



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

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

---

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

# Sinteza și evaluarea activității biologice a unor noi compuși tiazolici, derivați de la acizi 4-metil- tiazolil-carboxilici 2-substituiți

---

Doctorand: **Cristina Ioana Stoica**

---

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

---

CLUJ-NAPOCA 2016

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Aspecte generale asupra obținerii și activității biologice a 1,3,4-oxadiazolilor</b>	19
1.1. Chimia oxadiazolilor	20
1.2. Metode de obținere a derivaților 1,3,4-oxadiazolici 2,5-disubstituiți	21
1.2.1. Ciclodeshidratarea 1,2-diacilhidrazinelor	21
1.2.2. Ciclizarea oxidativă a N-acilhidrazonelor	22
1.2.3. Reacția hidrazidelor cu ortoesterei	24
1.2.4. Reacția a 4 componente, într-o singură etapă	25
1.2.5. Reacția clorurilor cu acizi cu (N-izocianimino)trifenilfosforan	26
1.2.6. Reacția Huisgen	26
1.3. Activitatea biologică a derivaților 1,3,4-oxadiazolici 2,5-disubstituiți	27
1.3.1. Activitatea antimicrobiană	27
1.3.2. Activitatea antitumorală	30
1.3.3. Activitatea antivirală	31
1.3.4. Activitatea anticonvulsivantă	32
1.3.5. Activitatea antiinflamatoare	33
1.3.6. Alte activități	34
<b>2. Aspecte generale asupra obținerii și activității biologice a 1,3,4-oxadiazolinelor</b>	35
2.1. Chimia oxadiazolinelor	35
2.2. Metode de obținere a oxadiazolinelor	35
2.3. Activitatea biologică a oxadiazolinelor	36
2.3.1. Activitatea antimicrobiană	36
2.3.2. Activitatea antitumorală	38
2.3.3. Alte activități	39
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43

<b>2. Metodologie generală</b>	45
<b>3. Studiul 1 – Sinteza, activitatea antimicotică <i>in vitro</i> și studiul de andocare moleculară a unor noi tiazolil-1,3,4-oxadiazoli</b>	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	48
3.3. Material și metodă	48
3.3.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	48
3.3.2. Evaluarea activității antimicotice <i>in vitro</i>	51
3.3.3. Studiul de andocare moleculară	51
3.4. Rezultate și discuții	53
3.4.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	53
3.4.2. Evaluarea activității antimicotice <i>in vitro</i>	63
3.4.3. Studiul de andocare moleculară	63
3.5. Concluzii	66
<b>4. Studiul 2 – Sinteza și evaluarea activității antimicrobiene <i>in vitro</i> a unor noi tiazolil-1,3,4-oxadiazoline</b>	69
4.1. Introducere	69
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	70
4.3. Material și metodă	71
4.3.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	71
4.3.2. Evaluarea activității antimicrobiene <i>in vitro</i>	72
4.4. Rezultate și discuții	74
4.4.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	74
4.4.2. Evaluarea activității antimicrobiene <i>in vitro</i>	82
4.5. Concluzii	82
<b>5. Studiul 3 – Evaluarea lipofilicității în cadrul seriei de tiazolil-1,3,4-oxadiazoli și tiazolil-1,3,4-oxadiazoline</b>	85
5.1. Introducere	85
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	86
5.3. Material și metodă	88
5.4. Rezultate și discuții	89
5.4.1. Derivații de tiazolil-oxadiazoline	89

5.4.2. Derivații de tiazolil-oxadiazol	93
5.5. Concluzii	99
<b>6. Discuții generale</b>	101
<b>7. Concluzii generale</b>	103
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	107
<b>REFERINȚE</b>	109

**Cuvinte cheie:** sinteză chimică, tiazolil-1,3,4-oxadiazoli, tiazolil-1,3,4-oxadiazoline, andocare moleculară, *lanosterol 14 $\alpha$ -demetilază*, antimicrobian, lipofilie, cromatografie pe strat subțire, analiza componentelor principale.

## INTRODUCERE

Descoperirea substanțelor cu acțiune antimicrobiană a reprezentat unul dintre cele mai importante momente în evoluția științelor medicale. Împreună cu introducerea schemelor de vaccinare obligatorii și cu măsurile luate de sistemele de sănătate publică, medicamentele antimicrobiene sunt responsabile de o scădere a ratei de mortalitate ca urmare a bolilor infecțioase, însă, din cauza utilizării necorespunzătoare a acestora, problema globală a rezistenței bacteriene a devenit o provocare pentru specialiștii și cercetătorii din domeniul sănătății. Creșterea incidenței rezistenței la antibiotice poate să aibă un impact negativ asupra sănătății atât în mod direct, prin scăderea eficienței tratării infecțiilor cât și indirect, prin compromiterea altor tratamente. Având în vedere, problematica prezentată, ne-am propus obținerea de noi molecule cu acțiune antimicrobiană, care să prezinte alte posibile mecanisme de acțiune sau alte situsuri de legare de țintele microbiene cunoscute. În acest scop, modelele structurale au fost alese ținându-se cont de heterociclii care stau la baza unor molecule cu acțiune antimicrobiană, aflate în dezvoltare. Aceștia au fost divers substituiți cu grupări cu potențial farmacofor, cu scopul optimizării activității, polarității și lipofilității moleculelor.

Cercetările cuprinse în această teză prezintă sinteza, caracterizarea fizico-chimică, spectrală și evaluarea activității antimicrobiene (bacterii, fungi) a unor compuși originali. S-a urmărit identificarea grupărilor farmacofore și stabilirea de relații între structura chimică, lipofilia și activitatea biologică a derivaților sintetizați.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Studiul 1 – Sinteza, activitatea antimicotică *in vitro* și studiul de andocare moleculară a unor noi tiazolil-1,3,4-oxadiazoli

**Ipoteza de lucru/obiective.** Ținând cont de datele din literatura de specialitate despre potențialul biologic al derivaților de 1,3,4-oxadiazol și tiazol, ne-am propus obținerea unor compuși cu activitate biologică amplificată. Principalele activități care au fost urmărite în cadrul acestui studiu sunt:

- Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și spectrală a unor noi derivați de tiazolil-1,3,4-oxadiazol substituiți în poziția 2 a nucleului tiazolic și în poziția 5 a nucleului oxadiazolic cu resturi aromatice;
- Evaluarea activității antimicotice *in vitro*, prin metoda difuzimetrică;
- Studiul de andocare moleculară pe *lanosterol 14 $\alpha$ -demetilază*, în vederea corelării rezultatelor obținute *in vitro* cu capacitatea și modul de legare al compușilor obținuți, de situsul activ al enzimei.

**Material și metodă.** Au fost sintetizate 21 de molecule noi care au în comun un schelet de tip 4-metil-tiazol-5-il-1,3,4-oxadiazol, divers substituit în poziția 5 a nucleului oxadiazolic și în poziția 2 a nucleului tiazolic, cu resturi aromatice sau heteroaromatice. Prin condensarea Hantzsch a tioamidelor cu 2-cloroacetilacetatul de etil, s-au obținut derivații esterici corespunzători, care au fost ulterior derivatizați la hidrazide.

Pornind de la hidrazidă, sinteza tiazolil-1,3,4-oxadiazolilor a avut loc prin două metode. Prima metodă a implicat condensarea hidrazidei cu acizi carboxilici aromatici când s-au obținut diacilhidrazinele corespunzătoare, care ulterior au fost supuse unei reacții de ciclodeshidratare, cu POCl<sub>3</sub>, cu formare de tiazolil-1,3,4-oxadiazoli.

În a doua metodă s-a recurs la condensarea hidrazidelor cu variate aldehide aromatice. Hidrazid-hidrazonele obținute pe această cale s-au ciclizat oxidativ sub acțiunea iodului și a carbonatului de potasiu, cu obținerea tiazolil-1,3,4-oxadiazolilor.

Activitatea antimicotică a fost evaluată pe 2 tulpini fungice: *Candida albicans* ATCC 10231 și *Aspergillus fumigatus*, prin metoda difuziei în agar. S-au utilizat soluții de concentrație de 1 mg/ml în DMSO, iar rezultatele au fost comparate cu cele ale fluconazolului și itraconazolului ca și antifungice de referință. Ulterior, a fost efectuat un studiu de andocare moleculară pe 3 subtipuri de *lanosterol 14 $\alpha$ -demetilază* (*Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae* și *Candida albicans*) cu ajutorul a două programe diferite: Autodock și Autodock Vina. Având în vedere că în momentul actual nu sunt disponibile date cristalografice ale *lanosterol 14 $\alpha$ -demetilazei* de la *Candida albicans*, a fost construit un model omolog tridimensional pornind de la enzima care aparține tulpinii *Saccharomyces cerevisiae*.

**Rezultate și discuții.** Analiza elementală cantitativă (C, H, N, S) și analiza spectrală (MS,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN) au confirmat structurile moleculelor obținute. Metoda de obținere a nucleului oxadiazolic, care presupune ciclizarea oxidativă a N-acilhidrazonelor, este net superioară metodei de ciclizare prin deshidratarea diacilhidrazinelor. Derivații sintetizați au avut o activitate apropiată de cea a substanțelor de referință, pe *Candida albicans* și *Aspergillus fumigatus*. Șase compuși au prezentat rezultate bune atât în urma studiului *in vitro* cât și în urma studiului *in silico*, ceea ce permite încadrarea lor într-o serie de molecule "hit". Andocarea cu ținta sugerează formarea unor interacțiuni hidrofobe între aminoacizii din structura canalului de acces către situsul activ al enzimei și tiazolil-1,3,4-oxadiazolii seriei "hit".

**Concluzii.** Rezultatele obținute în urma screeningului antimicotic au confirmat, în proporție mare, datele obținute în urma studiului de andocare moleculară, dovedind că substituirea restului fenil, grefat de nucleul tiazolic în poziția 2, cu un rest  $\text{CF}_3$  (în poziția 3) determină o creștere a activității. Substituția nucleului fenil, legat în poziția 5 a nucleului oxadiazolic, este favorabilă. De obicei, compușii monohalogenati la nivelul acestui rest, prezintă o activitate mai bună față de derivații dihalogenati sau substituiți cu grupări electronodonoare.

## Studiul 2 – Sinteza și evaluarea activității antimicrobiene *in vitro* a unor noi tiazolil-1,3,4-oxadiazoline

**Ipoteza de lucru/obiective.** Având în vedere rezultatele promițătoare obținute în urma evaluării activității antimicotice *in vitro*, a seriei de tiazolil-1,3,4-oxadiazoli, ne-am propus investigarea influenței aromaticității asupra activității antimicrobiene.

Pentru că existența mai multor nuclee aromatice, într-o moleculă, determină, în general, o reducere a solubilității în apă a compusului, am urmărit scăderea caracterului aromatic al moleculelor și consecințele asupra spectrului de activitate.

Realizarea acestui studiu a cuprins următoarele activități:

- Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și spectrală a unor derivați de tiazolil-1,3,4-oxadiazolină, substituiți în poziția 2 a nucleului tiazolic și în poziția 5 a nucleului oxadiazolinic;
- Evaluarea activității antimicrobiene *in vitro*, prin metoda disc-difuzimetrică.

**Material și metodă.** Au fost obținuți 10 compuși noi care au în comun un rest de 4-metil-tiazol-5-il-1,3,4-oxadiazolină, acilată în poziția N4. Sinteza a pornit de la 3-(trifluorometil)benzonitril, prin barbotare de hidrogen sulfurat, cu obținerea tioamidei. Aceasta a fost condensată cu 2-cloroacetilacetatul de etil, în cadrul reacției Hantzsch, pentru a forma derivatul esteric.

3-(Trifluorometil)benzohidrazida s-a obținut prin tratarea derivatului esteric cu hidrat de hidrazină.

N-acilhidrazonele intermediare au fost sintetizate printr-o reacție de condensare între hidrazidă și aldehide aromatice sau cetone ciclice saturate.

Derivații de tiazolil-1,3,4-oxadiazolină au fost obținuți prin ciclizarea hidrazid-hidrazonelor cu anhidridă acetică sau propionică.

Potențialul antimicrobian al noilor molecule a fost determinat prin metoda disc-difuzimetrică. Testările au fost efectuate pe patru tulpini bacteriene: *Staphylococcus aureus* ATCC 49444, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și o tulpină fungică: *Candida albicans* ATCC 10231. Soluțiile compușilor investigați au avut concentrația de 10 mg/ml în DMSO. Datele obținute au fost comparate cu cele ale gentamicinei, utilizată ca martor pozitiv pentru bacterii și cu cele ale fluconazolului, utilizat ca martor pozitiv pentru *Candida albicans* ATCC 10231.

**Rezultate și discuții.** Structurile derivaților obținuți au fost validate prin analiză elementală cantitativă și metode spectrale (MS,  $^1\text{H}$  RMN). Substanțele din această clasă structurală au prezentat un efect slab spre absent atât pe bacterii cât și pe specia de funghi utilizată în acest studiu.

O posibilă explicație a diferenței între activitatea antimicrobiană, a celor două serii de compuși, ar putea fi scăderea caracterului aromatic în cazul derivaților de oxadiazolină.

**Concluzii.** Tiazolil-1,3,4-oxadiazolinele au avut activitate antimicrobiană slabă, ceea ce indică faptul că scăderea aromaticității nucleului oxadiazolic diminuează efectul antimicrobian, atât pe bacteriile cât și pe funghi utilizați în experimentul de față.

### **Studiul 3 – Evaluarea lipofilității în cadrul seriei de tiazolil-1,3,4-oxadiazoli și tiazolil-1,3,4-oxadiazoline**

**Ipoteza de lucru/obiective.** Este cunoscut faptul că profilul farmacocinetic, farmacodinamic și toxicologic al compușilor bioactivi este influențat de lipofilie. Astfel, având în vedere diferențele de activitate între seria de 1,3,4-oxadiazoli și cea de 1,3,4-oxadiazoline, ne-am propus să cercetăm lipofilia acestora, cu scopul de a găsi o explicație pentru activitatea redusă a seriei de tiazolil-1,3,4-oxadiazoline.

Lipofilia acestor compuși a fost determinată prin utilizarea cromatografiei pe strat subțire cu fază inversă (RP-TLC) și aplicarea analizei componentelor principale (PCA), pentru parametri de retenție obținuți.

**Material și metodă.** Derivații de oxadiazolină și oxadiazol au fost supuși cromatografiei pe strat subțire cu fază inversă, cu scopul obținerii parametrilor care sunt necesari pentru estimarea proprietăților lipofile. Determinarea acestora s-a făcut separat, pentru fiecare serie. Soluțiile compușilor analizați au avut concentrația de 1mg/ml în DMSO. Cromatografia pe strat subțire cu fază inversă oferă date de retenție sub formă de  $R_f$  și respectiv  $R_M$ . Pentru reducerea numărului mare de variabile la cele care păstrează informația inițială, s-a recurs la aplicarea analizei componentelor principale (PCA), prin prelucrarea statistică a valorilor  $R_f$  cu scopul obținerii unor noi parametri de lipofilitate și anume  $PC_i$ . Acestea au fost corelate cu valorile teoretice  $\text{LogP}$ , generate de aplicația online SwissADME.

**Rezultate și discuții.** Rezultatele obținute au arătat și confirmat, încă o dată, că prezența atomilor de halogen, cu un volum atomic mare a crescut lipofilia, în cadrul ambelor serii, fapt care validează metoda aplicată. Activitatea antimicrobiană superioară a compușilor 1,3,4-oxadiazolici, în comparație cu derivații de 1,3,4-oxadiazolină poate fi asociată cu o lipofilie mai mare a acestora. În plus, este posibil ca aromaticitatea superioară și polaritatea redusă a oxadiazolilor să faciliteze pasajul prin peretele celular și/sau membrana microbilor.

**Concluzii.** Pentru menținerea activității antimicrobiene, este esențial nucleul oxadiazolic. Hidrogenarea parțială a acestuia determină scăderea semnificativă a potențialului antimicrobian, în cadrul seriei de tiazolil-hetarene cercetate de noi.

## ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Au fost sintetizate 61 de molecule, dintre care 50 sunt cu structuri noi (produși intermediari și finali). Acestea au fost clasificate în 2 serii, pe baza sistemelor heterociclice care stau la baza lor: tiazolil-1,3,4-oxadiazoline și tiazolil-1,3,4-oxadiazoli. Determinarea potențialului antimicrobian al tuturor compușilor nou sintetizați, a permis identificarea elementelor farmacofore esențiale pentru activitate și modul în care variază activitatea în funcție de modificările structurale efectuate, permițând astfel stabilirea unor relații calitative structură-activitate.

Ulterior, în cazul compușilor care au prezentat activitate biologică promițătoare, s-a urmărit investigarea modului de interacțiune cu ținta, printr-un studiu de andocare moleculară, care a permis formularea unei ipoteze asupra mecanismului de acțiune.

Un studiu suplimentar asupra proprietăților fizico-chimice a compușilor originali, este reprezentat de determinarea lipofiliei tuturor moleculelor obținute, care a permis efectuarea unor corelații structură-lipofilicitate-activitate antimicrobiană.

Obținerea unei serii largi de molecule cu structuri de bază asemănătoare a permis efectuarea unei analize comparative, din punct de vedere fizico-chimic și biologic. Dintre compușii sintetizați, șase molecule au activitate biologică promițătoare și le-am încadrat într-o serie de molecule "hit". Pornind de la acestea, prin alte modulări structurale, pot fi aduse noi optimizări ale profilului biologic, fiind posibilă identificarea unui compus "leader", cu activitate biologică și proprietăți fizico-chimice apropiate de ale unei molecule "candidat clinic".





**PhD School**

---

PhD Thesis. Abstract

# Synthesis and biological activity evaluation of some new thiazole compounds, derived from 4-methyl- thiazolyl-2-substituted carboxylic acids

---

PhD Student: **Cristina Ioana Stoica**

---

PhD Scientific Coordinator: **Prof. Dr. Ovidiu Oniga**

---

CLUJ-NAPOCA 2016

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>PRESENT STATUS OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. General aspects on synthesis and biological activity of 1,3,4-oxadiazoles</b>	19
1.1. Chemistry of oxadiazoles	20
1.2. Synthesis methods of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole derivatives	21
1.2.1. Cyclodehydration of 1,2-diacylhydrazines	21
1.2.2. Oxidative cyclization of N-acylhydrazones	22
1.2.3. Reaction of hydrazides with orthoesters	24
1.2.4. One-pot, four-component reaction	25
1.2.5. Reaction of acyl chlorides with (N-isocyanimine)triphenylphosphorane	26
1.2.6. Huisgen reaction	26
1.3. Biological activity of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole derivatives	27
1.3.1. Antimicrobial activity	27
1.3.2. Antitumour activity	30
1.3.3. Antiviral activity	31
1.3.4. Anticonvulsant activity	32
1.3.5. Anti-inflammatory activity	33
1.3.6. Other activities	34
<b>2. General aspects on synthesis and biological activity of 1,3,4-oxadiazolines</b>	35
2.1. Chemistry of oxadiazolines	35
2.2. Synthesis methods of oxadiazolines	35
2.3. Biological activity of oxadiazolines	36
2.3.1. Antimicrobial activity	36
2.3.2. Antitumour activity	38
2.3.3. Other activities	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Hypothesis/aims</b>	43

<b>2. General methodology</b>	45
<b>3. Study 1 – Synthesis, <i>in vitro</i> antimycotic activity and molecular docking study of some new thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles</b>	47
3.1. Introduction	47
3.2. Hypothesis/aims	48
3.3. Materials and methods	48
3.3.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization	48
3.3.2. <i>In vitro</i> antimycotic activity evaluation	51
3.3.3. Molecular docking study	51
3.4. Results and discussions	53
3.4.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization	53
3.4.2. <i>In vitro</i> antimycotic activity evaluation	63
3.4.3. Molecular docking study	63
3.5. Conclusions	66
<b>4. Study 2 – Synthesis and <i>in vitro</i> antimicrobial activity evaluation of some new thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines</b>	69
4.1. Introduction	69
4.2. Hypothesis/aims	70
4.3. Materials and methods	71
4.3.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization	71
4.3.2. <i>In vitro</i> antimicrobial activity evaluation	72
4.4. Results and discussions	74
4.4.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterization	74
4.4.2. <i>In vitro</i> antimicrobial activity evaluation	82
4.5. Conclusions	82
<b>5. Study 3 – The evaluation of lipophilicity in the series of thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles and thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines</b>	85
5.1. Introduction	85
5.2. Hypothesis/aims	86
5.3. Materials and methods	88
5.4. Results and discussions	89
5.4.1. Thiazolyl-oxadiazoline derivatives	89

5.4.2. Thiazolyl-oxadiazole derivatives	93
5.5. Conclusions	99
<b>6. General discussions</b>	101
<b>7. General conclusions</b>	103
<b>8. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	107
<b>REFERENCES</b>	109

**Key words:** chemical synthesis, thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles, thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines, molecular docking, *lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase*, antimicrobial, lipophilicity, thin-layer chromatography, principal component analysis.

## INTRODUCTION

The discovery of the antimicrobial substances was one of the most important moment in the evolution of medical sciences. Together with the introduction of the mandatory vaccination schedules and other measures taken by the public health systems, antimicrobial drugs are responsible for a decrease in mortality, caused by infectious diseases, but because of their misuse, the global problem of bacterial resistance has become a challenge for health professionals and researchers. The increasing incidence of antibiotic resistance can have a negative impact on human health, both directly, by decreasing the infection treatment efficiency and indirectly, by compromising other treatments. Considering the issues presented, we set out to obtain new molecules with antimicrobial activity, which should have other possible mechanisms of action or other binding sites to the already known microbial targets. To this end, the structural models were chosen by taking into account the common heterocycles of the molecules with antimicrobial activity, which are currently under development. These heterocycles were substituted with potential pharmacophore groups, in order to optimize the activity, polarity and lipophilicity of the molecules. The research contained in this thesis presents the synthesis, physico-chemical and spectral characterization and antimicrobial activity evaluation (bacteria, fungi) of some original compounds. We aimed to identify the pharmacophore groups and establish relationships between the chemical structure, the lipophilicity and the biological activity, of the synthesized derivatives.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### Study 1 – Synthesis, *in vitro* antimycotic activity and molecular docking study of some new thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles

**Hypothesis/aims.** Considering the data from the research literature on the biological potential of 1,3,4-oxadiazole and thiazole derivatives, we decided to synthesize compounds with enhanced biological activity. The main activities that have been completed in this study are:

- Synthesis, physico-chemical and spectral characterization of some novel thiazolyl-1,3,4-oxadiazole derivatives, substituted with aromatic residues, in the 2-position of the thiazole ring and in the 5-position of the oxadiazole ring;
- *In vitro* antimycotic activity evaluation, by the diffusimetric method;
- The molecular docking study on *lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase*, in order to correlate the *in vitro* obtained results with the capacity and the binding mode of the synthesized compounds, to the active site of the enzyme.

**Materials and methods.** 21 novel molecules were synthesized. These have in common a 4-methyl-thiazole-5-yl-1,3,4-oxadiazole scaffold, diversely substituted in the 5-position of the oxadiazole system and in the 2-position of the thiazole system, with aromatic or heteroaromatic residues. The corresponding esteric derivatives were obtained by the Hantzsch condensation of thioamides with ethyl-2-chloroacetoacetate. These were further derived to the hydrazides.

Starting from the hydrazide, the synthesis of thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles was performed by two methods. The first method involved the condensation of the hydrazide with aromatic carboxylic acids to the corresponding diacylhydrazines, which were then subjected to a cyclodehydration reaction with POCl<sub>3</sub>, with the formation of thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles.

In the second method, the hydrazides were condensed with various aromatic aldehydes. The hydrazide-hydrazones thus obtained, were oxidatively cyclized under the influence of iodine and potassium carbonate, to yield the thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles.

The antifungal activity was evaluated on two fungal strains: *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus fumigatus*, by the agar diffusimetric method. The compounds were dissolved in DMSO to obtain a concentration of 1 mg/ml and the results were compared with those of fluconazole and itraconazole, as antifungal references. Subsequently, a molecular docking study was conducted by two different programs: Autodock and Autodock Vina, on 3 subtypes of *lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase* (*Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*). Since the crystallographic structure of the *lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase* from *Candida albicans* was not yet

characterized, we built a tridimensional homology model, starting from the enzyme which belongs to the *Sachharomyces cerevisiae* strain.

**Results and discussions.** The quantitative elemental analysis (C, H, N, S) and the spectral analysis (MS,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN) confirmed the structures of the obtained compounds. The synthesis of the oxadiazole system, which involves the oxidative cyclization of N-acylhydrazones is superior, to the dehydrative cyclization method of diacylhydrazines. The synthesized compounds have a similar activity to that of the reference substances, on *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Six compounds showed good results in both the *in vitro* study as well as in the *in silico* study, allowing their integration into a “hit” molecule series. The docking study suggests the possibility of hydrophobic interactions between the amino acid residues from the structure of the access channel to the active site of the enzyme and the thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles.

**Conclusions.** The results obtained from the antifungal screening confirmed to a high extent the data from the molecular docking study, proving that the substitution of the phenyl residue, bound to the thiazolic system in the 2-position, with a  $\text{CF}_3$  moiety (3-position) causes an increase in activity. The substitution of the phenyl ring, linked in the 5-position to the oxadiazole system, is favorable. Usually, the monohalogenated compounds exhibited a better activity than the dihalogenated derivatives or the derivatives substituted with groups that have a positive inductive effect.

## Study 2 – Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity evaluation of some new thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines

**Hypothesis/aims.** Considering the promising results obtained by assessing the *in vitro* antifungal activity evaluation, of the thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles series, we aimed to investigate the influence of aromaticity on the antimicrobial activity.

Since the existence of more than one aromatic ring in a molecule, generally, leads to a reduction on the aqueous solubility of the compound, we set out to reduce the aromatic character of the molecules and to observe the consequences on the spectrum of activity.

This study included the following activities:

- Synthesis, physico-chemical and spectral characterization of some thiazolyl-1,3,4-oxadiazoline derivatives, substituted in the 2-position of the thiazole system and in the 5-position of the oxadiazoline system;
- *In vitro* antimicrobial activity evaluation, by the disk-diffusion method.

**Materials and methods.** 10 novel compounds, with a common 4-methyl-thiazole-5-yl-1,3,4-oxadiazoline scaffold, acylated in the N4-position, were obtained. The synthesis started from 3-(trifluoromethyl)benzotrinitril, by bubbling of hydrogen sulfide, with the formation of the corresponding thioamide. This thioamide was condensed with ethyl-2-chloroacetoacetate, within the Hantzsch reaction, to form the ester derivative.

3-(Trifluoromethyl)benzohydrazide was obtained by the reaction of the ester derivative with hydrazine hydrate.

The intermediate N-acylhydrazones were synthesized by a condensation reaction between the hydrazide and aromatic aldehydes or saturated cyclic ketones.

The thiazolyl-1,3,4-oxadiazoline derivatives were prepared by the cyclization reaction of hydrazide-hydrazones with acetic or propionic anhydride.

The antimicrobial potential of the new molecules was determined by the disk diffusion method. The tests were performed on four bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 49444, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and a fungal strain: *Candida albicans* ATCC 10231. The solutions of the investigated compounds had a concentration of 10 mg/ml in DMSO. The obtained data were compared with those of gentamicin, used as a positive control for antibacterial activity and with fluconazole, used as a positive control for antifungal activity.

**Results and discussions.** The structures of the obtained derivatives were confirmed by quantitative elemental analysis and by spectral methods (MS,  $^1\text{H}$  NMR). The substances from this structural class had little to no effect on the microbial strains, used in this study.

A possible explanation for the difference between the antimicrobial activity of the two series of compounds may be the decreased aromatic character of the oxadiazoline derivatives.

**Conclusions.** The thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines have poor antimicrobial activity, indicating that the decrease in aromaticity of the oxadiazole system, diminishes the antimicrobial effect, both on the bacteria and fungi, used in this study.

### **Study 3 – The evaluation of lipophilicity in the series of thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles and thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines**

**Hypothesis/aims.** It is well established that the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicologic profile of bioactive compounds is influenced by the lipophilicity. Thus, considering the differences in activity between the series of 1,3,4-oxadiazoles and 1,3,4-oxadiazolines, we decided to investigate their lipophilicity, in order to find an explanation for the low antimicrobial activity of the series of thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines.

The lipophilicity of these compounds was determined using reversed-phase thin-layer chromatography (RP-TLC) and principal components analysis (PCA), applied on the obtained retention parameters.

**Materials and methods.** The oxadiazoline and oxadiazole derivatives were subjected to reverse-phase thin-layer chromatography, in order to obtain the parameters that are required to estimate their lipophilic properties. Their assessment was performed separately for each series. The solutions of the analyzed compounds had a concentration of 1 mg/ml in DMSO. Reverse-phase thin-layer chromatography provides data in the form of  $R_f$  and respectively  $R_M$ . In order to reduce the number of variables to those who preserve the initial information, the principal component

analysis (PCA) was applied. PCA statistical processing of the  $R_f$  values, lead to new lipophilicity parameters, such as  $PC_i$ . These were correlated with the theoretical  $\text{LogP}$  values generated by the online application SwissADME.

**Results and discussions.** The results showed and proved once again that the presence of halogen atoms with a high atomic volume increased lipophilicity, in both series, which validates the applied method. The higher antimicrobial activity of the 1,3,4-oxadiazoles in comparison with the 1,3,4-oxadiazolines could be associated with a higher lipophilicity. In addition, it is possible that the high aromaticity and low polarity of the oxadiazoles, facilitates the passage through the cell wall and/or the membranes of the microbes.

**Conclusions.** The oxadiazole system is essential for maintaining the antimicrobial activity. Its partial hydrogenation causes a significant decrease of the antimicrobial potential, in the thiazolyl-hetarene series, investigated by us.

## ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

61 molecules were synthesized, 50 of which are new structures (intermediate and final products). Based on the common heterocyclic systems, they were classified into 2 series: thiazolyl-1,3,4-oxadiazolines and thiazolyl-1,3,4-oxadiazoles.

The assessment of the antimicrobial potential of all newly synthesized compounds, allowed us to identify the pharmacophore elements that are essential for the activity. This also allowed us to establish qualitative structure-activity relationships by assessing how the activity varies depending on the structural changes that were made.

Subsequently, in the case of the compounds that showed promising biological activity, we investigated the mode of interaction with the target, by a molecular docking study which permitted the formulation of a hypothesis on the mechanism of action.

An additional study on the physico-chemical properties of the compounds, was represented by the evaluation of the lipophilicity for all obtained compounds. This allowed us to make some structure-lipophilicity-antimicrobial activity correlations.

The synthesis of a wide range of molecules with similar scaffolds enabled us to do a comparative analysis in terms of physico-chemical and biological properties. Among the synthesized compounds, six molecules have showed promising biological activity and we have included them in a hit molecule series. On this prerogative, further structural modulations can be undertaken for the optimization of the biological profile, thus allowing the identification of a leader compound, with biological activity and physico-chemical properties, similar to the clinical candidate molecules.