



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA MAHLE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO PROTÓTIPO
N-ANTIPIRINO-3,4-DICLOROMALEIMIDA E SEUS DERIVADOS**

Itajaí – 2008.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

FERNANDA MAHLE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO PROTÓTIPO
N-ANTIPIRINO-3,4-DICLOROMALEIMIDA E SEUS DERIVADOS

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Itajaí, Agosto de 2008

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO PRÓTIPO N-ANTIPIRINO-3,4-DICLOROMALEIMIDA E SEUS DERIVADOS

Fernanda Mahle

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Dr. Alexandre Bella Cruz
Orientador

Dr^a. Tania Mari Bellé Bresolin
Coordenadora do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Dr. Alexandre Bella Cruz (UNIVALI)
Presidente

Dr^a. Fátima de Campos Buzzi (UNIVALI)
Membro

Dr^a. Tânia Ueda Nakamura (UEM)
Membro

Itajaí (SC), Agosto, 2008

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por ter me amparado com fé, sabedoria e serenidade em todos os momentos e por ter me guiado até aqui... Na conquista deste ideal!

Ao professor Dr. Alexandre Bella Cruz, receba meus sinceros agradecimentos pela orientação que me foi dada com muita competência, sabedoria e profissionalismo.

À professora MSc. Rosana Cé Bella Cruz pelos conhecimentos transmitidos na parte de micologia e também pela amizade e apoio durante o estágio em docência.

À professora Dra. Fátima de Campos Buzzi, pelo auxílio e ensinamentos nas estruturas químicas e principalmente pela participação na Banca de Qualificação, nos transmitindo valiosas sugestões que agregaram muito na concretização desta pesquisa.

Ao professor Dr. César Augusto Tischer pela participação na Banca de Qualificação, com considerações importantes na finalização deste estudo.

Ao NIQFAR (Núcleo de Investigações Químicas e Farmacêuticas) por gentilmente ter nos cedido as substâncias sintéticas empregada neste estudo.

A todos os meus colegas do mestrado, obrigada pelo coleguismo e pelos bons momentos compartilhados durante estes dois anos. Desejo também manifestar meu agradecimento em especial, às minhas colegas que se tornaram verdadeiras amigas, Francieli Goelzer, Nadir Vier, Taline Canto Tristão e Tânia Rosa, vocês são inesquecíveis, levarei vocês para sempre em meu coração! “Nenhum caminho é longo demais, quando um amigo nos acompanha”.

Aos meus colegas da Faculdade Senac de Chapecó, que muito me incentivaram para a realização desta conquista e em especial a Berenice do Prado Bueno que sempre me ofereceu sábios conselhos, dedicação e carinho com muita irmandade!

Por fim, registro aqui a minha gratidão para as pessoas que mais amo e admiro... Aos meus pais, pelo incentivo e exemplo de vida os quais me impulsionaram para a realização desta conquista. Vocês semeiam diariamente, o amor incondicional em nossa família, e essa é a maior dádiva da minha vida!

Aos meus irmãos, pela amizade e apoio, vocês são a luz e o exemplo do meu caminho! Ter vocês por perto é uma benção de Deus!

Ao meu namorado, pela paciência, compreensão, amor e acima de tudo incentivo... Obrigada por você tanto me ensinar sobre a vida e sobre o verdadeiro significado de se relacionar e compartilhar a existência.

A vocês, todo o meu amor e gratidão!

*"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida,
a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força,
determinação e sempre faça tudo com muito amor e
com muita fé em Deus, que um dia você chega lá.
De alguma maneira você chega lá."
Ayrton Senna*

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO PROTÓTIPO N-ANTIPIRINO-3,4-DICLOROMALEIMIDA E SEUS DERIVADOS

Fernanda Mahle

Agosto/2008

Orientador: Dr. Alexandre Bella Cruz
Área de Concentração: Microbiologia
Número de Páginas: 75

As imidas cíclicas destacam-se como promissoras moléculas, pois apresentam interessantes propriedades biológicas, tais como analgésica, antiespasmódica, antitumoral, antiinflamatória e principalmente antimicrobiana. As imidas cíclicas podem ser de origem natural, ou obtidas através da síntese orgânica. No presente trabalho, dezoito moléculas de imidas cíclicas pertencentes à subclasse das maleimidias, foram sintetizadas a partir do protótipo N-antipirino-3,4-dicloromaleimida, a fim de detectar a atividade antimicrobiana, bem como o potencial tóxico destas substâncias. Neste sentido, a determinação da atividade antibacteriana e antifúngica foi realizada através do método da diluição em ágar. Para a avaliação do potencial citotóxico, empregou-se o microcrustáceo *Artemia salina* e também a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. E para a detecção do potencial mutagênico, foi utilizado o teste Ames. Das dezenove maleimidias testadas, seis apresentaram atividade contra fungos leveduriforme e/ou dermatófito e/ou oportunista, sendo que a substância N-antipirino 3-cloro-4-[benzilamino maleimida] (19) foi a única que apresentou atividade aos três gêneros de fungos distintos. Não foi observado atividade antibacteriana para nenhuma das substâncias até a concentração máxima testada (100 µg/mL). Com relação ao potencial de toxicidade em *Artemia salina*, três maleimidias apresentaram toxicidade moderada (CL₅₀ entre 86,23 e 94,15 µg/mL), entretanto nenhuma destas substâncias apresentou atividade antimicrobiana. As demais substâncias, foram consideradas atóxicas (CL₅₀ > 250 µg/mL). No teste de toxicidade celular sobre *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que somente uma maleimida (07), apresentou potencial citotóxico, na maior concentração testada, 1000 µg/mL. Nenhuma das dezenove maleimidias estudadas apresentaram capacidade de indução mutagênica, pelo teste Ames até a concentração máxima testada (5 mg/mL). Desta forma fica evidenciado que as maleimidias se mostraram como uma interessante fonte de agentes antifúngicos e com baixo potencial tóxico.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, toxicidade, imidas cíclicas.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND TOXICITY OF PROTOTYPE N-ANTIPIRINO-3,4-DICHLOROMALEIMIDE AND ITS DERIVATIVES

Fernanda Mahle

AUGUST/2008

Supervisor: Alexandre Bella Cruz, Dr.
Area of Concentration: Microbiology
Number of Pages: 75

Cyclic imides have presented interesting biological properties, such as analgesic, antispasmodic, antitumoral, anti-inflammatory and in particular, antimicrobial effects. It can be obtained from natural sources, or through organic synthesis. In the present study, eighteen molecules of cyclic imides belonging to the subclass maleimides were synthesized from the prototype N-antipirino-3,4-dicloromaleimide, in order to evaluate the antimicrobial activity and toxicity potential of these substances. The antibacterial and antifungal activity was determined by the agar dilution method. To evaluate the toxicity, brine shrimp *Artemia salina* was used, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Finally, the mutagenic potential was determined, using the Ames' test. Amongst the nineteen maleimides tested, six presented activity against yeast and/or dermatophytes and/or opportunist fungi, and the substance N-antipirine 3-chlorine-4-[benzylamine maleimide] (19) was the only one that showed activity to the three types of fungi. No antibacterial activity was observed for the substances at the maximum tested concentration (100 µg/mL). Regarding the potential toxicity, of the nineteen substances, it was verified that three of them fitted the criteria used for moderated toxicity in *Artemia salina* (LC₅₀ since 86,23 to 94,15 µg/mL). However none of these substances presented antimicrobial activity. The other maleimides was considered atoxic (LC₅₀ > 250 µg/mL). In the cell toxicity using strains of *Saccharomyces cerevisiae*, it was observed that only maleimide 07 showed toxic potential at the maximum concentration used (1000 µg/mL). None of nineteen maleimides studied showed mutagenic capacity in the Ames test at the maximum tested concentration (5 mg/mL). Thus, maleimides proved to be an interesting source of antifungal agents with low toxic potential.

Key words: antimicrobial activity, toxicity, cyclic imides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Diferenças estruturais entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.</i>	17
Figura 2.	<i>Estrutura geral das Imidas cíclicas</i>	27
Figura 3.	<i>Estrutura geral das maleimidas</i>	29
Figura 4.	<i>Estrutura da 2-etil-3-metil-maleimido-N-B-D-Glucopiranosídeo, raro exemplo de maleimida natural</i>	29
Figura 5.	<i>Estrutura química da substância protótipo, N-antipirino-3,4-dicloromaleimida.</i>	34
Figura 6.	<i>Procedimento para hidratação e eclosão das larvas de Artemia salina.</i>	42
Figura 7.	<i>Metodologia empregada para avaliação do potencial citotóxico utilizando Artemia salina</i>	44
Figura 8.	<i>Processo para ativação do inóculo da levedura de Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Figura 9.	<i>Fluxograma da metodologia empregada no teste Ames</i>	46
Figura 10.	<i>Gráfico que relaciona a proliferação celular em UFC do padrão branco da levedura S. cerevisiae com a maleimida 07 na concentração de 1000 µg/mL em função do tempo de exposição</i>	56
Figura 11.	<i>Estrutura química da maleimida 07, denominada N-antipirino-3-cloro-4-[bromoanilino maleimida</i>	57

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1.</i>	<i>Maleimidas utilizadas para a avaliação de atividade antimicrobiana e potencial toxicológico</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 2.</i>	<i>Atividade antifúngica e propriedades químicas da molécula protótipo e de maleimidas com atividade biológica</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 3.</i>	<i>Maleimidas que apresentaram citotoxicidade frente Artemia salina.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 4.</i>	<i>Índice de mutagenicidade das dezenove maleimidas estudadas.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 5.</i>	<i>Médias do número de revertentes induzidas pelas maleimidas versus número de revertentes induzidas pelo controle negativo.....</i>	<i>60</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CMM – Concentração Microbicida Mínima

CL₅₀ – Concentração Letal de 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

IM – Índice de Mutagenicidade

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NIQFAR - Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2.1 OBJETIVO GERAL:	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS BACTÉRIAS.....	15
3.1.1 <i>Infecções bacterianas</i>	17
3.1.2 <i>Agentes antibacterianos</i>	18
3.1.3 <i>Resistência bacteriana</i>	20
3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS.....	22
3.2.1 <i>Infecções fúngicas</i>	23
3.2.2 <i>Agentes antifúngicos</i>	24
3.2.3 <i>Resistência antifúngica</i>	26
3.3 IMIDAS CÍCLICAS.....	27
3.3.1 <i>Propriedades biológicas das imidas cíclicas</i>	28
3.3.2 <i>Maleimidas e atividade antimicrobiana</i>	29
3.3.3 ANTIPIRINA	31
3.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	31
3.4.1 <i>Toxicidade sobre Artemia salina</i>	32
3.4.2 <i>Citotoxicidade sobre Saccharomyces cerevisiae</i>	32
3.4.3 <i>Genotoxicidade</i>	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	34
4.2 MATERIAL MICROBIOLÓGICO	36
4.2.1 <i>Meios de Cultivo</i>	37
4.2.2 <i>Manutenção dos microrganismos</i>	37
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
4.3.1 <i>Preparo dos inóculos</i>	38
4.3.1.1 Bactérias	38
4.3.1.2 Fungos leveduriformes.....	39
4.3.1.3 Fungos filamentosos	39
4.3.2 <i>Concentração inibitória mínima</i>	40
4.3.3 <i>Concentração microbicida mínima (CMM)</i>	41
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	41
4.4.1 <i>Ensaio com Artemia salina</i>	41
4.4.2 <i>Ensaio com Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.4.3 <i>Ensaio de genotoxicidade</i>	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	47
5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	49
5.3 CITOTOXICIDADE FRENTE ARTEMIA SALINA	53
5.4 TOXICIDADE FRENTE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	56
5.5 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE UTILIZANDO O TESTE AMES.....	58
6 CONCLUSÕES	62

1 INTRODUÇÃO

As infecções vêm ganhando destaque nas pesquisas da área da saúde, devido ao expansivo crescimento desta patologia. Tal fato pode ser explicado devido ao aumento no número de pacientes imunodeficientes, que são mais susceptíveis a adquirir infecções. Aliada a este contexto, inclui-se a resistência aos antimicrobianos que tem sido considerado um dos grandes problemas relacionados à saúde pública. E esta crescente resistência, ocorre não somente para as bactérias, mas também em fungos, parasitas e vírus (RUSSEL; CHOPRA, 1990; ZENTZ et al., 2002).

Assim, o número crescente de infecções e o surgimento de microrganismos resistentes aos fármacos já existentes, tornam a química medicinal imprescindível e essencial para a saúde pública, tornando-se um importante alicerce no incremento do arsenal terapêutico (CLARK, 2002; THOMAS, 2003). De acordo com Andricopulo et al. (1998) e Lima (2007), a química medicinal tem evoluído expressivamente, visto que em meio aos fármacos disponíveis no mercado farmacêutico, a síntese orgânica é responsável por 75% deles. Existem diversas classes de substâncias orgânicas inseridas neste conjunto, dentre as quais se ressalta as imidas cíclicas.

As imidas cíclicas podem ser de origem natural, ou obtidas através da síntese orgânica. Dividem-se em sub-classes como: maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas entre outras. No presente trabalho, dezoito imidas cíclicas pertencentes à subclasse das maleimidas, foram sintetizadas a partir do protótipo N-antipirino-3,4-dicloromaleimida. Dentre as propriedades biológicas desta classe, destacam-se o efeito antimicrobiano, antiespasmódico, antitumoral, antinociceptivo, antiinflamatório e analgésico, (CORRÊA et al., 1996; ORZESZKO, KAMINSKA, STAROSCIAK, 2002; ZENTZ et al., 2002; CECHINEL FILHO et al., 2003; PRADO, 2005; AZIZ-ABDEL, 2007). Assim, os estudos dessa classe de substâncias vêm sendo impulsionado pela necessidade de busca de novos fármacos para as patologias que ainda não possuem tratamento correspondente com uma terapia segura e também no desenvolvimento de novos tratamentos para combater a resistência microbiana já adquirida por alguns microrganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antimicrobiana e a toxicidade do protótipo N-antipirino-3,4-dicloromaleimida e dezoito derivados.

2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar a Concentração Inibitória e Bactericida Mínima das substâncias sintetizadas da subclasse das maleimidas.
- Determinar a Concentração Inibitória e Fungicida Mínima das substâncias sintetizadas da subclasse das maleimidas.
- Avaliar o potencial de toxicidade das substâncias sintetizadas, oriundas das maleimidas, através dos modelos experimentais usando o microcrustáceo *Artemia salina* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Avaliar o potencial genotóxico das substância sintetizadas, através do modelo experimental do teste Ames.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Características gerais das bactérias

As bactérias são células procarióticas, unicelulares, geralmente monomórficas, ou seja, sustentam uma única forma. A célula bacteriana apresenta várias estruturas que desempenham funções essenciais para o microrganismo. A membrana citoplasmática é composta por bicamada fosfolipídica formando uma barreira que serve para separar o citoplasma e o meio extracelular (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000; TRABULSI et al., 2005).

As bactérias podem ser divididas em duas importantes classes, Gram-positivas e Gram-negativas (figura 1). Essa classificação é baseada na reação de coloração destes microrganismos ao cristal violeta, através do método de Gram (RUSSELL; CHOPRA, 1990; TRASULBI et al., 2005).

As bactérias Gram-positivas possuem parede celular composta quase que basicamente (90%) por peptidoglicano. Além disso, encontram-se proteínas e o ácido teicóico que é composto por resíduos de glicerol formados por ligações de fosfodiéster. Dentre suas funções destacam-se a constituição de sítios receptores de bacteriófagos, a regulação da atividade das autolisinas durante a divisão celular, servindo como sítio de ligação entre o epitélio do hospedeiro em algumas bactérias patogênicas além de fazer parte da constituição de antígenos celulares, tornando possível a identificação sorológica de algumas bactérias (RUSSELL; CHOPRA, 1990; RANG et al., 2003; TRABULSI et al., 2005).

As bactérias Gram-negativas são mais complexas que as Gram-positivas. Sua parede celular é composta por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e outros três componentes que a envolvem, lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo. A lipoproteína tem como função estabilizar a membrana externa e ancorá-la a camada de peptidoglicano. A membrana externa possui uma dupla camada de lipídios, com moléculas de proteínas e lipoproteínas ligadas ao peptidoglicano na face interna da membrana em sua membrana externa encontra-se o lipopolissacarídeo, este que é capaz de conferir propriedade de patogenicidade nas bactérias. O lipopolissacarídeo é conhecido também como endotoxina, pois é

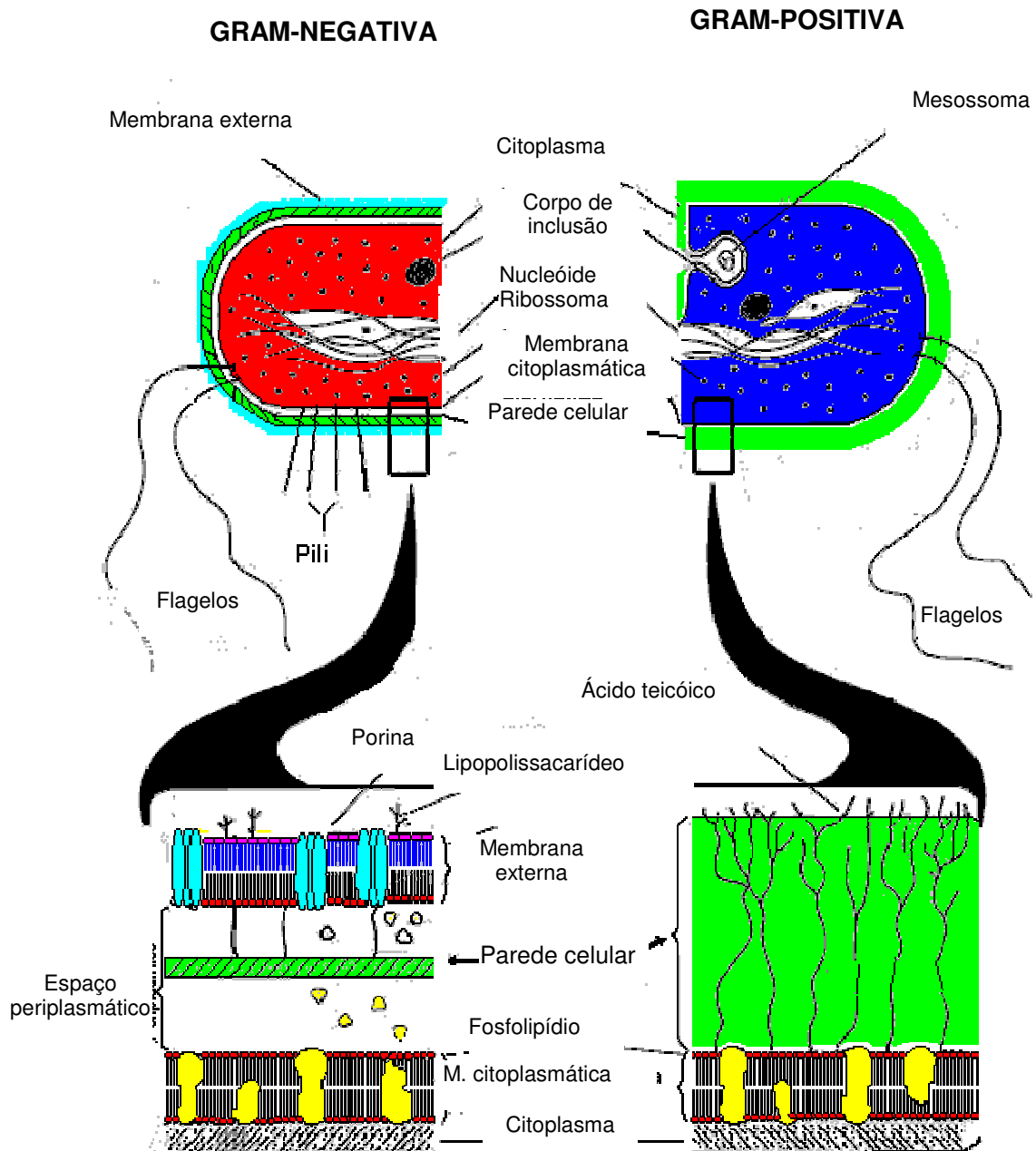
tóxico, sendo considerado um ativador nas reações inflamatórias de fase aguda (BLACK, 2002; TRABULSI et al., 2005).

Ainda relacionado aos fatores de virulência da bactéria, é válido enfatizar a presença de apêndices filamentosos, denominados fímbrias ou pili, que tem a capacidade de aderir-se as células do hospedeiro (MURRAY et al., 2002)

Entre a membrana citoplasmática e a membrana externa das bactérias Gram-negativas, encontra-se o espaço periplasmático, constituído de enzimas hidrolíticas que facilitam sua nutrição, proteínas de ligação que participam da obtenção de aminoácidos e açúcares a partir do meio e enzimas que inativam alguns agentes antibacterianos (MIMS; PLAYFAIR; ROITT, 1999; LEVINSON; JAWETZ, 2005).

Apesar das diferenças entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ambas apresentam um fator de virulência em comum, que é a formação de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Algumas bactérias conseguem construí-la, através da formação de uma camada viscosa fundada de polissacarídeos e proteínas. A cápsula age como um antígeno de superfície das bactérias, uma vez que confere resistência a fagocitose, dificultando a captura e a destruição das bactérias pelas células do sistema imunológico do hospedeiro (BLACK, 2002; MURRAY et al, 2002).

Entre os fatores diferenciais das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pode-se ressaltar que as bactérias Gram-negativas não possuem o ácido teicóico, além de possuir menor concentração de peptidoglicano, sendo que estas características as tornam mais suscetíveis à permeabilidade da membrana, quando comparadas às bactérias Gram-positivas (RUSSELL; CHOPRA, 1990; RANG et al., 2003).



Fonte: Adaptado de GONZALES; RAISMAN, 2008.

Figura 1: Diferenças estruturais entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

3.1.1 Infecções bacterianas

O corpo humano representa para as bactérias uma coleção de nichos ambientais, capazes de fornecer calor, umidade e alimento, essenciais para o crescimento bacteriano. Assim, a obtenção de características genéticas torna as bactérias capazes de penetrar no ambiente, ter acesso aos alimentos e também conseguir evadir-se do processo de eliminação pela resposta imunológica do

hospedeiro. Deste modo, toda essa adaptação que a bactéria realiza, pode resultar em danos e problemas à saúde do hospedeiro (MURRAY et al., 2002; FOXMAN, 2007).

É importante ressaltar que nem todas as bactérias causam enfermidades, para que a infecção seja estabelecida, a bactéria precisa primeiramente penetrar no corpo. O acesso das bactérias ao corpo é dificultada pelas barreiras naturais do hospedeiro, que são a pele, o muco, o epitélio ciliado e algumas secreções que produzem enzimas. Porém, pode ocorrer destruição dessas barreiras, proporcionando uma porta de entrada para as bactérias (MURRAY et al., 2002; LEVINSON; JAWETZ, 2005).

3.1.2 Agentes antibacterianos

O termo antibiótico significa literalmente “contra a vida”, são substâncias químicas produzidas a partir do metabolismo secundários de microrganismos como bactérias - especialmente os actinomicetos - ou os fungos, capazes de interferir em alguma estrutura essencial microbiana. Já os quimioterápicos são substâncias produzidas exclusivamente por síntese orgânica, não ocorrendo na natureza. Ambos podem exercer dois efeitos nas bactérias: bacteriostático ou bactericida. Os agentes bacteriostáticos impedem o crescimento da célula bacteriana, enquanto que os bactericidas matam a bactéria (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; YONEYAMA; KATSUMATA, 2006).

Os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química e o mecanismo de ação, sendo que a estrutura tem determinado o mecanismo de ação. Assim, de acordo com, Tavares (1993), Plorde (1994), Jawetz; Melnick; Adeleberg (2000), Rang e seus colaboradores (2003), Rossi; Andreazzi (2005), podem ser divididos em cinco categorias:

a) inibição da síntese da parede celular - A parede celular pode ser caracterizada como um envoltório externo à membrana citoplasmática, que tem por objetivo manter a forma e a rigidez celular, além de manter a hipertonicidade do meio interno. Outra função oportuna à parede celular está relacionada à reprodução binária da célula, cujo início, ocorre através da formação de um septo a partir da parede celular (TAVARES, 1993).

O mecanismo de ação dos fármacos que inibem a síntese da parede celular se dá através da inibição do estágio final da síntese do peptidoglicano, que é um componente vital da parede celular bacteriana. Assim, substâncias que interferem na sua síntese, seguramente produzirão um efeito destrutivo na bactéria. Uma vez que, sob ação desta classe de antimicrobianos, a parede celular apresenta defeitos estruturais, impedindo a rigidez e a proteção celular. A penicilina, bacitracina, vancomicina e novobiocina, são alguns dos agentes antimicrobianos presentes nessa classe (RUSSELL; CHOPRA, 1990; MIMS; PLAYFAIR; ROITT, 1999; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000).

b) inibição da função da membrana celular - A membrana citoplasmática age como uma barreira de permeabilidade seletiva e controla a composição interna da célula. Quando a integridade funcional da membrana é rompida, macromoléculas e íons evadem-se, ocorrendo a lesão ou morte celular (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000). As polimixinas são os exemplos desse mecanismo, na inibição da membrana celular. Estes fármacos possuem atividade detergente, penetrando na membrana externa para a membrana interna da bactéria. Assim, ocorre diminuição da integridade da membrana devido à perda de componentes essenciais citoplasmáticos e conseqüente morte bacteriana (PLORDE, 1994; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

c) inibição da síntese de proteínas - A biossíntese de proteínas é um processo metabólico essencial para a função celular. É catalisada por ribossomos, compostos por subunidades de nucleoproteínas, 30S e 50S (YONEYAMA; KATSUMATA, 2006). De acordo com Plorde (1994), os fármacos mais importantes dessa classe farmacológica são: Estreptomicina, Neomicina, Canamicina, Tobramicina, Amicacina e Tetraciclina. Todos possuem amplo espectro de ação, com atividade inclusive para cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

d) inibição da síntese de ácidos nucléicos.

A inibição da síntese de ácidos nucléicos ocorre através da ligação ao RNA polimerase ou inibição do DNA girase que são enzimas essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano, provocando um efeito bactericida no microrganismo (HEISIG, 2001; ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Segundo Trabulsi e colaboradores (2005), os fármacos presentes nessa classe são os derivados quinolônicos, as rifampicinas e o metronidazol.

Na terapêutica farmacológica, o destaque deste grupo é para as quinolonas, derivadas do ácido nalidíxico. Inicialmente, o espectro de ação deste fármaco, incluía somente atividade contra infecções urinárias não complicadas. No entanto, a incorporação da molécula de flúor na anel quinolônico, resultou num aumento da potência dos fármacos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Assim, um vasto número de fluoroquinolonas têm sido sintetizadas e testadas, a fim de aprimorar o potencial antibacteriano, pois as fluoroquinolonas representam a expectativa de produzir agentes antibacterianos capazes de tratar as mais variadas infecções bacterianas (GOOTZ, 1990; HEISIG, 2001).

e) inibidores do ácido fólico.

O ácido fólico é um derivado do ácido p-aminobenzóico (PABA), glutamato e unidade de pteridina, ele é necessário para alguns microrganismos, e a sua falta provoca um efeito bacteriostático. Assim, é o mecanismo de ação das sulfonamidas que competem com o ácido p-aminobenzóico, impedindo a síntese de ácido fólico (PLORDE, 1994; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

As sulfonamidas são análogos estruturais do PABA, possuem um amplo espectro de ação, incluindo patógenos como *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Escherichia coli* e *Chlamydia*. As sulfonamidas são empregadas sozinhas, ou em adjunto a Trimetropina para um efeito sinérgico (PLORDE, 1994; VOLK et al., 1996; RANG et al., 2003).

3.1.3 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana pode ser classificada como natural ou adquirida. A resistência natural corresponde a ausência de um processo metabólico afetado pelo agente antimicrobiano. Esta característica pode estar presente em uma espécie inteira ou em determinadas espécies. Em contrapartida a resistência adquirida ocorre por mecanismos distintos – que pode ser por mutação cromossômica do genoma bacteriano pré-existente, por transferência de DNA, bem como por diminuição da permeabilidade celular bacteriana (GOOTZ, 1990; COAST; SMITH, 2003; GOBENARDO, 2003; ROSSI; ANDREAZZI, 2005; TRABULSI et al., 2005; AL-HARONI, 2007).

Os principais mecanismos de resistência das bactérias são: inativação enzimática, alteração da permeabilidade da membrana, efluxo ativo de antibióticos e alteração do sítio de ligação do antibiótico (MIMS; PLAYFAIR; ROITT, 1999; HEISIG, 2001; COAST; SMITH, 2003; ROSSI; ANDREAZZI, 2005; AL-HARONI, 2008).

A inativação de fármacos antimicrobianos através de enzimas produzidas por microrganismo é o principal mecanismo molecular de resistência microbiana. Um dos exemplos mais evidentes é a produção de β -lactamases. Estas enzimas são produzidas no citoplasma e posteriormente, secretadas no espaço periplasmático, onde inativam os agentes antimicrobianos antes mesmo deles alcançarem o sítio alvo dentro da membrana (TAVARES, 1993; ANG; EZIKE; ASMAR, 2004; YONEYAMA; KATSUMATA, 2006).

A resistência também pode ocorrer devido à alteração da permeabilidade da membrana que modifica as proteínas dos poros, impedindo ou retardando a entrada de antibiótico. Este processo pode ocorrer através de dois distintos mecanismos: mutação estrutural bacteriana, e modificação da permease (RUSSEL; CHOPRA, 1990; STRATTON, 2002; AL HARONI, 2008).

Um dos mecanismos de resistência bacteriana mais complexo é o efluxo ativo de antimicrobianos, também conhecido como bomba de efluxo. Este mecanismo ocorre devido a produção de proteínas, que são capazes de reconhecer o fármaco, à medida que este atravessa a membrana bacteriana. Assim, antes mesmo do agente antimicrobiano ligar-se ao alvo, ocorre a remoção do fármaco no citoplasma celular bacteriano (BAMBEKE; BALZI; TULKENS, 2000; POOLE, 2001).

E por fim, a alteração do sítio de ligação do antimicrobiano acontece em decorrência da aquisição de novos genes, carregados por plasmídeos que resulta numa modificação enzimática do alvo natural que então é fechado para os antimicrobianos. Este processo físico-químico enfraquece a afinidade do fármaco pelo sítio, assim, ocorre prejuízo da atividade antimicrobiana (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; YONEYAMA; KATSUMATA, 2006).

Além de todos os mecanismos de resistência das bactérias citados acima, é muito importante caracterizar o precursor da resistência bacteriana, que é o uso indiscriminado e demasiado dos antibacterianos. Pois, seu uso repercute não somente no paciente que está fazendo o uso, mas também em outros pacientes e em toda a comunidade de uma forma geral, devido à seleção da microbiota

resistente. Assim, o uso racional é imprescindível para a saúde pública, pois toda essa situação representa um constante desafio terapêutico, no qual faz-se necessário uma conscientização de todos os profissionais da saúde o quanto é importante o uso racional e responsável dos antibióticos e quimioterápicos, pois o sucesso da antibioticoterapia só poderá ser alcançado através de uma prescrição individualizada, baseada numa conduta terapêutica ética e responsável (RUSSEL; CHOPRA, 1990; CAMARGO, 2003; COAST; SMITH, 2003; VISKVEEN, 2003; STEIN et al., 2004; ALANIS, 2005).

3.2 Características gerais dos fungos

Os fungos são classificados como seres eucarióticos, pois possuem membrana nuclear envolvendo o nucléolo e os cromossomos. Algumas estruturas como: parede celular, citoplasma e núcleo podem ser observados nas células fúngicas (MOREIRA; SIDRIM, 1999; MURRAY et al., 2005; TRABULSI et al., 2005).

A parede celular tem como função proteger a célula de possíveis choques osmóticos. É composta por glucana e mananas, e em menor quantidade por quitina, proteínas e lipídios. Sendo que a quitina é o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados e da parede celular fúngica. Os lipídios por sua vez, representam de 1 a 2% do peso celular. Os principais lipídios são os triacilgliceróis e os esteróis (KERN; BLEVINS, 1999; FISHER; COOK, 2001)

No citoplasma fúngico, encontram-se algumas organelas como: retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vesículas mitocondriais e vacúolos. As membranas fúngicas apresentam em sua composição química esteróis, que não são encontrados nas células bacterianas (LACAZ et al., 2002; LEVINSON; JAWETZ, 2005).

É no núcleo que se encontra o genoma fúngico formado por dupla fita de DNA ordenado em hélice. Além disso, também apresenta nucléolo, RNA, proteína e corpúsculo esférico contendo DNA, o qual é o sítio da produção do RNA ribossomal (MOREIRA; SIDRIM, 1999; SCHAECHTER, 2002; TRABULSI et al., 2005).

O reino fungi, compreende cerca de 50.000 espécies de fungos, sendo que sua grande maioria é benéfica aos seres humanos. Estes microrganismos são responsáveis pela produção de alimentos e bebidas alcoólicas, além de apresentam

características essenciais para o incremento da medicina, como no desenvolvimento de fármacos, agentes imunossupressores e metabólitos bioativos úteis. No entanto, também existem os fungos patogênicos, que causam as infecções fúngicas, conhecidas também como micose (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000).

3.2.1 Infecções fúngicas

Além das infecções bacterianas, existem também as infecções fúngicas, que são caracterizadas como micose. As micoses são classificadas de acordo com o sítio anatômico comprometido onde se localiza o agente patogênico. Assim, pode ser dividida clinicamente em: micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. É importante salientar que essa divisão é essencial para a conduta terapêutica (MOREIRA; SIDRIM, 1999; LACAZ et al., 2002).

As micoses superficiais e cutâneas geralmente são apresentadas num só grupo, porque contaminam as mesmas áreas corpóreas: pele, cabelos e unhas. Ambas, são designadas como as doenças infecciosas mais comuns. As micoses superficiais são assintomáticas e afetam as camadas superiores queratinosas da pele e cabelos. Comumente são causadas por *Malassezia furfur* e *Piedraia hortae*. Já as micoses cutâneas são sintomáticas, afetam as camadas epidérmicas e geralmente destroem mais os tecidos. O patógeno mais comum é a *Candida* sp (JOLY; BOLARD; YENI, 1992; KERN; BLEVINS, 1999; FISCHER; COOK, 2001).

A micose subcutânea pode ocorrer em casos de traumatismos com materiais contaminados e é transmissível através de picadas de inseto e mordida de animais. O microrganismo se mantém na pele do hospedeiro e produz uma infecção localizada no tecido subcutâneo e nos linfonodos da região. A lesão caracteriza-se por áreas duras crônicas, nodulosas e ulceradas. Este tipo de micose é originada principalmente pelos fungos *Cladosporium* e *Scedosporium* (KERN; BLEVINS, 1999; LACAZ et al., 2002; TRABULSI et al., 2005; FERREIRO et al., 2007).

As micoses sistêmicas acometem os principais sistemas corporais ou mais de um tipo de tecido ou órgão. Na maioria das vezes são originadas pelos microrganismos *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, respectivamente, decorrentes das fezes de pombos e morcegos (KERN; BLEVIN, 1999; TRABULSI et al., 2005).

3.2.2 Agentes antifúngicos

A terapêutica das micoses surgiu com o iodo, o ácido salicílico e o ácido benzóico. Atualmente, o arsenal terapêutico dispõe dos mais variados tratamentos tópicos e orais para tratar os diversos tipos de micoses (ZAITZ et al., 1998).

Devido a semelhança existente entre a célula fúngica e a célula humana, os fármacos empregados na terapêutica antifúngica podem ter ação tóxica sobre as células do hospedeiro. Assim, a seleção do antimicótico adequado é de extensa importância sendo que alguns fatores devem ser seguidos como o tipo de micose e o agente etiológico, a saúde geral do paciente, já em relação à terapia farmacológica, deve-se observar o mecanismo de ação e o espectro do fármaco escolhido, além do conhecimento da via de administração e os possíveis efeitos colaterais (MOREIRA; SIDRIM, 1999; TRABULSI et al., 2005). De acordo com Ghannoum e Rice (1999), Trabulsi e colaboradores (2005), os fármacos antifúngicos são classificados em três categorias distintas:

a) afetam a membrana celular - Derivados poliênicos e derivados imidazólicos são dois grupos que compõem a classe de fármacos que afetam a membrana celular. Os derivados poliênicos atuam interagindo com a membrana celular de modo irreversível, danificando suas funções e levando a perda de constituintes essenciais como potássio e açúcares. Os dois antifúngicos poliênicos mais utilizados na terapêutica são: anfotericina B e nistatina. O primeiro, é o fármaco de escolha em pacientes imunodeprimidos com micoses sistêmicas. O segundo citado é empregado topicamente para tratar candidíase oral e vaginal, devido ao fato de apresentar baixa absorção via gastrointestinal (ZAITZ et al., 1998; TRABULSI et al., 2005).

Os derivados imidazólicos representam um grande avanço na terapêutica das micoses superficiais e profundas, devido ao fato de atuarem na inibição da enzima fúngica 3A, pertencente ao citocromo P₄₅₀, a lanosina 14 α -desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol - principal esteroide presente nas células fúngicas. A escassez do mesmo promove interferência na ação das enzimas que estão associadas à membrana, resultando em inibição da replicação. O fármaco com maior destaque neste grupo é o cetoconazol, que possui baixa toxicidade para o homem, e é bem absorvido por via oral. É empregado para tratar candidíases, micoses profundas, dermatofitoses e pitíriase versicolor (JOLY; BOLARD; YENI, 1992; MOREIRA; SIDRIM, 1999).

Ainda com relação aos azólicos, encontram-se também os derivados triazólicos, que além de serem mais modernos e potentes, têm seu espectro de ação ampliado e menores efeitos colaterais. O fluconazol e o itraconazol revolucionaram o tratamento das onicomicoses, e tem sido empregados em micoses oportunistas. Além disso, podem ser empregados em associação com anfotericina B, auxiliando na manutenção do esquema terapêutico para alguns pacientes (ZAITZ et al., 1998; RANG et al., 2003).

b) atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais, como síntese de RNA, DNA ou proteínas - A griosefulvina é um antibiótico fungistático de pequeno espectro, isolado a partir de culturas *Penicillium grioseofulvum*. O mecanismo de ação deste fármaco consiste em penetrar na célula fúngica, através de um processo denominado energia-dependente, interagindo com os microtúbulos gerando inibição do processo de mitose e multiplicação do microrganismo, em decorrência do rompimento do fuso mitótico. É utilizado excepcionalmente para micoses dermatofíticas, provocadas pelos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (SIDRIM; MOREIRA, 1999; RANG et al., 2003).

A fluocitosina é uma pirimidina fluorada sintética, empregada no tratamento de micoses sistêmicas e meningites, sendo que sua eficácia ocorre principalmente em leveduras. Este fármaco geralmente é associado à anfotericina B na terapia farmacológica, devido a alta prevalência de resistência primária. A fluocitosina age no interior da célula fúngica, auxiliada pela enzima permease. Quando inserida na célula, é convertida a 5-fluoracil, inibindo o timidilato sintetase (enzima envolvida na síntese do DNA e divisão nuclear) e conseqüentemente, a síntese de DNA (GHANNOUM; RICE, 1999).

c) atuam interferindo na síntese da parede celular - As equinocandinas formam um grupo de moléculas lipídicas, capaz de inibir a síntese de $\beta - 1,3$ glucano, o qual é um componente essencial na parede celular da maioria dos fungos, e se faz ausente na célula hospedeiro humana, o que garante uma seletividade de ação. A instabilidade osmótica celular provocada pela inibição da $\beta - 1,3$ glucano, promove a morte celular fúngica. Até o momento, a Caspofungina, a Micafungina e a Anidulafungina, são os fármacos pertencentes a este grupo que foram aprovados para uso clínico (SHAO; HUANGA; HSUEH, 2007).

3.2.3 Resistência antifúngica

Pode-se dizer que um agente antifúngico está resistente a um fungo, quando há continuidade no crescimento fúngico e sintomas clínicos da doença ainda evidenciados, perante o uso do antimicótico em concentrações máximas. Devido ao crescente número de pacientes imunodeficientes e o uso de antibacterianos mais potentes a resistência antifúngica ficou ainda mais evidenciada nas últimas décadas (ZAITZ et al., 1998; GHANNOUM; RICE, 1999).

De acordo com Zaitz et al. (1998) e Rogers (2006) três categorias distintas de resistência antifúngica podem ser encontradas em pacientes. Quando o paciente é colonizado por um microrganismo, que não seja coberto pelo espectro do antifúngico empregado, denomina-se resistência primária, intrínseca ou inata. Por sua vez, resistência seletiva é classificada de modo que o paciente é infectado por várias cepas, assim, no decorrer do tratamento os microrganismos mais sensíveis são abolidos, todo este processo favorece a seleção e o crescimento dos mais resistentes. E finalmente, quando a cepa infectante, primeiramente sensível, após sofrer mutação, tornar-se resistente, e esse mecanismo é o da resistência secundária ou adquirida.

Espécies de *Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de *Aspergillus* têm sido os microrganismos mais associados com as infecções invasivas, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Ainda, aliado a essa situação, o uso indiscriminado de antimicóticos têm se ampliado, favorecendo o desenvolvimento da resistência aos antifúngicos. Esta conjuntura é agravada pela dificuldade no desenvolvimento de um novo fármaco antimicótico de amplo espectro, que possua desprezível toxicidade e mecanismo de ação distinto dos fármacos já empregados na terapêutica atualmente. E o mais relevante, é considerar que tanto os fungos, quanto seus hospedeiros, são organismos eucarióticos, assim, várias vias metabólicas e estruturas celulares são equivalentes entre si (ZAITZ et al., 1998; ROCHA, 2002).

Deste modo, inserido ao contexto da incessante busca por novos fármacos, as imidas cíclicas emergem como possíveis aspirantes à novos fármacos (CECHINEL FILHO et al., 2003).

3.3 Imidas cíclicas

As imidas cíclicas formam uma ampla classe que pode ser de origem natural ou obtida através da síntese orgânica, resultante da reação entre ácidos dicarboxílicos e amônia, com liberação de água ou pela reação entre anidridos cíclicos e diferentes aminas. Sua estrutura química, conforme pode ser visualizado a seguir, compreende o grupo -CO-N(R)-CO- ; sendo R, um átomo de hidrogênio, grupo alquila ou grupo arila (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970; CECHINEL FILHO et al., 2003; PRADO et al., 2004; PRADO, 2005; COSTA, 2006; GUIMARÃES, 2006). Esta classe apresenta boa solubilidade em acetona, porém para os estudos biológicos, sua solubilização é realizada com dimetilsulfóxido (DMSO) (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970).

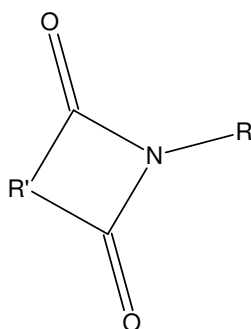


Figura 2: Estrutura geral das imidas cíclicas

As imidas cíclicas podem ser classificadas em diversas subclasses, como: maleimidas, succinimidas, ftalimidas, naftalimidas, glutarimidas entre outras, que de acordo com vários pesquisadores, apresentam bom perfil de aplicabilidade terapêutica (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970; CECHINEL FILHO et al., 2003; PRADO, 2005). Um dos fármacos mais conhecidos, reportado a esta classe, é a talidomida, a qual possui estrutura molecular derivada da ftalimida (PRADO, 2005). Segundo Cechinel Filho e colaboradores (2003), a talidomida é considerada a primeira molécula de grande proeminência entre as imidas cíclicas. Apesar dos efeitos adversos relatados no passado, envolvendo má formação congênita, a talidomida tem ressurgido na área da pesquisa científica, como um possível fármaco para o tratamento de indivíduos com câncer, apresentando atividade contra mieloma

avançado, inclusive para pacientes com mieloma múltiplo. Atualmente, outros fármacos oriundos das imidas cíclicas também se destacam na terapêutica clínica, como a buspirona, agente ansiolítico (BOJARSKI et al., 2004), a aminoglutetimida, fármaco inibidor da biossíntese de esteróides, empregado no tratamento de carcinoma mamário (JINDAL et al., 2005) e “ethosuximide” agente anticonvulsivante (GOREN; ONAT, 2007).

3.3.1 Propriedades biológicas das imidas cíclicas

O estudo das imidas cíclicas foi impulsionado através do isolamento de um alcalóide natural conhecido como filantimida, procedente das partes aéreas do *Phyllanthus sellowianus*. Este alcalóide com um anel glutarimida, que devido as suas atividades biológicas já comprovadas, tais como: antimicrobiana, antiespasmódico e analgésico tem sido empregado como protótipo na síntese de análogos (CECHINEL FILHO et al., 1994; CORRÊA et al., 1996; ZENTZ et al., 2002; CECHINEL FILHO et al., 2003; PRADO, 2005).

As imidas cíclicas têm demonstrado uma série de atividades biológicas, como anticonvulsivante (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970; FLAIH; PHAM-HUY; GALONS, 1999), analgésica (ANDRICOPULO et al., 2000; CECHINEL FILHO et al., 2003; PRADO et al., 2004; COSTA, 2006), ansiolítica (KOSSAKOWSKI; JAROCKA, 2001; AZIZ-ABDEL, 2007), antiinflamatória (AZIZ-ABDEL, 2007) , antitumoral (PRADO et al., 2004; AZIZ-ABDEL, 2007), antiespasmódica (LIMA et al., 1999; MEDERSKI et al., 2003) antigotosa (HALL et al., 1990) e também antibacterianas e antifúngicas (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970; CECHINEL FILHO et al., 1994; CECHINEL FILHO et al., 1996; CORRÊA et al., 1996; ORZESZKO et al., 2000; ORZESZKO; KAMINSKA; STAROSCIAK, 2002; ZENTZ et al., 2002; AQUINO et al., 2003; CECHINEL FILHO et al., 2003; PRADO et al., 2004; PRADO, 2005; COSTA, 2006; AZIZ-ABDEL, 2007; SORTINO et al., 2008).

Ressalta-se que dentre as subclasses das imidas cíclicas, as maleimidias são as substâncias que se destacam frente aos efeitos antibacterianos, antifúngicos e inseticidas quando comparadas com a subclasse das succinimidias. Dados da literatura mostram que tais propriedades biológicas estão relacionadas com a dupla ligação imídica (segundo pode ser visualizado na figura a seguir); característica esta,

que é peculiar das maleimididas (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970; CECHINEL FILHO et al., 2003; ZENTZ et al., 2004; PRADO, 2005).

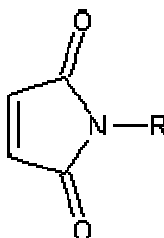
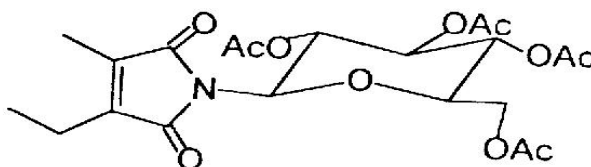


Figura 3: Estrutura geral das maleimididas

Assim, visto que todas as substâncias utilizadas neste trabalho pertencem à subclasse das maleimididas, faz-se necessário um estudo mais detalhado sobre as mesmas, conforme é descrito a seguir.

3.3.2 Maleimididas e atividade antimicrobiana

Bem como as imidas cíclicas em geral, as maleimididas também podem ser oriundas da natureza. Embora seja incomum acontecer, as folhas isoladas da mangosta (*Garcinia mangostana*), é um raro exemplo de maleimida natural, denominado 2-etil-3-metil-maleimido-N-β-D-glucopiranosídeo (PRADO, 2005), que pode ser visualizado na figura 4.



Fonte: PRADO, 2005.

Figura 4: Estrutura da 2-etil-3-metil-maleimido-N-β-D-Glucopiranosídeo, raro exemplo de maleimida natural

Em um estudo recente realizado por Sortino (2008) e colaboradores, foi avaliada a estabilidade e a interação de maleimidas e seus relativos ácido âmicos contra *Candida* sp., analisando a possibilidade da hidrólise do anel imídico no meio de cultivo. Desta forma, os resultados indicaram que a hidrólise é negligenciável no tempo necessário ao teste.

As maleimidas inseridas neste estudo foram obtidas através de síntese química, pois, é um meio de obtenção fácil, além de possuir um rendimento de moderado a ótimo (45-95%) associado a rotas sintéticas viáveis (ANDRICOPULO et al., 1998; GUIMARÃES, 2006; CAMPOS-BUZZI, 2007).

Recentemente, Sortino (2008) e seus colaboradores descreveram que N-fenilalquil maleimida apresentou uma excelente atividade antifúngica frente a *Candida albicans*. Na qual, sua CIM (Concentração Inibitória Mínima) obteve valores similares a fármacos utilizados na terapêutica, como a Anfotericina B e Cetoconazol.

Na pesquisa desenvolvida por Aquino et al. (2003) a substância 3,4-dicloro N fenilpropilmaleimida produziu atividade antifúngica sobre o crescimento dos fungos *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*.

Lima e seus colaboradores (2002), descreveram as maleimidas 3,4-dicloro-N-fenilmaleimida e 3,4-dicloro-N-fenilpropilmaleimida, como promissoras na atividade antifúngica contra *Malassezia furfur*.

Com relação à atividade antibacteriana, as maleimidas também apresentam bons resultados. Zentz e seus colaboradores (2002) descreveram que, N-propilmaleimida, N-isopropilmaleimida e N-butilmaleimida, apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*. Bella Cruz e colaboradores (1996), relataram que a N-arildicloromaleimida também apresentou bons resultados, contra as bactérias *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva).

Assim, diante de todos estes favoráveis resultados, as maleimidas apresentam-se como prováveis novos agentes terapêuticos, despertando na comunidade científica o anseio de estudá-las ainda mais (ANDRICOPULO et al., 1998; CECHINEL FILHO et al., 2003).

3.3.3 Antipirina

Levando em consideração que as maleimidias em estudo apresentam em sua estrutura um núcleo antipírinico acoplado ao anel imídico, faz-se necessário uma breve abordagem sobre este grupo químico – o núcleo antipírinico.

O núcleo antipirina possui algumas propriedades farmacológicas amplamente descritas, como analgésica, antiinflamatória e sedativa (TURAN-ZITOUNI et al., 2001). Esta substância é análoga à dipirona, que é um dos analgésicos mais importantes da terapêutica brasileira (CAMPOS-BUZZI, 2007).

Além das propriedades já elucidadas dessa classe, observa-se que novos testes estão sendo realizados, no anseio da descoberta de novas propriedades biológicas dessa classe, incluindo a atividade antimicrobiana, conforme é descrito a seguir.

Embora Cunha e colaboradores (2005), não tenham encontrado atividade antibacteriana para derivados da 4-aminoantipirina, recentemente Bondock e colaboradores (2008), descreveram que a adição do núcleo antipirínico na posição 3, às moléculas cumarínicas em estudo, promoveu aumento da atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*. Dessa forma, a avaliação de moléculas híbridas imido-antipirino tornam-se alvo de interesse na descoberta de novas substâncias bioativas.

3.4 Avaliação toxicológica

A avaliação toxicológica compreende uma série de dados que podem ser obtidos por meio de microrganismos e animais de laboratório, ou até mesmo em seres humanos através dos registros de intoxicação, visando classificar toxicologicamente uma substância química. Deste modo, pode se elucidar que é um bioensaio preliminar e essencial no estudo de substâncias com atividade biológica a fim de avaliar suas possíveis interações químicas com o organismo (CAVALCANTE et al., 2000; SOUZA et al., 2003; MIGUEL; BOSCO, 2005).

Dentre as metodologias empregadas para realizar a avaliação toxicológica, no presente trabalho serão abordados a toxicidade com *Artemia salina* e *Saccharomyces cerevisiae* e a genotoxicidade, avaliada utilizando o teste de Ames.

3.4.1 Toxicidade sobre *Artemia salina*

A avaliação de toxicidade geral é considerada fundamental como bioensaio preliminar no estudo de substâncias com propriedades biológicas. Deste modo, utiliza-se organismos simples para o monitoramento da resposta biológica, existindo apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida (CAVALCANTE et al., 2000; LHULLIER; HORTA; FALKENBERG 2006). Neste sentido, pode-se empregar larvas do microcrustáceo *Artemia salina* como um indicador de toxicidade.

Cavalcante e seus colaboradores (2000), relataram que em 1956 surgiu a primeira publicação de um trabalho utilizando a *Artemia salina*, deste então, inúmeras pesquisas tem sido desenvolvidas para os mais variados fins, como triagem para detecção de toxinas fúngicas, toxicidade de algas marinhas, avaliação da toxicidade de materiais dentários, bem como a toxicidade de substâncias com propriedades biológicas (CARBALLO et al., 2002; LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

3.4.2 Citotoxicidade sobre *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, também tem sido utilizada como um bio indicador de toxicidade. Através do estado fisiológico da célula e a mudança na razão de proliferação celular (crescimento padrão celular na fase logarítmica), é possível determinar a toxicidade de uma substância testada (INVITTOX, 2008; LETAVAYOVÁ et al., 2008).

Este bioensaio é formidável, visto que os resultados obtidos com as células eucarióticas da levedura em estudo, podem ser considerados equivalentes para células humanas, uma vez que os mecanismos moleculares envolvidos são semelhantes (DEL RIO, 2004; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005).

3.4.3 Genotoxicidade

Segundo Rang e colaboradores (2003), mutação pode ser definida a partir de uma alteração no genótipo de uma célula que é transmitida quando a célula se

divide. As mutações ocorrem por modificação covalente no DNA. Vários estudos têm evidenciado que as mutações, seja em células somáticas ou células germinativas, são capazes de desenvolver casos de câncer, doenças hereditárias, anemia e até mesmo interferência no processo de envelhecimento (MARON; AMES, 1983).

Um dos testes mais empregados em protocolos internacionais para avaliar a atividade mutagênica é o teste de Ames. Este bioensaio, caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium*, auxotrófico para histidina e biotina e sensíveis a substâncias capazes de induzir mutações. Na presença de agentes com capacidade mutagênica, estas linhagens reverterem seu caráter auxotrófico (ou seja, não se desenvolve em meio mínimo, requerendo para seu crescimento a adição de uma substância específica) de aminoácido e passam a formar colônias em um meio desprovido de aminoácidos. Desta forma, é possível estabelecer o potencial de indução mutagênica da substância teste em função de sua concentração, através da contagem de colônias revertentes na placa contendo as substâncias testes, bem como nas placas em que se emprega o controle positivo (azida sódica) e o controle negativo (dimetilsulfóxido) (INVITTOX, 1992; FRATIANNI et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das substâncias

Foram utilizadas dezenove substâncias obtidas por síntese, da classe das maleimidas. As substâncias foram sintetizadas pela acadêmica do curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, Tatiana da Rosa Guimarães, sob orientação da professora Dr^a. Fátima de Campos Buzzi, pertencente ao grupo NIQFAR (Núcleo de Investigação Químicas e Farmacêuticas).

Dentre as substâncias testadas, o protótipo sintetizado pode ser observado na figura abaixo e é denominado N-antipirino-3,4-dicloromaleimida (01). A partir deste, dezoito derivados foram sintetizados (listados na tabela 1) procedendo a reação de substituição do átomo de cloro por diferentes aminas aromáticas.

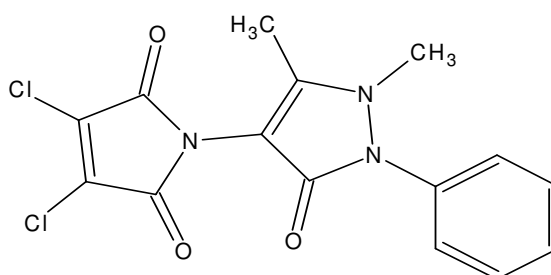


Figura 5: Estrutura química da substância protótipo, N-antipirino-3,4-dicloromaleimida

Tabela 1: Relação das maleimidias utilizadas para a avaliação de atividade antimicrobiana e potencial de toxicidade.

Sigla	Substância
01	N-antipirino-3,4-dicloromaleimida
02	N-antipirino-3-cloro-4-[anilino maleimida]
03	N-antipirino-3-cloro-4-[3,4-dicloroanilino maleimida]
04	N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloroanilino maleimida]
05	N-antipirino-3-cloro-4-[4-metóxianilino maleimida]
06	N-antipirino-3-cloro-4-[4-metilanilino maleimida]
07	N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida]
08	N-antipirino-3-cloro-4-[4-fluoroanilino maleimida]
09	N-antipirino-3-cloro-4-[4-etilanilino maleimida]
10	N-antipirino-3-cloro-4-[3-nitroanilino maleimida]
11	N-antipirino-3-cloro-4-[4-carboxianilino maleimida]
12	N-antipirino-3-cloro-4-[3-carboxianilino maleimida]
13	N-antipirino-3-cloro-4-[3-cloroanilino maleimida]
14	N-antipirino-3-cloro-4-[3-metilanilino maleimida]
15	N-antipirino-3-cloro-4-[3-metoxianilino maleimida]
16	N-antipirino-3-cloro-4-[3,5-dimetilanilino maleimida]
17	N-antipirino 3-cloro-4-[3,5-dimetoxianilino maleimida]
18	N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloro-3-nitroanilino maleimida]
19	N-antipirino 3-cloro-4-[benzilamino maleimida]

4.1.1 Cálculo do Log P das maleimidias em estudo

A lipofilidade pode ser obtida através do cálculo de *Log P* que expressa a afinidade da molécula pela fase aquosa e orgânica. Assim, um fármaco deve apresentar ambas as propriedades e afinidades para que possa promover sua ação biológica (JORGE, 2007; PEREIRA, 2007).

No que diz respeito ao estudo de relação estrutura atividade e permeação de fármacos, o coeficiente de partição *Log P* é considerado um dos parâmetros mais importantes deste contexto (LIMA, 2007). Desta forma, com base no prognóstico, o cálculo do *Log P* do protótipo N-antipirino-3,4-dicloromaleimida e seus derivados, foram calculados pela professora Dr^a. Fátima de Campos Buzzi, pertencente ao NIQFAR, utilizando o Programa ChemSketch 10.0, freeware, disponível no seguinte endereço eletrônico: <<http://www.acdlabs.com/download>>.

De acordo com Lipinski e colaboradores (2001) e Duchowicz e colaboradores (2007), dentre os itens que compõe a Regra de Lipinski, consta que o valor de *Log P* ideal deve ser abaixo de 5, a fim de que a substância possa penetrar nas membranas promovendo seu efeito farmacológico.

4.2 Material microbiológico

Os microrganismos que foram utilizados para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, foram as bactérias:

- *Escherichia coli* (ATCC 11775)
- *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028)
- *Proteus mirabilis* (ATCC 25933)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P)
- *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 35552)
- *Streptococcus agalactie* (ATCC 13813)
- *Bacillus cereus* (ATCC 14579)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 2385)

Os fungos leveduriformes utilizados para atividade antifúngica foram:

- *Candida albicans* (ATCC 10231)
- *Candida krusei* (ATCC 6582)
- *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264)

Para a avaliação de citotoxicidade, foi usada a levedura:

- *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763)

Todos os microrganismos listados acima foram fornecidos pela “Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello”, Campinas, São Paulo.

Os fungos filamentosos empregados na avaliação de atividade antifúngica foram:

- *Aspergillus flavus* (ATCC 9170)

- *Aspergillus fumigatus* (ATCC 26934)
- *Aspergillus niger* (ATCC 9092)
- *Rhizopus* sp (CL 35)
- *Microsporum canis* (C112)
- *Microsporum gypseum* (C115)
- *Trichophyton rubrum* (ATCC 9972)

Os fungos filamentosos foram fornecidos pelo Centro de Referência Micológica (CEREMIC), Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas de Rosário, Argentina.

4.2.1 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo empregados para os ensaios de atividade antimicrobiana e toxicidade foram:

- Ágar Mueller-Hinton (Merck)
- Ágar Nutriente (Merck)
- Ágar Nutriente n. 2 (Oxoid)
- Ágar Sabouraud dextrosado (Difco)
- Ágar de Superfície [cloreto do sódio 0,5%, ágar 0,6%]
- Caldo Nutriente n. 2 (Oxoid)
- Ágar Completo [glicose 2%, extrato de levedura 1%, peptona 0,5%, ágar 1,5%]
- Caldo Completo [glicose 2%, extrato de levedura 1%, peptona 0,5%]
- Ágar Davis [sulfato de magnésio 0,01%, citrato de sódio 0,05%, fosfato dipotássico 0,7%, fosfato de potássio 0,3%, sulfato de amônia 0,1%, glicose 0,2%, ágar 1,5%]

4.2.2 Manutenção dos microrganismos

As bactérias foram mantidas em ágar Nutriente e conservadas sob refrigeração (4 °C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI, sendo repicadas em intervalos de 15 a 30 dias para manter as colônias viáveis.

Os fungos (leveduriformes e filamentosos) foram mantidos em ágar Sabouraud dextrosado. As leveduras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) e os fungos filamentosos sob temperatura ambiente na micoteca do Laboratório de Micologia da UNIVALI, sendo repicados em intervalos de 15 a 30 dias para manter as colônias viáveis.

4.3 Atividade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) ou concentração fungicida mínima (CFM) das substâncias sintetizadas (imidazóis cíclicos), foram realizadas por diluição em ágar.

O método consiste em preparar diluições sucessivas das substâncias testadas, em meios de cultivos próprios, inoculados com a bactéria ou fungo em estudo, incubado e posteriormente verificado a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo.

4.3.1 Preparo dos inóculos

4.3.1.1 Bactérias

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas as bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae* e as Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae*.

Cada bactéria foi transferida do meio de manutenção para o meio ágar Mueller-Hinton (MERCK) e incubada a 37 °C por 18-24 horas, para a ativação da respectiva cultura.

Para o preparo do inóculo foram selecionadas de 4 a 5 colônias da bactéria ativadas em ágar Mueller-Hinton e transferidas para tubo de ensaio com 5 mL de solução NaCl 0,86 % estéril, seguidas de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 520 nm, por comparação com a escala de 0,5 de McFarland, obtendo-se a concentração de

aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL, inoculado em cada frasco, uma alçada calibrada de 1 μ L resultando em concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células (NCCLS, 1993).

4.3.1.2 Fungos leveduriformes

As leveduras utilizadas para o preparo dos inóculos foram *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans*.

Cada levedura foi cultivada em ágar Sabouraud dextrosado, pelo menos duas vezes, para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens de 24 e 48 horas a 37 °C.

Para o preparo dos inóculos foram selecionadas 5 colônias da levedura, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, as quais foram suspensas em 5 mL de NaCl 0,85% estéril e homogeneizadas em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 520 nm para a obtenção de transmitância equivalente a 95%, obtendo-se uma concentração final entre 1 e 5×10^6 células/mL, inoculado em cada frasco com meio, uma alçada calibrada de 1 μ L, atingindo concentração final entre 1 e 5×10^3 células, como descrito por Espinel-Ingroff e Pfaller (1995).

4.3.1.3 Fungos filamentosos

Para o preparo dos inóculos dos fungos filamentosos, foram utilizados os dermatófitos, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* e os fungos oportunistas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp.

Os fungos foram mantidos em ágar Sabouraud à temperatura ambiente por 7 a 10 dias para obtenção de culturas jovens. Os respectivos inóculos foram preparados removendo-se os esporos de cada fungo a partir de cultura jovem, com auxílio de uma alça, transferidos para tubo com água estéril e homogeneizado em agitador de tubos. A suspensão conidial foi filtrada, para remoção das hifas, novamente homogeneizada e ajustada para $1,4 \times 10^6$ células/mL com adição de água, pela determinação do número de células utilizando um hemocítômetro. Em seguida,

cada frasco com meio, foi inoculado com uma alçada calibrada de 10 μL para obter concentração final de aproximadamente $1,4 \times 10^4$ células (LLOP et al., 2000).

4.3.2 Concentração inibitória mínima

O método consiste em se preparar diluições da amostra a ser testada, em meios de cultivo sólido ou líquido, semear a bactéria ou fungo em estudo, e após incubação, verificar a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do microrganismo utilizado no ensaio.

Os valores da CIM foram determinados através da diluição das substâncias sintetizadas em ágar, empregando a metodologia descrita em NCCLS (1993) com modificações. A substância foi dissolvida em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 40%, e então, adicionado em séries de 10 frascos com capacidade para 5 mL em diferentes concentrações (10 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, a cada frasco foi adicionado 1 mL de meio ágar Mueller-Hinton para as bactérias e ágar Sabouraud dextrosado para as leveduras e fungos filamentosos, seguido de imediata homogeneização da mistura. Após a solidificação dos respectivos meios de cultivo, os microrganismos, previamente ativados, foram inoculados nas séries correspondentes, sendo então, incubados a 35 °C por 18 a 24 horas para as bactérias e 35 °C por 24 a 48 horas para os fungos leveduriformes, e à temperatura ambiente (25 °C) por 5 a 15 dias para os fungos filamentosos.

Após o período de incubação, foram realizadas leituras da concentração inibitória mínima através da verificação visual do crescimento microbiano. Para interpretação dos resultados foi considerado CIM a inibição total do crescimento microbiano.

Durante os testes foram utilizados controles, com os meios de cultivo e solvente utilizado na solubilização das substâncias, a fim de verificar seu efeito sobre os microrganismos. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2%. A leitura dos resultados foi considerada válida somente quando houve crescimento microbiano nos controles.

Todos os ensaios foram realizados por três vezes.

4.3.3 Concentração microbiana mínima (CMM)

Este bioensaio tem por finalidade, determinar a concentração mínima de uma substância capaz de inviabilizar as células microbianas.

Para determinar a concentração bactericida ou fungicida mínima, foram selecionadas as culturas que apresentaram inibição do desenvolvimento bacteriano ou fúngico, no ensaio de CIM (item 4.3.2), onde se adicionou 200 µL de solução salina estéril e realizadas suas respectivas subculturas em meio ágar Mueller-Hinton para as bactérias e ágar Sabouraud dextrosado para os fungos leveduriformes, isento das maleimidias em estudo, e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas para as bactérias; entre 24 e 48 horas para os fungos leveduriformes, e entre 5 e 15 dias para os fungos filamentosos. Após a incubação as culturas foram inspecionadas para a verificação visual do crescimento microbiano.

Para a interpretação dos resultados foram considerados que, a inibição no ensaio de CIM e crescimento do microrganismo na subcultura (CMM) significou ação bacteriostática ou fungistática e a ausência de crescimento na subcultura significou ação bactericida ou fungicida (BARON; FINEGOLD, 1990).

4.4 Avaliação da toxicidade

4.4.1 Ensaio com *Artemia salina*

Para realização do ensaio de toxicidade das substâncias sintetizadas, imidas cíclicas, foi utilizado o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi obtido em comércio local. Nas figuras a seguir, podem ser visualizados os esquemas ilustrando a metodologia empregada.

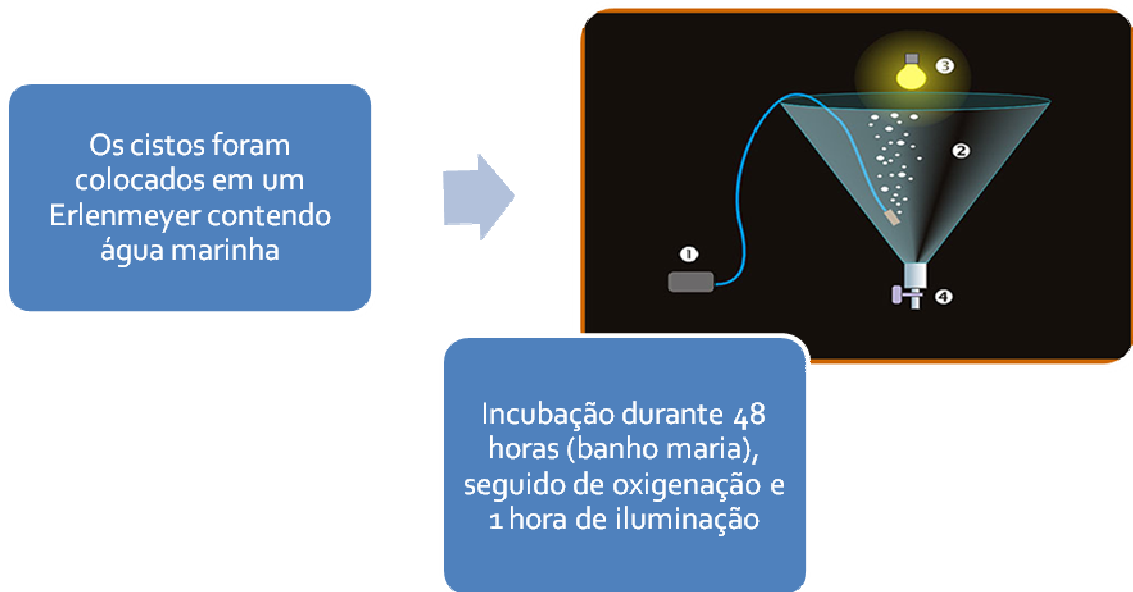


Figura 6: Representação do procedimento para hidratação e eclosão das larvas de *Artemia salina*.

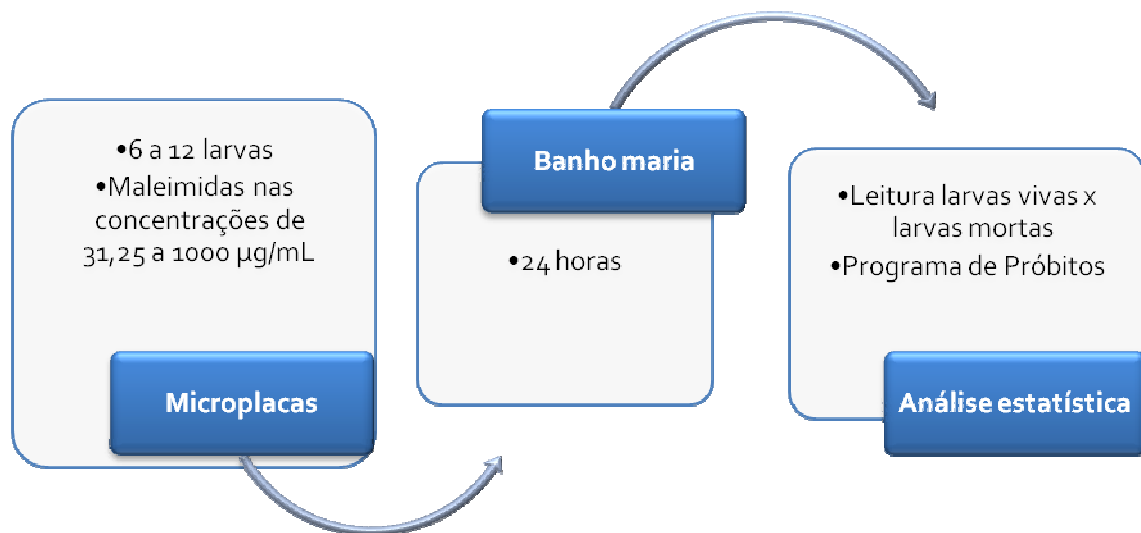


Figura 7: Representação da metodologia empregada para avaliação do potencial citotóxico utilizando *Artemia salina*.

Os ensaios foram realizados conforme o método descrito por Meyer et al. (1982), onde as substâncias foram preparadas com 1% de DMSO, para facilitar a dissolução das mesmas, e água marinha sintética (38 g/mL).

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados em frasco Beaker contendo água marinha e incubados em banho-maria entre 20 °C a 25 °C, por 48 horas para eclodirem. Após este período, em microplacas (200 µL), foram preparadas diferentes concentrações das substâncias, que variam de 31,25 µg/mL a 1000 µg/mL e a cada uma delas foram adicionados de 6 a 12 larvas do microcrustáceo, e novamente incubado em banho-maria (20 °C a 25 °C) por 24 horas.

O resultado foi obtido através da contagem do número de *Artemia salina* vivas e mortas para cada diluição (concentração). O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle positivo, foi utilizado uma solução de dicromato de potássio nas concentrações de 400, 600 e 800 µg/mL e como controle negativo 200 µL de água marinha.

A leitura do resultado foi validada somente quando nos controles positivos houve observação da morte de todos os indivíduos (*Artemia salina*) e no controle negativo a sobrevivência de todos os indivíduos.

Para o cálculo final da concentração letal de 50% (CL₅₀) e seu respectivo intervalo de segurança foi utilizado o método de Próbitos de análise. As substâncias foram consideradas tóxicas quando o ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* foi menor que 250 µg/mL (MEYER et al., 1982; DOLABELA, 1997; PARRA et al., 2001).

4.4.2 Ensaio com *Saccharomyces cerevisiae*

O ensaio com *Saccharomyces cerevisiae*, foi adaptado do procedimento descrito em Invitox n. 33 (1991). As maleimidias sintetizadas foram previamente diluídas em solução de DMSO 40%.

A primeira etapa da realização do ensaio utilizando cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi a preparação do inóculo. Este processo está apresentado na figura 8.



Figura 8: Representação do processo para a ativação do inóculo da levedura de *Saccharomyces cerevisiae*.

Após o preparo do inóculo ($2,5 \times 10^7$ células/mL), transferiu-se para um tubo de ensaio, uma alíquota de 25 μL do mesmo e 125 μL da substância teste na concentração de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e finalmente completou-se o volume de 5 mL com meio de cultivo Completo obtendo-se uma concentração final de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Então, o tubo de ensaio foi vedado e incubado em *shaker* sob agitação, à temperatura de 30 °C. Após este procedimento, nos tempos de 0, 1, 2, 8 e 24 horas, foi retirado uma alíquota de 1 μL , que foi diluído em 10 mL de água destilada para ajuste da concentração do inóculo. Posteriormente, 50 μL desta solução foi semeado em placa com meio Completo e o inóculo estendido com auxílio de alça de Drigalski, vertidas e incubadas durante 24 horas sob temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a contagem das *unidades formadoras de colônias* (UFC) de cada amostra e para cada tempo.

Os resultados obtidos foram plotados num gráfico que correlacionava o número de UFC versus o tempo de exposição do microrganismo à substância teste.

Os testes foram realizados por três vezes, e em paralelo ao teste com as maleimidias sintetizadas, foram preparados tubos sem maleimidias (denominado branco) que demonstrou a proliferação normal da levedura nas condições do método em estudo.

4.4.3 Ensaio de genotoxicidade

Para a realização desse ensaio de mutagenicidade foram utilizadas três diferentes linhagens da bactéria Gram-negativa *Salmonella typhimurium* - TA97 e TA98 com defasagem no quadro de leitura, e TA100 com substituição de pares de bases, sendo todas as cepas auxotróficas de histidina.

Primeiramente, com a finalidade de confirmar se as cepas de *Salmonella typhimurium* eram auxotróficas para o aminoácido histidina, realizou-se um ensaio preliminar, em placas com ágar Davis acrescido de uma solução contendo biotina e histidina.

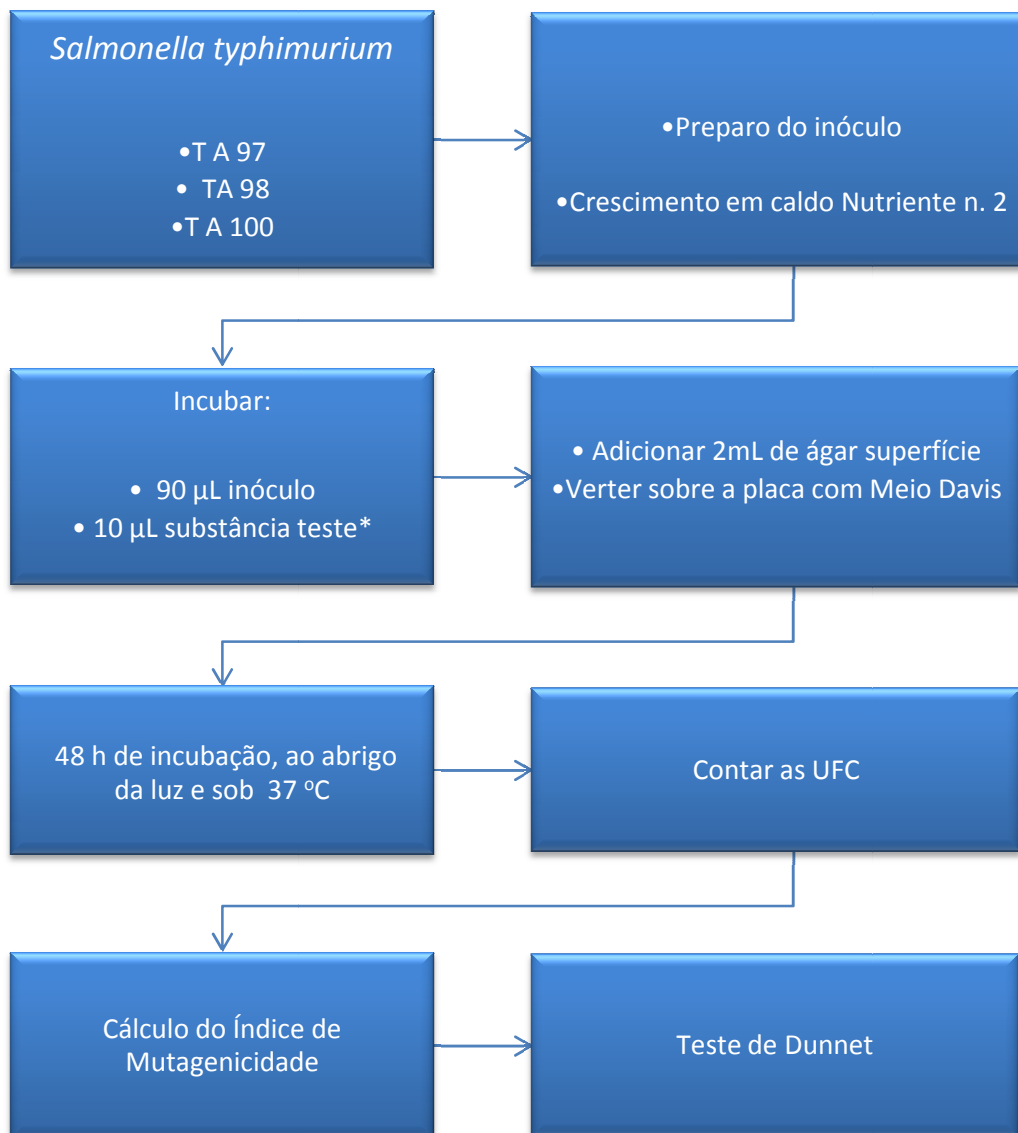
O ensaio de genotoxicidade foi realizado de acordo com o método descrito no protocolo n. 30, por Invitox (1992), conforme segue o fluxograma apresentado na figura 9.

As linhagens previamente ativadas, foram crescidas em caldo Nutriente nº 2 (Oxoid), a 37 °C, sob agitação constante e ao abrigo da luz.

A densidade celular do inóculo foi ajustada, empregando-se espectrofotometro a 520 nm, por comparação com a escala de 0,5 de McFarland, corrigindo a concentração para atingir a transmistância de 74% para obter a densidade de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL. Após preparo do inóculo, retirou-se uma alíquota de 90 µL deste e adicionou-se 10 µL da substância teste. Portanto, as dezenove maleimidias foram testadas na concentração máxima de 5 mg/mL. Em seguida foram incubados por 20 minutos, em banho-maria a 37 °C. Após este período, adicionou-se 2 mL de ágar Superfície e verteu-se sobre a placa com ágar Davis (carente de histidina e biotina).

Após 48 horas de incubação, sob 37 °C e ao abrigo da luz foi realizada a contagem das UFC de cada uma das cepas e substância teste, controle positivo e controle negativo.

Todos os ensaios foram repetidos por três vezes, na presença de controles negativo (dimetilsulfóxido) e positivo (azida sódica), a fim de confirmar a capacidade de resposta das linhagens. Como controle positivo foi utilizado a substância mutagênica azida sódica, e para o controle negativo, foi empregado a solução de dimetilsulfóxido.



Legenda: * = Controle positivo (azida sódica 1 µg) e controle negativo (dimetilsufóxido 10 µL) por placa. A concentração das substâncias testes oscilaram entre 5000 µg e 8 µg.

Figura 9: Fluxograma da metodologia empregada no teste Ames

Para o cálculo de índice de mutagenicidade (IM) foi aplicada uma equação, que consiste na divisão do número de revertentes induzidos pelo número de revertentes espontâneos no controle negativo. Além disso, a análise estatística, foi efetuada através do teste de Dunnet que tem por finalidade obter a variância do número de revertentes induzidos pelas maleimidas, versus o número de revertentes induzidos pelo controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade antibacteriana

Para avaliação da atividade antibacteriana foram empregadas dez cepas bacterianas, sendo cinco delas Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae*) e cinco Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter cloacae*). Através do método de diluição em ágar, de dezenove maleimidias.

O parâmetro empregado para designar a atividade biológica, segue o que descreve Mitscher e seus colaboradores (1972), e Rios e Recio (2005). Quando se avalia uma substância na pesquisa antibacteriana, a sua concentração deve ser preferencialmente, inferior a 100 µg/mL, para que a mesma seja considerada biologicamente ativa. Este critério é atribuído, em função de que geralmente os agentes antimicrobianos empregados na clínica, apresentam uma concentração inibitória mínima até 10 µg/mL (MITSCHER et al., 1972; LÓPEZ et al., 2001; RIOS; RECIO, 2005).

Levando-se em consideração o critério estabelecido para classificar uma substância como ativa (≤ 100 µg/mL) foi constatado que nenhuma das dezenove maleimidias testadas apresentaram atividade contra as bactérias acima descritas, até a concentração máxima testada (100 µg/mL).

Deve-se considerar que parte das pesquisas com maleimidias apresentaram atividade antibacteriana com CIM de valores superior a 200 µg/mL (ORZESZKO et al., 2002; ZENTZ et al., 2002). Esta situação também é evidenciada na pesquisa de Prado et al. (2004), onde foi utilizado a substância N-antipirino-3,4-dicloromaleimida para avaliação da atividade antibacteriana frente *Staphylococcus aureus*. Segundo os autores, esta maleimida apresentou atividade biológica, pois foi capaz de inibir o crescimento bacteriano na concentração de 250 µg/mL, através do método de difusão em ágar.

Ressalta-se que a substância descrita no trabalho de Prado e colaboradores (2004), foi a mesma substância protótipo da presente pesquisa, porém ela não foi considerada ativa em nossos ensaios, pois o valor da concentração inibitória

mínima, frente aos microrganismos testados, foi acima do limite de 100 µg/mL, portanto, de acordo com o critério estabelecido, não pôde ser considerada ativa.

O motivo pelo qual as maleimidias não foram ativas contra as bactérias testadas, pode estar relacionado com as características de resistência intrínsecas dos microrganismos. No caso das bactérias Gram-positivas, têm sido relatado que podem apresentar resistência natural através da modificação do alvo celular, ocorrendo uma deficiência de afinidade, entre a substância e o alvo, impedindo que o fármaco se acumule em quantidade suficiente no interior da célula a fim de provocar um dano letal na estrutura bacteriana (GHANNOUM; RICE, 1999; TAVARES, 2000; AL-TATARI et al., 2006).

Especificamente no que se diz respeito às bactérias Gram-negativas, de modo geral, deve se considerar as características morfológicas das mesmas. As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa, que consiste numa dupla camada de lipídios, contendo moléculas de proteínas e lipoproteínas ligadas ao peptidoglicano. Além disso, agregado à membrana externa, há o espaço periplasmático, composto por enzimas responsáveis pela inativação de algumas substâncias com ação antibacteriana. Assim, todas essas características adjuntas, explicam o porquê muitos agentes antimicrobianos têm dificuldade em penetrar nessa membrana (POOLE, 1994; GEORGE, 1996; NIKAIDO, 1998; RANG et al., 2003; ANG, EZIKE, ASMAR, 2004; TRABULSI et al., 2005).

Além dos fatores de resistência exibidos pelas bactérias testadas, faz-se necessário também, uma correlação química com as maleimidias empregadas neste estudo. Nesse sentido, tem sido descrito que dentre as características químicas das maleimidias com atividade antibacteriana, observa-se que a distância entre o anel imídico e o anel aromático parece ser um fator estrutural importante para esta atividade biológica (BELLA CRUZ et al., 1996; ANDRICOPULO et al., 1998; CECHINEL FILHO et al., 2003). No entanto, se observa que as dezenove maleimidias testadas, apresentam uma distância relativamente pequena entre o anel imídico e o anel aromático. Pois, o nitrogênio do grupo imídico está ligado diretamente com o núcleo antipirínico da molécula.

Sugere-se também que a presença do núcleo antipirínico acoplado a porção imídica possa estar colaborando para a ausência da atividade antibacteriana. Uma vez que, algumas maleimidias já tenham sido citadas como ativas frente à inibição do

crescimento bacteriano, em função da presença da dupla ligação imídica (CAMPOS-BUZZI, 2007).

Além disso, o caráter lipofílico das maleimidas em estudo não é muito elevado, o que pode estar contribuindo para a ausência da atividade antibacteriana. Visto que Nowakowska (2007), afirma que há uma correlação entre a lipofilicidade e a atividade antimicrobiana, ou seja, o forte caráter lipofílico da molécula desenvolve uma função essencial no efeito antibacteriano.

Assim, sugere-se que novas modificações estruturais sejam feitas, a fim de promover alterações químicas e biológicas, considerando que várias maleimidas reportadas na literatura, já foram descritas como promissoras na atividade antibacteriana.

5.2 Atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica, empregou-se o método de diluição em ágar e foram utilizados fungos filamentosos e fungos leveduriformes. Valores de CIM menor ou igual a 100 µg/mL foram os critérios utilizados para considerar a atividade antifúngica.

Conforme pode ser visualizado na tabela 4, dentre as quatro espécies de fungos filamentosos testados (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *Rhizopus* sp), as maleimidas aqui avaliadas apresentaram ação antifúngica, frente ao *Aspergillus fumigatus* e ao *Rhizopus* sp.

Observou-se que a maleimida 19, apresentou atividade antifúngica na concentração de 100 µg/mL, sendo equivalente a 236,96 µM, frente à cepa do *Aspergillus fumigatus* que é a principal espécie patogênica, dentre o gênero do *Aspergillus* (ZAITZ et al., 1998; XESS et al., 2004; NADKARNI; GOEL, 2005; SHAO; HUANG; HSUEH, 2007).

Os fungos do gênero *Aspergillus* não pertencem à microbiota normal dos seres humanos e não crescem em tecidos saudáveis, porém são capazes de produzir doença invasiva em pessoas fortemente imunocomprometidas. A frequência desta doença tem evoluído drasticamente, em conseqüência do aumento

no número de pacientes imunodeficientes (ZAITZ, 1998; SHAO; HUANG; HSUEH, 2007).

Com relação à atividade das maleimidias contra o fungo *Rhizopus* sp. observou-se que três substâncias apresentaram atividade antifúngica frente a este microrganismo. As substâncias 02 e 03 apresentaram concentração inibitória mínima de 80 µg/mL (196,07 µM e 167,71 µM, respectivamente) e concentração fungicida mínima de 100 µg/mL (245,09 µM e 209,64 µM, respectivamente). Além disso, a maleimida 07, agiu de forma inibitória na concentração de 100 µg/mL (205,33 µM), Cabe aqui explicar, que o *Rhizopus* sp. compete ao gênero, conhecido por causar a mucormicose, uma infecção grave e aguda que pode manifestar lesões cerebrais, hepáticas, renais e gastrintestinais (ZAITZ et al., 1998; TRABULSI et al., 2005).

Os resultados obtidos frente aos fungos filamentosos dermatófitos testados (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* e *M. gypseum*), mostraram que as maleimidias em estudo exibiram pronunciada atividade antifúngica contra os mesmos. É importante ressaltar que estes microrganismos são responsáveis pela grande maioria das infecções cutâneas, capilares e nas unhas, conhecidas como dermatomicoses, que afetam crianças, adolescentes e adultos, e está se tornando um complexo problema de saúde, devido à sua alta prevalência, conforme afirmam Kannan, Janaki e Selvi (2006) e Pakshir e Hashermi (2006).

O *Microsporium gypseum* teve seu crescimento inibido por três maleimidias: 03, 08 e 09, na concentração inibitória mínima de 100 µg/mL (209,64 µM, 234,74 µM e 229,35 µM, respectivamente). As espécies de *Microsporium* comumente estão envolvidas em processos infecciosos humanos e animais, na dependência de características geográficas e do próprio hospedeiro (MOREIRA; SIDRIN 1999; JEHN, 2000; FISHER; COOK, 2001).

Com relação às espécies testadas do *Trichophyton*, ambas as espécies tiveram seu crescimento inibido pela maleimida 19, na concentração máxima testada (100 µg/mL). O fungo *Trichophyton rubrum* é descrito na literatura mundial, como a espécie fúngica mais implicada em quadros de dermatofitoses humanas, além de ser um dos microrganismos eucariontes mais resistentes ao tratamento farmacológico (BENEKE, 1972; MOREIRA; SIDRIN, 1999; SINGH; BEENA, 2003). O *Trichophyton mentagrophytes* é caracterizado como fator determinante de diversos processos de epidermofitases, onicomioses, lesões do couro cabeludo e lesões interdigitoplantares (MOREIRA; SIDRIN, 1999; MURRAY et al., 2002).

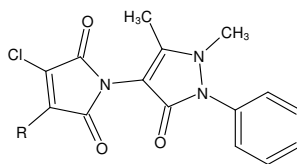
Recentemente, Gayoso e seus colaboradores (2006), descreveram as maleimidas como promissoras substâncias químicas, contra à inativação do crescimento de fungos causadores de onicomicoses, enfatizando, que esta é uma das micoses que apresentam um elevado nível de ineficácia perante o tratamento farmacológico.

No que diz respeito à atividade frente aos fungos leveduriformes, a maleimida 19, apresentou atividade inibitória na concentração de 40 µg/mL (91,74 µM), frente ao microrganismo *Cryptococcus neoformans*. Este resultado é extremamente valioso, visto que este microrganismo é o fungo oportunista, que apresenta a maior prevalência em meio aos pacientes imunodeficientes. Até a década de 1970, eram raros os casos de criptococose, porém, o aumento do uso de corticóides, quimioterápicos, antimicrobianos e pacientes recém transplantados e aidéticos tem aumentado. Assim, a freqüência desta patologia elevou-se, bem como a morbidade e a mortalidade da mesma (CHAKRABARTI, 2007; LAKSHMI, 2007).

Analisando a tabela 2, é possível fazer algumas correlações entre as maleimidas que apresentaram atividade antifúngica e suas propriedades químicas descritas. Assim, observa-se que a maleimida N-antipirino-3-cloro-4-[anilino maleimida], codificada como 02, apresentou atividade contra o fungo *Rhizopus* sp. Quando compara-se a 02 com a molécula protótipo desta pesquisa (01), é possível visualizar a ocorrência da substituição de um átomo de cloro pelo anel anilino, o que confere uma maior lipofilicidade a molécula, conforme pode ser confirmado nos valores de $\text{Log } P$, sendo que a molécula protótipo, apresenta $\text{Log } P$ $0,00 \pm 0,75$ e a 02 $\text{Log } P$ $0,73 \pm 0,75$. Deste modo, sugere-se que o aumento da lipofilicidade seja o fator determinante para que a maleimida 02, possa interagir com a célula fúngica provocando a inibição do crescimento do microrganismo.

Com relação à maleimida 03, denominada N-antipirino-3-cloro-4-[3,4-dicloroanilinomaleimida], observa-se sua ação antifúngica frente aos fungos *Rhizopus* sp. e *Microporum gypseum*, tal atividade parece estar relacionada com a presença de dois átomos de cloro. Pois, de acordo com Korolkovas e Burckhalter (1988) e Thomas (2003) a presença do grupo halogênio, aumenta a lipofilicidade da molécula, o que melhora a sua penetração nas membranas lipídicas.

Tabela 2: Atividade antifúngica e propriedades químicas da molécula protótipo e de maleimidas com atividade biológica



Substância	Substituinte R	Log P	Atividade antifúngica	CIM (µg/mL)	CIM µM
01	-Cl	0,00 ± 0,75	-	-	-
02		0,73 ± 0,75	<i>Rhizopus</i> sp.	80	196,07
03		2,62 ± 0,75	<i>Rhizopus</i> sp <i>M. gypseum</i>	80 100	167,71 209,64
07		1,89 ± 0,75	<i>Rhizopus</i> sp	100	205,33
08		1,17 ± 0,75	<i>M. gypseum</i>	100	234,74
09		1,72 ± 0,75	<i>M. gypseum</i>	100	229,35
19		1,36 ± 0,75	<i>A. fumigatus</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. entagrophytes</i> <i>C. neoformans</i>	100 100 100 40	236,96 236,96 236,96 91,74

Legenda: N-antipirino-3,4-dicloromaleimida (01), N-antipirino-3-cloro-4-[anilino maleimida] (02), N-antipirino-3-cloro-4-[3,4-dicloroanilino maleimida] (02), N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida] (07), N-antipirino-3-cloro-4-[4-fluoroanilino maleimida] (08), N-antipirino-3-cloro-4-[4-etilalilino maleimida] (09), N-antipirino 3-cloro-4-[benzilamino maleimida] (19), *Aspergillus fumigatus* (*A.fumigatus*), *Trichophyton rubrum* (*T.rubrum*), *Trichophyton mentagrophytes* (*T.mentagrophytes*), *Microsporium gypseum* (*M.gypseum*), *Cryptococcus neoformans* (*C.neoformans*), Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os valores de Log P foram calculados no Programa ChemSketch.

Outra substância que também apresenta halogênio, no radical substituinte e apresentou atividade antifúngica frente ao *Rhizopus* sp. é a maleimida 07, denominada N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida]. Esta maleimida apresenta em seu radical, um átomo extremamente reativo, que é o bromo e que possivelmente agiu sobre a estrutura celular fúngica, provocando dano e conseqüente morte celular.

As maleimidas 08 e 09, N-antipirino-3-cloro-4-[4-fluoroanilino maleimida] e N-antipirino-3-cloro-4-[4-etilanilino], respectivamente, apresentaram atividade biológica semelhante, pois ambas inibiram o crescimento do *Microsporum gypseum* na concentração inibitória máxima testada, 100 µg/mL. A partir de suas propriedades químicas, é possível observar que a maleimida 08, apresenta como grupo substituinte, o flúor. Sendo este elemento químico, o mais reativo de todos os halogênios (THOMAS, 2003), pode ser que a substância atue sobre a membrana celular fúngica, provocando sua morte. Com relação a substância 09, observa-se que a presença do grupo etil como radical substituinte esta aumentando o valor de *Log P* e conseqüentemente seu caráter lipofílico. É valido ressaltar, que o *Log P* de ambas as substâncias são adjacentes, o que justifica a capacidade de penetração na estrutura celular fúngica.

Finalmente, a maleimida 19, denominada N-antipirino-3-cloro-4-[benzilamino maleimida], apresentou excelente atividade antifúngica inibindo o crescimento de quatro fungos distintos, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Observa-se que a principal diferença estrutural entre esta molécula e as demais sintetizadas, é a distância de um carbono entre o anel imídico e o anel aromático, sugerindo que esta distância esteja diretamente relacionada com a atividade antifúngica desta maleimida. Além disso, há possibilidade de que a quebra da conjugação entre o anel imídico e o substituinte do grupo amino possam estar contribuindo na potencialização da atividade antifúngica (CAMPOS-BUZZI, 2007).

5.3 Citotoxicidade frente *Artemia salina*

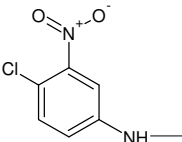
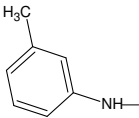
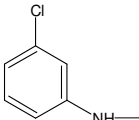
Um dos métodos utilizados, para detecção do potencial tóxico das maleimidas, foi o ensaio utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Diversos trabalhos buscam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades

biológicas, como antifúngica, antimicrobiana, parasiticida entre outras (SOLIS et al., 1993; ZANI et al., 1995; PELKA et al., 2000; CHAN-BACAB et al., 2003). Além disso, também há relatos na literatura (SIQUEIRA et al., 1998) sobre o uso sistemático deste bioensaio na avaliação prévia de substâncias com possível atividade antitumoral.

Para elucidar os resultados encontrados neste bioensaio, faz-se necessário a obtenção da CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança utilizando o método de Próbitos. De acordo com Siqueira e seus colaboradores (1998), uma substância é considerada altamente tóxica quando a CL_{50} for menor que 80 $\mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxica, quando os valores são entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ e quando os valores forem acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ a substância é considerada atóxica.

Conforme pode ser visualizado na tabela a seguir, as substâncias que apresentaram algum nível de toxicidade foram a 18, 14 e 13, apresentadas em ordem crescente de toxicidade. É válido ressaltar, que nenhuma das substâncias que apresentaram atividade antimicrobiana, estão inseridas nas descritas como tóxicas.

Tabela 3: Maleimidias que apresentaram citotoxicidade frente *Artemia salina*

Substância	Log P	Substituinte	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de Confiança 95% ($\mu\text{g/mL}$)
18	1,09 - 0,75		94,15	57,04 – 131,26
14	1,19 - 0,75		90,54	50,18 – 130,91
13	1,76 - 0,75		86,23	33,81 – 138,84

Legenda: N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloro-3-nitroanilino maleimida] (18), N-antipirino-3-cloro-4-[3-metilanilino maleimida] (14), N-antipirino-3-cloro-4-[3-cloroanilino maleimida] (13), Concentração Letal de 50% (CL_{50}).

Os resultados apresentados na tabela 3, norteiam a discussão sobre a toxicidade das maleimidias em estudo. Assim, através do radical da maleimida 18, N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloro-3-nitroanilino maleimida], é possível observar a inserção de um grupamento nitro na posição meta. Então, é necessário enfatizar que de acordo com Korolkovas e Burckhalter (1988) e Barreiro e Fraga (2002), o grupo nitro tem a capacidade de modificar as propriedades químicas da substância, promovendo um aumento no caráter hidrofóbico da molécula. Assim, estas substâncias tendem a permanecer no organismo por mais tempo, quando comparadas aos seus análogos não nitrados, o que sugere a sua toxicidade. Além disso, há relatos na literatura farmacêutica (ZENTZ et al., 2004; GUIMARÃES, 2006) que o grupamento $-NO_2$ na posição meta, é frequentemente o responsável pela toxicidade dos fármacos.

Com relação a citotoxicidade das maleimidias 13 e 14, não é possível estabelecer uma correlação entre a toxicidade destas substâncias e os parâmetros estéricos, eletrônicos e hidrofóbicos. Observou-se que as moléculas que apresentaram citotoxicidade apresentaram substituição na posição meta do anel. Porém, outras moléculas desta mesma série também com substituintes nesta posição apresentaram-se atóxicas.

Os resultados obtidos através da avaliação da toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*, aprimoram ainda mais os resultados obtidos na avaliação antifúngica, pois nenhuma destas maleimidias que apresentaram-se com potencial citotóxica, estão classificadas com atividade antifúngica. Assim, a ausência de toxicidade tornam estas maleimidias sintéticas ainda mais promissoras, no que diz respeito a eficácia e segurança.

Além disso, os resultados obtidos neste bioensaio podem conduzir a novos estudos, visto que esta avaliação de citotoxicidade esta relacionada com possível atividade contra as células tumorais, quando os valores de CL_{50} forem inferiores a 250 $\mu g/mL$ (SIQUEIRA et al., 1998). Deste modo, as maleimidias sintéticas 18, 14 e 13 poderão futuramente ser empregadas na realização de bioensaios específicos para designação da atividade antitumoral.

5.4 Toxicidade frente *Saccharomyces cerevisiae*

Outro método utilizado para detecção do potencial tóxico das maleimidas, foi o ensaio utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, o qual tem o propósito de avaliar o potencial de inibição do crescimento desta levedura.

Dentre todas as dezenove maleimidas testadas, somente a substância 07, apresentou inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae*. As demais maleimidas não apresentaram potencial tóxico para inibir o crescimento desta levedura na maior concentração testada, 1000 µg/mL, e nas 24 horas de exposição a substância.

Através da figura 10, pode-se observar o gráfico que correlaciona à proliferação celular do padrão branco da levedura *S. cerevisiae* com a maleimida 07 na concentração máxima testada, 1000 µg/mL.

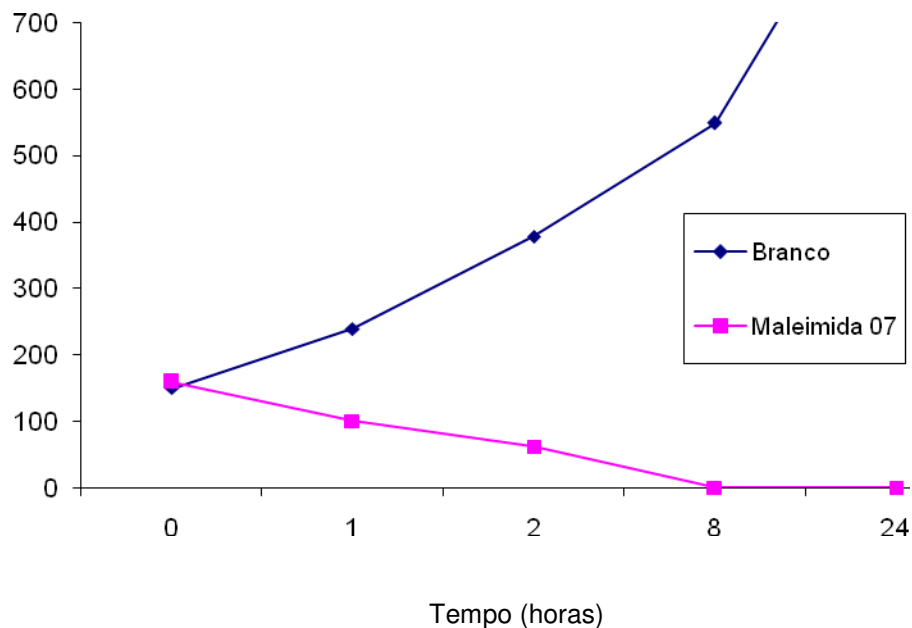


Figura 10: Gráfico que relaciona a proliferação celular em unidades formadoras de colônias (UFC) do padrão branco da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com a maleimida 07 (N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida]) na concentração de 1000 µg/µL em função do tempo de exposição.

O gráfico demonstra que o *S. cerevisiae* exposto a N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida] na maior concentração testada, teve seu crescimento inibido no tempo 8 h, enquanto que a levedura padrão (branco) continuou seu

crescimento durante todo o ensaio, demonstrando que a substância, exerceu algum efeito tóxico sobre a célula fúngica de *S. cerevisiae*.

De acordo com a estrutura da maleimida 07, N-antipirino-3-cloro-4-[bromoanilino maleimida] que está ilustrada a seguir, é possível observar a presença de um bromo na posição para, o que pode justificar o efeito tóxico da maleimida frente à proliferação celular de *S. cerevisiae*. Pois, de acordo com Korolkovas e Burckhalter (1988) e Barreiro e Fraga (2002), o bromo é um elemento químico altamente reativo. Assim, possivelmente, interagiu com o alvo biológico da levedura, promovendo a morte celular antecedendo as 24 horas. Outra característica proeminente desta molécula é a sua lipofilicidade, demonstrada pelo valor de $\text{Log } P$ $1,89 \pm 0,75$, que expressa o potencial da molécula química para atravessar as biomembranas da célula fúngica.

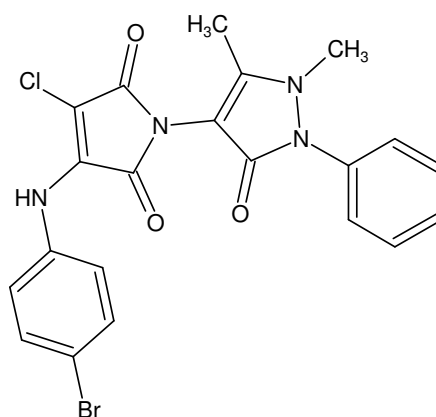


Figura 11: Estrutura química da maleimida 07, denominada N-antipirino-3-cloro-4-[bromoanilino maleimida]

Através de mais esta avaliação de citotoxicidade fica explícito que estas maleimidas apresentam um adequado perfil de segurança, pois em meio às maleimidas sintéticas em estudo apenas a 07 demonstrou citotoxicidade na sua maior concentração testada. Evidenciando assim, o quão é importante a realização de novos testes com estas maleimidas, uma vez que a célula da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é análoga a célula humana (DEL-RIO, 2004), evidencia-se o bom perfil de aplicabilidade terapêutica destas maleimidas sintéticas.

5.5 Avaliação da genotoxicidade utilizando o teste Ames

Para a avaliação do potencial mutagênico da N-antipirino-3,4-dicloromaleimida e seus análogos, utilizaram-se três linhagens (TA 97, TA 98 e TA 100) de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina. As substâncias analisadas, tiveram uma concentração máxima de 5 mg/mL.

Através dos valores do Índice de Mutagenicidade - obtidos apartir da contagem de UFC do teste de genotoxicidade (Apêndice A) - pode-se avaliar se as maleimidas em estudo apresentam capacidade de induzir a mutação. Desta forma, a tabela 4, mostra o Índice de Mutagenicidade das dezenove maleimidas testadas.

De acordo com Vargas e colaboradores (1990), Fernandes e Vargas (2003), Borgo, Rosa e Vargas (2004) e Jayaprakasha, Negi e Jena (2006), o valor de IM = 1,0 ou muito próximo, indica que não houve indução de revertentes; $IM < 0,6$ a $0,7$ pode ser indicativo de toxicidade, $IM > 1,0$ pode indicar indução de revertentes e $IM \geq 2,0$ a substância é considerada mutagênica. Portanto, correlacionando essas informações com os valores descritos na tabela 4, é pode-se verificar que as dezenove maleimidas empregadas na pesquisa, não provocaram a indução de revertentes, pois os valores de IM variaram entre 0,95 a 1,04.

Tabela 4: Índice de mutagenicidade de dezenove maleimidas sobre as linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA 97, TA 98 e TA 100).

Substância	Índice de Mutagenicidade		
	TA 97	TA 98	TA 100
01	0,96	0,95	0,99
02	1,00	1,02	0,99
03	0,98	1,00	1,00
04	0,97	0,95	1,01
05	1,00	1,00	1,01
06	1,00	1,00	0,99
07	0,96	1,02	1,01
08	1,01	1,02	1,00
09	1,01	1,02	1,00
10	1,00	1,00	1,01
11	0,98	1,02	1,01
12	0,98	1,00	0,99
13	1,02	1,04	1,01
14	1,01	1,04	1,00
15	0,97	1,02	1,01
16	1,02	1,00	1,00
17	1,02	1,04	0,98
18	0,99	1,04	1,01
19	0,99	1,00	1,00

Legenda: N-antipirino-3,4-dicloromaleimida (01), N-antipirino-3-cloro-4-[anilino maleimida] (02), N-antipirino-3-cloro-4-[3,4dicloroanilino maleimida] (03), N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloroanilino maleimida] (04), N-antipirino-3-cloro-4-[4-metóxianilino maleimida] (05), N-antipirino-3-cloro-4-[4-metilanilino maleimida] (06), N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida] (07), N-antipirino-3-cloro-4-[4-fluoroanilino maleimida] (08), N-antipirino-3-cloro-4-[4-etilalinino maleimida] (09), N-antipirino-3-cloro-4-[3-nitroanilino maleimida] (10), N-antipirino-3-cloro-4-[4-carboxianilino maleimida] (11), N-antipirino-3-cloro-4-[3-carboxianilino maleimida] (12), N-antipirino-3-cloro-4-[3-cloroanilino maleimida] (13), N-antipirino-3-cloro-4-[3-metilanilino maleimida] (14), N-antipirino-3-cloro-4-[3-metoxianilino maleimida] (15), N-antipirino-3-cloro-4-[3,5-dimetilanilino maleimida] (16), N-antipirino 3-cloro-4-[3,5-dimetoxianilino maleimida] (17), N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloro-3-nitroanilino maleimida] (18), N-antipirino 3-cloro-4-[benzilamino maleimida] (19).

Tabela 5: Médias do número de colônias revertentes das linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA 97, TA 98 e TA 100), induzidas pelas maleimidias.

Substância	Número de Revertentes (UFC \pm DP)		
	TA 97	TA 98	TA 100
01	145 \pm 3,22	43 \pm 1,00	164 \pm 4,04
02	150 \pm 4,36	46 \pm 2, 53	164 \pm 4,04
03	148 \pm 3,61	45 \pm 3,01	166 \pm 2,52
04	146 \pm 2,08	46 \pm 2,00	168 \pm 1,53
05	151 \pm 4,00	45 \pm 2,65	167 \pm 1,53
06	151 \pm 3,61	45 \pm 2,00	164 \pm 3,22
07	145 \pm 1,00	46 \pm 2,00	167 \pm 3,51
08	152 \pm 3,61	46 \pm 3,61	165 \pm 4,73
09	152 \pm 2,65	46 \pm 2,52	165 \pm 4,36
10	150 \pm 2,08	45 \pm 2,65	166 \pm 1,53
11	148 \pm 2,00	46 \pm 2,00	168 \pm 2,52
12	148 \pm 3,51	45 \pm 3,00	164 \pm 3,51
13	154 \pm 2,89	47 \pm 2.65	167 \pm 2,08
14	152 \pm 3,51	47 \pm 2,08	165 \pm 2,00
15	146 \pm 3,06	46 \pm 2,65	168 \pm 1,00
16	153 \pm 3,06	45 \pm 2,00	166 \pm 2,65
17	154 \pm 2,52	47 \pm 2,65	163 \pm 2,00
18	149 \pm 2,52	47 \pm 2,00	167 \pm 1,53
19	149 \pm 2,08	45 \pm 1,53	165 \pm 3,79
DMSO	150 \pm 2,00	45 \pm 1,73	165 \pm 2,65

Legenda: N-antipirino-3,4-dicloromaleimida (01), N-antipirino-3-cloro-4-[anilino maleimida] (02), N-antipirino-3-cloro-4-[3,4dicloroanilino maleimida] (03), N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloroanilino maleimida] (04), N-antipirino-3-cloro-4-[4-metóxi-anilino maleimida] (05), N-antipirino-3-cloro-4-[4-metilanilino maleimida] (06), N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida] (07), N-antipirino-3-cloro-4-[4-fluoroanilino maleimida] (08), N-antipirino-3-cloro-4-[4-etilalino maleimida] (09), N-antipirino-3-cloro-4-[3-nitroanilino maleimida] (10), N-antipirino-3-cloro-4-[4-carboxianilino maleimida] (11), N-antipirino-3-cloro-4-[3-carboxianilino maleimida] (12), N-antipirino-3-cloro-4-[3-cloroanilino maleimida] (13), N-antipirino-3-cloro-4-[3-metilanilino maleimida] (14), N-antipirino-3-cloro-4-[3-metoxianilino maleimida] (15), N-antipirino-3-cloro-4-[3,5-dimetilanilino maleimida] (16), N-antipirino 3-cloro-4-[3,5-dimetoxianilino maleimida] (17), N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloro-3-nitroanilino maleimida] (18), N-antipirino 3-cloro-4-[benzilamino maleimida] (19), Controle negativo – Dimetilsulfóxido (DMSO), Desvio Padrão (DP).

A análise estatística, foi realizada através do teste de Dunnet, conforme pode ser visualizado na tabela 5, com o objetivo de obter a variância do número de

revertentes induzidos pelas maleimidas contra o número de revertentes induzidos pelo controle negativo com DMSO.

As dezenove maleimidas testadas não apresentaram potencial mutagênico na concentração máxima testada, de 50 mg/mL sobre as linhagens testadas (TA 97, TA 98 e TA 100), sendo que, a análise estatística, elucida o valor de $p > 0,05$, mostrando que não há diferença estatística entre as médias das maleimidas e as do controle negativo.

Este resultado é muito significativo, visto que a ausência de capacidade mutagênica, torna estas substâncias mais seguras para o uso terapêutico, além de servir como um estímulo no desenvolvimento de protótipos a novos fármacos.

As substâncias em estudo apresentaram atividade antifúngica considerável, comparando-as com algumas maleimidas já reportadas na literatura. Além disso, a ausência de mutagenicidade torna estas maleimidas ainda mais subjetivas no desenvolvimento de novas pesquisas, sugerindo-se que mais estudos com estas e outras maleimidas sejam feitas a fim de elucidar o mecanismo de ação antifúngico validando ainda mais as propriedades biológicas desta classe.

6 CONCLUSÕES

- Quanto a atividade antibacteriana as dezenove maleimidas testadas, não apresentaram atividade antibacteriana, até a máxima concentração testada, 100 µg/mL.
- Frente à avaliação da atividade antifúngica, observou-se que as maleimidas apresentaram considerável ação biológica, inibindo o crescimento de cinco gêneros distintos de fungos representados por *Rhizopus* sp., *Microsporium gypseum*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.
- A maleimida que exibiu maior proeminência frente à atividade antifúngica, foi a N-antipirino 3-cloro-4-[benzilamino maleimida], codificada como 19, pois apresentou ação fungistática com CIM = 40 µg/mL, frente a levedura *Cryptococcus neoformans*. E para os demais fungos: *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mengrophytes*, inibiu o crescimento fúngico na maior concentração testada, 100 µg/mL.
- A melhor atividade antifúngica foi observada sobre o fungo oportunista *Cryptococcus neoformans*, que teve seu crescimento inibido pela maleimida 19, denominada N-antipirino 3-cloro-4-[benzilamino maleimida], na concentração de 40 µg/mL (91,74 µM).
- As maleimidas 18, 14 e 13 (N-antipirino-3-cloro-4-[4-etilanilino maleimida]; N-antipirino-3-cloro-4-[3-metilanilino maleimida] e N-antipirino-3-cloro-4-[3-cloroanilino maleimida], respectivamente) apresentaram toxicidade moderada (CL₅₀= 94,15 µg/mL, 90,54 µg/mL e 86,29 µg/mL, respectivamente) frente o microcrustáceo *Artemia salina*. As demais substâncias, foram consideradas atóxicas, visto que apresentaram CL₅₀ superior a 250 µg/mL.
- No teste de toxicidade celular utilizando cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que somente a maleimida 07, nomeada N-antipirino-3-cloro-4-[4-

bromoanilino maleimida] apresentou potencial tóxico, na maior concentração testada, 1000 µg/mL.

- Nenhuma das dezenove maleimidas estudadas apresentaram capacidade de indução mutagênica, pelo teste Ames até a concentração máxima de 50 mg/mL.

REFERÊNCIAS

- AL HARONI, M. Bacterial resistance and the dental professionals' role to halt the problem. **Journal of Dentistry**, v. 36, p. 95-103, 2008.
- AL TATARI H.; ABDEL-HAQ N.; CHEARSKUL P.; ASMAR B. Antibiotics for treatment of resistant Gram-positive coccal infections. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 73, p. 323-334, 2006.
- ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697-705, 2005.
- ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A.; NUNE S, R. J.; SAVI, A. O.S.; CORRÊA, R.; CRUZ, A. B.; CECHINEL FILHO, V. Síntese de atividade antibacteriana de imidas cíclicas: 3,4-dicloromaleimidias e 3-cloro-4-substituída-maleimidias. **Química Nova**, v. 21, p. 573-577, 1998.
- ANDRICOPULO, A.D.; MULLER, A.L; CECHINEL FILHO, V.; CANI, G.S.; ROOS, J.F.; CORRÊA, R.; SANTOS, A.R.S.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A. Analgesic activity of cyclic imides: 1,8-naphthalimide and 1,4,5,8-naphthalenediimide derivates. **II Farmaco**, v. 55, p. 319-321, 2000.
- ANG, Y. J.; EZIKE, E.; ASMAR, I. B. Antibacterial resistance. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 71, p. 229-239, 2004.
- AQUINO, P.; LIMA, E.; FARIAS,M.; FREIRE, K.; SOUZA, E.; CECHINEL FILHO, V.; CORREA, R.; NUNES, R. Atividade antifúngica de maleimidias contra dermatófitos isolados de *Tinea capitis*. **Role Based Access Control**, v. 35, n.4, p. 191-194, 2003.
- AZIZ-ABDEL, A.A; Novel and versatile methodology for synthesis of cyclic imides and evaluation of their citotoxic, DNA binding, apoptotic inducing activities and molecular modeling study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 614-626, 2007.
- BARON, E. J.; FINEGOLD. S. M. **Bailey & Scott's – Diagnostic microbiology**, 8 ed. St. Louis: C. V. Mosby Co, 1990.
- BAMBEKE, F.V.; BALZI, E.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 457-470, 2000.
- BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**, São Paulo: Atheneu, 1998.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**, Porto Alegre: Artmed, 2002. 243 p.
- BELLA CRUZ, A.; BELLA CRUZ, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; JUNIOR DEODÓSIO A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A. Avaliação dos efeitos antibacterianos de N-

arildicloromaleimidias e N-arilftalimidias. Relação estrutura-atividade. **Revista Latinoamericana Química**, v. 25, p. 10-13, 1996.

BENEKE, E. S. **Human mycoses**. Michigan: Upjohn, 1972, 46 p.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

BOJARSKI, A. J.; MOKROSZ, M. J.; DUSZYNSKA, B.; KOZIAL, A.; BUGNO, R. New imide 5-HT_{1A} receptor ligands – Modification of terminal fragment geometry. **Molecules**, v. 9, p. 170-177, 2004.

BONDOCK, S., RABIE, R.; ETMAN, H. A.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial activity of some new heterocycles incorporating antipyrine moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2008, *In Press*.

BORGO, J.; ROSA, D.P.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicidade do extrato aquoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon no ensaio *Salmonella*/Microsoma, **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.17, p. 37-43, 2004.

CAMARGO, L. F. A. Controle de antibióticos: mais que retórica, necessidade baseada em evidências. **Einstein**, v.1, p.135-136, 2003.

CAMPOS-BUZZI, F. **Síntese de novas moléculas com potencial terapêutico: imidas cíclicas, chalconas e compostos relacionados**. Florianópolis: UFSC, 198p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CARBALLO, J. L.; INDA, Z. L. H.; PÉREZ, P.; GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, p. 1-5, 2002.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, p. 20-22, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; PINHEIRO, T.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; BELLA CRUZ, A.; MORETTO, E.. Antibacterial activity of N-Phenylmaleimides, N-Phenylsuccinimides and related compounds. Structure-activity relationships. II **Farmaco**, v. 49, p. 675-677, 1994.

CECHINEL FILHO, V.; QUEIROZ, E.F; LIMA, E.O.; PINHEIRO, T.; NUNES, R.J; YUNES, R.A. Síntese de N-alquifenilmaleimidias e N-alquilarilmaleimidias com atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 19, p. 590-596, 1996.

CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS, F.; CORREA, R.; YUNES; R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, 230-241, 2003.

CHAKRABARTI, A. Epidemiology of central nervous system mycoses. **Neurology India**, v. 66, p. 191-199, 2007.

CHAN-BACAB, M.J.; BALANZA, E.; DEHARO, E.; MUNÓZ, V. GARCIA, D. R.; RODRIGUEZ, P.M.L. Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 243–247, 2003.

CLARK A. In: Natural products. WILLIAMS D. A., LEMKE T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**, p. 24-35, 5 ed. Lippincott Williams & Williams: Baltimor, 2002.

COAST, J.; SMITH, R.D. Solving the problem of antimicrobial resistance: is a global approach necessary? **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1-2, 2003.

CORRÊA, A. ; ROSA, P.W. ; BELLA CRUZ, A. ; SAVI, A. O.S. ; CECHINEL FILHO, V. ; NUNES, R.J. ; Synthesis and antibacterial activity of citraconimides. **Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 353-355, 1996.

COSTA, B.B.C. **Síntese de novos derivados da tetrahidroftalimida de interesse biológico e estudos preliminares de correlação estrutura-atividade**. 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

CUNHA, S.; OLIVEIRA, S. M.; RODRIGUES, M. T.; BASTOS, R. M.; FERRARI, J.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; NAPOLITANO, H. B.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C. Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 75, p. 32-39, 2005.

DEL RIO, D. T. **Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2004. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, 2004.

DOLABELA, M. F. **Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti *Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997 . Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DUCHOWICZ, P. R.; TALEVI, A.; BELLERA, C.; BRUNO-BLANCH, L. E.; CASTRO, E.A. Application of descriptors based on Lipinski's rules in the QSPR study of aqueous solubilities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3711-3719, 2007.

ESPINEL-INGROF, A.; PFALLER, M.A. Antifungal agents and susceptibility testing. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed. Washington: ASM, 1995.

FERNANDES, J.B.F.; VARGAS, V.M.F. Mutagenic and antimutagenic potential of medicinal plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 269-273, 2003.

FERREIRO, L.; SPANAMBERG, A.; BORBA, M. R.; SANCHES, E. M. C.; ROEHE, C.; SANTURIO, J. M.; CHERMETTE, R. Feohifomicoses: infecções micóticas emergentes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 239-241, 2007.

FISHER, F.; COOK, N. B. **Micologia fundamentos e diagnóstico**. Rio de Janeiro: Reviter, 2001.

FLAIH, N.; PHAM-HUY, C.; GALONS, H. An expeditious synthesis of cyclic imides. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 3697-3698, 1999.

FOXMAN, B. Contributions of Molecular Epidemiology to the Understanding of Infectious Disease Transmission, Pathogenesis, and Evolution. **Annals of Epidemiology**, v. 17, p. 148-156, 2007.

FRATIANNI, F.; LUCCIA, A.D.; COPPOLA, R.; NAZZARO, R. Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* Black truffle: A preliminary study. **Food Chemistry**, v. 102, p. 471-474, 2007.

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; CECHINEL FILHO, V.; TRAJANO, V. N.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O. Antimicrobial effectiveness of maleimides on fungal strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 4, p. 661-664, 2006.

GEORGE M. Anthony. Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 139, p. 1-10, 1996.

GHANNOUM M, A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, p. 501-517, 1999.

GOBERNADO, M. Reflexiones sobre resistencia bacteriana. **Revista Española Quimioterapia**, v.16, p. 158-160, 2003.

GONZALES, A.M.; RAISMAN J.S.; **Hipertextos del área de la biología**. [S.1], 2008. Disponível em: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro4.htm> Acesso em: 13 jan. 2008.

GOOTZ, T. D. Discovery and development of new antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.1, 1990.

GOREN, M. Z.; ONAT, F. Ethosuximide: from bench to bedside. **CNS Drugs Reviews**, v. 13, p. 224-239, 2007.

GUIMARÃES, T. **Obtenção de novas imidas cíclicas de interesse biológico a partir da N-antipirino-3,4-dicloromaleimida**. 2006. Monografia (Graduação). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

HALL, I.H.; SCOVILLE, J.P.; REYNOLDS, D.J.; SIMLOT, R.; DUNCAN, P. Substituted cyclic imides as potential anti-gout agents. **Life Sciences**, v. 46, p. 1923-1927, 1990.

HARGREAVES, M.K., PRITCHARD, J.G., DAVE, H.R. Cyclic carboxylic monoimides. **Chemical Reviews**, v. 70, p. 439-469, 1970.

HEISIG, P. Inhibitors of bacterial topoisomerases: mechanisms of action and resistance and clinical aspects. **Planta Medica**, v. 67, p. 3-12, 2001.

INVITTOX. **The Ames test**. Protocol n^o. 30, 1992. Disponível em <<http://www.ib.amwaw.edu.pl/invittox/prot/30.htm#TOP>> acessado em Março de 2008.

INVITTOX. **Yeast growth rate cytotoxicity test**. Protocol n^o. 33, 1991. Disponível em <<http://www.ib.amwaw.edu.pl/invittox/prot/33.htm>> acessado em Março de 2008.

JAYAPRAKASHA, G.K.; NEGI, P.S.; JENA, B.S. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 246-250, 2006.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**, 21 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

JEHN, U. **Micologia clínica: guia para a prática interdisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000.

JINDAL, D. P.; BEDI, V.; JIT, B.; KARKRA, N.; GULERIA, S.; BANSAL, R.; PALUSCZAK, A.; HARTMANN, R. B. Synthesis and study of some new N-substituted imide derivatives as potential anticancer agents. **II Farmaco**, v. 60, p. 283-290, 2005.

JOLY, V.; BOLARD, J.; YENI, P. *In vitro* models for studying toxicity of antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1799-1804, 1992.

JORGE, S. D. **Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados de 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados 5(6)-benzofuraxânicos frente a cepa padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus***. São Paulo: USP. 154p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KANNAN, P.; JANAKI, C.; SELVI, G. S. Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, p. 212-215, 2006.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica**, 2 ed. São Paulo: Premier, 1999.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 783 p.

KOSSAKOWSKI J.; JAROCKA M.; Synthesis of new N-substituted cyclic imides with an expected anxiolytic activity. XVII. Derivatives of 1-ethoxybicyclo[2.2.2]-oct-5-one-2,3-dicarboximide. **II Farmaco**, v. 56, p. 785-789, 2001.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELLO, N. T. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAKSHMI, V.; SUDHA, T.; TEJA, D.; UMABALA P. Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. **Indian Journal of Microbiology**. v. 25, p. 146-149, 2007.

LETAVAYOVÁ, D.; VLASAKOVA, J. SPALLHOLZ, B.; BROZMANOV, J.; CHOVANEC, M. Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 638, p. 1-10, 2008.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 632 p.

LIMA, E.O; QUEIROZ, E.F; ANDRICOPULO, A.D.; NUNES, R.J; YUNES, R.A; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V. Evaluation of antifungal activity of N-aryl-maleimides and N-phenylalkyl-3,4-Dichloro-maleimides. **Boletim de La Sociedade Chinela de Química**, v. 44, p. 185-189, 1999.

LIMA, E.O.; BELÉM, L.F.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; NUNES, R.J.; ANDRICOPULO, A.; SILVA, V.E. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 442-451, 2002.

LIMA, L. M.; Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, p. 1456-1468, 2007.

LIPINSKI, A. C.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.46, p. 3-26, 2001.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.158-163, 2006.

LLOP, C.; PUJOL, I.; AGUILAR, C.; SALA, J.; RIBA, D.; GUARRO, J. Comparison of tree methods of determining MICs for filamentous fungi using different end point criteria and incubation periods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 239-242, 2000.

LÓPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMINGUEZ, J. N.; LOBO, G.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTÉS, J.C G.; RIBAS, J. C.; DEVIA, C.; RODRIGUEZ, A. M.; ENRIZ, R. D. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcones derivatives and synthesis analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, august 2001.

MARON, D. M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MEDERSKI, W.W.K.R.; BAUMGARTH M.; GERMANN M.; KUX D.; WEITZEL, T.; A convenient synthesis of 4-aminoaryl substituted cyclic imides. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 2133-2136, 2003.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E. J.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, C. O.; BOSCO, M. B. **Análise da citotoxicidade da *Acmela brasiliensis* utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae***. Itajaí: UNIVALI. 40p. Monografia (Graduação) – Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M. **Microbiologia médica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999.

MITSCHER, L.A; LEV, L.P.; BATHOLA, M.S; WU, W.N.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.

MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J.J. C. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MURRAY, P.; KOBAYASHI, G.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

NADKARNI T, GOEL, A. Aspergilloma of the brain: an overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, p. 37-41, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. M7-A3. NCCLS, Villanova, PA, 1993.

NIKAIDO, H. Multiple antibiotic resistance and efflux. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 516-523, 1998.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

ORZESZKO, A.; KAMINSKA, B.; ORZESZKO, G.; STAROSCIAK B. J. Synthesis and antimicrobial activity of new adamantane derivatives II. **II Farmaco**, v. 55, p. 619-623, 2000.

ORZESZKO, A; KAMINSKA, B. ; STAROSCIAK B. J. Synthesis and antimicrobial activity of new adamantane derivatives III. **II Farmaco**, v. 57, p. 619-624, 2002.

PAKSHIR K.; HASHEMI, J. Dermatophytosis in Karaj, Iran. **Indian Journal of Dermatology**, v. 51, p. 262-264, 2006.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, G. I.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W., PETSCHERT, A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dentistry**, v. 28, p. 341-345, 2000.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, p. 171-177, 2007.

PLORDE, J. J. Antimicrobics and chemotherapy of bacterial and viral infections. In: RYAN, K. J. **Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases**. 3 ed. Stamford: Appleton & Longe, 1994.

POOLE, K. Bacterial multidrug resistance – emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, p. 453-456, 1994.

POOLE, K. Multidrug resistance in bacteria Gram-negative. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 500-508, 2001.

PRADO, S. R. T. **Efeitos das imidas cíclicas sobre o metabolismo mitocondrial e atividade antimelanoma**. Curitiba: UFPR. 256p. Tese (Doutorado) – Curso de pós graduação em bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PRADO, S.; CECHINEL-FILHO, V.; CAMPOS-BUZZI; CORRÊA, R.; CADENA, S.; OLIVEIRA, M. Biologics evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and *in vitro* cytotoxicity. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 59, p. 663-672, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RIOS, J.L.; RECIO M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Pharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROCHA, E. M. F. **Mecanismo molecular envolvido na resistência aos derivados de acridina e ao antimicótico tioconazol em *Aspergillus nidulans***. Ribeirão Preto: FMRP, 2002, 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Área: Concentração Genética, Ribeirão Preto: 2002.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Antimicrobial Agents**, v. 27S, p. 7-11, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana – interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, p.118, 2005.

RUSSEL, A.D., CHOPRA, I. **Understanding antibacterial action and resistance**. Nova Iorque: Ellis Horwood, p.246, 1990.

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

SHAO P. L.; HUANG L. M.; HSUEH P.R. Recent advances and challenge in the treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Microbiology Agents**, v. 30, p. 487-495, 2007.

SINGH, S.; BEENA, P. M. Profile of dermatophyte infectious in Baroda. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 69, p. 281-283, 2003.

SIQUEIRA, M.J.; BOMM, D.M.; PEREIRA, G.F.N.; GARCEZ S.W.; BOAVENTURA, M.A.D . Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, p. 557-559, 1998.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 95-100, 2005.

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P. and PHILLIPSON, J.D., A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Medica**, v. 59, p. 250–252, 1993.

SORTINO, M; CECHINEL FILHO, V; CORRÊA , R; ZACCHINO, S. N-phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 560-568, 2008.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B., SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. Bellé. **Ciências Farmacêuticas**. Itajaí: UNIVALI, 2003. 109-166.

STEIN, A.; BEHAR, P.; CUNHA, C. R; PELLEGRIN, L.; FERREIRA, J. S.F. Uso racional de antibióticos para médicos de atenção primária. **AMRIGS**, v. 48, n. 2, p. 126-134, 2004.

STRATTON, C. W. **The cost of microbial resistance**. Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter, v. 18, p. 96-97, 2002.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, 2000.

THOMAS, G. **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 413, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TURAN-ZITONI, G.; SIVACI, M.; KILIÇ, F. S.; EROL, K. Synthesis of some trizolyl-antipyrene derivatives and investigation of analgesic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 685-689, 2001.

VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; LEITÃO, A.C.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureoides* in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 240, p. 13-18, 1990.

VIKSVEEN, P. Antibiotics and development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative? **Homeopathy**, v. 92, p. 99-107, 2003.

XESS, I.; MOHANTY, S.; JAIN, N.; BANERJEE, U. Prevalence of *Aspergillus* species in clinical samples isolated in an Indian Tertiary care hospital **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 58, p.513-519, 2004.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R.; SOUZA, V. M. **Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998.

ZANI, C.L., CHAVES, P.G.; QUEIROZ, R., Brine shrimp lethality assay as a pre-screening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v.2, p. 47-50, 1995.

ZENTZ, F.; VALLA, A.; GUILLOU, R. L.; LABIA, R.; MATHOT, A. G.; SIROT, D. Synthesis and antimicrobial activities of N-substituted imides. **II Farmaco**, n.57, p.421-426, 2002.

ZENTZ, F.; GUILLOU, L.; LABIA, R.; SIROT, D.; LINARD, B.; VALLA. Synthesis, in vitro antibacterial and cytotoxic activities of a series of 3- substituted succinimides. **II Farmaco**, v.60, p.944-947, 2004.

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n.5, p. 1060-1075, 2006.

APÊNDICE

Apêndice A – Tabela dos valores médios obtidos de unidades formadoras de colônias no teste de avaliação mutagênica das maleimidias em estudo, controle negativo e controle positivo, sobre três linhagens de *Salmonella typhimurium*.

Substância	Unidades Formadoras de Colônias		
	Cepa TA 97	Cepa TA 98	Cepa TA 100
Azida	48	24	638
DMSO	152	45	163
01	93	43	115
02	129	39	130
03	110	41	158
04	149	28	136
05	107	44	127
06	133	31	148
07	97	28	112
08	100	38	153
09	98	27	130
10	98	38	118
11	150	30	100
12	108	35	150
13	134	40	129
14	95	29	145
15	142	36	119
16	139	37	137
17	101	43	121
18	95	29	149
19	128	36	127

Legenda: Azida Sódica - controle positivo (Azida), Dimetilsulfóxido - controle negativo (DMSO), N-antipirino-3,4-dicloromaleimida (01), N-antipirino-3-cloro-4-[anilino maleimida] (02), N-antipirino-3-cloro-4-[3,4dicloroanilino maleimida] (03), N-antipirino-3-cloro-4-[4-cloroanilino maleimida] (04), N-antipirino-3-cloro-4-[4-metóxi-anilino maleimida] (05), N-antipirino-3-cloro-4-[4-metil-anilino maleimida] (06), N-antipirino-3-cloro-4-[4-bromoanilino maleimida] (07), N-antipirino-

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)