

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Sinteza și evaluarea proprietăților antiinflamatoare și analgezice ale unor imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazoli și ale unor tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoli

---

Doctorand **Anamaria Cristina**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Valentin Zaharia**

---



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

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Compuși cu structură tiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazolică</b>	17
1.1. Metode de sinteză a compușilor tiazolo[3,2- <i>b</i> ][1,2,4]triazolici	17
1.1.1. Reacții de condensare ale 1,2,4-triazol-3-tionelor/tiolilor	17
1.1.2. Ciclizarea unor tioeteri triazolici nesaturați sau a unor triazoli cu nucleu tiairanic	20
1.1.3. Substituția nucleului tiazolo-triazolic la atomul de carbon C-5	21
1.2. Comportamentul biologic al compușilor tiazolo[3,2- <i>b</i> ][1,2,4]triazolici	23
1.2.1. Activitatea antibacteriană și antifungică	23
1.2.2. Activitatea antiinflamatoare și analgezică	24
1.2.3. Activitatea anticanceroasă	27
<b>2. Compuși cu structură imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]tiadiazolică</b>	29
2.1. Metode de sinteză a compușilor imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]tiadiazolici	29
2.1.1. Sinteza imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]tiadiazolilor C-2 și/sau C-5 sau C-6 substituiți	29
2.1.2. Sinteza imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]tiadiazolilor C-5, C-6 sau C-2, C-5, C-6 substituiți	33
2.2. Comportamentul biologic al compușilor imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]tiadiazolici	34
2.2.1. Activitatea antibacteriană și antifungică	34
2.2.2. Activitatea antituberculoasă	37
2.2.3. Activitatea antiinflamatoare și analgezică	38
2.2.4. Activitatea anticanceroasă	39
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43
<b>2. Metodologie generală</b>	45
<b>3. Studiul 1 - Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor derivați de tiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazol</b>	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de lucru	47
3.3. Material și metodă	48
3.4. Rezultate și discuții	50
3.5. Partea experimentală	54

---

3.6. Concluzii	65
<b>4. Studiul 2 - Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor derivați de imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]tiadiazol</b>	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru	67
4.3. Material și metodă	68
4.4. Rezultate și discuții	69
4.5. Partea experimentală	72
4.6. Concluzii	78
<b>5. Studiul 3 - Evaluarea potențialului biologic al tiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazolilor și al imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați</b>	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru	80
5.3. Material și metodă	80
5.3.1. Evaluarea activității antiinflamatoare	81
5.3.2. Evaluarea activității analgezice	82
5.3.3. Evaluarea riscului ulcerogen	82
5.3.4. Studiul de andocare moleculară	83
5.3.5. Analiza statistică	83
5.4. Rezultate și discuții	84
5.4.1. Evaluarea activității antiinflamatoare	84
5.4.2. Evaluarea activității analgezice	91
5.4.3. Evaluarea riscului ulcerogen	97
5.4.4. Studiul de andocare moleculară	99
5.5. Concluzii	100
<b>6. Studiul 4 - Evaluarea lipofiliei tiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazolilor și a imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați</b>	109
6.1. Introducere	109
6.2. Ipoteza de lucru	110
6.3. Material și metodă	110
6.3.1. Condițiile cromatografice	110
6.3.2. Parametrii de lipofilie experimentali	111
6.3.3. Parametrii de lipofilie computaționali	111
6.4. Rezultate și discuții	112
6.5. Concluzii	128
<b>7. Discuții generale</b>	129

<b>8. Concluzii generale</b>	133
<b>9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	137
<b>REFERINȚE</b>	139

**Cuvinte cheie:** tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazol, imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazol, analiză spectrală, activitate antiinflamatoare, activitate analgezică, risc ulcerogen, andocare moleculară, lipofilie, cromatografie pe strat subțire cu fază inversă

## INTRODUCERE

Antiinflamatoarele nesteroidiene (AINS) reprezintă o clasă importantă de medicamente, utilizate pentru tratamentul inflamației, durerii și al febrei. Acestea acționează la nivelul cascadei acidului arahidonic, unde inhibă ciclooxigenaza (COX). Inhibiția COX-2 de către AINS explică efectul antiinflamator, analgezic și antipiretic, în timp ce inhibiția COX-1 explică o serie de reacții adverse de tipul lezării mucoasei gastrice, prelungirii timpului de sângerare, afectării funcției hepatice, respectiv a funcției renale. În pofida excelentelor proprietăți antiinflamatoare și analgezice ale AINS, la utilizare îndelungată prezintă efecte adverse gastrointestinale și hemoragice, care le limitează utilizarea. Pentru reducerea efectelor adverse gastrointestinale, s-au dezvoltat noi compuși cu activitate antiinflamatoare care inhibă selectiv și specific COX-2, însă și aceștia prezintă reacții adverse cardiovasculare, așadar descoperirea de noi medicamente antiinflamatoare eficiente și cu un profil de siguranță mai bun rămâne un obiectiv important al chimiei medicamentului.

Pornind de la aceste premise, ne-am propus sinteza unor compuși cu proprietăți antiinflamatoare și analgezice și cu un risc scăzut al reacțiilor adverse comparativ cu antiinflamatoarele clasice.

Compușii biheterociclici sintetizați conțin în molecula lor sistemul tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolic și cel imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolic, sisteme considerate farmacofori importanți pentru apariția efectelor antiinflamatoare și analgezice. S-au obținut două serii de compuși tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici și imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici, izosteri, substituiți cu grupe farmacofore care să îmbunătățească potențialul biologic, precum și comportamentul farmacocinetic al acestora. Compușii obținuți au fost purificați, caracterizați fizico-chimic și spectral și au fost testați pentru evaluarea potențialului antiinflamator și analgezic.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Studiul 1 - Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor derivați de tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazol

**Ipoteza de lucru.** Având în vedere aspectele prezentate în literatura de specialitate, ne-am propus sinteza unor compuși biheterociclici, derivați de tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazol care au în moleculă grupe farmacofore cu potențial antiinflamator și evaluarea potențialului lor antiinflamator și analgezic. Obiectivele specifice studiului sunt:

- sinteza precursorilor 3-mercapto-1,2,4-triazolici;
- sinteza și caracterizarea fizico-chimică a tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor și a intermediarilor tioeterici corespunzători;
- stabilirea structurii compușilor obținuți prin analiză spectrală MS, RMN și IR.

**Material și metodă.** Derivații 1,2,4-triazolici s-au obținut prin ciclizarea aciltiosemicarbazidelor sintetizate în prealabil prin condensarea hidrazidelor cu tiocianatul de potasiu în cataliză acidă. Ciclizarea aciltiosemicarbazidelor a avut loc în mediu bazic, la reflux, iar mercapto-triazolii formați s-au izolat prin acidulare cu acid acetic concentrat. Prin reacția de condensare a 5-aril-3-mercapto-1,2,4-triazolilor cu  $\alpha$ -halocarbonili (derivați de 2-bromoacetofenonă) s-au obținut compuși tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici într-o singură etapă, dacă reacția s-a realizat la cald, sau în două etape, prin intermediul iminotioeterilor, dacă aceasta s-a realizat la temperatura camerei.

**Rezultate și discuții.** Au fost sintetizați șaisprezece compuși tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici (**1b-16b**) și iminotioeterii corespunzători (**1a-16a**), cu randamente de 21-95%, respectiv de 51-95%. Pentru a stabili influența condițiilor de reacție (temperatură, catalizator) asupra desfășurării reacției, sinteza compușilor s-a realizat la temperatura camerei, în mediu de acetona și în prezență de acetat de sodiu, precum și la reflux, în mediu etanolic și în cataliză acidă. Atunci când tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolii (**1b-16b**) s-au obținut direct prin condensarea 1,2,4-triazolilor cu 2-bromo-1-feniletanona, 2-bromo-1-(4-bromofenil)etanona, 2-bromo-1-(4-trifluorometil)fenil)etanona și 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etanona, randamentele au fost mai bune, decât atunci când au fost obținuți în două etape prin intermediul iminotioeterilor (**1a-16a**). Cele mai mici randamente au fost obținute în cazul compușilor tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici substituiți cu trifluorometil. Confirmarea structurii compușilor obținuți s-a realizat prin analiză spectrală  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, IR și spectrometrie de masă.

**Concluzii.** Au fost sintetizați 32 de compuși, dintre care 16 iminotioeteri 3-aril-1,2,4-triazolici (**1a-16a**) și 16 compuși tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici (**1b-16b**). Dintre compușii sintetizați 16 sunt substanțe noi, 11 iminotioeteri și 5 tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoli. Compușii au fost obținuți prin reacții de alchilare, condensare și ciclizare intramoleculară, cu participarea a diverși parteneri de reacție aleși astfel încât

pe molecula suport să existe grupe farmacofore cu potențial antiinflamator consacrat. Structurile compușilor sintetizați au fost stabilite prin analiză spectrală: IR,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN și spectrometrie de masă.

## Studiul 2 - Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor derivați de imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazol

**Ipo-teza de lucru.** Ne-am propus sinteza de compuși imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici izosteri cu derivații tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici descriși în studiul 1, pentru a evalua comparativ activitatea antiinflamatoare și analgezică a acestora. Obiectivele specifice studiului sunt:

- sinteza precursorilor 2-amino-1,3,4-tiadiazolici;
- sinteza și caracterizarea fizico-chimică a imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor;
- stabilirea structurii compușilor obținuți prin analiză spectrală MS, RMN și IR.

**Material și metodă.** Compușii imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici au fost sintetizați pornind de la derivații 2-amino-5-aril-1,3,4-tiadiazolici. 2-Amino-5-aril-1,3,4-tiadiazolii au fost sintetizați în prealabil printr-o reacție de acilare și ciclizare a tiosemicarbazidei cu acizi carboxilici aromatici în prezența oxiclururii de fosfor. Derivații 2,6-diaril-imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici s-au obținut într-o singură etapă prin condensarea 2-amino-5-aril-1,3,4-tiadiazolilor cu derivați de 2-bromoacetofenonă, la reflux, în mediu etanolic și în cataliza acidă.

**Rezultate și discuții.** A fost sintetizată o serie de compuși imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici (**1c-16c**), cu randamente între 27-57%. La obținerea compușilor s-a urmărit ca pe sistemul heterociclic să existe aceiași substituenți prezenți și în moleculele tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor, cu scopul obținerii unor compuși în care sistemul heterociclic și substituenții să se potențeze reciproc din punctul de vedere al potențialului biologic. Compușii imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici (**1c-16c**) substituiți în pozițiile C-2 și C-6 au fost obținuți într-o singură etapă, printr-o reacție de condensare a derivaților 1,3,4-tiadiazolici cu bromoacetofenonele corespunzătoare. Confirmarea structurii compușilor obținuți s-a realizat prin analiză spectrală  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, IR și spectrometrie de masă.

**Concluzii.** Au fost sintetizați 16 compuși imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici, cinci dintre aceștia nu au mai fost raportați în literatura de specialitate. Compușii au fost obținuți prin reacții de condensare și ciclizare intramoleculară, iar partenerii de reacție au fost aleși astfel încât să se obțină derivații imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici izosteri cu derivații tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici raportați în studiul 1. Structurile compușilor sintetizați au fost stabilite prin analiză spectrală: IR,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN și spectrometrie de masă.

### Studiul 3 - Evaluarea potențialului biologic al tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor și al imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați

**Ipoteza de lucru.** Ne-am propus obținerea unor compuși cu proprietăți antiinflamatoare și analgezice, dar care să prezinte un profil de siguranță mai bun. După sinteza și caracterizarea spectrală a compușilor, obiectivele specifice au fost:

- evaluarea *in vivo* a potențialului antiinflamator al tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor și al imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați, utilizând un model farmacologic de inflamație acută;
- evaluarea *in vivo* a potențialului analgezic al tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor și al imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați, utilizând un model farmacologic de durere în condiții inflamatorii;
- evaluarea riscului potențial de toxicitate gastrică al tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor și al imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați, prin determinarea gradului de lezare a mucoasei gastrice;
- evaluarea raportului de inhibiție COX-2/COX-1 prin andocare moleculară.

**Material și metodă.** Studiul s-a desfășurat, după obținerea avizului favorabil din partea Comisiei de etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” și a Direcției Sanitar Veterinare și Pentru Siguranța Alimentelor Cluj.

Pentru evaluarea potențialului biologic al compușilor sintetizați, au fost utilizați șobolani albi, masculi (Crl:Wi), cu greutatea între 180-200g, proveniți de la Centrul de Medicină Experimentală și Aptitudini Practice (Biobaza) al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, care au fost repartizați în grupuri a câte 6 șobolani. Animalele au fost păstrate în condiții standard înaintea derulării experimentelor. Compușii sintetizați au fost administrați prin gavaj, într-o doză unică (50 mg/kg), grupul control negativ a fost tratat doar cu vehicul, iar grupul control pozitiv a primit ca medicament de referință, diclofenac.

Activitatea antiinflamatoare a fost evaluată prin testul edemului labei de șobolan indus cu  $\lambda$ -caragenină.

Pentru evaluarea potențialului analgezic al substanțelor sintetizate, au fost utilizate aceleași grupuri de animale folosite pentru testul edemului labei de șobolan indus cu  $\lambda$ -caragenină 1%.

Potențialul risc ulcerogen apărut după administrarea unei doze unice de 50 mg/kg prin gavaj, a fost evaluat prin observarea directă a mucoasei gastrice. Gradul de afectare gastrică a fost evaluat din punct de vedere al aspectului și numărului leziunilor, după o scală de la 0.5 la 3.0 puncte.

Andocare moleculară pe cele două enzime (COX-1 și COX-2), s-a efectuat printr-o metodă computațională.

**Rezultate și discuții.** În prima fază a inducerii edemului, în principal au avut un efect antiinflamator bun compușii substituiți cu brom (**2b/2c**, **6c**, **10c**, **14c**) și cu metoxil (**4b/4c**, **8c**, **9c**, **10c**, **12b/12c**), iar în cea de-a doua fază a edemului inflamator, compușii substituiți cu brom (**2b/2c**, **10c**, **14a**), cu metoxil (**4b**, **8b/8c**, **9c**, **10c**, **11b**,

**12b**) și cei substituiți cu trifluorometil (**3b/3c**, **7b**, **11b**, **15a**) au scăzut semnificativ edemul inflamator.

S-a observat o activitate analgezică bună pentru compușii substituiți cu clor și cu brom (**6b/6c**) sau trifluorometil (**7b/7c**) și restul metoxil împreună cu brom (**10b/10c**) sau trifluorometil (**11b/11c**). Prezența unor grupe atrăgătoare de electroni și a unor substituenți lipofili, cum ar fi bromul, pe heterociclul de bază, duc la îmbunătățirea efectului analgezic, lucru evidențiat și în cazul compușilor **9b/9c**.

Nici un compus sintetizat nu a indus un efect iritativ gastric mai mare decât cel produs de diclofenac.

Prezența restului 4-trifluorometil (**3b/3c**) crește în special selectivitatea pentru COX-2 și scade selectivitatea pentru COX-1, comparativ cu derivații nesubstituiți (**1b/1c**). Restul 4-bromfenil (**2b/2c**) influențează pozitiv interacțiunea cu COX-2 față de compușii nesubstituiți (**1b/1c**), iar adăugarea unui rest 4-metoxifenil (**10b/10c**) în structura compușilor substituiți cu 4-bromfenil scade afinitatea față de COX-1 și o menține crescută pentru COX-2. Derivații benzensulfonamidici se leagă omogen la nivelul izoenzimelor și au o selectivitate mai mare pentru COX-2, față de COX-1.

**Concluzii.** Din punct de vedere al efectului antiinflamator, zece derivații tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici (**1b-12b**), șase compuși imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici (**1c-12c**) și trei derivați benzensulfonamidici, unul cu structură tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolică și doi iminotioeteri, au redus semnificativ edemul inflamator. Toți compușii evaluați au prezentat o creștere a pragului nociceptiv atunci când au fost testați în modelul de alergie indusă în condiții inflamatorii, iar majoritatea compușilor evaluați nu au prezentat un risc ulcerogen semnificativ față de grupul control negativ. Compușii substituiți cu 4-bromfenil (**2b**), 4-trifluorometilfenil (**3c**) și 4-metoxifenil (**13b**) au prezentat cea mai mare selectivitate față de COX-2 și o selectivitate scăzută față de COX-1, acest lucru fiind evidențiat *in vivo* prin efectul antiinflamator bun al acestora și efectul ulcerogen scăzut.

#### **Studiul 4 - Evaluarea lipofiliei tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor și a imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați**

**Ipoteza de lucru.** Obiectivul principal al acestui studiu este determinarea lipofiliei tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolilor și a imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor sintetizați, utilizând RP-TLC. Obiectivele specifice ale studiului sunt:

- determinarea parametrilor de lipofilie experimentali (**R<sub>f</sub>**, **R<sub>M</sub>**, **R<sub>M0</sub>**, **b**, **mR<sub>M</sub>**, **φ<sub>0</sub>**, **PC<sub>1</sub>**) ai compușilor sintetizați, prin RP-TLC (RP-C18);
- determinarea parametrilor de lipofilie teoretici (**Log P**, **Log D**) ai compușilor sintetizați prin metode computaționale;
- evaluarea corelației dintre parametrii de lipofilie experimentali și cei teoretici prin aplicarea analizei componentelor principale (**PCA**);
- evaluarea corelației dintre parametrii de lipofilie ai compușilor sintetizați și activitatea biologică.



**Material și metodă.** Determinarea parametrilor de lipofilie experimentali s-a realizat prin cromatografie pe strat subțire cu fază inversă (RP-TLC). Indicii de lipofilie teoretici s-au determinat prin diferite metode computaționale. S-a utilizat programul Chem Draw Ultra 12 pentru calcularea Log P, Log P<sup>C</sup>-Crippen, Log P<sup>V</sup>-Viswanadhan, ClogP și siteurile ALOGPS 2.1 vclab, pentru calcularea ALOGPS, AclogP, ALOGP, MLOGP, XLOGP2, XLOGP3 și SwissADME pentru determinarea iLOGP, MLOGP, XLOGP3, WLOGP, SILICOS-IT. Pentru calcularea Log D la diferite valori ale pH-ului s-a utilizat platforma Chemicalize, dezvoltată de ChemAxon. Pentru efectuarea analizei componentelor principale (PCA) s-a folosit programul „Statistica”.

**Rezultate și discuții.** În urma interpretării rezultatelor s-a constatat că tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolii **1b-12b** și imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolii **1c-12c** au o lipofilie crescută, comparativ cu derivații benzensulfonamidici care sunt mai puțin lipofili, iar dintre aceștia tioeterii mercapto-1,2,4-triazolici **13a-16a** sunt cei mai hidrofilii. În profilul de retenție al compușilor **1b-16b**, **1c-16c** se evidențiază caracterul lipofil asemănător al acestora, interacțiunile cu faza staționară fiind de același tip. Compușii substituiți cu brom sau trifluorometil prezintă un caracter lipofil mai ridicat, comparativ cu ceilalți compuși substituiți cu grupa metoxil, respectiv cu cei nesubstituiți. Compararea parametrilor de lipofilie determinați experimental cu o serie de parametri estimați prin metode computaționale a evidențiat corelații semnificative din punct de vedere statistic.

**Concluzii.** S-a evaluat lipofilia a 36 de compuși sintetizați prin RP-TLC, având ca fază staționară C18 și ca fază mobilă un amestec de izopropanol-apă. Analiza componentelor principale (**PC<sub>1</sub>**, **PC<sub>2</sub>**) aplicată direct asupra parametrilor **R<sub>M</sub>**, a evidențiat gruparea compușilor investigați în două mari grupe de lipofilie: derivații benzensulfonamidici mai puțin lipofili și ceilalți compuși studiați mai lipofili.

Gradul de lipofilie crescut al compușilor nu variază direct proporțional cu activitatea biologică, deoarece intervine și modalitatea de interacțiune cu COX-1, COX-2, care nu este dictată de lipofilia acestora. Pentru un efect antiinflamator bun, trebuie să existe un echilibru între caracterul hidrofil-lipofil al compușilor.

## Concluzii generale

1. Au fost sintetizați și caracterizați fizico-chimic și spectral 32 de compuși (16 tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoli și 16 tioeteri), dintre care 16 sunt compuși noi (5 tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoli și 11 tioeteri).
2. Au fost sintetizați și caracterizați fizico-chimic și spectral 16 compuși imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolici, dintre care 5 sunt compuși noi.
3. A fost evaluat *in vivo* potențialul antiinflamator și analgezic al compușilor sintetizați, printr-un model de inflamație acută indusă cu λ-caragenină 1% la șobolani, 19 compuși prezentând o activitate antiinflamatoare semnificativă statistic față de grupul control

negativ. Efectul analgezic al compușilor a fost evaluat folosindu-se un model de durere inflamatorie. Prezența în moleculă a resturilor 4-bromfenil, 4-trifluorometilfenil și 4-metoxifenil au determinat creșterea pragului nociceptiv. Derivații 4-benzensulfonamidici au evidențiat efecte antiinflamatoare și analgezice bune, la 4h de la inducerea inflamației, unul din factorii care pot determina apariția cu întârziere a efectului este absorbția gastrointestinală scăzută a acestor compuși.

Activitatea antiinflamatoare, respectiv analgezică a compușilor *in vivo* a putut fi corelată cu studiul de andocare moleculară pe COX-1 și COX-2. Niciunul dintre compușii evaluați nu a prezentat un risc ulcerogen crescut.

4. A fost evaluată lipofilia compușilor tiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazolici, imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazolilor și a unor tioeteri mercapto-1,2,4-triazolici prin cromatografie pe strat subțire cu fază inversă. Parametrii cromatografici experimentali au fost corelați valorile Log P și Log D, determinate teoretic. Rezultatele obținute au arătat că pentru o activitate antiinflamatoare și analgezică bună, nu este necesară o lipofilie crescută a compușilor, ci trebuie să existe un echilibru între gradul de lipofilie și de hidrofilie al acestora.

---

Summary of the doctoral thesis

Synthesis and evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of some imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles and some thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles

---

PhD Student **Anamaria Cristina**

---

Scientific supervisor **Prof. Dr. Valentin Zaharia**

---



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

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Compounds with thiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazole structure</b>	17
1.1. Synthesis methods of thiazolo[3,2- <i>b</i> ][1,2,4]triazole compounds	17
1.1.1. Condensation reactions of 1,2,4-triazole-3-thione/thiol	17
1.1.2. Cyclization of some unsaturated triazole thioethers or some triazoles with thiirane ring	20
1.1.3. Substitution of the thiazolo-triazole at the C-5 carbon	21
1.2. Biological activities of thiazolo[3,2- <i>b</i> ][1,2,4]triazole compounds	23
1.2.1. Antibacterial and antimycotic activity	23
1.2.2. Anti-inflammatory and analgesic activity	24
1.2.3. Anticancer activity	27
<b>2. Compounds with imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]thiadiazole structure</b>	29
2.1. Synthesis methods of imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]thiadiazole compounds	29
2.1.1. Synthesis of C-2 and/or C-5 or C-6 substituted imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]thiadiazoles	29
2.1.2. Synthesis of C-5, C-6 or C-2, C-5, C-6 substituted imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]thiadiazoles	33
2.2. Biological activities of imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3,4]thiadiazoles	34
2.2.1. Antibacterial and antimycotic activity	34
2.2.2. Antitubercular activity	37
2.2.3. Anti-inflammatory and analgesic activity	38
2.2.4. Anticancer activity	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Background/Aims</b>	43
<b>2. General methodology</b>	45
<b>3. Study 1 – Synthesis and physico-chemical characterization of some thiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazole derivatives</b>	47
3.1. Introduction	47
3.2. Aims	47
3.3. Material and method	48
3.4. Results and discussions	50
3.5. Experimental protocols	54

---

3.6. Conclusions	65
<b>4. Study 2 - Synthesis and physico-chemical characterization of some imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]thiadiazole derivatives</b>	67
4.1. Introduction	67
4.2. Aims	67
4.3. Material and method	68
4.4. Results and discussions	69
4.5. Experimental protocols	72
4.6. Conclusions	78
<b>5. Study 3 – Biological evaluation of thiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazole and imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]thiadiazole compounds</b>	79
5.1. Introduction	79
5.2. Aims	80
5.3. Material and method	80
5.3.1. Anti-inflammatory activity evaluation	81
5.3.2. Analgesic activity evaluation	82
5.3.3. Ulcerogenic activity evaluation	82
5.3.4. Molecular docking study	83
5.3.5. Statistical analysis	83
5.4. Results and discussions	84
5.4.1. Anti-inflammatory activity evaluation	84
5.4.2. Analgesic activity evaluation	91
5.4.3. Ulcerogenic activity evaluation	97
5.4.4. Molecular docking study	99
5.5. Conclusions	100
<b>6. Study 4 – Lipophilicity evaluation of thiazolo[3,2-<i>b</i>][1,2,4]triazole and imidazo[2,1-<i>b</i>][1,3,4]thiadiazole compounds</b>	109
6.1. Introduction	109
6.2. Aims	110
6.3. Material and method	110
6.3.1. Chromatographic conditions	110
6.3.2. Experimental lipophilicity parameters	111
6.3.3. Computational lipophilicity parameters	111
6.4. Results and discussions	112
6.5. Conclusions	128
<b>7. General discussions</b>	129
<b>8. General conclusions</b>	133

<b>9. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	137
<b>REFERENCES</b>	139

**Keywords:** thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole, imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole, spectral analysis, anti-inflammatory activity, analgesic activity, ulcerogenic activity, molecular docking, lipophilicity, reverse phase thin layer chromatography

## INTRODUCTION

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are an essential class of drugs used to treat inflammation, pain, and fever. They act on the arachidonic acid cascade, where they inhibit cyclooxygenase (COX). The inhibition of COX-2 by NSAIDs explains the anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic effects. In contrast, the inhibition of COX-1 explains a series of side effects such as damage to the gastric mucosa, prolongation of bleeding time, impaired liver function and kidney function. Despite the excellent anti-inflammatory and analgesic properties of NSAIDs, long-term use can lead to gastrointestinal and hemorrhagic side effects, which limit their use. To reduce gastrointestinal side effects, new compounds with an anti-inflammatory activity that selectively and specifically inhibit COX-2 have been synthesized, but they also presented cardiovascular side effects. The discovery of new effective anti-inflammatory drugs with a better safety profile remains an important goal of drug chemistry.

Starting from these premises, we proposed the synthesis of compounds with anti-inflammatory and analgesic properties and with a low risk of side effects compared to conventional anti-inflammatory drugs.

The synthesized biheterocyclic compounds contain in their molecule the thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole and the imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole systems which are considered essential pharmacophores for the occurrence of the anti-inflammatory and analgesic effects. Two series of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole compounds, isosteres, substituted with pharmacophore groups to improve their biological potential, as well as their pharmacokinetic behavior, were synthesized. The compounds were purified, characterized physico-chemically and spectrally, and were tested to evaluate their anti-inflammatory and analgesic potential.

---

## PERSONAL CONTRIBUTION

### Study 1 – Synthesis and physico-chemical characterization of some thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole derivatives

**Aims.** Considering the aspects presented in the literature, we proposed the synthesis of some biheterocyclic compounds, thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole derivatives, substituted with pharmacophore groups with anti-inflammatory potential. After the synthesis, the compounds will be evaluated for their anti-inflammatory and analgesic potential. The specific objectives of the study are:

- synthesis of 3-mercapto-1,2,4-triazole precursors;
- synthesis and physico-chemically characterization of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles and their corresponding thioether intermediates;
- spectral analysis (NMR, IR, MS) of synthesized compounds to confirm their chemical structure.

**Material and method.** 1,2,4-Triazole derivatives were obtained by cyclization of acylthiosemicarbazides, previously synthesized by the condensation of the corresponding hydrazides with potassium thiocyanate in acid catalysis. The cyclization of acylthiosemicarbazides was performed in alkaline media, under reflux. The sodium mercaptides formed as intermediates were transformed in the corresponding mercapto-triazoles by treatment with concentrated acetic acid. Thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole derivatives were synthesized in a single step reaction by the condensation of 5-aryl-3-mercapto-1,2,4-triazoles with  $\alpha$ -halocarbonyls (2-bromoacetophenone derivatives), if the reaction was performed under reflux, or in two reaction steps, through iminothioethers intermediates, if the reaction was performed at room temperature.

**Results and discussions.** Sixteen thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole compounds (**1b-16b**) and corresponding iminothioethers (**1a-16a**) were synthesized in yields of 21-95% and 51-95%, respectively. To establish the influence of the reaction conditions (temperature, catalyst) on the reaction development, the synthesis of the compounds was performed at room temperature, in acetone media and the presence of sodium acetate, as well as under reflux, in ethanolic media and acid catalysis. When thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles (**1b-16b**) were obtained directly by condensing 1,2,4-triazoles with 2-bromo-1-phenylethanone, 2-bromo-1-(4-bromophenyl)ethanone, 2-bromo-1-(4-trifluoromethyl)phenyl)ethanone and 2-bromo-1-(4-methoxyphenyl)ethanone, yields were better than when obtained in two steps by means of iminothioethers (**1a-16a**). The lowest yields were obtained for thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles substituted with 4-trifluoromethylphenyl moiety. The structures of the synthesized compounds were confirmed by spectral analysis:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR and mass spectrometry.

**Conclusions.** We synthesized 32 compounds, of which 16 3-aryl-1,2,4-triazole iminothioethers (**1a-16a**) and 16 thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole derivatives (**1b-16b**). Of the synthesized compounds, 16 are novel substances, 11 iminothioethers and 5 thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles. The compounds were obtained by alkylation, condensation and intramolecular cyclization reactions, with the participation of various reaction partners chosen so that on the support molecule there are pharmacophore groups with established anti-inflammatory potential. The structures of the synthesized compounds were determined by spectral analysis: IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and mass spectrometry.

## Study 2 – Synthesis and physico-chemical characterization of some imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole derivatives

**Aims.** We proposed the synthesis of imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole isosteric compounds with thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole derivatives described in study 1, to evaluate their anti-inflammatory and analgesic activity comparatively. The specific objectives of the study are:

- synthesis of 2-amino-1,3,4-thiadiazole precursors;
- synthesis and physico-chemical characterization of imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles;
- spectral analysis (NMR, IR, MS) of synthesized compounds to confirm their chemical structure.

**Material and method.** The imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole compounds were synthesized starting from 2-amino-5-aryl-1,3,4-thiadiazole derivatives. 2-Amino-5-aryl-1,3,4-thiadiazoles were previously synthesized by an acylation and cyclization reaction of thiosemicarbazide with aromatic carboxylic acids in the presence of phosphorus oxychloride. 2,6-Diaryl-imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole derivatives were obtained in a single step by condensing 2-amino-5-aryl-1,3,4-thiadiazoles with 2-bromoacetophenone derivatives, under reflux, in ethanolic media and in acid catalysis.

**Results and discussions.** A series of imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole compounds (**1c-16c**) were synthesized, in yields between 27-57%. The compounds were substituted with the same moieties as on the thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole molecules, in order to obtain compounds in which the heterocyclic system and the substituents potentiate each other biological potential. The imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole compounds (**1c-16c**) substituted on C-2 and C-6 were obtained in a single step, by a condensation reaction of 1,3,4-thiadiazoles with the corresponding bromoacetophenones. The structures of the synthesized compounds were determined by spectral analysis: IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and mass spectrometry.

**Conclusions.** We synthesized 16 imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole compounds, five of which have not been reported in the literature. The compounds were obtained by intramolecular condensation and cyclization reactions, and the reaction partners were



chosen so as to obtain imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole derivatives isosteres with thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles derivatives reported in study 1. The structure of the synthesized compounds was confirmed by spectral analysis: <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR and mass spectrometry.

### **Study 3 – Biological evaluation of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole compounds**

**Aims.** We aimed to obtain compounds with anti-inflammatory and analgesic properties, and with a good safety profile. After the synthesis and spectral characterization of the compounds, the specific objectives were:

- *in vivo* evaluation of the anti-inflammatory potential of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles, using a pharmacological model of acute inflammation;
- *in vivo* evaluation of the analgesic potential of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles, using a pharmacological model of inflammatory pain;
- assessment of the potential risk of gastric toxicity of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles by evaluating the degree of damage to gastric mucosa;
- evaluation of the COX-2 / COX-1 inhibition ratio by molecular docking.

**Material and method.** The study was carried out, after obtaining ethical approval from the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" and the Sanitary Veterinary and Food Safety Directorate from Cluj.

For the evaluation of the biological potential of the synthesized compounds, white male rats (CrI: Wi), weighing between 180-200 g, from the Center of Experimental Medicine and Practical Skills (Biobase) of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, were used. The animals were distributed in groups of 6 rats each and they were kept in standard conditions before the experiments. The synthesized compounds were administered by gavage, in a single dose (50 mg/kg, b.w.). The negative control group was treated with vehicle only, and the positive control group received diclofenac as the reference drug.

Anti-inflammatory activity was assessed by the  $\lambda$ -carrageenan-induced rat paw edema test.

To evaluate the analgesic potential of the synthesized substances, were used the same groups of rats previously tested for the anti-inflammatory potential of the synthesized compounds.

The ulcerogenic effect arising after administration of a single dose of 50 mg/kg by gavage was assessed by direct observation of the gastric mucosa. The degree of gastric mucosa damage was assessed in terms of appearance and number of lesions, on a scale of 0.5 to 3.0 points.

Molecular docking on the two enzymes (COX-1 and COX-2) was performed by a computational method.

**Results and discussions.** In the first phase of edema induction, mainly compounds substituted with bromine (**2b/2c**, **6c**, **10c**, **14c**) and methoxyl (**4b/4c**, **8c**, **9c**, **10c**, **12b/12c**) presented a good anti-inflammatory effect, and in the second phase of inflammatory edema, compounds substituted with bromine (**2b/2c**, **10c**, **14a**), methoxyl (**4b**, **8b/8c**, **9c**, **10c**, **11b**, **12b**) and those substituted with trifluoromethyl (**3b/3c**, **7b**, **11b**, **15a**) significantly decreased inflammatory edema.

Good analgesic activity was observed for compounds substituted with chlorine and bromine (**6b/6c**) or trifluoromethyl (**7b/7c**) and methoxyl moiety together with bromine (**10b/10c**) or trifluoromethyl (**11b/11c**). The presence of attractive electron groups and lipophilic substituents, such as bromine, on the heterocycle system, leads to an improvement in the analgesic effect, which is also highlighted in the case of **9b/9c** compounds.

No synthesized compound induced a greater gastric irritant effect than diclofenac.

The presence of 4-trifluoromethyl moiety (**3b/3c**) increases, in particular, the selectivity for COX-2 and decreases the selectivity for COX-1, compared to the unsubstituted derivatives (**1b/1c**). 4-Bromophenyl moiety (**2b/2c**) positively influences the interaction with COX-2 compared to unsubstituted compounds (**1b/1c**), and the addition of a 4-methoxyphenyl moiety (**10b/10c**) to the structure of 4-bromophenyl substituted compounds decreases the affinity for COX-1 and keeps it increased for COX-2. Benzenesulfonamide derivatives bind homogeneously to isoenzymes and have a higher selectivity for COX-2 than COX-1.

**Conclusions.** In terms of anti-inflammatory effect, ten thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole derivatives (**1b-12b**), six imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole derivatives (**1c-12c**) and three benzenesulfonamide derivatives, one with thiazolo-triazole structure and two iminothioether, significantly decreased inflammatory edema. All evaluated compounds showed an increase in the nociceptive threshold when tested in the inflammatory pain model, and most of the tested compounds did not present a significant ulcerogenic risk compared to the negative control group. Compounds substituted with 4-bromophenyl (**2b**), 4-trifluoromethylphenyl (**3c**) and 4-methoxyphenyl (**13b**) showed the highest selectivity to COX-2 and low selectivity to COX-1, as evidenced *in vivo* by their good anti-inflammatory effect and low ulcerogenic risk.

#### **Study 4 – Lipophilicity evaluation of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole compounds**

**Aims.** The main objective of this study is to determine the lipophilicity of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles synthesized, using RP-TLC. The specific objectives of the study are:

- evaluation of the experimental lipophilicity parameters ( $R_f$ ,  $R_M$ ,  $R_{M0}$ ,  $b$ ,  $mR_M$ ,  $\phi_0$ ,  $PC1$ ) of the synthesized compounds, by RP-TLC (RP-C18);

- evaluation of the theoretical lipophilicity parameters (Log P, Log D) of the compounds synthesized by computational methods;
- evaluation of the correlation between experimental and theoretical lipophilicity parameters by applying principal component analysis (PCA);
- evaluation of the correlation between the lipophilicity parameters of the synthesized compounds and the biological activity.

**Material and method.** The evaluation of the experimental lipophilicity parameters was performed by reverse phase thin layer chromatography (RP-TLC). Theoretical lipophilicity parameters were estimated by various computational methods. The ChemDraw Ultra 12 program was used to calculate Log P, Log P<sup>C</sup>-Crippen, Log P<sup>V</sup>-Viswanadhan, ClogP and the ALOGPS 2.1 vclab sites, to calculate ALOGPS, AclogP, ALOGP, MLOGP, XLOGP2, XLOGP3 and SwissADME to determine iLOGP, MLOGP, XLOGP3, WLOGP, SILICOS-IT. The Chemicalize platform, developed by ChemAxon, was used to calculate Log D at different pH values. The "Statistica" program was used to perform the analysis of the principal components (PCA).

**Results and discussions.** Following the interpretation of the results, it was found that thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles **1b-12b** and imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazoles **1c-12c** have increased lipophilicity, compared to benzenesulfonamide derivatives which are less lipophilic, and among them mercapto-1,2,4-triazoles thioethers **13a-16a** are the most hydrophilic. In the retention profile of compounds **1b-16b**, **1c-16c**, their similar lipophilicity compartment is highlighted, the interactions with the stationary phase being of the same type. Compounds substituted with bromine or trifluoromethyl are more lipophilic, compared to compounds substituted with the methoxyl group, respectively with the unsubstituted ones. The comparison of experimentally determined lipophilicity parameters with a series of lipophilicity parameters estimated by computational methods showed statistically significant correlations.

**Conclusions.** The lipophilicity of 36 synthesized compounds was investigated by RP-TLC having as stationary phase C18 and as mobile phase a mixture of isopropanol-water. The analysis of the main components (**PC1**, **PC2**) applied directly on the **R<sub>M</sub>** parameters, highlighted the grouping of the investigated compounds in two major lipophilic groups: benzenesulfonamide derivatives which are less lipophilic and the other synthesized compounds more lipophilic.

The increased degree of lipophilicity of the compounds does not vary in direct proportion to the biological activity, because there is also important the way that compounds interact with COX-1, COX-2, which is not dictated by their lipophilicity. For a good anti-inflammatory effect, there must be a balance between the hydrophilic-lipophilic character of the compounds.

## General conclusions

1. We synthesized and physico-chemically characterized 32 compounds (16 thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles and 16 thioethers), of which 16 compounds are novel compounds (5 thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazoles and 11 thioethers).

2. We synthesized and physico-chemically characterized 16 imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole, of which 5 compounds are novel.

3. The anti-inflammatory and analgesic properties of the synthesized compounds were evaluated *in vivo*, by a model of acute inflammation induced with 1%  $\lambda$ -carrageenan in rats. Nineteen compounds showed a statistically significant anti-inflammatory activity compared to the negative control group. The analgesic effect of the compounds was evaluated using an inflammatory pain model. The presence in the molecule of 4-bromophenyl, 4-trifluoromethylphenyl and 4-methoxyphenyl moieties increased the nociceptive threshold. Benzenesulfonamide derivatives showed good anti-inflammatory and analgesic effects, 4 hours after the induction of inflammation. One of the factors that can cause the delayed effect could be the low gastrointestinal absorption of these compounds.

The *in vivo* anti-inflammatory and analgesic activity of the compounds could be correlated with the results from the study of molecular docking on COX-1 and COX-2. None of the evaluated compounds showed an increased ulcerogenic risk.

4. The lipophilicity of thiazolo[3,2-*b*][1,2,4]triazole, imidazo[2,1-*b*][1,3,4]thiadiazole and mercapto-1,2,4-triazole thioether derivatives has been evaluated by reverse phase thin layer chromatography. The experimental chromatographic parameters were correlated with the values of Log P and Log D, determined theoretically. The obtained results showed that for a good anti-inflammatory and analgesic activity, increased lipophilicity of the compounds is not absolutely necessary, but there must be a balance between the lipophilicity and their hydrophilicity.