

"ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DOS DERIVADOS DE 4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL 4-X-FENILMETANONA E TOXICIDADE AGUDA EM *Escherichia coli*".

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a tuberculose é responsável por mais de 3 milhões de mortes por ano (Hart e col., J. Med. Microbiol., 44: 1-34, 1996) e o aumento da incidência está relacionado com casos da Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em muitos países (Lima e col., Rev. Saúde Públ. S. Paulo, 31:217-20, 1997). A quimioterapia com drogas antituberculose se iniciou em 1944 com a estreptomicina e, em 1946, já havia o uso de uma associação terapêutica visando a cura da tuberculose causada por microrganismos resistentes. Além do aumento no número de casos de tuberculose há um aumento da proporção de cepas resistentes (Cohn e col., Clin. Infect. Dis., 24:S121-S130, 1997) o que dificulta o tratamento da doença. Isto, tem levado à contínua pesquisa por uma quimioterapia alternativa por meio da identificação de novas drogas que sejam mais eficazes e menos tóxicas que as correntemente em uso.

Os derivados de 4'-Bromo-[1,1'-Bifenil]-4-Il 4-X-fenilmetanona onde X=H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, SO₂CH₃, NO₂ - (III - Figura 1), (Durán e col., PI 9601602 (1996)), são substituídos na posição *para* do anel fenila e são obtidos por acilação de Friedel-Crafts.

Esta invenção relata: (1) a síntese de um novo derivado com o grupo acetoxila na posição *para* do anel fenila (X=OCOCH₃), (2) a formulação farmacêutica e a atividade antimicobacteriana dos derivados de 4'-Bromo-[1,1'-Bifenil]-4-Il 4-X-Fenilmetanona (X=H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, OCOCH₃, SO₂CH₃, NO₂) (4) e ensaios de toxicidade aguda demonstrando a ausência de toxicidade destes compostos em *E. coli*.

As formulações farmacêuticas para determinações da atividade antimicobacteriana de 4'-Bromo-[1,1'-bifenila]-4-il 4-X-fenilmetanona foram realizadas em solventes apróticos, como por exemplo o dimetilsulfóxido, ou em agentes tensoativos de caráter anfifílico (1 mg.L⁻¹). Em seguida, as formulações acima descritas foram diluídas de 2 a 500 mg.L⁻¹ em meio líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO).

1). Síntese dos derivados de 4'-Bromo-[1,1'-Bifenil]-4-Il 4-X-Fenilmetanona onde X=H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, SO₂CH₃, NO₂

Os compostos foram sintetizados por uma clássica acilação de Friedel-Crafts entre

4-bromobifenila e os cloretos de ácidos correspondentes (Durán e col., PI 9601602, 1996) para formar a 4'Bromo-[1,1'-Bifenila]-4-il 4-X-fenilmetanona (X=H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, SO₂CH₃, NO₂).

1.1). Síntese da 4'bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-acetoxifenil metanona

5 A síntese da 4'Bromo-[1,1'-Bifenila]-4-il 4-acetoxifenilmetanona (X=OCOCH₃) se procedeu pela reação de 0.2 g de cloreto de ácido acetoxibenzóico (Ignatious e col., Polymer 36: 2819-2825. 1995) com 0.26 g de 4-bromobifenila na presença de cloreto de alumínio (0.26 g) e 5 mL de dissulfeto de carbono (figura 1). Após 8 horas, a reação foi interrompida pela adição de água, o dissulfeto de carbono foi destilado à
10 vácuo e o produto bruto extraído com diclorometano. Da fase orgânica obteve-se a 4'bromo[1,1'-bifenil]-4-il 4-acetoxifenil metanona que foi purificada após recristalização com diclorometano e hexano com 80% de rendimento. A caracterização estrutural foi efetuada por espectroscopia de infra-vermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300 MHz, CDCl₃/TMS, ppm),
15 espectrometria de massa (EI-70 eV), espectrofotometria de ultravioleta/visível e ponto de fusão, de acordo com os dados abaixo.

IV (pastilha de KBr): 1642,5 (C=O, cetona), 1744,1 (C=O, éster). ¹H-RMN (300 MHz; CDCl₃/TMS): δ 8,0-7,1 (m, 12H, aromático), 2,35 (s, 3H, OCOCH₃) ppm. M.S. (m/z): 396/394 (M⁺, 22), 354/352 (73), 261/259 (20), 152 (53), 121 (100), 93 (8), 65 (8). U.V.
20 (CH₂Cl₂): λ_{máximo} - 284 nm. Ponto de fusão: 248 °C

2). Testes Biológicos

2.1). Toxicidade Aguda em *E. coli*

A toxicidade aguda foi determinada experimentalmente pela dosagem da concentração de CO₂ em meio de cultura contendo *E. coli* ATCC 25922. O
25 procedimento já descrito na literatura, baseia-se na análise por injeção de fluxo (FIA) com um detector condutométrico que avalia a respiração microbiana pelo período de 2 horas.

Os derivados de 4'-Bromo-[1,1'-Bifenil]-4-il 4-X-Fenilmetanona (X=H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, OCOCH₃, SO₂CH₃, NO₂) foram testados de 50 à 400 mmol.L⁻¹. Há um
30 controle negativo aonde a respiração microbiana é normal (0 % de inibição) e um controle positivo (adiciona-se 25 µl de tetraciclina 0.5 mg.L⁻¹ e a inibição é em torno de 40%). O parâmetro utilizado para inferir toxicidade foi IC₅₀ (concentração que inibe 50% da respiração celular). Estes compostos na concentração de 50 à 400

mmol.L⁻¹ não apresentaram toxicidade aguda em *E. coli* pela metodologia estudada.

2.2). Cepas e Condições de Crescimento:

As cepas de *M. tuberculosis H37Rv* ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. avium* ATCC 15769 e *M. malmoense* ATCC 29571 foram cultivadas em meio Lowenstein-Jensen à 37°C por aproximadamente 3 semanas e em seguida subcultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 à 37°C por 10 dias. Para os experimentos, as culturas bacterianas foram ajustadas à escala de densidade ótica N°1 do padrão de McFarland.

Para avaliar a atividade antimicobacteriana utilizamos a determinação da CIM (mg.L⁻¹) por meio da microdiluição em placas sendo o corante alamar blue o revelador do crescimento micobacteriano como descrito na literatura. As soluções dos compostos 4'-bromo-[1,1'-bifenila]4-il 4-X-fenil-metanona (X = H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, OCOCH₃, SO₂CH₃, NO₂) (figura 1) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma) à 1 g.L⁻¹ e diluídas em meio líquido Middlebrook 7H9 até a obtenção das concentrações de 2 à 500 mg.L⁻¹ antes da adição nas microplacas. As amostras foram avaliados em cepas padrões de micobactérias (anteriormente descritas) e a concentração inibitória mínima (CIM - em mg.L⁻¹) foi definida como a menor concentração da droga que previne uma alteração de cor do corante alamar blue do azul para o rosa, indicando que não houve crescimento de micobactérias. A forma oxidada, azul não fuorescente, se torna rosa após a redução. A oxidação-redução do corante é uma indicação de crescimento ou viabilidade celular.

Os resultados de CIM foram obtidos uma semana após o inóculo e estão apresentados na tabela 1. De nove amostras testadas, oito (X = H, Cl, Br, I, NO₂, CH₃, OCH₃, OCOCH₃) não mostraram atividade sobre *M. tuberculosis H37Rv*, *M. kansasii*, *M. avium* e *M. malmoense*. O derivado SO₂CH₃ apresentou atividade antimicobacteriana nas 4 cepas testadas, o qual teve CIM de 4, 8, 16 e 16 mg.L⁻¹ respectivamente para *M. tuberculosis H37Rv*, *M. kansasii*, *M. avium* e *M. malmoense*.

Tabela 1 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) mg.L⁻¹, SOBRE *M. tuberculosis H37Rv* ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. avium* ATCC 15769 e *M. malmoense* ATCC 29571.

	Cepas			
Derivados	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. malmoense</i>

	H	62	250	250	250
	Cl	>128	>128	>128	>128
	Br	>128	>128	>128	>128
	NO ₂	>32	>32	>32	>32
5	CH ₃	62	250	250	250
	OCH ₃	>32	250	250	250
	OCOCH ₃	125	62	125	≤31
	SO ₂ CH ₃	4	8	16	16

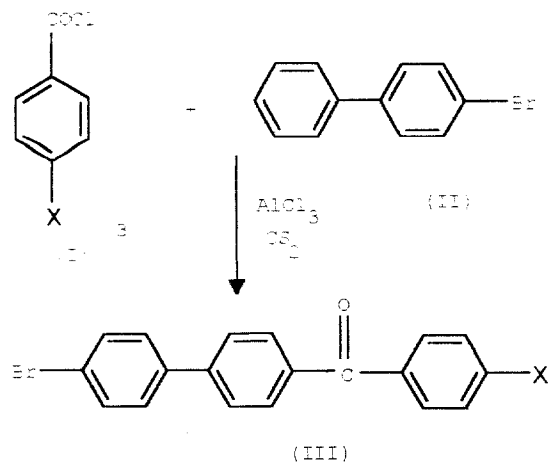


FIGURA 1

REIVINDICAÇÕES

1. **“ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DOS DERIVADOS DE 4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL 4-X-FENILMETANONA E TOXICIDADE AGUDA EM *Escherichia coli*”**; caracterizada pela preparação farmacêutica dos derivados de 4'-Bromo-[1,1'-bifenil]-4-il 4-X-fenilmetanona (X=H, Cl, Br, I, CH₃, OCH₃, OCOCH₃, SO₂CH₃, NO₂) para a utilização como agentes antimicobacterianos ou antibacterianos.
2. **“ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DOS DERIVADOS DE 4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL 4-X-FENILMETANONA E TOXICIDADE AGUDA EM *Escherichia coli*”** caracterizada pela síntese do derivado 4'-Bromo-[1,1'-bifenil]-4-il 4-acetoxifenilmetanona (X=OCOCH₃).
3. **“ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DOS DERIVADOS DE 4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL 4-X-FENILMETANONA E TOXICIDADE AGUDA EM *Escherichia coli*”**, caracterizada pela determinação da toxicidade de 4'-Bromo-[1,1'-bifenil]-4-il 4-x-fenilmetanona através da respiração celular de *Escherichia coli*.

RESUMO

"ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DOS DERIVADOS DE 4'-BROMO-[1,1'-BIFENIL]-4-IL 4-X-FENILMETANONA E TOXICIDADE AGUDA EM *Escherichia coli*".

- 5 Trata-se de um procedimento para a síntese da 4'-Bromo-[1,1'-bifenil]-4-il 4-acetoxifenilmetanona ($X=OCOCH_3$) e descreve a preparação dos derivados de 4'-Bromo-[1,1'-bifenil]-4-il 4-acetoxifenilmetanona ($X=H, Cl, Br, I, CH_3, OCH_3, OCOCH_3, SO_2CH_3, NO_2$) para a utilização como antimicobacterianos em cepas de *Mycobacterium*. Os valores de CIM determinados para estes compostos está entre 4
- 10 e 500 $mg.L^{-1}$, sendo o derivado SO_2CH_3 , o mais potente. Na avaliação da toxicidade em *E. coli* estes compostos não foram tóxicos.