

---

SUMMARY OF THE PhD THESIS

Contributions to the synthesis  
and biological activity  
evaluation of new thiazolidine-  
diones și thiazoline-ones

---

PhD student **Anca-Daniela Stana**

---

Scientific supervisor **Prof. Dr. Ovidiu Oniga**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Thiazolidine-2,4-diones</b>	21
1.1. Structural aspects. Physico-chemical properties and spectral data	21
1.2. Methods of synthesis and pharmacomodulation	22
1.3. Therapeutic applications	24
1.3.1. Hypoglycemic thiazolidine-2,4-diones	24
1.3.2. Thiazolidine-2,4-diones as aldose reductase inhibitors	27
1.3.3. Antitumoral thiazolidine-2,4-diones	29
1.3.3.1. Thiazolidine-2,4-diones as PPAR $\gamma$ agonists	29
1.3.3.2. Thiazolidine-2,4-diones as IGF-1R inhibitors	31
1.3.3.3. Thiazolidine-2,4-diones as HDAC inhibitors	31
1.3.3.4. Thiazolidine-2,4-diones as Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways inhibitors	32
1.3.3.5. Thiazolidine-2,4-diones - active in hormone-dependent tumors	32
1.3.3.6. Thiazolidine-2,4-diones as VEGFR inhibitors	33
1.3.4. Antioxidant and anti-inflammatory thiazolidine-2,4-diones	33
1.3.5. Antiarthritic thiazolidine-2,4-diones	35
1.3.6. Antimicrobial and antiprotozoal thiazolidine-2,4-diones	36
1.3.7. Thiazolidine-2,4-diones with miscellaneous biological activities	38
<b>2. Thiazoline-4-ones</b>	40
2.1. General synthetic methods	40
2.2. Therapeutic applications	42
2.3.1. Anti-inflammatory thiazoline-4-ones	42
2.3.2. Antitumoral thiazoline-4-ones	44
2.3.3. Antimicrobial thiazoline-4-ones	46
2.3.4. Antioxidant thiazoline-4-ones and thiazoline-4-ones with miscellaneous biological activities	47
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	
<b>1. Hypothesis. Aims</b>	51
<b>2. General methodology</b>	55
<b>3. Study 1. Synthesis and antimicrobial activity of some N-substituted 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones</b>	57
3.1. Introduction	57

3.2. Hypothesis. Aims	58
3.3. Materials and methods	58
3.3.1. Chemical synthesis	58
3.3.1.1. General procedure for the synthesis of 5-((2-phenylthiazol-4-yl)methylene)thiazolidine-2,4-dione <b>2</b>	
3.3.1.2. General procedure for the synthesis of N-substituted 5-((2-phenylthiazol-4-yl)methylene)thiazolidine-2,4-diones <b>4a-i</b>	59
3.3.1.3. General procedure for the synthesis of 3-((2'-phenyl-2,4'-bisthiazol-4-yl)methyl)-5-((2-phenylthiazol-4-yl)methylene)thiazolidine-2,4-dione <b>4j</b>	60
3.3.1.4. General procedure for the synthesis of N-substituted 5-(2,6-dichlorobenzylidene)thiazolidine-2,4-diones <b>6a-g</b>	60
3.3.2. Antibacterial and antifungal activity	61
3.4. Results and discussion	62
3.4.1. The chemical synthesis of N-substituted 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones	62
3.4.2. The physico-chemical characterization of 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones	63
3.4.3. The structural spectral analysis of 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones	66
3.4.3.1. MS spectral data	66
3.4.3.2. IR spectral data	69
3.4.3.3. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectral data	72
3.4.4. Antibacterial and antifungal activity of the synthesized compounds	76
3.5. Conclusions	78
<b>4. Study 2. Synthesis and antimicrobial activity of some new N-(aryl-oxo-alkyl)-5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones</b>	79
4.1. Introduction	79
4.2. Hypothesis. Aims	80
4.3. Materials and methods	80
4.3.1. Chemical synthesis	80
4.3.1.1. General procedure for the synthesis of compounds <b>5</b> and <b>9</b>	81
4.3.1.2. General procedure for the synthesis of compounds <b>8a-h</b>	82
4.3.1.3. General procedure for the synthesis of compounds <b>10a-h</b>	82
4.3.2. Antibacterial and antifungal activity	82
4.4. Results and discussion	83
4.4.1. The chemical synthesis of the new N-(aryl-oxo-alkyl)-5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones	83

4.4.2. The physico-chemical characterization of the N-(aryl-oxo-alkyl)-5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones <b>8a-h</b> and <b>10a-h</b>	85
4.4.3. The structural spectral analysis of the N-(aryl-oxo-alkyl)-5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones <b>8a-h</b> and <b>10a-h</b>	88
4.4.3.1. MS spectral data	88
4.4.3.2. IR spectral data	90
4.4.3.3. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectral data	94
4.4.4. Antibacterial and antifungal activity	99
4.5. Conclusions	101
<b>5. Study 3. Synthesis and antimicrobial activity of some new 5-arylidene-thiazoline-4-ones</b>	103
5.1. Introduction	103
5.2. Hypothesis. Aims	104
5.3. Materials and methods	104
5.3.1. Chemical synthesis	104
5.3.1.1. General procedure for the synthesis of 2-allylamino-thiazoline-4-one <b>11</b>	105
5.3.1.2. General procedure for the synthesis of 2-arylamino-thiazoline-4-ones <b>13</b> and <b>15</b>	105
5.3.1.3. General procedure for the synthesis of 2-(allyl/aryl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones <b>12a-h</b> , <b>14a-e</b> and <b>16a-e</b>	106
5.3.2. Antibacterial and antifungal activity	106
5.4. Results and discussion	107
5.4.1. The chemical synthesis of the new 2-(allyl/aryl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones	107
5.4.2. The physico-chemical characterization of the 2-(allyl/aryl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones <b>12a-h</b> , <b>14a-e</b> and <b>16a-e</b>	108
5.4.3. The structural spectral analysis of the 2-(allyl/aryl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones <b>12a-h</b> , <b>14a-e</b> and <b>16a-e</b>	112
5.4.3.1. MS spectral data	112
5.4.3.2. IR spectral data	115
5.4.3.3. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectral data	119
5.4.4. Antibacterial and antifungal activity	124
5.5. Conclusions	126
<b>6. Study 4. Antioxidant activity of some new thiazolidine-2,4-diones and thiazoline-4-ones</b>	127
6.1. Introduction	127
6.2. Hypothesis. Aims	128
6.3. Materials and methods	129
6.3.1. DPPH method	129
6.3.2. Antioxidant potential evaluation by DPPH method	130

6.4. Results and discussion	131
6.5. Conclusions	134
<b>7. General conclusions</b>	<b>135</b>
<b>8. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>141</b>

**Keywords:** thiazolidine-2,4-diones, thiazoline-4-ones, Knoevenagel condensation, antibacterial activity, antifungal activity, antioxidant activity

## **Introduction**

Infections with bacteria and fungi, in immunocompetent patients but especially in those immunocompromised, registers nowadays alarming mortality and morbidity rates. In addition, the treatment for these community or nosocomial infections involves high costs for the health systems worldwide.

At this time, over 200 antibiotic molecules are authorized for the treatment of bacterial infections and fungal infections also benefit of several classes of chemotherapeutic agents, the best represented regarding the number of authorized molecules being the class of azoles. Consequently, the therapeutic arsenal represented by antibacterial antibiotics and antifungal chemotherapeutics could be considered as an important one. Unfortunately, microbial resistance to clinically available anti-infective agents appeared, a phenomenon that concerningly continues to grow in the past few years.

To limit the development of this phenomenon, the discovery of antimicrobial compounds with new chemical structures and mechanisms of action, towards which microbial resistance might install slower is necessary. Heterocyclic compounds have been and are still widely studied as antimicrobial agents, numerous molecules with antibacterial and antifungal potential from the class of thiazole and its derivatives (thiazolines, thiazolidines) being reported in the literature.

On the other hand, some thiazolidine-diones and thiazoline-ones are reported in the literature also for their antioxidant properties. The effect of oxygen radical species in the emergence of many diseases is well known, so the discovery of molecules able to counteract the harmful effects of hydroxyl radical, superoxide anion radical or hydroperoxide radical is highly important.

Based on the above premises, the present work presents the chemical synthesis of several series of new compounds which have as basic core the thiazolidine-2,4-dione and the 2-thiazoline-4-one moiety and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antioxidant potential. The main purpose for this research was the discovery of leading molecules within each series of compounds, from which structural analogs with optimized biological, pharmacokinetic and biopharmaceutical properties

and that can interact better with specific targets, can be further developed with the help of specific medicinal chemistry pharmacomodulation methods.

## **Study 1. Synthesis and antimicrobial activity of some N-substituted 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones**

### **Introduction**

Since their discovery, antibiotics have dramatically improved public health by enabling millions of people to live longer, more productive lives. The very success of these drugs has often resulted in an inappropriate and irrational use of antimicrobial drugs that has led to the development of antimicrobial resistance, a worldwide public health problem that continues to grow. In spite of the large number of antibacterial agents available for medical use, the dramatically increasing number of pathogens resistant to different classes of antibiotics and chemotherapeutics, and emerging infectious diseases over the past decades, lead to the necessity for developing new approaches to antimicrobial therapy, especially for seeking, testing, and validating novel therapeutics with little or no cross-resistance.

Thiazolidine-2,4-dione derivatives have been studied extensively and found to serve as basic pharmacophore for various biological profiles: antidiabetic, anticancer, antimicrobial, antioxidant, analgesic, cardiogenic, aldose reductase inhibitors, and anti-inflammatory. It has been reported that the insertion of arylidene moieties at the fifth position of the thiazolidine-2,4-dione ring enhanced the antimicrobial activity.

### **Hypothesis. Aims**

Prompted by these findings and as part of our efforts to discover potentially active new antimicrobial agents, we report in the present work, the synthesis of two series of 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones, various substitution in the third position, at the nitrogen atom, their physico-chemical and spectral characterization (IR, MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) and the evaluation of their antibacterial and antifungal activities.

### **Materials and methods**

The synthesized compounds, both intermediate and final were characterized in terms of physico-chemical properties, so the melting point, the reaction yield and their solubility in different solvents was determined for each compound.

In order to monitor the progress and completion of the reactions and the purity of the synthesized compounds, thin layer chromatography (TLC) has been performed, using a mixture of heptane-ethyl acetate 3:7 v/v as elution system and UV light to visualize the spots.

For structural confirmation of the synthesized compounds, C, H, N, S quantitative elemental analysis of and spectral analysis (MS, IR,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR) were used.

In vitro antimicrobial activity was evaluated by agar disc diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines, using ciprofloxacin and fluconazole as standard drugs. Antibacterial activity of newly synthesized compounds **2**, **4a-j**, **5** and **6a-g** was evaluated against various pathogenic Gram-negative (*S. typhimurium* ATCC 13311 and *E. coli* ATCC 25922) and Gram-positive (*L. monocytogenes* ATCC 35152, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 13061 and *E. fecalis* ATCC 29212) bacterial strains. Antifungal activity of the aforementioned compounds was evaluated against a strain of *C. albicans* ATCC 90028.

### Results and discussion

The 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones **2** and **5** were synthesized by Knoevenagel condensation of thiazolidine-2,4-dione with the appropriate aromatic aldehyde. The obtained 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones **2** and **5** were converted to potassium salts at the N atom of the heterocycle in the 3-position of thiazolidine-2,4-dione ring and were then treated with various halogenated compounds to give the target compounds, the N-substituted 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones **4a-j** and **6-g**.

All compounds gave very good C, H, N, S quantitative elemental analysis results and all spectral data were in accordance with the assumed structures.

The antimicrobial activity tests revealed that most of the synthesized compounds had a modest inhibitory activity on Gram-positive and Gram-negative bacteria, except compound **5** which showed a good inhibitory effect on G(-) bacterial strains, similar to that of ciprofloxacin. 5-(2,6-dichloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione **5** was the only compound that showed antibacterial activity against *L. monocytogenes*. All synthesized compounds were active, having a moderate inhibitory activity against *E. fecalis*, *E. coli* and *S. typhimurium*. 5-(2-phenyl-thiazol-4-yl-methylidene)thiazolidine-2,4-diones, **2** and **4a-j** were more active than the N-substituted 5-(2,6-dichloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones **6-g**, indicating that the presence of the thiazole ring enhances the activity of the compounds. Compounds **4d-f** showed a better inhibitory effect against *S. typhimurium* than compounds **2**, **4a-c** and **4g**, suggesting that suggesting that the substitution of N3 with lipophilic alkyl groups enhances the antibacterial properties.

Regarding antifungal activity, most of the synthesized compounds showed good inhibitory activity on *C. albicans* at the concentrations tested. The most active compounds were 3-((2'-phenyl-2,4'-bisthiazole-4-yl)methyl)-5-((2-phenylthiazol-4-yl)methylene)thiazolidine-2,4-dione **4j**, with three thiazole rings in the structure, and the unsubstituted 5-(2,6-dichlorobenzylidene)thiazolidine-2,4-dione **5**, which presented very good antifungal activity; the inhibitory activity being significantly more powerful than that of fluconazole. The most active compound in terms of both antifungal and

antibacterial activity was compound **5**, suggesting that the presence of chlorine atoms in the aromatic ring that increase the lipophilicity of the compound and the lack of substituents on the nitrogen atom of 5-arylidene-thiazolidine-2,4-dione, play an important role in improving the antimicrobial properties of this class of compounds.

### Conclusions

In conclusion, a series of 11 new 5-((2-phenylthiazol-4-yl)methylene)thiazolidine-2,4-dione and a series of 7 new 5-(2,6-dichloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones were synthesized. All compounds were characterized using several analytical techniques: <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR, MS and elemental analysis, after which they were evaluated for their antibacterial and antifungal activity. The results of the antimicrobial activity shown promising antibacterial and antifungal activities for some of the tested compounds, compound **5** being more active than ciprofloxacin against *S. aureus*, and compounds **4j** and **5** displaying better inhibitory activities than fluconazole against *C. albicans*.

## Study 2. Synthesis and antimicrobial activity of some new N-(aryl-oxo-alkyl)-5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones

### Introduction

Heterocyclic compounds have long been recognized in the field of synthetic organic chemistry as a very important class. Especially great attention has been given to thiazolidine-2,4-dione derivatives as they possess a diverse array of pharmacological activities, such as antidiabetic, antioxidant, analgesic, anti-arthritic, anti-inflammatory, anticancer, antibacterial and antifungal. Besides showing a remarkable antidiabetic activity by binding with PPAR $\gamma$ , heterocyclic compounds bearing thiazolidine-2,4-dione moiety with substitution at the fifth position can reduce oxidative stress and inhibit intracellular free radical overproduction. It was reported that 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones can act as potentially promising 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitors, inhibitors of MurD ligase and antimicrobial agents.

### Hypothesis. Aims

In view of these facts and in continuation of efforts to discover potentially active new antimicrobial agents, the synthesis of two series of various N-substituted 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones, their physico-chemical and spectral characterization and an evaluation of their antimicrobial activities are reported herein.

### Materials and methods

All the synthesized intermediate and final compounds, were physico-chemically characterized and for each compound melting temperature, reaction yield, molecular formula, relative weight and solubility in different solvents were determined.



The progress and completion of the reactions and the purity of the synthesized compounds was monitored by TLC, using as eluting system a mixture of heptane-ethyl acetate 3:7 v/v and UV light to visualize the spots.

Structural elucidation of the synthesized compounds was performed using quantitative elemental analysis of C, H, N, S, and by recording the IR, MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR spectra.

*In vitro* antimicrobial activity was determined using the disc diffusion technique according to the CLSI guidelines and the results were assessed as growth inhibition zone diameters.

All compounds were tested for their antibacterial activity against two G(-) (*S. typhimurium* ATCC 13311 and *E. coli* ATCC 25922) and three G(+) (*L. monocytogenes* ATCC 35152, *S. aureus* ATCC 25923 and *B. cereus* ATCC 13061) bacterial strains. The antifungal activity of the compounds was evaluated against a strain of *C. albicans* ATCC 90028. Ciprofloxacin was used as a reference antibiotic for antibacterial activity test and antifungal fluconazole as a reference for the antifungal activity test.

## Results and discussion

5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones **5** and **9** were synthesized by Knoevenagel condensation with 2,6-dichloro-benzaldehyde and 4-methoxy-benzaldehyde, respectively. For N-substitution, the 5 arylidene-thiazolidine-2,4-diones were converted into potassium salts at the nitrogen atom in the thiazolidine-2,4-dione moiety, and then the obtained potassium salts were treated with various  $\alpha$ -halo-ketones, to give the target compounds, the N-(aryl-alkyl-oxo)-5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones **8-h** and **10a-h**.

All compounds showed good C, H, N, S quantitative elemental analysis results, consistent with the calculated values and the spectral analysis data were consistent with the assumed structures.

The antimicrobial screening showed that all tested compounds had a modest to good inhibitory activity against G(+) and G(-) bacteria compared with ciprofloxacin. All synthesized compounds were active and exhibited a moderate antibacterial activity against *E. coli* and *S. typhimurium*. The 5-(4-methoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones **10a-h** were generally more active than the 5-(2,6-dichloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones **8a-h**, suggesting that substitution of the thiazolidine-2,4-dione ring with a methoxy-benzylidene moiety in the fifth position rather than with a 2,6-dichloro-benzylidene moiety favoured the antibacterial activity of the compounds against G(-) bacteria. On the contrary, the 5-(2,6-dichloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones **8a-h** displayed better antibacterial activity than the 5-(4-methoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones **10-h** against G(+) bacteria, probably as a result of some differences in the intracellular uptake of the compounds. The antibacterial activity of the compounds **8a**, **8c**, **8e-f** and **10a**, was generally better than that of other N-(aryl-alkyl-oxo)-5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones, suggesting that the presence of

an electron-withdrawing group, such as nitro, nitrile and carbonyl on the aromatic ring plays an important role for the antibacterial activity of the compound.

With respect to antifungal activity, most of the synthesized compounds showed moderate to good inhibitory activity against *C. albicans*. The most active compounds were the unsubstituted 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones **5** and **9**, which showed superior inhibitory activity against fluconazole.

### Conclusions

In conclusion, two series of new 5-(2,6-dichloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones and 5-(4-methoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones were synthesized and their structures were confirmed by analytical techniques:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS and quantitative elemental analysis. The synthesized compounds were evaluated for antibacterial and antifungal activity against several G(-) and G(+) bacteria and a fungal strain of *C. albicans*. The results of the antimicrobial screening revealed that all the tested compounds have antibacterial and antifungal properties while some of them showed the most promising antimicrobial activity: compounds **8c**, **8e**, **9**, **10c** showed better inhibitory activity than ciprofloxacin against *S. aureus*, compounds **8e**, **8f** were more active against *L. monocytogenes*, compound **8f** was significantly more active than ciprofloxacin against *B. cereus*, and compounds **5** and **9** were more active than fluconazole against *C. albicans*.

## Study 3. Synthesis and antimicrobial activity of some new 5-arylidene-thiazoline-4-ones

### Introduction

Compounds containing heterocyclic systems in their structure draw researchers special attention as they belong to classes of drugs with proven utility in medicinal chemistry.

Among pentaatomic heterocyclic rings, thiazoline-4-ones are of particular interest due to their wide range of biological activities: antifungal, antiviral, anti-inflammatory, hypoglycemic, antioxidant, analgesic, cardiogenic, anti-tubercular, etc. In addition, substituted thiazolyl-4-ones have found applications in the development of bioactive compounds with potential to treat bacterial infections, allergies, schizophrenia, hypertension and, more recently, in the treatment of pain, Alzheimer's disease, various types of tumors and hepatitis B.

### Hypothesis. Aims

Based on the wide range of potential therapeutic applications of thiazoline-4-ones and as a continuation of our research in identifying valuable compounds in the design of new antimicrobial agents, potent and less toxic, this study presents the

synthesis of new 2-(allyl/aryl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones, the physico-chemical and spectral characterization of the synthesized compounds and the investigation of their antibacterial and antifungal potential.

### Materials and methods

The intermediate and final synthesized compounds were analytically and physico-chemically characterized, as melting point, reaction yield, molecular formula, relative weight and solubility in different solvents were determined for each compound.

The progress and completion of the reactions and the purity of the synthesized compounds was monitored by TLC, using a mixture of heptane-ethyl acetate 3:7 v/v as elution system and UV light for spots visualization.

In order to elucidate the structures of the synthesized compounds, C, H, N, S elemental analysis and spectral methods (infrared spectrometry, mass spectrometry, proton and carbon nuclear magnetic resonance spectrometry) were used.

*In vitro* antimicrobial activity was determined using the cup-plate agar diffusion method, according to the CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines and the results were assessed as inhibition zone diameters. All synthesized compounds were subjected to antimicrobial screening against a G(-) (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311), a G(+) (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) bacterial strain and against one fungal strain of *Candida albicans* ATCC 90028. Ciprofloxacin and fluconazole were used as reference substances.

### Results and discussion

A series of new 2-(allylamino)-5-arylidene-thiazol-4(5H)-ones **12a-h**, 2-(phenylamino)-5-arylidene-thiazol-4(5H)-ones **14a-e** and 2-(naphtalen-1-il-amino)-5-arylidene-thiazol-4(5H)-ones **16a-e** were synthesized starting from various thiourea derivatives. Through their condensation with  $\alpha$ -ethyl-bromoacetate or monochloroacetic acid was obtained the 2-substituted thiazoline-4-one ring, followed by modulation of the fifth position by Knoevenagel condensation with various aromatic aldehydes.

All compounds showed good C, H, N, S elemental analysis results, consistent with the calculated values. Data from spectral analysis confirmed the structures of the synthesized compounds.

The antimicrobial screening results showed that all the synthesized compounds were active, having a moderate antibacterial activity against *S. typhimurium*. Although no major differences were observed among the tested compounds regarding the inhibitory activity against G(-) bacteria. of these the 2-(phenyl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones **14a-e** and the 2-(allyl/aryl-amino)-thiazoline-4-ones **11**, **13**, **15** were generally, slightly more active than the rest of the compounds. The synthesized compounds were active against *S. aureus*, showing modest to good inhibitory activities,

the compounds **14c** and **16a-e** exhibiting an antibacterial activity similar to better than that of ciprofloxacin. The 2-(1-naphthyl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones **16a-e** were more active than the thiazoline-4-ones **12a-h** and **14a-e** against *S. aureus*, suggesting that the presence of a  $\alpha$ -naphthyl-amine moiety in the 2-position of the thiazoline-4-one ring, is more favorable to the antibacterial activity against G(+) bacteria, possibly as a result of the difference in intracellular uptake of the compound. 2-(allyl/aryl-amino)-thiazoline-4-ones **11**, **13** and **15** showed lower inhibitory activity of than that of their 5-substituted derivatives, suggesting that the introduction of an arylidene moiety in the 5-position of the thiazoline-4-one ring significantly increases the activity against *S. aureus* of the compounds.

In regards to the antifungal activity of the tested compounds, all synthesized compounds presented moderate to good inhibitory activity against *C. albicans*. Among them, compounds **13**, **12f**, **12g**, **15** and **16e** displayed similar or superior antifungal activity to that of fluconazole. The 2-(allyl-amino)-5-arylidene-thiazoline-4-ones **12a-h** and the 5-unsubstituted 2-(allyl/aryl-amino)-thiazoline-4-ones **11**, **13**, **15** were more active than the rest of the compounds against *C. albicans*, suggesting that the presence of an allyl substituent to the amino group from the 2-position of the thiazoline-4-one is favorable to the antifungal activity of the compounds.

### Conclusions

A series of new 2-(allylamino)-5-arylidene-thiazol-4(5H)-ones, 2-(phenylamino)-5-arylidene-thiazol-4(5H)-ones and 2-(naphthalen-1-yl-amino)-5-arylidene-thiazol-4(5H)-ones were synthesized. The structural elucidation of the newly synthesized compounds was based on C, H, N, S quantitative elemental analysis and spectroscopic data (MS, FTIR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR). Their antimicrobial activities were assessed against several standardized strains of G(-) and G(+) bacteria and one strain of fungi (*C. albicans*). The antimicrobial screening results revealed that all the synthesized compounds have antibacterial and antifungal properties. All the compounds presented moderate antibacterial activity against *S. typhimurium*, good antifungal activity against *C. albicans* (compound **15**), while some of them (compounds **16a-c**) showed a promising antibacterial activity against *S. aureus*, sometimes superior to that of the antibiotic used as reference.

## Study 4. Antioxidant activity of some new thiazolidine-2,4-diones and thiazoline-4-ones

### Introduction

By producing reactive oxygen species during metabolic and physiological processes, living organisms set into motion a series of reactions in order to counteract them through enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms. An imbalance

between the amount of ROS (reactive oxygen species) produced and the capacity of the antioxidant defense systems of the human body to prevent the effects of ROS on cells, generates oxidative stress.

Caused by the excess of reactive oxygen and nitrogen species, the oxidative stress is incriminated in the pathogenesis of many and serious conditions such as atherosclerosis, myocardial infarction, diabetes and its complications, neurodegenerative diseases, cancer, liver cirrhosis, etc. Therefore, the role of antioxidants in the body defense system from different types of radicals impairments is essential.

Many thiazoline-4-ones and thiazolidine-2,4-diones have been reported in the literature with proven antioxidant properties, with the possible applications to a wide range of diseases such as diabetes and its micro- and macrovascular complications (diabetic retinopathy, diabetic neuropathy and diabetic nephropathy), various cancers, cataract and macular degeneration, various neurodegenerative diseases, atherosclerosis and its consecutive cardiovascular diseases, etc.

### **Hypothesis. Aims**

In view of the above, in this study we aimed to evaluate the antioxidant potential of the new thiazolidine-2,4-diones and thiazoline-4-ones thiazolin, whose synthesis has been presented in the previous chapters. The antioxidant potential of the synthesized compounds was assessed *in vitro* by determining their ability to inhibit DPPH free radicals.

### **Materials and methods**

The antioxidant potential of the synthesized compounds was assessed by measuring their ability to inhibit DPPH free radicals according to the method described in the literature, with a few minor changes. BHT and ascorbic acid were used as reference antioxidants. Subsequently, we evaluated the ability of DPPH free radicals scavenging activity by plotting the percentage depending on its concentration, which allowed calculation of IC<sub>50</sub>.

### **Results and discussion**

From a total of 36 thiazolidine-2,4-diones, which were subjected to the DPPH assay, only 7 compounds showed a modest ability to inhibit DPPH free radicals, the other compounds were inactive at the tested concentration. Regarding the thiazoline-4-ones, from 21 tested compounds, 13 showed a modest to good inhibitory activity, while the remaining compounds were inactive. Among the thiazolidine-2,4-diones, the 5-(2,6-dichlorobenziliden)-3-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)thiazolidine-2,4-dione **8c** had the best antioxidant activity, however, lower than that of ascorbic acid and BHT. There was a mild increase in the free radical scavenging activity for N-(aryl-alkyl-oxo)-5-(2,6-dichloro-benzylidene)-thiazolidine-2,4-diones as compared to the rest of the

thiazolidine-2,4-diones. 2-(allylamino)-5-((6-chloro-4-oxo-4H-chromen-3-yl)methylene) thiazol-4(5H)-one **12e** was the most active compound of the thiazoline-4-ones, having better antioxidant activity than that of the reference compounds.

In general, the thiazoline-4-ones displayed a better antioxidant activity than the thiazolidine-2,4-diones, compounds **12e** and **16e** exhibiting a higher antioxidant potential than that of the reference compounds.

### Conclusions

The antioxidant potential of the synthesized thiazoline-4-ones and thiazolidine-2,4-diones presented in the previous studies was evaluated. The antioxidant properties were tested using the DPPH method, by evaluating the DPPH free radicals scavenging activity, as compared to ascorbic acid and BHT. The thiazoline-4-ones were more active than the thiazolidine-2,4-diones, compounds **12e** and **16e** showing superior antioxidant activity to that of ascorbic acid and BHT, with IC<sub>50</sub> values lower than the reference compounds.

### Originality and innovative contributions of the thesis

Originality of the thesis consists of this present research contributions to the broadening of libraries of compounds with potential antibacterial, antifungal and antioxidant activity and with original structures, by:

- Development of:

- 4 series of N-substituted 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones, including 34 novel compounds which have not been reported in the literature;
- 3 series of 5-arylidene-thiazoline-4-ones, including 18 new compounds also not reported in the literature.

- Collecting biological data from antibacterial, antifungal and antioxidant potential evaluation, which allowed the quality relationships establishing between the compounds and their properties - *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity. The experimental data obtained enabled the selection of the leading molecules with the most promising activity for the biological effects studied. Starting from these prototype molecules, during further research studies, the premises for the optimization of compounds by docking studies, followed by new chemical pharmacomodulations to improve the biological, pharmacokinetic and biopharmaceutical properties are created.

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Contribuții la sinteza și prospectarea activității biologice a unor noi compuși tiazolidin- dionici și tiazolin-onici

---

Doctorand **Anca-Daniela Stana**

---

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

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	17
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Tiazolidin-2,4-dione</b>	21
1.4. Aspecte de structură. Proprietăți fizico-chimice și date spectrale	21
1.5. Metode de sinteză și farmacomodulări	22
1.6. Aplicații terapeutice	24
1.3.1. Tiazolidin-2,4-dione hipoglicemiente	24
1.3.2. Tiazolidin-2,4-dione inhibitoare ale aldoreductazei	27
1.3.3. Tiazolidin-2,4-dione antitumorale	29
1.3.3.1. Tiazolidin-2,4-dione agoniste a receptorilor PPAR $\gamma$	29
1.3.3.2. Tiazolidin-2,4-dione inhibitoare a IGF-1R	31
1.3.3.3. Tiazolidin-2,4-dione inhibitoare ale HDAC	31
1.3.3.4. Tiazolidin-2,4-dione inhibitoare ale căilor de semnalizare Raf/MEK/ERK și PI3K/Akt	32
1.3.3.5. Tiazolidin-2,4-dione active în tumori hormono-dependente	32
1.3.3.6. Tiazolidin-2,4-dione inhibitoare ale VEGFR	33
1.3.4. Tiazolidin-2,4-dione antioxidante și antiinflamatoare	33
1.3.5. Tiazolidin-2,4-dione antiartrite	35
1.3.6. Tiazolidin-2,4-dione antimicrobiene și antiprotozoarice	36
1.3.7. Tiazolidin-2,4-dione cu alte acțiuni farmacologice	38
<b>2. Tiazolin-4-one</b>	40
2.3. Metode generale de sinteză	40
2.4. Aplicații terapeutice	42
2.3.1. Tiazolin-4-one antiinflamatoare	42
2.3.2. Tiazolin-4-one antitumorale	44
2.3.3. Tiazolin-4-one antimicrobiene	46
2.3.4. Tiazolin-4-one antioxidante și cu alte acțiuni farmacologice	47
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru. Obiective</b>	51
<b>2. Metodologie generală</b>	55
<b>3. Studiul 1. Sinteza și activitatea antimicrobiană a unor 5-</b>	57



## ariliden-tiazolidin-2,4-dione N-substituite

3.1. Introducere	57
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective	58
3.3. Material și metodă	58
3.3.1. Sinteza chimică	58
3.3.1.1. Procedeu general de sinteză al 5-((2-feniltiazol-4-il)metilen)tiazolidin-2,4-dionei (compusul <b>2</b> )	59
3.3.1.2. Procedeu general de sinteză al 5-((2-feniltiazol-4-il)metilen)tiazolidin-2,4-dionelor N-substituite <b>4a-i</b>	
3.3.1.3. Procedeu general de sinteză al 3-((2'-fenil-2,4'-bistiazol-4-il)metil)-5-((2-feniltiazol-4-il)metilen)tiazolidin-2,4-dionei <b>4j</b>	60
3.3.1.4. Procedeu general de sinteză al 5-(2,6-diclorobenziliden)-tiazolidin-2,4-dionelor N-substituite <b>6a-g</b>	60
3.3.2. Activitatea antibacteriană și antifungică	61
3.4. Rezultate și discuții	62
3.4.1. Sinteza 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionelor N-substituite	62
3.4.2. Caracterizarea fizico-chimică a 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionelor	63
3.4.3. Analiza structurală spectrală a 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionelor	66
3.4.3.1. Date spectrale SM	66
3.4.3.2. Date spectrale IR	69
3.4.3.3. Date spectrale $^1\text{H}$ RMN și $^{13}\text{C}$ RMN	72
3.4.4. Activitatea antibacteriană și antifungică a compușilor sintetizați	76
3.5. Concluzii	78
<b>4. Studiul 2. Sinteza și activitatea antimicrobiană a unor noi N-(aril-oxo-alkil)-5-ariliden-tiazolidin-2,4-dione</b>	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza cercetării. Obiective	80
4.3. Material și metodă	80
4.3.1. Sinteza chimică	80
4.3.1.1. Procedeu general de sinteză al compușilor <b>5</b> și <b>9</b>	81
4.3.1.2. Procedeu general de sinteză al compușilor <b>8a-h</b>	82
4.3.1.3. Procedeu general de sinteză al compușilor <b>10a-h</b>	82
4.3.2. Activitatea antibacteriană și antifungică	82
4.4. Rezultate și discuții	83
4.4.1. Sinteza noilor N-(aril-oxo-alkil)-5-ariliden-tiazolidin-2,4-dione	83
4.4.2. Caracterizarea fizico-chimică a N-(aril-oxo-alkil)-5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionelor <b>8a-h</b> și <b>10a-h</b>	85
4.4.3. Analiza structurală spectrală a N-(aril-oxo-alkil)-5-ariliden-	88

tiazolidin-2,4-dionelor <b>8a-h</b> și <b>10a-h</b>	
4.4.3.1. Date spectrale SM	88
4.4.3.2. Date spectrale IR	90
4.4.3.3. Date spectrale <sup>1</sup> H RMN și <sup>13</sup> C RMN	94
4.4.4. Activitatea antibacteriană și antifungică	99
4.5. Concluzii	101
<b>5. Studiul 3. Sinteza și activitatea antimicrobiană a unor noi 5-ariliden-tiazolin-4-one</b>	103
5.1. Introducere	103
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	104
5.3. Material și metodă	104
5.3.1. Sinteza chimică	104
5.3.1.1. Procedeele generale de sinteză al 2-alilamino-tiazolin-4-onei <b>11</b>	105
5.3.1.2. Procedeele generale de sinteză al 2-arilamino-tiazolin-4-onelor <b>13</b> și <b>15</b>	105
5.3.1.3. Procedeele generale de sinteză al 2-(alil/aryl-amino)-5-ariliden-tiazolin-4-onelor <b>12a-h</b> , <b>14a-e</b> și <b>16a-e</b>	106
5.3.2. Activitatea antibacteriană și antifungică	106
5.4. Rezultate și discuții	107
5.4.1. Sinteza chimică a noilor 2-(alil/aryl-amino)-5-ariliden-tiazolin-4-one	107
5.4.2. Caracterizarea fizico-chimică a 2-(alil/aryl)-5-ariliden-tiazolin-4-onelor <b>12a-h</b> , <b>14a-e</b> și <b>16a-e</b>	108
5.4.3. Analiza structurală spectrală a 2-(alil/aryl-amino)-5-ariliden-tiazolin-4-onelor <b>12a-h</b> , <b>14a-e</b> și <b>16a-e</b>	112
5.4.3.1. Date spectrale SM	112
5.4.3.2. Date spectrale IR	115
5.4.3.3. Date spectrale <sup>1</sup> H RMN și <sup>13</sup> C RMN	119
5.4.4. Activitatea antibacteriană și antifungică	124
5.5. Concluzii	126
<b>6. Studiul 4. Activitatea antioxidantă a unor noi compuși tiazolidin-2,4-dionici și tiazolin-4-onici</b>	127
6.1. Introducere	127
6.2. Ipoteza de lucru. Obiective	128
6.3. Material și metodă	129
6.3.1. Metoda DPPH	129
6.3.2. Evaluarea potențialului antioxidant prin metoda DPPH	130
6.4. Rezultate și discuții	131
6.5. Concluzii	134
<b>7. Concluzii generale</b>	135

**8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei** 139**REFERINȚE** 141

**Cuvinte cheie:** tiazolidin-2,4-dione, tiazolin-4-one, condensare Knoevenagel, activitate antibacteriană, activitate antifungică, efect antioxidant

### Introducere

Infecțiile cu bacterii și funghi, la pacienții imunocompetenți dar mai ales la cei imunocompromiși, înregistrează și în zilele noastre procente de mortalitate și morbiditate îngrijorătoare. În plus, tratamentul acestor infecții comunitare sau nozocomiale, implică mari costuri pentru sistemele de sănătate din întreaga lume.

La ora actuală, în terapia infecțiilor bacteriene sunt autorizate peste 200 de molecule de antibiotice, iar infecțiile fungice beneficiază, de asemenea, de câteva clase de chimioterapice, cea mai bine reprezentată ca număr de molecule autorizate fiind cea a azolilor. În consecință, arsenalul terapeutic reprezentat de antibioticele antibacteriene și chimioterapicele antifungice poate fi considerat ca fiind unul important. Din păcate însă, în timp a apărut rezistența microbilor la agenții antiinfecțioși disponibili clinic, fenomen care se află într-o creștere îngrijorătoare în ultimii ani.

Pentru limitarea dezvoltării acestui fenomen, este necesară descoperirea de compuși antimicrobieni cu structuri chimice și mecanisme de acțiune noi, față de care rezistența microbiană s-ar putea instala mai lent. Compușii heterociclici au fost și sunt încă intens studiați ca agenți antimicrobieni, în literatura de specialitate fiind raportate numeroase molecule cu potențial antibacterian și antifungic din clasa tiazolului și a derivaților acestuia (tiazoline, tiazolidine).

Pe de altă parte, unii compuși tiazolidin-dionici și tiazolin-onici sunt raportați în literatura de specialitate și pentru proprietățile antioxidante pe care le prezintă. Fiind cunoscut efectul speciilor radicalice de oxigen în apariția a numeroase patologii, importanța descoperirii unor molecule capabile să contracareze efectele nocive ale radicalului hidroxil, a radicalului anionic superoxid sau a radicalului hidroperoxid este una marcantă.

Pornind de la premisele descrise mai sus, lucrarea de față prezintă sinteza chimică a câtorva serii de compuși noi, care au ca nucleu de bază ciclurile tiazolidin-2,4-dionic, respectiv 2-tiazolin-4-onic și investigarea potențialului antibacterian, antifungic și antioxidant al acestora. Scopul principal al cercetării l-a constituit descoperirea unor molecule leader, în cadrul fiecărei serii de compuși, de la care să poată fi ulterior dezvoltăți, prin aplicarea metodelor de farmacomodulare specifice

chimiei medicamentului, analogi structurali cu proprietăți biologice, farmacocinetice și biofarmaceutice optimizate, și care să interacționeze mai bine cu țintele specifice.

## **Studiul 1. Sinteza și activitatea antimicrobiană a unor 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dione N-substituite**

### **Introducere**

Încă de la descoperirea lor și până în prezent, antibioticele au avut o contribuție incontestabilă la îmbunătățirea sănătății publice și creșterea speranței de viață. Însuși succesul de care s-au bucurat aceste medicamente a determinat adesea utilizarea inadecvată și irațională a acestora, fapt care a condus la apariția și dezvoltarea fenomenului de rezistență microbiană, aflat în continuă creștere la nivel mondial. În pofida numărului mare de agenți antimicrobieni disponibili pentru terapia antiinfecțioasă, creșterea dramatică a germenilor patogeni rezistenți la diferite clase de chimioterapice, a condus la necesitatea implementării de noi strategii pentru dezvoltarea de noi agenți terapeutici la care rezistența microbiană să fie scăzută sau chiar absentă.

Derivații de TZD au fost studiați extensiv și s-a constatat că nucleul de bază tiazolidin-2,4-dionic reprezintă fragmentul farmacofor responsabil pentru diverse efecte biologice: hipoglicemizante, anticanceroase, antimicrobiene, antioxidante, analgezice, cardiotonice, inhibitori asupra aldozo-reductazei, antiinflamatoare. S-a raportat în literatură că introducerea de fragmente ariliden în poziția 5 a inelului tiazolidin-2,4-dionic duce la îmbunătățirea activității antimicrobiene.

### **Ipoteza de lucru. Obiective**

Pornind de la potențialul biologic remarcant al derivaților de TZD și ca parte a eforturilor noastre în domeniul descoperirii de noi agenți terapeutici cu potențial antimicrobian, în acest studiu ne-am propus sinteza a două serii de 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dione, divers substituie la atomul de azot din poziția 3, caracterizarea fizico-chimică și spectrală (IR, SM,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN) a compușilor sintetizați și evaluarea activității antibacteriene și antifungice ale acestora.

### **Material și metodă**

Compușii sintetizați, intermediari și finali, au fost caracterizați din punct de vedere fizico-chimic, determinându-se pentru fiecare compus punctul de topire, randamentul de reacție și solubilitatea în diferiți solvenți.

Pentru monitorizarea progresului și finalizării reacțiilor, precum și a purității compușilor sintetizați s-a utilizat cromatografia pe strat subțire (CSS), utilizând ca sistem de eluție un amestec de heptan-acetat de etil 3:7 v/v și lumină UV pentru vizualizarea spoturilor.

Pentru confirmarea structurală a compușilor sintetizați s-a recurs la analiza elementală cantitativă de C, H, N și S și la analiza spectrală (MS, IR,  $^1\text{H}$  RMN și  $^{13}\text{C}$  RMN).

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a fost evaluată prin metoda difuzimetrică, tehnica godeurilor conform regulilor Institutului pentru Standarde Clinice și de Laborator, utilizând ciprofloxacina și fluconazolul ca substanțe de referință. Activitatea antibacteriană a compușilor sintetizați **2**, **4a-j**, **5** și **6a-g** a fost evaluată împotriva mai multor tulpini bacteriene patogene standardizate Gram-negative (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922) și Gram-pozitive (*Listeria monocytogenes* ATCC 35152, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 13061 și *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Activitatea antifungică a compușilor menționați mai sus a fost evaluată împotriva unei tulpini standardizate de *Candida albicans* ATCC 90028.

### Rezultate și discuții

5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionele **2** și **5** au fost sintetizate prin condensare Knoevenagel a tiazolidin-2,4-dionei cu aldehidele aromatice corespunzătoare. 5-ariliden-2,4-tiazolidin-dionele **2** și **5** obținute au fost convertite în săruri de potasiu la atomul de N din poziția 3 al heterociclului tiazolidin-2,4-dionic și au fost tratate ulterior cu diferiți derivați halogenați, pentru a obține compușii țintă 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionele N-alchilate (**4a-j** și **6a-g**).

Toți compușii sintetizați au dat rezultate bune la analiza elementală cantitativă de C, H, N și S, în concordanță cu valorile teoretice calculate. Toate datele spectrale au fost în conformitate cu structurile asumate.

În urma testării activității antimicrobiene a rezultat că majoritatea compușilor sintetizați au prezentat o activitate inhibitorie modestă asupra bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative luate în studiu, excepție făcând compusul **5** care a prezentat un efect inhibitor bun asupra tulpinilor Gram-negative, similar cu cel al ciprofloxacinei. 5-(2,6-dicloro-benziliden)tiazolidin-2,4-diona **5** a fost singurul compus care a prezentat activitate antibacteriană împotriva *L. monocytogenes*. Toți compușii sintetizați au fost activi, prezentând o activitate inhibitorie moderată împotriva tulpinilor de *E. faecalis*, *E. coli* și *S. typhimurium*. 5-(2-fenil-4-tiazolil-metiliden)tiazolidin-2,4-dionele **2** și **4a-j** au fost mai active decât 5-(2,6-dicloro-benziliden)tiazolidin-2,4-dionele N-substituie **6a-g**, sugerând faptul că prezența nucleului tiazolic îmbunătățește activitatea compușilor. Compușii **4d-f** au prezentat un efect inhibitor superior compușilor **2**, **4a-c** și **4g** asupra *S. typhimurium*, sugerând că substituirea atomului de azot din poziția 3 a nucleului tiazolidin-2,4-dionic cu grupări alchil lipofile are un efect benefic asupra proprietăților antibacteriene.

În ceea ce privește activitatea antifungică, majoritatea compușilor sintetizați au prezentat o activitate inhibitorie bună pe *C. albicans*, la concentrațiile testate. Cei mai activi compuși au fost 3-((2'-fenil-2,4'-bistiazol-4-il)metil)-5-((2-feniltiazol-4-il)metilen)tiazolidin-2,4-diona **4j**, cu trei nuclee tiazolice în structură și 5-(2,6-dicloro-

benziliden) tiazolidin-2,4-diona nesubstituită **5**, care au înregistrat o activitate antifungică foarte bună, mult superioară fluconazolului. Cel mai activ compus, atât în ceea ce privește activitatea antibacteriană cât și cea antifungică, a fost compusul **5**, sugerând că prezența atomilor de clor pe nucleul aromatic care cresc lipofilia compusului precum și lipsa substituenților de la atomul de azot tiazolidin-2,4-dionic a 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionelor, joacă un rol important în îmbunătățirea proprietăților antimicrobiene ale acestei clase de compuși.

### Concluzii

În concluzie, în cadrul acestui studiu a fost sintetizată o serie de 11 noi 5-((2-feniltiazol-4-il)metilen)tiazolidin-2,4-dione și o serie de 7 noi 5-(2,6-dicloro-benziliden)tiazolidin-2,4-dione. Toți compușii au fost caracterizați cu ajutorul mai multor tehnici analitice:  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, SM și analiză elementală, după care au fost evaluați pentru activitatea antibacteriană și antifungică. Rezultatele activității antimicrobiene au indicat activități antibacteriene și antifungice promițătoare pentru unii dintre compușii testați, compusul **5** înregistrând activitate inhibitorie asupra *S. aureus* superioară ciprofloxacinei, iar compușii **4j** și **5** prezentând activitate inhibitorie asupra *C. albicans* mai bună decât fluconazolul.

## Studiul 2. Sinteza și activitatea antimicrobiană a unor noi N-(aril-oxo-alchil)-5-ariliden-tiazolidin-2,4-dione

### Introducere

Compușii heterociclici sunt de mult timp considerați ca o clasă foarte importantă în domeniul chimiei organice sintetice. Derivații de tiazolidin-2,4-dionă se bucură de o atenție deosebită din partea cercetătorilor din domeniul chimiei medicamentului datorită gamei diverse de acțiuni farmacologice pe care le posedă, precum acțiunea antidiabetică, antioxidantă, analgezică, antiartritică, antiinflamatoare, antitumorală, antibacteriană și antifungică. Pe lângă activitatea antidiabetică pe care o înregistrează, tiazolidin-2,4-dionele substituie în poziția 5 reduc stresul oxidativ și inhibă supraproducția intracelulară de radicali liberi. Conform datelor din literatura de specialitate, 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionele pot acționa ca inhibitori promițători ai 15-hidroxi prostaglandin dehidrogenazei, ca inhibitori ai MurD ligazei și ca potențiali agenți antimicrobieni.

### Ipoteza de lucru. Obiective

În contextul cercetărilor menționate anterior în direcția dezvoltării unor compuși N-alchil-tiazolidin-2,4-dionici, și ca o continuare a interesului pentru identificarea de compuși valoroși în cadrul design-ului de noi agenți antimicrobieni potenți și mai puțin toxici, studiul de față prezintă sinteza unor N-aril-oxo-alchil-

tiazolidin-2,4-dione, caracterizarea fizico-chimică și spectrală a compușilor sintetizați și investigarea activității lor antimicrobiene.

### Material și metodă

Compușii sintetizați, intermediari și finali, au fost caracterizați din punct de vedere fizico-chimic, determinându-se pentru fiecare compus puțnctul de topire, randamentul de reacție, formula moleculară, masa relativă și solubilitatea în diferiți solvenți.

Progresul și finalizarea reacțiilor, precum și puritatea compușilor sintetizați au fost monitorizate prin CSS, utilizând ca sistem de eluție un amestec de heptan-acetat de etil 3:7 v/v și lumina UV pentru vizualizarea spoturilor.

Confirmarea structurilor compușilor sintetizați s-a realizat cu ajutorul analizei elementale cantitative de C, H, N, S și prin înregistrarea spectrelor în infraroșu, a spectrelor de masă și a spectrelor de rezonanță magnetică nucleară de carbon și de proton.

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a fost determinată utilizând metoda difuzimetrică, tehnica godeurilor conform regulilor Institutului pentru Standarde Clinice și de Laborator, evaluarea rezultatelor realizându-se prin înregistrarea diametrelor zonelor de inhibiție. Toți compușii sintetizați au fost supuși unui screening antibacterian împotriva a două tulpini bacteriene G(-) (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922) și trei tulpini G(+) (*Listeria monocytogenes* ATCC 35152, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 13061). Activitatea antifungică a fost evaluată împotriva unei tulpini de *Candida albicans* ATCC 90028. Ciprofloxacina a fost utilizată ca antibiotic de referință, iar fluconazolul ca antimicotic de referință.

### Rezultate și discuții

Într-o prima etapă au fost sintetizate 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionele **5** și **9** prin modularea poziției 5 a heterociclului tiazolidin-2,4-dionic, prin condensarea Knoevenagel a acestuia cu 2,6-dicloro-benzaldehida și respectiv, 4-metoxi-benzaldehida. În vederea N-substituției, 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionele sintetizate au fost transformate în săruri de potasiu la nivelul atomului de azot din nucleul tiazolidin-2,4-dionic, iar ulterior sărurile de potasiu obținute au fost tratate cu diverse  $\alpha$ -halo-cetone, când s-au obținut compușii țintă, N-(aril-oxo-alcil)-5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionele **8a-h** și **10a-h**.

Toți compușii au dat rezultate bune în urma analizei elementale cantitative C, H, N și S, în concordanță cu valorile calculate, iar datele obținute în urma analizelor spectrale efectuate au fost în concordanță cu structurile presupuse.

În urma screening-ului antimicrobian a rezultat că toți compușii testați au prezentat o activitate inhibitorie modestă spre bună împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative, în comparație cu ciprofloxacina, utilizat ca antibiotic de

referință. Toți compușii sintetizați au fost activi, înregistrând o activitate antibacteriană moderată împotriva tulpinilor de *E. coli* și *S. typhimurium*. 5-(4-metoxi-benziliden)-tiazolidin-2,4-dionele **10a-h** au fost în general mai active decât 5-(2,6-dicloro-benziliden)tiazolidin-2,4-dionele **8a-h**, sugerând faptul că substituția inelului tiazolidin-2,4-dionic în poziția 5 cu un fragment 4-metoxi-benzilidenic, este mai favorabilă activității antibacteriene împotriva bacteriilor Gram (-), decât substituția cu un rest 2,6-dicloro-benzilidenic. Dimpotrivă, 5-(2,6-dicloro-benziliden)tiazolidin-2,4-dionele **8a-h** au manifestat o activitate antibacteriană mai bună decât 5-(4-metoxi-benziliden)tiazolidin-2,4-dionele **10a-h** împotriva bacteriilor Gram (+), probabil ca urmare a unor diferențe în ceea ce privește asimilarea intracelulară a compușilor. Activitatea antibacteriană a compușilor **8a**, **8c**, **8e-f** și **10a-c** a fost în general mai bună decât cea a celorlate N-(aril-oxo-alchil)-5-ariliden-tiazolidin-2,4-dione sugerând că prezența unei grupări atrăgătoare de electroni cum ar fi nitro, nitril și carbonil pe nucleul aromatic joacă un rol important pentru activitatea antibacteriană a compușilor.

Referitor la activitatea antifungică, majoritatea compușilor sintetizați au arătat o activitate inhibitorie moderată spre bună împotriva tulpinii de *C. albicans*. Cei mai activi compuși au fost 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dionele nesubstituite **5** și **9** care au prezentat activitate inhibitorie superioară fluconazolului, utilizat ca referință.

### Concluzii

În concluzie, au fost sintetizate două serii de noi 5-(2,6-dicloro-benziliden)tiazolidin-2,4-dione și 5-(4-metoxi-benziliden)tiazolidin-2,4-dione. Structurile lor au fost confirmate prin tehnici analitice:  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, SM și analiză elementală cantitativă. Compușii sintetizați au fost evaluați pentru activitatea antibacteriană și antifungică împotriva mai multor bacterii Gram (-) și Gram (+) și a unei tulpini fungice de *Candida albicans*. Rezultatele screening-ului antimicrobian au arătat că toți compușii testați au proprietăți antibacteriene și antifungice în timp ce unii dintre ei au înregistrat unele dintre cele mai promițătoare activități antimicrobiene: compușii **8c**, **8e**, **9**, **10c** au prezentat activitate inhibitorie mai bună decât ciprofloxacina împotriva *S. aureus*, compușii **8e**, **8f** au fost mai activi pe *L. monocytogenes*, compusul **8f** a fost mult mai activ pe *B. cereus* decât ciprofloxacina, iar compușii **5** și **9** au fost mai activi pe *C. albicans* decât fluconazolul.

## Studiul 3. Sinteza și activitatea antimicrobiană a unor noi 5-ariliden-tiazolin-4-one

### Introducere

Datorită faptului că aparțin unor clase de substanțe medicamentoase cu utilitate demonstrată în chimia medicamentului, compușii care conțin în structura lor sisteme heterociclice se bucură de o atenție specială din partea cercetătorilor.



Dintre sistemele heterociclice pentaatomice, tiazolin-4-onele prezintă un interes deosebit datorită gamei largi de activități biologice: antifungică, antivirală, antiinflamatoare, hipoglicemiantă, antioxidantă, analgezică, cardiotonică, antituberculoasă, etc. De asemenea, tiazolin-4-onele substituie și-au găsit aplicații în dezvoltarea de compuși bioactivi cu activitate potențială pentru tratamentul infecțiilor bacteriene, a alergiilor, schizofreniei, hipertensiunii și, mai recent, în tratamentul durerii, bolii Alzheimer, a diferitelor tipuri de tumori și hepatitei B.

### **Ipoteza de lucru. Obiective**

Pornind de la paleta largă de aplicații terapeutice potențiale a compușilor tiazolin-4-onici și ca o continuare a interesului pentru identificarea de compuși valoroși în cadrul design-ului de noi agenți antimicrobieni, potenți și mai puțin toxici, studiul de față prezintă sinteza unor noi 2-(alil/aryl-amino)-5-aryliden-tiazolin-4-one, caracterizarea fizico-chimică și spectrală (IR, SM,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN) a compușilor sintetizați și investigarea potențialului antibacterian și antifungic.

### **Material și metodă**

Compușii intermediari și finali sintetizați au fost caracterizați din punct de vedere analitic și fizico-chimic, fiind determinate, pentru fiecare compus, temperatura de topire, randamentul de reacție, formula moleculară, masa relativă și solubilitatea în diferiți solvenți.

Progresul și finalizarea reacțiilor, precum și puritatea compușilor sintetizați au fost monitorizate prin CSS, utilizând un amestec de heptan-acetat de etil 3:7 v/v ca sistem de eluție și lumina UV pentru vizualizarea spoturilor.

Pentru elucidarea structurilor compușilor sintetizați s-a utilizat analiza elementală cantitativă C, H, N, S și metode spectrale (spectrometrie în infraroșu, spectrometrie de masă, spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară de proton și de carbon).

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a fost determinată utilizând metoda difuzimetrică, tehnica godeurilor, conform regulilor CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute), iar evaluarea rezultatelor s-a realizat prin înregistrarea diametrelor zonelor de inhibiție. Toți compușii sintetizați au fost supuși unui screening antibacterian împotriva unei tulpini bacteriene G(-) de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 și a unei tulpini G(+) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Activitatea antifungică a compușilor a fost evaluată împotriva unei tulpini fungice de *Candida albicans* ATCC 90028. Ciprofloxacina și fluconazolul au fost folosite ca substanțe de referință.

### **Rezultate și discuții**

O serie de noi 2-(alil-amino)-5-aryliden-tiazolin-4(5H)-one, 2-(fenil-amino)-5-aryliden-tiazol-4(5H)-one și 2-(1-naftil-amino)-5-aryliden-tiazol-4(5H)-one au fost

sintetizate pornind de la diferiți derivați de tiouree, prin condensarea acestora cu acid  $\alpha$ -monocloroacetic sau cu  $\alpha$ -bromoacetat de etil. Tiazolin-4-onele 2-amino substituie **11**, **13** și **15** obținute anterior, au fost supuse unor modulări în poziția cinci prin condensare cu diferite aldehide aromatice, când s-au obținut 2-(alil/aryl-amino)-5-aryliden-tiazolin-4-onele **12a-h**, **14a-e** și **16a-e**.

Toți compușii au dat rezultate bune în urma analizei elementale cantitative C, H, N și S, în concordanță cu valorile calculate. Datele obținute în urma analizei spectrale, au confirmat structurile compușilor sintetizați.

În urma screening-ului antimicrobian la care au fost supuși compușii sintetizați a rezultat ca toți compușii au fost activi, înregistrând o activitate antibacteriană moderată împotriva tulpinii de *S. typhimurium*. Deși între compuși nu s-au observat diferențe majore în ceea ce privește activitatea inhibitorie împotriva tulpinii bacteriene G(-) luată în studiu, dintre aceștia 2-(fenil-amino)-5-aryliden-tiazolin-4-onele **14a-e** și 2-(alil/aryl-amino)-tiazolin-4-onele **11**, **13**, **15** au fost, în general, puțin mai active decât restul compușilor. De asemenea, compușii sintetizați au fost activi împotriva tulpinii de *S. aureus*, prezentând activitate inhibitorie modestă spre bună, compușii **14c** și **16a-e** înregistrând activitate antibacteriană similară sau chiar mai bună decât cea a antibioticului de referință, ciprofloxacina. 2-(1-naftil-amino)-5-aryliden-tiazolin-4-onele **16a-e** au fost mai active decât tiazolin-4-onele **12a-h** și **14a-e**, împotriva tulpinii de *S. aureus* sugerând faptul că prezența în poziția 2 a inelului tiazolin-4-onic a unui fragment voluminos  $\alpha$ -naftil-aminic, este mai favorabilă activității antibacteriene împotriva tulpinii bacteriene G(+), decât prezența unui fragment alil-aminic sau fenil-aminic, probabil ca urmare a unor diferențe în ceea ce privește asimilarea intracelulară a compușilor. 2-(alil/aryl-amino)-tiazolin-4-onele **11**, **13** și **15** au prezentat o activitate inhibitorie inferioară compușilor 5-substituiți, sugerând faptul ca introducerea restului ariliden în poziția 5 a nucleului tiazolin-4-onic crește semnificativ activitatea antibacteriană a compușilor împotriva tulpinii de *S. aureus*.

Referitor la activitatea antifungică, compușii sintetizați au arătat o activitate inhibitorie moderată spre bună împotriva tulpinii de *C. albicans*, la concentrația testată. Dintre aceștia, compușii **13**, **12f**, **12g**, **15** și **16e** au înregistrat activitate antifungică similară sau superioară antimicotocului utilizat ca referință, fluconazolul. 2-(alil-amino)-5-aryliden-tiazolin-4-onele **12a-h**, precum și 2-(alil/aryl-amino)-tiazolin-4-onele 5-nesubstituie **11**, **13**, **15** au fost mai active decât ceilalți compuși împotriva tulpinii de *C. albicans* la concentrația testată, sugerând că prezența unui substituent de tip alil la nivelul aminei din poziția 2 a nucleului tiazolin-4-onic este favorabilă activității antifungice a compușilor.

## Concluzii

Au fost sintetizate o serie de noi 2-(alil-amino)-5-aryliden-tiazolin-4(5H)-one, 2-(fenil-amino)-5-aryliden-tiazol-4(5H)-one și 2-(1-naftil-amino)-5-aryliden-tiazol-4(5H)-

one. Confirmarea structurilor compușilor sintetizați s-a realizat cu ajutorul datelor obținute în urma analizei elementale cantitative și analizei spectrale (SM, FTIR,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN). Compușii sintetizați au fost evaluați pentru activitatea antibacteriană și antifungică împotriva mai multor tulpini standardizate de bacterii G(-) și G(+) și a unei tulpini fungice de *C. albicans*. Rezultatele screening-ului antimicrobian au arătat că toți compușii sintetizați au proprietăți antibacteriene și antifungice. Toți compușii au prezentat activitate antibacteriană moderată împotriva *S. typhimurium*, activitate antifungică moderată spre bună împotriva *C. albicans*, uneori superioară fluconazolului (compusul **15**), în timp ce unii compuși (**16a-c**) au înregistrat o activitate promițătoare împotriva tulpinii de *S. aureus*, superioară comparativ cu antibioticul de referință.

## **Studiul 4. Activitatea antioxidantă a unor noi compuși tiazolidin-2,4-dionici și tiazolin-4-onici**

### **Introducere**

Prin producerea speciilor reactive oxigenate în cadrul unor procese metabolice și fiziologice, organismele vii pun în mișcare o serie de reacții care au drept scop îndepărtarea acestora prin mecanisme enzimactice și non-enzimactice antioxidante. Apariția unui dezechilibru între cantitatea de SRO produsă și capacitatea sistemelor antioxidante de apărare ale organismului de anularea efectele asupra celulelor ale SRO, determină apariția stresului oxidativ.

Stresul oxidativ, generat de excesul de specii reactive de oxigen și azot, este incriminat în patogeniza a numeroase și grave afecțiuni ca ateroscleroza, infarctul miocardic, diabetul și complicațiile acestuia, afecțiunile neurodegenerative, cancerul, ciroza hepatică și altele. De aceea, rolul antioxidantilor în apărarea organismului de afectarea produsă de diferite tipuri de radicali este crucială.

În literatura de specialitate au fost raportate numeroase tiazolin-4-one și tiazolidin-2,4-dione cu proprietăți antioxidante dovedite, cu posibilă aplicabilitate într-o gamă largă de afecțiuni precum diabetul zaharat și complicațiile micro- și macrovasculare pe care le poate produce (retinopatia diabetică, neuropatia diabetică și nefropatia diabetică), diferite tipuri de cancer, degenerescență maculară și cataractă, diferite patologii neurodegenerative, ateroscleroză și afecțiunile cardiovasculare consecutive acesteia, etc.

### **Ipoteza de lucru. Obiective**

Având în vedere aspectele prezentate mai sus, în cadrul acestui studiu ne-am propus evaluarea activității antioxidante a noilor compuși tiazolidin-2,4-dionici și tiazolin-4-onici, a căror sinteză a fost prezentată în cadrul capitolelor anterioare. Potențialul antioxidant al compușilor a fost evaluat *in vitro* prin determinarea capacității lor de inhibare a radicalilor liberi de DPPH.

### Material și metodă

Potențialul antioxidant al compușilor sintetizați a fost evaluat prin măsurarea capacității de inhibare a radicalilor liberi DPPH conform metodei descrise în literatură cu câteva modificări minore. Ca antioxidanți de referință s-au utilizat acidul ascorbic și BHT-ul. Ulterior, s-a evaluat capacitatea de neutralizare a radicalilor de DPPH în procente prin reprezentarea grafică a acestuia în funcție de concentrație, fapt ce a permis calcularea valorilor  $IC_{50}$ .

### Rezultate și discuții

Dintr-un total de 36 de compuși tiazolidin-2,4-dionici, care au fost supuși testului DPPH, doar 7 compuși au prezentat o capacitate modestă de inhibare a radicalilor liberi de DPPH, ceilalți compuși fiind inactivi la concentrația testată. În cazul compușilor tiazolin-4-onici, din 21 de compuși testați, 13 au înregistrat o activitate inhibitorie modestă spre bună, restul compușilor fiind inactivi. Dintre tiazolidin-2,4-dione, 5-(2,6-diclorobenziliden)-3-(2-(4-nitrofenil)-2-oxoetil)tiazolidin-2,4-diona **8c** a înregistrat cea mai bună activitate antioxidantă, însă inferioară acidului ascorbic și BHT. S-a observat o creștere a capacității antiradicalice în cazul N-(aril-oxo-alkil)-5-(2,6-dicloro-benziliden)tiazolidin-2,4-dionelor comparativ cu restul tiazolidin-2,4-dionelor. Dintre tiazolin-4-one cel mai activ compus a fost 2-(alilamino)-5-((6-cloro-4-oxo-4H-chromen-3-il)metilen)tiazol-4(5H)-ona **12e** cu activitate antioxidantă superioară compușilor de referință utilizați.

În general, tiazolin-4-onele au înregistrat o activitate antioxidantă superioară tiazolidin-2,4-dionelor, dintre care compușii **12e** și **16e** au prezentat un potențial antioxidant mai mare decât compușii de referință utilizați, acidul ascorbic și BHT-ul.

### Concluzii

În acest studiu a fost evaluat potențialul antioxidant al compușilor tiazolin-4-onici și tiazolidin-2,4-dionici prezentați în studiile anterioare. Proprietățile antioxidante au fost testate prin metoda DPPH, prin evaluarea capacității antiradicalice, de inhibare a radicalilor liberi de DPPH, în comparație cu acidul ascorbic și BHT. Tiazolin-4-onele au fost mai active decât tiazolidin-2,4-dionele, compușii **12e** și **16e** înregistrând activitate antioxidantă superioară acidului ascorbic și BHT-ului, cu valori  $IC_{50}$  inferioare compușilor de referință.

### Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

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

- Dezvoltarea a:

- 4 serii de 5-ariliden-tiazolidin-2,4-dione N substituite, care includ 34 de compuși noi, care nu au mai fost raportați în literatura de specialitate;

- 3 serii de 5-ariliden-tiazolin-4-one, care includ 18 compuși noi, de asemenea neraportați în literatură.

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

- Este de notat faptul că unii compuși au o activitate antibacteriană similară, uneori chiar superioară ciprofloxacinei, pe tulpinile standardizate de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* și *Listeria monocytogenes*, numeroși compuși au o activitate antifungică comparabilă cu cea a fluconazolului pe specia de *Candida albicans* standardizată, în timp ce compușii **12e** și **16e** au o activitate antioxidantă superioară acidului ascorbic și BHT-ului.