

Síntesis y Actividad Antimicrobiana de Diacilhidrazinas y Análogos

RUBEN H. EDROSA y SUSANA M. SICARDI

Cátedra de Farmacoquímica, IQUIMEFA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina

RESUMEN: Fueron sintetizadas y evaluadas *in vitro*, 11 diacilhidrazinas de ácidos grasos. Algunas de ellas fueron derivatizadas por oxidación a diacildiazenos o ciclizadas utilizando acetato de mercurio como único reactivo. Mientras que las diacilhidrazinas resultaron activas frente a microorganismos Gram-negativos, los diacildiazenos y la diimida mercúrica cíclica de la sym-hexanoilhidrazina amplían el espectro hacia Gram-positivos y hongos. Es de destacar la actividad de la sym-decanoilhidrazina frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

SUMMARY: A series of fatty acid diacylhydrazines (I) and analogs have been prepared and tested *in vitro* in a search for more effective germicides. Derivatization of (I) with $\text{CO}_3 \text{Ag}_2$ - Celite afforded the corresponding diacyldiazenes. It was found that the reaction of (I) with mercuric acetate afforded directly mercuric cyclic diimides. While diacylhydrazines showed activity against Gram-negative microorganisms, diacyldiazenes and mercuric cyclic diimide extended the antibacterial spectrum to Gram-positive and fungi. Sym-decanoylhydrazide showed the highest activity against *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCION

Son pocas las hidrazidas, aril o heteroíl sustituidas que han sido reconocidas por su actividad antimicrobiana ^{1,2}, destacándose entre ellas la Isonicotinhidrazida por su potencia y selectividad frente al *Mycobacterium tuberculosis* ³. El estudio reciente de hidrazidas N'-piridonioacetilsustituidas conteniendo al subgrupo amidocarbamoílo (-CO-NH-NH-CO-) ha despertado considerable interés acerca de su actividad antimicro-

biana, selectividad y baja toxicidad ⁴⁻⁷.

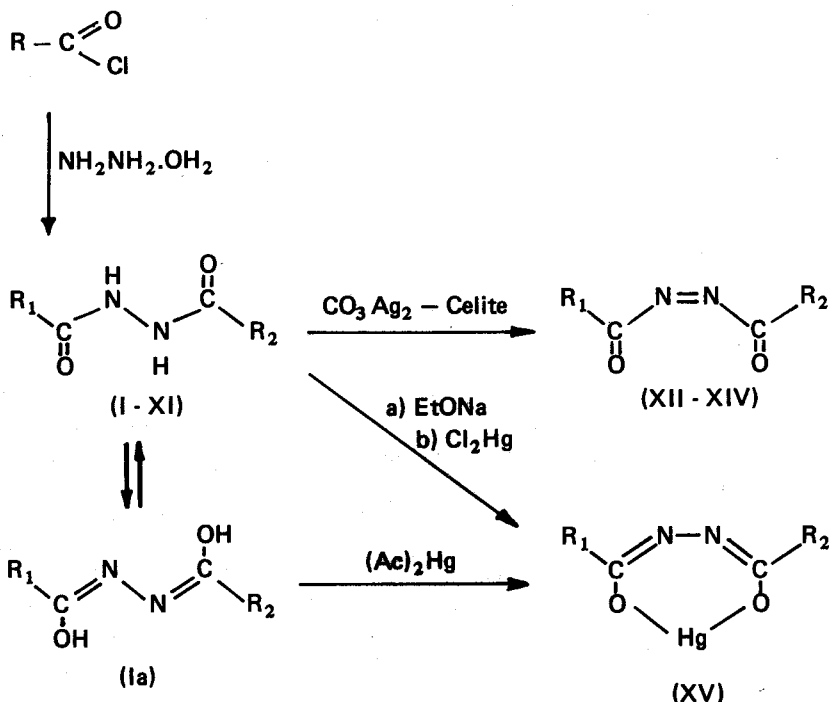
En esta publicación se describe el estudio de compuestos simples conteniendo la función amidocarbamoílo como son las diacilhidrazinas de ácidos grasos (I-XI), conocidas por su participación como intermediarios en la formación de heterociclos⁸⁻¹⁰ más que por sus posibles acciones biológicas. Como apertura a la síntesis de nuevas estructuras derivadas de la anterior, se oxidó la función amidocarbamoílo transformando diacilhidrazi-

PALABRAS CLAVE: Antibacterianos, diacilhidrazinas, diacildiazenos, diimidas mercúricas cíclicas, síntesis directa de diimidas mercúricas cíclicas con acetato de mercurio.

KEY WORDS: Antibacterials diacylhydrazines, diacyldiazenes and mercuric cyclic diimides mercuric acetate reactive for mercuric cyclic diimides synthesis.

nas en diacildiazenos (XII-XIV) o se incorporó un átomo de mercurio para obtener diimidaz mercúricas cíclicas (Esquema 1). La diimida mercúrica de la

sym-hexanoilhidrazina (XV) fue obtenida modificando el método clásico de Stollé¹¹ al usar ventajosamente acetato de mercurio como único reactivo.



Esquema 1

Todos los compuestos obtenidos fueron evaluados *in vitro* utilizando la técnica de difusión en medio sólido inoculado con microorganismos sensibles¹²; los resultados de este ensayo expresado como halos de inhibición se encuentran descritos en la Tabla 1.

PARTE EXPERIMENTAL

Los compuestos inéditos fueron identificados por análisis elemental cuantitativo (AEC) y espectroscópico (IR y RMN). Los puntos de fusión, exceptuando los de diacildiazenos, fueron determinados usando tubos capilares en un aparato Büchi, valores que no fueron corregidos. Los espectros infrarrojo y de reso-

nancia nuclear protónica fueron efectuados en un Perkin-Elmer A-700 y un Varian A-60, respectivamente. El cloruro de benzalconio (cloruro de alquilbencildimetilamonio) fue provisto por Merck-Schuchardt (art. 821944), con una pureza del 95%.

Preparación de diacilhidrazinas (I-XI): Todas fueron preparadas por el método general de Schotten-Baumann previamente descrito¹³ y el procedimiento se ejemplifica con la obtención del compuesto V.

***N*-Hexanoil-*N'*-octanoilhidrazina (V):** A 2,60 g (0,02 moles) de hexanoilhidrazina en 40 ml de benceno se agregan 4 ml (0,025 moles) de cloruro de octanoilo (p. e. 15 mm = 83°C). Se calienta a reflujo durante 2 hs y

Cto n°	R ₁	R ₂	p. f. °C	Actividad Antimicrobiana ¹				Datos Analíticos
				S.a.	E.c.	C.a.	Ps.a.	
I	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	167-8	—	8,0	—	7,0	
II	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	162-3	—	8,3	—	8,0	
III	C ₅ H ₁₁	C ₅ H ₁₁	159-60	—	8,9	—	8,0	
IV	C ₄ H ₉	C ₇ H ₁₅	149-50	—	8,9	—	8,5	AEC; IR; RMN
V	C ₅ H ₁₁	C ₇ H ₁₅	143-4	—	8,6	—	8,5	AEC; IR; RMN
VI	C ₇ H ₁₅	C ₇ H ₁₅	154-5	—	9,3	—	9,0	
VII	C ₇ H ₁₅	C ₉ H ₁₉	140-1	—	8,9	—	8,0	AEC; IR; RMN
VIII	C ₉ H ₁₉	C ₉ H ₁₉	152-3	—	9,2	—	12,0	
IX	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	149-50	—	9,5	—	9,2	
X	C ₁₃ H ₂₇	C ₁₃ H ₂₇	147-8	—	10,2	—	9,0	
XI	C ₁₅ H ₃₁	C ₁₅ H ₃₁	146-7	—	8,5	—	—	
XII	C ₉ H ₁₉	C ₉ H ₁₉	38-40	7,7	10,0	—	12,0	AEC; IR; RMN
XIII	C ₁₁ H ₂₃	C ₁₁ H ₂₃	41-2	8,0	10,0	7,7	10,5	AEC; IR; RMN
XIV	C ₁₃ H ₂₇	C ₁₃ H ₂₇	54-5	8,5	11,0	8,0	10,5	AEC; IR; RMN
XV	C ₅ H ₁₁	C ₅ H ₁₁	239-40	11,1	9,8	—	10,0	AEC; IR; RMN
Cloruro de benzalconio				17,0	14,1	17,4	12,5	

¹ La actividad antimicrobiana se expresa como el diámetro de la zona de inhibición, en mm.

S.a = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p; E.c = *Escherichia coli* ATCC 8739-2; C.a = *Candida albicans*; Ps.a = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853.

Tabla 1. Propiedades físicas y actividad antimicrobiana de diacilhidrazinas y análogos

luego se enfría, precipitando un sólido blanco que es filtrado y secado a temperatura ambiente. Recristaliza de EtOH-H₂O. Peso: 3,88 g (Rto. 75,8%). P.F.: 143-4°C. Análisis para C₁₄H₂₈N₂O₂: calculado (%) C 65,62, H 10,93, N 10,93; hallado (%) C 65,70, H 11,02, N 10,97. IR (BrK) 3.200-3030 cm⁻¹ (NH); 1590-1480 cm⁻¹ (OCN); 1420 cm⁻¹ (CH₂ activado). RMN (DMSO-d₆): 1: b: 6H (CH₃); 1,5: m: 16H (CH₂); 2,2: b: 4H (CH₂CO); 9,7: s: 2H (NH).

Diacildiazenos (XII-XIV): Los productos, sólidos blancos de aspecto amorfo, fueron obtenidos por oxidación directa de la diacilhidrazina correspondiente, utilizando CO₃ Ag₂ absorbido en Celita¹⁴. El punto de fusión se determinó en un aparato FBR con platina de calentamiento.

Preparación del reactivo: Se purifica la Celita (tierra de diatomeas) lavándola varias veces con ClH al 10% en metanol y finalmente con agua destilada hasta pH neutro, llevando a sequedad a 120 °C. La Celita así purificada (30 g) se agrega agitando a una solución de 34 g (0,2 moles) de NO₃ Ag₂ en 200 ml de agua destila-

da. Se obtiene así una suspensión homogénea a la que, continuando con la agitación, se agregan 30 g (0,105 moles) de CO₃ Na₂ · 10 H₂O en 300 ml de agua destilada. Luego de 10 minutos el precipitado verde amarillento se filtra y se deja secar en un evaporador rotatorio a 50-60°C durante varias horas. 0,57 g de CO₃ Ag₂-Celita equivalen a 0,001 mol de CO₃ Ag₂.

Didecanoildiazeno (XII): A 3,38 g (0,02 moles) de *sym*-decanoilhidrazina disuelta en 100 ml de benceno, se agregan 6 equivalentes de CO₃ Ag₂-Celita. Luego de calentar 6 hs a reflujo en B.M. se filtra en caliente; se evapora a fondo y el residuo blanco ceroso recristaliza de éter etílico. (p. f.: 38-40°C, Rto.: 89,9%). Análisis para C₂₀H₃₈N₂O₂: calculado (%) C 71,01; H 11,24; N 8,28; hallado (%) C 71,15; H 11,45; N 8,40. IR (Cl₃ CH): 2940-2880 cm⁻¹ (CH); 1750 cm⁻¹ (CO). RMN (Cl₃ CD): 0,8: b: 6H (CH₃); 1,5: masim: 28H (CH₂); 2,3: m: 4H (CH₂CO).

Dilauroildiazeno (XIII): Siguiendo el procedimiento anterior, a partir de

1,82 g (0,005 moles) de *sym*-lauroilhidrazina, se obtuvo 1,7 g. Recristalizado de éter-cloroformo, p.f.: 41-2 °C. Análisis para $C_{24}H_{46}N_2O_2$, calculado (%) C 73,09; H 11,67; N 7,10; hallado (%) C 72,98; H 11,73; N 7,15. IR ($Cl_3 CH$): 2940-2875 cm^{-1} (CH); 1740 cm^{-1} (CO). RMN ($Cl_3 CD$): 0,8: b: 6H (CH_3); c.a. 1,25: *masim* : 36H (CH_2); 2,3: m: 4H ($CH_2 CO$).

Dimiristildiazeno (XIV). Por igual procedimiento, a partir de 2,25 g se llega a 2,15 g (Rto.: 95,5%). p.f.: 54-55 °C. Análisis para $C_{28}H_{54}N_2O_2$, calculado (%) C 74,76; H 12,44; N 6,22; hallado (%) C 74,52; H 12,50, N 6,32. IR ($Cl_3 CH$): 2950-2870 cm^{-1} (CH); 1730 cm^{-1} (CO). RMN ($Cl_3 CD$): 0,8: b: 6H (CH_3); 1,5: *masim* : 44H (CH_2); 2,2: m: 4H ($CH_2 CO$).

Diimida mercúrica de la sym-hexanoilhidrazina (XV): 1 g (0,0043 moles) del compuesto III se disuelve a temperatura ambiente en 50 ml de metanol; manteniendo el sistema en agitación se agregan 0,02 moles de acetato de mercurio disuelto en 200 ml de metanol. Inmediatamente precipita un sólido blanco; se completa la reacción agitando durante 30 minutos y se filtra. El filtrado se lava con solución de ácido acético al 30% y se seca en estufa a 20 mm entre 20-25°C. Recristaliza de $AcH-H_2O$. p.f.: 239-40 °C c/d. Análisis para $C_{12}H_{22}N_2HgO_2$, calculado (%) C 33,76; H 5,16; N 6,56; Hg 47,02; hallado (%) C 33,39; H 5,50; N 6,73; Hg 46,97. IR (BrK): 2950-2900 cm^{-1} (CH); 1570-1420 cm^{-1} (OCN). RMN (TFA): 0,5: b: 6H (CH_3); 1,0: *masim* : 12H (CH_2); 2,1: t: 4H ($CH_2 CO$).

El compuesto (XV) es prácticamente insoluble en agua, alcoholes, DM SO, cloroformo y solventes no polares. Es soluble en soluciones diluidas de AcH .

Actividad antimicrobiana: Como ensayo preliminar *in vitro* se utilizó el

método del disco-placa¹². Los microorganismos usados en este ensayo fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, conservado en medio para ensayos de antibióticos N° 1 (Oxoid CM 327); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853; *Escherichia coli* ATCC 8739-2, ambas mantenidas en digerido papaínico de soja-digerido pancreático de caseína-agar (SBA Difco) y *Candida albicans*, mantenida en Sabourau-Dextrosa-agar (Difco). El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 18-24 hs. De una suspensión de turbidez adecuada, en solución fisiológica, se siembra un volumen de 0,5 a 1 ml por cada 100 ml de medio de cultivo fundido y enfriado. Para estudiar la actividad frente a microorganismos Gram-positivos se sembró *S. aureus* en medio Antibióticos N° 11 (Oxoid) mientras que los microorganismos Gram-negativos y *C. Albicans* fueron sembrados en medio SBA-Difco. Dada la escasa solubilidad en agua de los compuestos en estudio, los derivados (I-XIV) fueron disueltos en cloroformo y el compuesto (XV) en ácido acético, todos en concentración al 1% P/V. Con las soluciones preparadas extemporáneamente se impregnaron discos de papel Whatman N° 3 y, previo secado para evitar toda posible influencia del solvente, se aplicaron al medio inoculado.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 hs para bacterias y para *C. albicans* se incubó 2 ó 3 días a temperatura ambiente. Los halos de inhibición se midieron con un calibre efectuándose los ensayos por duplicado. El cloruro de benzalconio se utilizó como patrón de referencia (Tabla 1).

RESULTADOS:

Hemos encontrado que la formación de diimidas mercúricas cíclicas

(XV) ocurre directamente cuando se emplea como reactivo acetato de mercurio. Esta modificación al método clásico de Stollé¹¹ tiene 2 ventajas: evita la utilización del etóxido de sodio como agente tautomerizante y mejora el rendimiento a un 80-90%.

Los resultados microbiológicos descriptos en la Tabla I, muestran que la actividad antimicrobiana de las diacilhidrazinas (I-XI) está limitada al espectro de microorganismos Gram - negativos, destacándose la potencia de la *sym*-decanoilhidrazina (VIII) frente a *Pseudomonas aeruginosa*, potencia que es similar, en las condiciones de este ensayo, al cloruro de benzalconio utilizado como referencia.

La derivatización de la función amidocarbamoilo en compuestos más lipofílicos (XII-XV) amplía el espectro hacia microorganismos Gram-positivos y hongos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores^{15,16} confirmando que es posible, para una serie particular de compuestos, modificar el espectro antibacteriano por farmacomodulación.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido subsidiado por la Universidad de Buenos Aires, Resolución Nº 1046/83 y el Centro de Estudios para el Desarrollo de la Industria Químico-Farmacéutica Argentina.

Los ensayos microbiológicos fueron realizados por la Dra. Ana L. Aquerman del Laboratorio Experimentia. A ella nuestro sincero agradecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Koruncec, D., I.; Babic, S. Cvetnic y A. Deljac (1975) *Acta Pharm. Jugosl.* 25: 241-6
2. Berdinskii, I. S. (1976) U.R.R.S. Pat., nº 527.417. *Chem. Abstr.* (1976) 85: 186.826
3. Fox, H. H.; Hoffman - La Roche, Inc. (1952) U. S. Pat., nº 2.596.069. *Chem. Abstr.* (1952) 46: 7294d
4. Sicardi, S. M. y A. L. Aquerman (1979) *Rev. Arg. Microbiol.* 11: 64-6
5. Sicardi, S. M., C. M. Vega y E. B. Cimijotti (1980) *J. Med. Chem.*, 23: 1139-42
6. Sicardi, S. M., (1982) *Acta Farm. Bonaerense*, 1: 69-74
7. Sicardi, S. M., (1983) U.S. Pat., nº 4.382.941
8. Gilbert, E. C. (1927) *J. Amer. Chem. Soc.*, 49: 286-9
9. Herbst, R. M. y J. A. Garrison (1953) *J. Org. Chem.*, 18: 872-7
10. Wu Du-Yung y R. M. Herbst (1952) *J. Org. Chem.* 17: 1216-27
11. Stollé, R., (1912) *Ber.* 45: 273-89
12. Davis, W. W. y T. R. Stout (1971) *Appl. Microbiol.* 22: 666-70
13. Sonntag, N.O.V. (1968) *J. Amer. Oil Chem. Soc. (Ingl.)*, 45: 571-7
14. Fetizon, M., M. Golfier, R. Milcent e I. Papadakis (1975) *Tetrahedron* 31: 165-7
15. Lien, E. J., C. Hansch y S. M. Anderson (1968) *J. Med. Chem.* 11: 430-41
16. Lien, E. J. y C. Hansch (1972) *Advan. Chem. Ser.*, 114: 155-82