
SUMMARY OF THE PhD THESIS

Contributions to the synthesis and biological activity evaluation of some new Thiazolidine-4-ones and Thiadiazolines

PhD Student **Ioana Andrada Ionuț**

Scientific supervisor **Prof. Ovidiu Oniga, PhD**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
LITERATURE REVIEW	
1. Synthesis and biological activities of Thiazolidine-4-ones	19
1.1. Chemistry of thiazolidine-4-ones	20
1.2. Synthesis methods of thiazolidine-4-one derivatives	20
1.3. Biological activities of 4-thiazolidinone derivatives	26
1.3.1. Antimicrobial activity	26
1.3.2. Antitumour activity	30
1.3.3. Anti-hyperglycemic activity	32
1.3.4. Anti-HIV activity	33
1.3.5. Antioxidant activity	34
1.3.6. Anti-inflammatory activity	35
1.3.7. Other activities	36
2. Synthesis and biological activities of Thiadiazolines	37
2.1. Chemistry of thiadiazolines	37
2.2. Synthesis methods of thiadiazoline derivatives	38
2.2.1. Cyclization of thiosemicarbazones	38
2.2.2. Cyclization of thiourea derivatives	40
2.2.3. Cyclization of hydrazides	40
2.2.4. Cyclization of dithiocarbazate derivatives	40
2.3. Biological activities of thiadiazolines	41
2.3.1. Antimicrobial activity	41
2.3.2. Antitumour activity	43
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Hypothesis/Aims	47
2. General Methodology	51

3. Study 1. Synthesis, phisico-chemical, spectral characterization and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of some new thiazolyl-thiazolidine-4-ones	53
3.1. Introduction	53
3.2. Hypothesis/aims	54
3.3. Materials and methods	55
3.3.1. Chemical synthesis, phisycy-chemical and spectral characterization	55
3.3.2. Antimicrobial activity evaluation	58
3.3.3. <i>In vitro</i> antioxidant potential evaluation	58
3.4. Results and Discussions	61
3.4.1. Chemical synthesis, phisycy-chemical and spectral characterization	61
3.4.2. Antimicrobial activity evaluation	68
3.4.3. Antioxidant activity	70
3.5. Conclusions	74
4. Study 2. Synthesis and <i>in vitro</i> anticancer activity of some new chromenyl-thiadiazolines	75
4.1. Introduction	75
4.2. Hypothesis/aims	76
4.3. Materials and methods	77
4.3.1. Chemical synthesis, phisycy-chemical and spectral characterization	77
4.3.2. <i>In vitro</i> antitumour potential evaluation	78
4.4. Results and Discussions	79
4.4.1. Chemical synthesis, phisycy-chemical and spectral characterization	79
4.4.2. <i>In vitro</i> antitumour potential evaluation	91
4.5. Conclusions	94
5. Study 3. Synthesis, antimicrobial activity and lipophilicity of some <i>N</i>¹-arylidene-thiosemicarbazones and 1,3,4-thiadiazolines	97
5.1. Introduction	97
5.2. Hypothesis/aims	99
5.3. Materials and methods	100
5.3.1. Chemical synthesis, phisycy-chemical and spectral characterization	100
5.3.2. Antimicrobial activity evaluation	102
5.3.3. Lipophilicity evaluation	103
5.4. Results and Discussions	105
5.4.1. Chemical synthesis, phisycy-chemical and spectral characterization	105
5.4.2. Antimicrobial activity evaluation	111

5.4.3. Lipophilicity evaluation	113
5.5. Conclusions	121
6. General conclusions	123
7. Originality and innovative contributions of the thesis	127
REFERENCES	129

Key words: chemical synthesis, antibacterial, antifungal, antioxidant, ascorbate-peroxidase, antitumour, videomicroscopy, apoptosis, lipophilicity, chromatography, principal component analysis.

Introduction

Nowadays, people confront, among other diseases, the problem of high morbidity and mortality caused by infections and cancer.

Concerning the therapy of bacterial infections, microorganisms resistance to antibiotics remains a serious problem of public health, the development of this phenomenon becoming a challenge for the medicine of our days. Despite the progress in the antibiotic research field, bacterial infections have remained a major threat to life, statistical data showing that every year, over the world, more than 20 million people die because of infectious diseases. Among the causes of high mortality through bacterial infections, the first one is represented by the gradual decrease of the initial efficacy of many antibiotics. A similar phenomenon, even if the small-scale, is found in fungal infections, in immunocompetent patients but especially in those immunocompromised, where there was an increase of the antifungal resistance, especially to antimycotic azoles.

In this century, the development of new active molecules against resistant bacteria and fungal strains represents a priority of research. One of the reasons is the significant decrease of pharmaceutical companies interest in the development of new antibiotics, as a consequence of the high costs implied in this kind of research and the lower rate of their recovering compared to the investments realised in the field of new chronic diseases drug discovery (cancer, cardio-vascular disease, osteoporosis, etc). Moreover, the antimicrobials authorized in the last decades are not more than new representatives of some older antibiotic families, to whom bacterial resistance develops rapidly, through the same mechanisms as to the other representatives of the class. In 2004, Infectious Diseases Society of America launched a program named Bad Bugs Need Drugs, proposing solutions for the discovery of new „leader” (pipeline) molecules, with antibacterial activity against "problematic" strains. One of the proposed solutions is to support small teams of researchers from universities or research centers outside of pharmaceutical companies. One of the priority directions in

medicinal chemistry research is thus a prototype molecule identification (leader), which should belong to new structural models and should inhibit one or more newly discovered bacterial targets, trying to avoid the phenomenon of acquired resistance to classical structural models. An example of this is the oxazolidinone class, the newest family of synthetic antibiotics.

On the other hand, the discovery of new anticancer agents, with direct cytotoxic activity, which modifies the cell signal disturbed in cancer, induces apoptosis, inhibit histones desacetylation, the protein kinase C, the proteasome, etc., is a priority of the global research.

In the presented context, the main objectives of the research contained in the present thesis consists in the discovery of new structural models of molecules with antibacterial, antifungal and antitumour activity. Some of the synthesized compounds were also tested for their antioxidant potential, given that the capture of free oxygen species plays a major role in chemoprevention of some sicknesses such as cancer or cardiovascular disease. The synthesized compounds belong to two structural models - thiazolidin-4-one and thiadiazoline respectively - the literature presenting a lot of reports about their antimicrobial and anticancer potential. The development of these molecules was performed by organic chemical synthesis, followed by the subsequent identification of pharmacophore fragments and the determination of the relationship between the chemical structures of the synthesized compounds, their lipophilic character and biological activity. This research was conducted as part of multidisciplinary collaborations with specialists in structural analysis, microbiology and oncology.

Study 1. Synthesis, physico-chemical, spectral characterization and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of some new thiazolyl-thiazolidine-4-ones

Introduction

The continuous increase of the bacterial resistance to many classes of chemotherapeutics constitutes a problem that seriously affects human health.

The main "problematic" strains are: methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VRE), penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRP), ampicillin resistant *Haemophilus influenzae*, sulfonamide resistant *Neisseria meningitidis*, ampicillin resistant *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Mycobacterium tuberculosis*.

Another problem that a lot of researchers deal with is that of oxidative stress and its negative effects to the human body.

As a consequence to those presented above, it is absolutely necessary to project alternative compounds, capable to act with novel mechanisms.

In the past two decades it has been noticed an increasing interest for thiazole and thiazolidinone derivatives synthesis, a lot of studies proving their important biological potential.

Substituted thiazolidine-4-ones have been previously studied in microbial infections, diabetes, epilepsy, allergies, schizophrenia, hypertension, and, recently, in the treatment of pain. Moreover, the *in vitro* antioxidant potential of these compounds has been proven and also that these derivatives represent a promising alternative in the treatment of AIDS, Alzheimer disease, B hepatitis and different types of cancer.

Also, a large number of substituted thiazole derivatives show significant activity against a variety of microbial strains, attracting a growing interest in the development of pharmacologically active compounds.

Hypothesis/aims

Based on the proven biological activity of thiazolidine-4-one compounds and due to the increased interest in the chemistry of thiazole, we proposed the synthesis of some new thiazolyl-thiazolidine-4-one derivatives, bringing together in the same molecule these two heterocycles by the "molecular hybridization" method, in order to obtain less toxic antimicrobials and antioxidants, with enhanced effects.

Materials și metode

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization

The synthesis of the thiazolidine-4-one derivatives is based on a condensation reaction between the *N*⁴-substituted thiosemicarbazones and chloroacetic acid, in glacial acetic acid medium in the presence of anhydrous sodium acetate as a catalyst. The intermediate thiosemicarbazone derivatives were synthesized by refluxing 5-acetyl-thiazoles with *N*⁴-substituted- thiosemicarbazides, in absolute alcohol medium, using concentrated sulfuric acid as a catalyst. The derivatives of 5-acetyl-thiazole were synthesized through a Hantzsch condensation reaction of the corresponding thioamides with 3-chloroacetylacetone in an alcoholic medium. *N*⁴-substituted thiosemicarbazide derivatives (phenyl, methyl, allyl, 3-trifluoromethyl-phenyl, 4-methoxy-phenyl) were obtained in good yields (> 90%) by the addition of hydrazine hydrate to corresponding isothiocyanates, by stirring for 3 hours at room temperature in absolute ethanol.

The purity of the compounds was confirmed by TLC, each being characterized by melting point, quantitative elemental analysis and spectroscopic data (¹H NMR, MS).

Antimicrobial activity evaluation

Twenty-four compounds (thiosemicarbazone and thiazolidine-4-one derivatives) were tested *in vitro* for their antimicrobial activities. The study was performed on four standard bacteria strains (*S. aureus* ATCC 49444, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 13932) and one fungal strain (*Candida albicans* ATCC 10231), using the difusimetric technique. The results obtained were compared with those of Ciprofloxacin and Fluconazole as reference antimicrobials.

***In vitro* antioxidant potential evaluation**

The antioxidant capacities of the 12 newly synthesized thiazolyl-thiazolidine-4-one derivatives were evaluated by the well known ABTS assay, which implies a simple organic system based on the ability of an antioxidant to quench the ABTS^{•+} radical, and by two relevant physiological reactions of hemoglobin - the autooxidation rate and the ascorbate peroxidase activity.

Results and Discussions

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization

Twenty-four compounds, with new structures, have been synthesized in good yields. The purity of the newly obtained compounds was checked by thin layer chromatography. Quantitative elemental analysis (C, H, N and S) and spectral data (MS, ¹H NMR) confirmed their structures.

Antimicrobial activity evaluation

All the compounds showed good to very good antibacterial effects, the size of the zone of inhibition ranging between 8 and 22 mm (50 µg compound/well); against Gram positive bacteria some of them proved to be more potent than reference Ciprofloxacin.

Concerning the antifungal activity, the results obtained were even better than those obtained through the antibacterial assay, the size of the zone of inhibition ranging between 14 and 32 mm (50 µg compound/well). Five of the newly synthesized compounds were more active against *C. albicans* than reference Fluconazole.

Preliminary study of the structure-activity relationship revealed that cyclization of thiosemicarbazones to 4-thiazolidinones did not have a major effect on the antibacterial activity, but it did decrease the antifungal potency.

***In vitro* antioxidant potential evaluation**

Four compounds had the ability to quench the ABTS^{•+} radical, the antioxidant effects observed for two of them appearing to be well correlated with their capacities

to inhibit the autooxidation rate of hemoglobin. Also, one thiazolidinone proved to be an inhibitor of the autooxidation rate of hemoglobin, while other two demonstrated slight prooxidant effects upon this reaction.

The positive values obtained for two of the compounds in the ascorbate peroxidase activity of hemoglobin assay also suggested antioxidant effects, while the negative values obtained, more obviously for five derivatives, suggested prooxidant effects.

The UV-VIS changes in the spectra of four chromenyl-thiadiazolines indicated that these compounds may constitute substrates for peroxidase.

Conclusions

✓ A total of 24 derivatives of N^1 -substituted-thiosemicarbazone and N^3 -substituted-4-thiazolidinone were synthesized.

✓ Quantitative elemental analysis (C, H, N, S) and spectral studies (MS, ^1H NMR) confirmed the structures of the obtained compounds.

✓ The *in vitro* antimicrobial activities of the 24 new compounds were assessed against bacteria and fungal strains using the difusimetric method. Ciprofloxacin and Fluconazole were used as reference drugs. The tested compounds showed good to very good activities against Gram-positive bacteria, and modest activities against Gram-negative strains. The majority of the studied compounds had good to very good antifungal activities against *Candida albicans*. Structure-activity relationship analysis revealed that cyclization of the studied thiazolyl-thiosemicarbazones to 4-thiazolidinone derivatives did not have a major effect on the antibacterial activity, but it decreased the antifungal potential.

✓ 12 thiazolyl-thiazolidine-4-one derivatives were investigated for their antioxidant capacities by three *in vitro* tests: the ABTS assay, autooxidation rate and ascorbate peroxidase activity of hemoglobin. Three compounds proved to be good inhibitors of the autooxidation rate of hemoglobin (antioxidant effect), while other two of them had prooxidant effects. In the ascorbate peroxidase assay two thiadiazoline derivatives showed antioxidant effects, while four of them were prooxidants.

Study 2. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of some new chromenyl-thiadiazolines

Introduction

Malignant tumours represent one of the most serious threats against human health in the world, and the clinical prognosis remains relatively poor. In 2008, cancer accounted for approximately 7.5 million deaths worldwide, and the number of cases is

expected to increase by more than 45% in the next 20 years. Genotoxic agents have long targeted apoptotic cell death as a primary means of treating cancer. However, the presence of cellular defects in many cancers has contributed to an acquired resistance to apoptotic cell death, thus lowering the effectiveness of chemo- and radiotherapies.

Molecules containing nitrogen- and sulphur-related heterocycles (thiazole, thiazolidine, thiazolinone, thiadiazoline) are considered important pharmacophores as they can possess interesting biological activities. For example, thiadiazolines have antihelmintic, antihypertensive, anticancer, anti-inflammatory, antibacterial, analgesic, and tyrosinase inhibitory activities.

Thiazolinones display hypoglycaemic, antibacterial, antifungal, antituberculous, anti-HIV and also antitumoural activities.

Chromones are a group of naturally occurring compounds that are ubiquitous, especially in plants. In addition to forming the basic nucleus of an entire class of natural products, the flavones, the chromone moiety forms an important component of the pharmacophores found in many molecules with medicinal significance: tyrosine and protein kinase C inhibitors, antifungal, antiallergenic, antiviral, antitubulin, antihypertensive, and anticancer agents. Consequently, considerable attention is being devoted to the isolation of these compounds from natural resources and partial versus complete syntheses of chromone derivatives as well as to the evaluation of their biologic activity. Therefore, particular attention is given to the isolation of these compounds from natural resources and to the partial or total synthesis of chromone derivatives, and also to the evaluation of their biological activity.

Hypothesis/aims

Knowing the biological potential of chromone derivatives and considering thiadiazolines proven biological activity, we intend to obtain a series of compounds whose structures bring constantly together these two heterocycles. By bringing them into the same molecule, our aim was to obtain compounds with original chemical structure (chromonyl-thiadiazolines), in order to combine the two heterocycles pharmacophore potential, or to bring new biological properties.

Materials și metode

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization

The derivatives of chromenyl-4,5-dihydrothiadiazoles were prepared by reacting the obtained chromenyl-thiosemicarbazones with the cyclisation agent acetic anhydride in the presence of small quantities of pyridine as a catalyst. The intermediate thiosemicarbazones were obtained by a simple condensation between the 3-formyl-chromones and *N*⁴-substituted thiosemicarbazides in absolute ethanol using concentrated sulphuric acid as catalyst. The *N*⁴-substituted phenyl, methyl, allyl, 3-trifluoro-methyl-phenyl, and 4-methoxy-phenyl thiosemicarbazides were obtained

in good yields (>90%) by the addition of hydrazine hydrate to phenylisothiocyanate, methylisothiocyanate, allylisothiocyanate, 3-trifluoro-methylphenyl-isothiocyanate and 4-methoxyphenyl-isothiocyanate, respectively, with stirring in absolute ethanol at room temperature for 3 h.

The purity of the compounds was confirmed by TLC, and all new compounds were characterized by melting point, elemental analysis and spectroscopic data (^1H NMR, ^{13}C NMR, MS).

***In vitro* antitumour potential evaluation**

12 final compounds were evaluated for their *in vitro* growth inhibitory activities. They were tested on seven human cancer cell lines (associated or not to various levels of resistance to pro-apoptotic stimuli) using the MTT colorimetric assay. For the most active compounds quantitative videomicroscopy analyses were then carried out to determine whether the growth inhibitory activity of a given compound was due to cytotoxic or cytostatic effects.

Results and Discussions

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization

Twenty-four compounds, with new structures, have been synthesized in good yields. The purity of the newly obtained compounds was checked by thin layer chromatography. Quantitative elemental analysis (C, H, N and S) and spectral data (MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR) confirmed their structures.

***In vitro* antitumour potential evaluation**

The data obtained show that the most potent compounds displayed an *in vitro* IC_{50} ranging between 12 and 35 μM , while the remaining chromenyl-thiadiazolines in the study displayed weak or no (> 100 μM) *in vitro* growth inhibition activity. In fact, 7 of the 12 compounds in the study displayed an antiproliferative activity of < 100 μM against all cancer cell lines that were analysed.

Structure Activity Relationship (SAR) analysis indicate that the substitution of the exocyclic amine with a substituted-phenyl moiety increased the *in vitro* growth inhibition of cancer cells, 3-trifluoromethyl-phenyl-derivatives displaying the highest growth inhibition activity.

So, it seems that the presence of fluorine atoms induces positive influences on the antiproliferative activity of these compounds against cancer cells.

The data obtained further reveal that the most potent compounds display similar growth inhibition effects in cancer cells independently of whether these cells are associated or not associated to various levels of resistance to pro-apoptotic stimuli.

Three compounds were further assayed by means of quantitative videomicroscopy. Two of them induced morphological cytostatic effects in the human MCF-7 breast cancer and T98G glioblastoma cell lines, while the third one induced morphological cytotoxic effects in both the human MCF-7 breast cancer and the T98G glioblastoma cell lines.

Conclusions

✓ Several types of metastatic cancers and primary cancers that have not yet metastasized by the time of initial diagnosis, including gliomas, melanomas, oesophageal cancers, pancreatic cancers, and NSCLCs, resist conventional chemotherapy and radiotherapy because these treatments induce pro-apoptotic factors in cancer cells, while the above-mentioned cancer types display various levels of resistance to pro-apoptotic stimuli.

✓ A total of 24 derivatives of chromenyl-thiosemicarbazone and chromenyl-1,3,4-thiadiazoline were synthesized. Quantitative elemental analysis (C, H, N, S) and spectral studies (MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR) confirmed the structures of the obtained compounds.

✓ All 12 chromenyl-thiadiazolines were screened for their *in vitro* antiproliferative activities, using the colorimetric MTT method, towards seven types of cancer cell lines, with different levels of resistance to pro-apoptotic stimuli.

✓ The current study demonstrates that thiadiazoline derivatives, such as the 3-trifluoromethyl-phenyl-derivative, are able to overcome cancer cell resistance to pro-apoptotic stimuli because these compounds display *in vitro* growth inhibition activity in both cancer cell lines that are sensitive to pro-apoptotic stimuli and those that are resistant to pro-apoptotic stimuli.

✓ Therefore, 3-trifluoromethyl-phenyl-derivatives deserve further investigation as potential anticancer drugs.

Study 3. Synthesis, antimicrobial activity and lipophilicity of some N^1 -arylidene-thiosemicarbazones and 1,3,4-thiadiazolines

Introduction

The emergence of bacterial resistance to different classes of antibacterial agents, such as β -lactams, quinolones, and macrolides is an alarming problem that seriously affects human health. To combat this situation, numerous efforts have been made in the development of new approaches to treat bacterial infections, particularly for therapeutics with novel mechanism of action and little or no cross-resistance. As a result, new antibacterial agents against multi-drug resistant strains have become the center of attention in this highlighted research field.

According to the literature thiosemicarbazone compounds have a wide range of biological activities, such as antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, antiparasitic and tuberculostatic.

In recent years, there has been a growing interest pertaining to the synthesis of bioactive compounds in the field of organic chemistry. Among the family of heterocyclic compounds, nitrogen containing heterocycles, especially azoles compounds, gain considerable importance owing to their varied biological properties such as antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antihypertensive, anti-HIV, antitumor, anticonvulsant, herbicidal, insecticidal, antiprotozoal. Furthermore, synthesis of novel chemical entities, which are still in resemblance with bioactive molecules by virtue of the presence of some critical structural features, is an essential direction of the research for new leads in drug designing programs.

In the recent decades, the synthesis of substituted thiadiazolines and related compounds has attracted considerable attention because these compounds show a wide range of pharmaceutical and industrial importance. Thiadiazolines possess a various biological properties and they act as antibacterial, anti-inflammatory, anticancer, antihypertensive, analgesic and fungicidal. Thus the thiadiazoline nucleus has attracted much interest in the development of pharmacologically active compounds.

Some physico-chemical properties of biologically active compounds, such as solubility, stability, lipophilicity, the acid-base character, must be determined in the early stage of drug development. Of these properties, lipophilicity is of great importance because it influences the basic steps of a drug pharmacokinetics and pharmacodynamics: absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity.

The absorption of substances from the site of administration to the site of action involves transporting them through various biomembranes, such as skin, cornea, intestinal mucosa, blood-brain barrier (BBB) and placenta. In general, all these biomembranes are lipid bilayers containing phospholipids, cholesterol, and integral proteins. Most molecules cross cell membranes by passive diffusion, their lipophilic character having a decisive impact on this process: the substance should be sufficiently lipophilic to diffuse through biological membranes, but also water soluble in order to be able to penetrate into the cytoplasm.

The biological activity of the molecules may be linked to their lipophilic character by means of some quantitative parameters. These parameters are known as the lipophilicity evaluation parameters and they include those values (calculated by means of theoretical methods or determined experimentally) that give the interaction between the cell membranes and the molecules of biological interest.

Hypothesis/aims

Since the thiadiazoline moiety seems to be a possible pharmacophore in various pharmacologically active agents, we decided to synthesize compounds with this

functionality as possible antimicrobial agents which could furnish better therapeutic results.

As mentioned before, the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of compounds is closely related to their lipophilicity, because in order to manifest an action, they must cross a series of biological barriers. Based on these considerations, we aimed to determine the lipophilicity of the synthesized compounds by using reverse phase liquid chromatography (RP-TLC) and the method of principal components analysis (PCA) and to correlate the obtained retention parameters with the chemical structures and the *in vitro* antimicrobial activities of the molecules in order to establish structure-retention (QSRR) and retention-biological activity relationships (QRAR).

Materials și metode

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization

*N*¹-arylidene-thiosemicarbazones were obtained via a simple condensation between substituted aromatic/heteroaromatic aldehydes or substituted acetophenones and *N*⁴-substituted thiosemicarbazides, in absolute ethanol, using concentrated sulphuric acid as catalyst. *N*⁴-substituted thiosemicarbazides (phenyl and methyl) were synthesized, with good yields, through the addition reaction of hydrazine hydrate to phenylisothiocyanate and methylisothiocyanate respectively, by stirring in absolute ethanol, at room temperature, for 3 hours.

The derivatives of 4,5-dihydro-1,3,4-thiadiazoles were prepared by reacting the thiosemicarbazones with acetic anhydride, as cyclization reagent, in presence of small quantities of pyridine as catalyst. An objective of this research was to evaluate the influence that different substituents on the phenyl ring and the presence of a thiazole heterocycle inserted between a phenyl ring and the thiadiazoline moiety may have on the antimicrobial activity.

The purity of the compounds was confirmed by TLC, and all new compounds were characterized by melting point, elemental analysis and spectroscopic data (¹H NMR, ¹³C NMR, MS).

Antimicrobial activity evaluation

Twenty compounds were screened *in vitro* for their antimicrobial activities against six strains of bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC 49444, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E.coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, and one strain of fungi *Candida albicans* ATCC 10231 by the agar diffusion technique. Some of the compounds that were active against *Candida albicans* were tested against other three strains of fungi *Candida krusei* ATCC 6285, *Candida glabrata* ATCC, *Candida tropicalis* ATCC. 2 mg/mL solutions in DMSO were used (100 µg compound/well). The obtained results

were compared with those of Gentamicin as antibacterial, and Fluconazole as antifungal reference.

Lipophilicity evaluation

In this study we evaluated the lipophilicity of the synthesized *N*¹-arylidene-thiosemicarbazone and 1,3,4-thiadiazoline derivatives using principal components analysis (PCA). The data used for the application of this mathematical model of lipophilicity evaluation were obtained using reverse phase thin layer chromatography (RP-TLC), in six chromatographic systems corresponding to six concentrations of *i*-propanol in the mobile phase.

Results and Discussions

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization

Twenty compounds, with new structures, have been synthesized in good yields. The purity of the newly obtained compounds was checked by thin layer chromatography. Quantitative elemental analysis (C, H, N and S) and spectral data (MS, ¹H NMR) confirmed their structures.

Antimicrobial activity evaluation

11 compounds showed antibacterial activities, most of them being more active against Gram-positive than against Gram-negative bacteria. Thus, 5 compounds (100 µg compound/well) were active against *Staphylococcus aureus* ATCC 49444, but with lower activities than reference Gentamicin (10 µg/well); 9 compounds were more active against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 than Gentamicin; 5 of them were less active against *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 than the reference drug; all of the compounds belonging to 1,3,4-thiadiazolines series showed a comparable activity against *Bacillus cereus* ATCC 11778 with that of Gentamicin. Gram-negative strains were less susceptible to the synthesized compounds: 9 thiadiazolines showed an antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922; only 1 thiosemicarbazone was active against *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. The size of the zone of the inhibition ranged between 10 and 20 mm.

12 compounds (100 µg compound/well) exhibited antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231, most of them presenting comparable activities with that of reference Fluconazole (25 µg compound/well). The active thiosemicarbazone derivatives were also tested against other three strains of *Candida* species. One of them was significantly active, presenting a better activity against *C. albicans* and *C. glabrata* than Fluconazole. The size of the zone of the inhibition ranged between 12 and 28 mm.

In this study, we have described the synthesis of 20 novel compounds, derivatives of *N*¹-arylidene-thiosemicarbazones and 4,5-dihydro-1,3,4-thiadiazoles, and have investigated for their in vitro antimicrobial activity.

The results obtained demonstrated that 1,3,4-thiadiazoline compounds possessed much better antibacterial efficacy than thiosemicarbazone derivatives. Actually, only one compound presented antibacterial activity from the first synthesized series. So, we could presume that, by transforming the derivatives of thiosemicarbazone into thiadiazoline derivatives, through cyclisation in presence of acetic anhydride, antibacterial activity is gained.

It can be noted that most of the dihydro-1,3,4-thiadiazole compounds were highly selective against tested Gram-positive microorganisms. The lack of efficacy may be attributed to their poor ability to penetrate the additional outer membrane barrier of Gram-negative bacteria.

Lipophilicity evaluation

R_f and R_M retention parameters values, respectively the values of the regression parameters ($R_M = f[c]$) for the two sets of compounds under study were determined.

These values provide a quantitative estimation of the distribution of investigated molecules between a non-polar phase (stationary phase, ODS) - that represents the biological membranes - and, respectively, a polar phase (the mobile phase) which plays the role of the extracellular aqueous environment.

Obtained R_M values graphical representation shows that they have the same profile in each of the six mobile phases, proving the fact that the chromatographic experiments were well conducted.

By analysing the obtained data, a linear correlation between the R_{M0} values (lipophilicity) and b (specific hydrophobic surface) can be observed. This indicates that thiosemicarbazone and 1,3,4-thiadiazoline derivatives may each belong to a series of *congeneric compounds* - compounds that even if the structural differences, brought in the same experimental conditions, behave similarly.

After PCA application, the first three principal components (PC) were retained, explaining **99.691%** of the total information contained in the original data.

Based on the values obtained for the three principal components, a relative **lipophilicity map** - $PC_2=f(PC_1)$ - and a **lipophilicity space** - $PC_3=f(PC_1,PC_2)$ - were made, thus being able to highlight **two** distinct classes of congeneric compounds.

By analysing the lipophilicity map it can be seen that both the thiosemicarbazone and thiadiazoline derivatives have similar behaviors. We can thus conclude that lipophilicity has not significantly changed by cyclization.

QSRR studies revealed that the presence of electron-withdrawing atoms or groups in the 5th position of the benzene ring of the thiadiazoline nucleus (Cl, Br, NO₂)

increases lipophilicity, while introducing electron-donating substituents (-OH,-OCH₃) leads to lower values of the lipophilic character.

Also, QRAR analysis showed that there is no proportional relationship (directly or inversely) between the lipophilic character and the inhibitory activity against *Bacillus cereus* of the tested 1,3,4-thiadiazolines.

Conclusions

✓ 20 compounds, *N*¹-arylidene-thiosemicarbazone and 1,3,4-thiadiazoline derivatives, have been synthesized, whose structures have a variously substituted aryl moiety (Cl, Br, OH, OCH₃, NO₂). Quantitative elemental analysis (C, H, N, S) and spectral studies (MS, ¹H NMR) confirmed the structures of the obtained compounds.

✓ The *in vitro* antimicrobial activities of the 20 new compounds were assessed against six bacteria and four fungal strains using the difusimetric method. Gentamicin and Fluconazole were used as reference drugs. Of all the compounds tested, eleven showed antibacterial activity against Gram-positive microorganisms, being less active towards Gram-negative bacteria. Regarding the antifungal potential, twelve derivatives inhibited the growth of *Candida species*, especially that of *C. albicans*.

✓ 20 synthesized compounds were investigated for their lipophilic character using principal components analysis (PCA). The data used for the application of this mathematical model of lipophilicity evaluation were obtained using RP-TLC. The results of the lipophilicity assessment show how a particular substituent attached to a pharmacophore (thiazole, thiadiazoline) influences the chromatographic retention of a given compound.

✓ Based on the PCA results, the compounds were grouped into two sets, based on the influence of certain substituents on the lipophilic character of the entire molecule. The presence of electron-withdrawing substituents (Br, Cl, NO₂) has a positive influence on the lipophilicity, whereas the presence of electron-donating (OH, OCH₃) substituents causes a decrease in lipophilic character.

General conclusions

This research lead us to the following conclusions:

• 76 compounds have been synthesized, of which 58 haven't been previously reported in the literature. Depending on the heterocyclic system, present in the chemical structures of these compounds, they can be grouped into three classes:

- thiazolyl-1,3-thiazolidine-4-ones;
- chromenyl-1,3,4-thiadiazolines;
- (het)aryl-1,3,4-thiadiazolines.

1. Quantitative elemental analysis and the performed spectral studies (MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR) confirmed the structures of the synthesized compounds..

2. The *in vitro* antibacterial and antifungal potential evaluation of the thiazolyl-thiazolidine-4-one and (het)aryl-thiadiazoline derivatives was performed against Gram-positive and Gram-negative bacteria strains and, respectively, *Candida spp.* standardized strains, using the difusimetric method. The antimicrobial screening showed that the inhibitory activity is more intense against Gram-positive than against Gram-negative bacteria, but also lower than that of reference antibiotics - Gentamicin and Ciprofloxacin. Regarding the antifungal activity of the tested compounds, the diameters of inhibition zones were in general higher than those obtained for the antibacterial activity screening, some of the compounds, at 5 mg/well or 50 mg/well, showing more intense inhibition potential against *Candida albicans* than Fluconazole (25 mg/well). These compounds could be "candidate" molecules for further development.

3. The *in vitro* antioxidant potential of the thiazolyl-thiazolidine-4-one derivatives has been studied by three tests: ABTS assay, the rate of autoxidation and ascorbate peroxidase activity of hemoglobin. The ABTS assay revealed no significant antioxidant effect, however, by the specific physiological reactions of hemoglobin, four compounds showed antioxidant and other four thiazolidine-4-ones prooxidant effects. Antioxidant effects could be exploited for capturing oxygen radical species, while the prooxidant effects may underlie an anti-proliferative action.

4. The *in vitro* antitumor activity of the chromenyl-thiadiazoline derivatives was evaluated using the MTT assay, on seven tumor cell lines with different levels of resistance to pro-apoptotic stimuli. The most active molecules were further investigated for their cytostatic or cytotoxic effects by quantitative videomicroscopy (QVM). 3-Trifluoromethyl-phenyl derivatives were the most active, having antiproliferative effects on both sensitive and resistant to pro-apoptotic stimuli cancer cell lines.

5. Due to the fact that the biological activity of a bioactive molecule can be linked to its lipophilic character, the **lipophilicity** of some (het)aryl-thiosemicarbazones and correspondent 1,3,4-thiadiazolines was investigated, using the **principal components analysis** (PCA). The data required for the application of this mathematical model for the lipophilicity evaluation were obtained by RP-TLC. Based on the PCA results, the compounds were grouped into two sets, showing that certain substituents may influence the lipophilic character of the entire molecule. It was found that lipophilicity is positively influenced by the presence of electron-withdrawing atoms or substituents

(Br, Cl, NO₂), whereas the presence of electron-donating substituents (OH, OCH₃) decreases the lipophilic character.

6. By the originality of the synthesized molecules structures, physico-chemical, structural and biological characterization, as well as by the lipophilicity determination and retention behavior modeling, it can be said that contributions to basic research in chemistry and heterocyclic systems field have been brought.

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of the thesis consists in the contributions that this research brings to the broadening of antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumour agents libraries by:

1. The development of:

- a series of thiazolyl-thiazolidine-4-ones, including 12 novel compounds, which have not been previously reported in the literature;
- two series of (het)aryl-1,3,4-thiadiazolines, including 20 novel compounds, also not yet reported in the literature.

2. Obtaining biological data from exploring the antibacterial, antifungal, antioxidant and antiproliferative potential, data that allowed us to establish some qualitative relationships between the structures of the compounds, their properties and *in vitro* antimicrobial, antioxidant and anticancer activities. The obtained experimental data allowed the selection of "leader" molecules with the most promising activity for the studied biological effects.

3. Obtaining certain quantitative parameters, through theoretical and experimental methods, by which the lipophilicity of the synthesized compounds can be correlated with their biological activities.

- Starting from these prototype molecules, the premises of compounds optimizations by molecular docking studies in further research are created, followed by new chemical pharmacomodulations in order to improve their biological, pharmacokinetic and biopharmaceutical properties.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Contribuții la sinteza și prospectarea activității biologice a unor noi Tiazolidin-4-one și Tiadiazoline

Doctorand **Ioana Andrada Ionuț**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Considerații asupra obținerii și activității biologice a Tiazolidin-4-onelor	19
1.1. Chimia tiazolidinonelor	20
1.2. Metode de obținere a derivaților tiazolidin-4-onici	20
1.3. Activitatea biologică a derivaților 4-tiazolidinonici	26
1.3.1. Activitatea antimicrobiană	26
1.3.2. Activitatea antitumorală	30
1.3.3. Activitatea anti-hiperglicemică	32
1.3.4. Activitatea anti-HIV	33
1.3.5. Activitatea antioxidantă	34
1.3.6. Activitatea antiinflamatoare	35
1.3.8. Alte activități	36
2. Considerații asupra obținerii și activității biologice a Tiadiazolinelor	37
2.1. Chimia tiadiazolinelor	37
2.2. Metode de obținere a compușilor tiadiazolinici	38
2.2.1. Ciclizarea tiosemicarbazonelor	38
2.2.2. Ciclizarea derivaților de tiouree	40
2.2.3. Ciclizarea hidrazidelor	40
2.2.4. Ciclizarea ditiocarbazaților	40
2.3. Activitatea biologică a compușilor tiadiazolinici	41
2.3.1. Activitatea antimicrobiană	41
2.3.2. Activitatea antitumorală	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	51

3. Studiul 1. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică, spectrală și prospectarea activității antimicrobiene și antioxidante a unor noi tiazolil-tiazolidin-4-one	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	54
3.3. Material și metodă	55
3.3.1. Sintează chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	55
3.3.2. Evaluarea activității antimicrobiene	58
3.3.3. Evaluarea potențialului antioxidant <i>in vitro</i>	58
3.4. Rezultate și Discuții	61
3.4.1. Sintează chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	61
3.4.2. Activitatea antimicrobiană	68
3.4.3. Activitatea antioxidantă	70
3.5. Concluzii	74
4. Studiul 2. Sinteza și activitatea anticanceroasă <i>in vitro</i> a unor noi cromonil-tiadiazoline	75
4.1. Introducere	75
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	76
4.3. Material și metodă	77
4.3.1. Sintează chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	77
4.3.2. Evaluarea <i>in vitro</i> a potențialului antitumoral	78
4.4. Rezultate și Discuții	79
4.4.1. Sintează chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	79
4.4.2. Evaluarea <i>in vitro</i> a potențialului antitumoral	91
4.5. Concluzii	94
5. Studiul 3. Sinteza, evaluarea activității antimicrobiene și a lipofilicității unor N^1-ariliden-tiosemicarbazone și 1,3,4-tiadiazoline	97
5.1. Introducere	97
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	99
5.3. Material și metodă	100
5.3.1. Sintează chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	100
5.3.2. Evaluarea activității antimicrobiene	102
5.3.3. Evaluarea lipofilicității	103
5.4. Rezultate și Discuții	105
5.4.1. Sintează chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	105
5.4.2. Evaluarea activității antimicrobiene	111
5.4.3. Evaluarea lipofilicității	113

5.5. Concluzii	121
6. Concluzii generale	123
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	127
REFERINȚE	129

Cuvinte cheie: sinteză chimică, antibacterian, antifungic, antioxidant, ascorbat peroxidază, antitumoral, videomicroscopie, apoptoză, lipofilicitate, cromatografie, analiza componentelor principale.

Introducere

În zilele noastre, omenirea se confruntă, printre alte afecțiuni, cu problema morbidității și mortalității ridicate prin boli infecțioase și cancer.

În ceea ce privește terapia infecțiilor de etiologie bacteriană, rezistența microorganismelor la antibiotice a fost și rămâne și în prezent o problemă de sănătate publică, dezvoltarea acestui fenomen devenind o provocare pentru medicina zilelor noastre. Cu toate progresele realizate în cercetarea antibioticelor, infecțiile bacteriene au rămas o amenințare importantă pentru viață, datele statistice recente arătând că anual, în lume, își pierde viața prin boli infecțioase bacteriene mai mult de 20 de milioane de oameni. Printre cauzele mortalității constant ridicate prin infecții bacteriene se situează în primul rând diminuarea treptată a eficienței inițiale a numeroase antibiotice. Un fenomen asemănător, chiar dacă de mai mică amploare, este întâlnit și în cazul infecțiilor fungice, la pacienți imunocompetenți dar mai ales la cei imunocompromiși, la care se constată o creștere a rezistenței fungilor la azolii antimicotici.

La acest început de secol XXI, descoperirea de noi molecule active pe bacteriile și fungii rezistenți la chimioterapicele autorizate clinic reprezintă o prioritate a cercetării. Unul dintre motive este scăderea semnificativă a interesului companiilor farmaceutice în dezvoltarea de noi antibiotice, ca urmare a costurilor ridicate pe care le implică o astfel de cercetare și a ratei mai reduse de recuperare a acestora comparativ cu investițiile realizate în domeniul descoperirii de noi medicamente utilizabile clinic în bolile cronice (cancer, boli cardiovasculare, osteoporoză, etc). Mai mult decât atât, antimicrobienele autorizate în ultimele decenii nu sunt decât noi reprezentanți ai unor familii de antibiotice mai vechi, față de care rezistența bacteriilor se dezvoltă rapid, prin aceleași mecanisme prin care apare și la alți reprezentanți ai clasei. În anul 2004, Infectious Diseases Society of America a lansat un program denumit Bad Bugs Need Drugs, prin care propunea soluții pentru descoperirea de noi molecule „leader” (pipeline) cu activitate asupra bacteriilor „problemă”. Una dintre soluțiile propuse constă în sprijinirea micilor echipe de cercetători din universități sau

centre de cercetare din afara companiilor farmaceutice. Una dintre direcțiile prioritare ale cercetării în domeniul chimiei medicamentului o constituie așadar identificarea molecule prototip (leader, cap de serie) care să aparțină unor modele structurale noi și care să inhibe una sau mai multe ținte bacteriene recent descoperite, în încercarea de a se „evita„ fenomenul de rezistență câștigată la modelele structurale clasice. Un exemplu în acest sens îl reprezintă clasa oxazolidinonelor, cea mai nouă familie de antibiotice de sinteză.

Pe de altă parte, descoperirea de noi agenți anticanceroși, cu activitate citotoxică directă, care modifică semnalizarea celulară dereglată în cancer, induc apoptoza celulară, inhibă deacetilarea histonelor, proteinkinaza C, proteazomul, etc, constituie o prioritate a cercetării mondiale.

În contextul celor prezentate, obiectivele principale urmărite în cadrul cercetării cuprinse în teza de față au fost reprezentate de descoperirea unor noi modele structurale de molecule cu activitate antibacteriană, antifungică și antitumorală. Pentru unii dintre compuși s-a urmărit și testarea potențialului antioxidant, în contextul în care, captarea speciilor libere de oxigen joacă un rol major în chimioprevenția unor boli precum cancerul sau afecțiunile cardio-vasculare. Compușii sintetizați aparțin la două modele structurale – tiazolidin-4-one, respectiv tiadiazoline - pentru care în literatura de specialitate există și raportări anterioare asupra potențialului antimicrobian și anticanceros. Dezvoltarea moleculelor a fost realizată prin sinteză chimică organică, urmărindu-se ulterior, identificarea fragmentelor farmacofore și stabilirea de relații între structura chimică a compușilor sintetizați, lipofilia moleculelor și activitatea biologică. Cercetarea de față s-a realizat în cadrul unor colaborări multidisciplinare cu specialiști în analiză structurală, microbiologie și oncologie.

Studiul 1. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică, spectrală și prospectarea activității antimicrobiene și antioxidante a unor noi tiazolil-tiazolidin-4-one

Introducere

Creșterea continuă a rezistenței microorganismelor la numeroase clase de chimioterapice se constituie într-o problemă alarmantă care afectează tot mai serios sănătatea umană.

Principalele bacterii “problemă” sunt: *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (MRSA), *Enterococcus faecium* rezistent la vancomicină (VRE), *Streptococcus pneumoniae* penicilino-rezistent (PRP), *Haemophilus influenzae* rezistent la ampicilină,

Neisseria meningitidis rezistent la sulfonamide, *Escherichia coli* rezitent la ampicilină, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Mycobacterium tuberculosis*.

O altă problemă pe care încearcă să o contracareze unele echipe de cercetători este cea a stresului oxidativ și a efectelor nocive ale acestuia asupra organismului uman.

Ca și o consecință ale celor prezentate, este necesară proiectarea unor compuși de alternativă, care să fie capabili să acționeze prin mecanisme noi.

În ultimele două decenii s-a remarcat o creștere a interesului pentru obținerea de derivați tiazolici și tiazolidinonici, dovadă stând numeroasele studii care atestă potențialul biologic important al acestor compuși.

Tiazolidin-4-onele substituie au fost studiate în infecții microbiene, diabet, epilepsie, alergii, schizofrenie, hipertensiune, și mai recent în tratamentul durerii.⁴⁴ În plus, s-a demonstrat activitatea antioxidantă *in vitro* a acestor derivați,⁵ precum și faptul că aceștia reprezintă o alternativă promițătoare în tratamentul SIDA, bolii Alzheimer, a diferitelor tipuri de tumori și hepatitei B.

Totodată, un număr mare de tiazoli divers substituie prezintă o activitate semnificativă asupra unei varietăți de tulpini microbiene, atrăgând un interes tot mai mare în dezvoltarea de compuși farmacologic activi.

Ipoteza de lucru/obiective

Bazându-ne pe activitatea biologică dovedită a compușilor cu nucleu tiazolidin-4-onic în structură și ca urmare a interesului crescut pentru chimia tiazolului, ne-am propus sinteza unor derivați tiazolil-tiazolidin-4-onici, reunind în aceeași moleculă cei doi heterocicli prin metoda "hibridării moleculare", cu scopul obținerii unor agenți antimicrobieni și antioxidanți mai puțin toxici și cu efecte potențate.

Material și metodă

Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală

Calea generală de sinteză a derivaților tiazolidin-4-onici are la bază o reacție de condensare între tiosemicarbazonele N^4 -substituie și acidul cloracetic, în mediu de acid acetic glacial și în prezența acetatului de sodiu anhidru cu rol de catalizator. Tiosemicarbazonele intermediare au fost sintetizate prin refluxarea 5-acetil-tiazolilor cu tiosemicarbazidele N^4 -substituie, în mediu de alcool absolut, utilizând acidul sulfuric concentrat ca și catalizator. Derivații de 5-acetil-tiazol s-au sintetizat printr-o reacție de condensare Hantzsch a tioamidelor corespunzătoare cu 3-cloracetilacetona, în mediu alcoolic. Derivații tiosemicarbazidici N^4 -substituie (fenil, metil, alil, 3-trifluorometil-fenil, 4-metoxi-fenil) au fost obținuți cu randamente bune (>90%) prin adăugarea hidratului de hidrazină la izotiocianatii corespunzători, prin agitare în mediu de etanol absolut timp de 3 ore, la temperatura camerei.

Puritatea compușilor a fost confirmată prin CSS, fiecare dintre ei fiind caracterizați prin punct de topire, analiză elementală cantitativă și date spectroscopice (^1H RMN, MS).

Evaluarea activității antimicrobiene

Douăzeci și patru de compuși au fost testați *in vitro* pentru determinarea activității lor antimicrobiene. Studiul s-a realizat pe patru tulpini bacteriene standardizate (*S. aureus* ATCC 49444, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 13932) și pe o tulpină fungică (*Candida albicans* ATCC 10231), aplicând tehnica difuzimetrică. Rezultatele obținute au fost comparate cu cele ale Ciprofloxacinii (10 $\mu\text{g/godeu}$) ca și antibacterian, și cu cele ale Fluconazolului (25 $\mu\text{g/godeu}$) ca și antifungic de referință.

Evaluarea potențialului antioxidant *in vitro*

S-a evaluat potențialul antioxidant *in vitro* al derivaților tiazolil-tiazolidin-4-onici utilizând două reacții ale hemoglobinei, relevante din punct de vedere fiziologic - viteza de autoxidare și activitatea ascorbat-peroxidazică - și testul ABTS, bazat pe capacitatea unui antioxidant de a inhiba radicalul liber ABTS $^{*\cdot}$.

Rezultate și Discuții

Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală

Au fost sintetizați douăzeci și patru de compuși cu structură nouă, cu randamente bune. Puritatea noilor compuși a fost verificată prin cromatografie pe strat subțire. Structurile au fost confirmate prin analiză elementală cantitativă de C, H, N și S și prin metode spectrale: MS și ^1H RMN.

Activitatea antimicrobiană

Majoritatea compușilor au prezentat efecte antibacteriene bune spre foarte bune, diametrul zonei de inhibiție variind între 8 și 22 mm; unii dintre compușii testați au fost chiar mai activi decât Ciprofloxacina pe bacteriile Gram-pozitive.

În general activitatea antibacteriană a fost mai bună pe bacteriile Gram-pozitive decât pe cele Gram-negative.

În ceea ce privește activitatea antifungică, rezultatele obținute au fost superioare, diametrul zonei de inhibiție variind între 14 și 32 mm. Cinci dintre compuși au fost mai activi pe *C. albicans* decât Fluconazolul.

Unul dintre obiectivele testării activității antimicrobiene a compușilor intermediari și finali a fost stabilirea modului în care ciclizarea tiazolil-tiosemicarbazonelor la tiazolil-tiazolidin-4-onele influențează acest potențial. Astfel, se

poate remarca faptul că, în general, activitatea antibacteriană s-a potențat ușor prin ciclizare, în timp ce potențialul antifungic s-a redus.

Activitatea antioxidantă

Patru tiazolidin-4-one au avut abilitatea de a inhiba radicalul ABTS^{•+}. Efectele antioxidante observate în cazul a două dintre acestea par a fi bine corelate cu capacitatea lor de a inhiba autooxidarea hemoglobinei. Un compus s-a dovedit a fi un inhibitor al vitezei de autooxidare a hemoglobinei, spre deosebire alți doi, care au demonstrat ușoare efecte prooxidante în această reacție.

Valorile pozitive obținute pentru doi dintre compuși în testul de determinare a activității ascorbat-peroxidazice a hemoglobinei sugerează tot un efect antioxidant; valorile negative însă, mai evidente în cazul a cinci derivați tiazolil-tiazolidin-4-onici, demonstrează un efect prooxidant.

Modificările de spectru UV-VIS observate în cazul unor compuși indică faptul că aceștia ar putea fi substrat pentru peroxidază.

Concluzii

✓ Au fost sintetizați 24 de compuși, derivați tiazolil-tiosemicarbazonici și tiazolil-tiazolidin-4-onici.

✓ Analiza elementală cantitativă (C, H, N, S) și studiile spectrale efectuate (MS, ¹H RMN) au confirmat structurile compușilor obținuți.

✓ A fost realizat un screening al potențialului antimicrobian pentru toți cei 24 de compuși sintetizați, prin metoda difuziei în agar, luându-se în studiu 2 bacterii Gram-pozitive, 2 Gram-negative și o tulpină fungică. Compușii au prezentat activități inhibitorii bune spre foarte bune pe bacteriile Gram-pozitive luate în studiu și modeste pe cele Gram-negative. Majoritatea compușilor testați au prezentat activități antifungice bune spre foarte bune, 5 derivați tiazolil-tiazolidin-4-onici având un efect mai intens de inhibiție asupra *Candida albicans*. Analiza relațiilor de tip Structură-Activitate a relevat faptul că ciclizarea tiazolil-tiosemicarbazonelor la tiazolil-tiazolidin-4-one a avut un efect ușor favorabil asupra activității antibacteriene și a afectat în sens negativ potențialul antifungic.

✓ A fost studiată acțiunea antioxidantă a derivaților tiazolidin-4-onici prin trei teste *in vitro*: testul ABTS, viteza de autooxidare a hemoglobinei și activitatea ascorbat-peroxidazică. Prin testul ABTS nu s-a observat un efect antioxidant semnificativ. Trei dintre compușii testați s-au dovedit a fi buni inhibitori ai vitezei de autooxidare a hemoglobinei (efect antioxidant), iar alți doi au avut efecte prooxidante în acest test. În

testul de determinare a activității ascorbat-peroxidazice a hemoglobinei doi compuși au demonstrat efecte antioxidante, iar alți patru efecte prooxidante.

Studiul 2. Sinteza și activitatea anticancerasă *in vitro* a unor noi cromonil-tiadiazoline

Introducere

Boala canceroasă reprezintă una dintre cele mai serioase amenințări împotriva sănătății în întreaga lume, iar prognosticul clinic rămâne de cele mai multe ori rezervat. La nivel global, se înregistrează anual aproximativ 7.5 milioane de decese din cauza cancerului și se estimează că acest număr va crește cu 45% în următorii 20 de ani. O posibilă rezolvare a mortalității ridicate prin cancer o reprezintă diagnosticul precoce al acestuia, descoperirea de noi agenți anticancerosi și aplicarea de noi strategii terapeutice. Chimioterapia a înregistrat progrese rapide și spectaculoase în ultimele decenii, de la un număr redus inițial de medicamente (anii 1950), până la cei peste 600 de compuși utilizați în prezent. Prezența în cazul unor linii celulare tumorale a unor procese cum sunt supraexpresia de pompe de eflux, alterarea țintelor (în special enzime și proteine), hiperactivarea unor mecanisme de reparare a ADN-lui, inhibarea căilor de inducere a apoptozei sau scăderea pH-lui extracelular, contribuie la creșterea rezistenței față de agenții citotoxici și, consecutiv, la diminuarea eficacității chimioterapiei și uneori a radioterapiei.

Numeroase cercetări sunt în prezent orientate spre obținerea de noi compuși cu potențial antitumoral, care să acționeze țintit asupra celulelor tumorale (toxicitate redusă asupra celulelor sănătoase) și care să depășească rezistența naturală sau câștigată a acestora.

Literatura de specialitate atestă faptul că moleculele care conțin heterocicli cu azot și sulf în structură (tiazol, tiazolidină, tiazolinonă, tiadiazolină) prezintă activități biologice variate. Spre exemplu, tiadiazolinele au potențial anticanceros, antibacterian, antihelmintic, antihipertensiv, antiinflamator, analgezic și inhibitor al tirozin-kinazelor.

Pe de altă parte, cromonele sunt un grup de compuși naturali ubicuitari, mai ales în plante, constituind nucleul de bază al flavonoidelor. Restul cromonil intră în structura multor molecule cu activitate biologică demonstrată: inhibitori ai tirozin-kinazelor și protein-kinazei C, antifungici, antialergici, antivirali, antihipertensivi, agenți anticancerosi. În consecință, se acordă o atenție deosebită izolării acestor

compuși din resurse naturale și sintezei parțiale sau totale a derivaților cromonici, precum și evaluării activității lor biologice.

Ipoteza de lucru/obiective

Cunoscând potențialul biologic al derivaților cromonici și ținând cont de activitatea biologică dovedită a tiadiazolinelor, ne-am propus obținerea unei serii de compuși în structura cărora să se regăsească în mod constant cei doi heterocicli. Prin reunirea în aceeași moleculă a acestora, am urmărit obținerea de compuși cu structură chimică originală (cromonil-tiadiazoline), care să îmbine potențialul farmacofor al celor doi heterocicli, sau să aducă proprietăți biologice noi.

Material și metodă

Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală

Compușii finali, derivații cromonil-4,5-dihidro-tiadiazolinici, au fost obținuți prin ciclizarea cromonil-tiosemicarbazonelor cu anhidridă acetică, în prezența unor cantități mici de piridină, cu rol catalitic.

Tiosemicarbazele intermediare au fost sintetizate printr-o reacție de condensare între 3-formil-cromonele cu tiosemicarbazida și cu tiosemicarbazide *N*⁴-substituite, în mediu de alcool absolut, utilizând câteva picături de acid sulfuric concentrat cu rol de catalizator. Derivații tiosemicarbazidici *N*⁴-substituiți (fenil, metil, alil, 3-trifluorometil-fenil, 4-metoxi-fenil) au fost obținuți cu randamente bune (>90%) prin adăugarea hidratului de hidrazină la izotiocianații corespunzători, prin agitare în mediu de etanol absolut timp de 3 ore, la temperatura camerei.

Puritatea compușilor a fost confirmată prin CSS, fiecare dintre ei fiind caracterizați prin punct de topire, analiză elementală cantitativă și date spectroscopice (¹H RMN, ¹³C RMN, MS).

Evaluarea *in vitro* a potențialului antitumoral

12 compuși finali au fost evaluați *in vitro* pentru efectele lor antiproliferative. Aceștia au fost testați pe șapte linii celulare tumorale standardizate (cu diferite niveluri de rezistență față de stimulii pro-apoptotici), prin metoda colorimetrică MTT. Cei mai activi dintre compuși au fost investigați suplimentar prin videomicroscopie cantitativă (QVM), în vederea stabilirii efectelor lor citostatice sau citotoxice.

Rezultate și Discuții

Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală

Au fost sintetizați douăzeci și patru de compuși cu structură nouă, cu randamente bune. Puritatea noilor compuși a fost verificată prin cromatografie pe

strat subțire. Structurile au fost confirmate prin analiză elementală cantitativă de C, H, N și S și prin metode spectrale: MS, ^1H RMN și ^{13}C RMN.

Evaluarea *in vitro* a potențialului antitumoral

Datele obținute arată faptul că pentru cei mai potenți dintre compuși s-au înregistrat valori ale IC_{50} *in vitro* variind între 12 și $35\mu\text{M}$, în timp ce ceilalți derivați cromonil-tiadiazolinici au prezentat activități de inhibare a creșterii tumorale foarte slabe sau chiar nule ($> 100\mu\text{M}$). De fapt, 7 din cei 12 compuși testați au avut o activitate antiproliferativă $< 100\mu\text{M}$ pe toate liniile celulare tumorale luate în studiu.

Analiza relațiilor calitative de tip Structură-Activitate au indicat faptul că, în cazul derivaților de cromonil-tiadiazolină, substituția aminei exociclice cu un rest aril potențează efectul de inhibare a creșterii celulare tumorale, compușii cu rest 3-trifluorometil-fenil fiind cei mai activi.

Se poate astfel presupune că prezența atomilor de fluor are o influență pozitivă asupra activității antiproliferative a acestor compuși.

Rezultatele obținute au mai relevat și faptul că derivații cei mai activi au avut efecte inhibitorii similare asupra celulelor tumorale, independent de nivelul de rezistență a acestora la stimulii pro-apoptotici.

Trei cromonil-tiadiazoline au fost testate suplimentar prin videomicroscopie cantitativă. S-a remarcat astfel faptul că două dintre ele au indus efecte morfologice citostatice asupra celulelor canceroase mamare MCF-7 și de glioblastom T98G, în timp un derivat cromonil-tiadiazolinic a avut efecte citotoxice asupra ambelor linii celulare tumorale umane menționate anterior.

Concluzii

✓ Numeroase tipuri de cancer metastazat și primar nemetastazat, în momentul diagnosticului inițial, inclusiv gliomul, melanomul, cancerul esofagian, pancreatic și pulmonar non-microcelular, sunt rezistente la chimioterapiile și radioterapiile convenționale. Aceste tratamente acționează în afara citotoxicității la nivelul ADN-lui, și prin inducerea unor factori pro-apoptotici în celulele canceroase, iar tipurile de cancer menționate anterior sunt caracterizate de diferite niveluri de rezistență față de acești stimuli.

✓ Au fost sintetizați 24 de compuși, derivați cromonil-tiosemicarbazonici și cromonil-tiadiazolinici. Analiza elementală cantitativă (C, H, N, S) și studiile spectrale efectuate (MS, ^1H RMN și ^{13}C RMN) au confirmat structurile compușilor obținuți.

✓ A fost realizat un screening al potențialului antitumoral *in vitro* pentru derivații cromonil-tiadiazolinici, prin metoda MTT, luându-se în studiu șapte linii celulare tumorale, cu diferite niveluri de rezistență față de stimulii pro-apoptotici.

✓ Studiul de față a demonstrat faptul că unii derivați tiadiazolinici, precum cei substituiți cu un rest 3-trifluorometil-fenil, sunt capabili să depășească rezistența celulelor tumorale față de stimulii pro-apoptotici datorită faptului că prezintă o activitate antiproliferativă *in vitro* atât asupra liniilor celulare canceroase sensibile, cât și asupra celor rezistente la acești stimuli.

✓ Prin urmare, 3-trifluorometil-fenil-cromonil-tiadiazolinele pot reprezenta molecule prototip care se pretează unei dezvoltări experimentale *in vivo*, pentru efecte anticanceroase.

Studiul 3. Sinteza, evaluarea activității antimicrobiene și a lipofilicității a unor N^1 -ariliden-tiosemicarbazone și 1,3,4-tiadiazoline

Introducere

Rezistența bacteriană la diferite clase de agenți antibacterieni, cum sunt β -lactaminele, fluorochinolonele sau macrolidele, reprezintă o problemă îngrijorătoare care afectează în mod semnificativ sănătatea umană. Ca urmare, descoperirea de noi molecule cu potențial antimicrobial, care să aparțină unor modele structurale noi, capabile să acționeze printr-un mecanism original, a devenit obiectivul principal al acestui domeniu de cercetare.

Conform datelor din literatură derivații tiosemicarbazonici prezintă o plajă largă de activități biologice, precum: antimicrobiană, antiinflamatoare, antivirală, antiparazitară și tuberculostatică.

Printre compușii cu structură heterociclică, derivații azolici au dobândit o importanță considerabilă datorită proprietăților biologice variate pe care le prezintă: antibacteriană, antifungică, antiinflamatoare, antihipertensivă, anti-HIV, antitumorală, anticonvulsivantă, insectică, antiprotozoară. Mai mult decât atât, sinteza unor entități chimice noi, asemănătoare din punct de vedere structural cu moleculele cu activitate biologică demonstrată, reprezintă o direcție esențială a cercetării orientate spre descoperirea unor noi molecule "leader" în cadrul unor programe de drug-design.

1,3,4-Tiadiazolinele, produși rezultați prin ciclizarea ariliden-tiosemicarbazonelor, posedă o gamă largă de proprietăți biologice: antibacteriană, anticanceroasă, antiinflamatoare, antihipertensivă, analgezică, și fungică. Astfel, nucleul tiadiazolinic a atras tot mai mult interes în dezvoltarea de compuși farmacologic activi.

Unele proprietăți fizico-chimice ale compușilor biologic activi, precum solubilitatea, stabilitatea, lipofilicitatea, caracterul acido-bazic, trebuie determinate în

faze timpurii ale dezvoltării de medicamente. Dintre aceste proprietăți, lipofilicitatea este de o mare importanță, deoarece aceasta influențează etape fundamentale ale farmacocineticii și acțiunii unui medicament: absorbția, distribuția, metabolizarea, excreția și toxicitatea.

Absorbția substanțelor de la locul administrării până la locul de acțiune implică transportul lor prin diferite biomembrane, precum pielea, corneea, mucoasa intestinală, BHE și placentă. În general, toate aceste biomembrane sunt bistraturi lipidice ce conțin fosfolipide, colesterol și proteine integrale. Majoritatea moleculelor traversează membranele celulare prin difuzie pasivă, caracterul lor lipofil având un impact decisiv asupra acestui proces: substanța ar trebui să fie suficient de lipofilă încât să difuzeze prin membranele biologice, dar în același timp și solubilă în apă pentru a putea pătrunde în citoplasmă.

Activitatea biologică a moleculelor poate fi corelată cu caracterul lor lipofil prin intermediul unor parametri cantitativi. Acești parametri sunt cunoscuți sub denumirea de parametri de evaluare a lipofilicității și reprezintă acele valori, calculate cu ajutorul unor metode teoretice sau determinate experimental, care redau modul de interacțiune dintre membranele celulare și moleculele de interes biologic.

Ipoteza de lucru/obiective

Ținând cont de activitatea biologică variată a derivaților tiosemicarbazonici și având în vedere faptul că nucleul 1,3,4-tiadiazolinic pare a fi un posibil farmacofor al unor agenți farmacologic activi, am decis să sintetizăm compuși cu aceste funcțiuni, respectiv cicluri în structură, ca și potențiali agenți antimicrobieni.

După cum s-a mai amintit, profilul farmacocinetic și farmacodinamic al unor compuși este strâns legat de lipofilia lor, deoarece, pentru manifestarea unei acțiuni, aceștia trebuie să traverseze o serie de bariere biologice. Pe baza acestui considerent ne-am propus să determinăm lipofilia compușilor sintetizați prin utilizarea cromatografiei de lichide cu fază inversă (RP-TLC) și a metodei de analiză a componentelor principale (PCA) și să corelăm parametrii de retenție obținuți cu structura chimică și activitatea antimicrobiană *in vitro* a moleculelor în vederea stabilirii unor relații de tip structură-retenție (QSRR) și respectiv, retenție-activitate biologică (QRAR).

Material și metodă

Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală

Derivații N^1 -ariliden-tiosemicarbazonici au fost obținuți printr-o reacție de condensare între aldehide aromatice/heteroaromatice sau acetofenone substituie și tiosemicarbazida sau tiosemicarbazide- N^4 -substituie, în mediu de etanol absolut, utilizându-se acidul sulfuric ca și catalizator. Tiosemicarbazidele- N^4 -substituie (fenil și metil) au fost obținute, cu randamente bune, printr-o reacție de adiție a hidratului de

hidrazină la fenilizotiocianat și, respectiv, metilizotiocianat, prin agitarea amestecului la temperatura camerei, în mediu de etanol absolut, timp de 3 ore.

Derivații 4,5-dihidro-1,3,4-tiadiazolici au fost obținuți prin ciclizarea tiosemicarbazonelor cu anhidrida acetică, în prezența unor mici cantități de piridină, cu rolul de a mări viteza de reacție.

Puritatea compușilor a fost confirmată prin CSS, fiecare dintre ei fiind caracterizați prin punct de topire, analiză elementală cantitativă și date spectroscopice (^1H RMN, MS).

Evaluarea activității antimicrobiene

Douăzeci de compuși au fost testați *in vitro* pentru determinarea activității lor antimicrobiene. Studiul a fost realizat pe șase tulpini bacteriene standardizate (*S. aureus* ATCC 49444, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028, *B. cereus* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 13932) și pe o tulpină fungică (*Candida albicans* ATCC 10231), aplicând tehnica difuzimetrică. Cei mai activi compuși pe *C. albicans* au fost testați și pe alte trei specii de *Candida* (*C. krusei* ATCC 6285, *C. glabrata* ATCC, *C. tropicalis* ATCC). S-au utilizat soluții de concentrație 2mg/mL (100 $\mu\text{g/godeu}$) în DMSO. Rezultatele obținute au fost comparate cu cele ale Gentamicinei ca și antibacterian, și cu cele ale Fluconazolului ca și antifungic de referință.

Evaluarea lipofilicității

În studiul de față s-a evaluat lipofilicitatea derivaților *N*-ariliden-tiosemicarbazonici și 1,3,4-tiadiazolinici sintetizați, utilizând analiza componentelor principale (PCA). Datele folosite pentru aplicarea acestui model matematic de evaluare a lipofilicității au fost obținute prin utilizarea cromatografiei pe strat subțire cu fază inversă, în șase sisteme cromatografice, corespunzătoare celor șase concentrații în *i*-propanol în faza mobilă.

Rezultate și Discuții

Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală

Au fost sintetizați douăzeci de compuși, derivați de tiosemicarbazonă și 1,3,4-tiadiazolină, cu randamente bune. Puritatea noilor compuși a fost verificată prin cromatografie pe strat subțire. Structurile au fost confirmate prin analiză elementală cantitativă de C, H, N și S și prin metode spectrale: MS și ^1H RMN.

Evaluarea activității antimicrobiene

11 din cei 20 de compuși testați au prezentat activitate antibacteriană pe tulpinile testate, majoritatea dintre ei fiind mai activi pe bacteriile Gram-pozitive decât pe cele Gram-negative. Astfel, cinci dintre aceștia (100 $\mu\text{g compus/godeu}$) au fost activi pe *Staphylococcus aureus* ATCC 49444, activitatea lor inhibitorie fiind însă mai puțin

intensă decât cea a Gentamicinei (10 µg/godeu); 9 dintre compuși au fost mai activi pe *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 decât antibioticul de referință; cinci dintre compuși testați au prezentat un efect mai slab de inhibiție pe *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 comparativ cu Gentamicina; toți compușii 1,3,4-tiadiazolinici au demonstrat un efect de inhibiție asupra *Bacillus cereus* ATCC 11778 comparabil cu cel al Gentamicinei. Tulpinile Gram-negative luate în studiu au fost mai rezistente față de compuşii testați: 9 tiadiazoline au demonstrat un efect inhibitor asupra *Escherichia coli* ATCC 25922, însă inferioare Gentamicinei; în ceea ce privește activitatea pe *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, doar un singur compus a prezentat un efect slab de inhibiție. Diametrul zonei de inhibiție a variat între 10 și 20 mm.

În ceea ce privește activitatea antifungică, 12 compuși (100 µg compus/godeu) au prezentat activitate inhibitorie asupra creșterii *Candida albicans* ATCC 10231, pentru majoritatea dintre ei aceasta fiind comparabilă cu cea a Fluconazolului (25 µg/godeu). Compușii tiosemicarbazonici activi, au fost testați suplimentar pe alte trei tulpini de *Candida spp.* Unul dintre ei a fost mai activ, remarcându-se printr-o activitate mai intensă decât cea a substanței de referință pe *C. albicans* și *C. glabrata*. Diametrul zonei de inhibiție a variat între 12 și 28 mm.

Rezultatele obținute demonstrează faptul că derivații 1,3,4-tiadiazolinici posedă un potențial antibacterian mult mai intens decât cel al derivaților tiosemicarbazonici. De fapt, doar un singur compus din această primă serie sintetizată a prezentat activitate antibacteriană. Astfel, putem presupune faptul că potențialul antibacterian este dobândit prin ciclizarea derivaților tiosemicarbazonici la tiadiazoline, în prezența anhidridei acetice.

Merită subliniat faptul că majoritatea compușilor tiadiazolinici au fost activi selectiv pe microorganismele Gram-pozitive testate. Activitatea redusă pe cele Gram-negative ar putea fi atribuită capacității lor reduse de a penetra membrana externă a acestora.

Evaluarea lipofilicității

Au fost determinate valorile parametrilor de retenție R_f și R_M , respectiv valorile parametrilor dreptei de regresie ($R_M=f[c]$) pentru cele două seturi de compuși luați în studiu.

Aceste valori oferă o estimare cantitativă a distribuției moleculelor investigate între o fază nepolară (faza staționară, ODS), care reprezintă membranele biologice și, respectiv, o fază polară (faza mobilă) care joacă rolul mediului apos extracelular.

Reprezentarea grafică a valorilor R_M obținute pentru fiecare compus luat în studiu, evidențiază că acestea au avut același profil în fiecare din cele șase faze mobile, denotând faptul că experimentele cromatografice au fost bine conduse.

Prin analiza datelor obținute se observă faptul că între valorile R_{M0} (lipofilicitate) și b (suprafață hidrofobă specifică) există o corelație lineară. Aceasta indică faptul că derivații tiosemicarbazonici și tiadiazolinici ar putea aparține fiecare unei serii de *compuși congenerici* - compuși care chiar dacă nu prezintă asemănări structurale, aduși la un moment dat în aceleași condiții experimentale, se comportă asemănător.

După aplicarea PCA, au fost reținute primele trei componente principale care explică **99.691%** din informația totală conținută în datele inițiale.

Pe baza valorilor obținute pentru cele trei componente principale s-a alcătuit o **hartă de lipofilicitate relativă** - $PC_2=f(PC_1)$ - și un **spațiu de lipofilicitate** - $PC_3=f(PC_1,PC_2)$ - putându-se astfel evidenția **două** clase distincte de compuși congenerici.

Din analiza hărții de lipofilicitate se poate observa că atât derivații tiosemicarbazonici, cât și compușii rezultați prin ciclizarea lor în prezența anhidridei acetice, au un comportament similar. Putem astfel conchide faptul că lipofilia nu se modifică semnificativ prin ciclizare.

Analiza relațiilor de tip structură-retenție a relevat faptul că prezența unor atomi sau grupări cu efect inductiv atragător de electroni pe ciclul benzenic din poziția 5 a nucleului tiadiazolinic (Cl, Br, NO_2) crește lipofilicitatea, în timp ce introducerea de substituenți cu efect inductiv donor de electroni (-OH, $-OCH_3$) conduce la scădea valorilor acesteia.

Totodată, studiul relațiilor de tip retenție-activitate a arătat că nu există un raport de proporționalitate (directă sau inversă) între caracterul lipofil și activitatea inhibitorie față de *Bacillus cereus*, întrucât compușii testați au efecte inhibitorii foarte asemănătoare, indiferent de caracterul lor lipofil.

Concluzii

✓ S-au sintetizat 20 de compuși, derivați N^1 -ariliden-tiosemicarbazonici și 1,3,4-tiadiazolinici, a căror structură prezintă un rest aril divers substituit (Cl, Br, OH, OCH_3 , NO_2). Analiza elementală cantitativă (C, H, N, S) și studiile spectrale efectuate (MS, 1H RMN) au confirmat structurile compușilor obținuți.

✓ A fost realizat un screening al potențialului antimicrobian *in vitro* pentru toți compușii sintetizați, prin metoda difuzimetrică, luându-se în studiu patru tulpini Gram-pozitive, 2 tulpini Gram-negative și patru tulpini fungice. Dintre toți compușii testați, 11 au prezentat activitate antibacteriană microorganismele Gram-pozitive, fiind mai puțin activi pe cele Gram-negative. În ceea ce privește potențialul antifungic, compușii 12 compuși au inhibat creșterea speciilor de *Candida*, în special *C. albicans*.

✓ S-a evaluat lipofilitatea celor 20 de compuși sintetizați, utilizând analiza componentelor principale (PCA). Datele folosite pentru aplicarea acestui model matematic de evaluare a lipofiliei au fost obținute prin utilizarea cromatografiei pe strat subțire cu fază inversă. Rezultatele obținute în urma evaluării lipofilității arată modul în care un anumit substituent, atașat de un farmacofor (tiazol, tiadiazolină), influențează retenția cromatografică a unui compus.

✓ Pe baza rezultatelor obținute prin PCA, compușii au fost grupați în două serii, pe baza influenței anumitor substituenți asupra caracterului lipofil al întregii molecule. Prezența în structură a unor substituenți cu efect inductiv atrăgător de electroni (Br, Cl, NO₂) influențează într-un sens pozitiv lipofilitatea acestora, în timp ce prezența substituenților cu efect inductiv donor de electroni (OH, OCH₃) determină o scădere a caracterului lipofil.

Concluzii generale

Această cercetare a condus la următoarele concluzii:

• Au fost sintetizați **76** de compuși, dintre care **58** nu au mai fost raportați în literatura de specialitate. În funcție de sistemele heterociclice care stau la baza structurii chimice, compușii obținuți pot fi grupați în 3 clase:

- tiazolil-1,3-tiazolidin-4-one;
- cromonil-1,3,4-tiadiazoline;
- (het)aril-1,3,4-tiadiazoline.

1. Analiza elementală cantitativă și studiile spectrale efectuate (MS, ¹H RMN, ¹³C RMN) au confirmat structurile compușilor sintetizați.

2. Testarea **acțiunii antibacteriene și antifungice *in vitro*** a tiazolil-tiazolidin-4-onelor și a (het)aril-tiadiazolinelor s-a realizat prin metoda difuzimetrică, pe tulpini de bacterii Gram-pozitive, Gram-negative și respectiv, pe tulpini de *Candida spp* standardizate. În urma screening-ului antimicrobian, s-a constatat faptul că activitatea inhibitorie este mai intensă asupra speciilor Gram-pozitive decât asupra celor Gram-negative, însă este inferioară activității antibioticelor de referință - Gentamicina și Ciprofloxacină. În ceea ce privește activitatea antifungică a compușilor testați, diametrele zonelor de inhibiție au fost în general mai mari comparativ cu cele obținute în cazul testării activității antibacteriene, unii dintre compuși, la 5 μg/godeu sau 50 μg/godeu, având un efect mai intens de inhibiție asupra *Candida albicans* decât Fluconazolul (25 μg/godeu). Acești compuși pot constitui molecule "candidat" în vederea unor dezvoltări mai avansate.

3. A fost studiat **potențialul antioxidant *in vitro*** al derivaților tiazolidin-4-onici prin trei teste: testul ABTS, viteza de autooxidare a hemoglobinei și activitatea ascorbat-peroxidazăică a acesteia. Prin testul ABTS nu s-a observat un efect antioxidant semnificativ, însă, prin reacțiile fiziologice specifice hemoglobinei, patru compuși au demonstrat efecte antioxidante, iar alți patru derivați tiazolidin-4-onici efecte prooxidante. Efectele antioxidante ar putea fi valorificate pentru captarea unor specii radicalice de oxigen, în timp ce efectele prooxidante pot sta la baza unei acțiuni antiproliferative.

4. A fost evaluată **activitatea antitumorală *in vitro*** a derivaților cromonil-tiadiazolinici prin testul MTT, pe șapte linii celulare tumorale, cu diferite niveluri de rezistență față de stimulii pro-apoptotici. Moleculele cele mai active au fost investigate pentru efectul lor citostatic sau citotoxic, prin videomicroscopie cantitativă (QVM). Cei mai activi compuși au fost cromonil-tiadiazolinele cu un rest 3-trifluorometil-fenil în structură, acestea având efecte antiproliferative atât asupra liniilor de celule canceroase sensibile, cât și asupra celor rezistente la stimulii pro-apoptotici.

5. Datorită faptului că activitatea biologică a unor molecule bioactive poate fi corelată cu caracterul lor lipofil, s-a evaluat **lipofilitatea** unor derivați (het)aril-tiosemicarbazonici și a derivaților tiadiazolinici corespunzători, prin **analiza componentelor principale** (PCA). Datele necesare pentru aplicarea acestui model matematic de evaluare a lipofiliei au fost obținute prin utilizarea cromatografiei pe strat subțire cu fază inversă. Pe baza rezultatelor obținute prin PCA, compușii au fost grupați în două serii, pe baza influenței anumitor substituenți asupra caracterului lipofil al întregii molecule. S-a constatat faptul că lipofilitatea este influențată în sens pozitiv de prezența în structura moleculelor a unor substituenți cu efect inductiv atragător de electroni (Br, Cl, NO₂), în timp ce prezența unor resturi cu efect donor de electroni (OH, OCH₃) determină o scădere a caracterului lipofil.

6. Prin originalitatea structurilor moleculelor sintetizate, caracterizarea fizico-chimică, structurală și biologică a acestora, precum și prin determinarea lipofiliei și modelarea comportamentului de retenție, se poate afirma că au fost aduse contribuții la cercetarea fundamentală în domeniul chimiei și acțiunii sistemelor heterociclice cu nuclee izolate, precum și la lărgirea bibliotecilor de compuși care pot fi în continuare dezvoltate pentru efectele antimicrobiene, antioxidante și antitumorale.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea tezei constă în contribuțiile pe care cercetarea de față le aduce lărgirii bibliotecilor de compuși cu activitate antibacteriană, antifungică, antioxidantă și antitumorală, prin:

1. Dezvoltarea:

- unei serii de tiazolil-tiazolidin-4-one, care include 12 compuși noi, care nu au mai fost raportați în literatura de specialitate;
- a două serii de (het)aril-1,3,4-tiadiazoline, care includ 20 compuși noi, de asemenea neraportați în literatură.

2. Obținerea de date biologice în urma prospectării potențialului antibacterian, antifungic, antioxidant și antiproliferativ, care au permis stabilirea de relații calitative între structura compușilor, proprietățile acestora și activitatea antimicrobiană, antioxidantă și anticanceroasă *in vitro*. Datele experimentale obținute au permis selectarea moleculelor „leader” cu cea mai promițătoare activitate pentru efectele biologice studiate.

3. Obținerea unor parametri cantitativi, prin metode teoretice și experimentale, prin intermediul cărora lipofilia compușilor sintetizați poate fi corelată cu activitatea biologică.

● Pornindu-se de la aceste molecule prototip, în cadrul unor cercetări ulterioare sunt create premisele unor optimizări ale compușilor prin studii de andocare, urmate de noi farmacomodulări chimice, cu scopul îmbunătățirii proprietăților biologice, farmacocinetice și biofarmaceutice ale acestora.