

Bilimsel Arařtırmalar

3,6-Diaçilbenzoksazolonların Antifungal Etkileri

Hakkı ERDOĞAN (*)
Nuran YULUĞ (**)

Özet : Daha önceki çalışmalarımızda, 3,6-diaçilbenzoksazolon yapısında beş bileşik sentez edilmiştir (1,2). Bu çalışmada ise hazırladığımız bileşiklerin antifungal etkileri incelenmiştir. Maya benzeri funguslar (*Candida Albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida Pseudotropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Torulopsis datilla*) için yapılan antifungal etki çalışmalarında 5-kloro-3,6-dibenzoilbenzoksazolonun (bileşik V) *C. albicans*'a karşı etkisinin, diğer bileşiklere oranda, daha yüksek olduğu saptanmıştır (M.I.K: 62.50 µg/ml).

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF 3,6-DIACYLBENZOXAZOLONES

Summary : In our previous studies, five new 3,6-diacylbenzoxazolones were synthesized (1,2). In this study, antifungal activities of this compounds have been studied. In the antifungal studies against yeast-like fungi (*Candida Albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Torulopsis datilla*) 5-chloro-3,6-dibenzoilbenzoxazolone (Compound V) has been found more active especially against *C. albicans* in comparison (M.I.C: 62.50 µg/ml).

Keywords : 3,6-Diacylbenzoxazolinones, Antifungal activity.

(*) H.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe - Ankara

(**) H.Ü. Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe - Ankara

GİRİŞ

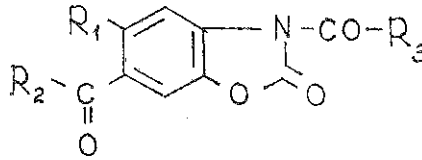
Hazırladığımız bileşiklerin ana yapısını oluşturan benzoksazolon ve diğer bazı türevleri çeşitli biyolojik etkinlikleri nedeniyle, uzun süreden beri araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu yapıdaki bileşikler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, çeşitli etkilerin yanısıra benzoksazolon ve bazı türevlerinin analjezik (3-9), antipiretik (5,10), antiromatizmal (5), antibakteriyel (2,11,17) ve antifungal (18-22) etkiye sahip oldukları da gözlenmiştir.

Benzoksazolonlar üzerinde yapılan ilk antifungal etki çalışmaları Virtanen ve arkadaşları (18) tarafından yapılmıştır.

Bu araştırmacılar, benzoksazolon ve 6-metoksi türevlerinin buğdaygiller familyasında bazı bitkilerde bulunan maya benzeri funguslar ile aspergillus ve penicillium gibi küf mantarlarına karşı etkili olduklarını gözlemişlerdir. Benzoksazolonlar üzerinde daha sonra devam eden araştırmalarda da bu bileşiklerin özellikle Mannich bazlarının ve 6-açıl türevlerinin (13, 14, 21,22) yüksek antifungal etkiye sahip oldukları bildirilmiştir.

Bu çalışmada sentez, analjezik etki (1) ve antibakteriyel etkileri (2) daha önce incelenen ve yapıları Tablo 1'de gösterilen 3,6-diaçilbenzoksazolon yapısındaki bileşiklerin maya benzeri funguslar üzerine antifungal etkileri incelenmiştir.

Tablo 1 : 3,6-Diaçilbenzoksazolonlar



Bileşik No	R ₁	R ₂	R ₃
I	H	H	-CH ₃
II	H	C ₆ H ₄ Cl (p)-	-CH ₃
III	H	C ₆ H ₅ -	-CH ₃
IV	H	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -
V	Cl	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Kimyasal Çalışmalar :

A. Sentez Yöntemleri

6-Açıl-2 (3H)-Benzoksazolonlar
(9)

0.1 mol 2(3H)-benzoksazolon türevi iki boyunlu bir balona konup, 200 g polifosforik asit ilave edilir. Üzerine açılme ajanı olarak kullanılacak asit (0.1 mol) azar azar ve mekanik karıştırıcıda karıştırılarak ilave edilir. Karışım termostatlı yağ banyosunda, renk koyu kahverengi oluncaya kadar ısıtılarak karıştırılır. Karışım 900 ml buzlu su içerisine karıştırılarak ilave edilir ve yedi saat karıştırılmaya bırakılır. Çöken su ile yıkanıp kurutulduktan sonra, uygun çözücülerle kristallendirilerek temizlenir.

3,6-Diaçıl-2(3H)-benzoksazolonlar

a) Sodyum 2(3H)-benzoksazolon türevleri : 0.04 mol 2(3H)-benzoksazolon türevi, sodyum etoksik (alınan 2(3H)-benzoksazolon türevine eşdeğer miktardaki metalik sodyumun 50 ml absölu etanoldeki çözeltisi) içerisinde çözülür. Çözünücünün tamamen uçurulması ile madde elde edilir.

b) Sübstitüsyon reaksiyonu : 0.04 mol asetilklorür veya benzoil-klorür 50 ml dimetilformamitte çözülüp üzerine 0.04 mol sodyum 2(3H)-benzoksazolon türevininin 25 ml dimetilformamitteki çözeltisi

ilave edilerek, manyetik karıştırıcıda otuz dakika karıştırılır. Karışım soğutulup süzöldükten sonra, çözücü tamamen uçurulur. Katı bileşik, uygun bir çözücü ile kristallendirilerek saflaştırılır.

B — Erime Derecesi Tayinleri

Bileşiklerin erime dereceleri «Buchi SMP-20» erime derecesi tayin cihazı ile saptanmıştır. Verilen erime dereceleri tashih edilmiş değerlerdir.

C — Elementer Analiz

Bileşiklerin elementer analizleri «Le Centre de Microanalyse du C.N.R.S. de Villeurbanne-Fransa» da yaptırılmıştır.

D — Spektrel Analizler

Bileşiklerin UV spektrumları, etanoldeki 10^{-5} Molar çözeltisinden PYE Unicam 1880 UV spektrofotometresinde alınmıştır. IR spektrumlarının alınması nda BECKMAN Acculab 4 IR spektrofotometre kullanılmış ve potasyum bromür disk yöntemi uygulanmıştır. NMR spektrumları ise C-60 HL JEOL NMR spektrometresinde, «Bulgular» kısmında belirtilen çözücüler içinde alınmıştır.

2. Mikrobiyolojik Çalışmalar

Bileşiklerin 6 maya benzeri fungus'a (Candida Albicans, Candida tropicalis, Candida pseudotropicalis, Cryptococcus neoformans, Torulopsis dattila) karşı antifun-

gal etkileri Tüpte Sıvı Dilüsyon ve Kağıt Disk yöntemleri ile incelendi.

A. Tüpte Sıvı Dilüsyon Yöntemi

Besiyeri olarak Sabouraud Dekstorz Sıvı Besiyeri (neopepton: 10 g, Dekstroz: 20 g), bileşiklerin suya ilave edilip ısıtılarak çözünmesi sağlandı ve otoklavda 115°C'de onbeş dakika tutularak sterilize edildi. Bu besiyerine incelenecek bileşiğin asetondaki steril çözeltisi, bileşik konsantrasyonu 1000 µg/ml olacak şekilde ilave edildi. Bundan da steril besiyeri ile iki kat seyreltme yapılarak 15 dilüsyon (1000, 500, 250 ... 0.06 µg/ml) hazırlandı ve steril deney tüplerine her bir dilüsyondan 5 ml kondu. Her tüpe maya benzeri fungus ile inoküle edilecek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmış besiyerinin 1/100 oranında sulandırılmasıyla elde edilen fungus süspansiyonundan 1 damla (0.05 ml) ilave edildi ve funguslar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda fungus üremesi sonucu oluşan bulanıklık dikkate alınarak hiç bulanıklık göstermeyen yani üreme olmayan tüpteki dilüsyon, minimum inhibisyon konsantrasyonu (M.I.K.) olarak saptandı.

B. Kağıt Disk Yöntemi

Besiyeri olarak D.S.T. Agar besiyeri (Proteaz pepton : 10 g, Dana eti ekstraktı : 10 g, Dekstroz : 2 g,

Sodyum Klorür : 3 g, Disodyum fosfat : 2 g, Sodyum asetat : 1 g, Adenin sülfat : 0.01 g, Tiyamin : 0.00002 g, Agar No 1 : g) bileşiklerin suya ilave edilip ısıtılarak çözünmesi sağlandı ve otoklavda 115°C'de onbeş dakika tutularak sterilize edildi.

Antimikrobik etkisi tespit edilecek bileşiğin asetondaki steril çözeltisi, standart çaplı steril kağıt disklerle bileşik konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde emdirildi. Asetonun uçması sağlandı. Tüpte Sıvı Dilüsyon yönteminde olduğu gibi hazırlanan mikroorganizma süspansiyonunun 0.2 ml'si 12.5 ml sterilize edilmiş D.S.T. Agar besiyeri konularak hazırlanmış petri kutularına kondu ve besiyeri yüzeyine homojen şekilde yayılması sağlandı. Kağıt diskler inoküle edilmiş besiyeri üzerine, steril şartlarda, petri kutusuna uygun aralıklarla yerleştirildi ve funguslar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda disklerin etrafında meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları kompas ile ölçülerek mm cinsinden değerlendirildi.

BULGULAR

1. Kimyasal Çalışmalar

Daha önce tarafımızdan hazırlanan 3(6-diaçil-2(3H)-benzoksazonların E.d., reaksiyon verileri IR'de gözlenen karakteristikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2 : 3,6-Diaçil-2(3H)-Benzoksazolünlerin E.d., Reaksiyon Verileri ve IR'de Gözlenen Karakteristik Pikleri.

Bileşik no	E.d. °C	% Verim	IR (cm ⁻¹)		
			laktam	Aromatik Keton	-N.CO-R Lit.
I	201-2	85	1810	1750	1650 (1,2)
II	234-5	90	1800	1745	1645 (1,2)
III	220-	84	1800	1700	1650 (1,2)
IV	173-5	88	1810	1705	1655 (1,2)
V	169-71	80	1800	1700	1650 (1,2)

2. Antifungal Etki Çalışmaları

Bileşiklerin maya benzeri funguslara karşı tüpte sıvı dilüsyon

ve kağıt disk yöntemiyle saptanan antifungal etki sonuçları Tablo 3' de gösterilmiştir.

Tablo 3 : Bileşiklerin Tüpte Sıvı Dilüsyon (µg/ml) ve kağıt disk (mm) Yöntemiyle Tespit Edilen Antifungal Etki Sonuçları

Bileşik no	a	b	c	d	e
I	1000*	1000	500	500	250
	—**	—	—	—	—
II	350	500	500	250	125
	—	—	—	—	—
III	500	500	250	250	125
	—	—	—	—	—
IV	500	500	250	250	125
	—	—	—	—	—
V	250	250	125	125	62.50
	—	—	—	—	—

(*) : Tüpte sıvı dilüsyon yöntemiyle tespit edilen Minimum inhibisyon konsantrasyonu (M.İ.K.)

(**) : Kağıt disk yöntemiyle tespit edilen inhibisyonları,

— : inhibisyon yok, — : 6-8 mm, — — : 9-11 mm, — — — : 12-15 mm.

a : *C. tropicalis*, b : *T. dattila*, c : *C. neoformans*, d : *C. Pseudo-tropicalis*, e : *C. Albicans*

SONUÇ VE TARTIŞMA

Hazırladığımız bileşiklerin maya benzeri funguslara karşı antifungal etkilerin araştırılmasında, dilüsyon (Tüpte sıvı Dilüsyon) ve difüzyon (Kağıt Disk) yöntemleri uygulanmıştır.

Dilüsyon yöntemleri antimikrobik etkisi tespit edilecek bileşiği değişik konsantrasyonlarda içeren sıvı veya katı besiyerinin mikroorganizma ile inoküle edilip, uygun ısıda belirli bir süre inkübe edilmesi sonunda üremenin önlenip önlenmediğinin tespiti esasına dayanır. Bu yöntemin minimal inhibisyon konsantrasyonu (M.I.K.) tespit etmede güvenilir sonuçlar verdiği bildirilmiştir (23,24).

Difüzyon yöntemi ise, antimikrobik etkisi tespit edilecek bileşiğin, mikroorganizma ile inoküle edilmiş katı besiyerine difüzyonu sonucunda, difüzyon alanında üremenin önlenmesi nedeniyle oluşan inhibisyon zonlarının ölçülmesi esasına dayanır. İnhibisyon zonlarının büyüklüğü antimikrobik etkinin şiddetini belirlemede yararlıdır (23,24).

Tüpte sıvı Dilüsyon Yöntemi ile belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonları, Disk Difüzyon Yöntemi ile tespit edilen inhibisyon zonları ile kıyaslamada iyi bir gösterge olarak kullanılmaktadır (23,25). Bu nedenle çalışmamızda farklı yöntemler arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek amacıyla

aynı mikroorganizma ve bileşiklere iki ayrı yöntem uygulanmıştır.

Çalışmalarımızda hazırladığımız bileşiklerin Maya benzeri funguslar üzerine genellikle etkisiz oldukları gözlenmiştir. Ancak, 5-kloro-3,6-dibenzoil-2(3H)-benzoksazolonun (Bileşik V) C. Albicans üzerine etkisi diğer bileşiklere oranla daha yüksek olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Erdoğan, H., «3,6-Diaçil-2(3H)-Benzoksazolon Türevleri Üzerinde Çalışmalar», H.Ü. Ecz. Fak. Der., 4.11984.
2. Erdoğan, H., Yuluğ, N., «3,6-Diaçil-2(3H)-Benzoksazolonların Antibakteriyel Etkileri Üzerinde Çalışmalar». FABAD Farm. Bil. Der., 10.201, 1985.
3. Close, W.J., Tiffany, B.D., Spielman, M.A., «The Analgesic Activity of Some Benzoxazolone Derivatives», J. Am. Chem. Soc., 71, 1265, 1949.
4. Lespagnol, V., Cazin, M., Cazin, J.C., Lesieur, D., Dupont, C., «Analgesic Activity of Some Benzoxazolinone Derivatives», Chem. Ther., 2, 347, 1967.
5. Aries, R., «3-Acylbenzoxazolinone Derivatives Having Antiinflammatory, Athirhavamtic, Analgesic, Antipyretic and Muscular Relaxative Properties». Fr. Pat., 1. 593. 066 03 Jul. 1970.

6. Erdoğan, H., «3-Kloroasetil-6-Açıl-2(3H)-Benzoksazolon Türevleri Üzerinde Çalışmalar», **FABAD Farm. Bil. Der.**, 9, 119, 1984.
7. Erdoğan, H., «3-Arilpiperazinoalkil-2(3H)-Benzoksazolon Türevleri Üzerinde Çalışmalar», **Doğa Bil. Der.** 8 (3), 340, 1984.
8. Erdoğan, H., «Reduction de Chloro-5 Benzoyl-6 Benzoxazolinones en Alcools Secondaires», **H.Ü. Ecz. Fak. Der.**, 4, 31, 1984.
9. Erdoğan, H., «6-Açılbenzoksazolonlar Üzerinde Çalışmalar», **Türk Farm. ve Klin. Araş. Der.**, 3, 12, 1985.
10. Lespagnol, A., Mercier, J., Sestier, R., Marinacee, P., «Etude de la Benzoxazolinone et de Certains de ses Dérives», **Bull. Soc. Chim. Biol**, 34, 397, 1952.
11. Tacquet, A., Lespagnol, C., Beerens, H., Lesieur, D., Devulder, B., «Antimicrobial Activity of Benzoxazolinones Derivatives», **Ann. Inst. Pasteur Lille**, 22, 189, 1971.
12. Varma, R.S., Nobles, W.L., «Synthesis and Antibacterial Activity of Certain 3-Substituted Benzoxazolinones», **J. Pharm. Sci.**, 57, 39, 1968.
13. Varma, R.S., «Substituted 3-Arylaminoethylbenzoxazolin-2-ones», **J. Prakt. Chem.**, 3, 350, 1973.
14. Varma, R.S., Imam, S.A., «Antimicrobial Activity of 3-Substituted 6-Nitrobenzoxazolinones-2, 6-chlorobenzoxazolinones-2 and benzoxazolin-2-thiones», **Def. Sci. J.** 25, 67, 1975.
15. Erdoğan, H., Yuluğ N., «Studies on antibacterial Activity of 6-Acyl-2(3H) - Benzoxazolinone Derivatives», **H.Ü. Ecz. Fak. Der.**, 4, 19, 1984.
16. Erol, D.D., Erdoğan, H., Yuluğ, N., «3-Piperidinometil-2(3H)-Benzoxasozolon Türevleri Üzerinde Çalışmalar», **FABAD Farm. Bil. Der.**, 10, 118, 1985.
17. Cesur, A., Erdoğan, H., Yuluğ, N., «2(3H)-Benzoksazolon Türevi Yeni Mannich Bazları ve Bunların Antibakteriyel Etkinlikleri», **FABAD Farm. Bil. Der.**, 10, 58, 1985.
18. Virtanen, A.I., Hietala, P.K., «An Antifungi Factor in Rye Seedlings», **Suomen Kemistil**, 288, 165, 1955.
19. Bindler, J., Model, E., «Fungizide Mittel», **Ger. Pat.** 1023. 627 17 Jul. 1958.
20. Ecktein, Z., Zukowski, E., «The Fungicidal Properties of Certain Derivatives of Benzoxazolinone», **Przemysl. Chem.**, 37, 418, 1958, **Ref. C.A.** 53, 5246, 1959.
21. Cesur, A., Erdoğan, H., Yuluğ, N., «Bazı 2(3H)-Benzoksazolon Türevlerinin Antifungal Etkile-

- rinin Araştırılması», **Doğa Bil. Der.**, C10, 141, 1986.
22. Erol, D.D., Erdoğan, H., Yuluğ, N., «3-Piperidinometil 2(3H)-Benzoksazonların Antifungal Etkileri», **Doğa Bil. Der.**, C10, 141, 1986.
23. Petersdorf, R.G., Sherris, J.G., «Methods and Significance of In-vitro Testing of Testing of Bacterial Sensitivity», **Am. J. Med.**, 39, 1766-98, 1965.
24. Leven, B., Berghe, D.A.V., «Mertens, F., Screening of Higher Plants of Biological Activities», **Plant. Med.**, 36, 1311-20, 1979.
25. Wick, W.E., «Influence of Antibiotic Stability on Results of In-Vitro Testing Procedures», **J. Bact.**, 87, 1162, 1964.