

# SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO SALICÍLICO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUBERCULOSE

The synthesis of salicylic Acid derivatives and the study of anti-tuberculosis activity

<sup>1,2</sup>Fernando Henrique de Souza Gama; <sup>1,2</sup>Igor dos Reis Detoni; <sup>2</sup>José Celso Torres\*; <sup>3</sup>Felipe R. C. Vicente; <sup>3</sup>Maria C. S. Lourenço.

<sup>1</sup>Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, campus Nilópolis.

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisa Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz.

\*email: jcelsotorres@gmail.com

## RESUMO

A tuberculose, uma doença grave causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, é responsável pela morte de milhões de pessoas por ano. De acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde, no Brasil existem cerca de 50 milhões de pessoas infectadas pela *Mycobacterium tuberculosis*. Sendo que, aproximadamente, 110 mil pessoas desenvolvem a doença e cerca de 6 mil pessoas morrem por ano, vítimas da tuberculose. Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados derivados do ácido salicílico e utilizadas em estudos de atividade antibacteriana, incluindo atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*. A metodologia usada na síntese envolveu a reação do ácido salicílico **1a** com dicloroiodato de potássio para formar o ácido 3,5-diiodossalicílico **1b**, em 95 % de rendimento. Os ácidos salicílico **1a** e 3,5-diiodossalicílico **1b**, através da reação com tricloreto de fósforo e anilinas apropriadas, foram convertidos nas respectivas salicilanilidas, em 60 – 80 % de rendimento. Dos compostos testados apenas a diiodosalicilanilida **3b** mostrou atividade contra o microorganismo patogênico *Mycobacterium tuberculosis*, em uma concentração mínima inibitória (CMI) de 100 µg/mL. Além disso, a diiodo-salicilanilida **3b** também mostrou atividade contra outros patógenos *S. aureus* ATCC, *MRSA* OC2089, e *E. faecalis* OC3041. Porém, nenhum dos compostos testados mostrou ação contra a *P. aeruginosa*, um dos patógenos responsáveis por casos de infecções hospitalares.

**Palavras-chave:** salicilanilida, tuberculose, ácido salicílico.

## ABSTRACT

Tuberculosis, a serious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*, is responsible for the deaths of millions of people every year. According to official data from the Ministry of Health in Brazil, there are about 50 million people infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Approximately 110,000 people develop the disease and about 6,000 people die every year as victims of tuberculosis. In this work salicylic acid derivatives were synthesized, characterized and used in studies of antibacterial activity, including activity against *Mycobacterium tuberculosis*. The methodology used in the synthesis involved the reaction of salicylic acid **1a** with potassium dichloriodate to form 3,5-diiodosalicylic acid **1b**, in 95% yield. The salicylic acid **1a** and 3,5-diiodosalicylic acid **1b** by reaction with phosphorus trichloride and the appropriate anilines were converted into their salicylanides in 60-80% yield. Of the compounds tested only 3,5-diiodosalicylanilide **3b** showed activity against the pathogenic microorganism *Mycobacterium tuberculosis* at a minimum inhibitory concentration (MIC) of 100 µg/mL. Moreover, the 3,5-diiodosalicylanilide **3b** also showed activity against other pathogens *S. aureus* ATCC, MRSA OC2089 and *E. faecalis* OC3041. However, none of the compounds tested showed activity against *P. aeruginosa*, which is currently one of the pathogens responsible for cases of hospital infections.

**Keywords:** salicylanide, tuberculosis, salicylic acid.

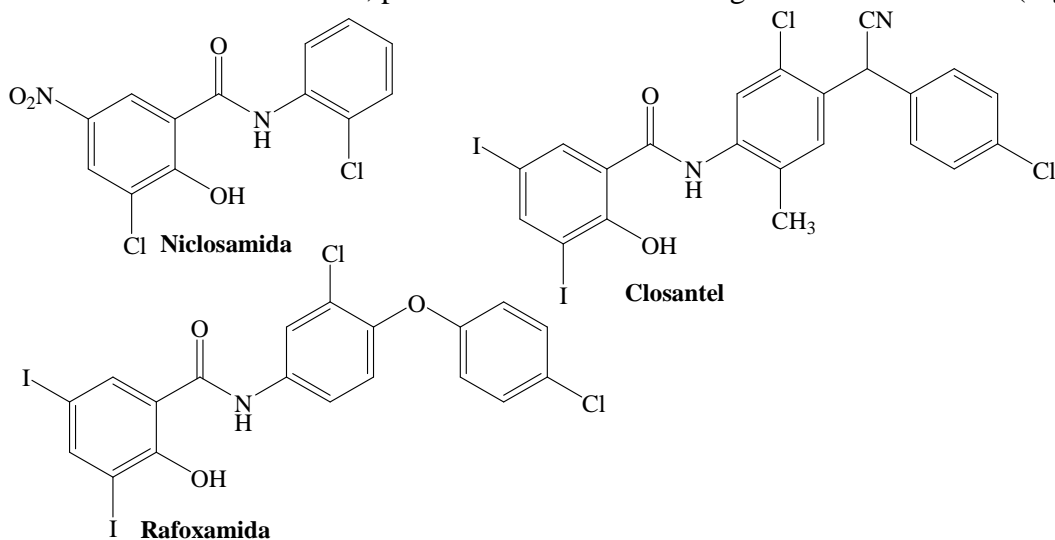
## INTRODUÇÃO

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde e a ONG Médicos Sem Fronteiras classificaram as doenças, segundo o interesse da indústria farmacêutica, em: doenças globais, doenças negligenciadas e doenças extremamente negligenciadas (LIMA Jr, 2009). As doenças classificadas como *negligenciadas*, especificamente, são doenças tropicais infecciosas; dentre elas: a malária, a tuberculose, a dengue e a doença de Chagas. Estas doenças acometem milhões de pessoas em todo o mundo, entretanto, ainda não possuem um tratamento eficaz ou o arsenal terapêutico disponível é muito limitado. Estima-se que as doenças *negligenciadas* matam mais de um milhão de pessoas por ano (PONTES, 2010), entretanto, estas doenças despertam pouco interesse da indústria farmacêutica, porque afetam, principalmente, as populações de países em desenvolvimento.

A tuberculose, uma doença grave causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, é responsável pela morte de cerca de 3 milhões de pessoas por ano (SOUZA, 2009). O Brasil ocupa o 19º lugar no *ranking* dos 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose do mundo. De acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde, no Brasil existem, atualmente, cerca de 50 milhões de pessoas infectadas pela *Mycobacterium tuberculosis*. Sendo que, aproximadamente, 110 mil pessoas desenvolvem a doença e cerca de 6 mil pessoas morrem por ano, vítimas da tuberculose (SOUZA, 2009; BRASIL, 2010).

O uso indiscriminado de antibióticos e a interrupção do tratamento antes da cura do paciente tornam o combate à tuberculose ainda mais difícil, isso porque esses dois fatores causam desenvolvimento de resistência da *Mycobacterium tuberculosis* às drogas administradas. Assim, faz-se necessário a busca constante por novos antibióticos que possuam mecanismos de ação distintos daqueles utilizados atualmente para o combate a esta doença.

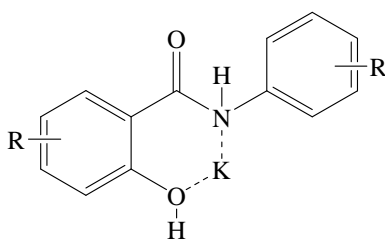
Nos últimos anos várias classes de compostos antituberculose, com diferentes mecanismos de ação, tem sido sintetizados (JUNIOR, *et al*, 2009; SOUZA, 2009). Dentre os compostos com potencial atividade antituberculose, encontram-se as salicilanilidas derivadas do ácido salicílico, que, além da atividade antibacteriana, possuem atividades antifúngica e anti-helmíntica (Figura 1).



**Figura 1** – Salicilanilidas com atividade antimicrobiana

As salicilanilidas são descritas como uma classe de compostos ionóforos, substâncias complexantes transportadoras de íons (LIN & NETO, 1998). Essa classe de substâncias está envolvida no processo de transporte de cátions monovalentes, assim como o K<sup>+</sup>, do meio aquoso para o meio lipofílico através da bicamada lipídica da membrana plasmática das bactérias, em um mecanismo de ação semelhante ao da valinomicina (OZAWA *et al*, 1984; RUSSEL, 1987; RUSSEL & STROBEL, 1988; BIAGI *et al.*, 2004).

Estudos da relação estrutura-atividade das salicilanilidas indicam a necessidade da presença do grupo hidroxila, *orto*, a posição do grupo amida, o qual permitirá o transporte dos íons K<sup>+</sup> para fora da membrana celular, através da formação de complexos com os mesmos (Figura 2) (DE LA FUENTE *et al*, 2006; GAMA *et al*, 2009; LÖW, 2010).



**Figura 2** – Complexação da salicilanilida com o íon potássio

Além da presença dos grupamentos amida e hidroxila; faz-se necessário a presença de anéis aromáticos e átomos de halogênio em um ou em ambos os anéis, facilitando assim, a permeabilidade das salicilanilidas pela bicamada fosfolipídica (SCHULER, 1957; ROTMISTROV *et al.*, 1970; OZAWA *et al*, 1984).

Estudos complementares *in vitro* e *in vivo* mostraram que as salicilanilidas inibem a fosforilação oxidativa no transporte de elétrons e inibem a fosforilação mitocondrial em microorganismos (ROTMISTROV *et al.*, 1970). Entretanto, ainda são poucos os estudos sobre a relação estrutura-atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos a síntese e a caracterização de derivados do ácido salicílico; e estudos de suas atividades antibacteriana, incluindo atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento do tipo PMF II da marca Tecnopon e não foram corrigidos. O andamento das reações foi acompanhado por cromatografia em camada delgada utilizando cromatofolha de alumínio – sílica gel 60 F<sub>254</sub> da Merck e as placas foram reveladas com o uso da lâmpada ultravioleta – 254 e 366 nm da marca Mineralight Lamp. Os espectros de Infravermelho na faixa de 4.000 a 600 cm<sup>-1</sup> foram obtidos, utilizando pastilhas de KBr, em aparelho Thermo Nicolet modelo AVATAR 330 FT-IR.

### Iodação com dicloroiodato de potássio (KICl<sub>2</sub>)

Em um balão de fundo redondo, provido de um agitador magnético, foram adicionados 12,5 mL (25 mmols) do dicloroiodato de potássio (KICl<sub>2</sub>) e 25,0 mL de água destilada. A mistura foi posta sob forte agitação durante a adição lenta de 10 mmol da vanilina (ou ácido salicílico) dissolvidos em 10,0 mL de metanol. Após a adição, a mistura reacional foi mantida, sob agitação, à temperatura ambiente durante 3 horas.

Após o término da reação foram adicionados 25,0 mL de água destilada à mistura reacional, o precipitado formado foi filtrado e lavado várias vezes com água destilada. O produto bruto foi solubilizado em 30 mL de metanol a quente e em seguida foram adicionados 30,0 mL de uma solução de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a 10 %. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada e seco ao ar.

### Obtenção das amidas, utilizando tricloreto de fósforo (PCl<sub>3</sub>)

A um balão de fundo redondo, provido de agitador magnético, foram adicionados 1 mmol dos respectivos ácidos salicílicos: 10 mL de tolueno e 1 mL (11,5 mmol) de tricloreto de fósforo (PCl<sub>3</sub>). A essa mistura, sob agitação, foram adicionados 1,1 mmol das respectivas anilinas dissolvidas em 1,0 mL de tolueno. Em seguida, o balão foi adaptado a um condensador de refluxo e a mistura reacional foi aquecida sob refluxo durante 3-5 h.

Após o término da reação, acompanhado por cromatografia em camada delgada, o solvente foi removido em evaporador rotatório, obtendo-se um resíduo escuro. O produto bruto foi recristalizado em acetona ou em uma mistura etanol/água (1:1).

## Ensaio biológicos

As substâncias utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* foram: ácido-3,5-diiossilicílico **1b**, tetraiodossalato **2a**, tetraiododissalicilida **2b**, 5-iodo-vanilina e 3,5-diiiodosalicilanilida **3b**. Os microorganismos empregados, foram: *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv (ATCC27294), *S. aureus* ATCC 29213, *MRSA* OC2089, *E. faecalis* OC3041 e *P. aeruginosa*. Foi feito teste colorimétrico Microplaca Alamar Blue Assay (MABA) e o ensaio de identificação de turvação do meio de cultura.

As substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas, em série, no caldo Middlebrook 7H9, antes de inocular. As concentrações usadas para as substâncias testadas variaram de 6,25 a 100 µg/mL. A Rifampicina, Gentomicina e a Vancomicina foram usadas como drogas de referências (padrões internacionais). A observação da concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração dos produtos isolados inibidores do crescimento microbiano e expressos pela média dos ensaios.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monocloreto de iodo (ICI) é o reagente normalmente utilizado para fazer a iodação do ácido salicílico (WOOLLETT & JONHSON, 1943). Entretanto, o mesmo é um líquido muito tóxico cuja obtenção envolve o borbulhamento de quantidade equimolar de cloro gasoso em um recipiente contendo iodo sublimado.

Uma fonte alternativa de ICl são os complexos, como por exemplo o monocloreto de iodo-piridina (PyICl), um sólido estável muito utilizado na iodação de várias classes de compostos aromáticos; e o complexo dicloroiodato de potássio (KICl<sub>2</sub>) em solução aquosa, utilizado na iodação de derivados de ácidos amino e hidróxi-benzóicos (LARSEN *et al.*, 1956; TORRES, 2000; GARDEN *et al.*, 2001).

Ao contrário do ICl, a solução de dicloroiodato de potássio é facilmente preparada pela adição simultânea, gota a gota, de uma solução aquosa de iodeto de potássio, e de ácido clorídrico concentrado a uma suspensão de iodato de potássio e cloreto de potássio (Figura 3), sob forte agitação. A solução resultante possui uma coloração vermelho castanha, estável quando estocada à temperatura ambiente em um frasco âmbar fechado (TORRES, 2000).

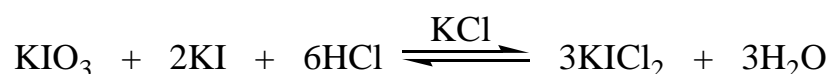


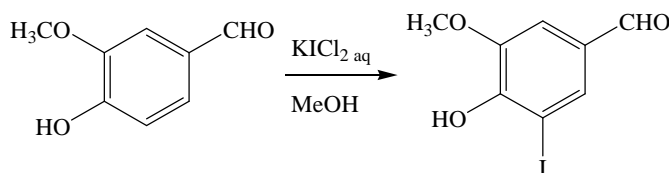
Figura 3. – Obtenção do dicloroiodato de potássio

Um outro procedimento para obtenção do dicloroiodato de potássio, descrito por Larsen e seus colaboradores (1956), envolve a adição do monocloreto de iodo (ICI) a uma solução aquosa contendo excesso de cloreto de potássio. Segundo o autor, a acidez do meio e/ou o excesso de íons cloreto no meio têm efeito estabilizante sobre a solução aquosa do monocloreto de iodo, na presença de cloreto de potássio. Com base nestas informações, pode-se sugerir que na solução de dicloroiodato de potássio pode co-existir, em equilíbrio, as espécies KICl<sub>2</sub> e ICl (Figura 4), sendo essa última, provavelmente, a espécie ativa frente a reação de iodação (TORRES, 2000).



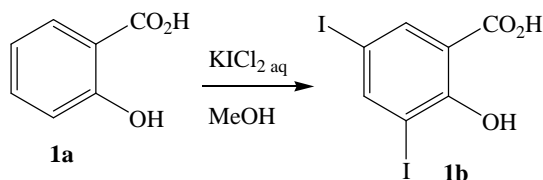
Figura 4 – Equilíbrio entre o KICl<sub>2</sub> e ICl

Após a preparação da solução 2 N de dicloroiodato de potássio, esta foi testada na iodação da vanilina. Assim, uma solução metanólica da vanilina foi adicionada lentamente a uma solução aquosa de KICl<sub>2</sub>, para formar um sólido escuro (Figura 5). Este sólido, após purificação através do tratamento com tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a 10%, forneceu um sólido amarelo claro (75% de rendimento) que foi caracterizado como sendo a 5-iodovanilina, com um ponto de fusão 185°C (182 °C; BUDAVARI *et al.*, 1996).



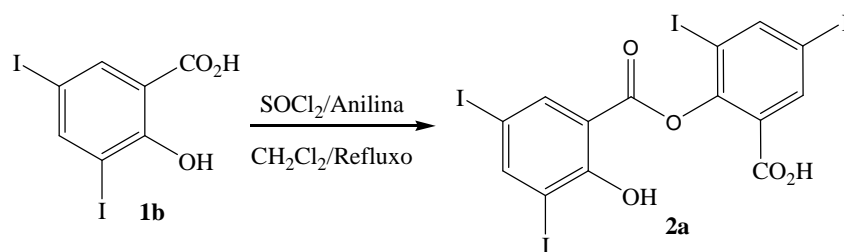
**Figura 5** – Iodação da vanilina

De forma similar, a adição lenta de uma solução metanólica de ácido salicílico a uma solução aquosa de 2,0 N de  $KICl_2$ , recém-preparada, forneceu um sólido cinza escuro (Figura 6). Esse sólido, após purificação através do tratamento com tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) a 10%, forneceu um sólido branco (80% de rendimento), que foi caracterizado como sendo o ácido-3,5-diiodossalílico com o ponto de fusão  $236^\circ C$  ( $236^\circ C$ ; BUDAVARI *et al.*, 1996).



**Figura 6** – Iodação do ácido salicílico.

A primeira tentativa de preparar a 3,5-diiodosalicilanilida envolveu o aquecimento do ácido-3,5-diiodossalílico com cloreto de tionila e anilina, em diclorometano (Figura 6). Após total consumo do substrato, obteve-se um sólido escuro que, após recristalização em acetona, forneceu um sólido branco (64% de rendimento) no qual foi caracterizado como sendo o tetraiodossalsalato **2a** (Figura 7) com o ponto de fusão  $227^\circ C$  (dec).



**Figura 7** – Reação com cloreto de tionila em diclorometano

Para verificar se realmente houve a influência da natureza do solvente e da temperatura na reação de formação do éster, o diclorometano foi substituído por tolueno. Assim, a mistura do ácido 3,5-diiodossalílico **1b**, cloreto de tionila e anilina e tolueno foi aquecida sob refluxo, obtendo-se um sólido escuro (Figura 8). Este sólido, após recristalização em acetona, foi analisado por cromatografia em camada delgada e mostrou um  $R_f$  diferente do  $R_f$  do tetraiodossalsalato **2a**. Além disso, o produto mostrou uma faixa de fusão de  $245-246^\circ C$  (dec), portanto, bem diferente do ponto de fusão do tetraiodossalsalato **2a** [ $227^\circ C$  (dec)].

A análise por espectrometria na região do infravermelho desse produto mostrou bandas de absorção em  $1764\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1751\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às deformações axiais das ligações  $C=O$  de grupamentos ésteres (SILVERSTEIN *et al.*, 1994), evidenciando a formação da tetraiododissalicilida **2b** (SHORT, 1952).



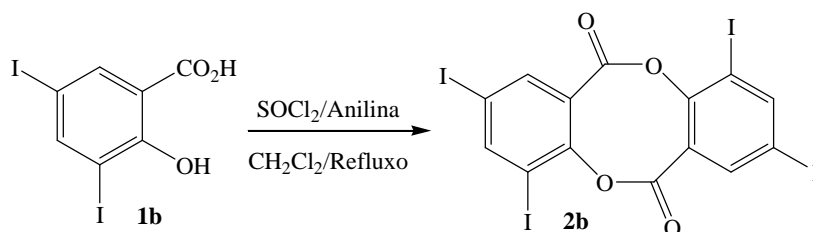


Figura 8 – Reação com cloreto de tionila em tolueno

A formação do tetraiodossalsalato **2a** e da tetraiododisalicilida **2b** nas reações de amidação, foi atribuída à utilização do cloreto de tionila. Provavelmente, o sub-produto da reação com cloreto de tionila, o ácido clorídrico (HCl), reage com a anilina para formar o clorohidrato da anilina, um sal “não reativo”.

A substituição do cloreto de tionila pelo tricloreto de fósforo nas reações com os ácidos, anilinas, em tolueno, sob refluxo, levou à formação das respectivas amidas (Figura 9).

A reação utilizando o ácido salicílico e o ácido-3,5-diiodossalicílico com a anilina, forneceu as respectivas amidas **3a** e **3b** em 75% e 60% de rendimento (Tabela 1: Entradas 1 e 2).

De forma similar, a reação dos ácidos com a 4-bromo-2,6-diiodo-anilina, levou à formação das amidas **3c** e **3d**, em 80% e 50% de rendimento, respectivamente. (Entradas 3 e 4). Estes resultados mostram que a presença do átomo de iodo no anel do ácido salicílico reduz, sensivelmente, o rendimento das reações, ao passo que a presença de substituintes halogenados (iodo e bromo), no anel da anilina, não influencia no rendimento da reação.

Por outro lado, o aquecimento sob refluxo do ácido-3,5-diiodossalicílico com a 2-iodo-4-nitroanilina, em tolueno, não forneceu a amida esperada (Entrada 5). Esse resultado foi atribuído ao caráter fortemente eletroatrator exercido pelo grupo nitro, o que torna a anilina pouco nucleofílica.

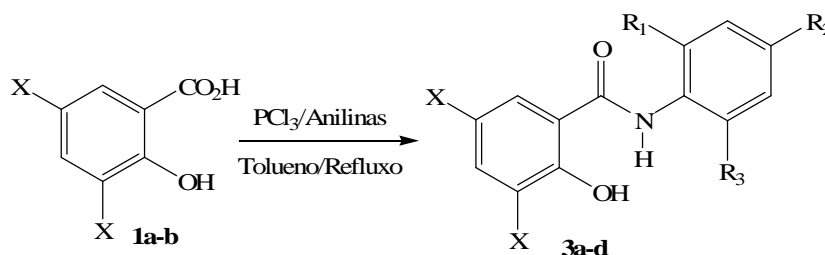


Figura 9 – Reação com tricloreto de fósforo em tolueno

Tabela 1 – Reações de formação das amidas

Entrada	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Tempo	Composto (%)
1	H	H	H	H	6h	<b>3a</b> (75%)
2	I	H	H	H	5h	<b>3b</b> (60%)
3	H	I	Br	I	5h	<b>3c</b> (80%)
4	I	I	Br	I	3h	<b>3d</b> (50%)
5	I	H	NO <sub>2</sub>	I	10h	-

Após o isolamento e purificação das amidas, essas foram caracterizadas através da determinação de seus respectivos pontos de fusão e através da análise espectrométrica na região do infravermelho. A comparação entre os espectros na região do infravermelho das amidas **3a** e **3b** com o espectro do ácido **1a**, mostra que há um deslocamento da banda referente à deformação axial da ligação dupla C=O de amida, para a absorção de maior energia do espectro (Tabela 2). Esses resultados estão coerentes com a absorção esperada para os grupos amidas (SILVERSTEIN, 1994).

Por outro lado, a comparação dos espectros na região do infravermelho das amidas **3c** e **3d**, com o espectro do ácido 3,5-diiodossalicílico **1b**, mostra que há um deslocamento da banda da amida **3d** referente à deformação axial da ligação dupla C=O, para a absorção de menor energia do espectro (Tabela 2).

Na comparação dos espectros dos compostos **3b**, **3c** e **3d**, observa-se que entre as amidas **3b** e **3c** há uma grande variação da posição da banda de C=O (Tabela 2).

**Tabela 2** – Dados de infravermelho e ponto de fusão.

Composto	IV $\nu_{C=O}$	Ponto de fusão
<b>1a</b>	1659 $\text{cm}^{-1}$	159°C
<b>1b</b>	1699 $\text{cm}^{-1}$	236°C
<b>3a</b>	1690 $\text{cm}^{-1}$	140°C
<b>3b</b>	1691 $\text{cm}^{-1}$	252°C (dec)
<b>3c</b>	1668 $\text{cm}^{-1}$	243°C (dec)
<b>3d</b>	1630 $\text{cm}^{-1}$	> 260°C (dec)

## Ensaio biológicos

O método do Alamar Blue – “Microplate Alamar Blue Assay” (ou MABA) consiste em uma técnica de determinação da concentração mínima inibitória (CMI), para o microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* em uma microplaca de 96 poços, que utiliza o princípio de detecção da oxirredução da resazurina (Alamar Blue) ou MTT, como um revelador alternativo. Neste método, a evidência da cor rosa mostra apenas o perfil de crescimento bacteriano, ao passo que a cor azul evidencia um perfil de ação bactericida da substância testada. Assim sendo, este teste permite a avaliação quantitativa da proliferação de bactérias, micobactérias e fungos em condições diversas (FRANZBLAU *et al*, 1998).

Neste ensaio microbiológico que utiliza o princípio da oxirredução da resazurina, observou-se que somente a diiodosalicilanilida **3b** conseguiu obter um perfil colorimétrico referente a uma ação bactericida, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 100  $\mu\text{g/mL}$  contra o microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Tabela 3). Isso porque as micobactérias, como a *Mycobacterium tuberculosis*, apesar de possuir uma parede celular semelhante às bactérias Gram-positivas, possuem alto poder de resistência a mecanismos de ataque a sua parede celular. Ou seja, é necessário que a substância-teste seja dotada de uma concentração razoavelmente elevada para promover essa inibição da etapa de fosforilação oxidativa da micobactéria (através da retirada dos íons monovalentes, como potássio, do meio interno para o meio externo). Com este mecanismo, a substância promove uma queda energética na cadeia respiratória e um desnível no balanço osmótico da micobactéria, vindo esta a morrer por perda da respiração celular.



Apesar do efeito de resistência deste microorganismo frente a outras substâncias testadas, constatou-se que outro composto sintetizado que obteve um perfil diferente da 3,5-diiodo-salicilanilida **3b** foi o tetraiodossalsalato **2a**, o qual obteve uma coloração levemente arroxeadada, também com uma concentração mínima inibitória de 100 µg/mL (faixa que está compreendida entre a cor rosa e azul), sugerindo com isso que esta substância obteve um perfil bacteriostático, ou seja, apenas inibiu o crescimento bacteriano, não conseguindo, portanto, uma ação de extermínio pleno da micobactéria.

**Tabela 3** – Perfil antimicrobiano das amostras testadas pela metodologia MABA.

Método: MABA					
Microorganismo utilizado: <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv ATCC n° 27294					
Concentração	5-iodovanilina	<b>2a</b>	<b>1b</b>	<b>2b</b>	<b>3b</b>
100 µg/mL	Res	<b>Bac</b>	Res	Res	<b>Sen</b>
50 µg/mL	Res	Res	Res	Res	Res
25 µg/mL	Res	Res	Res	Res	Res
12,5 µg/mL	Res	Res	Res	Res	Res
6,25 µg/mL	Res	Res	Res	Res	Res

Sen – Sensível; Res – Resistente; Bac – bacteriostático, Controle interno: 7H9, cepa padrão e Rifampicina – 1,0 µg/mL. Controle do crescimento: 7H9 e cepa padrão

Outro tipo de teste, conhecido como análise de turvação do meio de cultura, realizado contra as bactérias *S. aureus* ATCC 29213, *MRSA* OC2089, *E. faecalis* OC3041 e *P. aeruginosa*, mostrou que, essas mesmas substâncias, anteriormente testadas contra a *mycobacterium tuberculosis*, apresentaram ótimos resultados de atividade antibacteriana, em diferentes concentrações mínimas inibitórias somente para as Gram-positivas, ou seja, exceto para a bactéria *P. aeruginosa* (Gram-negativa) (Tabela 4).

Este resultado foi atribuído ao fato de que essa bactéria possui uma forte tendência de ser resistente a drogas que possuam mecanismo de ação semelhante ao da valinomicina (FRANZBLAU *et al.*, 1998). Isto porque nas bactérias Gram-negativas o invólucro celular é formado por uma parede celular e uma membrana externa conhecida como bicamada fosfolipídica (que não está presente nas Gram-positivas) o que dificulta a permeabilidade destas substâncias para o interior da célula, acarretando assim uma maior facilidade de resistência do microorganismo Gram-negativo.

Dentre as bactérias empregadas no ensaio de turvação do meio de cultura, observou-se uma maior atividade para a bactéria *MRSA* OC2089 a qual obteve os menores índices de CMI, comparados a outras bactérias testadas, como a *Staphylococcus aureus*. Dentro desse mesmo contexto, as substâncias que conseguiram desencadear uma maior seletividade, para um potencial de inibição contra as bactérias testadas, foram a 5-iodovanilina e a diiodo-salicilanilida **3b**, pois tiveram os menores índices de CMI em relação às outras substâncias testadas, tais como a tetraiodossalsalato **2a** e a tetraiododisalicilida **2b**(Tabela 4).

Tais resultados estão em pleno acordo com os resultados descritos na literatura (DE LA FUENTE *et al.*, 2006; FRANZBLAU *et al.*, 1998).

**Tabela 4** – Perfil bactericida das amostras testadas pela metodologia de turvação do meio de cultura

<b>Método:</b> Turvação do meio de cultura				
Microorganismos utilizados: <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>MRSA</i> OC2089, <i>E. faecalis</i> OC3041 e <i>P. aeruginosa</i> .				
Amostra	<i>S. aureus</i> CMI (µg/mL)	<i>MRSA</i> CMI (µg/mL)	<i>E. faecalis</i> CMI (µg/mL)	<i>P. aeruginosa</i> CMI (µg/mL)
<b>5-iodovanilina</b>	12,5	6,25	6,25	Res
<b>2a</b>	12,5	12,5	25	Res
<b>1b</b>	25	12,5	25	Res
<b>2b</b>	25	25	25	Res
<b>3b</b>	12,5	12,5	6,25	Res

## CONCLUSÕES

As reações do ácido-3,5-diiodossalicílico com  $\text{SOCl}_2$ , anilina, em diclorometano e em tolueno, forneceram o tetraiodossalsalato **2a** e tetraiododisalicilida **2b**, respectivamente. A substituição do  $\text{SOCl}_2$  por  $\text{PCl}_3$  nas reações dos ácidos salicílico e 3,5-diiodossalicílico, com anilinas, em tolueno, forneceu às respectivas salicilanilidas em bons rendimentos.

No ensaio de Alamar Blue (MABA), as únicas substâncias que conseguiram obter resultados positivos frente ao *Mycobacterium tuberculosis* foram a 3,5-diiodo-salicilanilida **3b** e o tetraiodossalsalato **2a**, com perfis bactericida e bacteriostático, respectivamente.

No ensaio de análise de turvação do meio de cultura, todas as substâncias testadas mostraram ação contra as bactérias Gram-positivas, sendo a 3,5-diiodo-salicilanilida **3a** e a 5-iodovanilina, as substâncias com as menores concentrações mínimas inibitórias (CMI), ambas com 6,25 µg/mL. A salicilanilida **3b** mostrou ação bactericida mais acentuada que as demais substâncias testadas. Entretanto, nenhuma das substâncias testadas mostrou-se eficaz contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIAGI, G., IRENE-GIORGI, I; LIVI, O.; NARDI, A.; CALDERONE, V.; MARTELLI, A.; MARTINOTTI, E.; SALERNI, O.L.R. Synthesis and biological activity of novel substituted benzanilides as potassium channel activators. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **39**, 491–498, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saude. **Tuberculose no Brasil e no mundo**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1527](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527), acessado em 28 de outubro de 2010.
- BUDAVARI, S. (Ed.); O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E.; KINNEARY, J.F. **The index merck – an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 20<sup>a</sup> Ed., Ed. Merck Research Laboratories Division of MERCK & CO., INC., New Jersey: Whitehouse Station, 1996.
- DE LA FUENTE, R.; SONAWANE, N.D.; ARUMAINAYGAM, D.; VERKMAN, A.S. Small molecules with antimicrobial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* identified by high-throughput screening. *British Journal of Pharmacology*, **149**, 551–559, 2006.

- FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; MCLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; COOK, M.B.; QUENZER, V.K.; FERGUSON, R.M.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *M. tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**, 362 – 366, 1998.
- GAMA, F.H.S.; TORRES, J.C.; FELIPE R.C.; VICENTE, F.R.C.; LOURENÇO, M.C.S. Síntese de derivados do ácido salicílico com potencial atividade antituberculose. *QO-143*. Fortaleza: **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Resumos...**, 2009.
- GARDEN, S.J.; TORRES, J.C.; MELO, S.C.S.; LIMA, A.S.; PINTO, A.C.; LIMA, E.L.S. Aromatic iodination in aqueous solution. A new lease of life for aqueous potassium dichloroiodate. **Tetrahedron Letters**, **42**, 2089–2092, 2001.
- JÚNIOR, C.O.R.; LE HYARIC, M., COSTA, C.F.; CORRÊA, T.A.; TAVEIRA, A.F.; ARAÚJO, D.P.; REIS, E.F.C.; LOURENÇO, M.C.S. VICENTE, F.R.C.; ALMEIDA, M.V. Preparation and antitubercular activity of lipophilic diamines and amino alcohols. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, **104**, 703-705, 2009.
- LARSEN, A.A.; MOORE, C.; SPRAGUE, J.; CLOKE, B.; MOSS, J.; HOPPE, J.O. Iodinated 3,5-Diaminobenzoic Acid Derivates, **Journal of the American Chemical Society**, **78**, 3210 – 3216, 1956.
- LIMA Jr. C.G. **Síntese de dezesseis adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: bioavaliação contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* e análise da relação estrutura-atividade biológica**. João Pessoa, PB: Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 2009.
- LIN, W.O.; NETO, J.T.X.B. Agentes complexantes: podante, coranante e criptante classificação e nomenclatura. **Química Nova**, **21**, 630-634, 1998.
- LÖW, N. **Polynukleare metall(II)-chelatkompexe durch spontane selbstorganisation: metalla-Kronenether und ihre Einschluß-Komplexe, tetranukleare und octanukleare metall-chelate** Disponível em: [http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Norbert\\_Loew/html/deckblatt.html](http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Norbert_Loew/html/deckblatt.html), acessado em 29 de outubro de 2010.
- OZAWA, I.; TAKEUCHI, I.; YAMAMOTO, K.; HAMADA, Y.; ITO, T.; KUWAHARA, M. Synthesis and antimicrobial activity of salicylanilide derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **32**, 305 – 312, 1984.
- PONTES, F. **Doenças negligenciadas ainda matam 1 milhão por ano no mundo**. Disponível em: [www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao\\_em\\_pauta\\_6\\_doencas\\_negl.](http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao_em_pauta_6_doencas_negl.), acessado em 20 de junho de 2010.
- ROTMISTROV, M.N.K.G.V.; LYSENKO, L.N.; DROBNOKHOD, L.P.; SKRYNIK, E.M. Effect of organic solvents on the antimicrobial activity of tribromosalicylanilide. **Antibiotiki (Kiev)**, **5**, 49 – 51, 1970.
- RUSSELL, J.B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force, **Journal of Animal Science**, **64**, 1519 – 1525, 1987.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J.; Effects of aditives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, **66**, 552-558, 1988.
- SCHULER, L.; **Bromosalicyloyl chloroanilide**, US 2, 802, 029, Patent, 1957.
- SHORT, L.N.; Infrared Studies of the Salicylanides and Cresotides. **Journal of the American Chemical Society**, **71**, 1073 – 1078, 1952.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, C.G.; MORRIL, T.C. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª Edição, Rio de Janeiro, RJ. Editora Guanabara Koogan, 1994.
- SOUZA, M.V.N.M. A tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Far-Manguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. **Revista Virtual de Química**, **1**, 9-16, 2009.
- TORRES, J.C. **Estudo de Reações de Acoplamento Arila-Arila Intramoleculares Catalisadas por Paládio. Síntese de Alcalóides de Amaryllidaceae a partir de Isatinas**. Rio de Janeiro, RJ: Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- WOOLLETT, G.H.; JOHNSON, W.W. 2-Hidroxy-3,5-diiodobenzoic acid, **Organic Syntheses Collective**, **2**, 343-343, 1943.