

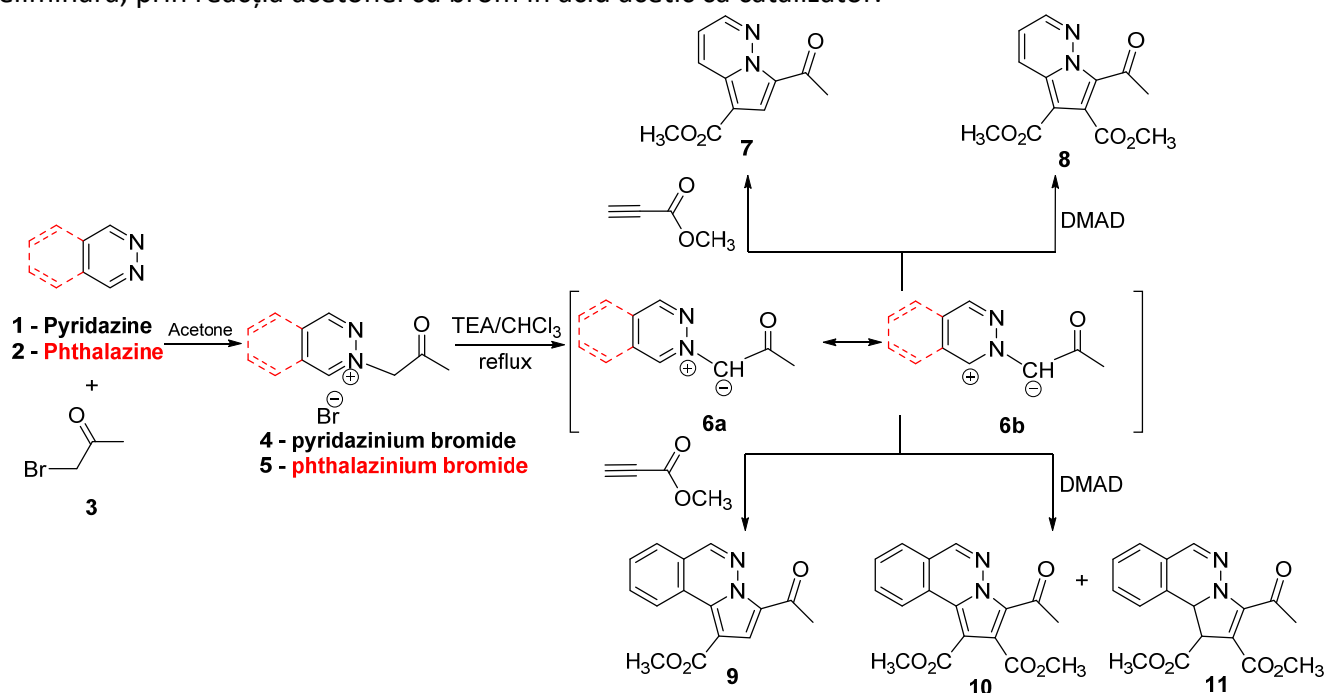
privind implementarea proiectului " **Noi structuri polifuncționale azasteroid-mimetice: compuși fluorescenți și biologic activi**", Cod: **PN-III-P1-1.1-TE-2016-1205** in perioada ianuarie –decembrie 2019

2019. Stagiul II. Sinteza și analiza structurală a unor noi compuși azasteroidici tetraaciclici.

Intr-o prima etapa am incercat sa obtinem noi derivati halogenati cu schelet pirolodiazinic cu reactivitate crescuta cu scopul de ai putea utiliza ulterior in reactiile de cuaternizare cu benzo[f]chinolina. Toate acestea cu scopul de a obtine noi compusi cu activitate antimicrobiana si /sau anticanceroasa. Interesul în domeniul derivaților de pirolodiazina rezultă și din emisia lor de fluorescență albastră extrem de eficientă.

Astfel, pirolopiridazinele reprezintă o clasă ce prezinta emitenta albastra puternica (care conține un heterociclu cu un atom de azot cu cap de punte ce desparte un inel pirololic bogat in electroni și un inel diazinic cu șase membri cu deficit de electroni). Această distribuție neuniformă de electroni π între cele două inele condensate este o caracteristică importantă care duce la delocalizarea electronilor. Delocalizarea electronilor în întregul schelet heterociclic poate fi posibilă fără o geometrie plană a indolizinei. In cazul acestor molecule planitatea azaindolizinei este asigurată de hibridizarea sp^2 a tuturor atomilor din inelul condensat și aceasta planaritate se păstrează la substituția cu diferite grupări.

Abordarea generală adoptată pentru sinteza derivaților pirolodiazinici fluorescenți este descrisă în schema 1. Așa cum se observa, prepararea tuturor derivaților de pirolodiazină, **7-11**, are loc in două etape: inițial N-alkilarea diazinei (piridazină - PY sau ftalazină - PH) cu bromoacetona 3 urmată de o cicloadiție [3 + 2] dipolară a diazinii ilidelor **6** (generate in situ în prezența trietilaminei (TEA)) la dipolarofili corespunzători (dimetil acetilendicarboxilat - DMAD sau propiolat de metil). Bromoacetona a fost sintetizată, într-o etapă preliminară, prin reacția acetonei cu brom în acid acetic ca catalizator.



Schema 1. Calea de reacție pentru obținerea derivaților de pirolodiazina

În acest studiu, am efectuat reacțiile în cloroform și după 6 ore de reflux, reacția a fost oprită și produsii au fost izolați din amestecul de reacție. În cazul piridazinei am obținut numai compuși complet aromatizați **7** și **8**. Pentru ftalazină, reacția cu propiolat de metil produce compuși complet aromatizați **9**, în timp ce reacția cu DMAD oferă un amestec de compuși parțiali și complet aromatizați (**11** și **10** respectiv). Toți cicloaductii au fost obținuți cu randamente moderate până la bune (74 - 81% vezi Tabelul 1). Rezultatele obținute de noi în acest studiu sunt de acord cantitativ cu cele publicate în literatura de specialitate, inclusiv cu privire la geometria cicloaductului hidrogenat **11**. Sinteza realizată în condiții convenționale posedă ca dezavantaje principale consumul mare de energie și timpul de reacție lung (360 min).

Ca o cale alternativă de sinteză am efectuat sinteza derivaților de azaindolină sub iradiere la microunde (MW), folosind un reactor monomod Monowave 300 (Anton Paar, Graz, Austria). Acest reactor este echipat cu un sistem de agitare (0 până la 1200 rpm) și poate atinge până la 300 ° C, cu control al temperaturii. Reacțiile au loc într-un vas închis, la o presiune maximă de 30 bari. Condițiile optime de reacție s-au dovedit a fi la 130 °C, 6-7 bari și sunt rezumate în tabelul 1, comparativ cu parametrii corespunzători folosiți în condițiile încălzirii termice (TH).



Figura 1. Reactor monomod Monowave 300 (Anton Paar, Graz, Austria)

Tabelul 1. Sinteza derivatilor de pirolodiazina prin iradiere la microunde (MW) și în condițiile încălzirii convenționale(TH).

Compus	Microunde (MW)		Incalzire conventionala (TH)	
	Timpul de reacție, (min)	Randament, %	Timpul de reacție, (min)	Randament, %
7	10	90	360	77
8		91		74
9		94		81
10		91		45
11		0		37

După cum este indicat în tabelul 1, prin iradiere la MW, timpii de reacție scad substanțial de la 6 ore la 10 min, în timp ce cantitățile de solvent utilizate în primele au fost de cel puțin cinci ori mai mici decât cantitățile corespunzătoare utilizate în condiții convenționale. Acest lucru face ca aceste reacții să poată fi considerate ecologic-prietenoase. De asemenea, putem observa că prin iradiere la MW, randamentele au fost mai mari (cu 10 până la 15%). În cazul reacției bromurii de ftalaziu cu DMAD, sub iradiere cu microunde, am izolat doar cicloaductul complet aromatizat de tipul 10 cu un randament de 91%.

Proprietățile fotofizice ale pirolodiazinelor sintetizate au fost investigate utilizând soluții diluate (mai mici de 10^{-5} mol / L) preparate în ciclohexan și respectiv diclormetan. Diluția fiecărei soluții a fost ajustată astfel încât absorbanțele, măsurate la 360, 320 și 370 nm să se încadreze între 0,02-0,20 unități.

λ_{max} de absorbție și λ_{max} de emisie cu randamentul cuantic corespunzător al derivaților de pirolodiazină în ciclohexan și diclorometan sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. λ_{max} (nm) a spectrelor de absorbție, λ_{max} (nm) a spectrelor de emisie, și randamentul cuantic (%) a compușilor **7** – **11**

Compus	Fluorescenta (λ_{max} , nm) (randament cuantic (%))		Absorbția (λ_{max} , nm)	
	Ciclohexan	Diclorometane	Ciclohexan	Diclorometane
7	426 (24)	432 (21)	360	358
8	422 (25)	426 (26)	356	354
9	428 (7)	441 (5)	327	325
10	439 (6)	446 (4)	324	322
11	491	-	374	372

$\lambda_{\text{exe}} = 360$ nm pentru probele **7** și **8**; $\lambda_{\text{exe}} = 320$ nm pentru probele **9** și **10**; $\lambda_{\text{exe}} = 370$ nm pentru proba **11**.

Datele din tabelul 2 evidențiază compușii pirolodiazinici **7** și **8** ce sunt emițători de albastru moderat (λ_{max} de fluorescență în jur de 420-430 nm, cu randamente cuantice în jur de 25%), compușii pirolotalazinici **9** și **10** sunt încă emițători de albastru (λ_{max} de fluorescență în jur de 425-440 nm, cu randamente cuantice mai mici - în jur de 5%), în timp ce pentru compusul **11**, intensitatea fluorescenței este neglijabilă și emisia este redusă în mod substanțial la roșu, cu un maxim al benzii de emisie (măsurabil doar în ciclohexan) în jur de 490 nm. Rezultatele din tabelul 2 evidențiază diferența dintre structurile electronice **7** - **10** (complet aromatizate și conjugate) și **11**, care nu are o conjugare completă de electroni.

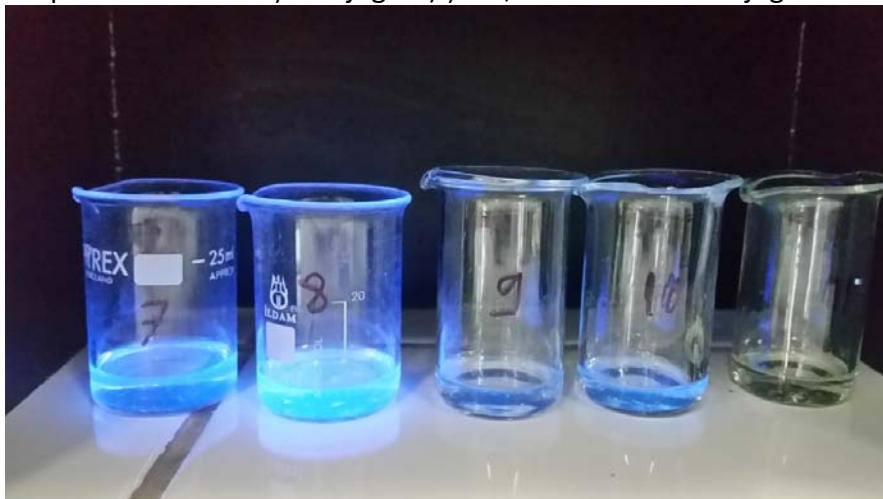
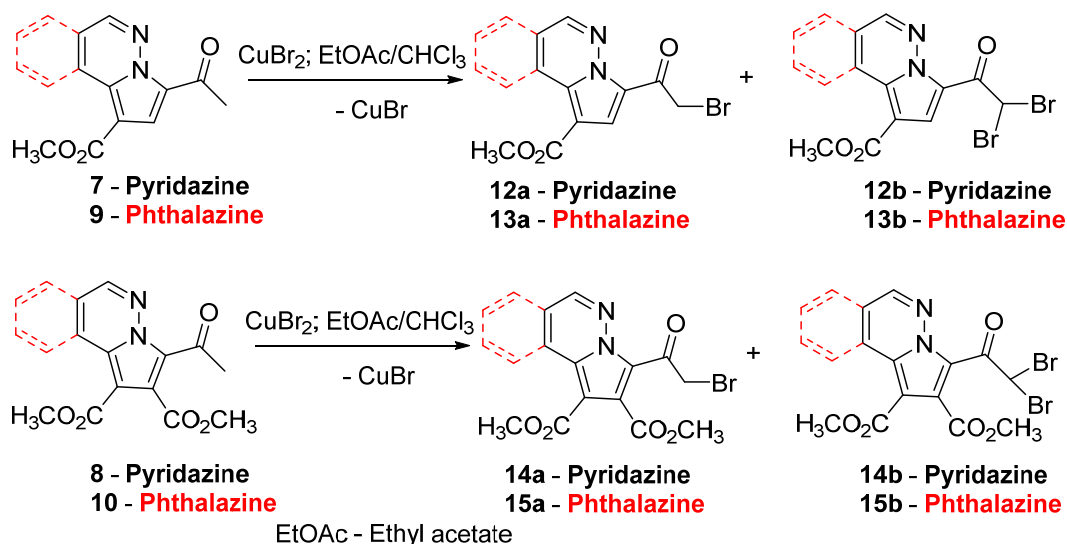


Figura 2. Fluorescenta derivaților pirolodiazinici în lumina lampii de UV ($\lambda = 256$ nm)

Emisia de fluorescență a compușilor complet aromatizați **7** - **10**, justifică interesul pentru sintetizarea pirolodiazinelor. Pentru a putea facilita utilizarea acestor compuși ca markeri fluorescenți, a fost necesară alegerea unei reacții de derivatizare fezabilă pentru a putea încorpora aceste molecule în macromolecule biologice (steroides, peptide, proteine și ADN). Prin urmare, ținând cont de faptul că gruparea carbonil poate fi ușor halogenată în poziția α și că derivații rezultați ar trebui să prezinte o reactivitate mărită, am decis în următoarea etapă să investigăm reacția de bromurare a pirolodiazinelor fluorescente, **7** - **10**, schema 2. Metoda aleasă constă în bromurarea în cataliză eterogenă folosind bromură de cupru (II) în cloroform / acetat de etil. Acest sistem de reacție este extrem de regiospecific, și duce la α -bromo-derivați cu randamente bune, dar mai puțin selectiv în ceea ce privește produsul mono- sau dibrominat rezultat.



Schema 2. Reacția de α -brominare a cicloaducților **7** – **10**.

Pentru a studia selectivitatea reacției, am efectuat bromurarea compușilor 7-10 cu bromură de cupru (II), atât în condiții convenționale TH cât și prin iradiere la MW. În tabelul 3 sunt enumerate condițiile optimizate ce au fost utilizate.

Tabelul 3. Sinteza pirolodiazinelor α -bromurate, prin iradiere la MW și în condițiile încălzirii termice TH.

Compus	Microunde (MW)		Încalzire convențională (TH)	
	Timpul de reacție (min)	Randament %	Timpul de reacție (min)	Randament %
12a	20	77	480	53
12b		12		17
13a		76		50
13b		11		16
14a		77		55
14b		13		17
15a		75		49
15b		12		16

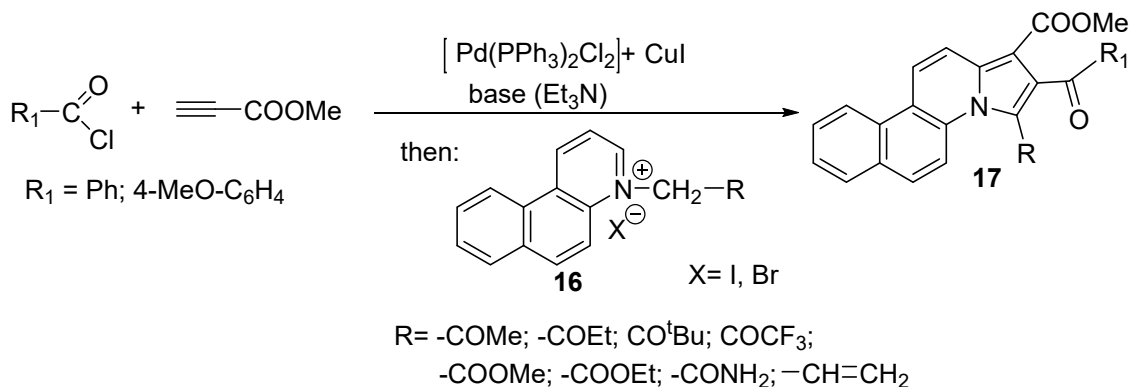
Așa cum se arată în tabelul 3, bromurarea asistată la microunde a derivaților de pirrolodiazină 7-10 s-a produs cu regioselectivitatea scontată (numai în poziția α) și cu o selectivitate crescută în ceea ce privește compusul monobrominat. Raportul dintre compușii mono și dibrominați a fost de aproximativ 3:1 prin încălzire termică și 6:1 în încălzire neconvențională. Randamentele au fost moderate în condiții convenționale și bune sub iradiere la MW, fiind observată o creștere semnificativă a randamentelor (cu o medie de 15-20%).

Structurile tuturor noilor compuși sintetizați au fost dovedite fără dubii prin analiza elementală și spectrală (IR, ^1H RMN, ^{13}C RMN, experimentele bidimensionale 2D-COSY, 2D-HETCOR (HMQC), 2D-HETCOR (HMBC).

II.1. Sinteza de noi azasteroide prin sinteza de tip *one-pot*.

În acest stadiu au fost sintetizate o serie de derivați azasteroidici **17** prin combinarea reacției de cuplare Sonogashira cu reacția de cicloadiție 3+2 dipolară. Într-o primă etapă clorura de benzoil / clorura de 4-metoxibenzoil și propiolatul de metil au fost supuse condițiilor de reacție ale cuplării Sonogashira (în amestec de cloroform și baza (Et_3N)) iar mai apoi după o scurtă perioadă de timp sunt adăugate sărurile de

ciloimoniu pentru a obtine cicloaductii corespunzatori **17**. Cicloaducții derivați de la benzo[f]chinolina au fost obținuti în conformitate cu datele din literatura utilizând sursele clasice de încălzire.

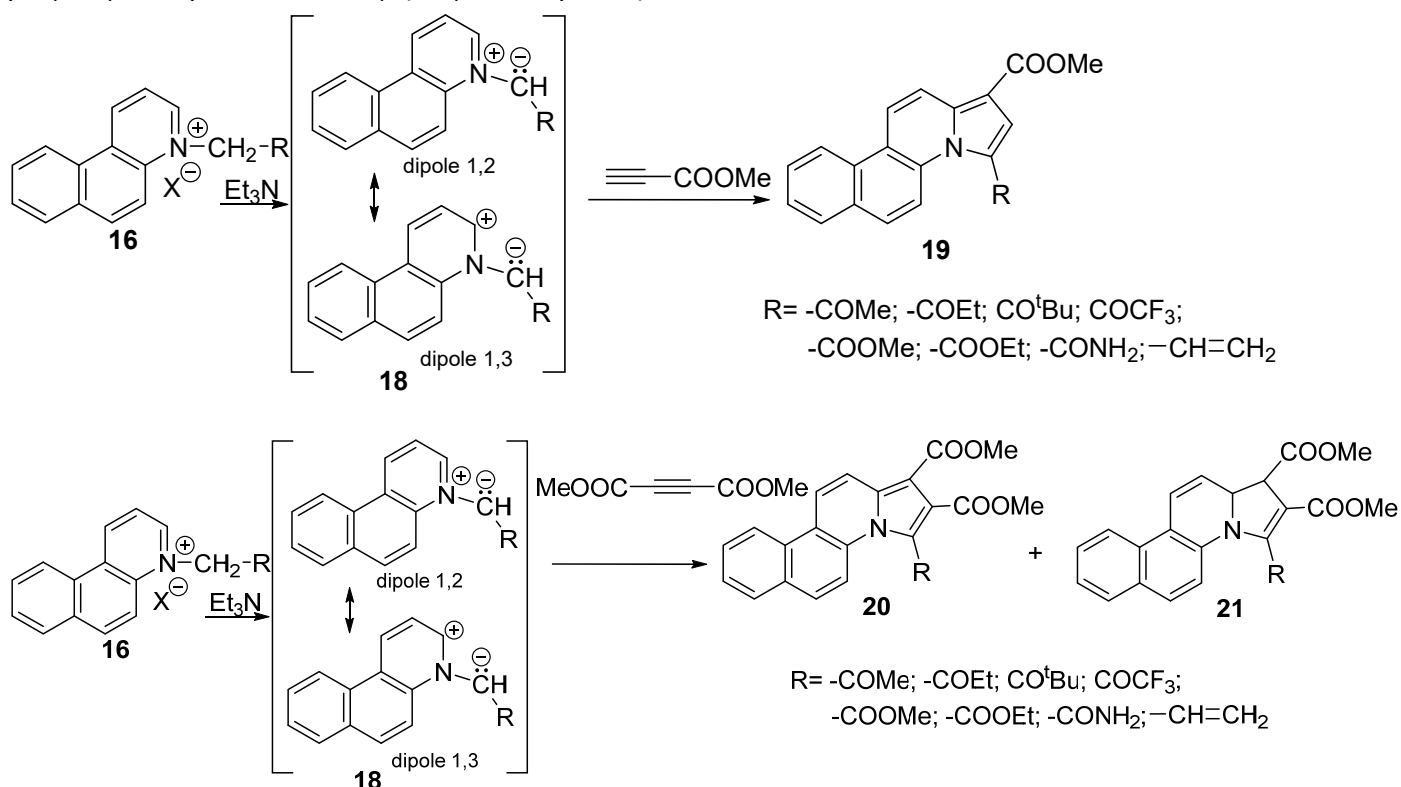


Toți derivații azasteroidici au fost obținuti în condițiile încălzirii convenționale cu randamente bune spre foarte bune (între 70 și 85 %).

II.2. Sinteza de noi azasteroide tetraciclice utilizând alchine activate

În acest stadiu a fost investigată reacția benzo[f]chinoliniu ilidelor **18** (generate in situ din sarurile corespunzătoare **16**) cu alchine activate (dimetil acetilendicarboxilat - DMAD sau propiolat de metil). Reacțiile au fost efectuate utilizând metodele clasice de încălzire.

În acest studiu, am efectuat reacțiile în cloroform și după 12 ore de reflux, reacția a fost oprită și produsele au fost izolați din amestecul de reacție. În cazul sarurilor de benzo[f]chinoliniu, reacția cu propiolat de metil produce compuși complet aromatizați **19**, în timp ce reacția cu DMAD oferă un amestec de compuși parțiali și complet aromatizați (**21** și **20** respectiv).



II.3. Sinteza cicloaductilor prin metode neconventionale

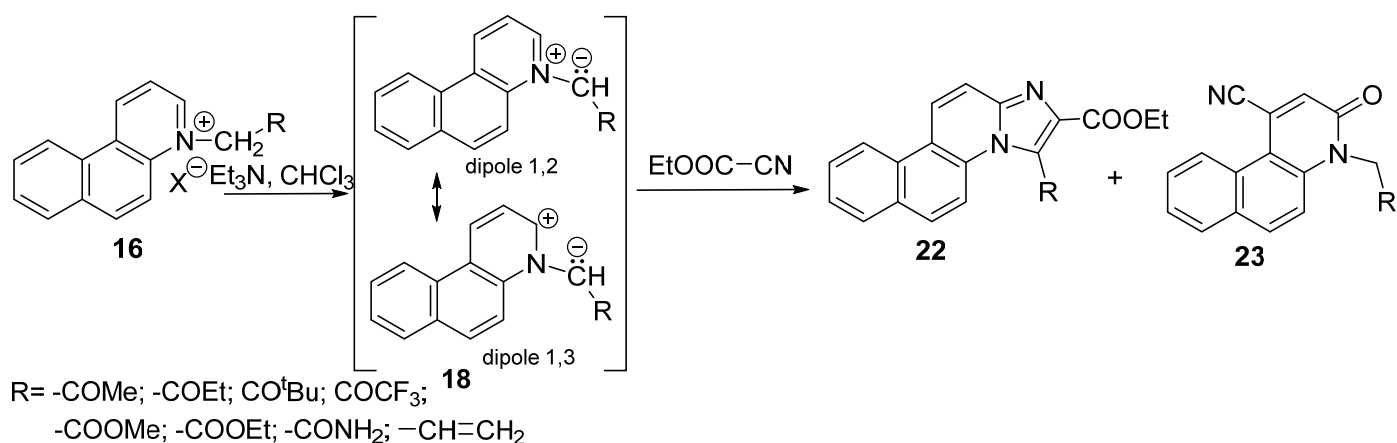
În scopul de a reduce timpul de reacție s-au realizat sintezele prin metode neconvenționale și anume prin iradiere cu microunde și respectiv ultrasunete. Utilizarea metodelor neconvenționale de sinteză în realizarea acestor sinteze a avut ca principal avantaj reducerea timpului de reacție de la 24 ore la 10 minute prin iradiere cu microunde și respectiv 30 minute prin iradiere cu ultrasunete. De asemenea, în unele cazuri, randamentul reacțiilor a fost îmbunătățit cu până la 15-20 %.

Au fost astfel elaborate noi proceduri pentru reacțiile de cicloadiție [3+2] dipolare sub acțiunea microundelor și respectiv ultrasunetelor. Aceste procedee scurtează mult timpul de reacție și de asemenea îmbunătățesc randamentul reacțiilor, iar condițiile de reacție sunt mai blânde.

Structura derivaților azasteroidici tetraciclici a fost dovedită prin analiză elementală (C, H, N) și prin analiză spectrală. Au fost înregistrate și interpretate spectrele IR, ^1H RMN, ^{13}C RMN și experimentele bidimensionale 2D-COSY, 2D-HETCOR (HMQC), 2D-HETCOR (HMBC) pentru toți derivații sintetizați. Structura determinată pe cale spectrală este în deplină concordanță cu structura propusă.

II.4. Sinteza de noi azasteroide tetraciclice utilizând etil cianoformat

Prepararea tuturor derivaților azasteroidici tetraciclici, **22**, are loc prin cicloadiția [3+2] dipolară a diaziniu ilidelor **18** (generate in situ în prezența trietilaminei (TEA)) la etil cianoformat. Așa după cum era de așteptat am obținut un amestec de cicloaducti de tipul **22** și derivați 4-ciano substituiți **23**.



II.5. Testarea proprietăților fluorescente a noilor compuși sintetizați

Toți derivații azasteroidici aromatizați sunt emitenți moderați de lumină albastră. Emisia de fluorescență a compușilor complet aromatizați justifică interesul nostru pentru sintetizarea acestor derivați azasteroidici. Rezultatele detaliate vor fi prezentate după publicare în jurnale de specialitate.

II.6. Evaluarea activității biologice a noilor compuși sintetizați

Sensibilitatea microorganismelor față de derivații azasteroidici s-a testat "in vitro", punându-le în condiții optime și standardizate de cultivare (mediul de cultură, inocul, timp de incubare etc.) în prezența unor cantități stabilite din compușii testați. Tehnica Kirby-Bauer adoptată de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) din SUA este larg utilizată în majoritatea țărilor. Este metoda uzuală pentru laboratoarele care testează un număr relativ mic de tulpini bacteriene cu creștere rapidă, fără diferențe semnificative a ratei de creștere de la tulpină la tulpină. Culturile microbiene de referință au fost

reprezentate de bacterii (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922) și fungi (*Candida albicans* ATCC 10231).

Tabelul 4. Testarea activității antimicrobiene a compușilor sintetizați

Compus testat	Microorganism test		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 28922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
GZ 1	-	+	-
GZ 2	-	-	-
GZ 3	-	-	-
GZ 4	-	-	-
GZ 5	-	-	-
GZ 6	-	-	+
GZ 7	+	+	+
GZ 8	+	+	+
GZ 9	+	+	+
GZ 10	+	+	+

Din cei 10 compuși GZ testați, 4 compuși (GZ 2, GZ 3, GZ 4, GZ 5) nu prezintă activitate antimicrobiană, 2 compuși (GZ 1, GZ 6) manifestă activitate față de un singur microorganism test (*Escherichia coli*, respectiv *Candida albicans*), în timp de compușii GZ 7, GZ 8, GZ 9 și GZ 10 inhibă creșterea și dezvoltarea celor trei microorganisme test. Compușii GZ 8 și GZ 9 au dovedit o puternică activitate antifungică.

Rezultatele detaliate vor fi prezentate după publicare în jurnale de specialitate.

Pagina web a proiectului se găsește la adresa: <https://teclu.chem.uaic.ro/npamfb/>, aici va fi publicat, până la data de 20.12.2019, raportul final a acestei etape.

II.7. O parte a rezultatelor obținute au fost organizate pentru a fi publicate în reviste de specialitate și prezentate la o serie de conferințe naționale și internaționale după cum urmează:

O lucrare publicată:

1. Moldoveanu, C.; Amariuca-Mantu, D.; Mangalagiu, V.; Antoci, V.; Maftai D.; Mangalagiu, I.I.; **Zbancioc, G.: Microwave Assisted Reactions of Fluorescent Pyrrolodiazine Building Blocks, *Molecules*, 24(20), 3760, 2019. DOI: 10.3390/molecules24203760. (Impact Factor 3.060)**

6 lucrări prezentate la conferințe naționale și internaționale:

1. **Zbancioc, Ghe.;** Moldoveanu, C.; Ciobanu, C.; Antoci, V.; Mangalagiu, V.; Amăriucăi-Mantu, D.; Mangalagiu, I.I.: Microwave assisted reactions of pyrrolodiazine compounds as potential

fluorescent biological markers, *IasiCHEM 2019*, 3rd Edition, *Faculty of Chemistry Conference*, 31 October-1 November, **2019**, Iasi, Romania (Oral Communication OC-04, pag.10).
<http://www.chem.uaic.ro/ro/manifestari/zu-2019.html>

2. Antoci, V.; Amăriucăi-Mantu, D.; Mangalagiu, V.; Cucu (Diaconu), D.; Ciobanu, C.; **Zbancioc, Ghe.**; Mangalagiu, I.I.: Newly vinyl-pyrrolo-phthalazine/pyridazine cycloadducts and their polymeric materials, *IasiCHEM 2019*, 3rd Edition, *Faculty of Chemistry Conference*, 31 October-1 November, **2019**, Iasi, Romania (poster PI-17, pag. 32).
<http://www.chem.uaic.ro/ro/manifestari/zu-2019.html>
3. Moldoveanu, C.; Mangalagiu, V.; **Zbancioc, Ghe.**; Amăriucăi-Mantu, D.; Antoci, V.; Cucu (Diaconu), D.; Mangalagiu, I.I.: New insights on the 1,3-dipolar cycloaddition of benzimidazolium ylides, *IasiCHEM 2019*, 3rd Edition, *Faculty of Chemistry Conference*, 31 October-1 November, **2019**, Iasi, Romania (poster PII-18, pag. 58).
<http://www.chem.uaic.ro/ro/manifestari/zu-2019.html>
4. Antoci, V.; Amariuca-Mantu, D.; Cucu, D.; Mangalagiu, V.; Loiseau, P. M.; Cojean, S.; Ciobanu, C.; **Zbancioc, Ghe.**; Mangalagiu, I.I.: New PyrroloBenzoQuinonePhthalazines and PyrroloBenzoQuinonePyridazines: Synthesis, Structure and Anti-leishmaniasis Activity, *21th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, RICCE 21, 4-7 Septembrie, **2019**, Constanța-Mamaia, România, **S1 – 051**, (oral presentation).
<http://ricce21.chimie.upb.ro/program/full-program/>
5. Zbancioc, G.; Moldoveanu, C.; Zbancioc, A.M.; Tatarina, G.; Mangalagiu, I.I.: New azasteroid compounds: synthesis and spectral analysis. *13th International Conference on Heteroatom Chemistry (ICHAC)*, 30 June – 5 July, **2019**, Prague, Czech Republic. PP41 (Poster presentation).
<http://www.ichac2019.com/book-of-abstracts>
6. Moldoveanu, C.; **Zbancioc, G.**; Amariuca-Mantu, D.; Mangalagiu, V.; Antoci, V.; Mangalagiu, I.I.: New blue fluorescent benzofuran derivatives. *13th International Conference on Heteroatom Chemistry (ICHAC)*, 30 June – 5 July, **2019**, Prague, Czech Republic. PP34 (Poster presentation). <http://www.ichac2019.com/book-of-abstracts>

Din cele prezentate anterior rezulta ca toate obiectivele propuse pentru aceasta etapa au fost indeplinite in proportie de 100%.

Director proiect,
Conf. dr. Gheorghita Zbancioc