machado Ramos¹ (PQ)

*raissakcpaiva@gmail.com

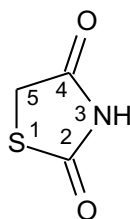
¹ UEG-CCET, Anápolis-Goiás, Brazil

Resumo: Os derivados do 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona obtidos via reação de condensação Knoevenagel representam uma importante e privilegiada classe de moléculas com distintas propriedades farmacológicas tais como: antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, anticancerígena, antioxidante, anti-hipertensiva entre outras. Em detrimento da ação biológica apresentada por esses derivados e, a multirresistência de bactérias e fungos a ação dos fármacos de uso clínico nos últimos anos, o interesse em torno da síntese e avaliação antimicrobiana do 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona aumentou consideravelmente. Diante do exposto o presente trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano e assim determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de dez distintas moléculas derivadas do 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona contra a cepa Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Os dados apresentados pelos compostos demonstraram o potencial antibacteriano dos compostos 3f com CMI de 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3j com CMI de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ambos os compostos apresentaram CMB $>500\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra o microrganismo teste.

Palavras-chave: 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona. Concentração Mínima Inibitória. Concentração Mínima Bactericida.

Introdução

Nas ultimas décadas as tiazolidina-2,4-diona (TZD) anel de cinco membros contendo dois heteroátomos, um átomo de enxofre posição 1 e um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonila na posição 2 e 4 (Figura 1) tornaram se alvo de pesquisadores, visto que seus derivados representam uma classe de compostos de grande interesse científico, em decorrência das suas propriedades químicas e biológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antiprotzoária, anti-retroviral, antiinflamatória e analgésico, antitumoral, dentre outras (MACCARI et al, 2014; SANCHEZ et al., 2006).

**Figura 1.** Núcleo da TZD.

Fonte. Adaptado de MACCARI et al 2014.

Dentre os derivados da TZD destaca-se os 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona obtidos preferencialmente através da condensação Knoevenagel de aldeídos aromáticos com a TZD (KUMAR et al., 2014; SINGH et al., 2012). Estas e outras aplicações biológicas destes derivados tornam o interesse nestes derivados cada vez maior (BOZDAG-DUNDAR et al., 2007; CANTELLO et al., 1994; LIESES et al., 2010; SOUZA et al., 2005).

O aumento recorrente de infecções causadas por bactérias e fungos multirresistentes aos muitos antibióticos comercialmente disponíveis tem se tornado uma preocupação mundial, visto que esta tem sido a causa de milhões de mortes no mundo, este fato observado pode ser atribuído à mutagenicidade destes agentes patógenos, provocada pela administração de múltiplos fármacos em pacientes hospitalizados, e em pacientes imunocomprometidos com câncer, AIDS ou transplantados (BROW, 2015; BLAIR et al., 2015).

Uma das análises antimicrobianas mais empregados para avaliar o potencial microbiano de novos agentes é a Concentração Inibitória Mínima (CIM), esse ensaio se baseia na avaliação da atividade antimicrobiana através da determinação de uma pequena quantidade de substância capaz de inibir o crescimento do microrganismo teste, este valor é definido como Concentração Mínima Inibitória (CMI) (Penna et al., 2001).

O teste de microdiluição gera uma economia de espaço, meios de cultura e reagentes, possibilitando a determinação quantitativa da CMI, sendo possível realizar várias repetições e diversas diluições uniformes dos compostos de origem sintéticos ou naturais (BONA et al., 2014).

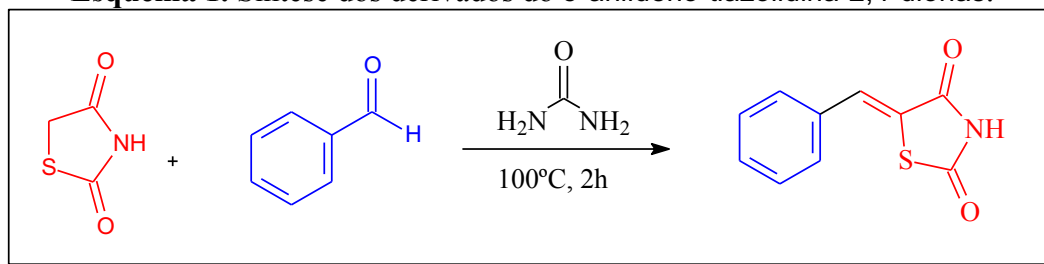
Diante do exposto o presente trabalho objetivou sintetizar e purificar derivados do 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona e submete-los a avaliação antimicrobiana e assim

determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) contra bactérias Gram-positiva.

Material e Métodos

A síntese dos derivados de 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona foi previamente realizada conforme esquema 1, em balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 1 mmol de ureia, 1mmolde TZD e aldeído, a mistura reacional foi mantida sob agitação constante durante o tempo de 2h a temperatura de 100°C. Através da metodologia empregada obteve-se 10 diferentes compostos os quais foram devidamente caracterizados por análises espectroscópicas: IV e RMN de ^1H e ^{13}C .

Esquema 1. Síntese dos derivados do 5-arilideno-tiazolidina-2,4-dionas.



Os derivados do 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona foram então submetidos a ensaio antimicrobiano. Foram utilizadas cepas-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) mantidas nos Laboratórios de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG). O Micro-organismo teste utilizado na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Inicialmente procedeu-se o Preparo do caldo Mueller Hinton: Dissolveu-se 33g de caldo MH em 1 litro de água destilada. A mistura foi esterilizada a 121°C em 1 atm por 15 minutos.

Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Foram utilizadas placas de microdiluição estéreis de 96 poços de fundo U. Os compostos foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) 5% e, diluídos em caldo MH de modo a obter as concentrações de 500,00; 250,00; 125,00; 62,5,00; 31,2,00;



15,62 e 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O mesmo procedimento foi utilizado para a determinação das CMI's do antibiótico padrão efetivo cloranfenicol (Inlab) nas concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra a bactéria Gram-positiva para validação de técnica. Estabeleceu-se os controles positivos sendo um de viabilidade bacteriana e outro com DMSO e os negativos o de esterilidade do meio e outro de esterilidade da amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Foram adicionados na microplaca 100 μL de caldo (MH) e 100 μL dos compostos nas concentrações previamente preparadas. Posteriormente, 5 μL do inóculo foram depositados em todos os orifícios da microplaca. A diluição final dos inóculos nos orifícios ficou em torno de $5 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$. As microplacas foram tampadas e mantidas em estufa à 35°C por 24 horas, após esse tempo, foi realizada a leitura visual e determinada a CMI dos compostos.

Determinou-se a CMI, como sendo a menor concentração do composto que inibiu o crescimento bacteriano, onde foi possível identificar a ausência de crescimento visível do micro-organismo teste.

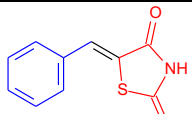
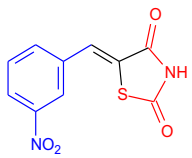
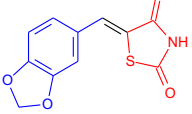
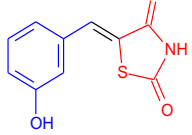
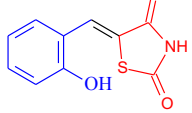
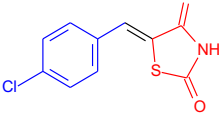
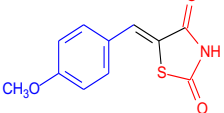
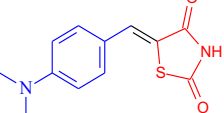
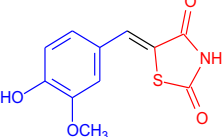
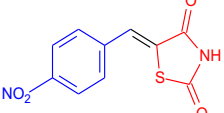
Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

Os valores da CMB foram determinados a partir da coleta de uma alíquota de 100 μL dos poços com ausência de crescimento e semeados em placas contendo ágar nutriente, as quais foram incubadas a 35°C por 24 horas. A CMB foi considerada como a menor concentração dos compostos que propiciaram a inibição (morte) total de crescimento bacteriano, ou seja, sem crescimento visível sobre o ágar.

Resultados e Discussão

A avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos derivados do 5-arilideno-tiazolidina-2,4-dionas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, estão disposto na tabela 1.

Tabela 1. Determinação da CMI e CMB dos derivados analisados:

código	Composto	CMI($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMB($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
3a		125	>500
3b		500	>500
3c		>500	>500
3d		125	>500
3e		125	>500
3f		62,5	>500
3g		125	>500
3h		>500	>500
3i		250	>500
3j		31,25	>500

*Os valores da CMI e CMB são dados em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O Cloranfenicol apresentando CMI entre 2-16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi utilizado como padrão para atividade anti-bacteriana.



Em geral, a CMI variou entre 31,25 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a *S. aureus* ATCC 29213 a variação das CMIs indicam esta como sendo a bactéria suscetível a ação dos derivados do 5-arilideno-2,4-tiazolidinodionas.

Os testes evidenciaram que alguns derivados 5-arilideno-2,4-tiazolidinodionas sintetizados apresentaram atividade antibacteriana, com destaque para os compostos 3f com CMI de 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3j com CMI de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ambos compostos apresentaram CMB $>500\mu\text{g.mL}^{-1}$, a ação antimicrobiana de acordo com os estudos realizados por Holetz e colaboradores (2002) prevê que os compostos que apresentarem valores de CMI até 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ desempenham promissora atividade antimicrobiana; CMI entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentam atividade antimicrobiana moderada e CMI entre 500 e 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentam fraca atividade, CMI acima de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, representa ausência de atividade antimicrobiana (HOLETZ et al., 2002).

Já os compostos (3a-e, 3g-i) apresentaram uma menor atividade antimicrobiana, os compostos (3a, 3d e 3g) apresentaram CMI de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de maneira geral, apresentaram discreta atividade microbiana. Os compostos 3c e 3h apresentaram CMI $>500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *S. aureus* ATCC 29213.

Considerações Finais

A metodologia empregada favoreceu a obtenção dos produtos de interesse e dessa forma possibilitou a avaliação do potencial antimicrobiano dos mesmos. Dois dos derivados do 5-arilideno-2,4-tiazolidinodionas sendo eles 3f e 3j CMI 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3j com CMI de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CMB $>500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 29213. Tais resultados denotam que estes compostos são bactericida, ou seja, atuam inibindo o crescimento do microrganismo teste. O método de determinação de CMI e CMB através da microdiluição em caldo é uma ótima opção para determinar a atividade antimicrobiana.

Agradecimentos

CAPES -FAPEG, CNPq, UEG, BolsaBIP e Pró-projeto pesquisa edital 026/2016.

Referências



BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V.; Molecular of mechanisms of antibiotic resistance, **Nature reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BONA, E. A. M., PINTO, F. G. S., FRUET, T. K., JORGE, T. C. M., MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

BROW, D. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void?, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 821-832, 2015.

BOZDAG-DUNDAR, O., OZGEN, O., MENTESE, A., ALTANLAR, N., ATLI, O., KENDI, E., ERTAN, R. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine- 2,4-dione derivatives, **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, n.18, p. 6012–6017, 2007.

CANTELLO, B.C.C., CAWTHORNE, M.A., COTTAM, G.P., DUFF, P. T., HAIGH, D., HINDLEY, R.M., LISTER, C.A., SMITH, S.A., THURLBY, P. L. [omega.-(Heterocyclilamino)alkoxy]benzyl]-2,4-thiazolidinediones as potent antihyperglycemic agents, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, n.23, p. 3977–3985, 1994.

HOLETZ, F.B., PESSINI, G.L., SANCHES, N.R., CORTEZ, D.A.G., NAKAMURA, C.V. and DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

KUMAR, K. S.; REDDY, B. M.; BABU, V. H. Synthesis of some novel 2, 4-thiazolidinedione incorporated pyrazole derivatives as anti cancer agentes, **International jornal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 6, p. 831-834, 2014.

LIESSE, A. P.; AQUINO, T. M.; CARVALHO, C. S.; LIMA, V. T.; ARAUJO, J.M.; LIMA, J. G.; Faria, A. R.; MELO, E. J.T.; ALVES, A. J. T.; ALVES, E. W.; ALVES, A. Q.; GOES, A. J. S. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4 – thiazolinones and 1,3,4 – thiadiazoles, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, n.9, p. 3685 – 3691, 2010.

MACARI, R.; VITALE, R. M.; OTANNÁ, R.; ROCCIOLI, M.; MARRAZZO, A.; CARDILE, A. C. E.; AMODEO, P., MURA, U.; CORSO, del A. Structureactivity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductaseinhibitors and potential anti-inflammatory agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 1 -14, 2014.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, MC.; MUÑOZ, JD.; CRUAÑES, J.;



FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V, Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p. 37-40, 2001.

SANCHEZ, R. A.; MONTAVON, F.; HARTUNG, T.; PAHLER, A. Thiazolidinedione Bioactivation: A Comparison of the Bioactivation Potentials of Troglitazone, Rosiglitazone, and Pioglitazone Using Stable Isotope-Labeled Analogues and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 1106 – 1116, 2006.

SINGH, P.; KUMARI, K.; DUBEY, M.; VISHVAKARMA, V. K.; MEHROTRAC, G. K.; PANDEY, N. D.; CHANDRA, R. Ionic liquid catalyzed synthesis of 7-phenyl-1,4,6,7-tetrahydro-thiazolo [5,4-d]pyrimidine-2,5-diones, **Comptes Rendus Chimie**, v.15, n.6, p. 504 – 510, 2012.

SOUZA, M. V. N.; FERREIRA, S. B.; Mendonça, J. S.; Costa, M.; Rebello, F. R. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos, **Química Nova**, v.28, n.1, p. 77-84, 2005.