

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

*Noi benzamide cu potențială
acțiune farmacologică*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. HABIL. LIMBAN CARMEN

Student-doctorand:

ROMAN ROXANA

2023

Cuprins

Lista cu lucrările științifice publicate	8
Lista cu abrevieri și simboluri.....	10
Introducere	12
I. Partea generală.....	14
1. Studii privind combaterea fenomenelor de rezistență prin dezvoltarea unor molecule noi.....	14
1.1. Recunoașterea rezistenței la antibiotice – o problemă de sănătate publică. Factori declanșatori	14
1.2. Evoluția de la celule planctonice către agregate sesile.....	15
1.3. Abordări sintetice pentru combaterea rezistenței la antibioticele existente	18
2. Instrumente de calcul folosite în dezvoltarea noilor compuși chimici	30
2.1. Descriptori moleculari.....	30
2.2. Studiile de andocare moleculară.....	34
II. Contribuții personale	39
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	39
4. Metodologia generală a cercetării.....	44
4.1. Evaluarea <i>in silico</i>	44
4.1.1. Descriptori moleculari.....	44
4.1.2. Andocarea moleculară – etape parcurse.....	46
4.2. Sinteza noilor compuși	48
4.3. Evaluarea <i>in vitro</i>	49
4.3.1. Activitatea antimicrobiană	49
4.3.2. Activitatea antibiofilm	49
4.3.3. Activitatea antioxidantă totală.....	49

4.3.4. Evaluarea citotoxicității.....	50
4.4. Sinteza nanoparticulelor	50
4.5. Evaluarea cantitativă prin cromatografie de lichide de înaltă performanță.....	50
4.5.1. Testarea sistemului cromatografic	50
4.5.2. Specificitatea.....	51
4.5.3. Limita de detecție și limita de cuantificare	51
4.5.4. Liniaritatea	51
4.5.5. Precizia.....	52
4.5.6. Acuratețea	52
4.5.7. Robustețea.....	52
5. Contribuție la proiectarea, sinteza, caracterizarea, separarea și cuantificarea unor noi derivați ai 2-((4-etilfenoxi)metil)-N-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei cu potențial antimicrobian și antioxidant	53
5.1. Introducere.....	53
5.2. Materiale și metode	54
5.2.1. Studii <i>in silico</i>	54
5.2.1.1. Descriptori moleculari	54
5.2.1.2. Pregătirea moleculelor pentru caracterizarea ADME-Tox	55
5.2.1.3. Evaluarea caracteristicilor care clasifică o entitate structurală ca potențială substanță activă.....	55
5.2.1.4. Profiluri farmacocinetice și farmacogenomice computaționale	55
5.2.1.5. Andocarea moleculară	55
5.2.2. Sinteza noilor compuși 1a – 1o	56
5.2.2.1. Prepararea acidului 2-(4-etilfenoximetil)benzoic	56
5.2.2.2. Prepararea clorurii acidului 2-(4-etilfenoximetil)benzoic	56
5.2.2.3. Procedura generală de sinteză a noilor compuși 1a – 1o	57

5.2.3. Caracterizarea noilor compuși 1a – 1o.....	57
5.2.3.1. Temperaturi de topire.....	57
5.2.3.2. Spectre în infraroșu.....	57
5.2.3.3. Spectre de rezonanță magnetică nucleară	57
5.2.3.4. Spectrele de masă	58
5.2.4. Evaluarea activității biologice a compușilor din seria I.....	58
5.2.4.1. Evaluarea activității antimicrobiene	58
5.2.4.2. Evaluarea activității antibiofilm	59
5.2.4.3. Evaluarea activității antioxidante totale.....	59
5.2.4.4. Testarea citotoxicității	59
5.2.5. Metoda analitică de separare a izomerilor clorurați prin tehnica RP-HPLC61	
5.2.5.1. Materiale și echipament.....	61
5.2.5.2. Condiții cromatografice	61
5.2.5.3. Prepararea fazei mobile	62
5.2.5.4. Prepararea probelor.....	62
5.3. Rezultatele studiilor efectuate pe compușii seriei I.....	64
5.3.1. Studii <i>in silico</i>	64
5.3.1.1. Descriptori moleculari	64
5.3.1.2. Profiluri farmacologice, farmacocinetice și farmacogenomice ale compușilor 1a – 1o	69
5.3.1.3. Studii de andocare moleculară, interacțiuni predictive ligand – receptor	73
5.3.1.3.1. Andocarea liganzilor în situsul activ al ADN-girazei din <i>Staphylococcus aureus</i>	73
5.3.1.3.2. Andocarea liganzilor în situsul activ al ADN-girazei din <i>Escherichia coli</i>	74

5.3.2. Sinteza noilor compuși 1a – 1o	76
5.3.3. Caracterizarea fizico-chimică a noilor compuși 1a – 1o.....	76
5.3.4. Evaluarea activității biologice a compușilor din seria I.....	78
5.3.4.1. Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene	78
5.3.4.2. Evaluarea cantitativă a activității antibiofilm	79
5.3.4.3. Evaluarea cantitativă a activității antioxidante	79
5.3.4.4. Testarea citotoxicității	80
5.3.5. Validarea metodei analitice de separare a izomerilor clorurați prin tehnica RP-HPLC.....	83
5.3.5.1. Testarea sistemului cromatografic	83
5.3.5.2. Specificitatea.....	85
5.3.5.3. Limita de detecție și limita de cuantificare.....	86
5.3.5.4. Liniaritatea	87
5.3.5.5. Precizia	87
5.3.5.6. Acuratețea	89
5.3.5.7. Robustețea.....	90
5.4. Discuții	90
6. Contribuție la proiectarea, sinteza, caracterizarea și cuantificarea unor noi derivați de 2-((4-metoxifenoxi)metil)- <i>N</i> -(heteroaril-carbamotioil)benzamidă cu potențial antimicrobian și antioxidant	96
6.1. Introducere.....	96
6.2. Materiale și metode	97
6.2.1. Aplicații ale chimiei computaționale în studiul noilor compuși 1a – 1g	97
6.2.2. Sinteza noilor compuși 1a – 1g.....	97
6.2.2.1. Prepararea acidului 2-(4-metoxifenoximetil)benzoic	98
6.2.2.2. Prepararea clorurii acidului 2-(4-metoxifenoximetil)benzoic	98

6.2.2.3. Procedura generală de sinteză a noilor compuși (1a – 1g)	98
6.2.2.4. Studiul de optimizare a sintezei compusului 1b	99
6.2.3. Caracterizarea fizico-chimică a noilor compuși 1a – 1g	99
6.2.3.1. Temperaturi de topire.....	99
6.2.3.2. Spectre în infraroșu.....	99
6.2.3.3. Spectre de rezonanță magnetică nucleară	99
6.2.3.4. Spectre de masă	100
6.2.4. Evaluarea activității biologice a compușilor din seria II.....	100
6.2.4.1. Evaluarea activității antimicrobiene	100
6.2.4.2. Evaluarea activității antibiofilm	101
6.2.4.3. Evaluarea activității antioxidante	101
6.2.4.4. Testarea citotoxicității	101
6.2.5. Metoda analitică de determinare cantitativă prin tehnica RP-HPLC	102
6.2.5.1. Materiale și echipament	102
6.2.5.2. Condiții cromatografice	103
6.2.5.3. Prepararea fazei mobile	103
6.2.5.4. Prepararea probelor.....	103
6.3. Rezultatele studiilor efectuate pe compușii seriei II	105
6.3.1. Studii <i>in silico</i>	105
6.3.1.1. Descriptori moleculari	105
6.3.1.2. Studii de andocare moleculară, interacțiuni predictive ligand - receptor	107
6.3.1.2.1. Andocarea liganzilor în situsul activ al ADN-girazei din <i>Escherichia coli</i>	107
6.3.1.2.2. Andocarea liganzilor în situsul activ al ADN-girazei din <i>Staphylococcus aureus</i>	109

6.3.2. Sinteza noilor compuși 1a – 1g	111
6.3.3. Caracterizarea fizico-chimică a noilor compuși 1a – 1g.....	113
6.3.4. Evaluarea activității biologice a compușilor din seria II.....	114
6.3.4.1. Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene	114
6.3.4.2. Evaluarea cantitativă a activității antibiofilm	114
6.3.4.3. Evaluarea cantitativă a activității antioxidante	116
6.3.4.4. Testarea citotoxicității	117
6.3.5. Metoda analitică de determinare cantitativă prin tehnica RP-HPLC	118
6.4. Discuții	124
7. Nanoparticule cu derivați ai 2-((4-etilfenoxi)metil)-N-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei.....	128
7.1. Importanța nanoparticulelor în medicina modernă.....	128
7.2. Materiale și metode	128
7.2.1. Sinteza nanomaterialelor	128
7.2.2. Încărcarea eșantioanelor	129
7.2.3. Caracterizarea noilor nanoparticule	130
7.2.3.1. Analiza Brunauer-Emmett-Teller	130
7.2.3.2. Spectroscopie FT-IR.....	130
7.2.3.3. Analiza termogravimetrică și calorimetria diferențială de scanare	130
7.2.3.4. Difracție de raze X.....	130
7.3. Rezultate și discuții	131
7.3.1. Caracterizarea noilor nanoparticule	131
7.3.1.1. Analiza Brunauer-Emmett-Teller	131
7.3.1.2. Spectroscopie FT-IR.....	132
7.3.1.3. Analiza termogravimetrică și calorimetria diferențială de scanare (TG-DSC)	132

7.3.1.4. Difrakție de raze X.....	133
8. Concluzii și contribuții personale	134
8.1. Concluzii	134
8.2. Contribuții personale	137
Bibliografie	139
Anexa 1. Predicții <i>in silico</i> , caracterizare și studii de andocare moleculară asupra noilor derivați ai benzamidei, 1a – 1o (seria I)	162
Anexa 2. Dovedirea structurii compușilor 1a – 1o, prin spectrometrie ¹ H-RMN și ¹³ C-RMN, spectroscopie IR și spectrometrie de masă.....	193
Anexa 3. Evaluarea citotoxicității compușilor 1a - 1o.....	224
Anexa 4. Predicții <i>in silico</i> , caracterizare și studii de andocare moleculară asupra noilor derivați ai benzamidei, 1a – 1g (seria II)	227
Anexa 5. Dovedirea structurii compușilor 1a – 1g, prin spectrometrie ¹ H-RMN și ¹³ C-RMN, spectroscopie IR și spectrometrie de masă.....	241
Anexa 6. Validarea metodei analitice de separare a izomerilor clorurați prin tehnica RP-HPLC (seria I). Cromatograme	254
Anexa 7. Validarea metodei analitice de determinare cantitativă prin tehnica RP-HPLC. Cromatograme (seria II)	322
Anexa 8. Caracterizarea nanoparticulelor obținute.....	398

Introducere

Dezvoltarea de noi agenți terapeutici, activi nu numai împotriva microorganismelor planctonice, dar și pe biofilme, reprezintă una dintre provocările fundamentale în chimia medicală [1, 2]. Sinteza facilă a benzamidelor a permis obținerea a numeroși derivați, mulți dintre ei fiind evaluați pentru acțiunea antimicrobiană.

Având în vedere aceste considerente și cu intenția de a continua eforturile în dezvoltarea de noi agenți antimicrobieni, prezenta lucrare descrie derularea a două studii de cercetare, care au ca punct de plecare comun strategia de a proiecta și sintetiza noi compuși bioactivi, ce conțin simultan doi farmacofori, și anume un fragment de *N*-acil-tiouree și un inel heterociclic (tiazol, benzotiazol, piridină sau pirimidină).

I. Partea generală

1. Studii privind combaterea fenomenelor de rezistență prin dezvoltarea unor molecule noi

Rezistența crescută, instalată la majoritatea claselor de agenți antimicrobieni, este recunoscută ca o confruntare globală în domeniul sănătății [3, 4], fiind o problemă de sănătate publică, la nivel mondial [5]. Patogeneza bacteriană concentrată pe infecțiile acute a fost dezbătută în numeroase cercetări științifice [6-8]. Alături de acestea, ultimele cercetări supun atenției afecțiunile cronice cauzate de bacterii în continuă evoluție, etalate sub formă de agregate cu aspect mucilaginos, cunoscute în general ca biofilme [9].

În literatura de specialitate au fost raportați derivați ai tioureei pentru multiplele lor activități biologice, inclusiv antibacteriană [10], antifungică [11], anticanceroasă [12], antioxidantă [13]. Derivații de tiouree sunt, de asemenea, intermediari versatili în sinteza compușilor heterociclici, cum ar fi 1,3-tiazoli, pirimidine, 1,2,4-triazine, 1,3-quinazoline [14].

Numeroase studii au raportat potențialul fragmentului de *N*-acil-tiouree, ca o componentă valoroasă în descoperirea de noi candidați antiinfecțioși [15].

2. Instrumente de calcul folosite în dezvoltarea noilor compuși chimici

Studiul de andocare este descris ca o metodă de calcul în care se prezice interacțiunea favorabilă între două molecule, dintre care o entitate se numește receptor și conține zonele de afinitate, care asigură și creează locuri de legare pentru cea de-a doua specie – ligandul [16].

Întrucât derivații de tiouree fac subiectul acestui proiect doctoral, am susținut cu date din literatură afinitățile dovedite *in silico* ale acestora față de tulpinile microbiene evaluate. Grupele N-H și C=S din fragmentul de tiouree acționează ca situsuri active de legare între liganzii nou studiați și receptorul proteic de pe suprafața microorganismului [17]. Prezența mai multor locuri de legare reactive (C=S, N-H, C=O) potențează activitatea biologică a moleculelor proiectate, prin sporirea posibilităților de interacțiune [18, 19]. Aceste aspecte sunt susținute și de faptul că situsurile de legare dintre un compus și suprafața receptorilor microorganismelor cresc odată cu creșterea numărului de fragmente de tiouree [20].

3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Lucrarea de cercetare cuprinde studiile *in silico*, sinteza, evaluarea antimicrobiană, antibiofilm și antioxidantă, pentru două serii de derivați ai *N*-acil-tioureei. Fiecare dintre cele două serii de compuși a fost proiectată plecând de la o structură de bază comună seriei.

În prima serie de compuși, s-au obținut 15 derivați ai 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei, necitați în literatura de specialitate.

Cea de-a doua serie conține 7 compuși, necitați în literatura de specialitate, care au în comun scheletul molecular 2-((4-metoxifenoxi)metil)-*N*-(heteroaril-carbamotioil)benzamidă.

În ansamblu, obiectivul este reprezentat de abordarea unor direcții de cercetare de actualitate, plecând de la dezvoltarea analogilor noi ai unor structuri care și-au demonstrat eficiența.

4. Metodologia generală a cercetării

Pentru fiecare serie de compuși, studiile *in silico* s-au desfășurat prin utilizarea a două instrumente computaționale: programele software (I) *Spartan 14* și (II) *CLC Drug Discovery Workbench 2.4*.

Pentru evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene a compușilor testați, s-a aplicat metoda standard de microdiluție în bulion, folosind următoarele microorganisme de testare: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Concentrațiile minime inhibitorii (CMI) s-au determinat prin cultivarea diferitelor diluții de bulion, pe plăci de agar Muller-Hinton.

Activitatea antibiofilm a compușilor a fost evaluată folosind metoda microtitrării, cu cristal violet.

Activitatea antioxidantă (AAT) totală a fost evaluată cu ajutorul testului DPPH. În acest scop, s-a utilizat un spectrofotometru UV-Vis UVD-3500.

Pentru realizarea testelor de citotoxicitate, am utilizat celule de adenocarcinom colorectal ileocecal HCT-8 (ATCC CCL-244), celule de adenocarcinom colorectal HT29 (ATCC HTB-38), celule de carcinom hepatocelular HepG2 (ATCC HB-8065) și celule de carcinom cervical HeLa (ATCC CCL-2). Viabilitatea celulelor după tratare cu noii derivați ai *N*-acil-tioureei a fost evaluată cu ajutorul colorantului diacetat de fluoresceină (FDA).

Caspaza-1 activată de noii derivați ai *N*-acil-tioureei a putut fi decelată prin testul Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay (Promega, Madison, WI, SUA).

Testul de hemoliză a fost efectuat în conformitate cu Lourenço et al. [21].

Evaluarea ciclului celular prin citometrie în flux s-a realizat după tratarea celulelor HCT 8 cu derivații *N*-acil-tioureei, prin reacția cu iodura de propidiu.

Pentru determinarea cantitativă și separarea compușilor care s-au evidențiat din fiecare serie, au fost dezvoltate și optimizate două metode analitice, prin tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță. Pentru determinare, s-a utilizat sistemul HPLC Waters Alliance, compus din următoarele module: Modul de separare 2695 + 2998, detector 998 PDA, PC echipat cu *Software Empower PDA*.

Patru compuși reprezentativi ai primei serii au fost încărcăți în trei tipuri de matrici (silicea mezoporoasă MCM-41, silicea mezoporoasă FDU-12 și magnetita). Nanomaterialele rezultate au fost analizate prin analiza Brunauer-Emmett-Teller, spectroscopie FT-IR, analiza termogravimetrică și calorimetria diferențială de scanare și difracție cu raze X.

5. Contribuție la proiectarea, sinteza, caracterizarea, separarea și cuantificarea unor noi derivați ai 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei cu potențial antimicrobian și antioxidant

Studiul a avut ca scop proiectarea, sintetizarea, caracterizarea și dezvoltarea unei metode de separare și cuantificare a unor noi derivați ai ai 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei, care încorporează un nucleu tiazolic sau piridinic.

În acest capitol au fost evaluați 15 compuși, prin determinarea unui cumul de descriptori moleculari (de exemplu aria, volumul, polarizabilitatea, log P, aria suprafeței polare), interconectați, în vederea elucidării și prezicerii comportamentului în organismul uman, pe baza structurii lor chimice. Întrucât tema centrală este reprezentată de obținerea unor derivați cu activitate antimicrobiană, am parcurs inițial studiile de andocare moleculară, pentru prezicerea potențialului antimicrobian față de proteinele țintă selectate. Privind rezultatele andocării, corelate cu grupul de interacțiune al co-cristalizațiilor tulpinilor *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, ligandul a luat conformații adecvate în situsul activ al receptorului proteic, formând legături de hidrogen cu restul aminoacizilor din proteina selectată. Conformația stabilită a fost apoi cuantificată într-un scor de andocare, descriind cea mai mare potrivire a moleculei studiate în situsul activ al receptorului.

Rezultatele obținute *in silico* au încurajat inițiativa sintezei derivaților 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei. Astfel, noii compuși au rezultat prin tratarea izotiocianatului de 2-((4-etilfenoxi)metil)benzoil cu o amină heterociclică. Izotiocianatul a fost obținut *in situ* prin reacția clorurii acidului 2-((4-etilfenoxi)metil)benzoic cu tiocianat de amoniu. Clorura acidului a fost preparată prin refluxarea acidului 2-((4-etilfenoxi)metil)benzoic cu clorură de tionil în mediu de 1,2-diclorețan anhidru. Acidul menționat a rezultat prin tratarea cu un acid mineral al sării de potasiu corespunzătoare, care la rândul ei a fost obținută din ftalidă și *p*-etilfenol.

Compușii rezultați au fost caracterizați prin determinarea temperaturilor de topire și evaluarea solubilității în diferiți solvenți, iar structura acestora a fost confirmată prin spectrometrie ¹H-RMN, ¹³C-RMN, spectroscopie în infraroșu și spectrometrie de masă (APCI+).

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a noilor molecule a fost evaluată pe tulpini bacteriene, care au dezvoltat rezistență față de antibioticele disponibile în prezent și au o capacitate ridicată de dezvoltare a biofilmului [22]. În mod specific, patru dintre compuși, 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-(tiazol-2-il-carbamotioil)benzamidă (**1a**), 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-((5-cloropiridin-2-il)carbamotioil)benzamidă (**1g**), 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-((2-cloropiridin-3-il)carbamotioil)benzamidă (**1h**) și 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-((3,5-dibromopiridin-2-il)carbamotioil)benzamidă (**1o**) au fost cei mai potenți inhibitori ai tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la concentrații minime inhibitorii de 625 μg/ mL. În urma testului împotriva aderenței bacteriene, compusul **1e** s-a remarcat prin concentrația cea mai mică de eradicare a biofilmului format de *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMEB = 312 μg/ mL).

Supuși testului DPPH, 13 compuși ai seriei I au înregistrat activitate antioxidantă. Din serie, compusul 2-((4-etilfenoxi)metil)-N-((2-cloropiridin-4-il)carbamotioil)benzamidă (**1i**) a avut cea mai mare capacitate de captare a radicalului liber, într-un procent de 87 % față de acidul ascorbic, utilizat ca antioxidant de referință, urmat de **1a** (44 %).

Compușii au fost supuși testului de citotoxicitate, efectuat pe celule de adenocarcinom HCT-8. Rezultatele analizei prin citometrie în flux ridică probabilitatea blocării fazei G0/G1 după un timp de contact prelungit cu derivații N-acil-tioureei.

În urma monitorizării celulare cu ajutorul sistemului automatizat Incucyte, nu s-a observat nicio diferență în ceea ce privește nivelurile de toxicitate pe liniile celulare testate pentru seria I. Prin determinarea nivelului de hemoliză indus la tratarea eritrocitelor cu derivați ai N-acil-tioureei din seria I, compușii testați s-au dovedit a fi non-hemolitici.

Pentru compușii clorurați izomeri, am dezvoltat o metodă de separare, prin intermediul cromatografiei de lichide de înaltă performanță, în fază inversă (RP-HPLC). Prin parcurgerea parametrilor de validare, în conformitate cu ghidurile ICH [23], metoda s-a dovedit a fi adecvată scopului propus, și anume separarea și cuantificarea izomerilor analizați.

6. Contribuție la proiectarea, sinteza, caracterizarea și cuantificarea unor noi derivați de 2-((4-metoxifenoxi)metil)-N-(heteroaril-carbamotioil)benzamidă cu potențial antimicrobian și antioxidant

Asemănător etapelor parcurse la evaluarea primei serii, am recurs la caracterizarea noilor compuși din seria 2-((4-metoxifenoxi)metil)-N-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei, prin abordări *in silico*. Descriptorii moleculari au descris natura compușilor și capacitatea acestora de a exercita un efect bioactiv. Prin studiile de andocare moleculară a fost posibilă prezicerea afinităților de legare între moleculele studiate și receptorii tulpinilor bacteriene *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. În consecință, datele *in silico* au furnizat mijloace pentru a explora afinitatea *in vitro* a moleculelor proiectate față de proteinele selectate.

Sinteza derivațiilor N-acil-tioureei din această serie, care conțin în structură fragmentul tiazol, benzo[d]tiazol, piridină sau pirimidină, s-a realizat asemănător studiului seriei I, anume condensarea clorurii acidului 2-(4-metoxifenoximetil)benzoic cu tiocianatul de amoniu în acetonă anhidră, urmată de reacția izotiocianatului rezultat cu o amină heterociclică. Deoarece randamentul de sinteză al compusului N-(benzo[d]tiazol-2-il-carbamotioil)-2-((4-metoxifenoxi)metil)benzamidă (**1b**) a fost scăzut, am

efectuat un studiu pentru a optimiza sinteza acestuia. În acest scop, am utilizat un catalizator cu transfer de fază, bromura de tetra-*n*-butilamoniu (TBAB). Astfel, randamentul s-a îmbunătățit la 76 %, comparativ cu randamentul de 41 % al reacției efectuate fără catalizator.

Structurile compușilor sintetizați au fost dovedite prin spectrometrie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), rezonanță magnetică nucleară (RMN) și spectrometrie de masă de înaltă rezoluție FT-ICR.

Compușii au fost cercetați *in vitro* din punct de vedere biologic, prin testarea capacității antimicrobiene, antibiofilm și antioxidante.

Activitatea antimicrobiană a compușilor din seria II a fost examinată pe tulpinile bacteriene standard selectate. Compușii testați au prezentat o activitate antimicrobiană scăzută împotriva celulelor planctonice, cu valori CMI de > 5000 – 1250 μg/ mL, în comparație cu matorul (ciprofloxacina). În ceea ce privește efectele antibiofilm, rezultatele au indicat valori ale CMEB între > 5000 și 625 μg/ mL. Compușii **1b** și 2-((4-metoxifenoxi)metil)-*N*-((6-metilpiridin-2-il)carbamotioil)benzamidă (**1d**) au prezentat cea mai bună activitate antibiofilm împotriva tulpinii *Escherichia coli* ATCC 25922, la valori CMEB de 625 μg/ mL.

Cea mai mare capacitate antioxidantă a fost înregistrată pentru compusul **1d** (~43%), în raport cu ascorbatul de sodiu, folosit ca antioxidant de referință.

Compușii au fost testați în ceea ce privește citotoxicitatea, iar determinarea s-a realizat pe celule de adenocarcinom HCT-8. După 48 de ore de tratament, celulele HCT-8 au fost recoltate pentru a examina efectele asupra fazelor ciclului celular, prin citometrie în flux. Rezultatele au indicat faptul că derivații de *N*-acil-tiouree au indus blocarea în faza G0/G1 a celulelor testate și au provocat o scădere comparabilă în faza S. Rezultatele sunt consecvente și semnificative din punct de vedere statistic.

În urma rezultatelor analizelor experimentale și evidențierea celui mai promițător compus al seriei, am dezvoltat o metodă de analiză cantitativă, prin tehnica RP-HPLC. Validarea procedurii analitice a fost efectuată și în acest caz în conformitate cu ghidul ICH Q2 (R1). Datele statistice calculate pe baza înregistrărilor cromatografice au demonstrat că metoda analitică este adecvată pentru determinarea cantitativă a compusului **1d** și poate fi utilizată în analizele de rutină.

7. Concluzii și contribuții personale

Cele două studii de cercetare au ca teme centrale proiectarea, sinteza, caracterizarea, separarea și cuantificarea unor noi derivați ai 2-((4-etilfenoxi)metil)-*N*-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei și 2-((4-metoxifenoxi)metil)-*N*-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei, necitați în literatura de specialitate, cu potențial antimicrobian și antioxidant.

Metodologia cercetării a avut ca punct de plecare evaluarea noilor structuri chimice prin abordări *in silico*. Obținerea celor două serii de compuși include mai multe faze de sinteză optimizare și reproductibile. Compușii rezultați au fost caracterizați prin determinarea temperaturilor de topire și evaluarea solubilității în diferiți solvenți, iar structura acestora a fost confirmată prin spectrometrie ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, spectroscopie în infraroșu și spectrometrie de masă.

În urma testării *in vitro* a acțiunii biologice, compușii au prezentat activitate antimicrobiană, antibiofilm, antioxidantă.

Caracteriul de originalitate al lucrării îl constituie prezența în aceeași moleculă a doi farmacofori biologic activi și anume fragmentul de *N*-acil tiouree și nucleul heterociclic. Proiectarea (*in silico*), procedeul de sinteză și metoda de optimizare a randamentului prezintă aspecte de originalitate.

Contribuțiile personale cuprind și caracterizarea noilor compuși, analiza spectrală și cromatografia de lichide de înaltă performanță. Metodele de separare și cuantificare validate au caracter de originalitate și fac subiectul contribuției proprii în domeniul dezvoltărilor prin tehnica HPLC.

Încărcarea matricilor de silice mezoporoasă MCM-41, silice mezoporoasă FDU-12 și magnetită cu derivați ai *N*-acil-tioureei și caracterizarea nanomaterialelor rezultate reprezintă, de asemenea, contribuția proprie la demersurile privind cercetarea acestui tip de nanostructuri și potențiala utilitate în îmbunătățirea activității antimicrobiene.

Aprofundarea relațiilor dintre structura chimică și activitatea biologică a noilor compuși, analizarea mecanismelor de acțiune pentru derivații care s-au evidențiat prin activitățile antimicrobiană, antibiofilm și antioxidantă, completarea profilului bioactiv al noilor derivați ai *N*-acil-tioureei, precum și evaluarea activității antimicrobiene și antibiofilm a nanoparticulelor încărcate cu derivații studiați, deschid noi perspective și pot reprezenta subiectul unor cercetări viitoare.

BIBLIOGRAFIE

1. Lafzi F, Kilic D, Yildiz M, Saracoglu N. Design, synthesis, antimicrobial evaluation, and molecular docking of novel chiral urea/thiourea derivatives bearing indole, benzimidazole, and benzothiazole scaffolds. *J. Mol. Struct.*, 1241, 130566, 2021.
2. Bielenica A, Stefańska J, Stępień K, Napiórkowska A, Augustynowicz Kopeć E, Sanna G, Madeddu S, Boi S, Giliberti G, Wrzosek M, Struga M. Synthesis, cytotoxicity and antimicrobial of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety. *Eur. J. Med. Chem.*, 101, 111-125, 2015.
3. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Front. Public Health*, 2, 2014.
4. Martens E, Demain A. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot*, 70, 520–526, 2017.
5. WHO. United Nations High-Level Meeting on Antimicrobial Resistance. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/events/UNGA-meeting-amr-sept2016/en/>, accesat pe data de 29 august 2023.
6. Kao P, Chng J, Chong K, Wong S, Kline K. *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* mixed species infection attenuates pathogen-specific neutrophil responses and impairs bacterial clearance. *Biorxiv*, 2022.
7. Li G, Walker MJ, De Oliveira DMP. Vancomycin Resistance in *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 11, 24, 2023.
8. Simor A, Williams V, McGeer A, Raboud J, Larios O, Weiss K, Gravel D. Prevalence of Colonization and Infection with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus* and of *Clostridium difficile* Infection in Canadian Hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 34(7), 687-693, 2013.
9. Srinivasan R, Santhakumari S, Poonguzhali P, Geetha M, Dyavaiah M, Xiangmin L. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Front. Microbiol.*, 12, 2021.
10. Ghorab MM, Alsaid MS, El-Gaby MSA, Elaasser MM, Nissan YM. Antimicrobial and anticancer activity of some novel fluorinated thiourea derivatives carrying sulfonamide moieties: Synthesis, biological evaluation and molecular docking. *Chem. Cent. J.*, 11, 32, 2017.

11. Antypenko L, Meyer F, Kholodniak O, Sadykova Z, Jirásková T, Troianova A, Buhaiova V, Cao S, Kovalenko S, Garbe LA. et al. Novel acyl thiourea derivatives: Synthesis, antifungal activity, gene toxicity, drug-like and molecular docking screening. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 352, e1800275, 2018.
12. Arafa WAA, Ghoneim AA, Mourad AK. N-Naphthoyl Thiourea Derivatives: An Efficient Ultrasonic-Assisted Synthesis, Reaction, and In Vitro Anticancer Evaluations. *ACS Omega*, 7, 6210–6222, 2022.
13. Naz S, Zahoor M, Umar MN, Alghamdi S, Sahibzada MUK, UIBari W. Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of thiourea derivatives. *Open Chem. J.*, 18, 764-777, 2020.
14. Kalhor M, Salehifar M. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of some novel N,N'-disubstituted thiourea, 2-amino thiazole, and imidazole-2-thione derivatives. *Med. Chem. Res.*, 23, 2947–2954, 2014.
15. Kulakov IV, Nurkenov OA, Akhmetova SB, Seidakhmetova RB, Zhambekov ZM. Synthesis and antibacterial and antifungal activities of thiourea derivatives of the alkaloid anabasine. *Pharm. Chem. J.*, 45, 15–18, 2011.
16. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *J. Mol. Biol.*, 161(2), 269–288, 1982.
17. Zhong Z, Xing R, Liu S, Wang L, Cai S, Li P. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydr Res.*, 343(3), 566-70, 2008.
18. Wan Zullkiplee WS, Mohd Ariff MA, Hussain H, Khairul WM, Ngaini Z. Bacteriostatic activities of N-substituted tris-thioureas bearing amino acid and aniline substituents. *Phosp. Sulf. Silicon Relat. Elem.*, 191(10), 1329-1333, 2016.
19. Ngaini Z, Wan Zulkiplee WS, Abd Halim AN. One-pot multicomponent synthesis of thiourea derivatives in cyclotriphosphazenes moieties. *J. Chem.*, 2017, 2017.
20. Wan Zullkiplee WS, Rasin F, Abd Halim AN, Mortadza NA, Ramli N, Hani NI. Ngaini Z. Synthesis, Biological Properties and Comparative Molecular Docking Evaluation Studies of 1,3 and 1,4 Bis-Thiourea Derivatives as Potential Antimicrobial Resistant Agents. *Int. J. Cur. Res. Rev.*, 3 (4), 23-30, 2021.
21. Lourenço AL, Saito MS, Dorneles LEG, Viana GM, Sathler PC, Aguiar LCdS, De Pádula M, Domingos TFS, Fraga AGM, Rodrigues CR, et al. Synthesis and Antiplatelet Activity of

Antithrombotic Thiourea Compounds: Biological and Structure-Activity Relationship Studies. *Molecules*, 20(4), 7174-7200, 2015.

22. Gheorghe I, Tatu AL, Lupu I, Thamer O, Cotar AI, Pircalabioru GG, Chifiriuc MC. Molecular characterization of virulence and resistance features in *Staphylococcus aureus* clinical strains isolated from cutaneous lesions in patients with drug adverse reactions. *Rom. Biotechnol. Lett.* 22(1), 12321-12327, 2017.

23. ICH Guideline Q2(R2) on Validation of Analytical Procedures, EMA/CHMP/ICH/82072/2006. Disponibil online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf (accesat în data de 19 iunie 2023).

Lista cu lucrările științifice publicate

1. **Roman R**, Pintilie L, Nuță D, Limban C. A QSAR Study on Thiourea Derivatives—New Approaches in Drug Development. *Farmacia*, 70, 228-240, 2022. <https://farmaciajournal.com/issue-articles/a-qsar-study-on-thiourea-derivatives-new-approaches-in-drug-development/>

Indexarea revistei: SciVerse Scopus, Chemical Abstracts Service, EMBASE, SCImago Journal&Country Rank, IPA, British Library, SSCI, A&HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, BKCI-S, BKCI-SSH, ESCI, CCR-EXPANDED, IC.

Factorul de impact (IF): 1,6.

(Lucrare realizată din capitolul 6. *Contribuție la proiectarea, sinteza, caracterizarea și cuantificarea unor noi derivați de 2-((4-metoxifenoxi)metil)-N-(heteroaril-carbamotioil)benzamidă cu potențial antimicrobian și antioxidant*, subcapitolul 6.3.1. *Studii in silico*)

2. **Roman R**, Pintilie L, Nuță D, Avram S, Buiu C, Sogor C, Limban C. In Silico Prediction, Characterization and Molecular Docking Studies on New Benzamide Derivatives. *Processes*, 11, 479, 2023. <https://doi.org/10.3390/pr11020479>

Indexarea revistei: Scopus, SCIE (Web of Science), CAPlus / SciFinder, Inspec, AGRIS, BibCnrs, CNKI, Digital Science, DOAJ, EBSCO, FRIDOC, Gale, Living Archive for Process Systems Engineering (LAPSE), OpenAIRE, OSTI (U.S. Department of Energy), PATENTSCOPE, ProQuest, SafetyLit.

Factorul de impact (IF): 3,5.

(Lucrare realizată din capitolul 5. *Contribuție la proiectarea, sinteza, caracterizarea, separarea și cuantificarea unor noi derivați ai 2-((4-etilfenoxi)metil)-N-(heteroaril-carbamotioil)benzamidei cu potențial antimicrobian și antioxidant*, subcapitolul 5.3.1. *Studii in silico*)

3. **Roman R**, Pintilie L, Căproiu MT, Dumitrașcu F, Nuță DC, Zarafu I, Ioniță P, Chifiriuc MC, Chiriță C, Moroșan A. et al. New N-acyl Thiourea Derivatives: Synthesis, Standardized Quantification Method and In Vitro Evaluation of Potential Biological Activities. *Antibiotics*, 12, 807, 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050807>

Indexarea revistei: BibCnrs, CABI (CAB Direct), CAPlus / SciFinder, CNKI, Digital Science, DOAJ, EBSCO, Elsevier Databases (Scopus, Embase), Gale, National Library of Medicine (PubMed, PMC), OpenAIRE, OSTI (U.S. Department of Energy), PATENTSCOPE, ProQuest, SafetyLit, Web of Science (SCIE, Biological Abstracts, BIOSIS Previews).

Factorul de impact (IF): 4,8.

(Lucrare realizată din capitolul 6. *Contribuție la proiectarea, sinteza, caracterizarea și cuantificarea unor noi derivați de 2-((4-metoxifenoxi)metil)-N-(heteroaril-carbamotioil)benzamidă cu potențial antimicrobian și antioxidant*, subcapitolele 6.3.2. *Sinteza noilor compuși Ia – Ig*, 6.3.3. *Caracterizarea fizico-chimică a noilor compuși Ia – Ig*, 6.3.4. *Evaluarea activității biologice a compușilor din seria II*, 6.3.5. *Metoda analitică de determinare cantitativă prin tehnica RP-HPLC*, 6.4. *Discuții*)