



**UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN
IAȘI
FACULTATEA DE CHIMIE**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE ȘI ȘTIINȚE ALE VIEȚII ȘI
PĂMÂNTULUI**

LUCIAN GABRIEL BAHRIN

Sinteze de noi derivați de flavonoide

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
Prof. dr. habil. MIHAIL-LUCIAN BÎRSĂ**

**IAȘI
2016**

Introducere

Flavonoidele reprezintă o clasă de compuși cu structură polifenolică de origine vegetală, considerați a fi metaboliți secundari ai plantelor. Denumirea de flavonoid provine din cuvântul latin *flavus*, care înseamnă galben, unul din rolurile acestor substanțe fiind acela de pigmentare a petalelor florilor.

În prezent se cunosc peste 9000 de flavonoide,¹ însă acest număr crește de la an la an. Atenția deosebită pe care acești compuși o primesc se datorează în special plajei largi de activități biologice. Diverse studii au relevat faptul că flavonoidele prezintă proprietăți antioxidante,² anti-tumorale,³ antimicrobiene,⁴ antivirale,⁵ antihelmintice,⁶ etc.

Prezenta teză are ca scop aprofundarea studiilor asupra acestei clase de compuși, prin sinteza de noi flavonoide ce conțin sulf, precum și prin investigarea unora dintre proprietățile acestora.

Structură și clasificare

Flavonoidele sunt construite plecând de la același schelet de bază, C₆-C₃-C₆, respectiv două nuclee aromatice unite prin intermediul unei catene formate din trei atomi de carbon. Marea majoritate a flavonoidelor sunt derivați de fenilbenzopiran.

În funcție de poziția în care se leagă restul fenil, se definesc trei mari clase, respectiv *flavonoide*, derivați de 2-fenilbenzopiran, *isoflavonoide*, derivați de 3-fenilbenzopiran, și *neoflavonoide*, derivați de 4-fenilbenzopiran (Figura 1).

Pe lângă aceste trei mari clase, în natură se întâlnesc și flavonoide a căror structură nu derivă din fenilbenzopiran. Acestea se numesc flavonoide minore și sunt încadrate în categoria flavonoidelor datorită scheletului de baza C₆-C₃-C₆. Exemple în acest sens sunt calcone și aurone (Figura 1).

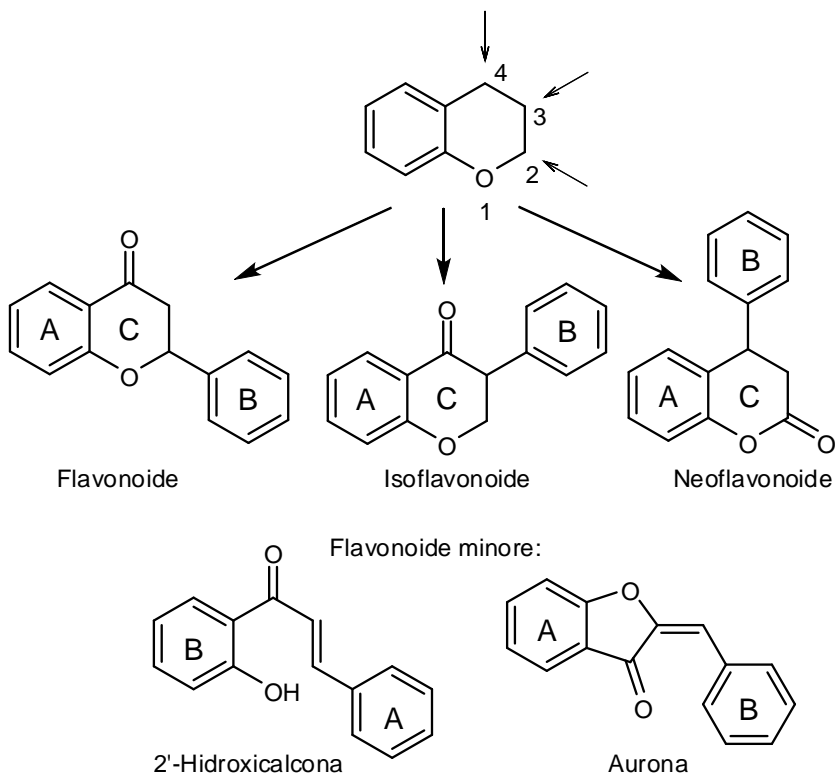


Figura 1 – Structurile de bază ale flavonoidelor, isoflavonoidelor, neoflavonoidelor și flavonoidelor minore.

Proprietăți biologice ale flavonoidelor

Flavonoidele prezintă un interes deosebit datorită interacțiunilor variate cu organismul uman. Acestea pot acționa asupra celulelor canceroase prin diverse mecanisme, cum ar fi declanșarea proceselor ce conduc la apoptoză (moartea programată a celulei),⁷ împiedicarea diviziunii celulare prin depolimerizarea microtubulilor,⁸ sau inhibarea procesului de angiogeneză, respectiv formarea de noi vase de sânge, necesare dezvoltării și proliferării tumorilor.⁹

Flavonoidele au capacitatea de a regla răspunsul inflamator prin mecanisme diverse, cum sunt neutralizarea unor radicali liberi sau reglarea unor factori sau a unor procese celulare implicate în inflamație.^{10,11,12}

Literatura de specialitate dispune de o pleiadă de studii referitoare la capacitatea antioxidantă a flavonoidelor, accentul punându-se pe extracția lor din plante – fructe,¹³ plante de ceai,^{14,15} plante folosite în alte scopuri medicinale¹⁶ - și testarea abilității de a neutraliza diverse specii radicalice.

O serie de studii relevă proprietățile antivirale ale unor flavonoide, prin testarea activității acestora împotriva unor virusuri ca virusul Hepatitei C,¹⁷ virusul Febrei Dengue,¹⁸ sau virusul A/H5N1.¹⁹

Unele flavonoide au potențialul de a fi folosite în tratarea infecțiilor cu viermi intestinali.^{20,21}

Flavonoidele au de asemenea potențial antimicrobian, ele acționând atât împotriva bacteriilor Gram pozitive sau Gram negative, cât și împotriva unor fungi.^{22,23,24,25}

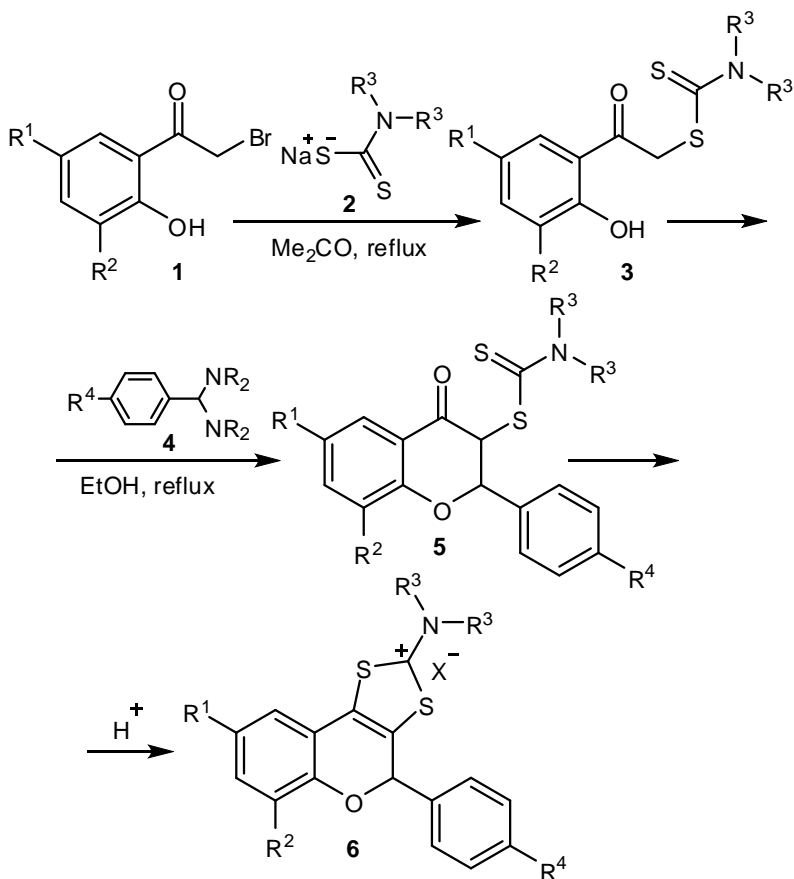
Sinteza unor noi derivați de flavonoide

Teza intitulată “Sinteze de noi derivați de flavonoide” a urmărit obținerea de flavanone substituie în poziția 3 cu un rest ditiocarbamic, precum și a sărurilor de 1,3-ditioliu provenite din ciclizarea acestuia. Astfel, obiectivele acestei teze au fost următoarele:

1. Sinteza unor 6-hidroxi flavanone și a sărurilor de 1,3-ditioliu corespunzătoare.
2. Sinteza unor 6-fluoroflavanone și a sărurilor de 1,3-ditioliu corespunzătoare.
3. Sinteza unor 6-cloroflavanone și a sărurilor de 1,3-ditioliu corespunzătoare.
4. Sinteza unor 6-bromoflavanone și a sărurilor de 1,3-ditioliu corespunzătoare.
5. Sinteza unor 6-iodoflavanone și a sărurilor de 1,3-ditioliu corespunzătoare.
6. Sinteza unor 6,8-diiodoflavanone și a sărurilor de 1,3-ditioliu corespunzătoare.
7. Testarea activității antimicrobiene a unora din derivații noi obținuți.

Toți compușii nou obținuți au fost caracterizați prin spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie de infra-roșu și/sau spectrometrie de masă și de raze X.

Schema 1 prezintă metoda generală de sinteză folosită în obținerea compușilor urmăriți:



Schema 1 – Metoda generală de sinteză a compușilor țintă.

ω -Bromo-2'-hidroxiacetofenonele de tipul **1** reacționează cu diverse săruri ale unor acizi dialchilaminoditiocarbamici, când se obțin ditiocarbamați cu structura **3**. Aceștia, în reacție cu amini de tipul **4** ($\text{NR}_2 = 4H$ -morfolinil) conduc la flavanone de tipul **5**, care au în poziția 3 un rest dialchilaminoditiocarbamic. Prin ciclizarea acestor flavanone în mediu acid, se obțin flavonoidele tricyclice cu structură de săruri de 1,3-ditioliu de tipul **6**.

Toate flavanonele sintetizate se obțin sub forma unui amestec de izomeri *syn* și *anti*, după cum substituenții legați de atomii de carbon C-2 și C-3 sunt orientați spațial de aceeași parte sau de părți diferite față de planul nucleului benzopiranic (Figura 2).

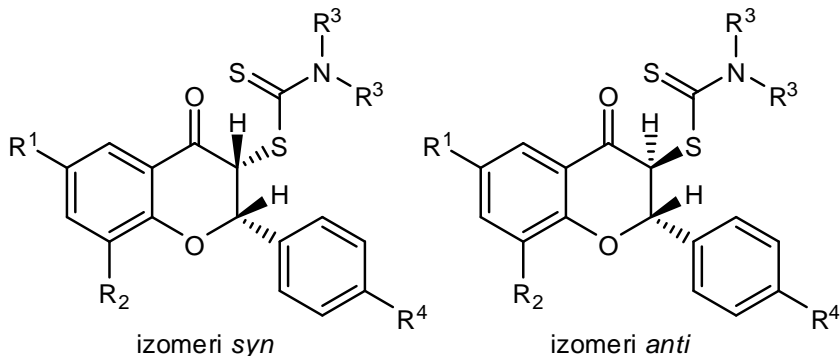


Figura 2 – Structurile izomerilor *syn* și *anti* ale flavanonei de tipul 5.

Detalii privind structurile flavonoidelor sintetizate se regăsesc în Tabelul 1.

Tabelul 1 – Structurile flavonoidelor nou sintetizate.

Flavonoidă	R ¹	R ²	NR ³ ₂	R ⁴	X		
136	OH	H	morfolinil	H	ClO ₄		
				NO ₂			
OMe							
Cl							
137							
144	F	H	dietilamino	F	BF ₄		
				Cl			
Br							
I							
145							
151	Cl	H	dietilamino	F	BF ₄		
				Cl			
Br							
I							
152							
155	Br	H	dietilamino	F	BF ₄		
				Br			
I							
156						dimetilamino	Cl
						pirolidinil	
						piperidinil	
160	I	I	morfolinil	Cl	ClO ₄		
			morfolinil	NO ₂	-		
dietilamino			OMe	ClO ₄			
161			H	dietilamino	F	BF ₄	
					Cl		
					Br		
		I					

Tabelul 1 (continuare)

Flavonoidă	R ¹	R ²	NR ₂ ³	R ⁴	X	Flavonoidă
164 165	a	H	H	morfolinil	H	BF ₄
	b				OMe	
	c	H	H	dietilamino	OMe	
	d	Br	H		Cl	
	e	Br	H		H	
	f	Br	H		OMe	
	g	Br	Br		H	
	h	Br	Br		Cl	
	i	I	I		H	
	j	I	I		Cl	
168		H	H	dietilamino	H	BF ₄
169 166	a	H	H	dietilamino	F	BF ₄
	b				Cl	
	c				Br	
	d				I	
170 171	a	F	H	dietilamino	H	BF ₄
	b	Cl				
	c	Br				
	d	I				

Datele spectrale adunate confirmă structurile propuse pentru noii compuși. Spectrele ¹H RMN ale flavanonelelor relevă dispariția semnalului singlet corespunzător atomilor de hidrogen aflați în poziția α față de gruparea carbonil, din spectrele ditiocarbamaților de tipul **3**. În schimb, se observă apariția a două dublete noi situate între 5.50 ppm și 6.50 ppm, ce corespund atomilor de hidrogen din pozițiile 2 și 3 ale nucleului benzopiranic. Totodată, apar noi semnale corespunzătoare inelului aromatic aflat în poziția 2 a nucleului benzopiranic. Spectrele ¹³C RMN ale flavanonelelor prezintă de asemenea semnale noi, corespunzătoare nucleului aromatic încorporat în reacția

ditiocarbamaților de tipul **3** cu aminalii **4**. Figurile 3 și 4 prezintă spectrele ^1H RMN și ^{13}C RMN ale flavanonei **151b**, înregistrate în CDCl_3 .

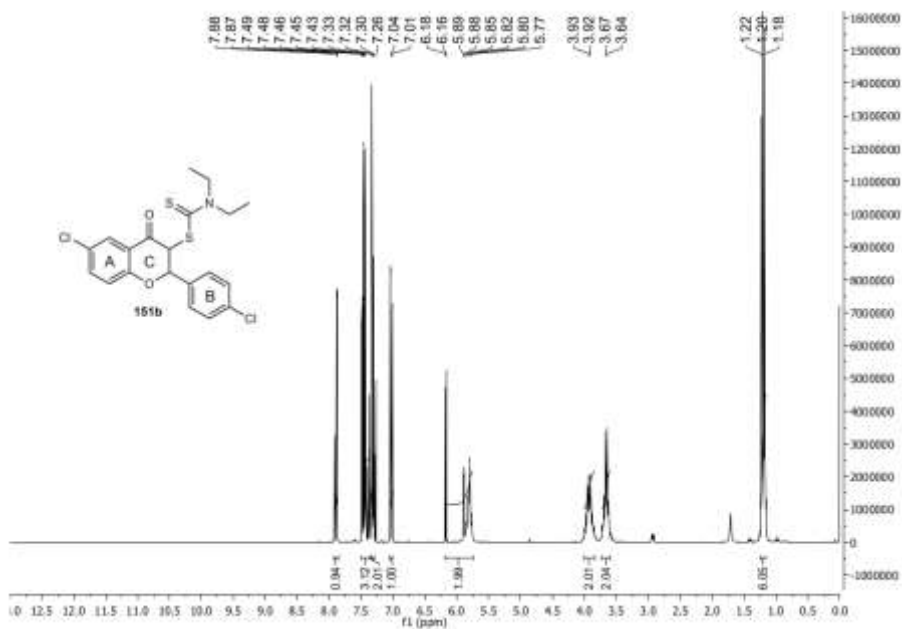


Figura 3 – Spectrul ^1H RMN al flavanonei **151b**, înregistrat în CDCl_3 , la 300 MHz.

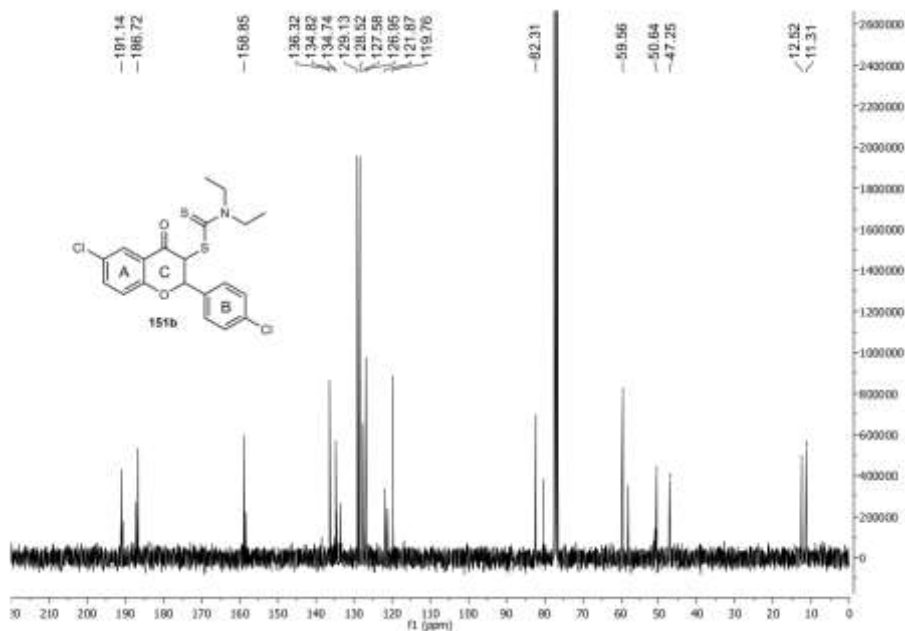


Figura 4 – Spectrul ^{13}C RMN al flavanonei **151b**, înregistrat în CDCl_3 , la 75 MHz.

Etapa de ciclizare a flavanonelelor la sărurile de 1,3-ditioliu corespunzătoare conduce de asemenea la schimbări importante de natură spectrală. Spectrele ^1H RMN ale sărurilor de 1,3-ditioliu prezintă dispariția dubletului corespunzător atomului de hidrogen din poziția 3 ale nucleului benzopiranic, precum și deplasarea semnalului dat de atomul din poziția 3 ale nucleului benzopiranic la aproximativ 6.90 ppm. De asemenea, multiplicitatea acestuia se modifică în singlet. Spectrele ^{13}C RMN ale sărurilor de 1,3-ditioliu prezintă dispariția semnalelor corespunzătoare grupărilor carbonil și tiocarbonil, concomitent cu apariția unui nou semnal în jurul valorii de 184.0 ppm, atribuit atomului de carbon pozitivat din ciclul 1,3-ditiolic. Figurile 5 și

6 prezintă spectrele ^1H RMN și ^{13}C RMN ale flavonoidei triciclice **152b**, înregistrate în $\text{DMSO-}d_6$.

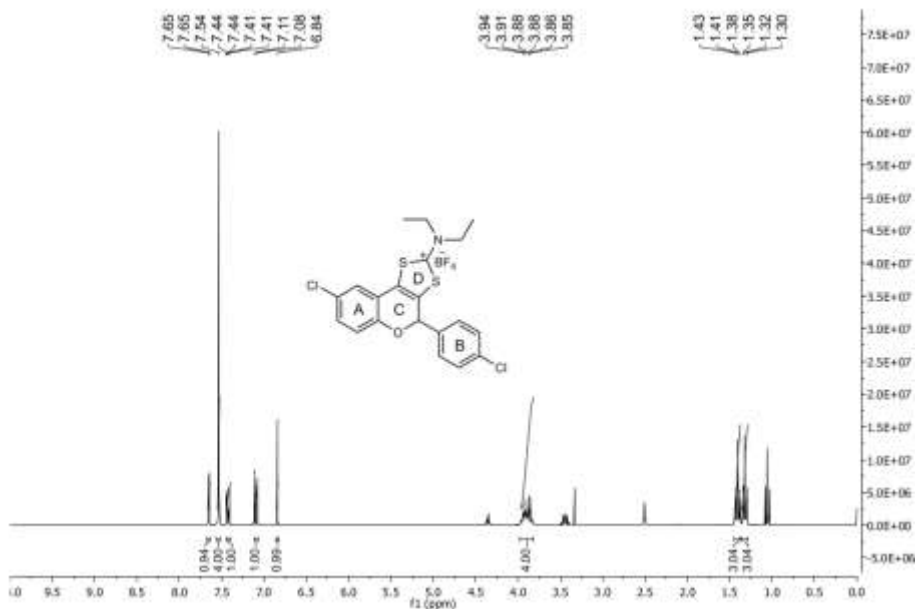


Figura 5 – Spectrul ^1H RMN al flavanonei **152b**, înregistrat în $\text{DMSO-}d_6$, la 300 MHz.

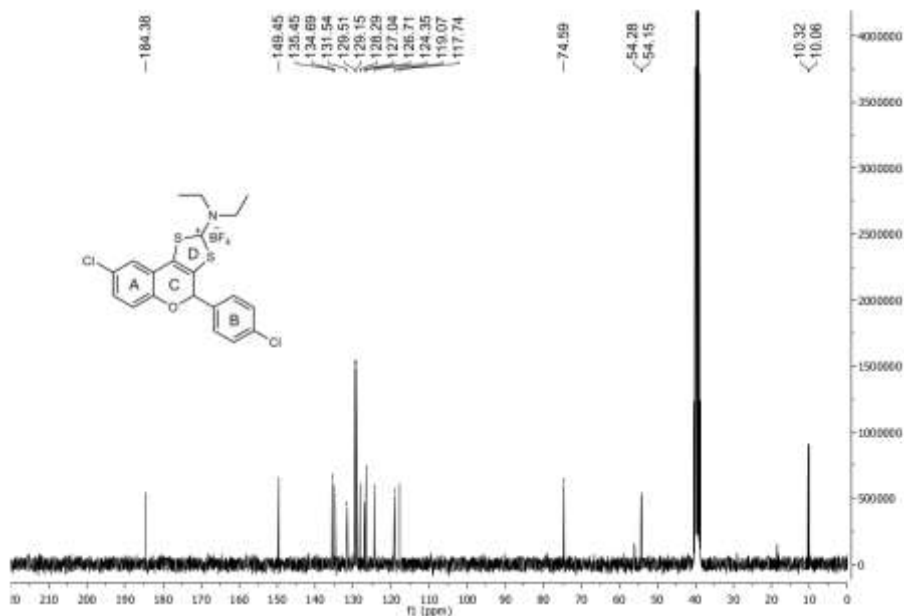
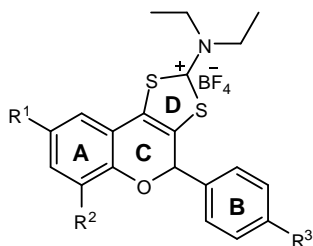


Figura 6 – Spectrul ^{13}C RMN al flavanonei **152b**, înregistrat în $\text{DMSO-}d_6$, la 75 MHz.

Evaluarea proprietăților antibacteriene ale unor flavonoide triciclice

În urma unor teste preliminare²⁶ s-a constatat faptul că flavonoidele triciclice **164d,f,h,j** și **166b** prezintă proprietăți antibacteriene, atât împotriva bacteriilor Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), cât și a celor Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922), rezultatele acestor teste fiind prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2 – Concentrațiile minime inhibitorii ale flavonoidelor triciclice, testate pe culturi de *S. aureus* (*Sa*) și *E. coli* (*Ec*).



	R ¹	R ²	R ³	MIC	
				(µg/ml)	
				<i>Sa</i>	<i>Ec</i>
165d	Br	H	Cl	0.24	3.9
165f	Br	H	OCH ₃	1.95	125
165h	Br	Br	Cl	1.95	7.81
165j	I	I	Cl	0.97	15.62
166b	H	H	Cl	1.95	62.5
DMSO				250	250

Odată cu acestea, au fost testate și flavanonele folosite în cadrul sintezei compușilor **165d,f,h,j** și **166b**, însă acestea nu prezintă activitate antibacteriană. Acest lucru indică importanța pe care ciclul 1,3-ditiolic o are în determinarea proprietăților antibacteriene. Dintre structurile testate, cea mai buna activitate a fost obținută cu flavonoida **165d**, a cărei concentrație minimă inhibitorie este de 0.24 µg/ml pentru *S. aureus* și 3.9 µg/ml pentru *E. coli*. La polul opus, cele mai slabe rezultate au fost obținute pentru flavonoida **165f**, a cărei concentrații minime inhibitorii pentru *E. coli* a fost determinată ca fiind 125 µg/ml. Acest rezultat se datorează cel mai probabil substituentului metoxi aflat în poziția 4'. Flavonidele dublu substituie sau nesubstituie la nucleul aromatic A, prezintă valori ale concentrației minime inhibitorii intermediare. Aceste valori intermediare sugerează faptul că

dimensiunea moleculei joacă un rol important în determinarea activității antimicrobiene.

Au fost de asemenea înregistrate curbele de creștere ale celor două microorganisme în prezența flavonoidei **165d**, la diverse concentrații, iar rezultatele sunt prezentate în Figurile 7 și 8.

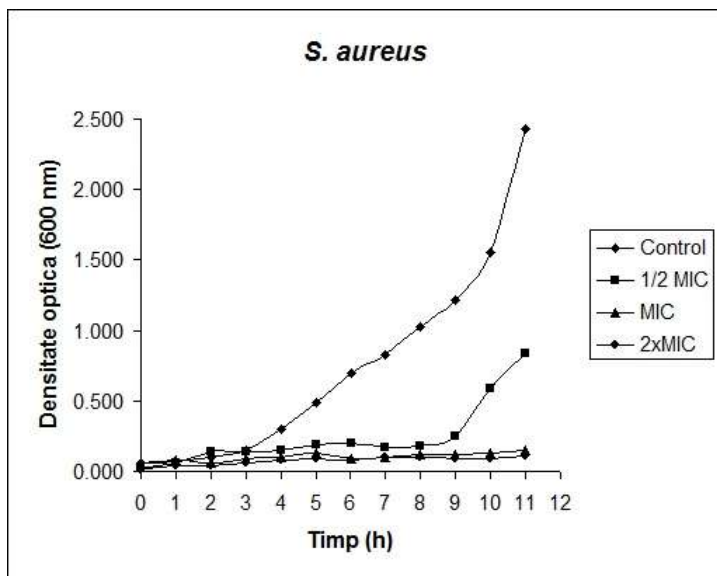


Figura 7 – Curbele de creștere pentru *S. aureus* în prezența a diverse concentrații ale flavonoidei **165d**.

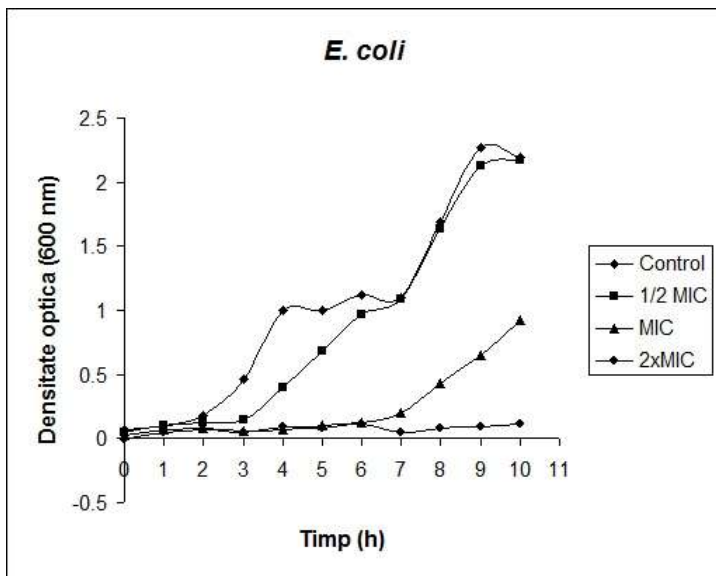


Figura 8 – Curbele de creștere pentru *E. coli* în prezența a diverse concentrații ale flavonoidei **165d**.

În cazul *S. aureus*, microorganismul începe să se dezvolte după 3 ore atunci când compusul **165d** nu se găsește în mediul de cultură (control). Această perioadă este extinsă la 9 ore când în mediu se găsește flavonoida **165d** la o concentrație egală cu $\frac{1}{2}$ MIC și depășește 11 ore când în mediu se găsește flavonoida **165d** la o concentrație egală cu MIC. În cazul *E. coli*, microorganismul își începe dezvoltarea după primele 2 ore, atunci când compusul **165d** nu se găsește în mediul de cultură (control). O concentrație de $\frac{1}{2}$ MIC din flavonoida **165d** extinde această perioada la 3 ore. Dacă în schimb se adaugă flavonoida **165d** într-o concentrație egală cu MIC sau 2 x MIC , perioada de latență este extinsă la 6, respectiv depășește 10 ore.

Rezultatele promițătoare obținute în urma acestor teste ne-au determinat să investigăm mecanismul de acțiune al acestor compuși asupra bacteriilor. O primă ipoteză a constatat într-un mecanism de tipul Maxam-Gilbert.²⁷ Acesta presupune interacțiunea dintre ciclul 1,3-ditiolic și acizii nucleici bacterieni, interacțiune ce ar conduce la scindarea acestor molecule. Pentru a testa această ipoteză, culturi de *S. aureus* și *E. coli* au fost tratate cu flavonoida **165d** (2 x MIC și 10 x MIC), iar ulterior, ADN-ul bacterian a fost extras și supus electroforezei. Rezultatele obținute au infirmat ipoteza de lucru, lanțurile de acizii nucleici nefiind fragmentate (Figura 9).²⁸

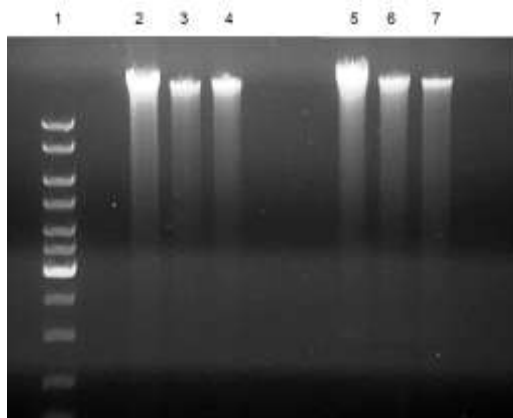


Figura 9 – Rezultatele testelor de fragmentare a ADN-ului microbial; 1 – martor; 2 – *S. aureus* control; 3 – *S. aureus* + **165d** 2 ore; 4 – *S. aureus* + **165d** 3 ore; 5 – *E. coli* control; 6 – *E. coli* + **165d** 2 ore; 7 – *E. coli* + **165d** 3 ore.

O a doua ipoteză urmărită a presupus existența unui mecanism de acțiune asupra peretelui celular bacterian. În acest sens, culturi de

S.aureus și *E. coli* au fost tratate cu iodură de propidiu, respectiv bromură de etidiu, compuși ce interacționează cu acizii nucleici, conducând la apariția unor combinații fluorescente. Pătrunderea acestor coloranți în interiorul celulelor bacteriene se realizează numai atunci când integritatea învelișului celular este afectată, prin urmare apariția unor combinații fluorescente indică celule ale căror învelișuri celulare au avut de suferit datorită prezenței în mediul de cultură a flavonoidei testate. Figura 10 prezintă rezultatele obținute în primele 10 minute pentru *E. coli*. Imaginile au fost înregistrate prin microscopie electronică. Prima imagine a fost obținută prin contrast diferențial de interferență (DIC) și are rolul de a evidenția numărul total de celule de pe suprafața investigată, iar următoarele două imagini au fost obținute la 5, respectiv 10 minute de la expunere la flavonoida **165d**, prin excitare la 488 nm.

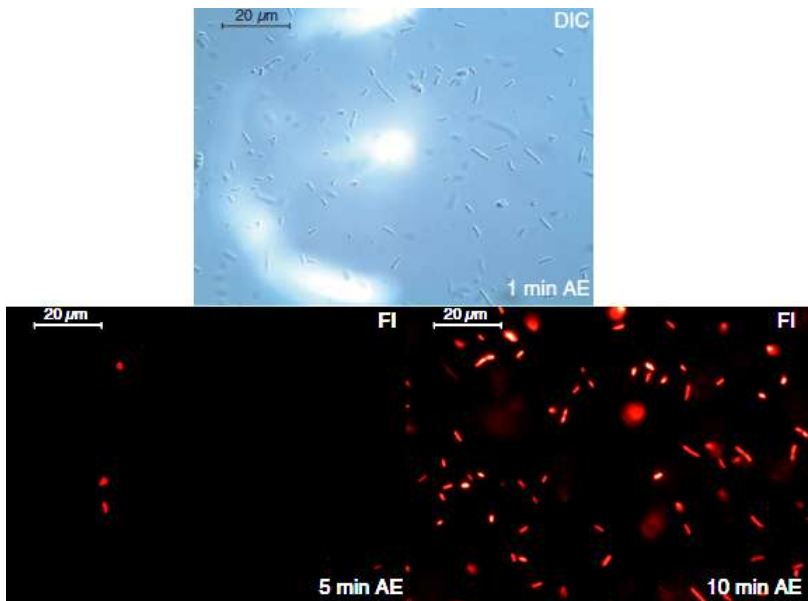


Figura 10 – Rezultatele evaluării integrității membranei celulare la *E. coli*; sus – numărul total de celule investigate (DIC); jos, stânga - celulele fluorescente după 5 minute de la expunere; jos, dreapta - celulele fluorescente după 10 minute de la expunere.

Un al doilea efect pe care flavonoida **165d** l-a avut asupra microorganismelor studiate a putut fi observat prin intermediul microscopiei electronice cu scanare (SEM) și se referă la fenomenul de aglutinare a celulelor bacteriene. Prin expunere timp de două ore la de 2x, respectiv 10x concentrația minimă inhibitorie, a fost observat faptul că celulele bacteriene își schimbă semnificativ morfologia, fapt prezentat în Figura 11.

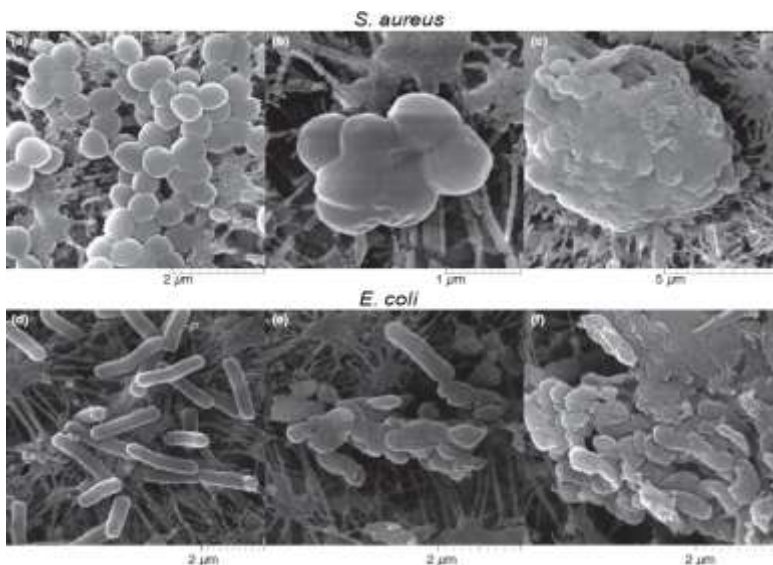
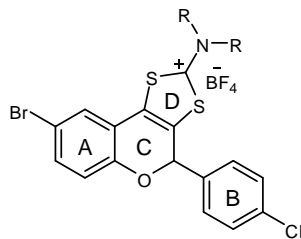


Figura 11 – Imagini obținute prin intermediul SEM; a, d – celule netratate; b, e – 2 x MIC; c, f – 10 x MIC.

Aceste rezultate confirmă existența unui mecanism de acțiune la nivelul peretelui celular bacterian, flavonoidele triciclice de tipul **165d** având capacitatea de a liza membranele celulelor asupra cărora acționează. Odată stabilit un mecanism de acțiune, următorul pas a constat în efectuarea unui studiu structură-activitate pentru flavonoidele triciclice studiate. În acest sens, plecând de la structura **165d**, s-a decis testarea activității antibacteriene a compușilor **155d-f**, care în locul restului de dietilamină, în poziția 2 a ciclului 1,3-ditiolic prezintă resturi de dimetilamină, pirolidină, respectiv piperidină. Rezultatele obținute în urma testărilor pe *S. aureus* și *E. coli* sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3 – efectele flavonoidelor **155d-f** asupra *S. aureus* (*Sa*) și *E. coli* (*Ec*), în comparație cu flavonoida **165d**.

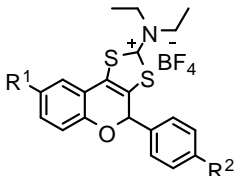
	NR ₂	MIC (μg/ml)		
		<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	
	165d	dietilamino	0.24	3,9
	155d	dimetilamino	7.81	15.62
	155e	pirolidinil	1.95	3.9
	155f	piperidinil	62.5	125

Astfel, ordinea creșterii activității antibacteriene în funcție de gruparea dialchilamino folosită este piperidinil < dimetilamino < pirolidinil < dietilamino. Odată stabilită gruparea dietilamino ca fiind cea optimă, s-a decis investigarea influenței substituenților greșiți pe nucleele aromatice A și B. Din rezultatele prezentate în Tabelul 2 se observă că valorile concentrațiilor minime inhibitorii sunt cele mai mici atunci când pe inelul A se află un singur substituent, legat de acesta în poziția 6 a nucleului benzopiranic. Ținând cont de această observație, s-a decis testarea influenței pe care o au halogenii, legați în pozițiile 6 și 4', asupra activității antibacteriene a flavonoidelor triciclice de tipul **165d**, în comparație cu flavonoidele triciclice nesubstituie în pozițiile 6 și 4'.

În acest scop, activitatea flavonoidelor triciclice **168**, **166a-d** și **171a-d**, dar și a flavonoidelor triciclice **145a-d**, **152a-d**, **156a-c** și **161d-g** a fost testată pe culturi de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922, determinându-se atât concentrațiile

minime inhibitorii, cât și concentrațiile minime bactericide. Prin concentrație minimă bactericidă (MBC) se înțelege concentrația minimă a agentului antibacterian la care microorganismele sunt omorâte. Rezultatele obținute în urma acestor determinări sunt prezentate în Tabelul 4.^{26,29,30}

Tabelul 4 – Valorile MIC și MBC ale flavonoidelor **145a-d**, **152a-d**, **156a-c**, **161d-g**, **168**, **166a-d** și **171a-d** obținute în urma testelor efectuate pe *S. aureus* (*Sa*) și *E. coli* (*Ec*).

	R ¹	R ²	MIC (μg/ml)		MBC (μg/ml)	
			<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>
168	H	H	62.5	62.5	250	250
166a	H	F	7.81	125	7.81	125
166b	H	Cl	3.9	125	7.81	125
166c	H	Br	1.95	62.5	1.95	125
166d	H	I	0.97	31.17	1.95	62.5
171a	F	H	7.81	62.5	15.62	125
145a	F	F	7.81	125	3.9	125
145b	F	Cl	3.9	15.62	7.81	15.62
145c	F	Br	1.95	7.81	7.81	15.62
145d	F	I	1.95	3.9	0.97	7.81
171b	Cl	H	3.9	62.5	3.9	125
152a	Cl	F	1.95	15.62	3.9	15.62
152b	Cl	Cl	0.24	3.9	0.48	3.9
152c	Cl	Br	0.24	3.9	3.9	1.95
152d	Cl	I	0.24	1.95	0.48	0.97

Tabelul 4 (continuare)

171c	Br	H	1.95	7.81	1.95	250
156a	Br	F	1.95	15.62	1.95	15.62
165d	Br	Cl	0.24	3.9	0.24	7.81
156b	Br	Br	0.48	3.9	0.97	7.81
156c	Br	I	0.48	3.9	1.95	7.81
171d	I	H	0.97	7.81	7.81	62.5
161d	I	F	1.95	7.81	1.95	15.62
161e	I	Cl	0.48	3.9	1.95	15.62
161f	I	Br	0.48	3.9	1.95	7.81
161g	I	I	0.48	3.9	1.95	7.81
Kanamycină			1.95	7.81	1.95	7.81
Ampicilină			7.81	7.81	nd	nd
DMSO (μl/ml)			250	125	nd	nd

În linii generale, se poate afirma că activitatea antibacteriană a compușilor testați crește odată cu volumul substituenților, cea mai slabă activitate fiind observată pentru flavonoida **168**, nesubstituită în pozițiile 6 și 4'. Față de aceasta, se observă o îmbunătățire semnificativă a proprietăților antibacteriene ale flavonoidelor **166a-d** ce sunt nesubstituite în poziția 6, însă au un atom de halogen în poziția 4'. În cadrul acestei serii, proprietățile inhibitorii se dublează în ordinea F < Cl < Br < I pentru *S. aureus*, valoarea MIC scăzând de la 7.81 μg/ml când în poziția 4' se găsește un atom de fluor, la 0.97 μg/ml, când în poziția 4' se găsește un atom de iod. În cazul valorilor MIC înregistrate pentru *E. coli*, nu se observă îmbunătățiri semnificative față de rezultatele înregistrate pentru compusul de referință **168**, însă tendința de scădere a valorii MIC de la fluor (125 μg/ml) la iod (31.17 μg/ml) se menține. În ceea ce privește proprietățile bactericide ale compușilor **166a-d**, acestea

sunt semnificativ mai pronunțate față de compusul nesubstituit **168**. Valorile MBC cele mai bune, de 1.95 μg/ml pentru *S. aureus* și 62.5 μg/ml pentru *E. coli*, au fost înregistrate pentru compusul **166d**, substituit în poziția 4' cu un atom de iod.

Seria de flavonoide substituie cu un atom de fluor în poziția 6 a nucleului benzopiranic prezintă valori ale MIC pentru *S. aureus* asemănătoare cu flavonoidele **166a-d** nesubstituie în poziția 6. În cazul *E. coli* însă, valorile MIC sunt de până la 8 ori mai scăzute. Tendința de îmbunătățire a proprietăților antibacteriene observată anterior se păstrează și în acest caz, valorile MIC înregistrate pentru *E. coli* scăzând de la 62.5 μg/ml pentru **171a** (4'-H) până la 3.9 μg/ml pentru **145d** (4'-I). Proprietățile bactericide suferă de asemenea îmbunătățiri față de seria anterioară, valorile MBC cele mai scăzute, de 0.97 μg/ml pentru *S. aureus* și 7.81 μg/ml pentru *E. coli* fiind înregistrate pentru compusul **145d**, substituit cu un atom de iod în poziția 4'.

Trecerea de la flavonoidele 6-fluoro substituie la cele 6-cloro substituie aduce cu sine o îmbunătățire suplimentară a valorilor MIC. Această serie prezintă 3 valori ale MIC de 0.24 μg/ml pentru *S. aureus*, valori determinate pentru compușii **152b-d** (4'-Cl, 4'-Br și 4'-I substituie). În cazul *E. coli*, cea mai scăzută valoare MIC a fost de 1.95 μg/ml, pentru compusul **152d**. Cele mai bune valori ale MBC au fost de 0.48 μg/ml în cazul *S. aureus*, înregistrate pentru flavonoidele **152b** (4'-Cl) și **152d** (4'-I). Aceasta din urmă a prezentat și cea mai scăzută valoare MBC pentru *E. coli*, de doar 0.97 μg/ml.

Înlocuirea cu brom a atomului de clor din poziția 6 a nucleului benzopiranic nu conduce la apariția unor îmbunătățiri substanțiale legate de proprietățile antibacteriene ale flavonoidelor testate. Cea mai activă flavonoidă o reprezintă compusul **165d** (4'-Cl), cu valori MIC de 0.24 μg/ml pentru *S. aureus* și 3.9 μg/ml pentru *E. coli*. În privința valorilor MBC, flavonoida **165d** prezintă cea mai scăzută valoare pentru *S. aureus* dintre toți compușii testați, de doar 0.24 μg/ml. Facând referire însă la *E. coli*, valoarea MBC înregistrată este de 7.81 μg/ml, egală cu cea a compușilor **156b** (4'-Br) și **156c** (4'-I).

Trecerea la flavonoidele 6-iodo aduce cu sine menținerea valorilor MIC/MBC la un nivel similar celui întâlnit la flavonoidele 6-bromo substituie. Acest lucru sugerează faptul că depășirea unei anumite dimensiuni moleculare determină atingerea unui plafon în ceea ce privește proprietățile antibacteriene.

Analizând proprietățile flavonoidelor nesubstituie în poziția 4', dar care în poziția 6 a nucleului benzopiranic prezintă un atom de halogen, se observă de asemenea că proprietățile antibacteriene se îmbunătățesc în ordinea $F < Cl < Br < I$.

Compușii care conțin măcar un atom de fluor în moleculă prezintă în general valori ale MIC/MBC semnificativ mai mari față de flavonoidele care în aceeași poziție sunt substituie cu un atom de clor, brom sau iod. Acest lucru ar putea fi o consecință a electronegativității mărite a fluorului, ce poate conduce la crearea unui pol încărcat parțial negativ, împiedicând astfel accesul compusului testat la membrana microbială.

Alături de flavonoidele triciclice prezentate, au fost testate și două antibiotice cunoscute, respectiv kanamicina și ampicilina. În raport cu acestea, 18 flavonoide au fost cel puțin la fel de active în inhibarea culturilor de *S. aureus*, iar 15 dintre ele au dat dovadă de proprietăți bactericide cel puțin la fel de accentuate cum sunt cele ale kanamicinei. Referitor la *E. coli*, 14 flavonoide au avut aceeași valoare sau valori mai mici ale concentrației minime inhibitorii comparativ cu cele două antibiotice, 9 dintre ele prezentând proprietăți bactericide cel puțin la fel de pronunțate ca cele ale kanamicinei.

Cele mai bune valori MIC și MBC au fost înregistrate pentru flavonoida **152d**, ce prezintă un atom de clor în poziția 6 a nucleului benzopiranic și un atom de iod în poziția 4'.

Concluzii

Ținând cont de rezultatele obținute și prezentate în cadrul prezentei teze de doctorat, pot fi trase următoarele concluzii:

1. Au fost sintetizați trei noi ditiocarbamați în vederea utilizării lor ca precursori pentru obținerea unor flavonoide cu sulf. Structurile acestora au fost confirmate prin spectroscopie IR și spectrometrie RMN și de masă. În cazul a doi dintre cei trei ditiocarbamați, structurile au fost de asemenea confirmate prin difracție de raze X.

2. Folosind cei trei ditiocarbamați nou sintetizați, precum și alți ditiocarbamați cunoscuți în literatură, au fost sintetizate șase noi serii de flavanone ce conțin în poziția 3 a nucleului benzopiranic un rest ditiocarbamic, iar în poziția 6 sunt fie nesubstituie, fie hidroxi, fluoro, cloro, bromo sau iodo substituie. Compușii noi au fost caracterizați prin spectroscopie IR și spectrometrie RMN și de masă, datele înregistrate confirmând structurile propuse. În opt cazuri, obținerea de monocristale a permis confirmarea structurilor și prin difracție de raze X. Prin analiza spectrelor ^1H -RMN, s-a stabilit faptul ca flavanonele se obțin sub forma unor amestecuri de perechi de izomeri *syn-anti*. Rapoartele dintre acești izomeri au fost determinate, în cele mai multe cazuri izomerul *anti* fiind cel predominant.

3. Flavanonele ditiocarbamice nou sintetizate au condus în mediu acid la obținerea a șase noi serii de flavonoide triciclice ce au un nucleu de 1,3-ditioliu încorporat. Caracterizarea spectrală a acestora prin spectroscopie IR și spectrometrie RMN și de masă a confirmat structurile propuse. În cazul a trei flavonoide triciclice, structurile au fost analizate și confirmate și prin difracție de raze X.

4. Activitatea antibacteriană a flavanonele și flavonoidelor 1,3-ditiolice halogeno-substituie a fost testată pe culturi de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ca microorganism Gram-pozitiv și *Escherichia coli* ATCC 25922 ca microorganism Gram-negativ. S-a constatat faptul că flavanonele nu prezintă proprietăți antibacteriene, în timp ce

flavonoidele triciclice derivate din acestea prezintă proprietăți inhibitorii și bactericide.

5. Atât proprietățile inhibitorii, cât și cele bactericide sporesc (valorile MIC și MBC scad) în ordinea $H < F < Cl < Br < I$. Cele mai mari valori de concentrație minimă inhibitorie (MIC) și concentrație minimă bactericidă (MBC) au fost obținute pentru flavonoida triciclică nesubstituită la nici unul dintre cele două nuclee aromatice. Odată cu introducerea unui atom de halogen în poziția 4' a nucleului aromatic lateral B, se observă o micșorare succesivă a valorilor MIC și MBC de la fluor la iod. Prin introducerea unui al doilea atom de halogen, în poziția 6 a nucleului benzopiranic, se observă o îmbunătățire suplimentară a proprietăților antibacteriene.

6. În ceea ce privește flavonoidele triciclice dihalogeno-substituite, valorile MIC și MBC scad pe măsură ce volumul molecular crește. Această îmbunătățire a proprietăților antibacteriene atinge un maxim în cazul compusului 6-cloro-4'-iodo substituit, ce prezintă valori ale MIC și MBC de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ și 0.48 $\mu\text{g/ml}$ pentru *S. aureus*, respectiv 1.95 $\mu\text{g/ml}$ și 0.97 $\mu\text{g/ml}$ pentru *E. coli*. Seriile de flavonoide triciclice 6-bromo și 6-iodo substituite aduc o plafonare a valorilor MIC și MBC, cele mai scăzute în cadrul acestor două serii fiind de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ și 0.24 $\mu\text{g/ml}$ pentru *S. aureus* și 3.9 și 7.81 pentru *E. coli*, înregistrate pentru compusul 6-bromo-4'-cloro substituit.

7. Prin studierea mecanismului de acțiune asupra microorganismelor, s-a ajuns la concluzia că flavonoidele triclice conduc la afectarea / distrugerea membranei celulare, neavând nici un efect asupra materialului genetic al bacteriilor.

8. Prin raportare la două antibiotice cunoscute, kanamicina și ampicilina, 15 flavonoide au fost cel puțin la fel de active împotriva culturilor de *S. aureus*. Referitor la *E. coli*, 9 flavonoide au avut o activitate cel puțin la fel de sporită ca cea a antibioticelor de referință.

9. A fost sintetizat un număr de 93 de noi compuși ce fac subiectul a 9 lucrări publicate în jurnale cotate ISI. Totodată, autorul prezentei teze este co-autor la un număr de 9 lucrări publicate în jurnale cotate ISI ce au vizat proceduri experimentale utilizate în cadrul elaborării acestei teze.

Lista de lucrări elaborate în cadrul acestei teze de doctorat este prezentată mai jos:

- **Bahrin, L. G.**, Jones, P. G., Hopf, H., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, 8, 1999-2003.
- **Bahrin, L. G.**, Luca, A. C., Birsa, L. M., *Rev. Chim. (Bucharest)*, **2014**, 65, 199-201.
- **Bahrin, L. G.**, Hopf, H., Jones, P. G., Earar, K., Birsa, L. M., *Rev. Chim. (Bucharest)*, **2014**, 65, 174-176.
- **Bahrin, L. G.**, Apostu, M. O., Birsa, L. M., Stefan, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 2315-2318.
- **Bahrin, L. G.**, Hopf, H., Jones, P. G., Earar, K., Birsa, L. M., *Rev. Chim. (Bucharest)*, **2016**, 67, 61-63.
- **Bahrin, L. G.**, Hopf, H., Jones, P. G., Poroch, V., Birsa, L. M., *Rev. Chim. (Bucharest)*, **2016**, 67, 481-494.
- **Bahrin, L. G.**, Hopf, H., Jones, P. G., Sarbu, L. G., Babii, C., Mihai, A. C., Stefan, M., Birsa, L. M., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2016**, 12, 1065–1071.
- **Bahrin, L. G.**, Sarbu, L. G., Hopf, H., Jones, P. G., Babii, C., Stefan, M., Birsa, L. M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 3166-3173.
- Babii, C., **Bahrin, L. G.**, Neagu, A. N., Gostin, I., Mihasan, M., Birsa, L. M., Stefan, M., *J. Appl. Microbiol.*, **2016**, 120, 630-637.

Bibliografie

- ¹. Williams, C. A., Grayer, R. J., *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 539–573.
- ². Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., Kromhout, D., *Lancet*, **1993**, *342*, 1007–1011.
- ³. Pavese, J. M., Farmer R. L., Bergan R. C., *Cancer Metast. Rev.*, **2010**, *29*, 465-482.
- ⁴. Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Cogulu, D., Gencay, M., Salih, B., *Microbiol. Res.*, **2005**, *160*, 189–195.
- ⁵. Song, J. M., Lee, K. H., Seong, B. L., *Antivir. Res.*, **2005**, *68*, 66–74.
- ⁶. Kar, P. K., Tandon, V., Saha, N., *Parasitol. Int.*, **2004**, *53*, 287-291.
- ⁷. Kumar, S., Pathania, A. S., Saxena, A. K., Vishwakarma, R. A., Ali, A., Bhushan, S., *Chem. Biol. Interact.*, **2013**, *205*, 128-137.
- ⁸. Sinha, S., Amin, H., Nayak, D., Bhatnagar, M., Kacker, P., Chakraborty, S., Kitchlu, S., Vishwakarma, R., Goswami, A., Ghosal, S., *Chem. Biol. Interact.*, **2015**, *239*, 1-11.
- ⁹. Tian, S. S., Jiang, F. S., Zhang, K., Zhu, X. X., Jin, B., Lu, J. J., Ding, Z. S., *Fitoterapia*, **2014**, *92*, 34-40.
- ¹⁰. Funakoshi-Tago, M., Okamoto, K., Izumi, R., Tago, K., Yanagisawa, K., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Kasahara, T., Tamura, H., *Int. Immunopharmacol.*, **2015**, *25*, 189–198.
- ¹¹. Abdallah, H. M., Almowallad, F. M., Esmat, A., Shehata, I. A., Abdel-Sattar, E. A., *Phytochem. Lett.*, **2015**, *13*, 74–80.
- ¹². Freitas, M., Ribeiro, D., Tome, S. M., Silva, A. M. S., Fernandes, E., *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *86*, 153-164.

-
- ¹³ . Barreca, D., Gattuso, G., Lagana, G., Leuzzi, U., Bellocco, E., *Food Chem.*, **2016**, *196*, 619–627.
- ¹⁴ . Tan, L. H., Zhang, D., Wang, G., Yu, B., Zhao, S. P., Wang, J. W., Yao, L., Cao, W. G., *Ind. Crop. Prod.*, **2016**, *80*, 123–130.
- ¹⁵ . Yin, D. D., Yuan, R. Y., Wu, Q., Li, S. S., Shao, S., Xu, Y. J., Hao, X. H., Wang, L. S., *Food Chem.*, **2015**, *187*, 20–28.
- ¹⁶ . Xie, J. H., Dong, C. J., Nie, S. P., Li, F., Wang, Z. J., Shen, M. Y., Xie, M. Y., *Food Chem.*, **2015**, *186*, 97–105.
- ¹⁷ . Zhong, Y., Ma, C. M., Shahidi, F., *J. Funct. Foods.*, **2012**, *4*, 87–93.
- ¹⁸ . Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R., AbuBakar, S., *Virol. J.*, **2011**, *8*, art. 560.
- ¹⁹ . Sithisarn, P., Michaelis, M., Schubert-Zsilavec, M., Cinatl, J. *Antivir. Res.*, **2013**, *97*, 41–48.
- ²⁰ . Das, B., Tandon, V., Saha, N., *Parasitology*, **2007**, *134*, 1457–1463.
- ²¹ . Ramsay, A., Williams, A. R., Thamsborg, S. M., Mueller-Harvey, I., *Phytochemistry*, **2016**, *122*, 146–153.
- ²² . Katerere, D. R., Gray, A. I., Nash, R. J., Waigh, R. D., *Fitoterapia*, **2012**, *83*, 932–940.
- ²³ . Thongnest, S., Lhinhatrakool, T., Wetprasit, N., Sutthivaiyakit, P., Sutthivaiyakit, S., *Phytochemistry*, **2013**, *96*, 353–359.
- ²⁴ . Mbaveng, A. T., Ngameni, B., Kuete, V., Simo, I. K., Ambassa, P., Roy, R., Bezabih, M., Etoa, F. X., Ngadjui, B. T., Abegaz, B. M., Meyer, J. J. M., Lall, N., Beng, V. P., *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, *116*, 438–489.

-
- ²⁵ . Okoth, D. A., Chenia, H. Y., Koorbanally, N. A., *Phytochem. Lett.*, **2013**, *6*, 476–481.
- ²⁶ . **Bahrin, L. G.**, Apostu, M. O., Birsa, L. M., Stefan, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 2315-2318.
- ²⁷ . Maxam, A. M., Gilbert, W., *Methods Enzymol.*, **1980**, *65*, 499–560.
- ²⁸ . Babii, C., **Bahrin, L. G.**, Neagu, A. N., Gostin, I., Mihasan, M., Birsa, L. M., Stefan, M., *J. Appl. Microbiol.*, **2016**, *120*, 630-637.
- ²⁹ . **Bahrin, L. G.**, Sarbu, L. G., Hopf, H., Jones, P. G., Babii, C., Stefan, M., Birsa, L. M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 3166-3173.
- ³⁰ . **Bahrin, L. G.**, Hopf, H., Jones, P. G., Sarbu, L. G., Babii, C., Mihai, A. C., Stefan, M., Birsa, L. M., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2016**, *12*, 1065–1071.