

ANTİMİKROBİYAL ETKİLİ YENİ BİR BENZOKSAZOL BİLEŞİĞİ

A NEW BENZOXAZOLE COMPOUND AS ANTIMICROBIAL AGENT

Özlem TEMİZ-ARPACI¹, Fatma KAYNAK-ONURDAĞ²

¹ Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06100,
Tandoğan-Ankara, TÜRKİYE

²Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06330,
Etiler- Ankara, TÜRKİYE

ÖZET

Bu çalışmada 2-(p-klorofenoksi)metil-5-(p-klorofenoksi)asetamidobenzoksazol, 2,4-diaminofenol ve p-klorofenoksiasetik asitin trimetilsilil polifosfat esteri (PPSE) katalizörlüğünde kondensasyonu ile sentez edildi. Yapısı IR, ¹H NMR ve mass analiz yöntemleri ile aydınlatıldı. Bileşiğin antimikrobiyal etkisi bazı Gram-pozitif, Gram-negatif bakteri ve Candida albicans ve onların antibiyotiklere dirençli suşlarına karşı belirlenmiştir. Bileşiğin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri bazı antibakteriyal ve antifungal ilaçlarla mukayese edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benzoksazol, antimikrobiyal etki.

ABSTRACT

In this research, 2-(p-chlorophenoxy)methyl-5-(p-chlorophenoxy)acetamidobenzoxazole was synthesized by condensing of 2,4-diaminophenol with p-chlorophenoxyacetic acid in presence of trimethylsilyl polyphosphate ester (PPSE). Its structure was elucidated by using IR, ¹H NMR and mass analysis methods. The antimicrobial activity of the compound against some Gram-positive, Gram-negative bacteria and Candida albicans and their isolates were determined. The observed Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of the compound was compared to some antibacterial and antifungal drugs.

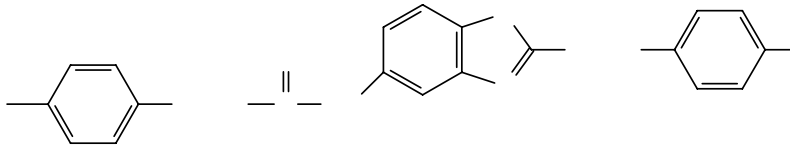
Key Words: Benzoxazole, antimicrobial activity.

GİRİŞ

Antimikrobiyal etkili ilaçlarla yapılan tedavide karşılaşılan en önemli sorun bu ilaçlara karşı mikroorganizmaların kısa sürede rezistans kazanması ve bu mikroorganizmaların biyokimyasına ait bilgilerin henüz yeterli olmamasıdır. Antibiyotiklere karşı bakterilerin oluşturduğu rezistansın moleküler mekanizması çeşitli ve komplekstir. Keşfedildiklerinden bu yana tüm farklı antibiyotik gruplarına karşı bakteriler rezistans geliştirebilmektedir. En sık görülen rezistans mekanizması plazmid konjugasyonunun horizontal olarak nakledilmesi ile olmaktadır. Son olarak yeni rezistans mekanizmaları ile çok tehlikeli metisilin-rezistans *Staphylococcus aureus* (MRSA), multi ilaç rezistans (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* gibi multi-ilâç rezistans(MDR) bakteri suşlarına etkili metisilin, vankomisin, rifamisin gibi çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı simultane rezistans gelişimi bildirilmiştir (1,2). Bu durum araştırmacıları daha etkili yeni antimikrobiyal etkili ilaçların tasarlanması ve sentezlenmesi çalışmalarına yöneltmektedir.

Araştırmalar heterosiklik çekirdek taşıyan yapıların oldukça güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermektedir (3). Benzoksazol halka sistemi nükleik asitlerin yapısında yer alan heterosiklik bazların yapısal benzeri olduğu için, bu grup bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerini bu yolla gösterebilecekleri düşünülmektedir. Bu nedenle son yıllarda bu türevler üzerindeki çalışmalar arttırılmıştır. Yapılan araştırmalar benzoksazol ve analoglarının antimikrobiyal etkileri yönünden (MIK; 200-6.25 µg/ml) kayda değer sonuçlar veren bileşikler olduğunu göstermektedir (4-9).

Daha önce yaptığımız araştırmalarda 5. konumda *p*-(klorofenoksi)asetamido fonksiyonu taşıyan 2-sübstitübenzoksazol bileşikleri sentezlenmiş ve antimikrobiyal etkinlikleri MIK : 100-12.5 µg/ml aralığında bulunmuştur (10). Bu çalışmada ise, 5. konumda *p*-(klorofenoksi)asetamido grubu, 2. konumda da *p*-klorofenoksimetil sübstitüenti taşıyan bir benzoksazol bileşiği (Şekil 1), PPSE katalizörlüğünde sentez edilerek (Şema 1) bazı Gram-pozitif, Gram-negatif bakteri ve bir fungus olan *C. albicans* ve bunların antibiyotiklere rezistans suşlarına karşı antimikrobiyal etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 1: 2-(*p*-Klorofenoksi)metil-5-(*p*-klorofenoksi)asetamidobenzoksazol

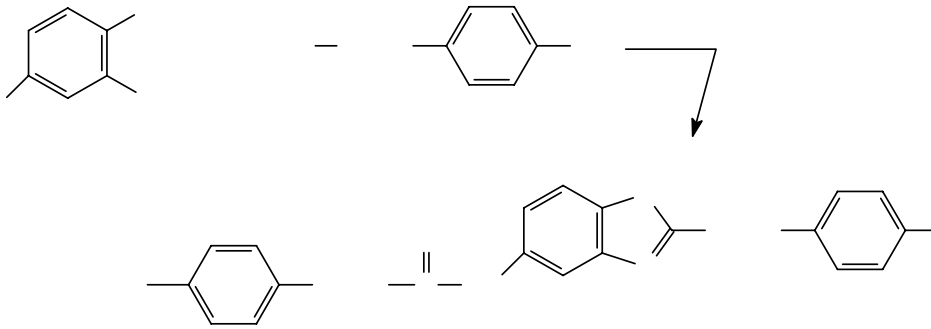
MATERYAL VE YÖNTEM

Sentez ve saflaştırma işlemlerinde *p*-klorofenoksiasetik asit (Aldrich), 2,4-diaminofenol (Aldrich), fosforpentaoksit (Aldrich), heksametildisiloksan (Aldrich), 1,2-diklorobenzen (Aldrich), diklorometan (Aldrich), sodyumhidroksit (Merck), n-hekzan (Merck), etanol (Emir), Silikagel 60 GF254 (Merck), İTK Silikagel 60 GF254 alüminyum plakları (Merck) kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiğin IR analizi, Jasko FT/IR-420 spektrofotometresinde KBr diski kullanılarak yapılmıştır. NMR analizi 400 MHz de Varian Mercury NMR spektrometresinde, Mass (Kütle) analizi, Waters ZQ mikromass LC-Ms spektrometresinde elektrosprey iyonizasyonu (ESI) yöntemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elementel analiz Leco CHNS 932 analyzer cihazında yapılmış ve değerler ± 0.4 aralığında bulunmuştur. Bileşiğin erime noktası tayini Büchi SMP 20 aleti ile saptanmıştır.

2-(*p*-Klorofenoksi)metil-5-(*p*-klorofenoksi)asetamidobenzoksazol sentezi:

Hedeflenen bileşiğe ulaşmak üzere 0.005 mol *p*-klorofenoksiasetik asit, 0.0069 mol 2,4-diaminofenol, 15 ml PPSE içinde 2.5 saat 110 °C da geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyon bitiminden sonra karışım 30 ml diklorometan içine boşaltıldı ve üzerine 50 ml 1N NaOH ilave edildi. Böylece organik faz ayrıldı. Sulu faz 3 defa 25 ml'lik diklorometan ile ekstre edildi. Birleştirilen ekstratlar susuz sodyum sülfat üzerinden kurutuldu. Solvan evapore edildi. n-Hekzan ilavesiyle çöktürüldü. Bileşik solvan olarak kloroform kullanılarak kolon kromatografisi ile temizlendi. Etanol-su karışımı ile tekrar kristallendirildi (Şema 1). Bu şekilde hazırlanan bileşiğin yapısı, IR, ¹H NMR ve mass spektroskopik yöntemleri ile aydınlatıldı (Tablo 1).

Şema 1: Bileşiğin sentezi.

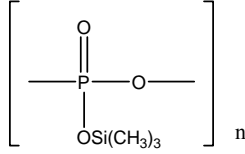


Tablo 1: Sentezlenen bileşiğin fiziksel ve spektral özellikleri.

	Kapalı Formül	% Verim	Erime Noktası (°C)	IR (cm ⁻¹)	¹ H NMR (J=Hz)	Mass % m/e
Bil.	C ₂₂ H ₁₆ O ₄ N ₂ Cl ₂	48	165	3280, 1670, 1490, 824- 417	8.33 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.52(s, 2H), 7.32-7.30(d, 2H, J=8.4), 7.26-7.24 (m, 2H), 6.99-6.97 (d, 2H, J=8.4), 6.95-6.93 (d, 2H, J= 8.8), 5.30 (s, 2H), 4.61(s, 2H)	443(M ⁺) (%100), 159 (%20)

Trimetilsililpolifosfat esteri (PPSE) Sentezi:

PPSE (Şekil 2), 35 mmol fosforpentaoksit, 132.5 mmol heksametildisiloksan ve 50 ml 1,2-diklorobenzen karışımının azot atmosferi altında solusyon berraklaşımca kadar geri çeviren soğutucu altında ısıtılmasıyla elde edilmiştir (11).



Şekil 2: Trimetilsililpolifosfat esteri

Antimikrobiyal Aktivite:

Antimikrobiyal etki tayini için Mikro Dilüsyon yöntemi kullanıldı (12-14). -20 °C de stoklanmış olarak saklanan bakteriler Müeller Hinton Broth (MHB), *C. albicans* ise Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyerlerine pasajlanarak 16-48 saat 35-37°C de inkübe edilerek kültürler tazelandı. Sentezlenen bileşiğin antibakteriyel ve antifungal etkilerinin saptanmasında kullanılan mikroorganizmalar, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edildi. Bunlar, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* RSHM 574, *Candida albicans* ATCC 10231, standart suşları ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen hasta izolatlarıdır. İzolatların direnç durumları disk difüzyon yöntemi ile araştırılarak dirençli suşlar çalışmaya alındı. İnokulum Hazırlanması için, tüm mikroorganizmaların uygun besiyerinde üretilmiş gecelik kültürlerinden steril serum fizyolojik içerisine alınarak McFarland 0.5 (10⁸ hücre/ml) yoğunluğunda hazırlanmış ve uygun oranlarda

sulandırılarak 10^6 hücre/ml içeren bakteri ve 10^5 hücre/ml mikroorganizma süspansiyonları elde edildi. Çalışmamızda besiyerleri olarak, bakteri ve mantarların üretilmesi amacıyla Mueller Hinton Agar (Merck), Mueller Hinton Broth (Merck), Sabouraud Dextrose Broth (Merck), Sabouraud Dextrose Agar (Merck) ve RPMI 1640 medium (Sigma) besiyerleri kullanıldı. Besiyerleri otoklavda 121°C 'de 15 dakika tutularak sterilize edildi. Antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri belirlenecek olan maddenin ve standart antibiyotik maddelerin homojen bir süspansiyon oluşturacak şekilde çözünmesini sağlamak için Mutlak etanol (Riedel-de Haen®) ve DMSO (Riedel-de Haen®) kullanıldı. Testte kullanılan çözücülerin de uygulanan dilüsyonlarda kontrolleri yapıldı. Standart antibiyotik maddeler olarak, Ampisilin trihidrat (Paninkret Chem.-Pharm.), Gentamisin sülfat (Paninkret Chem.-Pharm.), Ofloksasin (Zhejiang Huangyan East Asia Chemical CO. Ltd.), Flukonazol (Nobel İlaç) ve Amfoterisin B (Bristol Myers Squibb) kullanıldı.

Minimum inhibisyon değerlerinin (MİK) tespit edilebilmesi için 96 kuyucuklu Microtiter Plate® mikropleytlerde mikrodilüsyon yöntemi, CLSI protokolüne göre çalışıldı (12-14). Yöntemde bakteriler için MHB, mantarlar için 3-[N-morpholino]propansülfonik asid (MOPS) ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Tüm kuyucuklara $100\mu\text{l}$ besiyeri koyulduktan sonra

Tablo 2: Sentezlenen bileşiğin ve standart ilaçların in vitro antimikrobiyal aktivite değerleri (MİK $\mu\text{g/ml}$).

	S.a.	S.a.*	B.s.	B.s.*	E.c.	E.c.*	K.p.	K.p.*	P.a.	C.a.	C.a.*
Bileşik	125	125	125	31.25	62.5	62.5	62.5	125	62.5	62.5	62.5
Ampisilin trihidrat	0.03	2	0.25	8	8	256	2	256	4096	-	-
Gentamisin sülfat	0.06	1024	1	512	0.5	1	8	64	2	-	-
Ofloksasin	0.25	2	0.125	32	0.125	32	0.25	64	8	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	64
Amfoterisin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1

S.a.: *S. aureus* ATCC 25923

S.a.*: *S. aureus* izolat (gentamisine rezistans)

B.s.: *B. subtilis* ATCC 6633

B.s.*: *B. subtilis* izolat (seftriaksona rezistans)

E.c.: *E. coli* ATCC 25922

E.c.*: *E. coli* izolat (tazobaktama rezistans)

K.p.: *K. pneumoniae* RSHM 574

K.p.*: *K. pneumoniae* izolat (amoksisilin klavulonata rezistans)

P.a.: *P. aeruginosa* ATCC 25853

C. a.: *C. albicans* ATCC 10231

C.a.*: *C. albicans* izolat

her maddenin $1000\mu\text{g/ml}$ solüsyonundan ilk kuyucuklara eklenip çift katlı dilüsyon yapıldı. Dilüsyon sonrasında tüm kuyucuklara $10\mu\text{l}$ 10^6 hücre/ml bakteri ve $10\mu\text{l}$ 10^5 hücre/ml mantar

süspansiyonundan eklenerek bakteriler 37°C’de 24 saat, mantarlar 35°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası üremenin olduğu ilk kuyucuktan bir önceki kuyucuktaki madde miktarı MİK değeri olarak tespit edildi. Tüm çalışmalar 3 kez tekrarlandı ve çalışma sonuçları Tablo 2 de gösterildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bilinen antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların kısa sürede rezistans kazanması daha etkili yeni antimikrobiyal ilaçların tasarlanması ve sentezlenmesini gerekli kılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar nükleik asitlerin yapısında yer alan heterosiklik bazların yapısal benzeri olan benzoksazol halkası taşıyan bileşiklerin etkin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir (4-9). Bu nedenlerle bu çalışmada bir benzoksazol türevi olan 2-(*p*-klorofenoksi)metil-5-(*p*-klorofenoksi)asetamidobenzoksazol; 2,4-diaminofenol ve *p*-klorofenoksiasetik asitin PPSE (trimetilsilil polifosfat esteri) varlığında kondensasyonu ile sentez edilmiştir. Bileşiğin yapısı IR, ¹H NMR ve mass analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Bileşiğin antimikrobiyal etkisi *S.aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633 gibi bazı Gram-pozitif, *P. aeruginosa* ATCC 25853, *E.coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* RSHM 574 gibi bazı Gram-negatif bakteriler ile *C. albicans* ATCC 10231 ve onların antibiyotiklere dirençli suşlarına karşı belirlenmiştir. Bileşiğin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri bilinen suşlara karşı 125-62.5 µg/ml, antibiyotiklere dirençli suşlara karşı ise 125-31.25 µg/ml aralığında tespit edilmiştir. Ayrıca bileşiğin antimikrobiyal aktivite sonuçları referans ilaçlar olarak seçilen ampisilin trihidrat, gentamisin sülfat, ofloksazin, flukonazol ve amfoterisin B ile mukayese edilmiştir.

Bileşik, Gram-negatif bakterilerden *K. pneumoniae*’ye ve *E. coli*’ye karşı standart ilaçlardan daha az etkili bulunurken, *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarına karşı ise ampisilinden daha etkili olduğu gözlenmiştir. *P. aeruginosa*’ya karşı ise standart ilaçlardan ampisilinden daha etkili bulunmuştur. Bileşik, Gram-pozitif bakterilerden *S. aureus*’a ve *B. subtilis*’e karşı standart ilaçlardan daha az etkili bulunurken, *B. subtilis* izolatına karşı ise ofloksazin ve gentamisinden daha etkili bulunmuştur. Sentezi gerçekleştirilen bileşik *C. albicans*’a karşı standart ilaç olan flukonazolden daha az etkili iken ilaca dirençli izolatına karşı standart ilaç ile kıyaslanabilir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Sonuçta, sentezi ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilen 2-(*p*-klorofenoksi)metil-5-(*p*-klorofenoksi)asetamidobenzoksazol yapısı yeni antimikrobiyal etkili türevlerin geliştirilmesine ışık tutacak, önder bir bileşik olarak düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Yoneyama, H., Katsumata, R.** “Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development” *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70(5), 1060-1075 (2006).
2. **Alanis, A.J.** “Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era?” *Arc. Of Med. Res.*, 36, 697-705 (2005).
3. **Daidone, G., Maggio, B., Schillaci, D.** “Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimicrobial activity” *Pharmazie*, 45(6), 441-442 (1990).
4. **Şener, E., Yalçın, İ., Temiz, Ö., Ören, İ., Akın, A., Uçartürk, N.** “Synthesis and Structure-Activity Relationships of Some 2,5-Disubstituted Benzoxazoles and Benzimidazoles as Antimicrobial Agents” *Il Farmaco*, 52 (2) , 99-103 (1997).
5. **Ören, İ., Temiz, Ö., Yalçın, İ., Şener, E., Akın, A., Uçartürk, N.** “**Synthesis and Microbiological Activity of 5 (or 6)-Methyl-2-substituted Benzoxazole and Benzimidazole Derivatives**” *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 47 (12), 1393-1397 (1997).
6. **Ören, İ., Temiz, Ö., Yalçın, İ., Şener, E., Altanlar, N.** “Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel 2, 5- and/or 6-substituted benzoxazole and Benzimidazole Derivatives” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 153-160 (1998).
7. **Temiz, Ö., Ören, İ., Şener, E., Yalçın, İ., Uçartürk, N.** “Synthesis and Microbiological Activity of Some Novel 5- or 6-Methyl-2-(2,4-disubstitutedphenyl)Benzoxazole Derivatives” *Il Farmaco* , 53, 337-341 (1998).
8. **Şener, E.A., Temiz, Arpacı, Ö., Yalçın, İ., Altanlar, N.** “Synthesis and microbiological activity of some novel 5-benzamido- and 5-phenylacetamido- substituted 2-phenylbenzoxazole derivatives” *Il Farmaco*, 55, 397-405 (2000).
9. **Temiz-Arpacı, Ö., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., Altanlar, N.** “Synthesis and antimicrobial activity of some 2-[*p*-substituted-phenyl]benzoxazole-5-yl-arylcarboxyamides”, *Arch. Der Pharm.*, 6, 283-288, (2002).

10. **Temiz-Arpaci, Ö., Ören, İ., Altanlar, N.** “Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2-(p-substituted-phenyl)-5-substituted-carbonylaminobenzoxazoles” *Il Farmaco*, 57, 175-181 (2002).
11. **Aizpurua, J.M., Palomo, C.** “Reagents and synthetic methods.27: Improved synthesis of 2-substitutedbenzoxazoles induced by PPSE” *Soc. Chimique de France Bull.*, 142-144 (1984).
12. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS):** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, M2-A9. Clinical and Laboratory Standarts Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, (2006).
13. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS):** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 16th Informational Supplement. CLSI M100-S16. Clinical and Laboratory Standarts Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, (2006).
14. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS):** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeast; approved standard, M27-A. Clinical and Laboratory Standarts Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, (2006).

Received: 13.02.2007

Accepted: 30.04.2007