



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

***SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR NOI COMPUȘI
HETEROCICLICI CU NUCLEU PIROLIC SAU PIROLIC
CONDENSAT CU POTENȚIALĂ ACȚIUNE BIOLOGICĂ
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA

Student-doctorand:

BRETAN (căs. IVAN) BEATRICE-CRISTINA

2023

Cuprins

| | |
|--|-----------|
| Introducere | 7 |
| I. PARTEA GENERALĂ..... | 10 |
| Capitolul 1. Compuși heterociclici cu nucleu pirolic | 10 |
| 1.1. Metode de obținere a derivaților de pirol | 12 |
| 1.2. Proprietățile biologice ale derivaților de pirol..... | 20 |
| Capitolul 2. Compuși heterociclici cu nucleu pirolic condensat | 28 |
| 2.1. Metode de obținere a derivaților de pirol[1,2- <i>b</i>]piridazină..... | 30 |
| 2.2. Proprietățile biologice ale derivaților de pirol[1,2- <i>b</i>]piridazină | 32 |
| II. CONTRIBUȚII PERSONALE..... | 35 |
| Capitolul 3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale..... | 35 |
| Capitolul 4. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici cu nucleu pirolic.. | 36 |
| 4.1. Introducere | 36 |
| 4.2. Materiale și metode | 36 |
| 4.2.1. Obținerea și caracterizarea sărurilor intermediare de benzimidazoliu 2a-e... | 37 |
| 4.2.2. Obținerea și caracterizarea derivaților de pirol 4-19..... | 39 |
| 4.3. Rezultate și discuții..... | 47 |
| 4.3.1. Sinteza și determinarea structurii bromurilor de benzimidazoliu intermediare | 47 |
| 4.3.1.1. Sinteza bromurilor de benzimidazoliu intermediare 2a-e | 47 |
| 4.3.1.2. Determinarea structurii sărurilor de benzimidazoliu 2a-e | 47 |
| 4.3.2. Sinteza și determinarea structurii noilor compuși heterociclici cu nucleu pirolic | 49 |
| 4.3.2.1. Sinteza noilor compuși heterociclici cu nucleu pirolic 4-19 | 49 |
| 4.3.2.2. Determinarea structurii noilor compuși heterociclici cu nucleu pirolic 4-19 | 51 |
| 4.3.2.2.1. Spectrele de absorbție în infraroșu..... | 51 |
| 4.3.2.2.2. Spectrele de rezonanță magnetică nucleară..... | 52 |
| 4.3.2.2.3. Difracția de raze X | 55 |
| 4.4. Concluzii..... | 60 |

| | |
|---|-----------|
| Capitolul 5. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici cu nucleu pirolic condensat din clasa pirolo[1,2-<i>b</i>]piridazinelor | 61 |
| 5.1. Introducere | 61 |
| 5.2. Materiale și metode | 61 |
| 5.2.1. Obținerea și caracterizarea esterilor piridazinonici 26a-c și a acizilor piridazinonici 27a-c intermediari..... | 62 |
| 5.2.2. Obținerea și caracterizarea noilor pirolo[1,2-<i>b</i>]piridazine 29-34 | 66 |
| 5.3. Rezultate și discuții..... | 69 |
| 5.3.1. Sinteza și determinarea structurii esterilor piridazinonici 26a-c și a acizilor piridazinonici 27a-c intermediari..... | 69 |
| 5.3.1.1. Sinteza esterilor piridazinonici 26a-c și a acizilor piridazinonici 27a-c intermediari..... | 69 |
| 5.3.1.2. Determinarea structurii esterilor piridazinonici 26a-c și a acizilor piridazinonici 27a-c..... | 70 |
| 5.3.1.2.1. Spectrele de absorbție în infraroșu..... | 70 |
| 5.3.1.2.2. Spectrele de rezonanță magnetică nucleară..... | 71 |
| 5.3.1.2.3. Difracția de raze X | 75 |
| 5.3.2. Sinteza și determinarea structurii noilor compuși heterociclici cu nucleu pirolic condensat din clasa pirolo[1,2-<i>b</i>]piridazinelor 29-34 | 79 |
| 5.3.2.1. Sinteza noilor derivați de pirolo[1,2-<i>b</i>]piridazină 29-34 | 79 |
| 5.3.2.2. Determinarea structurii noilor derivați de pirolo[1,2-<i>b</i>]piridazină 29-34. | 80 |
| 5.3.2.2.1. Spectrele de absorbție în infraroșu..... | 80 |
| 5.3.2.2.2. Spectrele de rezonanță magnetică nucleară..... | 81 |
| 5.3.2.2.3. Difracția de raze X | 84 |
| 5.4. Concluzii..... | 85 |
| Capitolul 6. Sinteza și caracterizarea unor compuși heterociclici cu nucleu pirolic obținuți prin reinvestigarea reacției Nenițescu..... | 87 |
| 6.1. Introducere | 87 |
| 6.2. Materiale și metode | 87 |
| 6.3. Rezultate și discuții..... | 88 |
| 6.4. Concluzii..... | 91 |

| | |
|--|------------|
| Capitolul 7. Evaluarea citotoxicității unor noi compuși cu nucleu pirolol și pirolol condensat din clasa pirolol[1,2-<i>b</i>]piridazinelor | 92 |
| 7.1. Introducere | 92 |
| 7.2. Evaluarea citotoxicității pe celula vegetală de <i>Triticum aestivum</i> L. | 93 |
| 7.2.1. Materiale și metode | 93 |
| 7.2.2. Rezultate și discuții..... | 95 |
| 7.2.3. Concluzii..... | 107 |
| 7.3. Evaluarea citotoxicității pe celulele animale de <i>Artemia franciscana</i> Kellogg și <i>Daphnia magna</i> Straus..... | 108 |
| 7.3.1. Materiale și metode | 108 |
| 7.3.2. Rezultate și discuții..... | 109 |
| 7.3.3 Concluzii..... | 113 |
| 7.4. Evaluarea citotoxicității pe linii celulare tumorale | 114 |
| 7.4.1. Materiale și metode | 114 |
| 7.4.2. Rezultate și discuții..... | 116 |
| 7.4.3. Concluzii..... | 128 |
| Capitolul 8. Concluzii și contribuții personale | 131 |
| Bibliografie | 135 |
| Anexe..... | 154 |

Introducere

Rezistența celulelor canceroase și a microorganismelor la acțiunea tratamentelor actuale sau indisponibilitatea unor terapii pentru anumite boli grave ar fi câteva dintre motivele pentru care necesitatea sintezelor din chimia organică este una reală și fundamentată. Chimia heterociclicilor, ramură a chimiei organice, este un domeniu de cercetare intens studiat, care poate oferi soluții în descoperirea unor noi molecule cu acțiune terapeutică.

Compușii heterociclici prezintă o importanță deosebită, atât din punct de vedere fizico-chimic, cât mai ales al potențialului biologic, un număr mare de medicamente cu un spectru larg de acțiune, utilizate pentru tratarea a diferite afecțiuni, conțin astfel de molecule ca substanțe active. Datele statistice au indicat că peste 85% din numărul total de molecule bioactive sunt heterociclicurile care conțin în moleculă ca heteroatom azotul [1-3]. Din clasa compușilor heterociclici pentaatomici, pirolul, heterociclu cu un atom de azot, este unul dintre cei mai răspândiți compuși cu importanță vitală pentru organismele vii, având în vedere că se găsește în structura a numeroase biomolecule, printre care hemul B, clorofila, vitamina B12, pigmenții biliari (bilirubina și biliverdina), mioglobina, citocromii, cofactorul F430. O sursă bogată de biocompuși cu structură pirolică sunt alcaloizii extrași din organisme marine, bacterii, fungi, plante, vertebrate și nevertebrate [4-6]. Datele de literatură au evidențiat că diferiți derivați de sinteză cu nucleu pirolic prezintă numeroase proprietăți biologice, remarcându-se acțiunea antitumorală, antimicrobiană, analgezică, antiinflamatoare, antivirală, hipoglicemiantă, antidepresivă [3-8]. Mai mult, acest nucleu este prezent în structura unor medicamente, cele mai cunoscute fiind atorvastatina, sunitinib, pemetrexed, tolmetin, zomepirac, ketorolac, piviniu, tropisetron, ruxolitinib, remdesivir, ondansetron [3-8].

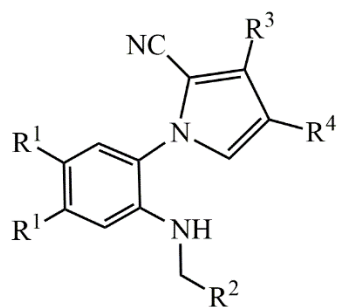
Pe de altă parte, studiind literatura de specialitate referitoare la compușii din clasa pirolilor, mi-au atras atenția și compușii cu nucleu pirolic condensat. Deși posibilitățile de condensare a acestui nucleu cu un alt heterociclu sunt numeroase, mi-am îndreptat cercetările asupra celor care conțin un nucleu de piridazină, heterociclu aromatic hexatomic care conține doi atomi de azot în pozițiile 1 și 2, și anume asupra compușilor heterociclici condensați cu structură de pirolo[1,2-*b*]piridazină. Derivații de sinteză ai piridazinei sunt cunoscuți pentru spectrul larg de proprietăți biologice, spre exemplu acțiunea antitumorală, analgezică, antiinflamatoare, antimicrobiană, antidiabetică, anticonvulsivantă, antidepresivă, hipotensivă

etc [9-16]. Totuși, comparativ cu derivații pirolului, numărul derivaților de piridazină biosintetizați de diferite organisme este mult mai mic [9]. Un alt aspect încurajator privind importanța piridazinei îl constituie prezența acestuia în structura unor medicamente: tepotinib, pildralazină, cadralazină, emorfazonă, minaprină [9-16]. Astfel de sisteme heterociclice condensate, pirolo[1,2-*b*]piridazinele, sunt cunoscute pentru proprietățile biologice cum ar fi antitumorală, antimicrobiană, antiinflamatoare, hipolipemiantă și anxiolitică [17-25], dar și pentru proprietățile fluorescente remarcabile [26-33]. Totuși, comparativ cu potențialul acestor două nuclee heterociclice prezente în moleculă, proprietățile fizico-chimice și biologice ale pirolo[1,2-*b*]piridazinelor sunt puțin studiate.

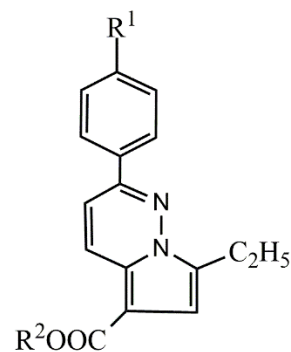
Luând în considerare aceste multiple proprietăți și aplicații ale heterociclorilor din clasa pirolului, piridazinei și a pirolo[1,2-*b*]piridazinei, am considerat de interes sinteza de noi compuși cu nucleu pirollic izolat tri- sau tetrasubstituit și condensat, din clasa pirolo[1,2-*b*]piridazinelor, în scopul identificării unor noi derivați biologic activi cu potențial terapeutic.

De asemenea, cunoscând că indolul, heterociclu care conține un nucleu pirollic condensat cu un nucleu benzenic, se regăsește în structura unor compuși naturali (triptofan, serotonină, melatonină și în unii alcaloizi), dar și în structura unor medicamente (vincristină, vinblastină, osimertinib, panobinostat, indometacin, acemetacin, arbidol, sumatriptan, fluvastatină etc.) [34-36], o altă direcție distinctă de cercetare a fost studiul sintezei Nenițescu [37].

Obținerea noilor compuși a fost realizată prin dezvoltarea unor metode de sinteză elaborate de către colectivul de cercetare condus de domnul dr. Florea Dumitrașcu (C.S. I) din cadrul Institutului de Chimie Organică și Supramoleculară „Costin D. Nenițescu”, Academia Română [38-40]. Derivații de pirol tri- sau tetrasubstituiți au fost obținuți din *N*-ilidele generate *in situ* din diferite bromuri de 3-cianometil-benzimidazoliu în mediu de 1,2-epoxibutan, cu alchine dipolarofile printr-o reacție de cicloadiție 1,3-dipolară (Fig. 1.). Derivații de pirolo[1,2-*b*]piridazină au fost obținuți prin reacția de cicloadiție a oxazolinelor mezoionice, generate *in situ* din acizii piridazinonici corespunzători în mediu de anhidridă acetică, cu alchine dipolarofile (Fig. 1.). De asemenea, prin reinvestigarea sintezei Nenițescu a 5-hidroxiindolului în care s-a izolat un compus caruia i s-a atribuit o structură bisazepinică [37], noile investigații prin difracție de raze X au demonstrat o structură pirololiliden-azepinică, diferită de cea formulată anterior (bisazepinică) (Fig. 2).



R¹, R², R³, R⁴: H, alchil, aril, benzoil, alchiloxicarbonil



R¹: H, X, R²: CH₃, C₂H₅

Figura 1. Structura noilor compuși heterociclici cu nucleu pirolic

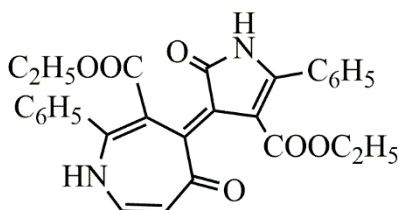


Figura 2. Structura noului compus piroliliden-azepinic

Structurile noilor compuși au fost confirmate prin analiză elementală, prin spectrometrie în infraroșu (IR), spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară (¹H-RMN și ¹³C-RMN), iar în cazul unora dintre aceștia prin difracție de raze X.

În scopul identificării unor noi compuși cu potențial biologic, s-a investigat citotoxicitatea pe celulele vegetale de *Triticum aestivum* L., pe celulele animale ale unor crustacee (*Artemia franciscana* Kellogg și *Daphnia magna* Straus), pe liniile celulare tumorale umane standardizate (LoVo, MCF-7, SK-OV-3) și pe celulele normale HUVEC.

Prezenta lucrare este structurată în două părți: Partea generală și Contribuții personale, la care se mai adaugă Lista cu lucrările publicate, Lista cu abrevieri și simboluri, Introducerea, Concluzii și contribuții personale, Bibliografia și Anexe. În prima parte (Partea Generală), am prezentat cele mai importante date de literatură privind sinteza și proprietățile biologice ale acestor compuși, iar în cea de-a doua parte (Contribuții personale), am prezentat sinteza noilor compuși, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea citotoxicității acestora.

I. PARTEA GENERALĂ

Capitolul 1. Compuși heterociclici cu nucleu pirolic

Pirolul este un compus heterociclic pentaatomic aromatic, care conține ca heteroatom azotul, fiind unitatea structurală de bază în compoziția a diferite biomolecule și medicamente. Prezența pirolului în structura porfirinelor imprimă acestuia o importanță deosebită, cei mai cunoscuți reprezentanți fiind hemul B și clorofila. Alte biomolecule care conțin nucleul pirolic sunt vitamina B12, bilirubina, biliverdina, cofactorul F430 și numeroși alcaloizi. Dintre medicamentele care conțin nucleul pirolic se remarcă: atorvastatină (hipocolesterolemiant prin inhibarea HMG Co-A reductazei), sunitinib (antitumoral prin inhibarea protein-kinazelor), tolmetin și zomepirac (antiinflamatoare nesteroidiene), pirviniu (antihelmintic) [4-8].

În acest capitol se prezintă principalele metode de sinteză și proprietățile biologice ale derivaților cu nucleu pirolic. Una dintre cele mai importante metode de sinteză o reprezintă sinteza Huisgen care constă în reacția de cicloadiție [3+2] dintre 1,3-dipoli și alchene sau alchine dipolarofile [41, 42], sinteză asupra căreia mi-am axat cercetările în cadrul acestor studii doctorale. În continuare, sunt prezentate datele de literatură referitoare la proprietățile biologice a numeroși compuși heterociclici cu nucleu pirolic: antitumorală, antimicrobiană, antivirală, analgezică, antiinflamatoare, hipoglicemiantă, antidepresivă [3-8].

Capitolul 2. Compuși heterociclici cu nucleu pirolic condensat

Compușii heterociclici condensați din clasa pirolo[1,2-*b*]piridazinelor, obținuți prin condensarea formală a două nuclee heterociclice, pirolul și piridazina, sunt cunoscute pentru potențialul lor biologic. În acest capitol, asemănător capitolului anterior, sunt prezentate principalele metode de sinteză și proprietățile biologice ale acestor compuși [17-25, 39, 40]. Metodele de sinteză a acestor compuși condensați pot fi clasificate, în funcție de precursorii folosiți, astfel: din piridazină sau derivați ai acesteia sau din derivați cu nucleu pirolic. Dintre acestea, cercetările au fost direcționate asupra metodelor de obținere din derivați de piridazină, fiind prezentate datele de literatură referitoare la reacțiile acestora cu alchine dipolarofile prin cicloadiție 1,3-dipolară. De asemenea sunt prezentate datele de literatură actualizate privind proprietățile antitumorale, antimicrobiane și antiinflamatoare ale derivaților de pirolo[1,2-*b*]piridazină.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Pornind de la datele de literatură în care se prezintă importanța compușilor heterociclici cu nucleu pirolic, în scopul identificării unor noi agenți biologici mai activi și cu o toxicitate scăzută față de cei existenți, ne-am propus sinteza unor noi derivați cu nucleu pirolic și pirolic condensat din clasa pirolo[1,2-*b*]piridazinelor, prin reacția de cicloadiție 1,3-dipolară dintre *N*-ilide heteroaromatice sau oxazolone mezoionice și alchinele dipolarofile.

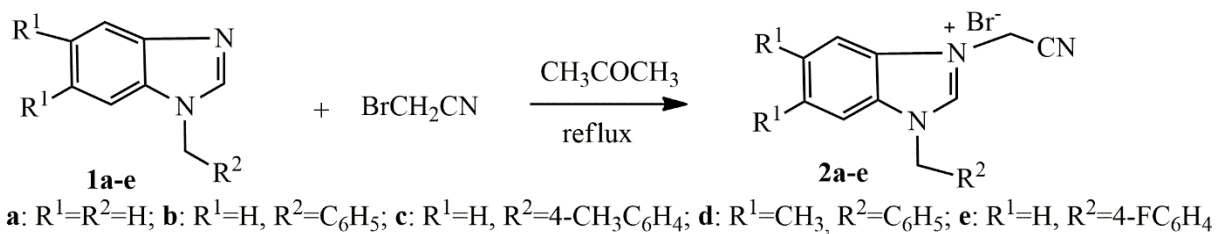
Obiectivele generale propuse pentru realizarea acestor studii doctorale au fost:

- sinteza unor noi derivați de pirol tri- sau tetrasubstituit;
- sinteza unor noi derivați de pirol condensat din clasa pirolo[1,2-*b*]piridazinei;
- confirmarea structurii chimice a noilor compuși sintetizați prin analiză elementală, metode spectrale (¹H-RMN, ¹³C-RMN, IR) și prin difracție de raze X;
- determinarea citotoxicității *in vivo* pe celulele vegetale de *Triticum aestivum* L. și pe celulele animale (*Artemia franciscana* Kellogg și *Daphnia magna* Straus);
- determinarea citotoxicității *in vitro* pe linii celulare tumorale (LoVo, MCF-7, SK-OV-3).

Capitolul 4. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici cu nucleu pirolic

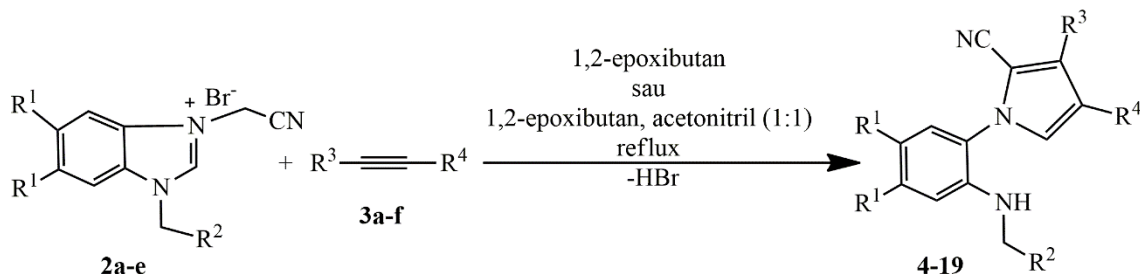
Pentru obținerea noilor compuși din clasa pirolilor tri- sau tetrasubstituiți, s-a folosit o metodă de sinteză în două etape. În prima etapă au fost sintetizate sărurile de benzimidazoliu, iar în cea de a doua, prin reacția acestora cu alchinele dipolarofile s-au obținut noii pirol.

Sărurile de benzimidazoliu **2a-e** intermediare s-au obținut prin reacția dintre derivatul benzimidazolic *N*-substituit **1a-e** și bromoacetonitril (Schema 4.1), cu randamente cuprinse în intervalul 75-87%. Dintre acestea, numai derivații **2d** și **2e** sunt compuși noi [38, 43, 44].



Schema 4.1. Obținerea sărurilor de benzimidazoliu **2a-e** intermediare

În ceea ce privește noii compuși heterociclici pirolici, sinteza derivaților **4-13** s-a realizat în mediu de 1,2-epoxibutan, la reflux timp de 48 ore, cu randamente de 35-60%. În schimb, derivații fluorurați **14-19** au fost obținuți printr-o metodă îmbunătățită, în mediu de 1,2-epoxibutan și acetonitril (v:v=1:1), la reflux timp de 6 ore, cu randamente de 46-61% (Schema 4.2.) [45-47].



4: $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=COC_6H_5$; **5:** $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=COOCH_3$; **6:** $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=COOC_2H_5$;
7: $R^1=R^2=R^3=H$, $R^4=COOCH(CH_3)_2$; **8:** $R^1=R^2=H$, $R^3=R^4=COOCH_3$; **9:** $R^1=R^2=H$, $R^3=R^4=COOC_2H_5$;
10: $R^1=R^3=H$, $R^2=C_6H_5$, $R^4=COC_6H_5$; **11:** $R^1=R^3=H$, $R^2=4-CH_3C_6H_4$, $R^4=COC_6H_5$; **12:** $R^1=CH_3$, $R^2=C_6H_5$,
 $R^3=H$, $R^4=COOCH_3$; **13:** $R^1=CH_3$, $R^2=C_6H_5$, $R^3=H$, $R^4=COOC_2H_5$; **14:** $R^1=R^3=H$, $R^2=4-FC_6H_4$, $R^4=COC_6H_5$;
15: $R^1=R^3=H$, $R^2=4-FC_6H_4$, $R^4=COOCH_3$; **16:** $R^1=R^3=H$, $R^2=4-FC_6H_4$, $R^4=COOC_2H_5$; **17:** $R^1=R^3=H$, $R^2=4-FC_6H_4$,
 $R^4=COOCH(CH_3)_2$; **18:** $R^1=H$, $R^2=4-FC_6H_4$, $R^3=R^4=COOCH_3$; **19:** $R^1=H$, $R^2=4-FC_6H_4$, $R^3=R^4=COOC_2H_5$

Schema 4.2. Sinteza noilor derivați pirolici tri- sau tetrasubstituiți **4-19**

Confirmarea structurală a noilor compuși heterociclici cu nucleu pirolitic **4-19**, purificați prin cromatografie pe coloană și recristalizați din alcool, a fost realizată prin analiză elementală și metode spectrale (IR, 1H -RMN și ^{13}C -RMN), iar în cazul derivaților **6**, **13** și **19** și prin difracție de raze X. De asemenea, structura noilor săruri **2d** și **2e** a fost confirmată prin analiză elementală, spectrometrie 1H - și ^{13}C -RMN.

Determinarea structurii sărurilor de benzimidazoliu **2a-e**

În spectrele de proton, cea mai importantă dovadă pentru confirmarea structurală a sărurilor de benzimidazoliu a constituit-o prezența noului semnal singlet al protonilor grupei metilen legat de grupa ciano, la deplasarea chimică de 5,80 ppm (pentru **2d**) și 5,83 ppm (**2e**).

Spectrele ^{13}C -RMN au confirmat structura bromurilor prin prezența a două noi semnale ale celor doi carboni din radicalul cianometilen, cel al atomului de carbon din grupa cian fiind prezent la 114,2 ppm (**2d**) și 114,3 ppm (**2e**), iar cel metilenic la 35,0 ppm (**2d**) și 35,2 ppm (**2e**).

Determinarea structurii noilor compuși heterociclici cu nucleu pirolitic **4-19**

În spectrele în infraroșu ale noilor compuși **4-19** este prezentă o nouă bandă de absorbție caracteristică vibrației de întindere a grupei amino, în regiunea $3341-3427\text{ cm}^{-1}$, confirmând că

reacția a avut loc prin ruperea ciclului imidazolic cu formarea noului nucleu pirolitic. O altă dovadă care confirmă reacția de cicloadiție este prezența noii benzi de absorbție $\nu_{C=O}$ din restul benzoil ($1632-1637\text{ cm}^{-1}$) sau din fragmentul alchiloxycarbonil ($1699-1752\text{ cm}^{-1}$).

În spectrele de proton ale noilor compuși **4-19**, apariția noului semnal al protonului din grupa amino la valori ale deplasării chimice δ cuprinse în intervalul 3,38-4,01 ppm, sub formă de triplet (NH-CH₂-C₆H₅), cu constanta de cuplaj $J=5,2-5,5\text{ Hz}$ sau sub formă de quartet (NH-CH₃), cu $J=4,7-4,9\text{ Hz}$ a confirmat că reacția a avut loc. În cazul derivaților trisubstituiți **4-7**, **10-17**, prin cuplarea celor doi protoni din nucleul pirolitic, H-3 și H-5, au apărut două semnale dublet cu $J=1,6-1,7\text{ Hz}$, la $\delta=7,29-7,47\text{ ppm}$ pentru H-3 și la $\delta=7,45-7,52\text{ ppm}$ pentru H-5. Protonul din nucleul pirolitic H-5 al derivaților tetrasubstituiți **8**, **9**, **18** și **19** a apărut sub forma unui semnal singlet ($7,36-7,41\text{ ppm}$). Semnalele protonilor din restul esteric (COOR) grefat în pozițiile 4 sau 3 și 4, au apărut la valori corespunzătoare ale deplasărilor chimice.

În spectrele de ¹³C-RMN, semnalele atomilor de carbon din nucleul pirolitic au apărut la deplasări chimice cuprinse între intervalele 121,6-122,6 ppm pentru C-3, 118,0-126,3 ppm pentru C-4 și 131,6-132,8 ppm pentru C-5. Semnalele tuturor carbonilor din fragmentele benzoil, metil- etiloxycarbonil au apărut la valori δ corespunzătoare.

Datele de difracție de raze X pentru pirolonii **6**, **13** și **19** au confirmat fără echivoc structura noilor compuși. Moleculele au cristalizat în sistemul monoclinic în grupul spațial $P2_1/c$ ca două molecule independente (compusul **6**, Fig. 4.1.a) sau în sistemul triclinic în grupul spațial $P-1$ ca două molecule chimic echivalente dar cristalografic independente (**13**, **19**, Fig 4.1.b-c).

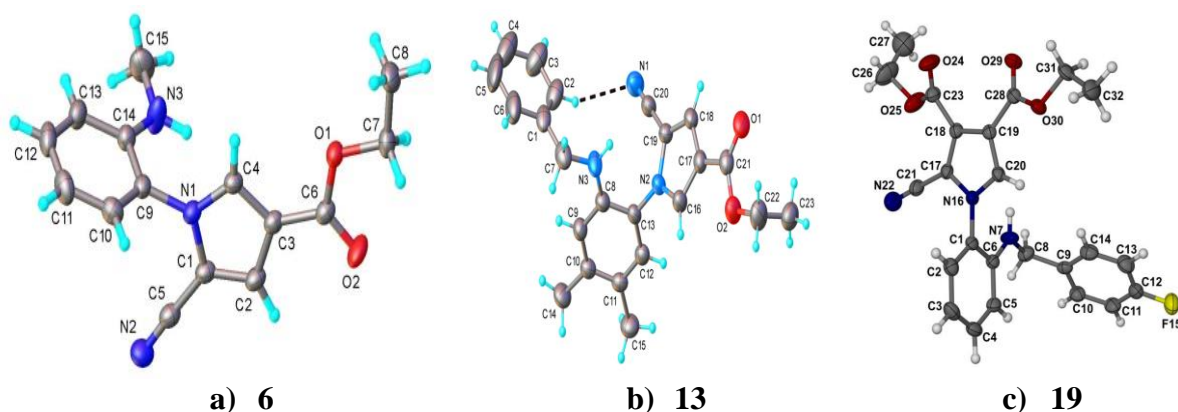


Figura 4.1. Diagramele ORTEP ale pirolilor **6**, **13** și **19**

În cristal moleculele au interacționat prin legături de hidrogen de tip N-H...O sau C-N...H, formându-se două lanțuri supramoleculare similare dar cristalografic independente (Fig. 4.2.a.).În cazul pirolului **19** s-a putut observa că structura celuiilalt dimer a fost chimic identică, formându-se aceleași legături de hidrogen (Fig. 4.2.b.).

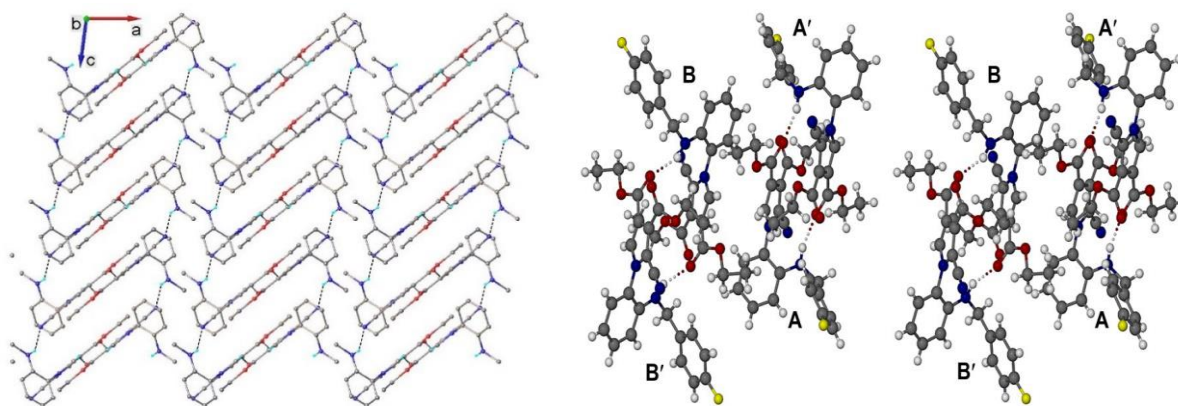
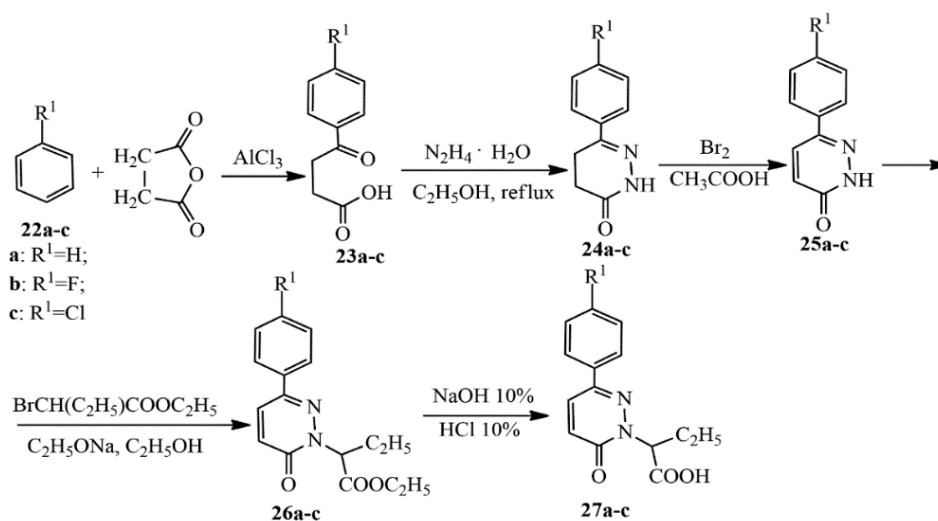


Figura 4.2. a) Împachetarea în cristal a moleculelor pirolului **6**; b) Structura dimerului pirolului **19**

Capitolul 5. Sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici cu nucleu pirolic condensat din clasa pirolo[1,2-*b*]piridazinelor

Sinteza compușilor heterociclici condensăți din clasa pirolo[1,2-*b*]piridazinelor s-a realizat în mai multe etape, esterii piridazinonici **26a-c** fiind obținuți cu randamente de 67-74%, iar intermediarii cheie, acizii **27a-c**, cu randamente de 87-90% (Schema 5.1.).



Schema 5.1. Obținerea esterilor piridazinonici **26a-c** și a acizilor piridazinonici **27a-c**

În fig. 5.2. sunt prezentate structurile supramoleculare ale acestor intermediari (Fig. 5.2.).

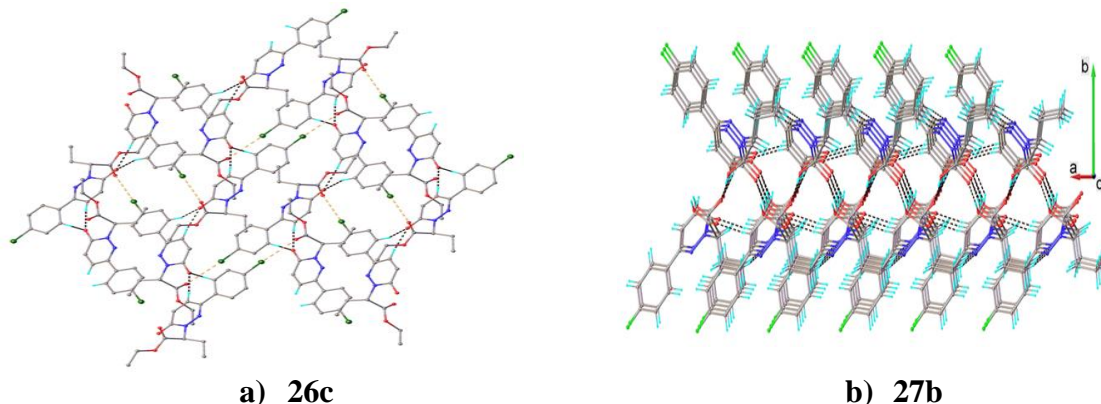


Figura 5.2. a) Rețeaua supramoleculară 3D a esterului **26c**; b) Structura 2D a lanțurilor supramoleculare ale acidului **27b**

Determinarea structurii pirolo[1,2-*b*]piridazinelor **29-34**

Spectrele IR ale noilor compuși **29-34**, au confirmat prezența grupei funcționale carbonil de tip ester prin banda de absorbție $\nu_{C=O}$ ester din regiunea $1666-1688\text{ cm}^{-1}$. Absența benzii $\nu_{C=O}$ lactamă din în acizii precursori a confirmat reacția de cicloadiție 1,3-dipolară.

În spectrele $^1\text{H-RMN}$, un semnal nou caracteristic a fost cel al protonului din poziția 6 a nucleului pirolo[1,2-*b*]piridazinic, prezent ca singlet în cazul derivatului **31** la $\delta=7,13$ ppm. Spectrele derivaților **29**, **32** și **34**, înregistrate în soluție diluată, au pus în evidență un semnal triplet pentru acest proton datorită cuplării cu protonii grupei metilen din radicalul etil din poziția 7, la $\delta=7,11-7,15$ ppm ($J=0,9$ Hz). Spectrele $^{13}\text{C-RMN}$ au confirmat formarea noului nucleu pirolic prin prezența celor două semnale ale atomilor de carbon C-5 ($\delta=103,0-103,6$ ppm) și C-6 ($\delta=112,6-112,8$ ppm), semnalele celorlalți atomi fiind prezente la valori δ corespunzătoare.

Prin difracție de raze X s-a observat că unitatea structurală de bază a pirolo[1,2-*b*]piridazinei **29** a fost formată din două molecule chimic identice, cristalografic independente (Fig. 5.3.a) și prezintă o împachetare cristalografică paralelă conform structurii 1D (Fig. 5.3.b).

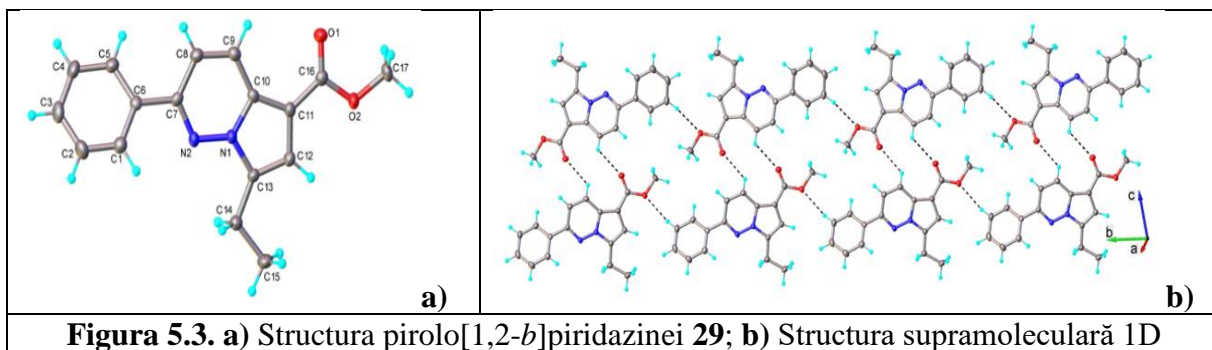
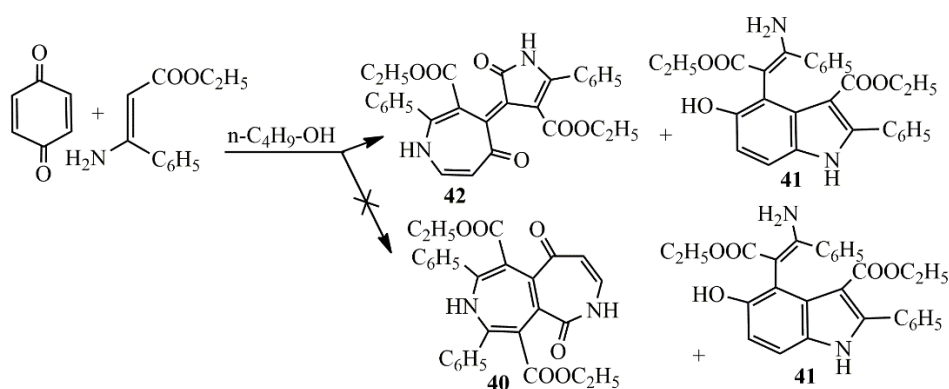


Figura 5.3. a) Structura pirolo[1,2-*b*]piridazinei **29**; b) Structura supramoleculară 1D

Capitolul 6. Sinteza și caracterizarea unor compuși heterociclici cu nucleu pirololic obținuți prin reinvestigarea reacției Nenițescu

Prin reacția dintre *p*-benzochinonă și 3-aminocinamatul de etil în mediu de 1-butanol, în anul 1988 Palaghiță M. și Răileanu D. [37] au obținut un amestec format din doi produși, un derivat bisazepinic **40** și un derivat de 4-enamino-5-hidroxiindol **41** (Schema 6.1.), ale căror structuri au fost confirmate prin spectrometrie IR și RMN [37]. În spectrul ¹H-RMN al compusului **40**, autorii [37] au raportat neechivalența a doi protoni metilenici dintr-o grupă ester.

Prin reinvestigarea structurii monocristalului compusului **40** prin difracție de raze X, s-a infirmat structura bisazepinică, evidențiind un izomer al acestuia, de tipul **42** (Schema 6.1.) [49].



Schema 6.1. Sinteza derivatului piroliliden-azepinic **42** și a derivatului de 5-hidroxiindol **41** prin reinvestigarea reacției Nenițescu

Prin analiza structurii monocristalului s-a observat că molecula nu a prezentat două nuclee azepinice condensate **40** [37] ci aceasta conține un nucleu azepinic și unul pirololic unite printr-o dublă legătură C5=C20, derivatul **42** (Fig. 6.1.). Datele de difracție de raze X au explicat neechivalența magnetică a protonilor metilenici prin valorile lungimilor legăturilor de hidrogen intra- și intermoleculare.

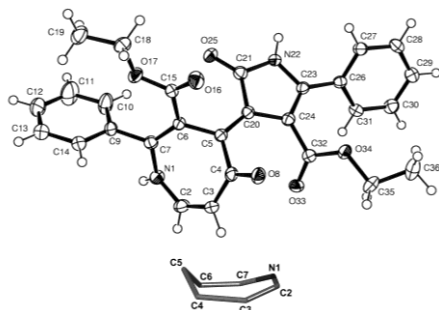


Figura 6.1. Structura moleculară a piroliliden-azepinei **42** obținută prin difracție de raze X.

Capitolul 7. Evaluarea citotoxicității unor noi compuși cu nucleu pirolic și pirolic condensat din clasa pirolo[1,2-*b*]piridazinelor

Evaluarea citotoxicității unora dintre noii compuși sintetizați (pirolii **4-13**, sărurile de benzimidazoliu **2a-d**, pirolo[1,2-*b*]piridazinele **29-31**, **33**, **34**, acizii piridazinonici **27a-c** și piroliliden-azepina **42**) s-a realizat pe celula vegetală de *Triticum aestivum* L., pe celulele animale ale crustaceelor *Artemia franciscana* Kellogg și *Daphnia magna* Straus și/sau pe trei linii celulare standardizate derivate din adenocarcinoame umane de colon (LoVo), de sân (MCF-7), de ovar (SK-OV-3) și pe celulele endoteliale ale venei ombilicale umane (HUVEC).

Evaluarea citotoxicității pe celula vegetală de *Triticum aestivum* L.

Evaluarea acțiunii citotoxice a compușilor luați în studiu pe celula vegetală de *Triticum aestivum* L. prin metoda Constantinescu, a indicat că dintre pirolii **4-13** și bromurile **2a-d** derivații pirolici trisubstituiți **12**, **13**, **10** și **5** au prezentat procente de inhibiție cele mai mari la 72 ore și la concentrația de 1000 μM (69,5%, 60,6%, 44,0% și 29,7%), aceștia având un efect inhibitor mai slab comparativ cu bromurile intermediare **2d** – 97,0%, **2c** – 95,2%, **2b** – 91,5%, cu excepția compusului pirolic **5** (29,7% vs. bromura **2a** – 16,0%). S-a observat că pirolii trisubstituiți au prezentat efect inhibitor mai pronunțat comparativ cu cei tetrasubstituiți și că grefarea pe nucleul benzenic în pozițiile 4 și 5 a doi radicali metil a potențat efectul inhibitor.

În cazul compușilor cu nucleu pirolic condensat, cea mai pronunțată acțiune inhibitorie a avut-o pirolo[1,2-*b*]piridazina **33** obținută din acidul piridazinonic **27b**, prezentând un procent de inhibiție mai mare de 35% la toate concentrațiile testate (98,3%-36,5%). S-a observat că grefarea atomului de fluor a îmbunătățit efectul inhibitor al acestora.

Analiza microscopică a confirmat efectul inhibitor a unora dintre acești compuși prin vizualizarea unor modificări ale filmului mitotic și a mitoinhibiției, spre exemplu metafaze și telofaze în tropocineză, metafaze dezorganizate, anafaze în tropocineză, punți telofazice etc.

Evaluarea citotoxicității pe celulele animale de *Artemia franciscana* Kellogg și *Daphnia magna* Straus

Evaluarea citotoxicității *in vivo* pe crustaceele de *Artemia franciscana* a noilor piroluri **4-13** și a sărurilor de benzimidazoliu **2a-d** a indicat că aceștia au fost lipsiți de toxicitate, cu excepția pirolului **12** care conține un fragment benzilamino și două grupe metil pe nucleul benzenic legat de atomul de azot pirolic și a precursorului acestuia, bromura **2d**, care la 48 ore au prezentat

valorile CL₂₅ de 168,8 μM și, respectiv, 793,2 μM. În cazul crustaceelor de *Daphnia magna*, acestea au prezentat sensibilitate mai mare față de noii compuși evaluați; cu câteva excepții (pirolii **7**, **8**, **10** și **13**), toți compușii au avut procente semnificative de letalitate, cei mai toxici fiind pirolii **5**, **6**, **11** și **12** (CL₅₀=4,58 μM), iar dintre săruri, derivatul **2d** (CL₅₀=157,0 μM).

Pirolol[1,2-*b*]piridazinele și acizii intermediari au fost lipsiți de toxicitate în cazul naupliilor artemiilor. În schimb, nevertebratele din specia *Daphnia magna* au fost mai sensibile la acțiunea acestora, evidențiindu-se pirolol[1,2-*b*]piridazina **29** (CL₅₀=46,12 μM), iar dintre acizi, derivatul **27a** (CL₅₀=521 μM).

Evaluarea citotoxicității pe linii celulare tumorale

Evaluarea acțiunii citotoxice a noilor compuși heterociclici cu nucleu pirololic izolat **4-11** și **13**, a bromurilor precursore **2a,d**, a pirolol[1,2-*b*]piridazinelor **29-31**, **33**, **34**, acizilor intermediari **27a-c** și a piroliliden-azepinei **42** pe cele trei linii celulare umane tumorale LoVo, MCF-7, SK-OV-3 și pe celulele endoteliale normale HUVEC s-a realizat comparativ cu medicamentele 5-fluorouracil (5-FU) și cisplatină (Cis-Pt) [45, 48].

Rezultatele obținute prin investigarea acțiunii citotoxice a derivaților cu nucleu pirololic izolat **4-11** și **13** și a bromurilor precursore **2a,d** pe linia celulară de adenocarcinom uman de colon (LoVo) au indicat că aceștia prezintă efect citotoxic dependent de concentrație și de timpul de expunere. Astfel, dacă la concentrația de 400 μM și la 24 ore, toți compușii au scăzut viabilitatea celulară sub 70%, la 48 ore acestea fiind sub 55%. Dintre compușii testați, cele mai scăzute valori ale viabilității celulare, le-a prezentat noul pirol **13** (3,93% – 400 μM) care conține în moleculă un fragment benzilamino și două grupe metil pe nucleul benzenic legat de atomul de azot și un radical 4-etiloxicarbonil, valori mai scăzute (19,06-61,79%) la concentrațiile 200-25 μM, la 24 ore, decât medicamentele 5-FU (39,27-76,22%) și Cis-Pt (54,95-76,03%). În schimb, la 48 ore, efectul citotoxic al acestuia a fost mai slab comparativ cu referințele. Dintre compușii testați s-au mai evidențiat, la concentrațiile cele mai mari, în special la 400 μM, și derivatul pirololic **4** (24,02%), urmat de omologii **9** (31,18 %) și **11** (30,72%) (Fig.7.1.).

În cazul liniei celulare MCF-7, cel mai bun efect inhibitor al proliferării celulare l-a prezentat derivatul pirololic **13** (16,67% - 400 μM), având procente de viabilitate celulară (41,92-85,23%), la 24 ore, mai mici decât ale medicamentului 5-FU (45,47-90,65%) în intervalul de concentrații 200-12,5 μM. Un alt compus cu o acțiune mai pronunțată a fost și derivatul **10** care conține fragmentele benzilamino și benzoil (23,54% – 400 μM). Alți compuși

care au prezentat viabilitatea celulară sub 70% la 400 μM au fost pirolii **5-9**. Spre deosebire de aceștia, derivatul **11** a avut un efect stimulator al proliferării celulare la primele concentrații testate (Fig. 7.2.). La 48 ore, același derivat **13**, urmat de **10**, au prezentat efect citotoxic la concentrațiile 400 μM (12,82% și 15,12%) și 200 μM (44,77% și 52,07%).

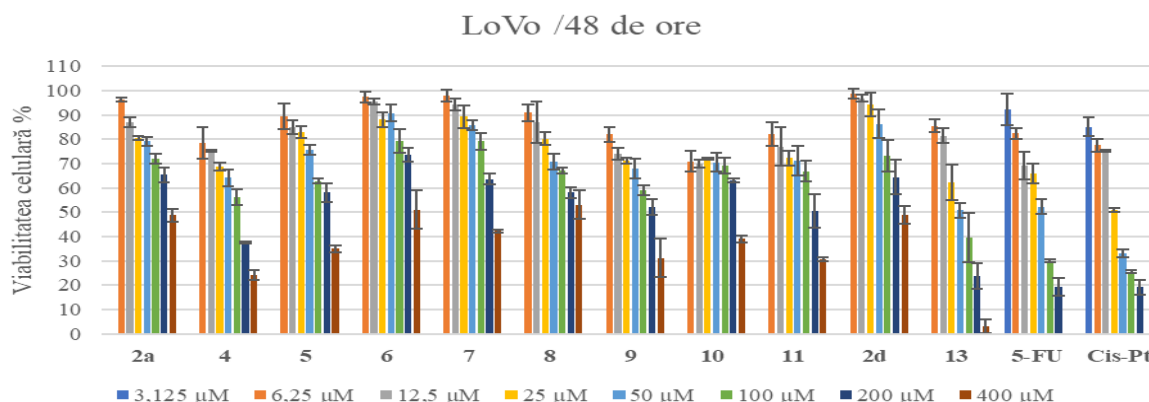


Figura 7.1. Viabilitatea celulară (exprimată în procente) a celulelor LoVo tratate cu pirolonii **4-11, 13**, sărurile intermediare **2a,d** și cu referințele la 48 ore

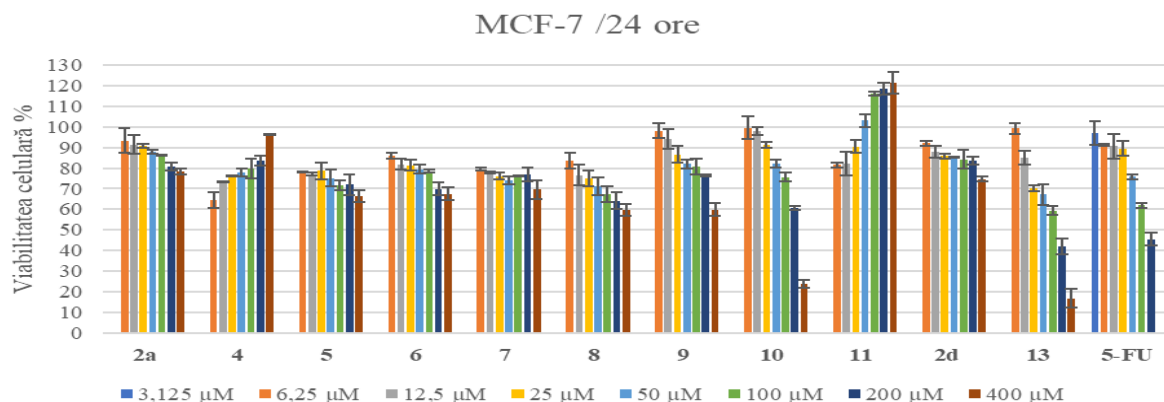


Figura 7.2. Viabilitatea celulară (exprimată în procente) a celulelor MCF-7 tratate cu pirolonii **4-11, 13**, sărurile intermediare **2a,d** și cu referința la 24 ore

Pe linia celulară SK-OV-3, la 24 ore, cele mai scăzute valori ale viabilităților celulare, în intervalul 400-25 μM , le-a prezentat tot pirolul **13** (35,27-80,27%), urmat de omologul **10** (54,93-81,88%), primul având efect comparabil cu Cis-Pt la concentrațiile 200-6,25 μM . În schimb, la 48 ore cele mai mici valori ale viabilității celulare le-a avut pirolul **10** în intervalul 400-25 μM , efectul citotoxic fiind mult mai scăzut decât al referinței. Și în cazul acestei linii celulare s-a înregistrat un efect stimulator al proliferării celulare când au fost tratate cu pirolul **8**

sau **11**, atât la 24 ore cât și la 48 ore, la cele mai mari concentrații. Rezultatele evaluării citotoxicității pe celulele HUVEC au indicat că derivații cu nucleu pirolic izolat și precursorii corespunzători testați au fost lipsiți de toxicitate, prezentând valori ale viabilităților peste 80%, cu excepția pirolului **13** la 24 ore, la concentrațiile 400 μM (55,10%) și 200 μM (71,80%) și la 48 ore la 400-25 μM (29,01-79,43%) și a pirolului **10** numai la 48 ore la 400 μM (60,41%).

Efectul citotoxic al pirolo[1,2-*b*]piridazinelor **29-31**, **33** și **34** și al acizilor **27a-c** a fost mai scăzut decât al compușilor cu nucleu pirolic izolat. Efectul antiproliferativ pe linia celulară tumorală LoVo la 24 ore a indicat că derivații **27a,c** și pirolo[1,2-*b*]piridazinele **29**, **31**, **34** au prezentat viabilități celulare sub 80% la cea mai mare concentrație. La 48 ore și la cea mai mare concentrație, compușii testați, cu excepția acidului **27b**, au prezentat valori ale viabilităților celulare sub 70%, evidențiindu-se derivatul **34** (41,82%) care conține fragmentul etiloxicarbonil și un atom de clor și omologul **29** (48,47%) cu un fragment metiloxicarbonil (Fig. 7.3.).

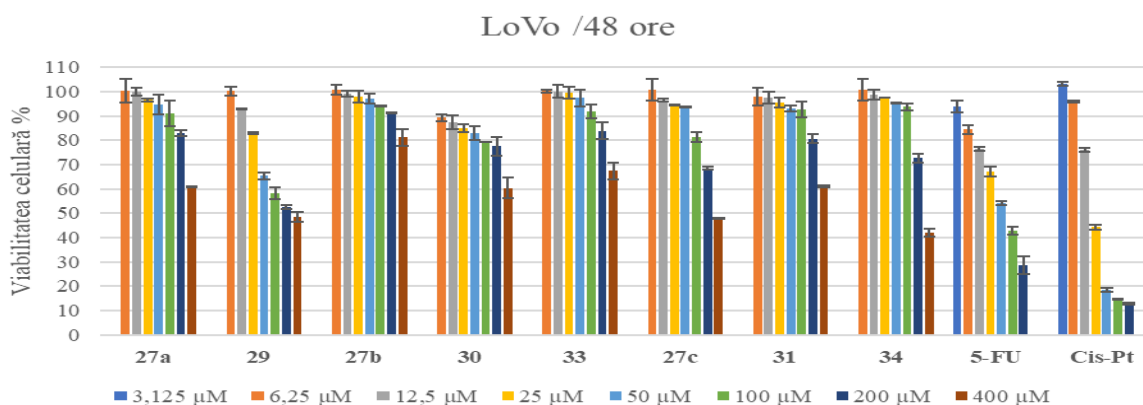


Figura 7.3. Viabilitatea celulară (exprimată în procente) a celulelor LoVo tratate cu pirolo[1,2-*b*]piridazinele **29-31**, **33**, **34**, acizii intermediari **27a-c** și cu referințele la 48 ore

A acțiunea citotoxică a acestora a fost și mai redusă pe liniile celulare MCF-7 și SK-OV-3, valorile cele mai scăzute ale viabilității celulare fiind observate la 400 μM și la 48 ore în cazul celor tratate cu pirolo[1,2-*b*]piridazinele care au greșit atomul de fluor în moleculă, compusul **33** pentru celulele MCF-7 (73,13%) și compusul **30** pentru celulele SK-OV-3 (79,76%). Prin tratarea celulelor HUVEC cu acești compuși, s-a observat absența efectului citotoxic, valorile viabilităților, la ambele intervale de timp, fiind mai mari de 90%. Și în cazul piroliliden-azepinei **42** cele mai scăzute valori ale viabilităților celulare (28,79%) s-au obținut pe linia celulară LoVo, la 48 ore și la 400 μM .

Capitolul 8. Concluzii și contribuții personale

Sinteza unor noi compuși heterociclici reprezintă una dintre cele mai sigure modalități de descoperire a unor noi molecule cu acțiune biologică, cunoscându-se că un procent foarte mare din numărul total de medicamente conțin în moleculă un nucleu heterociclic, cel mai adesea cu cel puțin un atom de azot ca heteroatom. Obiectivul general al acestui studiu a fost sinteza și caracterizarea unor noi compuși heterociclici cu nucleu pirolic, în scopul identificării unor noi molecule cu posibilă acțiune terapeutică. În acest scop, o etapă importantă, preliminară, a constat în studiul literaturii de specialitate referitoare la chimia unor compuși heterociclici cu nucleu pirolic izolat și condensat din clasa pirolpiridazinelor, cu privire la sinteza, dar și la proprietățile biologice ale acestora, prezentate în partea generală a lucrării.

Pe baza acestora date, obiectivele urmărite în sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea efectului citotoxic al unor noi compuși heterociclici cu nucleu pirolic tri- sau tetrasubstituit și a unor compuși cu nucleu pirolic condensat din clasa pirol[1,2-*b*]piridazinelor le consider îndeplinite.

Sinteza noilor compuși cu nucleu pirolic izolat **4-19** a avut loc în două etape, prima etapă constând în obținerea bromurilor de benzimidazoliu **2a-e** prin reacția unor derivați de benzimidazol și bromoacetonitril, în acetonă, la reflux, două dintre acestea, **2d** și **2e**, fiind necitate în literatură. În etapa următoare, prin tratarea sărurilor de benzimidazoliu cu diferite alchine dipolarofile (1-fenil-2-propin-1-onă, propiolat de metil, propiolat de etil, propiolat de izopropil, acetilendicarboxilat de dimetil, acetilendicarboxilat de dietil) în 1,2-epoxibutan, la reflux, timp de 48 ore, s-au obținut noii compuși pirollici tri- sau tetrasubstituiți **4-13** cu randamente moderate (35-60%). Un element de originalitate în această metodă de sinteză a constat în modificarea mediului de reacție prin adăugarea, alături de 1,2-epoxibutan și de acetonitril, în raport volumetric de 1:1, în cazul compușilor fluorurați **14-19**, diminuându-se substanțial timpul de reacție, la 6 ore, randamentele de reacție fiind ușor mărite, 46-61%. Reacția implică generarea *in situ* a unor *N*-ilide care, printr-o cicloadiție 1,3-dipolară cu alchinele dipolarofile, au condus în final la obținerea noilor compuși pirollici **4-19**. Prin introducerea de alchine nesimetrice (1-fenil-2-propin-1-onă, propiolat de metil, propiolat de etil, propiolat de izopropil) s-au obținut compușii pirollici **4-7** și **10-17** substituiți în poziția 4 cu radicalul alchiloxycarbonil și nu în poziția 5, indicând astfel regioselectivitatea reacției (capitolul 4).

Noii compuși cu nucleu pirolic condensat, pirolo[1,2-*b*]piridazinele **29-34**, au fost sintetizați din acizii piridazinonici **27a-c** cu alchine dipolarofile nesimetrice (propiolat de metil sau de etil), în anhidridă acetică, la 90 °C, cu randamente de 41-52%. Reacția a fost regioselectivă, cu obținerea pirolo[1,2-*b*]piridazinelor **29-34** substituie în poziția 5 și nu 6, având loc prin generarea *in situ* a unor oxazolone mezoionice. Alegerea alchinelor nesimetrice și identificarea regioselectivității reacției reprezintă o noutate în domeniu, contribuție însemnată în sinteza și mecanismele de reacție. Precursorii acizi **27a-c** au fost obținuți prin hidroliza esterilor corespunzători **26a-c**, aceștia din urmă fiind sintetizați în patru etape succesive, pornind de la benzen sau derivați halogenați ai acestuia cu anhidrida succinică printr-o reacție de acilare Friedel-Crafts, urmată de reacția cu hidrat de hidrazină, apoi dehidrogenare și, în final de alchilare cu esterul etilic al acidului 2-bromo-butanoic (capitolul 5).

Confirmarea structurală a noilor compuși s-a realizat prin analiză elementală, metode spectrale IR, ¹H-RMN și ¹³C-RMN și în cazul unora dintre aceștia prin difracție de raze X. Rezultatele au confirmat structurile propuse și au evidențiat caracterul regioselectiv al reacției de cicloadiție 1,3-dipolară.

Având în vedere importanța nucleului pirolic condensat, un capitol distinct al acestei teze l-a constituit reinvestigarea structurii unui compus bisazepinic obținut prin sinteza Nenițescu, prin reacția *p*-benzochinonei cu 3-aminocinamatul de etil, în mediu de *n*-butanol [37]. Prin analizarea structurii prin difracție de raze X s-a identificat un nou compus cu structură piroliliden-azepinică, cele două nuclee fiind legate printr-o dublă legătură C=C. Obținerea unui astfel de compus cu structură piroliliden-azepinică prin reacția Nenițescu nu a mai fost raportată în literatură, fiind un aport însemnat adus cercetării științifice din domeniu (capitolul 6).

În scopul identificării unor noi molecule cu potențial biologic, noii compuși heterociclici pirolici **4-13**, pirolo[1,2-*b*]piridazinele **29-31**, **33**, **34**, piroliliden-azepina **42** și precursorii **2a-d**, **27a-c** au fost testați privind citotoxicitatea *in vivo* și/sau *in vitro*. Studiile de citotoxicitate *in vivo* ale compușilor s-au realizat pe celula vegetală de *Titicum aestivum* L. și pe două crustacee *Artemia franciscana* Kellogg și *Daphnia magna* Straus, iar cele *in vitro* pe trei linii celulare derivate din adenocarcinoame umane de colon (LoVo), sân (MCF-7) și ovar (SK-OV-3) și pe celulele normale derivate din endoteliul venei ombilicale HUVEC, utilizate pentru control.

Rezultatele obținute prin evaluarea citotoxicității compușilor testați pe celula vegetală, în domeniul de concentrații 1000-10 μM, au indicat că aceștia prezintă toxicitate, în general,

scăzută. Dintre derivații pirolici, cei trisubstituiți **12** (69,5%), **13** (60,6%), **10** (44,0%) și **5** (29,7%) au prezentat, cele mai mari procente de inhibiție ale alungirii radiculare la 72 ore, la 1000 μM . În cazul pirolo[1,2-*b*]piridazinelor, s-a evidențiat derivatul **33** care conține un atom de fluor, cu valori ale inhibiției alungirii radiculare de 98,3%-36,5% la 72 ore, în domeniul de concentrații utilizate. Rezultatele observate macroscopic au fost susținute de observațiile microscopice, vizualizându-se diferite modificări ale filmului mitotic sau ale unor structuri celulare.

Prin evaluarea citotoxicității compușilor testați pe celula animală, pe crustaceele *Artemia franciscana* Kellogg s-a constatat că aceștia au fost în general lipsiți de toxicitate, cu excepția pirolului **12** care conține în moleculă un fragment benzilamino și două grupe metil pe nucleul benzenic legat de atomul de azot și un radical 4-metiloxicarbonil și a bromurii de benzimidazoliu precursoră **2d** care, la 48 ore au indus letalitate, cu valori CL_{25} de 168,8 μM și, respectiv, 793,2 μM . În schimb, crustaceele de *Daphnia magna* Straus au fost mai sensibile la acțiunea compușilor testați, rezultatele indicând că cei mai toxici au fost pirolii **5**, **6**, **11** și **12**, iar dintre săruri derivatul **2d**, valorile CL_{50} , la 24 ore, care au fost calculate pentru ultimii doi derivați fiind de 4,58 μM și, respectiv, 157,0 μM . Compușii cu nucleu pirolic condensat nu au prezentat toxicitate față de nauplii artemiilor, în schimb, dafnidele au fost mai sensibile la acțiunea acestora, evidențiindu-se pirolo[1,2-*b*]piridazina **29** și acidul precursor corespunzător, **27a** care, la 48 ore, au prezentat valori ale CL_{50} de 46,12 μM și, respectiv, 521,3 μM .

Screeningul potențialului antitumoral al noilor compuși prin determinarea viabilității celulelor tumorale prin metoda colorimetrică MTS, a indicat că aceștia au prezentat efect citotoxic dependent de doză și de timp, cel mai pronunțat fiind pe linia celulară LoVo. Dintre derivații cu nucleu pirolic izolat, compusul **13**, omolog cu pirolul **12**, care conține în moleculă un fragment benzilamino și două grupe metil pe nucleul benzenic legat de atomul de azot și un radical 4-etiloxicarbonil, s-a remarcat cu efectul antitumoral cel mai pronunțat pe toate liniile celulare tumorale luate în studiu. Cel mai scăzut procent al viabilității a fost observat pe linia celulară LoVo, la concentrația 400 μM (3,93%), valori chiar mai mici (19,06-61,79%) decât ale medicamentelor luate ca referință, 5-FU (39,27-76,22%) și Cis-Pt (54,95-76,03%), în intervalul de concentrații 200 μM -25 μM și la 24 ore. Același compus a prezentat efect citotoxic mai intens decât referința 5-FU și pe linia celulară MCF-7, tot la 24 ore, dar procente de viabilitate celulară au fost mai mari decât pe LoVo. Evaluarea efectului citotoxic pe celulele endoteliale HUVEC au indicat absența toxicității compușilor testați, cu excepția aceluiași compus **13** care

a prezentat procente de viabilitate celulară sub 80% atât la 24 ore la primele două concentrații (400 μ M – 55,10 %, 200 μ M – 71,80 %), cât și la 48 ore în intervalul de concentrații 400-25 μ M (29,01%-79,43%). Rezultatele obținute în cazul compușilor cu nucleu pirolitic condensat au indicat un efect inhibitor al proliferării celulare mai slab decât cei cu nucleu pirolitic izolat. Cele mai mici valori ale viabilității celulare au fost obținute tot pe linia celulară LoVo, fiind lipsiți de citotoxicitate pe celulele HUVEC. Dintre acești compuși, pirol[1,2-*b*]piridazina **34** care conține un atom de clor și o grupă etiloxicarbonil a prezentat un efect citotoxic mai pronunțat pe linia celulară LoVo, la 48 ore, procentul de viabilitate celulară la 400 μ M fiind de 41,82%, dar mai mare decât cele date de medicamentele de referință. Și în cazul piroliliden-azepinei efectul citotoxic cel mai pronunțat a fost pe linia celulară LoVo, cel mai mic procent de viabilitate celulară la 48 ore și la 400 μ M fiind de 28,79%, efect mai scăzut însă comparativ cu aceleași referințe, încurajator fiind absența citotoxicității pe celulele normale (capitolul 7).

Originalitatea acestei lucrări constă în sinteza unui număr de 23 de noi compuși heterociclici cu nucleu pirolitic, 16 cu nucleu pirolitic tri- sau tetrasubstituit și 6 cu nucleu pirolitic condensat din clasa pirol[1,2-*b*]piridazinelor, o piroliliden-azepină, necitată în literatură, dar și a 8 noi precursori, 2 săruri de benzimidazoliu, 3 esteri piridazinonici și 3 acizi piridazinonici care au fost caracterizați complet din punct de vedere fizico-chimic, cu structura confirmată prin analiză elementală, prin metode spectrale IR, ^1H -RMN și ^{13}C -RMN, iar în cazul unora și prin difracție de raze X.

Rezultatele obținute în urma evaluării citotoxicității noilor compuși obținuți au permis identificarea potențialului antitumoral al unor noi molecule, deschizând perspective de cercetare în domeniul medical.

Pe baza acestor rezultate, ne propunem următoarele perspective de continuare a acestor studii: evaluarea acțiunii antimicrobiene a noilor compuși sintetizați, evaluarea toxicității acute, a acțiunii analgezice și antiinflamatoare pe model murin, continuarea evaluării acțiunii antitumorale a compușilor sintetizați și pe alte linii celulare tumorale, evaluarea ciclului celular, modularea potențială a apoptozei, dar și sinteza unor noi compuși din aceste clase cu randamente îmbunătățite prin modificarea condițiilor de reacție și prin grefarea unor noi substituenți ca promițători centri farmacofori care să potențeze acțiunea biologică în general și în special cea antitumorală, cu capacitatea de diferențiere între celulele tumorale și normale.

Bibliografie selectivă

1. Jampilek J. Heterocycles in medicinal chemistry. *Molecules*, 24, 3839, 2019.
2. Heravi MM, Zadsirjan V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: An overview. *RSC Adv.*, 10, 44247-44311, 2020.
3. Li Petri G, Spano V, Spatola R, Holl R, Raimondi MV, Barraja P, Montalbano A. Bioactive pyrrole-based compounds with target selectivity. *Eur. J. Med. Chem.*, 208, 112783, 2020.
4. Jeelan Basha N, Basavarajaiiah SM, Shyamsunder K. Therapeutic potential of pyrrole and pyrrolidine analogs: An update. *Mol. Divers.*, 26, 2915-2937, 2022.
5. Ahmad S, Alam O, Naim MJ, Shaquiquzzaman M, Alam MM, Iqbal M. Pyrrole: An insight into recent pharmacological advances with structure activity relationship. *Eur. J. Med. Chem.*, 157, 527-561, 2018.
6. Domagala A, Jarosz T, Lapkowski M. Living on pyrrolic foundations—Advances in natural and artificial bioactive pyrrole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 100, 176-187, 2015.
7. Tzankova D, Vladimirova S, Peikova L, Georgieva M. Synthesis of pyrrole and substituted pyrroles (Review). *J. Chem. Technol. Metall.*, 3, 451-464, 2018.
8. Bhardwaj V, Gumber D, Abbot V, Dhiman S, Sharma P. Pyrrole: A resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. *RSC Adv.*, 5, 15233-15266, 2015.
9. Mousavi H. A concise and focused overview upon arylglyoxal monohydrates-based one-pot multi-component synthesis of fascinating potentially biologically active pyridazines. *J. Mol. Struct.*, 1251, 131742, 2022.
10. Daoui S, Direkel S, Ibrahim MM, Tüzün B, Chelfi T, Al-Ghorbani M, Bouatia M, Karbane ME, Doukkali A, Benchat N, Karrouchi K. Synthesis, spectroscopic characterization, antibacterial activity, and computational studies of novel pyridazinone derivatives. *Molecules*, 28, 678, 2023.
11. He ZX, Gong YP, Zhang X, Ma LY, Zhao W. Pyridazine as a privileged structure: an updated review on anticancer activity of pyridazine containing bioactive molecules. *Eur. J. Med. Chem.*, 209, 112946, 2021.
12. Dubey S, Bhosle PA. Pyridazinone: An important element of pharmacophore possessing broad spectrum of activity. *Med. Chem. Res.*, 24, 3579-3598, 2015.

13. Akhtar W, Shaquiquzzaman M, Akhter M, Verma G, Khan MF, Alam MM. The therapeutic journey of pyridazinone. *Eur. J. Med. Chem.*, 123, 256-281, 2016.
14. Singh J, Kumar V, Silakari P, Kumar S. Pyridazinones: A versatile scaffold in the development of potential target-based novel anticancer agents. *J. Heterocycl. Chem.*, 60, 929-949, 2023.
15. Hassan MSA, Ahmed EM, El-Malah AA, Kassab AE. Anti-inflammatory activity of pyridazinones: A review. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 355, e2200067, 2022.
16. Cantini N, Schepetkin IA, Danilenko NV, Khlebnikov AI., Crocetti L, Giovannoni MP, Kirpotina LN, Quinn MT. Pyridazinones and structurally related derivatives with anti-inflammatory activity. *Molecules*, 27, 3749, 2022.
17. Popovici L, Amarandi RM, Mangalagiu II, Mangalagiu V, Danac R. Synthesis, molecular modelling and anticancer evaluation of new pyrrolo[1,2-*b*]pyridazine and pyrrolo[2,1-*a*]phthalazine derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 34, 230-243, 2019.
18. Xiang HY, Chen JY, Huan XJ, Chen Y, Gao Z, Ding J, Miao ZH, Yang CH. Identification of 2-substituted pyrrolo[1,2-*b*]pyridazine derivatives as new PARP-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 31, 127710, 2021.
19. Chen Z, Kim SH, Barbosa SA, Huynh T, Tortolani DR, Leavitt KJ, Wei DD, Manne V, Ricca CS, Gullo-Brown J, Poss MA, Vaccaro W, Salvati ME. Pyrrolopyridazine MEK inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 628-632, 2006.
20. Butnariu RM, Mangalagiu II. New pyridazine derivatives: Synthesis, chemistry and biological activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 2823-2829, 2009.
21. Duan JJW, Lu Z, Jiang B, Yang BV, Doweiko LM, Nirschl DS, Haque LE, Lin S, Brown G, Hynes J, Tokarski JS, Sack JS, Khan J, Lippy JS, Zhang RF, Pitt S, Shen G, Pitts WJ, Carter PH, Barrish JC, Nadler SG, Salter-Cid LM, McKinnon M, Fura A, Schieven GL, Wroblewski ST. Discovery of pyrrolo[1,2-*b*]pyridazine-3-carboxamides as Janus kinase (JAK) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5721-5726, 2014.
22. Hynes J, Wu H, Kempson J, Duan JJW, Lu Z, Jiang B, Stachura S, Tokarski JS, Sack JS, Khan JA, Lippy JS, Zhang RF, Pitt S, Shen G, Gillooly K, McIntyre K, Carter PH, Barrish JC, Nadler SG, Salter-Cid LM, Fura A, Schieven GL, Pitts WJ, Wroblewski ST. Discovery of potent and efficacious pyrrolopyridazines as dual JAK1/3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 3101-3106, 2017.

23. Spergel SH, Mertzman ME, Kempson J, Guo J, Stachura S, Haque L, Lippy JS, Zhang RF, Galella M, Pitt S, Shen G, Fura A, Gillooly K, McIntyre KW, Tang V, Tokarski J, Sack JS, Khan J, Carter PH, Barrish JC, Nadler SG, Salter-Cid LM, Schieven GL, Wroblewski ST, Pitts WJ. Discovery of a JAK1/3 inhibitor and use of a prodrug to demonstrate efficacy in a model of rheumatoid arthritis. *ACS Med. Chem. Lett.*, 10, 306-311, 2019.
24. Fox BM, Iio K, Li K, Choi R, Inaba T, Jackson S, Sagawa S, Shan B, Tanaka M, Yoshida A, Kayser F. Discovery of pyrrolopyridazines as novel DGAT1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 6030-6033, 2010.
25. Saito T, Obitsu T, Kohno H, Sugimoto I, Matsushita T, Nishiyama T, Hirota T, Takeda H, Matsumura N, Ueno S, Kishi A, Kagamiishi Y, Nakai H, Takaoka Y. Pyrrolo[1,2-*b*]pyridazines, pyrrolo[2,1-*f*]triazin-4(3*H*)-ones, and related compounds as novel corticotropin-releasing factor 1 (CRF1) receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 1122-1138, 2012.
26. Vasilescu M, Bandula R, Cramariuc O, Hukka T, Lemmetyinen H, Rantala TT, Dumitrascu F. Optical spectroscopic characteristics and TD-DFT calculations of new pyrrolo[1,2-*b*]pyridazine derivatives. *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 194, 308-317, 2008.
27. Zbancioc G, Mangalagiu II. Pyrrolopyridazine derivatives as blue organic luminophores: synthesis and properties. Part 2. *Tetrahedron*, 66, 278-282, 2010.
28. Ahmed SA, Hozien ZA, Abdel-Wahab AMA, Al-Raqa SY, Al-Simaree AA, Moussa Z, Al-Amri SN, Messali M, Soliman AS, Durr H. Photochromism of dihydroindolizines. Part 16: Tuning of the photophysical behavior of photochromic dihydroindolizines in solution and in polymeric thin film. *Tetrahedron*, 67, 7173-7184, 2011.
29. Ahmed SA, Khairou KS, Abdel-Wahab AMA, Hozien ZA, Durr H. Photochromism of dihydroindolizines. Part XVIII: Palladium-catalyzed negishi coupling for the synthesis of photochromic dihydro 5-azaindolizine-linker-conjugates with a terminal ethylene anchoring group. *Tetrahedron Lett.*, 53, 4397-4401, 2012.
30. Maftai D, Zbancioc G, Humelnicu I, Mangalagiu I. Conformational effects on the lowest excited states of benzoyl-pyrrolopyridazine: Insights from PCM time-dependent DFT. *J. Phys. Chem. A*, 117, 3165-3175, 2013.
31. Fernando A, Shrestha TB, Liu Y, Malalasekera AP, Yu J, McLaurin EJ, Turro C, Bossmann SH, Aikens CM. Insights from theory and experiment on the photochromic spiro - dihydro-pyrrolo-pyridazine/betaine system. *J. Phys. Chem. A*, 120, 875-883, 2016.

32. Ahmed SA, El Guesmi N, Asghar BH, Maurel F, Althagafi II, Khairou KS, Muathen HA. Photochromism of dihydroindolizines Part XIX. Efficient one-pot solid-state synthesis, kinetic, and computational studies based on dihydroindolizine photochromes: synthesis, kinetic and computational studies based on DHI photochromes. *J. Phys. Org. Chem.*, 30, e3614, 2017.
33. El Guesmi N, Ahmed SA, Althagafi II, Khairou KS. Photochromism of dihydroindolizines. Part XXI: Multiaddressable photochromic performances based on pyrrolo[1,2-*b*]pyridazine photochromes: Kinetics, substituent effect and solvatochromism. *J. Photochem. Photobiol. A*, 346, 287-295, 2017.
34. Sravanthi TV, Manju SL. Indoles-A promising scaffold for drug development. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 91, 1-10, 2016.
35. Chadha N, Silakari O. Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. *Eur. J. Med. Chem.*, 134, 159-184, 2017.
36. Mahmoud E, Hayallah AM, Kovacic S, Abdelhamid D, Abdel-Aziz M. Recent progress in biologically active indole hybrids: A mini review. *Pharmacol. Rep.*, 74, 570-582, 2022.
37. Palaghita M, Raileanu D. Nenitzescu synthesis of 5-hydroxyindoles. III A diazaheptalenedione from 3-aminocinnamic ester. *Rev. Roum. Chim.*, 33, 953-967, 1988.
38. Dumitrescu D, Georgescu E, Caira MR, Draghici C, Dumitrascu F. A new synthesis of pyrroles from benzimidazolium *N*-cyanomethyl ylides and alkyne dipolarophiles. *Synlett*, 28, 2241-2246, 2017.
39. Dumitrascu F, Caira M, Draghici B, Caproiu M, Dumitrescu D. A novel approach for the synthesis of highly fluorescent pyrrolo[1,2-*b*]pyridazines. *Synlett*, 813-816, 2008.
40. Caproiu MT, Dumitrascu F, Caira MR. New pyrrolo[1,2-*b*]pyridazine derivatives by 1,3-dipolar cycloaddition of mesoionic oxazolopyridazinone. *Rev. Chim.*, 59, 1242-1244, 2008.
41. Breugst M, Reissig HU. The Huisgen reaction: Milestones of the 1,3-dipolar cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59, 12293-12307, 2020.
42. Amariuca-Mantu D, Mangalagiu V, Mangalagiu II. [3 + n] Cycloaddition reactions: A milestone approach for elaborating pyridazine of potential interest in medicinal chemistry and optoelectronics. *Molecules*, 26, 3359, 2021.
43. Zhang XC, Huang WY. Reaction of 1-alkylbenzimidazolium 3-ylides with ethyl 2,2-dihydropolyfluoroalkanoates. *Tetrahedron*, 54, 12465-12474, 1998.

44. Macsim AM, Georgescu E, Georgescu F, Filip P, Nicolescu A, Deleanu C. Benzimidazolium salts as starting materials or intermediates in 1,3-dipolar cycloadditions. *Monatsh. Chem.*, 152, 845-852, 2021.
45. **Ivan BC**, Barbuceanu SF, Hotnog CM, Anghel AI, Ancuceanu RV, Mihaila MA, Brasoveanu LI, Shova S, Draghici C, Olaru OT, Nitulescu GM, Dinu M, Dumitrascu F. New pyrrole derivatives as promising biological agents: design, synthesis, characterization, in silico, and cytotoxicity evaluation. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 8854, 2022.
46. Dumitrascu F, Georgescu E, Caira MR, Draghici C, Georgescu F, Popa MM, Barbuceanu SF, **Ivan BC**. The transformation of benzimidazoles into fluorinated pyrroles via cycloaddition reactions of benzimidazolium N-ylides. *Rev. Roum. Chim.*, 67, 43-50, 2022.
47. **Ivan BC**, Dumitrascu F, Anghel AI, Ancuceanu RV, Shova S, Dumitrescu D, Draghici C, Olaru O., Nitulescu GM, Dinu M, Barbuceanu SF. Synthesis and toxicity evaluation of new pyrroles obtained by the reaction of activated alkynes with 1-methyl-3-(cyanomethyl) benzimidazolium bromide. *Molecules*, 26, 6435, 2021.
48. **Ivan BC**, Barbuceanu SF, Hotnog CM, Olaru OT, Anghel AI, Ancuceanu RV, Mihaila MA, Brasoveanu LI, Shova S, Draghici C, Nitulescu GM, Dumitrascu F. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of new pyrrolo[1,2-*b*]pyridazines obtained via mesoionic oxazolopyridazinones. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 11642, 2023.
49. **Ivan BC**, Caira MR, Dumitrascu F. Nenitzescu indole synthesis: 1929-2019 Unexpected formation of a pyrrole-azepine hybrid in the Nenitzescu indole synthesis: A reinvestigation. *Rev. Chim.*, 71, 51-57, 2020.

Lista cu lucrările științifice publicate, participări la conferințe și proiecte

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Ivan BC**, Barbuceanu SF, Hotnog CM, Olaru OT, Anghel AI, Ancuceanu RV, Mihaila MA, Brasoveanu LI, Shova S, Draghici C, Nitulescu GM, Dumitrascu F. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of new pyrrolo[1,2-*b*]pyridazines obtained via mesoionic oxazolo-pyridazinones. *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (14), 11642, 2023. FI (2022)=5,6; <https://doi.org/10.3390/ijms241411642> (capitolele 5 și 7).
2. **Ivan BC**, Barbuceanu SF, Hotnog CM, Anghel AI, Ancuceanu RV, Mihaila MA, Brasoveanu LI, Shova S, Draghici C, Olaru OT, Nitulescu GM, Dinu M, Dumitrascu, F. New pyrrole derivatives as promising biological agents: design, synthesis, characterization, in silico, and cytotoxicity evaluation. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (16), 8854, 2022. FI (2022)=5,6; <https://doi.org/10.3390/ijms23168854> (capitolele 4 și 7).
3. Dumitrascu F, Georgescu E, Caira MR, Draghici C, Georgescu F, Popa MM, Barbuceanu SF, **Ivan BC**. The transformation of benzimidazoles into fluorinated pyrroles *via* cycloaddition reactions of benzimidazolium N-ylides. *Rev. Roum. Chim.*, 67 (1-2), 43-50, 2022. FI (2022)=0,5; <https://revroum.lew.ro/wp-content/uploads/2022/01/Art%2002.pdf> (capitolul 4).
4. **Ivan BC**, Dumitrascu F, Anghel AI, Ancuceanu RV, Shova S, Dumitrescu D, Draghici C, Olaru OT, Nitulescu GM, Dinu M, Barbuceanu SF. Synthesis and toxicity evaluation of new pyrroles obtained by the reaction of activated alkynes with 1-methyl-3-(cyanomethyl)benzimidazolium bromide. *Molecules*, 26 (21), 6435, 2021. FI (2021)=4,927; <https://doi.org/10.3390/molecules26216435> (capitolele 4 și 7).

Articole publicate în reviste cotate BDI

1. **Ivan BC**, Caira MR, Dumitrascu F. Nenitzescu indole synthesis: 1929-2019 unexpected formation of a pyrrole-azepine hybrid in the Nenitzescu indole synthesis: A reinvestigation. *Rev. Chim.*, 71 (5), 51-57, 2020; <https://doi.org/10.37358/RC.20.5.8112> (capitolul 6).

Participări la conferințe și congrese

1. **Ivan BC**, Dumitrașcu F, Drăghici C, Hotnog CM, Mihăilă MA, Brașoveanu LI, Shova S, Bărbuceanu ȘF. Synthesis of some new pyridazines derivatives with potential antitumoral activity. Congresul Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, Ediția a X-a, 10-12 Noiembrie 2022, prezentare orală (ID: 472), Secțiunea tânărului cercetător,

domeniul Farmacie, abstract publicat în *Maedica - a Journal of Clinical Medicine*, 2022, 17, Supplement, pg. 89, ISSN: 2501-6903.

2. **Ivan BC**, Dumitrașcu F, Ancuceanu RV, Anghel AI, Drăghici C, Barbuceanu ȘF. Synthesis and toxicity evaluation of some new pyrrole derivatives with potential biological activity. Congresul Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, Ediția a IX-a, 25-27 Noiembrie 2021, prezentare orală (ID: 377), Secțiunea tânărului cercetător, Premiul I la domeniul Farmacie, abstract publicat în *Maedica - a Journal of Clinical Medicine*, 2021, 16, Supplement, pg. 96, ISSN: 2501-6903.

3. **Ivan BC**, Dumitrașcu F, Anghel AI, Ancuceanu RV, Dumitrescu D, Drăghici C, Dinu M, Barbuceanu ȘF. Synthesis and toxicity evaluation of some new compounds from pyrrole class. Congresul Național de Farmacie, ediția a XVIII-a, 15-17 septembrie, 2021, e-poster (ID: 139), abstract publicat în culegerea de rezumate, pg. 29, I-SBN 978-606-10-2144-4.

Participări la proiecte

Student-doctorand în Proiectul „Net4SCIENCE: Rețea de cercetare doctorală și postdoctorală aplicativă în domeniile de specializare inteligentă Sănătate și Bioeconomie”, contract POCU/993/6/13/154722, în perioada decembrie 2022 – septembrie 2023. Proiectul a fost organizat de Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” din București, Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau” al Academiei Române fiind partenerul pentru desfășurarea stagiilor de practică.