

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

STUDII PRIVIND SINTEZA ȘI ACTIVITATEA BIOLOGICĂ A UNOR NOI DERIVAȚI DE 1,4-NAFTOCHINONĂ

REZUMAT

Conducător de doctorat,

Prof. univ. dr. Cătălina-Gabriela Pisoschi

Student-doctorand,

Maria-Flavia Crețu

Craiova

2017

Cuprins

Introducere	3
Stadiul actual al cunoașterii	3
1. Derivați naturali și sintetici ai 1,4-naftochinonei, activi biologic	4
2. Mecanisme biochimice responsabile de activitatea derivaților de 1,4-naftochinonă	5
Contribuții personale	6
3. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică unor noi 1,4-naftochinone 2-cloro-3- <i>N</i> -substituite	6
4. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor noi tioderivați de 1,4-naftochinonă	7
5. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor noi derivați de 1,4-naftochinonă 2-hidroseleno-3- <i>N</i> -substituiți	8
6. Evaluarea activității antimicrobiene a derivaților de 1,4-naftochinonă	9
7. Evaluarea potențialului antiproliferativ al noilor derivați de 1,4-naftochinonă	12
Concluzii	13

Cuvinte cheie: naftochinone, sinteză, antibacterian, antimicotic, antiproliferativ

Introducere

Chinonele sunt o categorie de compuși cu structură aromatică cu o largă răspândire în natură, incluzând substanțe precum pigmenți, antibiotice, vitamine și coenzime. Se regăsesc în plante, ca metaboliți secundari, ciuperci, dar și în regnul animal. Plantele cu conținut de 1,4-naftochinone au fost și sunt în continuare utilizate în medicina tradițională, în diferite colțuri ale lumii, motiv pentru care compușii cu această structură au început să fie studiați în vederea identificării acțiunilor biologice pe care le posedă. Cercetările efectuate au relevat efecte farmacologice dintre cele mai diverse, printre care se numără proprietățile antibacteriene, antifungice, antivirale, paraziticide, antiagregante plachetare.

Rezistența tulpinilor bacteriene la medicamentele existente în prezent în terapeutică reprezintă nucleul unei crize la nivel mondial ce anunță sfârșitul erei antibioticelor. Sunt din ce în ce mai numeroși agenții patogeni rezistenți la mai multe clase de antibiotice și se remarcă o tendință ascendentă în apariția de tulpini sensibile la un segment extrem de restrâns de agenți farmacologici, ceea ce limitează drastic variantele de tratament, mai ales la pacienții imunocompromiși.

În ciuda apariției de noi antibiotice, numărul de medicamente disponibile pentru tratamentul infecțiilor rămâne restrâns, aspect ce impune necesitatea dezvoltării unor molecule noi, mai simple, capabile să funcționeze ca agenți antimicrobieni cu un profil farmacotoxicologic optim.

În consecință, compușii cu structură naftochinonică au trezit interesul comunității științifice, respectând aceste deziderate.

Stadiul actual al cunoașterii

Compușii naftochinonici pot fi structurați în două categorii ample: naturali și de sinteză. Studiile din literatura de specialitate au în prim-plan atât utilizările și efectele moleculelor de proveniență naturală, cât și conceperea unor noi structuri optimizate plecând de la scheletul 1,4-naftochinonic. Nu în ultimul rând, cercetările ținute pe acest tip de compuși sunt îndreptate asupra elucidării mecanismelor de acțiune ce explică efectele farmacologice ale acestora.

1. Derivați naturali și sintetici ai 1,4-naftochinonei activi biologic

Naftochinonele naturale sunt metaboliți secundari produși de plante, fungi și animale, care îndeplinesc roluri biologice variate. De obicei, derivații de naftochinonă au culoare portocalie sau brună, fiind pigmenți naturali importanți.

Derivații naftochinonici au fost folosiți mai ales pentru proprietățile tinctoriale, dar ulterior au fost raportate și alte activități biologice. În acest sens, cele mai multe studii vizează acțiunile antibacteriană, antimicotică, antiprotozoarică și pe cea antitumorală. La acestea se adaugă cercetările ce au demonstrat efectul antiagregant plachetar, antiinflamator și antialergic.

Compușii naftochinonici întâlniți în natură sunt cel mai frecvent derivați de 1,4-naftochinonă, mai rar derivați de 1,2-naftochinonă, sub formă de monomeri, dimeri sau trimeri. Cea mai largă răspândire o au în anumite familii de plante, precum: *Bignoniaceae*, *Avicenniaceae*, *Boraginaceae*, *Droseraceae*, *Ebenaceae*, *Juglandaceae*, *Nepenthaceae*, *Plumbaginaceae*. Prezența lor a fost confirmată și la diverse genuri de fungi, precum *Fusarium*, *Marasmius*, *Verticillium*, dar și în licheni și alge.

Cel mai frecvent, naftochinonele se găsesc în pigmenții plantelor, având mai ales culoarea galbenă sau brună. Au fost întâlnite și în mecanismele de apărare ale plantelor, fiind utilizate apoi ca agenți antibacterieni cu spectru larg, antifungici și antimalarici, iar din acest motiv speciile producătoare de naftochinone sunt incriminate de alelopatie.

O categorie specială de compuși naturali naftochinonici o reprezintă grupul vitaminelor K, ce înglobează substanțe liposolubile ce au ca numitor comun structural fragmentul de 2-metil-1,4-naftochinonă, iar în poziția 3 prezintă o catenă alifatică. Vitaminele K au rol fundamental în numeroase procese biochimice, printre care coagularea (vitaminele K influențează activarea factorilor II, VII, IX, X ai coagulării) metabolismul osos și creșterea celulară.

În ceea ce privește derivații de sinteză, structurile descrise în literatură au în comun nucleul de 1,4-naftochinonă condensat cu diverse inele sau cu substituenți variați în pozițiile disponibile de pe nucleu. Acțiunile farmacologice manifestate de compușii de sinteză se încadrează în sfera efectelor caracteristice naftochinonelor naturale, cu accent pe acțiunea antimicrobiană și pe cea antitumorală.

Au fost concepute structuri de naftochinone cu acțiune dovedită atât împotriva bacteriilor, cât și a fungilor sau a protozoarelor sau virusurilor. În ceea ce privește acțiunea antibacteriană, naftochinonele au o predilecție pentru germenii Gram pozitivi și sunt inactive sau au o activitate extrem de scăzută împotriva celor Gram negativi.

A fost posibilă sinteza de compuși naftochinonici capabili să inhibe fosfolipaza A₂, precum și a unor derivați cu efect inhibitor asupra formării anionului superoxid în neutrofile și asupra degranulării mastocitare, proprietăți ce recomandă acest tip de compuși ca antialergici și antiinflamatori. În plus, au fost efectuate studii preclinice în urma cărora a fost pus în valoare efectul antiagregant plachetar, în absența celui anticoagulant, al unor derivați naftochinonici.

Un alt potențial terapeutic major pe care îl prezintă compușii naftochinonici rezidă în activitatea antitumorală pe care o manifestă substanțele de sinteză cu această structură. Numeroase cercetări încearcă să exploateze acest potențial, testând diferite molecule pe o varietate de linii celulare. Unele articole din literatura de specialitate investighează proprietățile antitumorale ale unor compuși substituiți în pozițiile 2, 3, 5 și 8 pe nucleul naftochinonic, în special cu radicali alcoxi.

2. Mecanisme biochimice responsabile de activitatea derivaților de 1,4-naftochinonă

Până în prezent, nu a fost confirmată o ipoteză singulară privind modul în care acționează compușii 1,4-naftochinonici la nivel celular și subcelular, însă există mai multe scenarii care au fost parțial verificate și care ar putea contribui la elucidarea cauzelor pentru care acești compuși sunt înzestrați cu acțiuni farmacologice atât de variate.

Una dintre ipotezele fundamentale privind mecanismul de acțiune a compușilor naftochinonici se bazează pe capacitatea de inducere a stresului oxidativ, remarcată inițial în cazul menadionei. Eficacitatea menadionei în diverse tipuri de cancer a fost pusă pe seama stresului oxidativ produs de ciclul redox al chinonei generator de specii reactive ale oxigenului (SRO), precum radical hidroxil, radical anion superoxid și peroxid de hidrogen. Prin producerea intensificată de SRO, se depășește capacitatea antioxidantă a celulei, ceea ce antrenează în cele din urmă moartea

celulară. Chinonele pot fi reduse cu un singur electron, generând radicali semichinonici, sau, acceptând doi electroni, se transformă în hidrochinone.

Un alt mecanism de acțiune este pus pe seama capacității de arilare, constând în introducerea unor structuri aromatice, cum este nucleul naftochinonic al menadionei, în molecula glutatationului, rezultând niște conjugați naftochinonă-glutation.

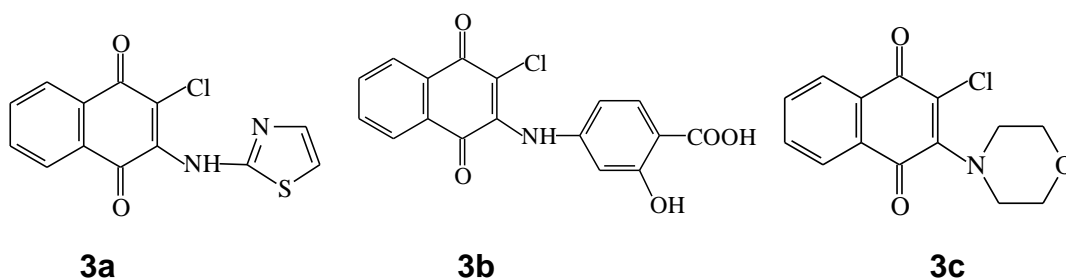
Nu în ultimul rând, cele două efecte menționate, producerea de SRO și arilarea resturilor tiolice din structurile peptidice și proteice, nu intervin individual, ci determină apariția unei cascade de semnalizare intracelulară, pe lângă faptul că grăbesc moartea celulară. În mod indirect, naftochinonele mai pot bloca avansarea ciclului celular din faza S în faza G2, prin blocarea duplicării ADN-ului celular. Acest lucru se realizează prin inhibarea topoizomerazelor.

Toate aceste cercetări ce validează ipotezele referitoare la mecanismele de acțiune ale naftochinonelor demonstrează că activitatea lor citotoxică se manifestă printr-o complexitate de fenomene subcelulare și celulare ce se completează reciproc, celula țintă fiind atacată de agenții naftochinonici pe mai multe fronturi.

Contribuții personale

3. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică unor noi 1,4-naftochinone 2-cloro-3-*N*-substituite

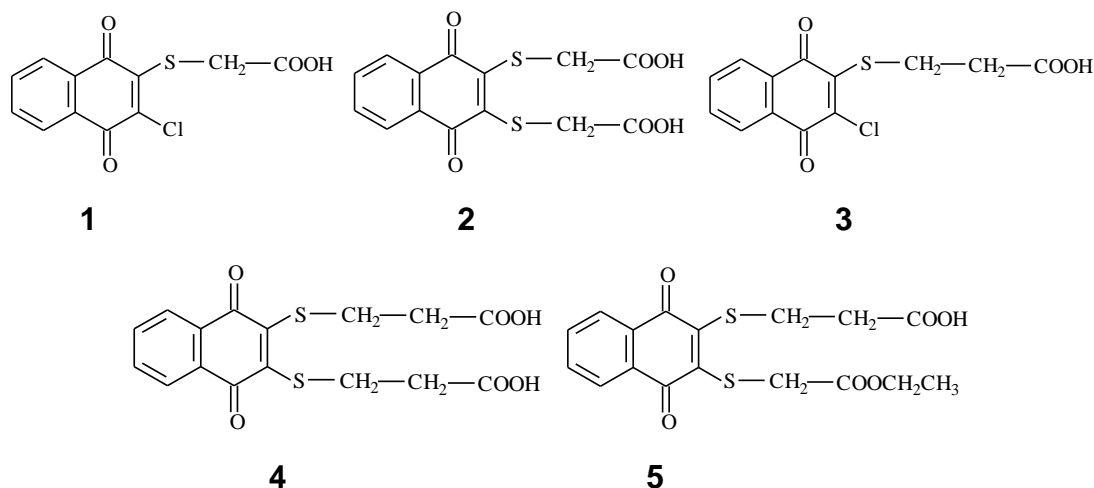
Sinteza derivaților de 1,4-naftochinonă 2-cloro-3-*N*-substituiți s-a realizat prin condensarea într-o singură etapă a unor amino derivați și anume 2-amino-sulfatiazol, acid 4-aminosalicilic și morfolină cu 2,3-dicloro-1,4-naftochinonă (diclonă), rezultând 2-cloro-3-(*N*-tiazol-2-ilamino)-1,4-naftochinonă (3a), 2-cloro-3-(*N*-[4-(1-carboxi-2-hidroxi-fenil)amino]-1,4-naftochinonă (3b), 2-cloro-3-morfolino-1,4-naftochinonă (3c), ale căror structuri se regăsesc în figura de ma jos:



S-au obținut compuși sub formă de pulberi de diferite culori, variind de la roșu la brun, cu valori ale randamentului cuprinse între 70-87%. Conform cromatogramelor obținute, s-a constatat că acești compuși au fost puri, datorită apariției unui pic unic. Spectrele UV-VIS și FTIR au indicat prezența grupărilor funcționale și a caracteristicilor structurale ale compușilor obținuți. În plus, validitatea formulelor structurale ale celor trei compuși a fost confirmată de spectrele RMN-¹H înregistrate la 300 MHz în DMSO-d₆.

4. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor noi tioderivați de 1,4-naftochinonă

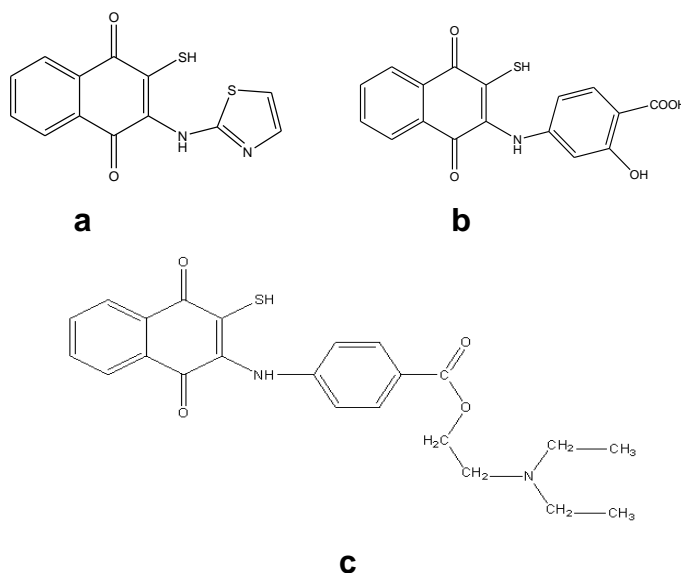
Sinteza celor 5 noi tioderivați de 1,4-naftochinonă constă într-o reacție de condensare între 2,3-dicloro-1,4-naftochinonă (diclonă) și acidul mercaptoetanoic, acidul 3-mercaptopropanoic, în raport 1:1 sau 1:2, respectiv acid 3-mercaptopropanoic și tioetanoat de etil, în prezență de piridină, la cald, rezultând acidul 2-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il-tio) etanoic (1), acidul 2,2'-[(1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2,3-diil)-ditiol] dietanoic (2), acidul 3-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il-tio) propanoic (3), acidul 3,3'-[(1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2,3-diil)-ditiol] dipropanoic (4), esterul etilic al acidului 2-(3-carboxietiltio-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-iltio) etanoic (5). Formulele structurale sunt prezentate în figura de mai jos.



S-au obținut produși de reacție solizi cu colorații diferite, de la galben la roșu, cu valori ale randamentului cuprinse între 75-85%. Și în cazul acestor compuși

cromatogramele au revelat puritatea produşilor, iar spectrele UV-Vis și FTIR au indicat prezența grupărilor funcționale și a caracteristicilor structurale ale compușilor obținuți. Și pentru această serie de compuși, validitatea formulelor structurale a fost confirmată de spectrele RMN-¹H înregistrate la 300 MHz în DMSO-d₆.

În aceeași categorie a tioderivaților naftochinonici, au mai fost sintetizați trei compuși, ale căror formule structurale figurează mai jos. Sinteza derivaților 2-tio-3-*N*-substituiți ai 1,4-naftochinonei s-a realizat prin condensarea în trei etape a unor 1,4-naftochinone 2-cloro-3-*N*-substituite cu tiouree, hidroxid de sodiu și acid acetic. Compușii obținuți sunt: 2-tio-3-(*N*-tiazol-2-ilamino)-1,4-naftochinonă (a), 2-tio-3-(*N*-[4-(1-carboxi-2-hidroxi-fenil)amino]-1,4-naftochinonă (b), 2-(dietilamino)etil-4-(1,4-dihidro-2-tio-1,4-dioxonaftalen-3-ilamino) benzoat (c).

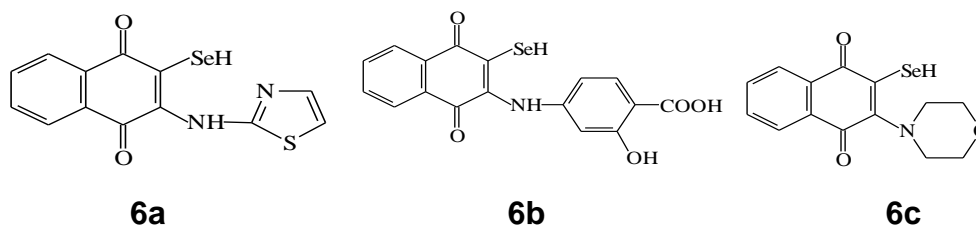


Compușii au fost obținuți sub formă de pulberi colorate de la roșu la brun, randamentele fiind în jurul valorii de 70%. Din invariabilitatea punctelor de topire și cromatogramele analizate s-a stabilit că și în cazul acestor compuși purificarea a fost optimă. Spectrele UV-Vis, FTIR și analiza RMN-¹H au confirmat caracteristicile structurale ale celor trei compuși.

5. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor noi derivați de 1,4-naftochinonă 2-hidroseleno-3-*N*-substituiți

Sinteza derivaților 2-hidroseleno-3-*N*-substituiți ai 1,4-naftochinonei s-a realizat prin condensarea în trei etape a unor 1,4-naftochinone 2-cloro-3-*N*-substituite cu selenouree, hidroxid de sodiu și acid acetic, rezultând 2-hidroseleno-3-(*N*-tiazol-2-

ilamino)-1,4-naftochinonă (6a), 2-hidro-selenu-3-(*N*-[4-(1-carboxi-2-hidroxi-fenil) amino]-1,4-naftochinonă (6b), 2-hidro-selenu-3-morfolino-1,4-naftochinonă (6c). Structurile sunt reprezentate în figura de mai jos.



Compușii au fost obținuți sub formă de pulberi brune sau cenușii, iar randamentele de reacție au fost între 70-80%. Și de această dată, din invariabilitatea punctelor de topire și cromatogramele analizate s-a stabilit că purificarea a fost optimă. Spectrele UV-Vis, FTIR și analiza RMN-¹H au confirmat caracteristicile structurale ale celor trei compuși.

6. Evaluarea activității antimicrobiene a derivaților de 1,4-naftochinonă

În acest capitol sunt prezentate mai întâi rezultatele obținute la testarea activității antibacteriene a celor cinci derivați de naftochinonă cu legături tioeterice substituie cu acizi alchilcarboxilici și esteri ai acestora (1-5).

Pentru testarea activității antibacteriene și/sau antifungice a celor cinci derivați naftochinonici cu legături tioeterice (1-5) s-a folosit metoda difuzimetrică, în conformitate cu recomandările CLSI. Toți compușii au fost testați pe următoarele tulpini bacteriene patogene: *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, iar activitatea antifungică a fost testată pe *Candida albicans* ATCC®10231.

Tulpinile bacteriene au fost însămânțate pe mediu Mueller Hinton. *C. albicans* a fost dezvoltată în mediu Sabouraud Dextroză Agar.

Rezultatele au fost înregistrate prin măsurarea diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii microbiene din jurul discului incluzând diametrul acestuia.

În acest caz au fost utilizate discuri cu vancomicină, ca substanță de control pentru acțiunea antibacteriană, respectiv fluconazol, pentru acțiunea antifungică. De asemenea, au fost utilizate diclona, drept control structural, precum și discuri îmbibate cu DMSO pentru a vedea influența solventului în care au fost dizolvați compușii sintetizați.

Majoritatea compușilor din această serie (1-5) s-au dovedit activi pe una sau mai multe dintre tulpinile patogene studiate, acțiunea acestora fiind superioară celei a diclonei. Superioritatea față de efectul antibacterian al diclonei s-a înregistrat îndeosebi în cazul tulpinii *S. aureus* ATCC®25923, acest lucru fiind observat mai ales pentru compușii 2 și 5 ce au manifestat o activitate antibacteriană comparabilă cu cea a antibioticului luat drept control, vancomicina. Pe de altă parte, în cazul tulpinilor Gram negative, *E. coli*, respectiv *P. aeruginosa*, absența zonelor de inhibiție a indicat lipsa clară a unei efect antibacterian asupra germenilor din această categorie atât a compușilor sintetizați cât și a controlului structural, diclona.

În ceea ce privește activitatea antifungică a compușilor studiați, deși toți cei cinci tioderivați naftochinonici și-au dovedit acțiunea antimicotică, am observat că doar compusul 5 a manifestat o acțiune medie asupra *C. albicans*, comparativ cu cea a fluconazolului, în timp ce restul compușilor au prezentat o activitate mai slabă chiar decât cea a diclonei.

În urma determinării concentrațiilor minime inhibitorii (CMI), prin metoda diluțiilor succesive, pentru compușii 1-5, s-a constatat că în cazul *S. aureus* rezultatele au indicat o uniformitate a valorilor CMI de 3 µg/ml pentru toți cei cinci compuși, în schimb, pentru *C. albicans*, valorile CMI au variat, în funcție de compus. Cea mai mică valoare a CMI s-a înregistrat pentru compusul 5, ceea ce îl face cel mai potent derivat din această serie împotriva *C. albicans*.

În mod similar s-a procedat pentru determinarea acțiunii antibacteriene și antimicotice a seriei de derivați naftochinonici clorurați (3a, 3b, 3c).

Efectul antibacterian al compusului 3a a fost testat pe *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Enterococcus faecalis* ATCC®29212, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Klebsiella spp.* ATCC®700603, iar activitatea antifungică a fost testată pe *Candida albicans* ATCC®10231, luând drept control ampicilina și oxacilina, respectiv clotrimazolul. Acesta s-a dovedit activ exclusiv împotriva germenilor Gram pozitivi, *S. aureus*, respectiv *E. faecalis*, dar cu o eficacitate inferioară față de antibioticele de control, ampicilina și oxacilina. Efectul antimicotic a fost comparabil cu al clotrimazolului.

Efectul antimicrobian al compusului 3b fost evaluat față de aceleași tulpini utilizate pentru testarea compusului 3a, iar măsurătorile au indicat o eficacitate similară a celor doi compuși, asupra germenilor testați, cu mențiunea că derivatul 3a

a fost sensibil mai activ pe tulpina standard de *C. albicans*, spre deosebire de compusul 3b.

Evaluarea acțiunii antimicrobiene a compusului 3c s-a realizat în stadiu inițial prin metoda difuzimetrică, atât pe bacterii, cât și pe tulpini de fungi. De această dată, tulpinile selecționate pentru acest compus au fost: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615, *Candida albicans* ATCC®10231. În plus, au fost luate în lucru și tulpini furnizate de Laboratorul de analize medicale din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova : o tulpină de *S. aureus* metilicilino-rezistent (SAMR), una de *E. coli* și una de *C. albicans*.

S-a observat că derivatul 3c a fost activ pe toate tulpinile testate, cu excepția *P. aeruginosa*. Cele mai bune rezultate s-au înregistrat pe tulpinile de *C. albicans*. Spre deosebire de diclonă, compusul 3c a manifestat eficacitate superioară asupra tuturor tulpinilor testate. În plus, s-a dovedit mai activ pe tulpina de *C. albicans* izolată din focare de infecție decât pe cea standardizată, *Candida albicans* ATCC®10231.

Tioderivații a și b au fost testați pe tulpini de *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Enterococcus faecalis* ATCC®29212, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Klebsiella spp.* ATCC®700603, iar activitatea antifungică a fost testată pe *Candida albicans* ATCC®10231. Ambii compuși au fost activi exclusiv pe tulpinile Gram pozitive și pe *C. albicans*, dar cu eficacitate inferioară substanțelor de control, aceleași ca în cazul derivaților clorurați.

Pentru evaluarea activității antimicrobiene a selenoderivaților (6a, 6b, 6c), au fost utilizate următoarele tulpini: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615, *C. albicans* ATCC®10231, precum și două dintre tulpinile obținute în colaborare cu Laboratorul de analize medicale al Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova, de *C. albicans*, respectiv de *S. aureus* metilicilino-rezistent. Substanța de control utilizată a fost diclona. Pe tulpina standard de *P. aeruginosa* au fost inactivi toți compușii testați, inclusiv diclona. Cea mai sensibilă dintre tulpinile testate s-a dovedit a fi SAMR, ce a răspuns la acțiunea compușilor 6b și 6c, acesta din urmă având o eficacitate superioară diclonei. Pe tulpina de *C. albicans* izolată din focarele infecțioase diclona a surclasat derivații având rest de morfolină, respectiv de acid salicilic. S-a observat un efect antibacterian asupra *E. coli* în cazul diclonei, nu și în cazul selenoderivaților. Compusul 6a a fost activ doar pe *S. pyogenes*, în timp ce pe *C. albicans* tulpina standard s-a observat un efect antimicrobian doar în cazul derivatului 6b.

Capitol 7. Evaluarea potențialului antiproliferativ al noilor derivați de 1,4-naftochinonă

În acest capitol sunt prezentate rezultatele experimentelor ce au urmărit efectele unor derivați naftochinonici asupra proliferării celulelor din linii celulare de adenocarcinom mamar și osteosarcom.

Au fost testați pe o linie celulară de adenocarcinom mamar de tip epitelial, MDA-MB-231, derivații 2-tio-3-*N*-substituiți ai 1,4-naftochinonei: 2-tio-3-(*N*-tiazol-2-ilamino)-1,4-naftochinonă (compus a), 2-tio-3-(*N*-[4-(1-carboxi-2-hidroxi-fenil)amino]-1,4-naftochinonă (compus b), 2-(dietilamino)etil-4-(1,4-dihidro-2-tio-1,4-dioxonaftalen-3-ilamino) benzoat (compus c).

Am observat că derivații analizați au acțiune diferită asupra proliferării celulelor MDA-MB-231. Dacă pentru compusul a nu am remarcat influență semnificativă asupra creșterii celulare în comparație cu probele de control, pentru ceilalți doi derivați, b și c, am observat o influență dependentă de doză. La concentrații mici, efectul celor doi compuși a fost asemănător, cu o activitate mai bună pentru b. Efectul lui c asupra viabilității celulare a crescut cu creșterea concentrației soluției testate. Rezultatele arată că tratamentul celulelor cu derivatul c a indus o scădere a viabilității la 86,55% în cazul celulelor tratate cu soluția de concentrație 1 μM , la 79,88% pentru 2,5 μM , 25% și 18% pentru 5 μM , respectiv 10 μM ($p < 0,05$), comparativ cu controlul. Pentru derivatul NQ-PAS (compus b), viabilitatea celulară a fost influențată mai mult la concentrații mici 77,14% pentru soluția 1 μM , 72,33% pentru 2,5 μM , 39,12% și 32,5% pentru 5 μM , respectiv 10 μM , comparativ cu celulele control ($p < 0,05$).

Pentru testarea efectului antiproliferativ a trei hetero 1,4-naftochinone, conținând grupe tiol substituie cu resturi de acizi alcanoici (etanoic sau propanoic) în poziția 2 sau în pozițiile 2 și 3, am folosit liniile celulare MCF-7 și MG63.

MCF-7 este tot o linie celulară cancer mamar, izolată din efuzia pleurală de la o pacientă de 69 ani, rasa caucaziană, cu carcinom ductal invaziv. MG-63 este o linie de tip fibroblastic, celulele fiind izolate din os de la un pacient de rasa caucaziană cu osteosarcom.

Au fost testați compușii: acid 2-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il-tio) etanoic (compus 1), acid 3-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il-tio) propanoic (3) și acid 3,3'-[(1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2,3-diil)-ditio] dipropanoic (4), împreună

cu vitamina K. Testul MTT nu a pus în evidență scăderea viabilității celulelor MCF-7 și MG-63 sub acțiunea compușilor testați după 24 ore. După 48 ore, am observat că derivații analizați au acțiune diferită asupra proliferării celor două tipuri celulare. În cazul liniei celulare de carcinom mamar MCF-7, analiza macroscopică a plăcilor rezultate după testul MTT a indicat o variație a intensității culorii datorate formazanului mai marcată decât în cazul celulelor MG-63.

În cazul celulelor MCF-7, menadiona a avut efect antiproliferativ marcat relativ independent de doză, rata de supraviețuire a celulelor reducându-se semnificativ față de control, însă fără diferențe marcate între soluțiile de diferite concentrații. Pentru linia celulară MCF-7, doar în cazul compusului 1 am observat o variație dependentă de doză a efectului acestuia asupra viabilității celulelor. Rezultatele arată că tratamentul celulelor MCF-7 cu compusul 1 nu a indus o scădere a ratei de supraviețuire mult diferită în cazul tratamentului cu soluții mai puțin concentrate, dar odată cu creșterea concentrației soluției către cea maximă testată (1000 μ M) rata de supraviețuire a scăzut drastic, la 31,95%.

În cazul derivatului 3, media valorilor obținute a indicat o ușoară scădere a ratei de supraviețuire celulare independentă de doză, însă deviațiile standard mari pun în discuție acuratețea rezultatului. Compusul 4 a dovedit un efect inconstant asupra ratei de supraviețuire, viabilitatea celulelor fiind similară la concentrațiile limită ale intervalului testat.

Concluzii

În cadrul acestei lucrări mi-am propus să sintetizez noi derivați de 1,4-naftochinonă 2,3-disubstituită cu potențială activitate biologică (antibacteriană, antifungică sau antitumorală).

Obiective specifice stabilite:

- sinteza derivaților de 1,4-naftochinonă imaginați – a fost propusă sinteza unor structuri noi grupate în trei categorii, în funcție de particularitățile structurale, după cum urmează: derivați 2-cloro-3-*N*-substituiți, derivați 2-hidroseleno-3-*N*-substituiți, respectiv tioderivați de 1,4-naftochinonă;

- caracterizarea fizico-chimică a compușilor sintetizați – purificare prin recristalizare, testarea purității prin cromatografie, confirmarea structurilor prin spectrometrie UV-Vis, FTIR, precum și în urma analizelor RMN-¹H;

- evaluarea activității antibacteriene a compușilor sintetizați prin metoda difuzimetrică și metoda diluțiilor succesive pe bacterii Gram pozitive și Gram negative;

- evaluarea activității antifungice a noilor compuși pe specii de *Candida albicans*;

- evaluarea activității antiproliferative a compușilor sintetizați pe două linii celulare de adenocarcinom mamar (MCF-7 și MDA-MB-231);

- evaluarea activității antiproliferative a compușilor sintetizați pe linie celulară de osteosarcom uman (MG-63).

Compușii sintetizați au dovedit activitatea antibacteriană variabilă, fiind activi mai ales pe bacteriile Gram pozitive. Unii derivați au avut efect antifungic fiind activi nu doar pe specii standardizate, ci și pe *C. albicans* izolată din focare de infecție.

Este necesară continuarea cercetărilor pentru a determina proprietățile farmacologice *in vivo* și potențialul acestora de a fi utilizați ca agenți antimicrobieni.

Rezultatele obținute la testarea activității antiproliferative încurajează studii ulterioare referitoare la identificarea mecanismelor de inhibare a creșterii celulare prin care acționează acești compuși.

Bibliografie selectivă

3. Akiyoshi, T., Matzno, S., Sakai, M., Okamura, N., Matsuyama, K. 2009. The potential of vitamin K3 as an anticancer agent against breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* 65, pp.143–150

12. Babula, P., Adam, V., Havel, L., Kizek, R. 2009. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones—Their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Curr Pharm Anal.* 5, pp.47–68

40. Coelho-Cerqueira, E., Netz, P.A., do Canto, V.P., Pinto, A.C., Follmer, C. 2014. Beyond topoisomerase inhibition: antitumor 1,4-naphthoquinones as potential inhibitors of human monoamine oxidase. *Chem Biol Drug Des.* 83(4), pp.401-410

42. Crețu, F.M., Stănoiu, B.P., Pisoschi, C.G., Predescu, A.M., Rău, G. 2017. Biological Evaluation of Two 1,4-Naphthoquinone Derivatives Against a Breast Human Adenocarcinoma Cell Line. *Current Health Sciences Journal.* 43(4), pp.335-339

50. Dong, M., Liu, D., Li, Y.H., Chen, X.Q., Luo, K., Zhang, Y.M., Li, R.T. 2017. Naphthoquinones from *Onosma paniculatum* with Potential Anti-inflammatory Activity. *Planta Med.* 83(7), pp.631-635
70. Gundberg, C.M., Lian, J.B., Booth, S.L. 2012. Vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin: friend or foe? *Advances in Nutrition.* 3(2), pp.149-157
75. Higa, M., Takashima, Y., Yokaryo, H., Harie, Y., Suzuka, T., Ogihara, K. 2017. Naphthoquinone Derivatives from *Diospyros maritima*. *Chem Pharm Bull.* 65, pp.739–745
85. Jin, Y.R., Ryu, C.K., Moon, C.K., Cho, M.R., Yun, Y.P. 2004. Inhibitory effects of J78, a newly synthesized 1,4-naphthoquinone derivative, on experimental thrombosis and platelet aggregation. *Pharmacology.* 70(4), pp.195-200
108. Levenson, A.S., Jordan, V.C. 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research.* 57(15), pp.3071–3078
113. Lien, J.C., Huang, L.J., Teng, C.M., Wang, J.P., Kuo, S.C. 2002. Synthesis of 2-alkoxy 1,4-naphthoquinone derivatives as antiplatelet, antiinflammatory and antiallergic agents. *Chem Pharm Bull.* 50(5), pp.672-674
114. Lien, J.C., Wu, C.R., Hour, M.J., Huang, L.J., Huang, T.F., Kuo, S.C. 2008. Synthesis of 2,3-disubstituted 1,4-naphthoquinones as antiplatelet agents. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 341, pp.639 – 644
120. Medentsev, A.G., Akimenko, V.K. 1998. Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry.* 47, pp.935-959
132. Ollinger, K., Brunmark, A. 1991. Effect of hydroxyl substituent position on 1,4 naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 266, pp. 21496–21503
142. Plyta, Z.F., Li, T., Papageorgiou, V.P., Mellidis, A.S, Assimopoulou, A.N., Pitsinos, E.N., Couladouros, E.A. 1998. Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 8(23), pp.3385-3390
151. Rău, G., Crețu, M.F., Andrei, A.M., PISOCHI, C.G., Mogoșanu, G.D., Boroghină, A., Baniță, I.M., Stănciulescu, C.E. 2015. Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of new 2-mercapto-3-substituted-1,4-naphthoquinones (I) *Farmacía.* 63(5), pp.665-669
152. Rău, G., Crețu, M.F., Berbecaru-lovan, A., Stănciulescu, C.E., Andrei, A.M., Mogoșanu, G.D., Bălășoiu, M., Baniță, I.M., PISOCHI, C.G. 2016. Screening of thioalkanoic substituted 1,4-naphthoquinones as potent antimicrobial agents. *Farmacía.* 64(6), pp.876-880

169. Stašauskaitė, I., Baltriukienė, D., Kažemėkaitė, M., Razumas, V., Bukelskienė, V. 2006. Study of cytotoxic activity of new 1,4-naphthoquinone derivatives in murine hepatoma cell line. *Biologija*. 2, pp.104-108
175. Tandon, V.K., Kumar, S. 2013. Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. *Expert Opin Ther Pat*. 23(9), pp.1087-1108
176. Tandon, V.K., Maurya, H.K., Mishra, N.N., Shukla, P.K. 2009. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *Eur J Med Chem*. 44(8), pp.3130-3137
186. Ui, H., Ishiyama, A., Sekiguchi, H., Namatame, M., Nishihara, A. Takahashi, Y., Shiomi, K., Otoguro, K., Omura, S. 2007. Selective and potent in vitro antimalarial activities found in four microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 60(3), pp.220–222
187. Verma RP. 2006. Anti-cancer activities of 1, 4-naphthoquinones: A QSAR study. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*. 6(5), pp.489–499
190. Wang, S.H., Lo, C.Z., Gwo, Z.H., Lin, H.J., Chen, L.G., Kuo, C.D., Wu, J.Y. 2015. Synthesis and Biological Evaluation of Lipophilic 1,4-Naphthoquinone Derivatives against Human Cancer Cell Lines. *Molecules*. 20, pp.11994-12015
192. Wellington, K.W. 2015. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones - a review. *RSC Adv*. 5, pp.20309-20338
199. Yan, C.H., Li, F., Ma, Y.C. 2015. Plumbagin shows anticancer activity in human osteosarcoma (MG-63) cells via the inhibition of S-Phase checkpoints and down-regulation of c-myc. *Int J Clin Exp Med*. 8(8), pp.14432-14439