



UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI
INGINERIE CHIMICĂ
CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ
ȘI FARMACIE „IULIU HAȚIEGANU”
FACULTATEA DE FARMACIE
CLUJ-NAPOCA

IGNAT ADRIANA

NOI DERIVAȚI DE TIAZOL ȘI SELENAZOL CU POTENȚIAL BIOLOGIC

Rezumatul tezei de doctorat

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Prof. Univ. Dr. Luminița Silaghi-Dumitrescu

Prof. Univ. Dr. Valentin Zaharia

Prof. Dr. Ioan-Alexandru Silberg

REFERENȚI:

Prof. Dr. Ionel Mangalagiu, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași.

Conf. Dr. Luminița David, Universitatea „Babes Bolyai”, Cluj-Napoca.

Conf. Dr. Mariana Palage, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

2010

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
I. STUDIU MONOGRAFIC	
1. Metode de obținere a compușilor cu structură 2-hidrazino-tiazolică.....	6
1.1 Obținerea ariliden-hidrazinotiazolilor.....	6
1.2 Obținerea hetariliden-hidrazinotiazolilor.....	10
1.3 Obținerea acil-hidrazinotiazolilor.....	13
1.4 Obținerea sulfonil-hidrazinotiazolilor.....	14
2. Comportarea chimică a compușilor cu structură 2-hidrazino-tiazolică.....	15
2.1 Reacția de N-acilare.....	15
2.2 Reacția de N-carbamoilare.....	20
2.3 Reacția de ciclizare.....	21
2.4 Reacția cu 1,3 dicetonele.....	29
2.5 Reacția de condensare cu calconele.....	30
2.6 Reacția de bromurare.....	31
2.7 Reacția cu formare de complecși.....	33
3. Potențialul biologic al compușilor cu structură 2-hidrazinotiazolică.....	34
3.1 Activitatea antitumorală.....	34
3.2 Activitatea mitodepresivă.....	35
3.3 Activitatea antimicrobiană.....	36
3.4 Activitatea antiinflamatoare.....	39
3.5 Activitatea pesticidă.....	41
4. Compuși cu nucleu selenazolic.....	43
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	
5. <i>p</i> -Toluensulfonil-hidrazinotiazoli și hidrazino-bis-tiazoli.....	46
5.1 Sinteza <i>p</i> -toluensulfonil-hidrazinotiazolilor.....	46
5.2 Sinteza în câmp de microunde a <i>p</i> -toluensulfonil-hidrazinotiazolilor.....	48
5.3 Sinteza hidrazino-bis-tiazolilor.....	53
5.4 Analiza structurală.....	54
5.4.1 Spectroscopie IR.....	54

<i>Cuprins</i>	
5.4.2 Spectrometrie de masă.....	57
5.4.3 Spectroscopia RMN.....	59
5.5 Evaluarea potențialului biologic.....	63
5.5.1 Activitatea antiinflamatoare.....	63
5.5.2 Activitatea analgezică.....	65
5.5.3 Activitatea antiproliferativă.....	68
5.6 Concluzii și perspective.....	72
<i>6. Hidrazino-selenazoli</i>	73
6.1 Sinteza ariliden-hidrazino-selenazolilor.....	73
6.2 Sinteza aroil-hidrazino-selenazolilor.....	75
6.3 Sinteza în câmp de microunde a hidrazino-selenazolilor.....	76
6.4 Analiza structurală.....	77
6.4.1 Spectroscopie IR.....	77
6.4.2 Spectroscopia RMN.....	80
6.4.3 Spectrometria de masă.....	90
6.5 Evaluarea potențialului biologic.....	92
6.5.1 Activitatea antimicrobiană și antifungică.....	92
6.5.2 Activitatea antiproliferativă.....	97
6.6 Concluzii și perspective.....	101
<i>7. Fenotiazinil-hidrazino-tiazoli și fenotiazinil-hidrazino-selenazoli</i>	102
7.1 Sinteza fenotiazinil-hidrazino-tiazolilor/selenazolilor.....	102
7.2 Sinteza în câmp de microunde a fenotiazinil-hidrazino-tiazolilor.....	103
7.3 Analiza structurală.....	106
7.3.1 Analiza prin spectroscopie RMN.....	106
7.3.2 Analiza prin spectrometrie de masă.....	112
7.4 Studiul cinetic al reacției de condensare Hantzsch.....	117
7.4.1 Introducere.....	117
7.4.2 Principiul metodei.....	119
7.4.3 Influența solventului asupra vitezei de reacție.....	127
7.4.4 Rezultate și discuții.....	128
7.4.5 Interpretarea rezultatelor.....	145

Cuprins-----

7.5 Activitatea antiproliferativă.....	146
7.6 Concluzii și perspective.....	153
8. CONCLUZII GENERALE.....	154
9. PARTE EXPERIMENTALĂ.....	156
III. BIBLIOGRAFIE.....	189

Cuvinte-cheie:

- 2-hidrazino-tiazoli
- 2-hidrazino-selenezoli
- bis-tiazoli
- condensarea Hantzsch
- activitate antiinflamatoare
- activitate analgezică
- activitate antiproliferativă
- activitate antitumorală
- studiu cinetic
- reacția în câmp de microunde
- activitatea antimicrobiană
- activitatea antifungică
- fenotiazine

INTRODUCERE

Compușii cu structură 2-hidrazinotiazolică sunt studiați de peste 50 de ani. Cu toate acestea, acești compuși prezintă încă interes pentru chimia organică datorită aplicațiilor numeroase atât în domeniul medical (activitate antitumorală,¹ citotoxică,^{2, 3} antimicrobiană,⁴ antiinflamatorie,⁵ mitodepresivă,⁶ hipotensivă,⁷ anti-HIV,⁸ hipotalergică,⁹ tuberculostatică¹⁰) cât și agricol (acțiune pesticidă). Preocupările pentru această clasă de compuși organici s-au concretizat prin obținerea unor compuși originali, care au fost caracterizați din punct de vedere structural cu ajutorul metodelor spectrale de analiză și evaluați din punct de vedere al potențialului biologic.

Lucrarea de față intitulată “NOI DERIVAȚI DE TIAZOL ȘI SELENAZOL CU POTENȚIAL BIOLOGIC” este constituită din două capitole:

Capitolul I-Studiu monografic: sistematizează și prezintă cele mai semnificative și mai recente date referitoare la sinteza și comportarea unor compuși 2-hidrazinotiazolici. Obiectivele principale urmărite au fost clasificarea cât mai logică și mai riguroasă a metodelor de obținere și a proprietăților chimice, precum și stabilirea unor relații între structura și activitatea biologică a acestor compuși.

Capitolul II-Contribuții personale: prezintă rezultatele originale ale studiilor efectuate în sinteza de derivați 2-hidrazino-tiazolici respectiv 2-hidrazino-selenazolici, confirmarea structurilor prin metode spectrale și evaluarea activității lor biologice. Acest capitol este structurat la rândul său în trei subcapitole.

Primul subcapitol descrie sinteza clasică și la microunde a unor noi derivați de *p*-toluensulfonil-hidrazinotiazoli și hidrazino-bis-tiazoli, având în vedere faptul că metoda cea mai simplă și eficientă în sinteza acestora este reacția de condensare Hantzsch. În continuarea studiului ne-am propus evaluarea acestor compuși din punct

¹ B. S. Holla, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, 38, 313.

² O. A. Fathalla, A. H. Mandour, E. M. Kassem, N. A. Ahmed, *Biomedical Problems*, **2001**, 62 (2), 53.

³ E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chaviara, C. A. Bolos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006** 16, 2234.

⁴ B. Dash, M. Pates, and S. Prarharay, *Indian J. Chem.* **1980**, 19, 894.

⁵ F. Haviv, J. D. Ratajczyk, R. W. DeNet, F. A. Kerdesky, R. L. Walters, S. P. Schmidt, J. H. Holms, P. R. Young and G. W. Carter, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 1719.

⁶ B. Dash, M. Pates and S. Prarharay, *Indian J. Chem.* **1980**, 19, 894.

⁷ W. C. Patt, H. W. Hamilton, M. D. Taylor, M. J. Ryan, D. G. Taylor, C. Connolly, A. Doherty, S. Klutchko, I. Sircar, A. Steinbaugh, B. L. Batley, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 2562.

⁸ A. Rao, A. Carbone, A. Chimirri, A. Monforte, P. Monforte and M. Zappal, *Farmaco*, **2003**, 58, 115.

⁹ K. D. Hargrave, F. K. Hess and J. T. Oliver, *J. Med. Chem.*, **1983**, 26, 1158.

¹⁰ K. Babaoğlu, M. Page, V. C. Jones, M. R. McNeil, C. Dong, J. H. Naismith and R. E. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 3227.

de vedere a activității antiinflamatoare, analgezice și antitumorale, activități prezente și la alți compuși care conțin gruparea hidrazino-tiazolică.

Având în vedere asemănarea de comportare chimică dintre sulf și seleniu cât și importanța biologică a compușilor heterociclici cu seleniu,^{11, 12, 13, 14} în subcapitolul al doilea sunt prezentate cercetările privind sinteza și evaluarea potențialului biologic a unor hidrazino-selenazoli.

În acest sens am sintetizat două serii de ariliden-hidrazinoselenazoli respectiv aroil-hidrazinoselenazoli și i-am testat din punct de vedere a activității antimicrobiene, antifungice și antitumorale.

În subcapitolul trei, obiectivul cercetării noastre a fost sinteza unor compuși care să conțină nucleul fenotiazinic legat printr-o punte hidrazinică de nucleul tiazolic respectiv selenazolic și să testăm proprietățile biologice ale noilor compuși. Aplicațiile farmaceutice ale fenotiazinei și derivaților săi acoperă un mare câmp aplicativ prin acțiunile sale: antitumorală prin inducerea efectului de apoptoză sau a efectului de neutralizare a endotoxinelor, neuroleptică,¹⁵ antiparkinsoniană,¹⁶ antimicrobiană,¹⁷ etc.

Această teză conține rezultate originale obținute ca urmare a cercetărilor efectuate în cadrul Laboratorului de Chimie Organică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" și a Laboratorului de Chimie Organică a Facultății de Chimie și Inginerie Chimică a Universității " Babeș Bolyoi" din Cluj-Napoca.

¹¹ E. Bulka, K. D. Ahlers und E. Tucek, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 1373.

¹² H. Goot, J. Ch. Rriks, R. Leurs and H. Timmerman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 16, 1913.

¹³ M. Koketsu and H. Ishihara, *Current Organic Chemistry*, **2003**, 7, 175.

¹⁴ M. Koketsu, K. Kanoh and H. Ishiharab, *Heterocycles*, **2006**, 68, 10, 2145.

¹⁵ A. N. Cristea, *Ed. Medicală Bucuresti*, **2005**, 67.

¹⁶ M. Diudea, M. Pitea, M. Butan, *Fenotiazine și medicamente structural înrudite Ed. Dacia*, **1992**, 40.

¹⁷ N. Motohaschi, H. Sahaganni, L. Ferenczy, *Anticancer Res.* **1992**, 12 (4), 1207.

5.1 p-TOLUENSULFONIL-HIDRAZINO-TIAZOLI ȘI HIDRAZINO-BIS - TIAZOLI

5.1 Sinteza p-toluensulfonil-hidrazino-tiazolilor

Cercetările experimentale de chimie farmaceutică și farmacologie evidențiază potențialul biologic deosebit al compușilor cu funcțiune sulfonil-hidrazinică. Astfel, se citează proprietăți antimicrobiene,^{18, 19, 20, 21} antitumorale,^{22, 23, 24} analgezice,²⁵ antiinflamatoare²⁶ și antipiretice ale compușilor cu această grupare funcțională. De asemenea, există în literatura de specialitate date referitoare la tiosemicarbazide și hidrazinotiazoli cu activitate inhibitoare a monoaminoxidazei (MAO)²⁷ precum și arilsulfonil-tiosemicarbazide cu acțiune antitrombotică.²⁸ Holla și colaboratorii²⁹ s-au ocupat de sinteza unor ariliden-hidrazinotiazoli și 2-furaniliden-hidrazinotiazoli cu potențial antimicrobian și antiinflamator, iar Bhat³⁰ a utilizat o serie de acil-tiosemicarbazide în sinteza unor tiazolo[2,3-c][1,2,4]triazoli.

Aceste date împreună cu experiența noastră privind sinteza și evaluarea potențialului antimicrobian al unor hidrazino-tiazoli,^{31, 32} precum și în sinteza și caracterizarea unor aroil-hidrazino-tiazoli pe care i-am utilizat ca intermediari în sinteza unor tiazolo[2,3-c][1,2,4]triazoli,^{33, 34, 35, 36} ne-au determinat să reunim aceste elemente structurale (gruparea sulfonil-hidrazinică și nucleul tiazolic) în aceeași moleculă și să evaluăm potențialul biologic (analgezic, antiinflamator și antineoplazic) al compușilor sintetizați.

¹⁸ L. Silva, K. Navakoski, R. J. Nunes, *Arkivoc*, **2006**, 124.

¹⁹ R. Naithani, *Mini - Rev. Med. Chem.*, **2008**, 8, 657.

²⁰ A. Kamal, M. Naseer, A. Khan, K. Rohini, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 1004.

²² R. A. Finch, K. Shyam, G. Philip, C. Sartorelli, *Cancer Research*, **2001**, 61, (7), 3033.

²³ F. Giles, S. Verstovsek, D. Thomas, S. Gerson, J. Cortes, S. Fader, A. Ferrajoli, F. Ravandi, S. Kornblau, G. Garcia-Manero, E. Jabbour, V. Karsten, M. Sznol and H. Kantarjian, *Clinical Cancer Research*, **2005**, 11, 7817.

²⁴ W. Loh, L. A. Cosby, A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 631.

²⁵ V. Arieșan, A. Mărie, B. Cuparencu, L. Safta, *Therapie*, **1972**, 27, 309.

²⁶ M. James, H. D. James, W. Xialou, *PCT Int. Appl.*, **2010**, 436.

²⁷ R. Pignatello, S. Mazzone, I. Castelli, P. Mazzone, G. Racite, G. Mazzone, *Pharmazie*, **1994**, 49 (4), 272.

²⁸ L. M. Lima, C. B. Orneli, C. Fraga, A. Miranda and E. J. Barreiro, *J. Braz. Chem. Soc.*, **1999**, 10 (5), 421.

²⁹ B. S. Holla, K. V. Maloni, B. S. Rao, B. K. Sarojini, N. S. Kumari, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38 (3), 313.

³⁰ K. Bhat, B. Holla, *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, **2004**, 179 (6), 1019.

³¹ D. Zaharia, V. Zaharia, D. Matinca, I. Simiti, *Clujul Medical*, **1996**, LXIX, 2, 304.

³² D. Zaharia, V. Zaharia, D. Matinca, I. Simiti, *Farmacia*, **1999**, XLVII, 2, 51.

³³ V. Zaharia, L. Vlase, N. Palibroda, *Farmacia*, **2001**, XLIX, 4, 54.

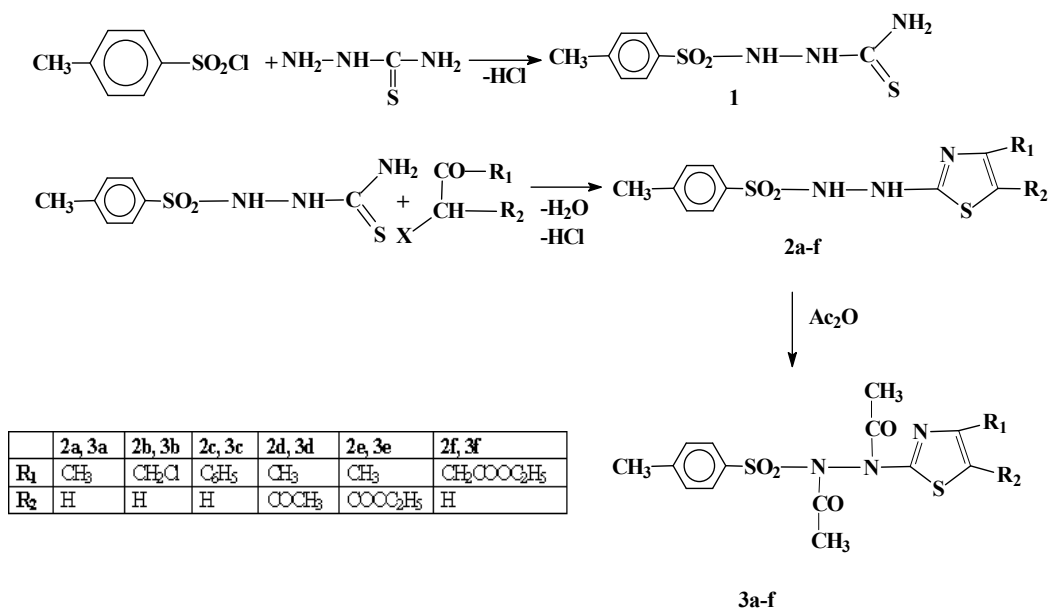
³⁴ V. Zaharia, I. Chirtoc, *Farmacia*, **2001**, XLIX, 6, 24.

³⁵ S. M. Cohen, E. Erturk, J. M. Price and T. Bryan, *Cancer Research*, **1970**, 30, 897.

³⁶ V. Zaharia, D. Zaharia, I. Chirtoc, N. Palibroda, *Clujul Medical*, **2002**, LXXV (4), 713.

II.5 Contribuții personale

Pentru sinteza compușilor din această serie s-a aplicat reacția de condensare de tip Hantzsch, având drept componentă tioamică *p*-toluensulfonil-tiosemicarbazida **1** care s-a obținut prin acilarea tiosemicarbazidei cu *p*-toluensulfoclorura (schema 5.1). Monitorizarea reacției s-a făcut cu ajutorul cromatografiei pe strat subțire (silicagel pe suport de aluminiu, eluent-acetat de etil).



Schema 5.1: Reacția de condensare de tip Hantzsch

p-Toluensulfonil-hidrazinotiazolii **2a-f** s-au sintetizat prin condensarea *p*-toluensulfonil-tiosemicarbazidei **1** cu o serie de α -halogenocarbonili (cloroacetona; 1,3-dicloroacetona; α -bromoacetofenona; 3-cloroacetilacetona; α -bromoacetoacetatul de etil și γ -bromoacetoacetatul de etil), în mediu de acetonă anhidră (cloroacetona; 1,3-dicloroacetona; 3-cloroacetilacetona) sau DMFA/acetonă (α -bromoacetofenona; 3-cloroacetilacetona; α -bromoacetoacetatul de etil și γ -bromoacetoacetatul de etil) în raport de 1:1 (schema 5.1).

Compușii **3a-f** au fost obținuți prin acetilare cu anhidridă acetică, în prezență de piridină la temperatura ambiantă (schema 5.1).

Izolarea și purificarea compușilor **2a-f** s-a realizat prin turnare pe apă, neutralizare cu NaHCO₃, filtrare și recristalizare din etanol sau separare pe coloană (silicagel 60/0,063-0,200mm, utilizând ca eluent acetatul de etil). Compușii **3a-f** au fost purificați prin recristalizare din etanol sau acid acetic.

5.2 Sinteza în câmp de microunde a *p*-toluensulfonil-hidrazinotiazolilor

Deși am raportat deja sinteza derivaților *p*-toluensulfonil-hidrazinotiazolici **2a-f** în condiții clasice, un alt obiectiv al acestei lucrări a fost de a optimiza condițiile reacției de condensare Hantzsch în microunde. Amestecul de reacție a fost supus încălzirii cu microunde în recipiente închise ermetic, la diferite presiuni, cu ajutorul unui aparat numit CEM Discover LabMate, echipat cu o singură cavitate de reacție. Solventul folosit în reacție este DMF fiind ales pe baza constantei dielectrice mari având capacitatea crescută de-a absorbi energia din domeniul microundelor. Pentru a stabili cât mai eficient condițiile de reacție aceasta s-a realizat la diferite temperaturi (25°C, 40°C, 80°C, 100°C) și diferiți timpi de reacție (0.5h, 1h, 2h). Randamentele reacțiilor au fost diferite acestea depinzând de temperatură și de timpul de reacție. Rezultatele sunt prezentate în **tabelul 5.1**.

Tabel 5.1 Randamentele reacției în condiții clasice/prin iradierea cu microunde.

Nr. compus	Temperatura (°C)	Timp (h)	Presiune (Bar)	W	Randament (%)
2a	25	24	1	-	61
2a	40	0.5	1.7	200	19
2a	40	1	1.7	200	36
2a	40	2	1.7	200	67
2a	80	0.5	1.7	200	27
2a	80	1	1.7	200	51
2a	80	2	1.7	200	82
2a	100	2	1.7	200	81
2b	25	24	1	-	73
2b	40	0.5	1.7	200	23
2b	40	1	1.7	200	42
2b	40	2	1.7	200	74
2b	80	0.5	1.7	200	27
2b	80	1	1.7	200	51
2b	80	2	1.7	200	92
2b	100	2	1.7	200	94
2c	25	24	1	-	67

II.5 Contribuții personale-----

2c	40	0.5	1.7	200	16
2c	40	1	1.7	200	23
2c	40	2	1.7	200	55
2c	80	0.5	1.7	200	21
2c	80	1	1.7	200	35
2c	80	2	1.7	200	71
2c	100	2	1.7	200	75
2d	25	24	1	-	59
2d	40	0.5	1.7	200	19
2d	40	1	1.7	200	33
2d	40	2	1.7	200	64
2d	80	0.5	1.7	200	24
2d	80	1	1.7	200	45
2d	80	2	1.7	200	81
2d	100	2	1.7	200	80
2e	25	24	1	-	56
2e	40	0.5	1.7	200	19
2e	40	1	1.7	200	38
2e	40	2	1.7	200	75
2e	80	0.5	1.7	200	21
2e	80	1	1.7	200	41
2e	80	2	1.7	200	85
2e	100	2	1.7	200	83
2f	25	24	1	-	58
2f	40	0.5	1.7	200	22
2f	40	1	1.7	200	41
2f	40	2	1.7	200	64
2f	80	0.5	1.7	200	26
2f	80	1	1.7	200	48
2f	80	2	1.7	200	86
2f	100	2	1.7	200	84

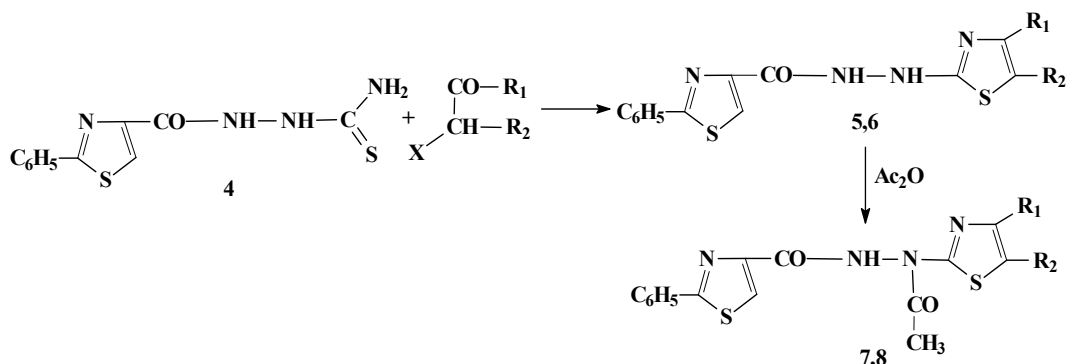
Rezultatele acestui studiu arată o scădere a timpului de reacție și o creștere a randamentului dacă reacția de condensare este asistată de microunde și se realizează la o temperatură mai ridicată decât în reacția clasică. După 2 ore de iradiere cu microunde

II.5 Contribuții personale-----

cu puterea de iradiere de 200 W, la temperatura de 40°C, randamentele sunt comparabile cu cele obținute în reacția clasică realizată la temperatura camerei în 24 ore. Prin iradierea cu microunde la o temperatură de 80°C, timp de 2 ore, randamentele sunt superioare celor din reacția realizată în condiții clasice. Temperatura de 100°C nu a condus la îmbunătățirea randamentului. Pe baza acestor rezultate putem concluziona că reacția de condensare este favorizată de creșterea temperaturii la 80°C și prezența microundelor.

5.3 Sinteza hidrazino-bis-tiazolilor

De asemenea, s-au sintetizat o serie de compuși cu două nuclee tiazolice unite prin gruparea carbonilhidrazinică. Pentru sinteza acestor compuși, 4-(2-fenil-tiazol-4-carbonil)-tiosemicarbazida **4** obținută anterior de noi prin acilarea tiosemicarbazidei cu clorura acidului 2-fenil-tiazol-4-carboxilic, a fost condensată cu 1,3-dicloroacetona, respectiv cu γ -bromoacetoacetatul de etil (**schema 5.2**).



	5,7	6,8
R₁	CH ₂ Cl	CH ₂ COOC ₂ H ₅
R₂	H	H

Schema 5.2: Reacția de condensare a 4-(2-fenil-tiazol-4-carbonil)-tiosemicarbazidei cu o serie de α -halogenocarbonili

Mersul reacției s-a minorizat prin cromatografie pe strat subțire, utilizând ca eluent acetatul de etil.

II.5 Contribuții personale-----

Compușii tiazolici au fost supuși reacției de acilare cu anhidridă acetică în prezență de piridină (**schema 5.2**). Produșii de reacție au fost purificați prin recristalizare din etanol sau cromatografie pe coloană (silicagel 60/0,063-0,200mm, eluent-acetat de etil). În cazul sulfonil-hidrazino-tiazolilor restul de hidrazină participă la o dublă reacție de acetilare, în timp ce în cazul tiazolil-carbonilhidrazino-tiazolilor are loc doar o monoacetilare.

5.4 Analiza structurală

Structura chimică a compușilor *p*-toluensulfonil-hidrazinotiazolici și hidrazino-*bis*-tiazolici a fost confirmată prin analiza spectrelor IR, SM și ¹H-RMN.

5.5. Evaluarea potențialului biologic

5.5.1. Activitatea antiinflamatoare

Compușii *p*-toluensulfonil-hidrazino-tiazolici sintetizați au fost supuși testării pentru o potențială activitate antiinflamatoare. S-a utilizat un model de inflamație acută care evaluează faza vasculară a procesului inflamator și anume edemul labei de șobolan indus cu caolin 10%. S-au luat în studiu 15 loturi a câte 8 șobolani masculi albi rasa Wistar Bratislava.

Animalelor li s-au administrat i.p. substanțele luate în lucru și anume primul lot a fost cel martor la care s-a administrat vehiculul folosit la prepararea suspensiilor (apă distilată și agent de suspendare), al doilea a primit pe aceeași cale un antiinflamator de referință și anume fenilbutazona 50 mg/kg, iar celelalte loturi au primit i.p. substanțele de testat sub formă de suspensie, în doze de 50 mg/kg.

La 30 de minute de la administrarea substanțelor, s-a măsurat volumul labei din stânga spate cu ajutorul pletismometrului Ugo Basile, iar în laba măsurată s-a injectat 0.1 ml suspensie de caolin 10%, agentul edemogen. Evoluția edemului inflamator a fost urmărită măsurând din nou volumul labei inflamate la 2h, 4h și 24h de la administrarea caolinului.

Rezultatele obținute în modelul de inflamație acută a edemului labei de șobolan indus cu caolin 10% pentru compușii studiați sunt prezentate în **figura 5.1**.

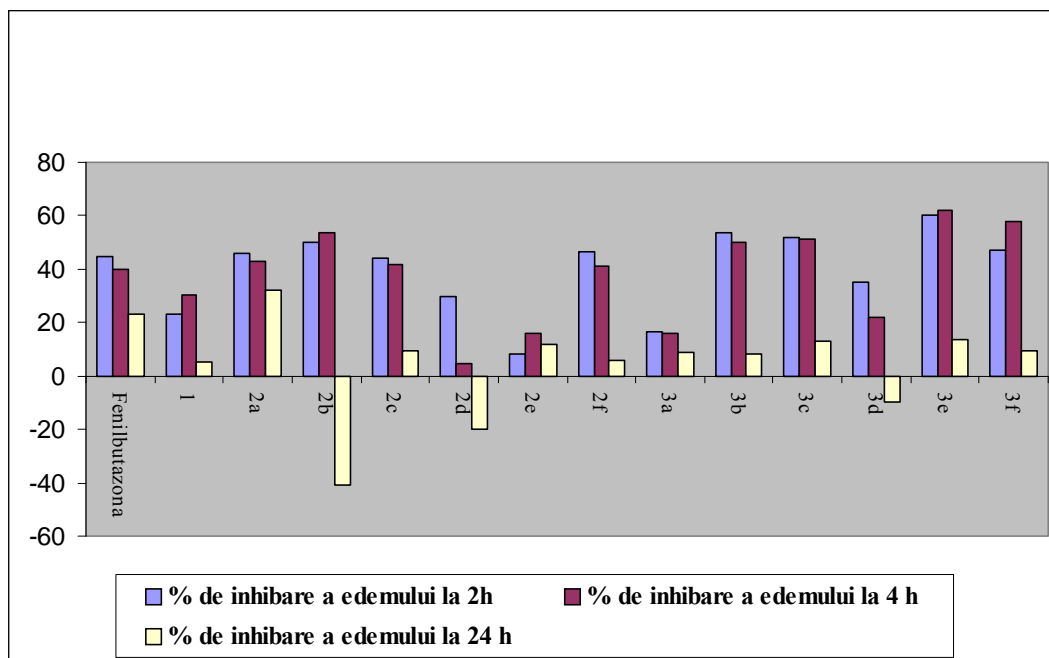


Figura 5.1 Procentul de inhibare a edemului inflamator al labei de șobolan

Prin comparație cu fenilbutazona, se observă la 2 ore de la inducerea inflamației, activitatea antiinflamatoare cea mai bună apare la compușii **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, **3b**, **3c**, **3e** și **3f**. După 4 ore de la inducerea inflamației, aceiași compuși au activitate asemănătoare sau chiar mai bună decât fenilbutazona (antiinflamator etalon). La 24 de ore de la administrare, activitatea antiinflamatoare se păstrează la compusul **2a** și este chiar mai bună decât al substanței etalon. Compusul **2a** este substanța cu potențial antiinflamator comparabil cu al fenilbutazonei.

5.5.2 Activitatea analgezică

Compușii sintetizați au fost de asemenea supuși testării farmacologice în vederea evaluării proprietăților analgezice printr-un model de analgezie centrală, în care stimulul dureros este reprezentat de o placă încălzită la 56°C (testul hot plate).³⁷

S-au luat în studiu 15 loturi a 8 șoareci masculi albi cu greutatea de 25-35 g. standard în ambianța laboratorului, cu acces la apă *ad libitum*. Ca stimul termic dureros s-a folosit o placă încălzită la 56°C (Hot/Cold plate Ugo Basile).¹⁸

³⁷ C. Mogoșan, O. Vostinaru, D. Dobrescu, M. Tamas, *Timișoara Medical Journal*, **2005**, 55 (5), 232.

II.5 Contribuții personale-----

Substanțele luate în studiu au fost administrate intraperitoneal. Primului lot, martor, i s-a administrat vehiculul folosit la prepararea ulterioară a suspensiilor (apa distilată și agent de suspendare), celui de-al doilea lot, control, i s-a administrat un analgezic opioid, heroina 5 mg/kg, iar lotului 3 care este tot lot control i s-a administrat un antiinflamator nesteroidian, fenilbutazona 50 mg/kg. Loturilor 4-15 li s-au administrat intraperitoneal substanțele de testat sub forma de suspensie în doze de 50 mg/kg corp.

Rezultatele au fost înregistrate și s-a calculat pentru fiecare lot valoarea medie a timpului de răspuns la stimulul dureros pentru fiecare moment al evaluării acestuia (30 minute, 1h, 1.30h și 2h) și respectiv eroarea standard. Analiza statistică s-a realizat prin testul T Student ($p < 0.05$), raportarea pentru fiecare lot fiind făcută față de momentul inițial.

Rezultatele obținute în urma studierii acțiunii analgezice a compuşilor în modelul de durere indusă cu un stimul termic (hot plate) sunt prezentate în **figura 5.2**.

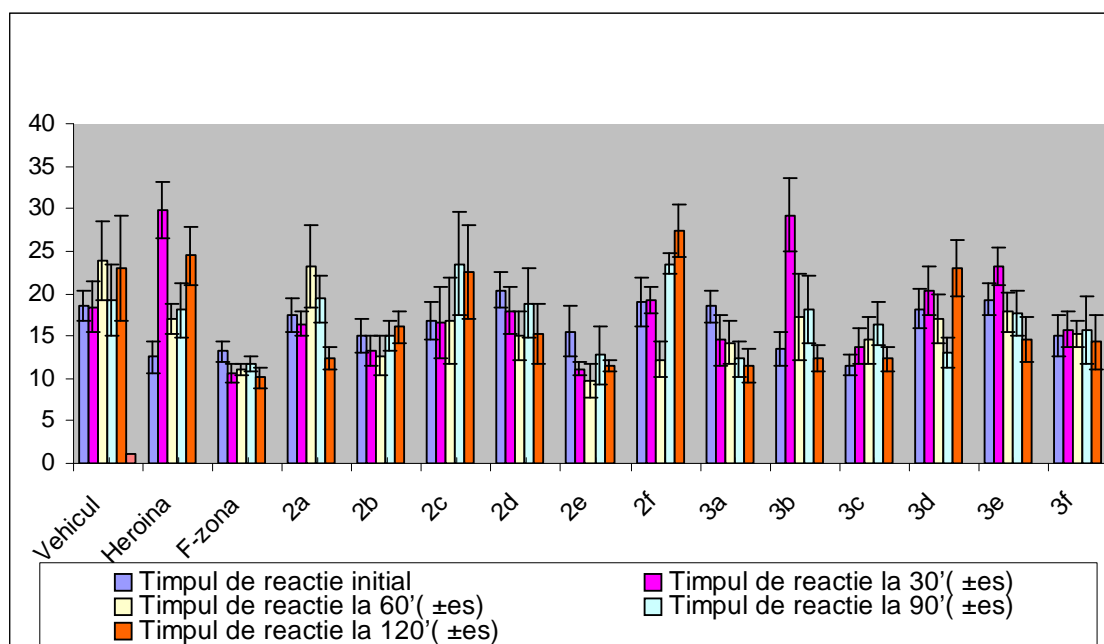


Figura 5.2 Timpul de răspuns la stimulul dureros

Din analiza rezultatelor obținute se observă că în acest model de analgezie centrală al plăcii încălzite la 56°C, heroina 5 mg/kg prezintă efect analgezic,

II.5 Contribuții personale-----

prelungind semnificativ timpul de reacție al animalelor la 30 minute, ceea ce corespunde cu profilul ei analgezic cunoscut.

Dintre substanțele luate în studiu prezintă creșteri importante ale timpului de reacție față de răspunsul inițial compușii **2a**, **2c**, **2f**, **3b**, **3d**, și **3e**. Lotul tratat cu compusul **3b** prezintă o creștere semnificativă a timpului de reacție la 30 de minute de la administrarea substanței de testat, timpul de reacție la 30 de minute fiind asemănător heroinei (analgezic etalon) pentru același interval de timp. Loturile **2c** și **2f** prezintă valori aproximativ egale a timpului de reacție la 90 minute față de inițial, acestea fiind superioare heroinei la același interval de timp. După 120 minute compusul **2f** determină o creștere semnificativă a timpului de reacție față de timpul inițial, timp de reacție comparabil sau chiar mai mare decât al lotului tratat cu heroină. Compușii **2f** și **3b** sunt substanțe cu potențial analgezic, **3b** cu un profil asemănător heroinei, iar **2f** cu profil diferit, efectul analgezic instalându-se mai lent decât în cazul heroinei.

5.5.3 Activitatea antiproliferativă

Peng-Cheng împreună cu colaboratorii³⁸ au sintetizat o serie de arilidenhidrazinil-tiazolil-4-one care prezintă activitate antiproliferativă prin inhibarea kinazelor EGFR (receptorul factorului de creștere epidemiologic) și HER-2 (receptor epidemiologic uman), care printr-o hiperactivare a acestor enzime conduce la apariția mai multor tipuri de cancere (hepatic, de prostată etc.).^{39, 40}

Veeresa Gududuru⁴¹ și echipa sa au studiat mai mulți derivați de 2-aril-4-oxotiazolidin-3-il-amide, care s-au remarcat prin activitatea lor anticancerosă pe liniile celulare responsabile de cancerul de prostată (DU-145, PC-3, LNCaP, PPC-1, și TSU) și cancerul de colon.⁴²

Datele din literatură ne-au îndrumat spre testarea activității anticancerose a compușilor sintetizați de noi, activitate care s-a pus în evidență pe celulele responsabile de cancerul de prostată (DU-145) și cele responsabile de hepatocarcinom (HepG2).

³⁸ L. Peng-Cheng, Z. Chang-Fang, J. Chen, L. Peng-Gang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, 18 (1) 314.

³⁹ Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, *Mol. Cell. Biol.*, **2001**, 2, 127.

⁴⁰ N. E. Hynes and D. F. Stern, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 11 (98), 165.

⁴¹ V. Gududuru, E. Hurh, T. James and D. Millera, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2004**, 14, 5289.

⁴² R. Ottana, S. Carotti, R. Maccari, I. Landini, G. Chiricosta, B. Caciagli, M. Vigorita and E. Mini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 3930.

II.5 Contribuții personale-----

Pentru studiul citotoxicității substanțelor studiate am folosit metoda colorimetrică XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboxianilide).

S-a adăugat reactiv XTT (50 :1) și după 72 h s-a măsurat absorbanta la lungimea de undă de 560 nm. Experimentele au fost efectuate de trei ori în trei exemplare. Probele active (cu mai puțin de 50% de supraviețuire) au fost diluate într-un interval de concentrații cuprins între 3.12 -50 $\mu\text{g/ml}$ și au fost testate. Concentrația de probă care inhibă 50% proliferarea celulelor (IC_{50}) a fost determinată din grafic. Doxorubicina, este agentul anti-tumoral de referință în acest experiment. Procentul de celule care au supraviețuit a fost determinat cu ajutorul formulei:

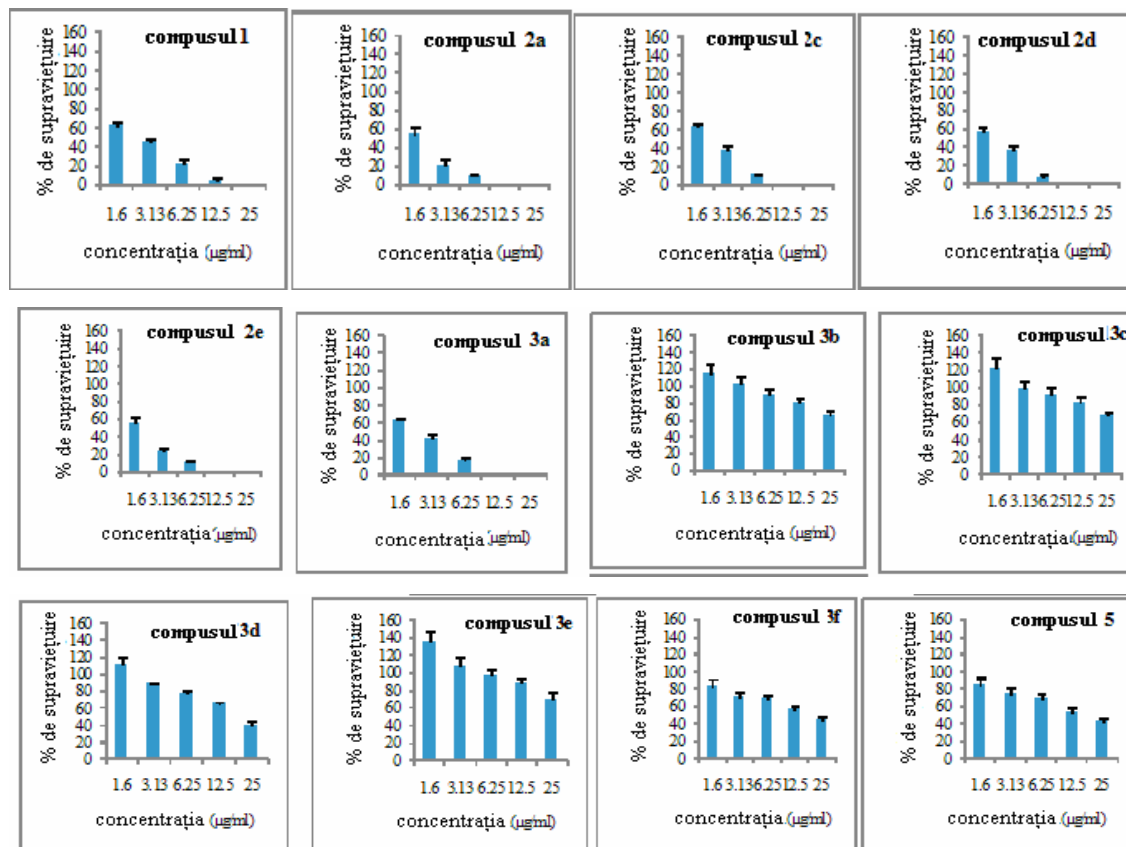
$$\% \text{ de supraviețuire} = (\text{ODT} / \text{ODC}) \times 100;$$

ODT- absorbanta probei de testat

ODC- absorbanta substanței de referință (0,1 DMSO%)

Activitatea anticanceră obținută pentru compușii 1-8 este prezentată în **figurile 5.3 și 5.4**.

Figura 5.3 Efectul citotoxic al compușilor studiați pe tipul de celule DU-145



II.5 Contribuții personale

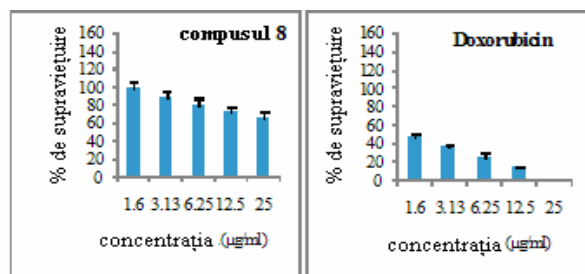
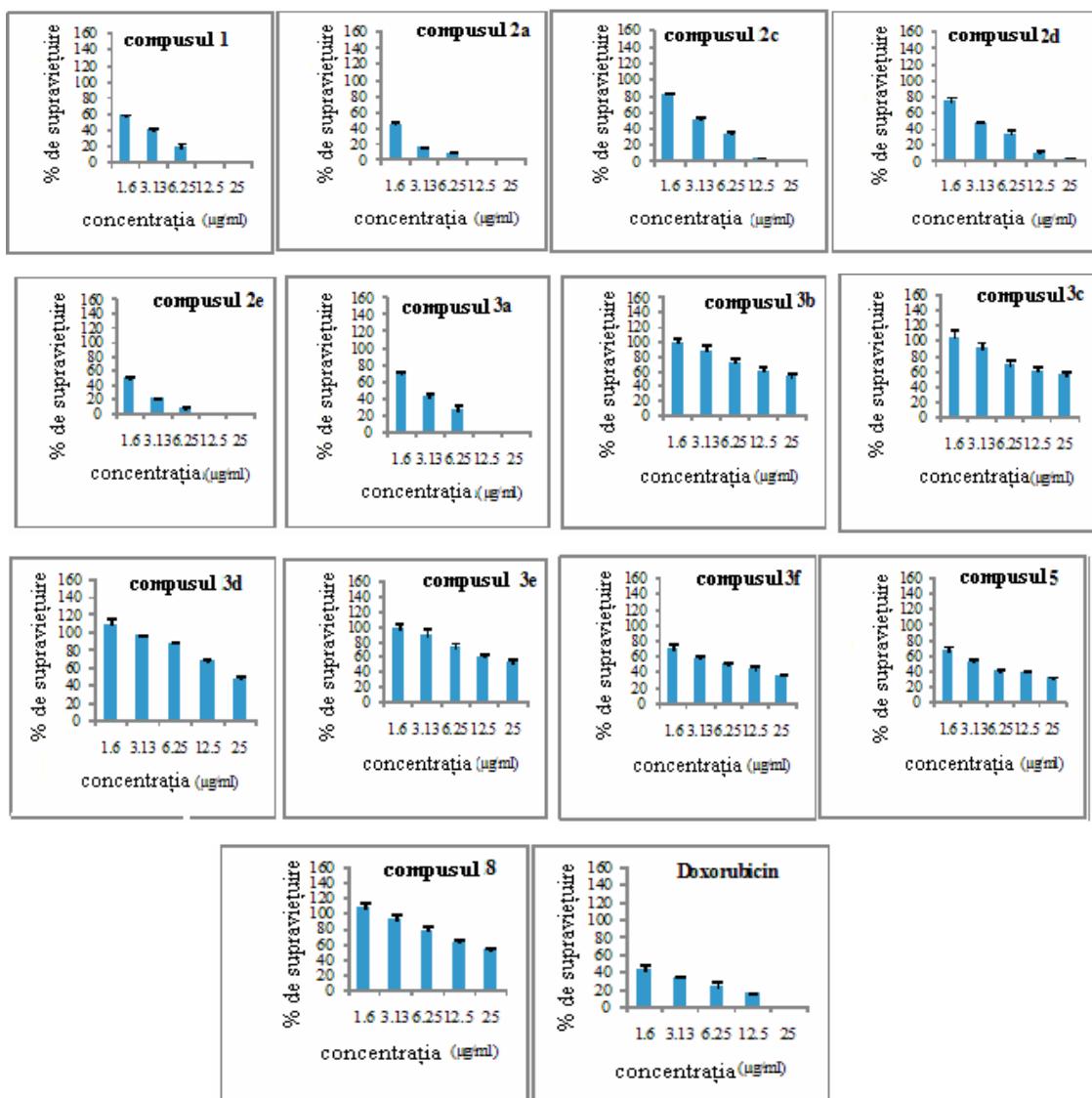


Figura 5.4 Efectul citotoxic al compușilor studiați pe tipul de celule HepG2



Rezultatele studiului arată activitate antineoplazică comparabilă cu a doxorubicinei (antineoplazic de referință) pentru compușii 1, 2a, 2c, 2d, 2e și 3a atât pe

II.5 Contribuții personale-----

celulele DU-145 cât și HepG2, la concentrația de 25 μg/ml (**Figurile 5.3 și 5.4**). Deși compusul **1** este activ pe ambele tipuri de celule DU-145 și HepG2, trebuie remarcat faptul că unii dintre compușii sintetizați (**2a și 2e**) sunt mai activi, au prezentat valori mai scăzute ale IC₅₀.

6. HIDRAZINO-SELENAZOLI

6.1. Sinteza ariliden-hidrazino-selenazolilor

Compușii heterociclici cu seleniu prezintă un spectru larg de activitate biologică. Derivații 1,3-selenazolici prezintă activitate anticanceroasă,⁴³ antibacteriană (selenafurinul), antivirală,^{44, 45} inhibă sinteza acidului nitric⁴⁶ și sunt agoniști pe receptorii histaminici H₂.⁴⁷ Compușii 2-dialchil-amino-1,3-selenazolici⁴⁸ pot fi utilizați în sinteza unor coloranți.⁴⁹ Derivații N-acilați ai compusul 2-amino-4-(izotiocianatometil)-1,3-selenazolici prezintă de asemenea activitate antitumorală.⁵⁰ Recent a fost raportată activitatea inhibitoare asupra anion-superoxidazei a 2-piperidino-1,3-selenazolilor și 4-fenil-2-piperidino-1,3-selenazolilor.⁵¹

Aceste date împreună cu experiența noastră privind sinteza și evaluarea potențialului antimicrobian și antitumoral al unor hidrazinotiazoli^{52, 53} și având în vedere asemănarea de comportare chimică dintre sulf și seleniu, ne-am propus continuarea cercetărilor prin sinteza unor hidrazino-selenazoli, în vederea studierii comportării lor chimice și biologice.

S-au utilizat ca precursori selenosemicarbazonele benzaldehidei, *p*-clorobenzaldehidei, *p*-metoxi-benzaldehidei și 2-fenil-tiazol-4-carbaldehidei, care s-au preparat prin condensarea aldehidelor corespunzătoare cu selenosemicarbazida (**schema 6.1**).

⁴³ P. C. Srivastava, R. K. Robins, *J. Med. Chem.*, **1983**, 26, 445.

⁴⁴ B. M. Goldstein, S. D. Kennedy, W. J. Hennen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8265.

⁴⁵ D. Smee, J. Huffman, J. Huggins, R. Sidwell, *Antiviral Chem. Chemother*, **1990**, 211.

⁴⁶ S.Ueda, H. Terauchi, K. Suzuki, M. Matsumoto, T. Kubo, H. Minato, Y. Arai, J. Tsuji, N. Watanabe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 1361.

⁴⁷ J. C. Eriks, R. Leurs, H. Timmerman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 1913.

⁴⁸ W. Kantlehner, M. Hauber, M. Vettel, *J. Prakt. Chem.*, **1996**, 338, 403.

⁴⁹ D. Keil, H. Hartmann, *Dyes and Pigments*, **2000**, 44, 149.

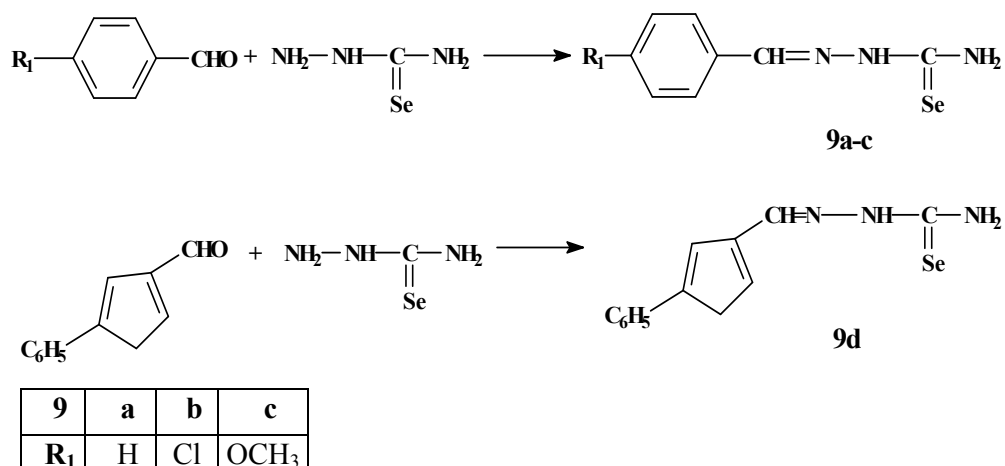
⁵⁰ Y. Kumar, R. Green, D. Wise, L. Wotring, L. Townsend, *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 3849.

⁵¹ K. N. Nam, M. Koketsu, E. H. Lee, *Eur. J. Pharm.*, **2008**, 589, 53.

⁵² D. Zaharia, V. Zaharia, D. Matinca, I. Simiti, *Farmacia*, **1999**, XLVII, 2, 51.

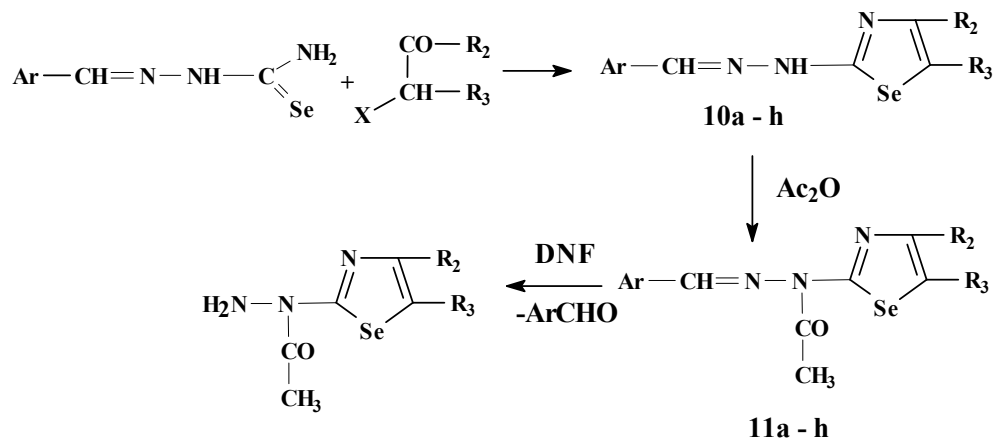
⁵³ A. Ignat, V. Zaharia, C. Mogosan, N. Palibroda, C. Cristea, L. Silaghi-Dumitrescu, *Farmacia*, **2010**, 58 (3), 290.

II.6 Contribuții personale



Schema 6.1

Selenosemicarbazonele **9a-d** au fost condensate ulterior cu monocloroacetona, 1,3-dicloroacetona, α -bromoacetofenona, 3-cloro-acetilacetona, esterul α -bromoacetic și esterul γ -bromoacetic obținându-se hidrazino-selenazolii corespunzători. Compușii **10a-h** au fost transformați în acetilderivații **11a-h** sub acțiunea anhidridei acetice, în prezență de piridină (schema 6.2).



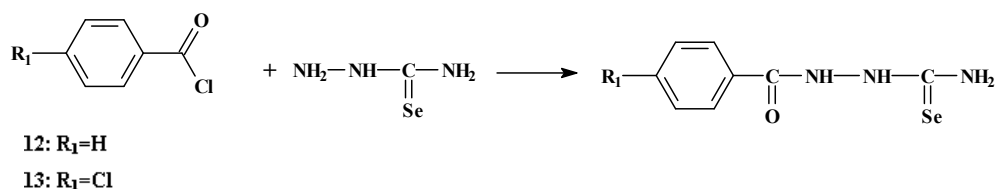
10, 11	a	b	c	d	e	f	g	h
Ar	C ₆ H ₄ Cl(4)	C ₆ H ₄ Cl(4)	C ₆ H ₄ Cl(4)	C ₆ H ₄ Cl(4)	C ₆ H ₄ OCH ₃ (4)	C ₆ H ₄ OCH ₃ (4)	Th	Th
R₂	CH ₃	CH ₂ Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅	CH ₂ Cl	CH ₃
R₃	H	H	H	COOC ₂ H ₅	H	H	H	COCH ₃

Schema 6.2

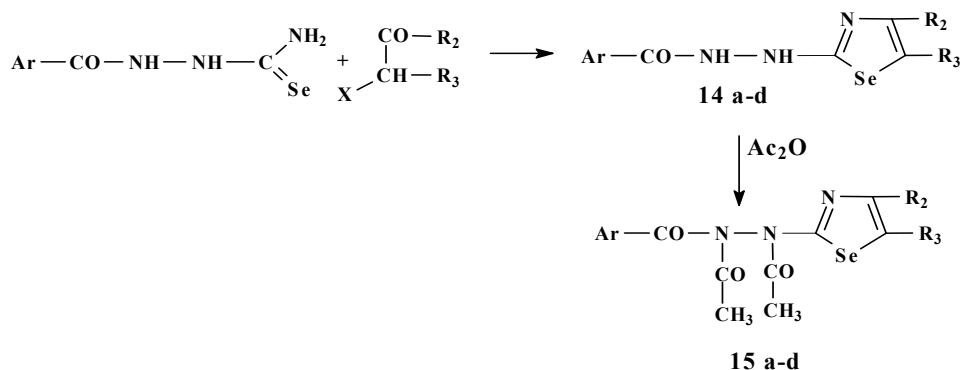
p-Clorobenzilidenhidrazinoselenazolul **10a** și acetilderivatul acestuia **11a** au fost scindați cu eliberarea hidrazinoselenazolilor corespunzători, prin acțiunea 2,4-dinitrofenilhidrazinei (DNF).

6.2 Sinteza aroil-hidrazino-selenazolilor

În mod asemănător s-au sintetizat mai mulți derivați aroil-hidrazino-selenazolici plecând de la aroil-selenosemicarbazidele **12** și **13**. Acestea au fost obținute prin reacția de acilare a selenosemicarbazidei cu clorura acidului benzoic respectiv p-clorbenzoic (**schema 6.3**). Aroil-selenosemicarbazidele au fost condensate ulterior cu compuși carbonilici α -halogenați ducând la obținerea aroil-hidrazino-selenazolilor **14a-d** (**schema 6.4**). În prezența anhidridei acetice hidrazinoselenazolii au fost diacetilați cu obținerea compușilor **15a-d** (**schema 6.4**).



Schema 6.3



14, 15	a	b	c	d
Ar	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ Cl (4)	C ₆ H ₅ Cl (4)
R ₁	CH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃	C ₆ H ₅
R ₂	H	H	H	H

Schema 6.4

Compușii **10a-h** și **14a-d** au fost obținuți prin reacția de condensare Hantzsch, în mediu de DMF-acetonă (1:1), la temperatura camerei în timp de 24h. Condensare Hantzsch pentru compușii cu seleniu s-a încercat și la temperatura de reflux în scopul reducerii timpului de reacție dar a condus la degradarea reactanților cu obținerea seleniului metallic.

6.3. Sinteza în câmp de microunde a hidrazino-selenazolilor

Hidrazinoselenazoli **10a-h** și **14a-d** au fost obținuți de asemenea prin iradiere cu microunde. Condițiile optime pentru reacția asistată de microunde s-au stabilit în urma mai multor încercări la diferite temperaturi (40°C, 60°C, 80°C) și diferiți timpi de reacție (30', 60', 90') utilizând ca solvet DMFA. Temperatura de 80°C este prea ridicată pentru compușii **10a-h** și **14a-d** și conduce la degradarea produsului de reacție. Randamentele cele mai bune s-au obținut la temperatura de 40°C timp de 60 minute și sunt prezentate în **tabelul 6.1**.

Tabelul 6.1. Condiții experimentale pentru obținerea hidrazino-selenazolilor

Compus	Temperatură (° C)	Timp (min)	Presiune (Bar)	Iradiere W	Randament (%)
10a	25	1440	1	-	52
	40	60	1.7	100	94
10b	25	1440	1	-	51
	40	60	1.7	100	91
10c	25	1440	1	-	56
	40	60	1.7	100	92
10d	25	1440	1	-	56
	40	60	1.7	100	92
10e	25	1440	1	-	56
	40	60	1.7	100	91
10f	25	1440	1	-	53
	40	60	1.7	100	93
10g	25	1440	1	-	52
	40	60	1.7	100	92
10h	25	1440	1	-	57
	40	60	1.7	100	94
14a	25	1440	1	-	63
	40	60	1.7	100	91
14b	25	1440	1	-	67
	40	60	1.7	100	87
14c	25	1440	1	-	63
	40	60	1.7	100	96
14d	25	1440	1	-	59
	40	60	1.7	100	98

II.6 Contribuții personale-----

Rezultatele acestui studiu arată o creștere a randamentului dacă reacția are loc în mediu de microunde și la o temperatură mai ridicată decât în reacția clasică. După 60 minute de iradiere în microunde, cu puterea de iradiere de 100W, la temperatura de 40°C, randamentele sunt superioare celor din reacția realizată în condiții clasice.

6.4 Analiza structurală

Structurile compușilor sintetizați au fost confirmate cu ajutorul spectrelor IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, HMQC, HMBC, ⁷⁷Se-RMN și SM.

6.5 Evaluarea potențialului biologic

6.5.1 Activitatea antimicrobiană și antifungică

Pe baza datele din literatură referitoare la activitatea antibacteriană (selenafurinul),⁵⁴ și antivirală,⁵⁵ a unor derivați de selenazol, ne-am propus evaluarea acestor activități pentru compușii sintetizați.

Tulpina *Staphylococcus aureus* MSSA 25213 a fost sensibilă la următoarele substanțe: selenosemicarbazida, **9a**, **9b**, **9c** și **13**, diametrul de inhibiție al soluției stoc fiind foarte apropiat de cel al antibioticului. Acest lucru demonstrează acțiunea antibacteriană bună a celor 4 substanțe. Rezultate destul de bune s-au obținut și pentru unele diluții, în special în cazul substanțelor **9b** și **9c**. De asemenea, tulpina *Staphylococcus aureus* MSSA 25213 a fost intermediar sensibilă la substanța **14a**, acestea având o acțiune antibacteriană mai scăzută.

Figura 6.1 Activitatea antimicrobiană a compusului **9a**



⁵⁴ B. M. Goldstein, S. D. Kennedy, W. J. Hennen, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8265.

⁵⁵ D. F. Smee, J. H. Huffman, L. L. Hall, J. W. Huggins, R. W. Sidwell, *Antiviral Chem. Chemother.*, **1990**, 211.



Figura 6.2 Activitatea compusului 9b



Figura 6.3 Activitatea compusului 13

Tulpina *Staphylococcus aureus* MRSA 43300 a fost sensibilă la substanțele selenosemicarbazida, 9a, 9b, 9c, 9d și 14a, în unele cazuri (subs. selenosemicarbazida și 9a), diametrul de inhibiție al soluției stoc fiind mai mare decât cel al antibioticului. Aceasta demonstrează acțiunea antibacteriană foarte bună a acestor substanțe. Rezultate destul de bune s-au obținut și pentru unele diluții, în special în cazul următoarelor substanțe: selenosemicarbazida, 9a, 9b, 9c, 9d și 13.

Diametrul zonei de inhibiție pentru ambele tulpini de *Staphylococcus aureus* a scăzut direct proporțional cu scăderea concentrației soluției testate. Cele 20 de substanțe organice testate nu au avut acțiune antibacteriană asupra tulpinii *Enterococcus faecalis* 29212.

În concluzie, se poate afirma faptul că substanțele selenosemicarbazida, 9a, 9b, 9c, 9d, 13 și 14a au avut o acțiune antibacteriană bună numai asupra celor două tulpini Gram-pozitive de *Staphylococcus aureus* (MSSA și MRSA).

6.5.2 Activitatea antiproliferativă

Având în vedere datele din literatură referitoare la activitatea antiproliferativă a unor derivați 1,3-selenazolici, ne-am propus testarea noilor compuși în scopul evidențierii acestei activități. Am folosit ca și sisteme biologice culturile de celule tumorale umane, celulele HepG2 - responsabile de hepatocarcinom și DU145 – responsabile de cancerul de prostată.

Pentru studiul citotoxicității substanțelor studiate am folosit metoda colorimetrică XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboxianilida) descrisă în subcapitolul 5.5.3. Rezultatele sunt prezentate în figurile 6.4 și 6.5.

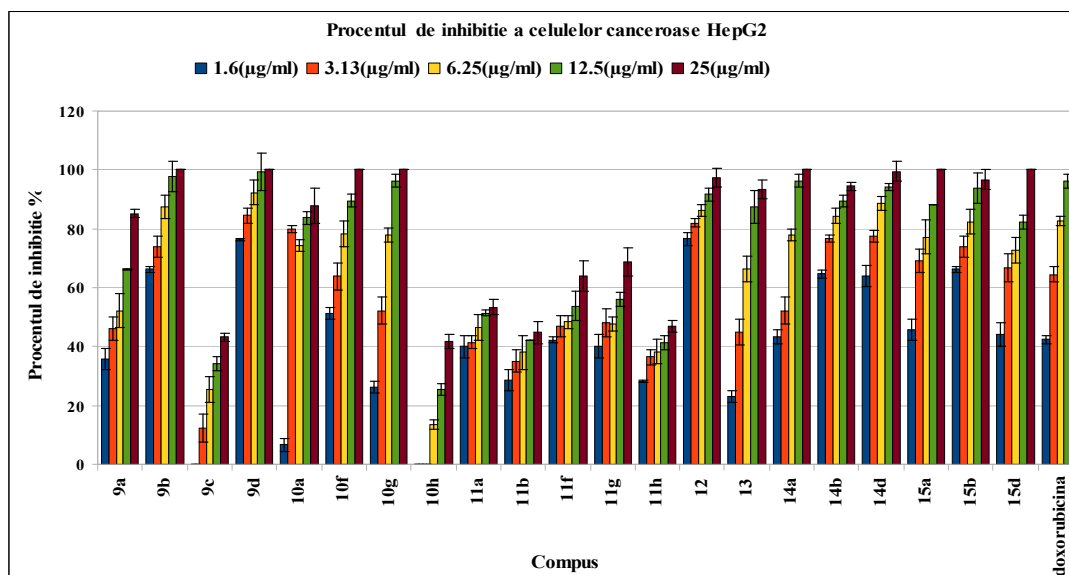


Figura 6.4 Efectul citotoxic al compușilor studiați pe tipul de celule HepG2

Activitate antineoplazică comparabilă cu a doxorubicinei pe linia celulară HepG2 s-a întâlnit la următorii compuși: **9b, 9d, 10f, 10g, 12, 13, 14a, 14d, 15a 15b** și **15d**. În seria de compuși **9a-d**, compusul **9d** este cel mai activ prezentând o inhibiție a proliferării celulare mai puternică decât doxorubicina chiar la concentrația de 1.6 (μg/ml). Ariliden-hidrazino-selenazolii **10a-h**, prezintă în general o activitate antineoplazică bună cei mai remarcabili dintre aceștia fiind compușii **10f** și **10g**. Compusul **10g** are atât procentul de inhibiție cât și IC₅₀ mai bun decât **10f**. Prin acetilarea acestor compuși scade foarte mult activitatea antineoplazică. Seria aroil-hidrazino-selenazolică (**12-15**) prezintă activitate antiproliferativă atât sub formă acetilată cât și sub formă neacetilată. Compușii **14a, 15a** și **15d** prezintă o inhibiție a proliferării celulelor HepG2 de 100% având IC₅₀ mai mic de 1.6μg/ml, profilul de inhibiție fiind asemănător cu a doxorubicinei. De remarcat faptul că în cazul derivatului aroil-hidrazino-selenazolic acetilat **15d** activitatea anticanceroasă este superioară față de cel neacetilat **14d**. Alura diagramei pentru efectul antiproliferativ pe celulele DU 145 (figura 6.5) este asemănătoare cu cea pe celulele HepG2 (figura 6.4).

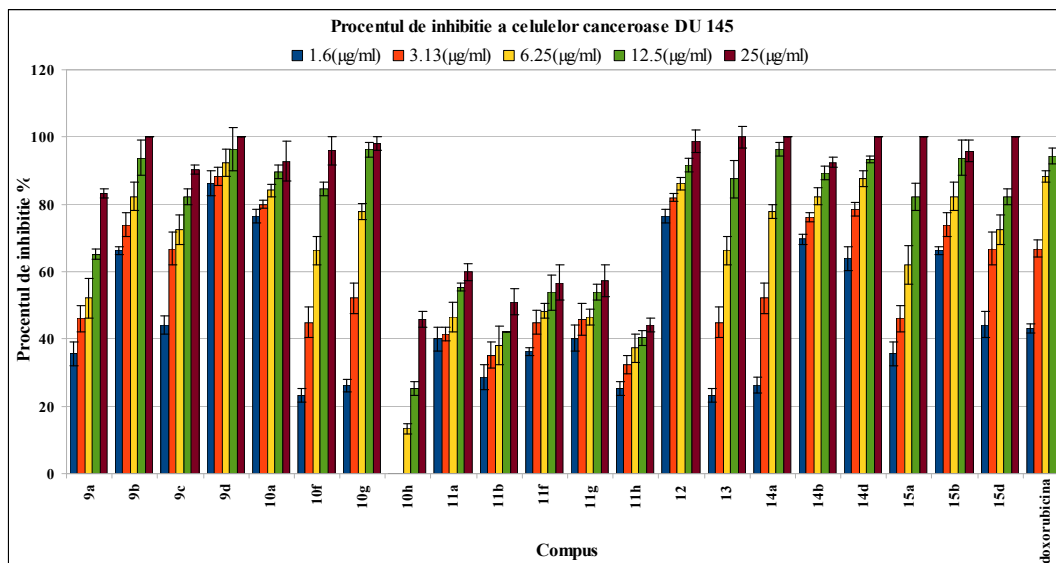


Figura 6.5 Efectul citotoxic al compușilor studiați pe tipul de celule DU145

Rezultatele studiului arată activitate antineoplazică comparabilă cu a doxorubicinei pentru compușii **9b**, **9d**, **10f**, **10g**, **13**, **14a**, **14d**, **15a** și **15d** atât pe celulele DU145 cât și HepG2, la concentrația de 25 µg/ml. Compusul **9b** are același procent de inhibiție pe ambele tipuri de celule dar, este mai activ pe celulele DU145 deoarece are IC₅₀ mai mic. Deoarece, compușii **9d**, **10g**, **13**, **14a**, **15a**, și **15d** prezintă IC₅₀ <1.6 micrograme/ml la fel ca doxorubicina putem spune că sunt compuși cu potențial antineoplazic.

7. FENOTIAZINIL-HIDRAZINO-TIAZOLI ȘI FENOTIAZINIL-HIDRAZINO-SELENAZOLI

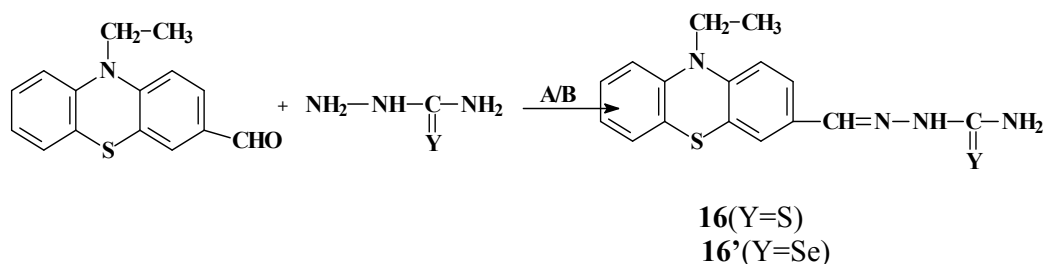
7.1 Sinteza fenotiazinil-hidrazino-tiazolilor/selenazolilor

Strategia aplicată pentru sinteza chimică a derivaților biheterociclici **17a-g** și **17'a-g** conținând nucleul tiazolic respectiv selenazolic și fenotiazinic în structura aceleiași molecule, este bazată pe două etape de reacție.

Prima etapă este condensarea 10-etil-10H-fenotiazin-3-carbalhidei cu tiosemicarbazida respectiv selenosemicarbazida cu formarea 1-(10-Etil-10H-fenotiazin-

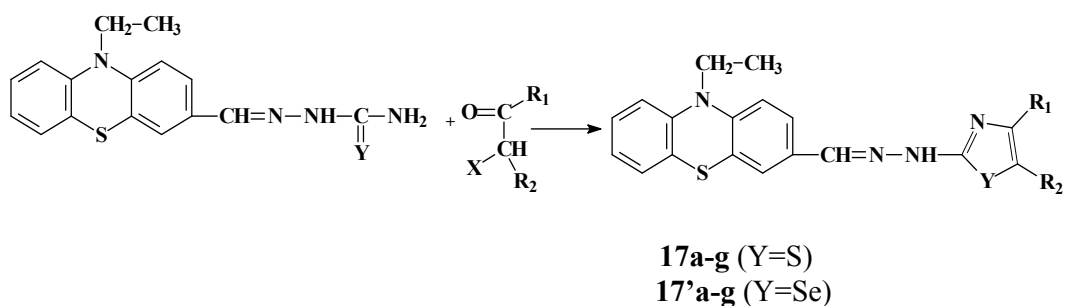
II.6 Contribuții personale-----

3-il)-metiliden-semicarbazidelor **16** și **16'** (Schema 7.1). Reacția are loc în etanol la reflux timp de 4 ore cu un randament de 52.3% (calea A).

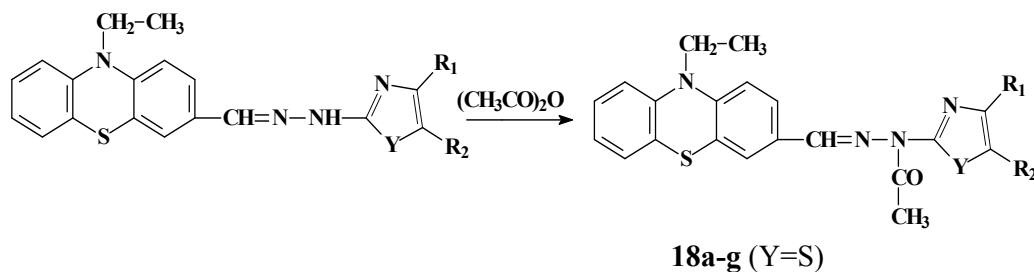


Schema 7.1 Condensarea 10-etil-10H-fenotiazin-3-carbaldehidei cu tiosemicarbazida respectiv selenosemicarbazida. Condițiile de reacție : A) etanol, ~80 °C, reflux; B) etanol sau amestec etanol-apă, ~100 °C, iradiere MW

În următoarea etapă, intermediarii 1-((10-etil-10H-fenotiazin-3-il)-metiliden)-tiosemicarbazida **16** și 1-((10-etil-10H-fenotiazin-3-il)-metiliden)-selenosemicarbazida **16'** au fost supuși sintezei nucleului tiazolic respectiv selenazolic prin reacția de condensare Hantzsch cu o serie de α -halogenocarbonili (monocloroacetona, 1,3-dicloroacetona, α -bromoacetofenona, 3-cloro-acetilacetona, esterul α -bromoacetilacetic, α -bromopiruvatul de etil și esterul γ -bromoacetilacetic), în urma căreia s-au obținut două seri de compuși noi **17a-g** și **17'a-g** (Schema 7.2). Ulterior compușii **17a-g** au fost transformați în acetilderivații **18a-g** sub acțiunea anhidridei acetice (Schema 7.3).



Schema 7.2 Condensarea Hantzsch cu formarea nucleului tiazolic și selenazolic



	a	b	c	d,	e	f	g
R₁	CH ₃	CH ₂ Cl	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₂ COOC ₂ H ₅	COOC ₂ H ₅
R₂	H	H	H	COCH ₃	COOC ₂ H ₅	H	H

Schema 7.3 Reacția de acetilare cu anhidridă acetică

Reacțiile de condensare au avut loc în mediu de acetonă : DMF (2:1) și au fost monitorizate prin CSS, utilizând ca eluent hexan:acetat de etil în diferite rapoarte prezentate în partea experimentală (Capitolul 9).

7.2 Sinteza în câmp de microunde a fenotiazinil-hidrazino-tiazolilor

Tehnica asistată de microunde are o largă aplicabilitate inclusiv în sinteza de heterocicluri cum ar fi nucleul fenotiazinic^{56, 57, 58} și tiazolic.^{59, 60}

Pentru a găsi condițiile optime de reacție, sinteza compușilor **16** și **16'** a fost efectuată atât clasic cât și prin tehnica asistată de încălzire cu microunde. Randamentele reacțiilor au fost diferite acestea depinzând de solvent, temperatură și de timpul de reacție. Rezultatele sunt prezentate în **tabelul 7.1**.

Randamentul cel mai bun pentru compusul **16** (peste 90%), s-a obținut la temperatura de 100°C, utilizând o putere de iradiere de 200 W, timp de 30 minute. Temperatura de 100°C este prea ridicată pentru compusul cu seleniu conducând la degradarea acestuia. Un randament bun (peste 80%) a compusul **16'** s-a obținut la

⁵⁶ S. V. Filip, I. A. Silberg, E. Surducan, M. Vlassa and V. Surducan, *Synth. Commun.*, **1998**, 28, 337.

⁵⁷ D. Porumb, C. Cristea, I. A. Silberg, *Studia UBB Ser. Chem*, **2002**, XLVII, 1-2, 45.

⁵⁸ M. Mayer, P. Lang, S. Gerber, P. Madrid, I. Pinto, R. Guy and T. James, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 993.

⁵⁹ L. Santosh, H. Shimizu, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 3314.

⁶⁰ D. Khrustalev, A. Suleimenova, S. Fazylov, A. Gazaliev, T. Zhivotova, *Izvestiya Natsional noi Akademii Nauk Respubliki Kazakhstan*, **2008**, 5, 18.

II.7 Contribuții personale-----

temperatura de 60°C în timp de 60 minute. Prin înlocuirea etanolului cu apa a condus la scăderea randamentului în cazul ambilor compuși.

Tabelul 7.1 Randamentele reacției în câmp de microunde

Nr.	Solvent	Timp (min.)	Temperatură (°C)	W	η (%) compus 16	η (%) compus 16'
1.	Etanol	30	100	200	95	-
2.	Etanol	20	100	200	65	-
3.	Etanol	10	100	200	48	-
4.	Etanol	30	80	200	61	21
5.	Etanol	60	60	200	52	86
6.	Etanol	30	60	200	39	61
7.	Etanol	10	60	200	20	23
8.	Etanol : Apă	30	100	200	51	-
9.	Etanol : Apă	30	60	200	32	41
10.	Apă	10	100	200	8	-
11	Apă	10	60	200	3	12

Derivații fenotiazinil-tiazolici **17a-g** au fost obținuți de asemenea prin iradiere cu microunde. Randamentele cele mai bune s-au obținut la temperatura de 60°C timp de 90 minute și sunt prezentate în **tabelul 7.2**.

Tabelul 7.2 Condițiile experimentale a reacției de condensare cu obținerea fenotiazinil-hidrazino-tiazolilor.

Compus	Temperatură (°C)	Timp (min)	Presiune (Bar)	Iradiere W	Randament (%)
17a	25 (classical)	1440	1	-	57
	60	90	1.7	100	98
17b	25 (classical)	1440	1	-	42
	60	90	1.7	100	92
17c	25 (classical)	1440	1	-	62
	60	90	1.7	100	99
17d	25 (classical)	1440	1	-	63
	60	90	1.7	100	89
17e	25 (classical)	1440	1	-	60
	60	90	1.7	100	91
17f	25 (classical)	1440	1	-	68
	60	90	1.7	100	94
17g	25 (classical)	1440	1	-	59
	60	90	1.7	100	91

II.7 Contribuții personale-----

Rezultatele acestui studiu arată o creștere a randamentului dacă reacția are loc în mediu de microunde și la o temperatură mai ridicată decât în reacția clasică. După 1.5 h de iradiere cu microunde cu puterea de iradiere de 200 W, la temperatura de 60°C, randamentele sunt superioare celor din reacția realizată în condiții clasice.

7.4. Studiul cinetic a reacției de condensare Hantzsch

S-a realizat studiul cinetic al reacției de condensare Hantzsch în care s-a urmărit influența solventului asupra vitezei de reacție. Am folosit o metodă lichid-cromatografică cuplată cu fluorescență pentru studiul cinetic și o metodă lichid-cromatografică cuplată cu spectrometrul de masă pentru identificarea produșilor de reacție.

În figurile de mai jos sunt reprezentate modificările concentrației reactantului **16** (forma logaritmică), în timp, în funcție de natura solventului.

Figura 7.4 Modificarea concentrației (10-etil-10H-fenotiazin-3-il-)metilideno-tiosemicarbazidei în reacția cu 2-bromoacetofenona

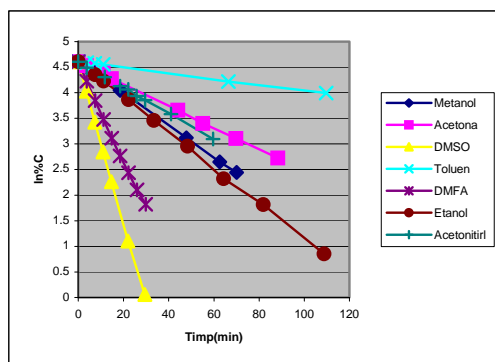


Figura 7.5 Modificarea concentrației (10-etil-10H-fenotiazin-3-il-)metilideno-tiosemicarbazidei în reacția cu 1,3-dicloroacetona

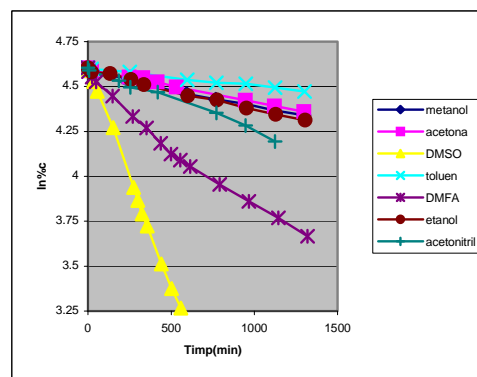


Figura 7.6 Modificarea concentrației (10-etil-10H-fenotiazin-3-il-)metilidentiosemicarbazidei în reacția cu 1-cloroacetona

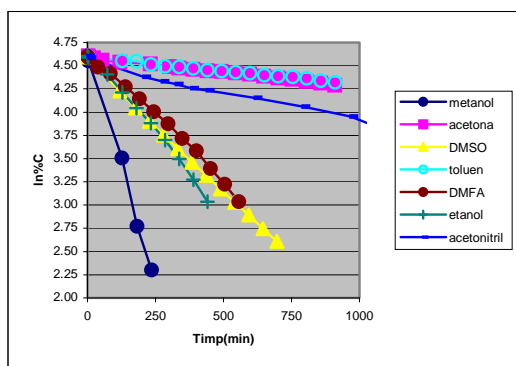
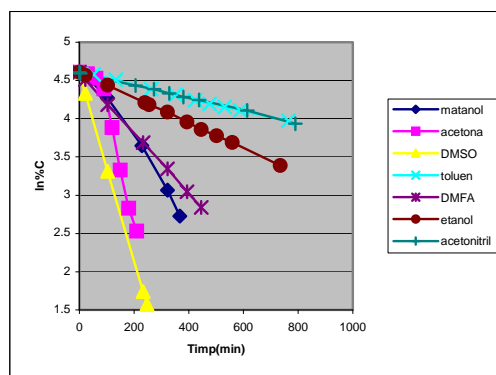


Figura 7.7 Modificarea concentrației (10-etil-10H-fenotiazin-3-il-)metilidentiosemicarbazidei în reacția cu 3-cloro-2,4-pentandiona



Din graficele de mai sus s-a determinat panta dreptelor și s-au calculat $t_{1/2}$ și $t_{99\%}$. Constanta dielectrică a solventului influențează mult viteza de reacție, în cazul unei reacții de substituție nucleofilă. Reacțiile desfășurate în solvenții cu constantă dielectrică mare, au vitezele cele mai mari. Astfel, viteza cea mai mare s-a înregistrat în DMSO, solvent care are cea mai mare constantă dielectrică dintre solvenții luați în studiu. Pe măsură ce scade constanta dielectrică a solvenților, scad și vitezele de reacție (excepție acetonitrilul, care deși are constantă dielectrică mare, determină o scădere a vitezei de reacție). În toluen care are o constantă dielectrică mică (2,38), reacțiile au avut loc cu viteză mică.

7.5. Activitatea antiproliferativă

Fenotiazinele sunt compuși heterociclici care prezintă numeroase aplicații terapeutice.^{61, 62} Acești compuși au fost investigați și pentru potențialul citotoxic, care s-a dovedit prin activitatea antiproliferativă pe celulele canceroase ovariene,⁶³ celulele

⁶¹ S. C. Mitchell. *Cur. Drug Targets.*, **2006**; 7 (9), 1181.

⁶² A. Mosnaim, V. Ranade, M. Wolf, M. Valenzuela, *Am. J. Ther.*, **2006**, 13 (3), 261.

II.7 Contribuții personale-----

canceroase cervicale umane,⁶⁴ limfom și celulele COLO 320.⁶⁵ Fenotiazinele au capacitatea de a induce apoptoza în liniile celulare neuroblastom, gliom⁶⁶ și fibroblaste pulmonare.⁶⁷ În plus, ele induc efecte antiproliferative asupra celulelor canceroase multi-rezistente^{68, 69} și prezintă un efect sinergic în asociere cu unele medicamente antineoplazice. Pe baza acestor date din literatură și considerații, am studiat activitatea biologică a unor noi derivați fenotiazinil-tiazolici.

În vederea evaluării efectelor antiproliferativ și antimitotic ale compușilor am folosit ca și sistem biologic culturi de celule tumorale umane HepG2 responsabile de hepatocarcinom și CC531S responsabile de tumoarea colorectală. Pentru studiul citotoxicității substanțelor studiate am folosit metoda colorimetrică MTT.

Principiul metodei este bazat pe clivarea inelelor de tetrazoliu formindu-se un precipitat cristalin de culoare albastru închis insolubile în apă, dar solubil în solvenți organici precum dimetilsulfoxid (DMSO), care nu trece prin membrana celulară și din această cauză se acumulează în celulele intacte. Doar celulele viabile pot converti tetrazoliul în formazan.

În vederea studierii efectului de inhibiție asupra proliferării celulare, am comparat valorile de absorbantă ale populațiilor de celule control, netratate, cu cele tratate. Cu ajutorul programului de biostatistică Graph Pad Prism 5 se calculează valorile IC₅₀-concentratia la care compusul inhibă cu 50% proliferarea celulelor vii, acest parametru matematic fiind determinant în studiul activității biologice a oricărui compus. Valorile IC₅₀ obținute pentru compușii **16-18g**, sunt prezentate în **figurile 7.8 și 7.9**.

⁶³ F. Barbieri, A. Alama, B. Tasso, V. Boido, C. Bruzzo, F. Sparatore. *Invest. New Drugs.*, **2003**, 21 (4), 413.

⁶⁴ V. Tandon, H. Maurya, A. Tripathi, G. Keshava, P. Shukla, P. Srivastava, D. Panda. *Eu.r J. Med. Chem.*, **2009**, 44 (3), 1086.

⁶⁵ B. Pajak, J. Molnar, A. Orzechowski. *COLO 320 cells. In Vivo*, **2005**, 19 (6), 1101.

⁶⁶ I. Gil-Ad, B. Shtauf, Y. Levkovitz, M. Dayag, E. Zeldich, A. Weizman, *J. Mol. Neurosci.*, **2004**, 22 (3), 189.

⁶⁷ P. Karmakar, A. Natarajan, R. Poddar, U. Dasgupta, *Toxicol. Lett.*, **2001**, 125 (1-3), 19.

⁶⁸ A. Bisi, M. Meli, S. Gobbi, A. Rampa, M. Tolomeo, L. Dusonchet, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16 (13), 6474.

⁶⁹ A. Kónya, A. Andor, P. Sátorhelyi, K. Németh, I. Kurucz. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 346 (1), 45.

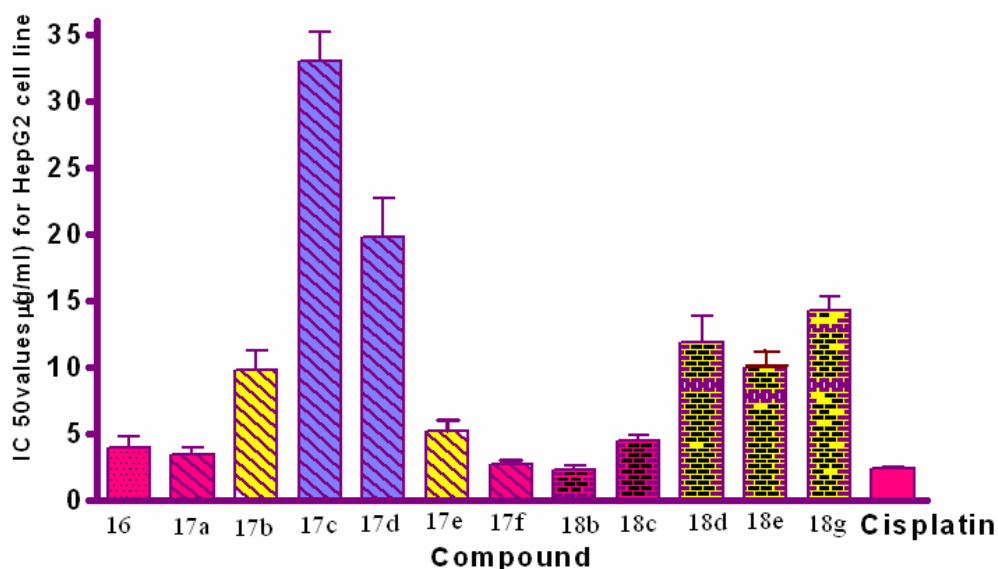


Figura 7.8 Activitatea biologică a compușilor **16-18g**, pe linia celulară HepG2 exprimată prin valorile IC₅₀

Creșterea celulelor tumorale hepatice HepG2 este inhibată de toți cei 12 compuși luați în studiu (**Figura 7.24**). S-a comparat proliferarea celulelor tratate cu derivații de fenotiazină cu celulele tumorale tratate cu cisplatin (substanță etalon). Ca valoare de referință s-a determinat IC₅₀ cisplatinului, un medicament chimioterapic folosit în mod obișnuit, care a demonstrat eficacitate în inhibarea celulelor tumorale, și este dovedit a fi activ împotriva celulelor tumorale HepG2 și CC531S. Cu ajutorul programului de biostatistică GraphPad Prism am efectuat statistica tip coloane. Testul de comparare T pe eșantioane corelate ne-a arătat o inhibiție semnificativă a creșterii celulare (95% discrepanță, valoare de corelare tip pereche $P < 0.0395$ pentru toți compușii). Analiza dispersională ANOVA unifactorială a variației și testul Dunnett de comparare multiplă indică faptul că activitatea compușilor **16**, **17a**, **17e**, **17f**, **18b** și **18c** este comparabil cu activitatea cisplatinului în timp ce activitatea **17b**, **17c**, **17d**, **18d**, **18e** și **18g** este semnificativ mai slabă decât citotoxicitatea cisplatinului ($P < 0.05$, valoarea P deosebit de semnificativă).

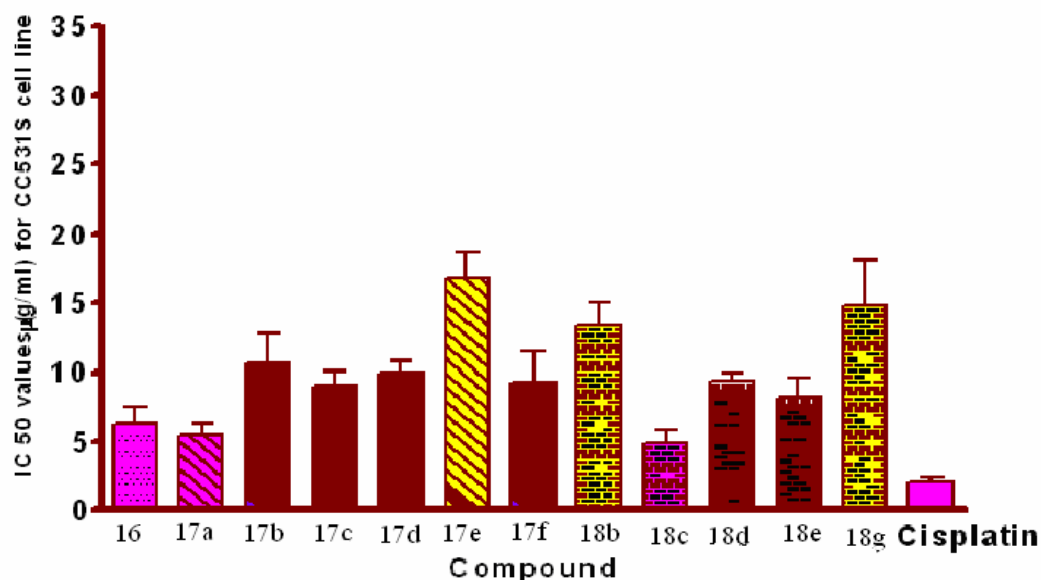


Figura 7.9 Activitatea derivaților de fenotiazină cuantificată prin valoarea IC50 pentru linia celulară CC531S

Proliferarea celulelor de carcinom de colon CC531S a fost inhibată de fenotiazinele **16-18g** (**Figura 7.9**). Conform analizei ANOVA și testului T de comparare pe eșantioane dependente, citotoxicitatea compușilor studiați crește semnificativ în comparație cu celulele netratate, în toate cazurile (interval de probabilitate 95% , valoare P unifactorială mai mică sau egală cu 0.043). Efectul biologic al compușilor **16**, **17a** și **18c** este similar cu cisplatinul, în timp ce activitatea celorlalte substanțe prezintă diferențe semnificative față de acest medicament de referință (pentru $P < 0.05$). În cadrul acestui grup, putem distinge două categorii: citotoxicitatea **17c**, **18d**, **17f** și **17d** diferă ușor de activitatea medicamentului chimioterapeutic (testul de comparare multiplă Dunnett, sumarul valorii P semnificativă), în timp ce **17b**, **18b**, **17e** și **18g** au o activitate semnificativ mai slabă (rezumat P extrem de semnificativ).

Am analizat activitatea biologică a derivaților fenotiazinil-tiazolici neacetilați (**17a**, **17b**, **17c**, **17d**, **17e**, **17f**) și derivaților acetilați (**18b**, **18c**, **18d**, **18e**, **18g**). Citotoxicitatea compușilor **17b** și **18b** asupra liniei celulare HepG2 diferă semnificativ între ele (testul de corelare a perechilor Wilcoxon indică valoarea P biparametrică egală cu 0,0074). Diferența dintre **17c** și **18c** este foarte semnificativă ($P=0,0002$), în

II.7 Contribuții personale-----

perechea **17e-18e** este o diferență semnificativă ale valorilor IC₅₀ (P=0,0105), în timp ce între activitățile **17d** și **18d** nu este o divergență semnificativă. Prezența grupării acetil are drept consecință scăderea valorii IC₅₀ a compușilor, exceptând pe **18e**, care are o valoare IC₅₀ mai mare.

Cele două serii de compuși -acetilați (**18b**, **18c**, **18d**, **18e**, **18g**), respectiv analogii neacetilați (**17a**, **17b**, **17c**, **17d**, **17e**)- au fost analizate cu statistica grupată. Testul ANOVA biparametric indică faptul că valorile IC₅₀ corespunzătoare substanțelor neacetilate sunt semnificativ mai mari la tratamentul celulelor HepG2 hepatice (testul Bonferroni, P<0.01), în timp ce la celulele CC531S diferențele dintre serii sunt irelevante (p>0.05).

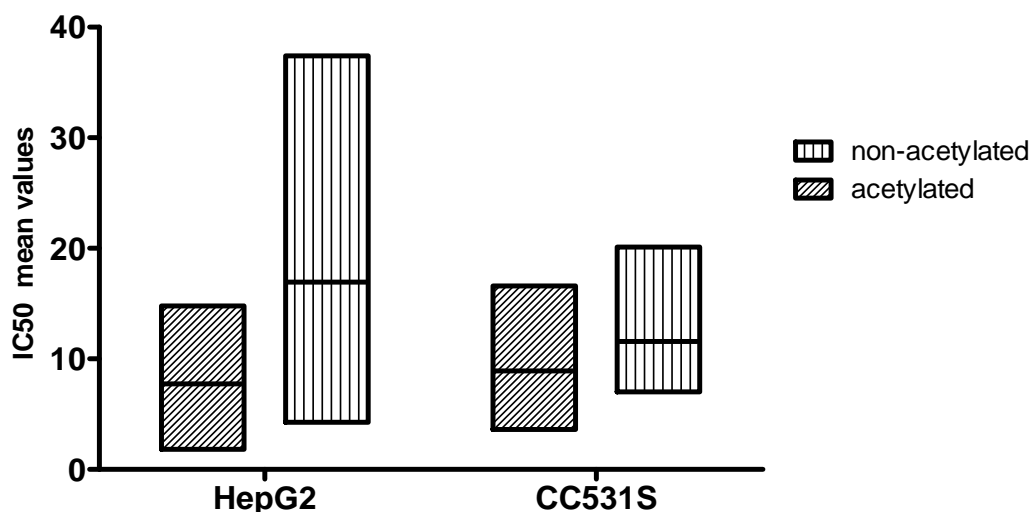


Figura 7.10 Comparația între efectul atiproliferativ a fenotiazinil-tiazolilor acetilate și neacetilate pe liniile celulare HepG2 și CC531S.

În ceea ce privește compusul **17a**, are ca substituenți doar gruparea metil în moleculă (grupare hidrofobă) și prezintă un efect antiproliferativ ridicat la ambele linii celulare. Am studiat proprietățile antitumorale a patru molecule cu grupări esterice în moleculă (**17e**, **18e**, **17f** și **18g**). În acest grup, **17f** are o activitate mai importantă asupra ambelor linii celulare, în timp ce **18f** și **18g** care au în plus gruparea acetil (crește caracterul hidrofil a moleculei) duce la o scădere a activității lor.

1. CONCLUZII GENERALE

➤ Lucrarea prezintă sinteza a 73 de compuși, dintre care 68 sunt compuși noi:

Au fost sintetizați:

- 13 compuși (**1**, **2a-f**, **3a-f**) din clasa hidrazinotiazolilor, din care 12 noi;
 - 5 compuși (**4-8**) din clasa hidrazino-bis-tiazolilor, din care 4 noi;
 - 32 compuși (**9a-f**, **10a-h**, **11a-h**, **12**, **13**, **14a-d**, **15a-d**) din clasa hidrazinoselenazolilor din care 30 sunt noi;
 - 15 compuși (**16**, **17a-g**, **18a-g**) din clasa fenotiazinil-hidrazino-tiazolilor din care 14 sunt noi;
 - 8 compuși (**16'**, **17'a-g**) din clasa și fenotiazinil-hidrazino-selenazolilor, toți fiind compuși noi;
- Reacția de condensare Hantzsch realizată în câmp de microunde prezintă un avantaj major prin scurtarea timpului de reacție și o creștere a randamentului.
- Caracterizarea structurală completă a compușilor sintetizați s-a realizat prin:
- RMN de înaltă rezoluție (300, 400MHz) spectre 1D: (¹H-RMN, ¹³C-RMN) și 2D: [(¹H-¹H) COSY, (¹H-¹³C) HMQC și (¹H-¹³C) HMBC].
 - Spectrometrie de masă (EI)
 - Spectroscopie IR
 - Analiză elementală
- Pe baza studiului cinetic s-a dovedit că reacția de condensare Hantzsch cu formarea nucleului tiazolic are loc cu viteză mai mare în solvenți aprotici, polari cu constantă dielectrică mare .
- Activitate antiinflamatoare de scurtă durată s-a observat în cazul compușilor **2a**, **2b**, **2f**, **3b**, **3c**, **3e** și **3f**. Compusul **2a** prezintă un potențial antiinflamator de lungă durată chiar mai bun decât fenilbutazona.
- Un profil analgezic asemănător cu a heroinei s-a întâlnit la compușii **3b** și **2f**.
- Activitate antiproliferativă comparabilă cu a doxorubicinei s-a întâlnit la compușii **9b**, **9f**, **9d**, **10g** și **10f** atât pe celulele DU-145 cât și HepG2, la concentrația de 25 μg/ml.

II.8 Concluzii generale-----

- Activitate antimicrobiană bună s-a obținut pe tulpinele de *Staphylococcus aureus* MSSA 25213 și *Staphylococcus aureus* MRSA 43300 de către compușii **9a, 9b, 9c** și **10e**. Activitatea dispare la selenazoli, deci introducerea seleniului în ciclu nu este favorabilă.
- Compușii **16, 17a, 17e, 17f, 18b** și **18c** prezintă activitate antiproliferativă asemănătoare cu a cisplatinului pe linia celulară HepG2.
- Potențial antiproliferativ comparabil cu a cisplatinului, la concentrații similare, pe ambele linii celulare prezintă compușii **16, 17a** și **18c**.