

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**  
**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL FARMACIE

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. LIMBAN CARMEN**

**Student-doctorand:**

**ALEXANDRA-TEODORA BORDEI (TELEHOIU)**

**2020**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**DOMENIUL FARMACIE**



**Sinteza și evaluarea biologică a unor noi derivați ai carbazolului**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. LIMBAN CARMEN**

**Student-doctorand:**

**ALEXANDRA-TEODORA BORDEI (TELEHOIU)**

**2020**

## **Motto**

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

Marie Curie

## Cuprins

Abrevieri și simboluri.....	10
Mulțumiri.....	12
Introducere.....	14
Cap. 1. Derivați ai carbazolului cu potențial terapeutic .....	18
1.1. Derivați ai carbazolului cu activitate antimicrobiană și antifungică .....	19
1.2. Derivați ai carbazolului cu activitate antimalarică .....	24
1.3. Derivați ai carbazolului cu activitate antiinflamatoare și antioxidantă .....	25
1.4. Derivați ai carbazolului cu acțiune pe sistemul cardiovascular.....	27
1.5. Derivați ai carbazolului cu acțiune neuroprotectoare .....	30
1.6. Derivați ai carbazolului cu activitate antitumorală.....	33
1.7. Derivați ai carbazolului cu acțiune antipsihotică.....	37
1.8. Derivați ai carbazolului cu alte acțiuni farmacodinamice .....	38
Cap.2. Carprofenul și derivați ai acestuia.....	41
2.1. Proprietăți fizico-chimice .....	42
2.2. Metode de sinteză .....	42
2.3. Proprietăți farmacologice .....	46
2.3.1. Farmacocinetică.....	46
Absorbție .....	46
Distribuție .....	46
Metabolizare și eliminare .....	47
2.3.2. Farmacodinamie .....	48
2.3.3. Farmacotoxicologie .....	50
2.4. Utilizări în practica farmaceutică .....	50
2.5. Studii efectuate pe compuși noi, derivați ai carprofenului .....	51
Cap.3. Derivați oxadiazolici cu potențial terapeutic.....	56

3.1. Metode de sinteză ale derivaților 1,3,4-oxadiazolici .....	56
3.2. Efectele terapeutice ale derivaților 1,3,4-oxadiazolici .....	58
3.2.1. Derivați 1,3,4-oxadiazolici cu efect antimicrobian .....	60
3.2.2. Derivați 1,3,4-oxadiazolici cu efect antituberculos .....	61
3.2.3. Derivați 1,3,4-oxadiazolici cu efect antiinflamator .....	63
3.2.4. Derivați 1,3,4-oxadiazolici cu efect antioxidant.....	63
3.2.5. Derivați 1,3,4-oxadiazolici cu efect anticonvulsivant .....	64
3.2.6. Derivați 1,3,4-oxadiazolici cu alte efecte farmacodinamice .....	66
Cap. 4. N-Acil hidrazone cu potențial terapeutic .....	68
4.1. Metode de sinteză ale N-acil hidrazonelor .....	69
4.1.1. Metode convenționale de sinteză.....	69
4.1.2. Metode de sinteză la microunde .....	70
4.2. Efecte biologice ale N-acil hidrazonelor .....	70
4.2.1. N-Acil hidrazone cu activitate antimicrobiană.....	70
4.2.2. N-Acil hidrazone cu acțiune antituberculoasă.....	73
4.2.3. N-Acil hidrazone cu acțiune antitumorală.....	75
4.2.4. N-Acil hidrazone cu acțiune analgezică și antiinflamatoare .....	76
4.2.5. N-Acil hidrazone cu acțiune antioxidantă .....	78
4.2.6. N-Acil hidrazone cu acțiune anticonvulsivantă.....	80
4.2.7. N-Acil hidrazone cu alte acțiuni farmacodinamice .....	82
Cap. 5. Ipoteze de lucru și obiective generale .....	84
Cap. 6. Sinteza și caracterizarea noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]- N'-benzoilhidrazine R-substituite, a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4- oxadiazol-2-il)etanului și a derivaților (EZ)-N'-benziliden-(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2- il)propanohidrazidei.....	85
6.1. Introducere.....	85
6.2. Materiale și metode .....	86

6.2.1. Obținerea (2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoatului de metil (esterul metilic al carprofenului) (5).....	88
6.2.2. Obținerea (2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanohidrazidei (hidrazida carprofenului) (6).....	88
6.2.3. Obținerea derivaților N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R-substituie (1a-h) .....	89
6.2.4. Obținerea derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului (2a-d).....	91
6.2.5. Obținerea derivaților (EZ)-N'-benziliden-(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanohidrazidei (3a-1).....	93
6.3. Rezultate și discuții.....	96
6.3.1. Sinteza noilor compuși .....	96
6.3.2. Dovedirea structurii chimice a compușilor sintetizați .....	102
6.4. Concluzii.....	123
Cap. 7. Determinarea activității antimicrobiene a noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine, a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului și a derivaților (EZ)-N'-benziliden-(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanohidrazidei .....	125
7.1. Introducere.....	125
7.2. Materiale și metode .....	126
7.2.1. Screening-ul calitativ al activității antimicrobiene pentru seria III de compuși.....	126
7.2.2. Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării CMI pentru seriile I-III de compuși .....	126
7.2.3. Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării CMB pentru seriile I și II de compuși .....	128
7.2.4. Evaluarea activității anti-biofilm prin determinarea CMEB pentru seriile I-III de compuși.....	128
7.3. Rezultate și discuții.....	129
7.3.1. Screening-ul calitativ al activității antimicrobiene pentru seria III .....	129

7.3.2. Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării CMI pentru seriile I- III.....	131
7.3.3. Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării CMB pentru seriile I și II de compuși .....	133
7.3.4. Evaluarea activității anti-biofilm prin determinarea CMEB pentru seriile I- III de compuși.....	133
7.4. Concluzii.....	136
Cap. 8. Determinarea citotoxicității noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoihidrazine R-substituite și a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului .....	138
8.1. Introducere.....	138
8.2. Materiale și metode .....	138
8.2.1. Determinarea citotoxicității in vitro .....	138
8.2.2. Determinarea citotoxicității in vivo.....	139
8.3. Rezultate și discuții.....	140
8.3.1. Determinarea citotoxicității in vitro .....	140
8.3.2. Determinarea citotoxicității in vivo.....	144
8.4. Concluzii.....	145
Cap. 9. Determinarea activității antioxidante a noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoihidrazine R-substituite și a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului .....	147
9.1. Introducere.....	147
9.2. Materiale și metode .....	148
9.2.1. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH.....	148
9.2.2. Capacitatea de scavenger asupra radicalului ABTS•+ .....	150
9.3. Rezultate și discuții.....	153
9.3.1. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH.....	153
9.3.2. Capacitatea de scavenger asupra radicalului ABTS•+ .....	155
9.4. Concluzii.....	157

Cap. 10. Obținerea grafenei funcționalizate, folosind hidrazida carprofenului.....	159
10.1. Introducere.....	159
10.2. Materiale și metode .....	160
10.2.1. Sinteza oxidului de grafenă .....	160
10.2.2. Prepararea grafenei funcționalizate cu hidrazida carprofenului (A1) .....	160
10.2.3. Determinarea activității antimicrobiane .....	161
10.3. Rezultate și discuții.....	161
10.3.1. Etapele de sinteză .....	161
10.3.2. Confirmarea structurii chimice .....	162
10.3.3. Activitatea biologică.....	164
10.4. Concluzii.....	165
Cap.11. Studiile bioinformatică ale noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoihidrazine R-substituite și ale derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului .....	166
11.1. Introducere.....	166
11.2. Materiale și metode .....	167
11.2.1. Modelarea moleculară a compușilor.....	167
11.2.2. Minimizarea energetică .....	167
11.2.3. Determinarea caracterului drug-like și a biodisponibilității .....	168
11.2.4. Identificarea mecanismului de acțiune .....	168
11.2.5. Similarități structurale pentru compușii analizați, comparativ cu compușii chimici din bazele de date .....	170
11.2.6. Identificarea profilului ADMET.....	172
11.3. Rezultate și discuții.....	175
11.3.1. Modelarea moleculară a compușilor.....	175
11.3.2. Minimizarea energetică .....	177
11.3.3. Determinarea caracterului drug-like și a biodisponibilității .....	177
11.3.4. Identificarea mecanismului de acțiune .....	178



11.3.5. Similarități structurale pentru compușii analizați, comparativ cu compușii chimici din bazele de date .....	183
11.3.6. Identificarea profilului ADMET .....	184
11.4. Concluzii.....	186
Cap.12. Concluzii generale.....	188
12.1. Sinteza și purificarea noilor compuși .....	188
12.2. Dovedirea structurii chimice a compușilor sintetizați .....	188
12.3. Determinarea activității antimicrobiene .....	189
12.4. Determinarea citotoxicității in vitro și in vivo.....	189
12.5. Determinarea activității antioxidante.....	190
12.6. Sinteza grafenei funcționalizate cu hidrazida carprofenului .....	190
12.7. Studiile bioinformaticice .....	191
Cap.13. Elemente de originalitate și perspective de cercetare .....	193
Bibliografie .....	195
Lista cu lucrările științifice publicate și participarea la conferințe și proiecte .....	212
ANEXE.....	214

## Mulțumiri

În primul rând, doresc să-i mulțumesc doamnei Prof. Dr. Carmen Limban, conducătoarea acestei lucrări de cercetare. Fără sprijinul, dedicarea, profesionalismul și timpul dedicat tuturor studiilor efectuate în cadrul acestei lucrări, finalizarea acestui proiect nu ar fi fost posibilă. Pe această cale, doresc să-i aduc toată mulțumirea și recunoștința mea.

Le mulțumesc de asemenea tuturor cadrelor didactice din cadrul disciplinei de Chimie Farmaceutică, UMF "Carol Davila": Conf. univ. Dr. Diana Nuță, Conf. univ. Dr. Carmellina Bădiceanu, Prof. univ. Dr. Alexandru Missir, Prof. univ. Dr. Ileana Cornelia Chiriță, Prof. univ. Dr. Laurențiu Morușciag, Prof. univ. Dr. Camelia Stecoza, Prof. univ. Dr. Mihai Nițulescu, Asist. univ. Dr. Horea Gurgu și Asist. univ. Drd. Ilinca Margareta Vlad, pentru sfaturile, ajutorul și încurajările din toată această perioadă.

Doresc să le mulțumesc domnilor Doctori de la Centrul de Chimie Organică al Academiei Române „C.D. Nenițescu”, București, Dr. Florea Dumitrașcu și Dr. Miron T. Căproiu pentru tot sprijinul acordat în realizarea analizelor spectrale precum și a altor aspecte din cadrul acestei cercetări.

De asemenea, doresc să aduc mulțumiri doamnei Prof. univ. Dr. Mariana Carmen Chifiriuc de la Departamentul de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea București, pentru ajutorul acordat în cazul determinării activității antimicrobiene; doamnei Prof. univ. Dr. Speranța Avram, de la Departamentul de Anatomie, Fiziologie Animală și Biofizică, Facultatea de Biologie, Universitatea București, pentru sfaturile și sprijinul acordat în efectuarea experimentelor informatice și cheminformatic; doamnei Dr. Coralia Bleotu de la Institutul de Virusologie „Prof. Șt. Nicolau”, București, pentru ajutorul acordat în vederea determinării citotoxicității *in vitro*, precum și domnului Prof. univ. Dr. Ancuceanu Robert Viorel, de la Departamentul de Botanică Farmaceutică și Biologie Celulară, pentru sprijinul acordat pentru determinarea citotoxicității *in vivo*.

Pentru ajutorul acordat în obținerea grafenei funcționalizate, aș dori să-i mulțumesc doamnei Conf. univ. Dr. Irina Zarafu, de la Departamentul de Chimie organică, Biochimie și Cataliză, Facultatea de Chimie, Universitatea București.

În plus, aș dori să le mulțumesc tuturor colegilor din cadrul Facultății de Farmacie Constanța, în special doamnelor Conf. univ. Dr. Laura Bucur, Conf. univ. Dr. Denisa

Dumitrescu, Conf. univ. Dr. Georgiana Pavalache, Ș.L. Dr. Virginia Schroder și domnului Asist. univ. Dr. Mihai Sebastian, pentru tot sprijinul acordat în cadrul sintetizării unor compuși, dar și a altor aspecte ale tezei, pentru sfaturile și înțelegerea de care au dat dovadă, ținând cont de faptul că cercetarea doctorală a implicat multe drumuri Constanța-București precum și alocarea multor săptămâni și luni de lucru, timp în care nu m-am putut implica foarte mult în alte proiecte de la nivelul facultății.

Nu în ultimul rând, aș dori să mulțumesc familiei mele și prietenilor care au fost alături de mine în toată această perioadă. Fără sprijinul moral și încurajările oferite pe parcursul acestor ani, tot acest proces mi-ar fi fost mult mai dificil de realizat.

## Introducere

Descoperirea și dezvoltarea de noi substanțe cu potențial terapeutic este necesară, dacă luăm în considerare faptul că microorganismele pot suferi periodic mutații care le pot face mai rezistente la acțiunea antibioticelor sau antiviralelor existente pe piața farmaceutică de astăzi.

Carbazolul și derivații săi reprezintă un grup important de compuși heterociclici aromatici care conțin un atom de azot și care au proprietăți electronice importante, precum electronii p implicați în conjugare, substituția pe inelul carbazolic cu diferite grupe funcționale realizându-se ușor [1].

Aceste proprietăți au ca rezultat potențiale aplicații extinse ale derivaților carbazolici în domeniul medicinei, fiind de interes proprietățile lor antimicrobiene, antitumorale, antihistaminice, antioxidante, antiinflamatoare, psihotrope etc. [2].

Considerând datele prezentate anterior, în această lucrare am dorit să realizăm combinarea fragmentului farmacofor carbazolic cu nucleul 1,3,4-oxadiazolic precum și formarea de N-acil hidrazone, pornind de la structura chimică a carprofenului.

Pentru compușii nou sintetizați am considerat importantă investigarea următoarelor efecte biologice: activitate antimicrobiană, determinarea citotoxicității *in vivo* și *in vitro*, determinarea activității antioxidante *in vitro*, prin metodele DPPH și ABTS precum și determinarea de studii *in silico* privind profilul ADMET și date de docking molecular.

Prezenta lucrare este structurată în două secțiuni: prima se referă la stadiul cunoașterii, prin prezentarea unor derivați carbazolici, 1,3,4-oxadiazolici și N-acil hidrazone cu potențiale efecte biologice precum și caracteristicile chimice și farmacologice ale carprofenului și derivați ai acestuia; în secțiunea a doua a lucrării sunt prezentate pe larg: sinteza, caracterizarea fizico-chimică și spectrală precum și testarea biologică și cea *in silico*, pentru noii compuși sintetizați.

În fig.1. sunt prezentați derivații carbazolului obținuți în cadrul cercetărilor efectuate, pentru a căror sinteză se folosește ca substanță de bază carprofenul.

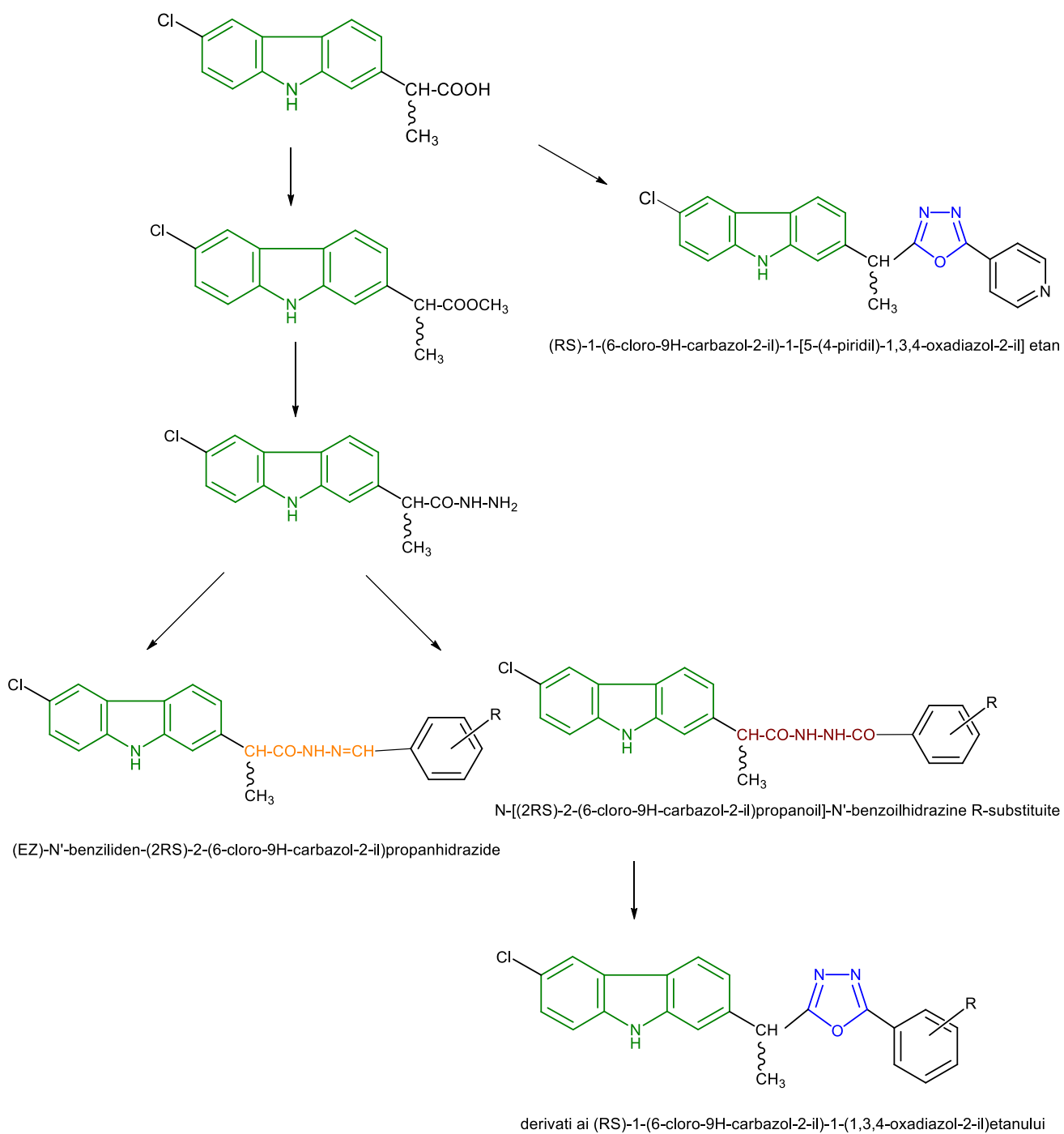


Fig.1. Derivații carbazolului obținuți în cadrul acestei lucrări

## Cap. 1. Derivați ai carbazolului cu potențial terapeutic

9H-Carbazolul (IUPAC) ( $C_{12}H_9N$ ) (Mr 167,206 g/mol) este un compus organic aromatic heterociclic. Are o structură triciclică, fiind format din două nuclee benzenice, dispuse pe ambele părți ale unui heterociclu pentaatomic care conține un atom de azot. Structura sa chimică se bazează pe cea a indolului, căreia i se adaugă un al doilea nucleu benzenic, în oglindă cu primul (fig.1.1.).

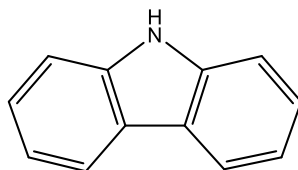


Fig.1.1. Formula de structură a carbazolului

Are temperatura de topire 246,3 °C, este o bază slabă, solubilă în acid acetic, eter, benzen, alcool etilic absolut. Se utilizează în industria fotografică și chimică, având rolul de agent de fotosensibilizare, producând fluorescență și fosforescență prin expunerea la raze UV. De asemenea, se utilizează ca reactiv în sinteza chimică [3].

Este întâlnit în structura unor compuși cu activitate farmacologică. În literatura de specialitate sunt menționați derivați ai carbazolului cu proprietăți antibacteriene, antifungice, antitumorale, antineoplazice, anticonvulsivante, antioxidante, antidiabetice sau antipsihotice [4].

Fragmentul de carbazol este întâlnit în structura unor substanțe farmacologic active cum ar fi olivacina, ondansetronul, rimcazolul, carazololul, carvedilolul, ciclindolul, ramatrobanul, elipticina [4].

Derivații carbazolului care au în structură heterociclii precum oxadiazolul, tiadiazolul, azetidina și tiazolidinona au potențial antimicrobian, antitumoral, antipsihotic, antidepresiv și anticonvulsivant [4].

Au fost izolați alcaloizi naturali care conțin în moleculă nucleul carbazolic. Aceștia au fost întâlniți mai ales în specii din familia Rutaceae. Primii alcaloizi derivați ai carbazolului au fost izolați din specia *Murraya koenigii* și au prezentat efecte antimicrobiene puternice. Tot din cadrul familiei Rutaceae, din genul *Clausena*, s-au izolat alcaloizi derivați ai carbazolului cu potențiale efecte terapeutice antitumorale [5, 6].

## Cap.2. Carprofenul și derivații ai acestuia

Carprofenul (fig.2.1.), ( $C_{15}H_{12}ClNO_2$ ), ( $M_r=273,71\text{g/mol}$ ), acidul 2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propionic (IUPAC), conține un atom de carbon asimetric și există sub forma a doi enantiomeri.

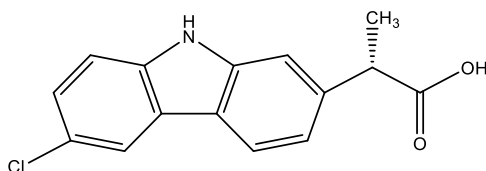


Fig.2.1. Formula de structură a carprofenului

Pe animalele de laborator au fost semnalate diferențe în farmacocinetica și farmacodinamia celor doi enantiomeri.

### 2.1. Proprietăți fizico-chimice

Carprofenul este o pulbere cristalină albă sau slab gălbuie, fără miros și fără gust.

Este practic insolubil în apă la 25 °C, solubil în solvenți organici, de exemplu etanol, DMSO, DMF. Solubilitatea în etanol este de aproximativ 20 mg/ mL iar în DMSO și DMF de 30 mg/ mL. Este parțial solubil în soluții apoase neutre. Temperatura de topire este 186-188 °C [7].

### 2.2. Efecte biologice

Activitatea antiinflamatoare nesteroidiană a carprofenului este comparativă cu a altor substanțe înrudite. Astfel, carprofenul prezintă un efect antiinflamator asemănător indometacinului, piroxicamului și diclofenacului, dar un efect mai puternic decât al fenilbutazonei. Efectul este, de asemenea, superior ibuprofenului și aspirinei. Acțiunile analgezică și antipiretică s-au dovedit a fi similare indometacinului și mai puternice față de fenilbutazonă sau aspirină.

Carprofenul este raportat a avea un risc de 16 ori mai mic decât indometacinul privind producerea de ulcere gastrice la șoareci. El are un efect farmacodinamic antiagregant plachetar semnificativ mai mic în comparație cu acidul acetilsalicilic. De asemenea, nu modifică timpul sângerării mucoasei bucale în condițiile unui subiect sănătos, potrivit studiilor pe animale de laborator [8, 9].

Cercetările efectuate pe specii canine sugerează că acest compus inhibă selectiv COX-2, având un efect mic pe COX-1. Caracterul selectiv ar trebui să aducă un avantaj

prin reducerea riscului de reacții adverse gastro-intestinale și renale, în timp ce eficiența pe reducerea inflamației este foarte bună. [10].

Potența terapeutică a carprofenului și selectivitatea acestuia pentru COX-2 față de COX-1 la câini nu a fost susținută în mod constant de toate cercetările publicate

Inhibarea ciclooxigenazei a fost, de asemenea, investigată și la alte specii de animale. Carprofenul a fost descris ca un puternic inhibitor COX, în cazul studiilor făcute pe ovine, pe baza unui studiu *in vivo*, dar selectivitatea pe COX-1 și COX-2 nu a fost determinată [10].

Teste *in vitro* pe sângele de feline, au arătat că acesta poate fi un inhibitor selectiv al COX-2 la aceste specii. În plus, la cobai, se pare că inhibă un eveniment inflamator acut și anume eliberarea de prostaglandine din leucocitele polimorfonucleare. De asemenea, inhibă și eliberarea de factori inflamatori din celulele sinoviale reumatoide, aici fiind vorba de o reacție inflamatorie cronică [11].

### Cap.3. Derivați oxadiazolici cu potențial terapeutic

Oxadiazolul este un heterociclu care conține doi atomi de carbon, doi atomi de azot și unul de oxigen. Se disting patru posibili izomeri ai oxadiazolului, dependent de poziția heteroatomilor din ciclu, așa cum este reprezentat în fig.3.1.

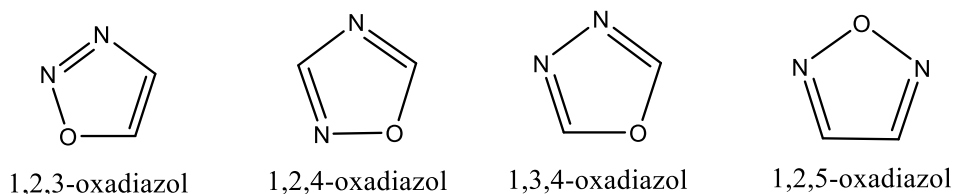


Fig.3.1. Izomerii oxadiazolului

Dintre aceștia, în domeniul cercetării compușilor cu potențial terapeutic, cel mai utilizat izomer este 1,3,4-oxadiazolul, deoarece mulți compuși care conțin în moleculă acest fragment structural, au demonstrat, prin studiile efectuate, numeroase efecte farmacologice [12, 13].

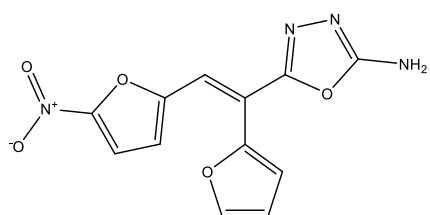
Astfel, luând în considerare caracteristicile compușilor cu nucleu carbazolic discutate anterior, dar și structura chimică a carprofenului ca punct de plecare pentru sinteze, introducerea unui nucleu 1,3,4-oxadiazolic în moleculă, ar putea aduce cu sine potențiale noi efecte terapeutice sau îmbunătățirea efectului antiinflamator existent.



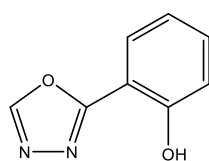
## Efectele terapeutice ale derivaților 1,3,4-oxadiazolici

Compușii care prezintă în structură heterociclul 1,3,4-oxadiazolic posedă diferite proprietăți biologice, printre care se pot menționa: antimicrobiană, antituberculoasă, anticonvulsivantă, antidiabetică, antialergică, antivirală, antipiretică și antiinflamatoare, imunosupresivă, antispastică, antioxidantă, antitumorală, antihelmintică [14].

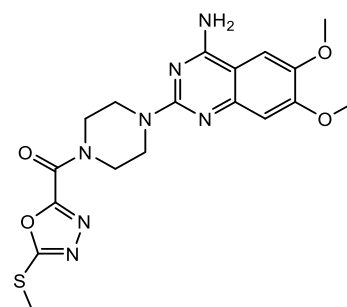
Exemple de substanțe medicamentoase care conțin un fragment 1,3,4-oxadiazolic în moleculă sunt prezentate în continuare [14].



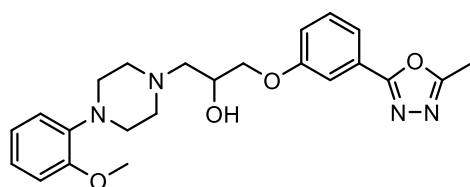
Furamizol (antibacterian)



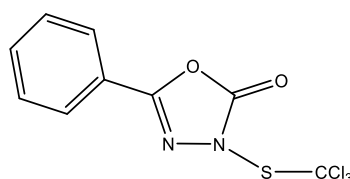
Fenadiazol (hipnotic, sedativ)



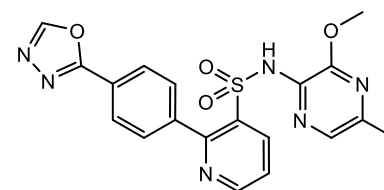
Tiodazosin (antihipertensiv)



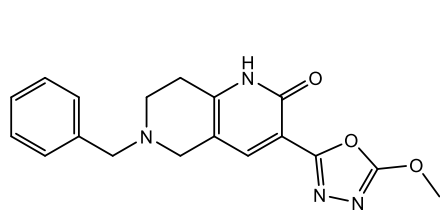
Nesapidil (antiaritmice)



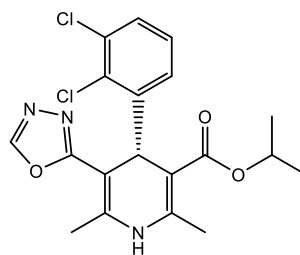
Clotioxon (antifungic)



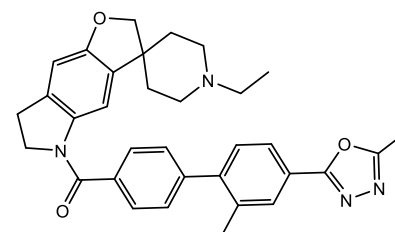
Zibotentan (antitumoral)



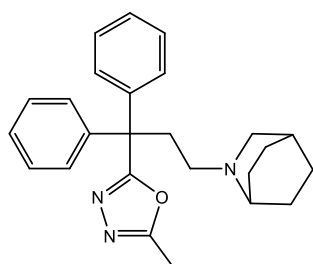
SX-3228 (hipnotic, anxiolitic)



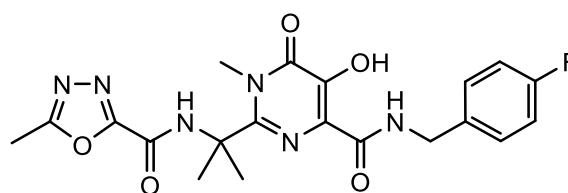
Elnadipine (antagonist de calciu)



SB 236057 (antagonist 5-HT<sub>1B</sub>)



Nufenoxole (antidiareic)



Raltegravir (antiretroviral)

## Cap. 4. N-Acil hidrazone cu potențial terapeutic

N-acil hidrazonele sunt compuși organici care aparțin bazelor Schiff și pot fi obținute prin condensarea unei hidrazide cu un compus carbonilic.

Bazele Schiff sau azometinele sunt compuși organici care pot fi considerați o subclasă de imine, denumite cetimine sau aldimine, în funcție de reacția de condensare care a dus la formarea lor, dacă aceasta a avut loc între o amină primară și o cetonă, sau între o amină primară și o aldehydă [15].

Grupa funcțională azometin ( $C=N$ ) a bazelor Schiff este considerată o grupă farmacoforă versatilă, implicată în proiectarea și dezvoltarea unor compuși cu rol bioactiv [16].

Bazele Schiff prezintă numeroase efecte farmacodinamice cum ar fi: antibacterian [17], antifungic [18], antituberculos [19], antimalaric [20], antihelmintic [21], antitumoral [22], analgezic, antipiretic și antiinflamator [23].

De asemenea, sunt folosite în tratamentul diabetului zaharat tip II și în terapia antivirală HIV. Ele pot scădea rezistența celulelor canceroase la medicația specifică și pot bloca activitatea unor enzime [24].

În activitatea de cercetare, pot fi implicate în sinteza unor compuși heterociclici noi, în identificarea, detectarea, analizarea și purificarea compușilor carbonilici sau în protejarea grupelor funcționale carbonilice, în cadrul unor sinteze complexe [23-25].

Bazele Schiff au aplicații și în alte domenii cum ar fi chimia coordinativă, chimia analitică, industria pigmentilor, a vopselelor și a polimerilor. Compușii de acest tip se folosesc și în agricultură pentru efectul lor fungicid, pesticid și bactericid [25].

Ținând cont de numeroasele utilizări în domeniul chimiei, dar și în alte domenii, bazele Schiff reprezintă candidați importanți în design-ul unor noi molecule, cu potențial terapeutic, având în vedere necesitatea sintetizării unor noi compuși cu diferite efecte farmacodinamice, care ar putea îmbogăți arsenalul terapeutic cu noi clase de medicamente, mai bine tolerate și cu cât mai puține reacții adverse.

În comparație cu bazele obișnuite Schiff, compușii N-acil hidrazonici sunt mai stabili și prezintă o activitate biologică și mai puternică. În plus, atomii de oxigen și azot ar putea fi implicați în formarea de legături cu hidrogenul sistemelor biochimice. În acest fel, compușii acil hidrazonici sunt candidați eficienți în diferite procese fizico-chimice cu implicații medicale.

## Contribuții personale

### Cap. 5. Ipoteze de lucru și obiective generale

Scopul acestei lucrări a fost acela de a obține molecule noi, concepute de la un medicament deja existent, prin efectuarea unor modificări chimice, pentru a obține noi compuși potențial biologic activi.

Farmacomodularea structurii unor molecule autorizate ca medicament poate conduce la noi molecule, analogi structurali. De regulă, acestea au proprietăți farmacocinetice, biofarmaceutice, acțiune biologică optimizate.

Conform informațiilor obținute din datele furnizate de literatura de specialitate, prezentate în capitolele 1-4 ale acestei lucrări, derivații de carbazol, precum și derivații 1,3,4-oxadiazolici, hidrazinici acilați și ai N-acil hidrazonelor, prezintă numeroase efecte biologice.

Prin modificări structurale ale moleculei carprofenului, substanță activă cu nucleu carbazolic și efect antiinflamator nesteroidian, se pot obține molecule *lead* cu activitate bună, stabilitate și farmacocinetică adecvate, ce pot constitui o bază pentru crearea de noi substanțe farmacologic active. Acestea pot intra în terapie, după efectuarea unor noi serii de teste și studii preclinice și apoi clinice.

Cercetările din această lucrare au constat în proiectarea, obținerea și caracterizarea fizico-chimică și biologică a unor noi compuși, necitați în literatura de specialitate, derivați ai N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoidhidrazinei R-substituite, ai (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului și ai (*EZ*)-N'-benziden-(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanohidrazidei.

Obiectivele generale propuse pentru realizarea tezei sunt:

1. sinteza și purificarea noilor derivați, folosind ca substanță de bază carprofenul;
2. confirmarea structurii chimice a acestora și a intermediarilor, prin metode spectrale;
3. determinarea *in vitro* a acțiunii antimicrobiene și anti-biofilm;
4. determinarea citotoxicității *in vitro*, pe culturi de celule HeLa și HaCaT și determinarea citotoxicității *in vivo*, pe specia *Artemia franciscana* Kellog;
5. determinarea activității antioxidante prin metodele DPPH și ABTS;
6. obținerea grafenei funcționalizate a hidrazidei carprofenului;
7. studii *in silico*: studii de docking molecular și determinarea profilului ADMET.

## Cap. 6. Sinteza și caracterizarea noilor N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R-substituite, a derivaților (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului și a derivaților (*EZ*)-N'-benziliden-(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanohidrazidei

Pe plan mondial, una dintre provocările pentru obținerea de noi medicamente antimicrobiene constă în descoperirea de substanțe medicamentoase, cu un mecanism de acțiune nou sau îmbunătățit față de cel al claselor existente, ce pot fi formulate în sisteme farmaceutice care să asigure stabilitate și activitate antimicrobiană și anti-biofilm, dar și diminuarea fenomenelor de rezistență și de multirezistență la antibioterapia clasică.

Modelele structurale dezvoltate în acest studiu, au fost obținute prin modularea structurii carprofenului la nivelul fragmentului de acid propanoic. Derivații conțin ca farmacofori, pe lângă nucleul carbazolic, fragmentul de hidrazină substituit la unul dintre atomii de azot cu un radical benzoil substituit (**compușii 1a-h**) sau cu un radical benziliden substituit (**compușii 3a-l**) și nucleul 1,3,4-oxadiazolic (**compușii 2a-d**) [26-27].

Sinteza compușilor **1a-h** a folosit ca materie primă carprofenul (**4**), care a fost transformat în esterul corespunzător, prin reacție cu metanolul absolut, în prezența acidului sulfuric concentrat. Apoi, esterul metilic (**5**) al carprofenului a reacționat cu hidratul de hidrazină, rezultând hidrazida carprofenului (**6**) care a fost tratată cu cloruri ale acizilor, în piridină anhidră.

Sinteza compușilor **2a-c** a plecat de la benzoilhidrazinele R-substituite obținute anterior, folosind oxiclorigă de fosfor. Referitor la sinteza compusului **2d**, aceasta a plecat direct de la carprofen, care a reacționat cu izoniazida, în prezența  $\text{POCl}_3$ .

Primele două etape de sinteză ale compușilor **3a-h** sunt comune cu cele ale derivaților **1a-h**. Intermediarul cheie, hidrazida carprofenului a reacționat apoi cu diferite aldehide aromatice, folosind metanol absolut ca mediu de reacție și acid acetic glacial, drept catalizator. Această reacție a fost asistată de microunde.

Compușii bruți obținuți au fost recristalizați din izopropanol, amestec de izopropanol: apă (1: 2) sau apă: etanol (2: 1) [26-27].

Schema generală de sinteză a compușilor **1a-h**, **2a-d** și **3a-l** este prezentată în fig.6.1.

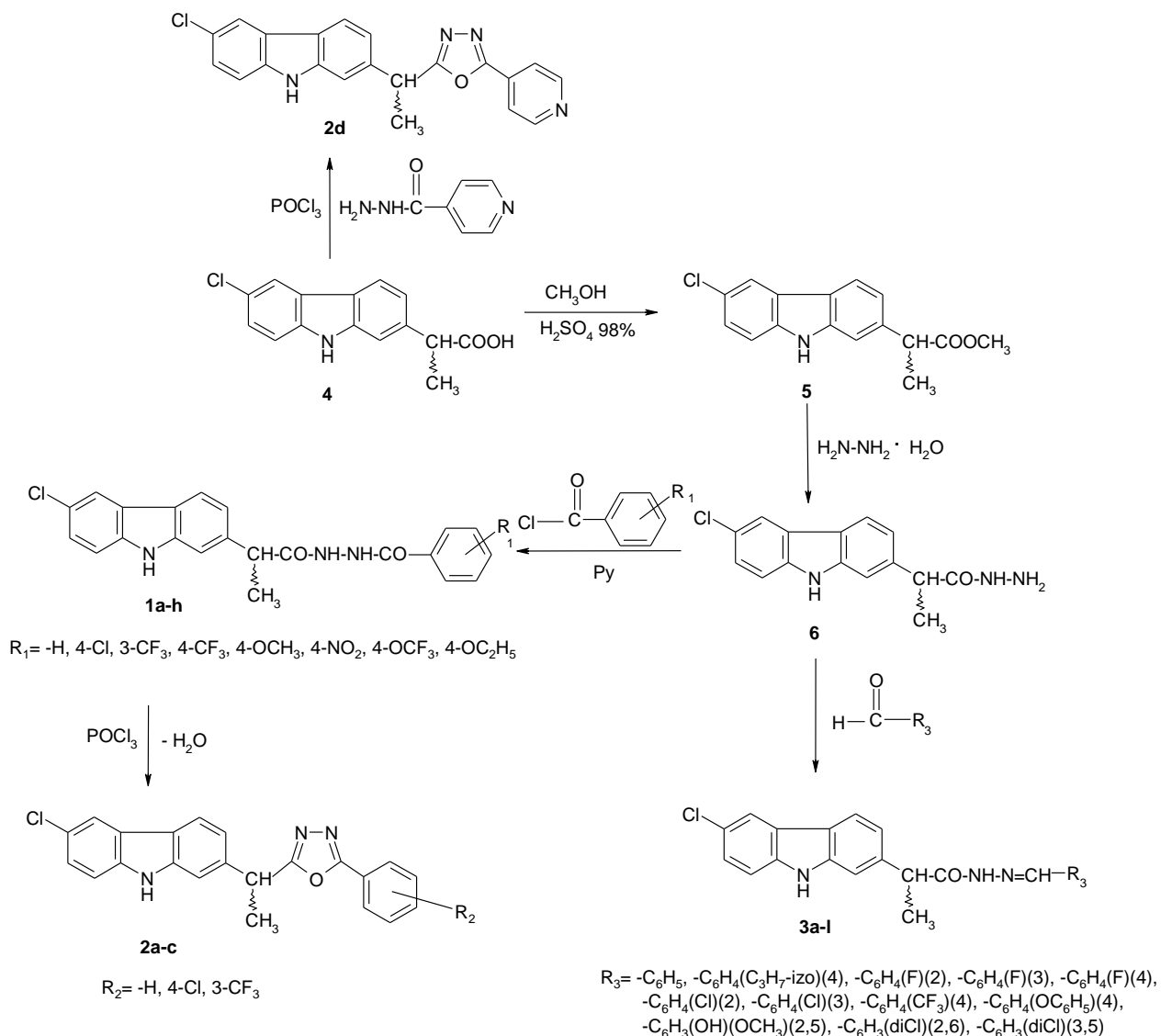


Fig.6.1. Prezentarea modului de obținere a intermediarilor și a noilor derivați **1a-h**, **2a-d** și **3a-l**

Caracterizarea din punct de vedere fizico-chimic a noilor derivați ai carbazolului s-a realizat prin determinarea temperaturii de topire, a aspectului, solubilității și a randamentului de reacție.

Structurile celor 25 de compuși nou sintetizați și a esterului carprofenului folosit ca intermediar, au fost confirmate cu ajutorul rezultatelor obținute în urma analizelor spectrale realizate: spectrometria în infraroșu, spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară ( $^1H$ -RMN,  $^{13}C$ -RMN).

Spectroscopia în infraroșu a confirmat prezența principalelor grupe funcționale, prin benzile de absorbție specifice acestora.

Semnălele tuturor protonilor din spectrele  $^1\text{H}$ -RMN și ale atomilor de carbon din spectrele  $^{13}\text{C}$ -RMN au fost atribuite, ceea ce confirmă structura și puritatea compușilor sintetizați.

## **Cap. 7. Determinarea activității antimicrobiene a noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine, a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului și a derivaților (EZ)-N'-benziliden-(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanohidrazidei**

Activitatea antimicrobiană a noilor compuși din seriile I-III a fost determinată față de tulpini bacteriene Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) și fungice (*Candida albicans*).

### **Screening-ul calitativ al activității antimicrobiene pentru derivații 3a-1**

Screening-ul calitativ al activității antimicrobiene a relevat faptul că substanțele testate au prezentat o capacitate redusă de difuzie în mediul de cultură solid, aspect demonstrat prin absența unor zone clare de inhibiție a creșterii microbiene în jurul discurilor impregnate cu substanțele testate. Aspectul plăcilor cu mediu Muller Hinton solid însămânțate cu inocul microbial standardizat și incubate în prezența substanțelor de testat arată absența activității antibacteriene pentru compușii testați precum și o ușoară inhibare a creșterii tulpinii fungice *Candida albicans* ATCC 90029.

Rezultatele evaluării calitative a compușilor **3a-1** pot fi cauzate și de hidrofobicitatea marcată a moleculelor testate, fiind astfel necesare studii suplimentare ulterioare pentru verificarea potențialului antimicrobian, cu metode de lucru optimizate.

### **Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării CMI pentru seriile I- III**

Compușii testați au prezentat activitate antimicrobiană cu valori CMI cuprinse între 0,15 și 10 mg/ mL. Se remarcă eficiența mai crescută a compusului **1a** față de tulpina de *E. coli* (CMI 1,25 mg/ mL) și a compusului **2c** față de tulpina de *C. albicans* (0,625 mg/ mL).

Dintre substanțele testate, cel mai activ față de celulele microbiene în fază de creștere planctonică a fost compusul **3i**, cu valori CMI scăzute, indicând o activitate antimicrobiană semnificativă. Este urmat de compusul **3j**, cu activitate antimicrobiană semnificativă față

de tulpinile de *E. faecalis* și *C. albicans* și moderată față de tulpinile de *S. aureus* și *P.aeruginosa*. Compusul **3k** a prezentat activitate antimicrobiană semnificativă față de tulpina de *E. faecalis* și moderată față de tulpinile de *P.aeruginosa* și *C. albicans*.

#### **Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării CMB pentru seriile I și II de compuși**

Rezultatele obținute au evidențiat valori CMB cuprinse între 0,625 și 10 mg/ mL. Se remarcă faptul că valorile CMB au fost în multe cazuri similare cu valorile CMI, ceea ce sugerează un mecanism de acțiune antimicrobiană de tip microbicid.

#### **Evaluarea activității anti-biofilm prin determinarea CMEB pentru seriile I- III de compuși**

Compușii testați au manifestat excelente proprietăți anti-biofilm față de tulpinile microbiene bacteriene și fungice în fază de creștere aderată sub forma biofilmelor dezvoltate pe substratul inert, cele mai mici valori CMEB fiind de 0,009 mg/ mL. Valorile CMEB au fost în unele cazuri de aproximativ 250 de ori mai mici decât valorile CMI sau CMB. Este de remarcat sensibilitatea foarte ridicată a biofilmului de *P. aeruginosa* la compușii **1a- c** și **2a- c** (CMEB 0,009 mg/ mL). Aceeași valoare a CMEB a prezentat-o compusul **1b** față de biofilmul de *E. faecalis* și **3j** față de cel de *C. albicans*.

Cel mai activ a fost compusul **1b**, cu valori CMEB cuprinse între 0,009 și 1,25 mg/ mL

### **Cap. 8. Determinarea citotoxicității noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoihidrazine R-substituite și a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului**

Unul dintre cele mai importante aspecte, atunci când vorbim despre o substanță activă din punct de vedere terapeutic, este siguranța administrării. Aceasta trebuie să fie cât mai eficientă din punct de vedere farmacodinamic, cu un profil farmacocinetic optim și risc farmacotoxicologic minim.

Pentru a stabili un profil toxicologic preliminar, am folosit două metode pentru determinarea citotoxicității:

a. **determinarea citotoxicității *in vitro***, pe culturi celulare HeLa (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>) și linia de keratinocite imortalizate HaCaT;

b. **determinarea citotoxicității *in vivo***, asupra speciei *Artemia franciscana* Kellog, determinare realizată pe baza metodelor lui B. M. Meyer și col. [28] și T. W. Sam [29], cu adaptări minore sugerate de surse bibliografice mai recente [30 - 32].

a. Referitor la determinarea citotoxicității *in vitro*, am folosit derivații 1-c, 2a-d. În urma analizării rezultatelor, s-a constatat că la concentrații mai mari de 100 μg/ mL apar efecte toxice, viabilitatea scăzând gradual, la 48h, în funcție de concentrație. Toți compușii la concentrații de 1 mg/ mL sunt foarte toxici, viabilitatea celulară scăzând dramatic în 24 de ore (fig.8.1.).

În legătură cu evaluarea ciclului celular, la 48h, la concentrații de 100 μg/ mL, compușii nu modifică fazele ciclului celular în celulele HeLa, dar se observă o fluctuație a fazei de sinteză în cazul celulelor HaCaT.

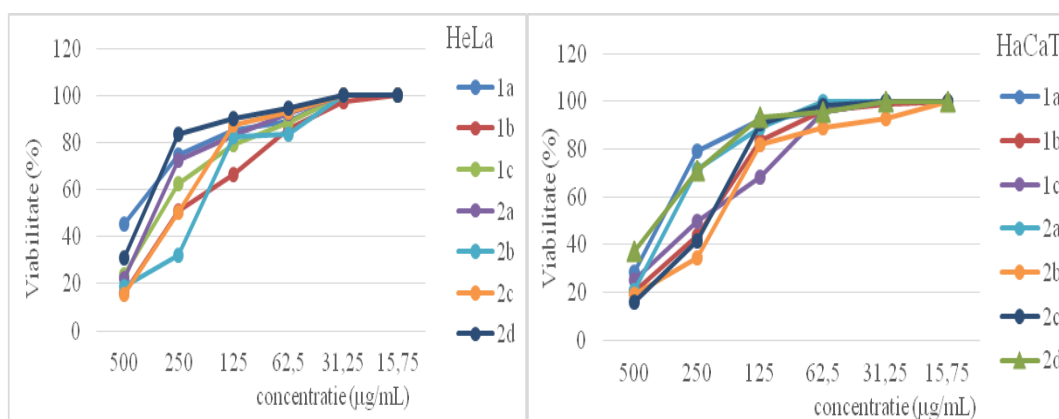


Fig.8.1. Citotoxicitatea compușilor **1a-c**, **2a-d** asupra celulelor HeLa și HaCaT (evaluare la 48 h utilizând kitul CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation).

b. Determinarea citotoxicității *in vivo* s-a realizat pe compușii **1a**, **2a**, **2b** și **2c**, trei dintre aceștia (**1a**, **2a** și **2b**) fiind netoxici la concentrațiile evaluate (la limita de solubilitate, în suspensie), la 24 de ore toți naupliii fiind vii și prezentând mișcări normale. La compusul **2c** s-a observat o ușoară toxicitate la concentrația maximă evaluată (100 μg/ mL), evidențiată printr-o letalitate de 16,67% (10% la una din cele trei replici și 20% la celelalte două replici).



## Cap. 9. Determinarea activității antioxidante a noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R-substituite și a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului

Determinarea activității antioxidante a compușilor **1a-c** și **2a-c** s-a realizat prin determinarea capacității de scavenger a radicalului DPPH și a capacității de scavenger a radicalului ABTS<sup>•+</sup>, conform metodelor descrise în literatura de specialitate [33 - 35].

### Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH

Inhibiția radicalului liber DPPH variază între 9,95% (**1a** – 25 μM) și 17,71% (**1c** – 1000 μM), valori crescute ale inhibiției (%) înregistrându-se pentru compușii **1c** și **1b**.

În general, capacitatea de scavenger a radicalului DPPH pe domeniul de concentrații folosit este modestă, probabil datorită mecanismului de acțiune al radicalului și caracterului hidrofob al compușilor testați. Cele mai mici valori ale inhibiției activității radicalului liber s-au obținut pentru compusul **1a**, independent de concentrația testată (fig.9.1).

În ceea ce privește valoarea echivalenților de acid, activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a** < **1c** < **2c** < **2a**. Pentru compușii **1b** și **2b** nu s-au putut determina echivalenții de acid ascorbic, deoarece valorile absorbanțelor nu s-au încadrat în curba etalon de acid ascorbic.

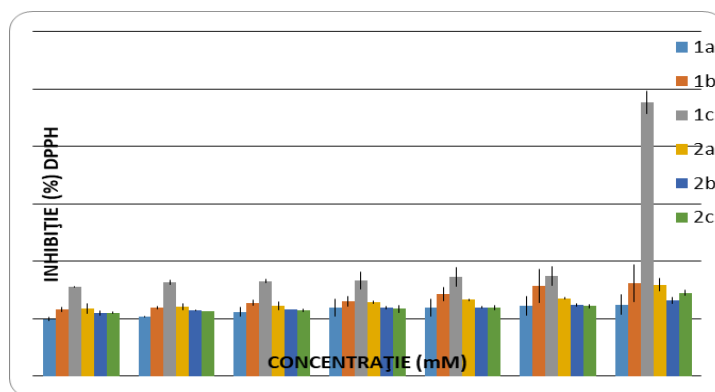


Fig.9.1. Reprezentarea grafică a inhibiției radicalului liber DPPH de către compușii analizați

### Capacitatea de scavenger asupra radicalului ABTS<sup>•+</sup>

Valorile inhibiției variază între 2,13 % (**1a** – 25 μM) și 69,83 % (**1c** – 1000 μM). Cele mai mari valori ale inhibiției s-au obținut pentru compusul **1c**, urmat de compușii **1b**

și **2b**. Similar metodei DPPH, pentru compusul **1a** s-a obținut capacitatea de scavenger a radicalului liber cea mai mică (fig.9.2).

În general, comparativ cu metoda DPPH, prin metoda ABTS<sup>•+</sup> s-au înregistrat procente de inhibiție ale activității radicalului liber mai mari. Diferențele observate se datorează cel mai probabil mecanismului diferit de acțiune al radicalilor (comparativ cu metoda DPPH, metoda ABTS<sup>•+</sup> se bazează preponderent pe transfer de protoni) și polarității compușilor.

În ceea ce privește echivalenții de acid ascorbic, activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a < 2b < 2a < 2c < 1b < 1c**.

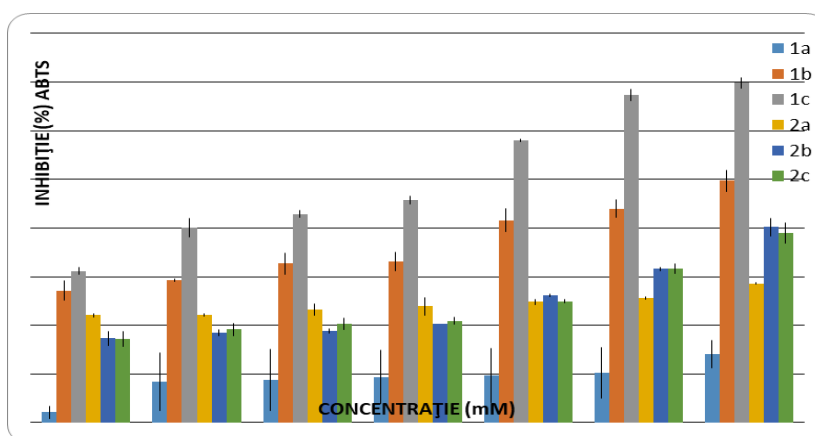


Fig.9.2. Reprezentarea grafică a inhibiției radicalului liber ABTS<sup>•+</sup> de către compușii analizați

## Cap. 10. Obținerea grafenei funcționalizate, folosind hidrazida caprofenului

Pentru a depăși problema rezistenței antimicrobiene și a decalajului inovator în dezvoltarea de noi clase de antibiotice, au fost propuse strategii alternative, inclusiv utilizarea diferitelor nanomateriale. Astfel, materialele pe bază de grafenă pot reprezenta candidați promițători pentru dezvoltarea de noi agenți antibacterieni ce se pot utiliza intern dar și pe diferite suprafețe, tocmai datorită activității lor biocide cu spectru larg, mediată de interacțiunea pe mai multe niveluri cu diferite structuri microbiene, cum ar fi membrana, proteinele sau ADN-ul bacterian. Funcționalizarea oxidului de grafenă cu diferite amine sau hidrazide se poate realiza prin legarea covalentă de grupările carboxilice ale GO, realizându-se grupe de tip amidic [36 - 39].

**Sinteza oxidului de grafenă:** Oxidul de grafenă (GO) a fost sintetizat prin metoda binecunoscută Hummers, cu o ușoară modificare [40 - 43].

**Prepararea grafenei funcționalizate** cu hidrazida carprofenului (A<sub>1</sub>) a plecat de la GO uscat, folosind dicloretan, dimetilformamidă și clorură de tionil, prin refluxare timp de 1- 2 ore. După filtrare, produsul a fost suspendat în diclormetan, apoi s-au adăugat hidrazida carprofenului și trietilamină, rezultând grafena funcționalizată (fig.10.1.).

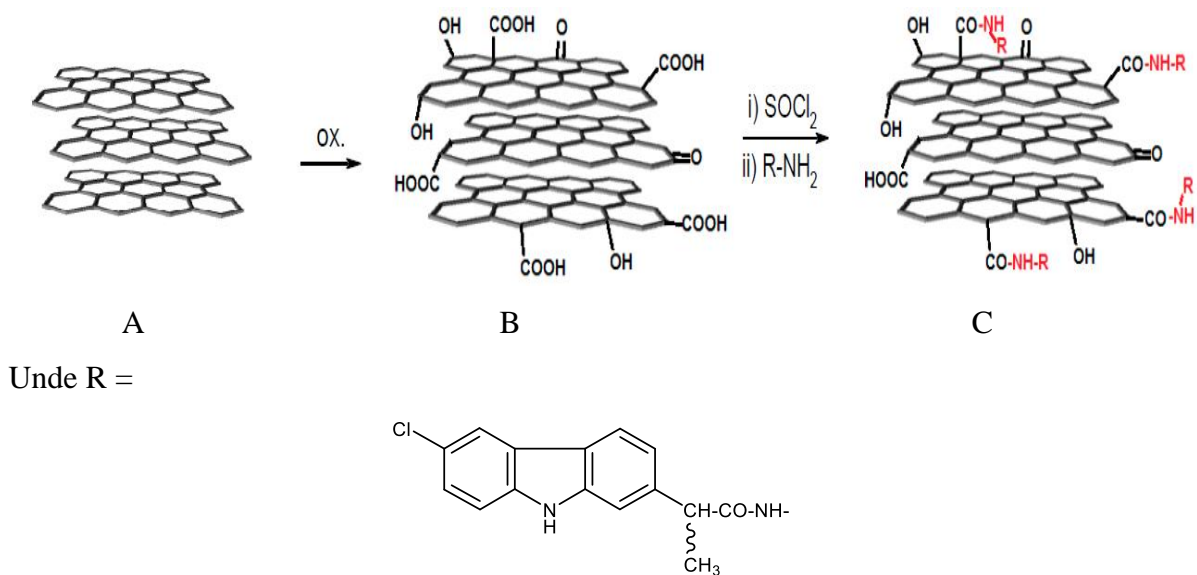


Fig.10.1. Schema generală pentru sinteza și funcționalizarea oxidului de grafenă cu hidrazidă: A – grafitul, B- oxidul de grafenă și C- oxidul de grafenă funcționalizat

Materialul hibrid astfel obținut (GO<sub>1</sub>IZ), a fost caracterizat prin spectroscopie IR, analiză elementală și microscopie electronică SEM.

**Determinarea activității antimicrobiane** Activitatea antibacteriană a materialului sintetizat, prescurtat GO<sub>1</sub>IZ, a hidrazidei carprofenului și a GO nefuncționalizat, a fost evaluată pe două tulpini Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923) și o tulpină Gram-pozitivă (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Referitor la valorile CMI, se poate observa o activitate antimicrobiană crescută asupra tulpinii de *S. aureus*, atât pentru grafena funcționalizată GO<sub>1</sub>IZ, cât și pentru hidrazida caprofenului A<sub>1</sub> și GO. Efectul este asemănător și pentru tulpina de *P. aeruginosa*. Tulpina de *E. coli* este cea mai rezistentă la acțiunea compușilor testați.

Activitatea antibiofilm a compușilor testați a fost bună, toate substanțele având activitatea cea mai pronunțată asupra biofilmului de *P. aeruginosa*. Dintre cei trei compuși

testați, valorile CMEB cele mai bune au fost prezente la grafena funcționalizată GO<sub>1</sub>IZ (fig.10.2.).

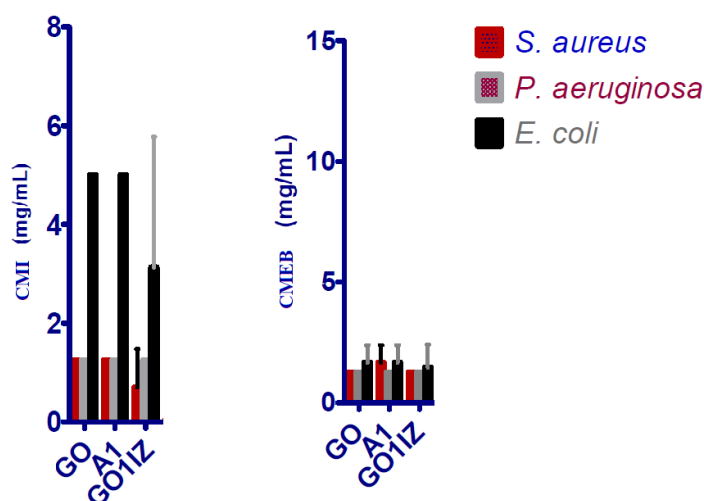


Fig.10.2. Reprezentarea schematică a valorilor CMI și CMEB pentru GO, A<sub>1</sub> și GO<sub>1</sub>IZ, pe cele trei tulpini bacteriene testate

Rezultatele evaluării cantitative a activității antimicrobiene a compușilor GO, A<sub>1</sub> și GO<sub>1</sub>IZ a demonstrat faptul că grafena funcționalizată poate exercita o activitate antibacteriană îmbunătățită, comparativ cu oxidul de grafenă, dar și cu hidrazida carprofenului. Astfel, funcționalizarea cu compuși organici a oxidului de grafenă nanostructurat poate avea diferite implicații biologice, inclusiv potențial antimicrobian, cu aplicabilitate în domeniul biomedical, dar și în alte domenii.

## Cap.11. Studiile bioinformatică ale noilor N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R-substituite și ale derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului

Studiile au fost efectuate pe compușii **1a-c** și **2a-c** și au permis evaluarea proprietăților farmacocinetice și farmacodinamice precum și predicția unor mecanisme de acțiune ale compușilor nou sintetizați și caracterizați, prin aplicarea metodelor bioinformatică, cheminformatică și de farmacologie computațională.

Studiile bioinformaticice și cheminformaticice pentru compușii **1a-c** și **2a-c** au inclus următoarele etape:

### Modelarea moleculară a compușilor

Fișierele bioinformaticice utile studiului acestor compuși au fost obținute în softul de simulare Discovery Studio.

Pentru compusul **2c** a rezultat cea mai mare reactivitate, atât din punct de vedere electrostatic, dar și din punct de vedere al potențialului lipofilic.

### Minimizarea energetică

În urma minimizării energetice, toți compușii au avut energia potențială la valori negative, ceea ce arată faptul că se află într-o stare energetică de stabilitate.

### Determinarea caracterului drug-like și a biodisponibilității

În ceea ce privește identificarea caracterului de agent farmacologic pentru compușii **1a-c** și **2a-c**, prin respectarea regulii Lipinski, putem menționa că toți compușii studiați respectă această regulă și toate moleculele testate prezintă o bună biodisponibilitate, conform regulii Veber (tab.XI.1.).

Tab.XI.1. Validarea regulilor Lipinski și Veber, scor de biodisponibilitate și masă moleculară

Compus	Regula Lipinski	Regula Veber	Scor de biodisponibilitate	Masă moleculară (g/mol)
<b>1a</b>	DA	DA	0.55	391.85
<b>1b</b>	DA*	DA	0.55	459.85
<b>1c</b>	DA*	DA	0.55	426.30
<b>2a</b>	DA	DA	0.55	373.83
<b>2b</b>	DA*	DA	0.55	408.28
<b>2c</b>	DA	DA	0.55	441.83
<b>carprofen</b>	DA	DA	0.56	273.71

\*Compușii **1b**, **1c** și **2b** nu respectă criteriul Log P, acesta fiind mai mare de 5, respectând celelalte criterii ale regulii Lipinski.

### Identificarea mecanismului de acțiune

Valorile predictive ale mecanismelor de acțiune ale compușilor **2a** și **2c** sunt apropiate carprofenului pentru receptorii metabotropi. Compușii par mai activi în inhibarea kinazelor, mai puțin activi la nivelul receptorilor nucleari și inactivi la nivelul canalelor ionice.

Ca o trăsătură comună, carprofenul, **1a**, **1b**, **1c**, **2b** și **2c** sunt liganzi pentru kinaze, iar **2b** și **2c** sunt liganzi și pentru receptorii metabotropi, în timp ce **2a** este ligand numai pentru receptorii metabotropi.

### **Similarități structurale pentru compușii analizați, comparativ cu compușii chimici din bazele de date**

Considerând principiul că similarități structurale pot induce similarități funcționale, prin accesarea bazei de date Expasy/ medicinal chemistry, am identificat posibilele similarități structurale ale compușilor analizați.

Prin inhibarea enzimei FAAH, derivații **1a-c** pot prezenta activitate antialgică și antiinflamatoare. Efect analgezic pot prezenta și compușii **2a** și **2b**, dar prin mecanism diferit, și anume prin faptul ca sunt liganzi ai receptorului nociceptiv. Compusul **2c** inhibă ciclotransferaza glutamil-peptid, enzimă ce poate fi responsabilă de formarea de peptide cauzatoare de plăci de amiloid, fiind incriminată în agravarea patologiei Alzheimer.

Astfel, din punct de vedere bioinformatic, compușii sintetizați sunt ași de a se considera potențiali compuși medicamentoși, prin faptul că prezintă largi zone de distribuție energetică, prezintă caracteristici hidrofobe, respectă regulile Lipinski și Veber și sunt molecule capabile să interacționeze cu diferiți receptori membranari umani și sisteme enzimatic.

### **Identificarea profilului ADMET**

Studiile ADMET au relevat un profil farmacocinetic bun, prin absorbția intestinală ridicată, cuprinsă între 89 și 94%, precum și prin permeabilitatea bună pe linia celulară Caco2.

La nivelul barierei hemato-encefalice, derivații **2a-c** prezintă o permeabilitate medie, în timp ce valorile pentru logPS ne arată o permeabilitate bună la nivel central, pentru toți derivații. La nivelul dermului, toți derivații testați penetrează greu membrana dar nu sunt substrat renal pt OCT2, astfel riscul de interacțiuni medicament-medicament la nivelul căii de eliminare este minim.

În final, derivații testați **1a-c** și **2a-c** pot exercita toxicitate la diverite niveluri, după administrare sistemică, cu toate că profilul farmacocinetic de absorbție intestinală precum și cel de traversare al membranelor fiziologice este bun.

## Cap.12. Concluzii generale

Studiile efectuate în cadrul prezentei lucrări, au dus la obținerea de noi compuși în cadrul clasei derivaților de carbazol, aceștia dovedind activitate farmacologică, precum și un potențial punct de plecare pentru alte serii de compuși.

Astfel, se poate considera că obiectivele generale propuse în cadrul acestei cercetări, au fost îndeplinite.

În continuare, sunt prezentate principalele concluzii ale studiilor efectuate pe noii derivați ai carbazolului ce fac subiectul acestei teze.

### Sinteza și purificarea noilor compuși

În urma modulărilor structurale pornind de la structura chimică a caprofenului, s-au obținut 8 N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R<sub>1</sub>-substituite (**1a-h**), 4 derivați ai (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului R<sub>2</sub>-substituiți (**2a-d**) și 12 derivați ai (EZ)-N'-benziliden-(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanohidrazidei (**3a-l**), compuși originali, necitați în literatura de specialitate. Acestora li se adaugă hidrazida caprofenului (**6**) care, de asemenea, nu este citată în literatura de specialitate.

Pentru sinteza seriilor I- III de compuși, au fost utilizate atât metode convenționale de obținere (pentru derivații **1a-h** și **2a-d**) dar și „sinteza verde”, ce a implicat abordarea unei metode asistate de microunde (pentru derivații **3a-l**), cu un timp de reacție redus, randamente ridicate și produși de reacție puri.

### Dovedirea structurii chimice a compușilor sintetizați

Structurile celor 25 de compuși noi, derivați ai carbazolului dar și cea a esterului caprofenului folosit ca intermediar, au fost confirmate cu ajutorul spectrometriei în infraroșu și spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară (<sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN).

### Determinarea activității antimicrobiene

Evaluarea activității antimicrobiene și anti-biofilm a substanțelor sintetizate a fost efectuată pe derivații **1a-c**, **2a-d** și **3a-l**.

Compușii testați din seriile I și II au prezentat valori CMI cuprinse între 0,625 și 10 mg/ mL, cele mai sensibile tulpini microbiene fiind cele Gram-negative, urmate de tulpina de *C. albicans*. Compusul **1a** a fost cel mai activ pe tulpina de *E. coli* (CMI 1,25 mg/ mL) și compusul **2c** pe tulpina de *C. albicans* (0,625 mg/ mL).

În cazul derivaților seriei III, referitor la valorile CMI, cea mai semnificativă activitate antimicrobiană a prezentat-o compusul **3i**.

Referitor la activitatea antibiofilm, compușii testați **1a-c** și **2a-d** au manifestat excelente proprietăți față de tulpinile microbiene bacteriene și fungice, valorile CMEB fiind cuprinse, cu două excepții, între 0,009 și 2,5 mg/ mL. Valorile CMEB au fost în unele cazuri de până la 250 de ori mai mici decât valorile CMI sau CMB. Toți compușii testați au avut o eficiență foarte ridicată asupra biofilmului de *P. aeruginosa*.

În final, derivații testați din seriile I și II au prezentat o activitate anti-biofilm foarte bună, în comparație cu compușii din seria III, în timp ce derivații **3i-k** ai seriei III au prezentat o activitate antimicrobiană mai bună decât cei din seriile I și II.

#### **Determinarea citotoxicității *in vitro* și *in vivo***

În cazul metodei *in vitro*, compușii evaluați au fost reprezentați de **1a-c** și **2a-d**. Aceștia devin toxici la concentrații mai mari de 100 μg/ mL, pe liniile celulare utilizate. La concentrații de 1 mg/ mL sunt foarte toxici, viabilitatea celulară scăzând dramatic în 24 de ore.

A doua metodă utilizată, cea *in vivo*, a fost realizată pe compușii **1a**, **2a**, **2b** și **2c**.

Cu excepția compusului **2c**, noii derivați nu au prezentat toxicitate la concentrațiile evaluate, la 24 de ore toți naupliii fiind vii și prezentând mișcări normale.

#### **Determinarea activității antioxidante**

Această determinare a fost exemplificată pe compușii **1a-c** și **2a-c**, folosind două metode: determinarea capacității de scavenger a radicalului DPPH și pe cea a capacității de scavenger a radicalului ABTS<sup>•+</sup>.

Privind prima metoda, valori crescute ale inhibiției (%) s-au înregistrat pentru compușii **1c** și **1b**. Pe baza echivalenților de acid ascorbic s-a observat că activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a < 1c < 2c < 2a**.

Referitor la a doua metodă utilizată, valori crescute ale inhibiției (%) s-au înregistrat pentru compușii **1b**, **1c** și **2c**. Pe baza echivalenților de acid ascorbic s-a observat că activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a < 2b < 2a < 2c < 1b < 1c**.

Astfel, compușii testați prezintă activitate antioxidantă, pe domeniul de concentrație analizat, în cadrul ambelor determinări. De asemenea, rezultatele obținute nu au evidențiat diferențe semnificative statistic între compușii analizați.



### **Sinteza grafenei funcționalizate cu hidrazida carprofenului**

Funcționalizarea oxidului de grafenă, folosind compuși organici, poate avea diferite implicații biologice, inclusiv efect antimicrobian, cu aplicabilitate atât în domeniul biomedical, dar și în alte domenii.

În prezentul studiu, s-a realizat funcționalizarea oxidului de grafenă cu hidrazida carprofenului, materialul hibrid rezultat dovedind o activitate antibacteriană mai bună în comparație cu hidrazida corespunzătoare dar și cu GO, în cadrul testării cantitative antimicrobiene, considerând valorile CMI și CMEB.

Prin rezultatele obținute, se încurajează efectuarea de studii viitoare și pe alți compuși similari, demonstrând totodată potențialul materialelor hibride obținute de a fi utilizate pentru diferite activități biologice.

### **Studiile bioinformatic**

Studiile bioinformatic și cheminformatic au fost realizate pe compușii seriilor I și II, **1a-c** și **2a-c**. Acestea au permis studierea interacțiunilor dintre liganzi și receptori sau proteine țintă, fiind metode de proiectare bazate pe structura chimică a compusului, care simulează interacțiunea moleculară și prezic modul de legare și afinitatea dintre receptori și liganzi.

Din punct de vedere bioinformatic, compușii sintetizați se pot considera potențiali compuși terapeutici iar studiile ADMET au relevat un profil farmacocinetic bun, cu o absorbție intestinală ridicată și o permeabilitate bună pe linia celulară Caco2. La nivelul barierei hemato-encefalice, derivații **2a-c** prezintă o permeabilitate medie. Valorile pentru logPS prezic o permeabilitate bună la nivel central, pentru toți derivații. Riscul de interacțiuni medicament-medicament la nivel renal este minim. Totuși, derivații **1a-c** și **2a-c** pot prezenta afectare hepatică și cardiotoxicitate, după administrare sistemică. Nu sunt toxici după aplicare la nivelul dermului.

Cu toate că profilul farmacocinetic de absorbție intestinală precum și cel de traversare al membranelor fiziologice este bun, o administrare sistemică poate fi contraindicată. O administrare optimă pentru aceștia ar putea fi recomandată cea topică, atunci când se dorește un efect terapeutic local.

## Bibliografie

1. Salih N, Salimon J, Yousif E. Synthesis and antimicrobial activities of 9*H*-carbazole derivatives. *Arab. J. Chem.*, 2016, 9: 781-786;
2. Knölker HJ, Reddy KR. Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem. Rev.*, 2002, 102: 4303;
3. Nandy BC, Gupta AK, Mittal A, Vyas V. Carbazole, it's biological activity. *J. Biomed. Pharm. Res.*, 2014, 3(1): 42-48;
4. Sharma D, Kumar N, Pathak D. Synthesis, characterization and biological evaluation of some newer carbazole derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2014, 79(2): 125-132;
5. Rahman MM, Gray AI. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry*, 2005, 66: 1601-1606;
6. Li H, Zhe-Ling F et co. Anticancer carbazole alkaloids and coumarinis from *Clausena* plants: a review. *Chines journal of natural medicines*, 2017, 15(12): 881-888;
7. *The United States Pharmacopeial Convention*, with Suppliment, USP 30, Washington D.C., 2007;
8. Hickford FH, Barr SC, Erb SC. Effect of carprofen on hemostatic variables in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, 62(10): 1642-1646;
9. Fox SM, Johnston SA. Use of carprofen for the treatment of pain and inflammation in dogs. *Am. J. Vet. Med. Assoc.m.*, 1997, 210(10): 1493-1498;
10. Cheng Z, Nolan A, McKellar QA. Anti-inflammatory effects of carprofen, carprofen enantiomers, and NG-nitro-L-arginine methyl ester in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 2002, 63(6): 782-788;
11. Rimadyl Caplets package insert (Pfizer—US). Available at [www.pfizerah.com](http://www.pfizerah.com), accesat aprilie-decembrie 2019;
12. Bhardwaj N, Saraf SK, Sharma P, and P. Kumar. Syntheses, evaluation and characterization of some 1, 3, 4-oxadiazoles as antimicrobial agents. *E-Journal of Chemistry*, 2009, 6(4): 1133–1138;
13. Sengupta P, Mal M, Mandal S, Singh J, Maity TK. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of some 1, 3, 4 oxadiazoles. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 2008, 7(2): 165–167;

14. Deepak M, Shashikant P, Yalgatti M. Oxadiazole, a nucleus with versatile biological behaviour. *Int. J. of Pharm. Chem.*, American Chemical Society, 2015, 11-15;
15. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2<sup>nd</sup> edition, „Gold Book”, 1997, online version: [https:// goldbook.iupac.org/html/A/ A00564.html](https://goldbook.iupac.org/html/A/A00564.html), accesat octombrie 2019;
16. Anu K, Suman B, Sunil K, Neha S, Vipin S. Schiff bases: a versatile pharmacophore. *J Catal.*, 2013, 1-13;
17. Venugopal K, Jayashree B. Microwave-induced synthesis of Schiff bases of aminothiazolylbromocoumarins as antibacterials. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2008, 70: 88–91;
18. Pandey S, Lakshmi V, Pandey A. Biological activity of Mannich bases. *Indian Pharm. Sci.*, 2003, 65: 213–222;
19. Joshi S, Vagdevi H, Vaidya V, Gadaginamath G. Synthesis of new 4-pyrrol-1-yl benzoic acid hydrazide analogs and some derived oxadiazole, triazole and pyrrole ring systems: a novel class of potential antibacterial and antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, 43: 1989–1996;
20. Kalaivani S, Priya N, Arunachalam S. Schiff Bases: facile synthesis, spectral characterization and biocidal studies. *Int. J. Appl. Bio. Pharm. Technol.*, 2012, 3: 219–223;
21. Mathew B, Vakketh SS, Kumar SS. Synthesis, molecular properties and anthelmintic activity of some Schiff bases of 1,3,4 thiadiazole derivatives. *Der Pharma Chem*, 2010, 2(5): 337–343;
22. Encio I, Migliaccio M, Martinez V, Synthesis and cytotoxic activity of lipophilic sulphonamide derivatives of the benzo[b]thiophene 1,1-dioxide. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12: 963–968;
23. Murtaza S, Akhtar MS, Kanwal F, Abbas A, Ashiq S, Shamim S. Synthesis and biological evaluation of Schiff bases of 4-aminophenazone as an anti-inflammatory, analgesic and antipyretic agent. *J. Saudi. Chem. Soc.*, 2014;
24. Boghaei D, Askarizadeh E, Bezaatpour A. Molecular and biomolecular spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A*, 2008, 69: 624–628;
25. Chohan ZH, Praveen M, Ghaffar A. Structural and Biological Behaviour of Co(II), Cu(II) and Ni(II) Metal Complexes of Some Amino Acid Derived Schiff-Bases. *Met. Based Drugs*, 1997, 4: 267-272;

26. Bordei (Telehoiu) AT, Nuță DC, Căproiu MT, Dumitrașcu F, Zarafu I, Ioniță P, Bădiceanu CD, Avram S, Chifiriuc MC, Bleotu C and Limban C. Design, Synthesis and In Vitro Characterization of Novel Antimicrobial Agents Based on 6-Chloro-9H-carbazol Derivatives and 1,3,4-Oxadiazole Scaffolds. *Molecules*, 2020, 25(2): 266;
27. Bordei (Telehoiu) AT, Nuță DC, Mușat GC, Missir AV, Căproiu MT, Dumitrașcu F, Zarafu I, Ioniță P, Bădiceanu C, Limban C, Ozon EA. Microwave assisted synthesis and spectroscopic characterization of some novel Schiff bases of Carprofen hydrazide. *Farmacia*, 2019, 67: 955-962;
28. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.*, 1982, 45(5): 31–34;
29. Sam TW. Toxicity testing using the brine shrimp *Artemia salina*. In: *Bioactive natural products detection, isolation, and structural determination*. CRC Press, Boca Raton (FL), 1993, 441–456;
30. Cock IE, Kalt FR. Toxicity evaluation of *Xanthorrhoea johnsonii* leaf methanolic extract using the *Artemia franciscana* bioassay. *Pharmacogn. Mag.*, 2010, 6(23): 166–171;
31. Cock IE, Van Vuuren SF. A comparison of the antimicrobial activity and toxicity of six combretum and two terminalia species from southern Africa. *Pharmacogn. Mag.*, 2015, 11(41): 208–218;
32. Artoxkit M. *Artemia* Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Waters. Standard Operational Procedure. *Microbiotests*, Mariakerke-Gent., 2014;
33. Dudonné S, Vitrac X, Coutierré P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food. Chem.*, 2009, 57(5): 1764-1778;
34. Deepshikha G. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *IJPSR*, 2015, 6(2): 546-566;
35. Robu S, Aprotosoiaie AC, Miron A, Cioancă O, Stănescu U, Hăncianu M. *In vitro* antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species, cultivated in Romania, *Farmacia*, 2012, 60(3): 394-401;
36. Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* 2010, 4: 5731-5736;

37. Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, Kong J, Chen Y. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS Nano*, 2011, 5: 6971-6980;
38. Li C, Wang X, Chen F, Zhang C, Zhi X, Wang K, Cui D. The antifungal activity of graphene oxide–silver nanocomposites. *Biomaterials*, 2013, 34: 3882-3890;
39. Chen J, Peng H, Wang X, Shao F, Yuan Z, Han H. Graphene oxide exhibits broad-spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation. *Nanoscale*, 2014, 6: 1879-1889;
40. Zarafu I, Turcu I, Culita D, Petrescu S, Popa M, Chifiriuc MC, Limban C, Bordei (Telehoiu) AT, Ioniță P. Antimicrobial features of organic functionalized graphene-oxide with selected amines. *Materials*, 2018, 11: 1704;
41. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80: 1339;
42. Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev AS, Alemany LB, James WL, Tour M. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano*, 2010, 4: 4806;
43. Avramescu S, Petrescu S, Culita DC, Tudose M, Hanganu A, Zarafu I, Ionita P. A mixed organic functionalized silica-graphene oxide as advanced material for pollutants removal. *J. Nanoparticle Res.*, 2020, 22: 194.

## Lista cu lucrările științifice publicate și participarea la conferințe și proiecte

### I. Lucrări publicate în reviste indexate ISI:

1. **Bordei (Telehoiu) AT**, Nuță DC, Căproiu MT, Dumitrașcu F, Zarafu I, Ioniță P, Bădiceanu CD, Avram S, Chifiriuc MC, Bleotu C and Limban C. Design, Synthesis and In Vitro Characterization of Novel Antimicrobial Agents Based on 6-Chloro-9H-carbazol Derivatives and 1,3,4-Oxadiazole Scaffolds. *Molecules*, 2020, 25(2): 266; FI 3,060;
2. Guma (Tanasiev) N, **Bordei (Telehoiu)\* AT**, Limban C, Sogor C, Manoliu L, Avram S. Bioinformatics And Cheminformatics Study Of Carbazole Derivatives – P3c7, P3c7-A20, P3c7-S243, And De Novo 2,5-Disubstituted 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. *Farmacia*, 2020, 68: 665-671; FI 1,607;
3. **Bordei (Telehoiu) AT**, Nuță DC, Mușat GC, Missir AV, Căproiu MT, Dumitrașcu F, Zarafu I, Ioniță P, Bădiceanu C, Limban C, Ozon EA. Microwave assisted synthesis and spectroscopic characterization of some novel Schiff bases of Carprofen hidrazide. *Farmacia*, 2019, 67: 955-962; FI 1,607;
4. Zarafu I, Turcu I, Culita D, Petrescu S, Popa M, Chifiriuc MC, Limban C, **Bordei (Telehoiu) AT**, Ioniță P. Antimicrobial features of organic functionalized graphene-oxide with selected amines. *Materials*, 2018, 11: 1704; FI 2,467.

### II. Lucrări publicate sub formă de postere sau prezentări orale:

1. **Bordei (Telehoiu) AT**, Nuță DC, Căproiu MT, Dumitrașcu F, Zarafu I, Bădiceanu CD, Limban C. Principles of green chemistry applied in obtaining Schiff bases with potential therapeutic effect. Prezentare orală, *Congresul UMF Carol Davila*, Bucuresti, octombrie 2019;
2. Dumitrescu D, **Bordei (Telehoiu) AT**, Caira MR, Draghici C, Limban C, Dumitrașcu F. The halogenation of the non-steroidal anti-inflammatory drug carprofen. poster - *Conferința Națională de Chimie*, Râmnicu-Vâlcea, Octombrie 2018.

### **III. Participări la proiecte:**

Începând cu luna august 2019, timp de un an, am participat la proiectul POCU/380/6/13/125245, „Excelență în cercetarea interdisciplinară, doctorală și postdoctorală, alternative de carieră prin inițiativa antreprenorială (EXCIA)”, proiect ce și-a propus să formeze antreprenorial tineri cercetători, printr-o abordare interdisciplinară și prin formarea unui grup țintă format din participanți ai unor domenii diverse: economic, medical, sociologic și de științe sociale sau juridice.

### **IV. Brevete de invenție:**

**Bordei (Telehoiu) AT**, Limban C, Missir AV, Nuță DC, Bădiceanu CD, Dumitrașcu F, Căproiu MT, Chifiriuc MC, Delcaru C, Zarafu I, Ioniță P, Avram S, Bleotu C, Costea T, Gîrd C, Ancuceanu VR, Dinu-Pîrvu CE. Derivați ai carbazolului, compoziție farmaceutică ce îi conține și utilizarea acestora. Cerere de brevet de invenție nr. A/00320/30.05.2019.