



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00406

(22) Data de depozit: 15/07/2021

(41) Data publicării cererii:  
29/11/2021 BOPI nr. 11/2021

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN  
BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR.37,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• SOCEA LAURA-ILEANA, STR. BUDILĂ,  
NR.9, ET.5, AP.31, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• APOSTOL THEODORA - VENERA,  
STR. ANTON PANN, NR.24, ET.1, AP.6,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA,  
STR. AGRICULTORI, NR.44, BL.1, ET.4,  
AP.14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• DRĂGHICI CONSTANTIN,  
BD. TIMIȘOARA NR. 49, BL. CC6, SC. A,  
ET.2, AP. 7, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• OLARU OCTAVIAN TUDOREL,  
STR.ZBOINA NEAGRĂ NR.5, BL.98, SC.1,  
ET.1, AP.8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ISCRULESCU LUCIAN,  
STR.LIVIU REBREANU, NR.7, BL.51, SC.1,  
ET.7, AP.32, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• PAHONȚU ELENA MIHAELA,  
STR.IZBICENI, NR.38, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DUMITRU ALEXANDRU-CLAUDIU,  
STR.NAZARCEA, NR.52, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• NACHAWATI RAED, STR.DINU VINTILĂ,  
NR.6B, BL.2, SC.F, ET.6, AP.57, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DUMITRESCU VLAD-ȘTEFAN,  
STR.TICUȘ, NR.1, BL.M31A, SC.1, ET.8,  
AP.53, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) NOI N-ACILHIDRAZONE CU NUCLEU DIBENZO  
[A, D][7]ANULENIC CU ACȚIUNE CITOTOXICĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la derivați de N-acilhidrazone care conțin un nucleu dibenzo[a, d][7]anulenic cu acțiune citotoxică și la un procedeu de preparare a acestora. Derivații, conform invenției au formula generală: I în care R este 2-clorofenil, 3-bromofenil, 1-fenil-3-metil-

1H-pirazol-4-il sau 2-metoxifenil. Procedeu, conform invenției, constă în condensarea 2-(5H-dibenzo[a, d][7]anulen-5-il)acetohidrazidei cu diverse aldehide.

Revendicări: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



**NOI N-ACILHIDRAZONE CU NUCLEU DIBENZO[A,D][7]ANULENIC PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI  
CU ACȚIUNE CITOTOXICĂ**

BURENUL CENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2021 0406
Data depozit .....	15 -07- 2021

Invenția de față se referă la: sinteza (prin condensarea hidrazidei acidului 5H-dibenzo[a,d][7]anulen-5-ilacetic cu diverse aldehide aromatice sau heterociclice) și evaluarea *in vitro* a citotoxicității a unor noi N-acilhidrazone care conțin un nucleu dibenzo[a,d][7]anulenic cu aplicații în terapia antitumorală.

Invenția se înscrie în cadrul preocupărilor pe plan mondial pentru descoperirea unor noi agenți antitumorali eficienți, care pot inhiba selectiv dezvoltarea celulelor tumorale, dar care nu afectează excesiv celule normale și nu perturbă procesele celulare normale.

Cele mai recente date, disponibile până în 2017, referitoare la cauzele de deces disponibile pentru statele membre ale Uniunii Europene arată că bolile sistemului circulator și cancerul (neoplazmele maligne) au fost, de departe, principalele cauze de deces [[https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes\\_of\\_death\\_statistics/ro](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics/ro)].

Rata standardizată estimată pentru Europa în 2020, pentru toate cazurile de cancer (inclusiv cancerul de piele non-melanom) la bărbați și femei este de 285,2 la 100.000 de locuitori în 2020. Valoarea este mai mare la bărbați (328,5 la 100.000) decât la femei (256,4 la 100.000) [<https://gco.iarc.fr/today/home>].

Conform unui studiu recent, în Statele Unite rata de incidență a cancerului calculată pe baza cazurilor 2013-2017 este de 442,4 la 100.000 de bărbați și femei pe an. Totodată mortalitatea prin cancer calculată pe baza cazurilor 2013-2017 este de 158,3 la 100.000 de bărbați și femei pe an [<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>].

În 2020, diagnosticul și tratamentul cancerului au fost îngreunate de pandemia bolii coronavirus 2019 (COVID-19). De exemplu, accesul redus la îngrijire din cauza închiderii setărilor de îngrijire a sănătății a dus la întâzieri în diagnostic și tratament care pot duce la o scădere pe termen scurt a incidenței cancerului, urmată de o creștere a bolii în stadiu avansat și, în cele din urmă, a mortalității crescute. După creșterea înregistrată în cea mai mare parte a secolului al XX-lea, rata mortalității prin cancer a scăzut continuu până în 2018, înregistrându-se o scădere globală de 31%, datorită reducerii fumatului și a progreselor făcute în detectarea și tratamentul precoce [Siegel, R. L. și colab., “Cancer Statistics”, *CA Cancer J. Clin.*, 2021, 71(1), 7–33].

Având în vedere larga incidență socială și rata mortalității este necesar să se acorde o atenție sporită cercetărilor fundamentale și clinice pentru a putea obține informații suplimentare referitoare la opțiunile de tratament. Acest fapt ar accelera fără îndoială progresul în lupta cu această maladie.

În acest context este necesară introducerea în terapeutică a unor medicamente antitumorale mai eficiente, care să inhibe selectiv dezvoltarea celulelor tumorale, dar care să nu afecteze excesiv celule normale și nu să nu perturbe procesele celulare normale.

Acilhidrazonele posedă o structură privilegiată, capabilă de a se lega de diverse tipuri de bioreceptori. De-a lungul timpului, prin modificarea radicalilor legați de grupa acil, respectiv imino sau obținut o serie de derivați care pot acționa selectiv asupra unui număr mare de ținte moleculare. O serie de compuși din această clasă sunt utilizați în terapie, cum ar fi spre exemplu, nitrofurazona, nitrofurantoina, carbazocromul, nifuroxazida, dantrolena și azumolena [Thota, S. și colab., “*N-Acylhydrazones as drugs*”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2018, 28(17), 2797-2806].

Totodată, compușii din această clasă au fost intens studiați în ultima perioadă în scopul obținerii de noi medicamente antitumorale, mai ales datorită acțiunilor lor biologice care implică capacitatea de a bloca proliferarea celulelor tumorale [Manssour Fraga, C. A. și Alencar, R. D., “*N-acylhydrazone compounds inhibiting histone desacetylase enzymes, pharmaceutical compositions containing same, and method for producing same*”, WO2016154694A1, 2016; Nunes, R. J. și colab., “*Acyl-hydrazone and oxadiazole compounds, pharmaceutical compositions containing the same and uses thereof*”, EP2784061A1, 2014; Demurtas, M. și colab., “*Indole derivatives as multifunctional drugs: Synthesis and evaluation of antioxidant, photoprotective and antiproliferative activity of indole hydrazones*”, *Bioorg. Chem.*, 2019, 85, 568-576]. Au fost obținute o serie de acilhidrazone utilizate ca *link*-eri pentru anticorpi monoclonali [Dalton, K. și colab., “*Branched hydrazone linkers*”, WO 1997023243A1, 1997].

Dandawate și colaboratorii au obținut acilhidrazone derivate de la plumbagin cu acțiune antitumorală asupra unor linii celulare implicate în cancerul de sân [Dandawate, P. și colab., “*Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells*”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22(9), 3104–3108]. De asemenea, Al-Said și colaboratorii au investigat acțiunea unor derivați de acilhidrazonă asupra unor linii celulare implicate în cancerul de sân [Al-Said, M. S. și colab., “*Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives*”, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, 46, 137–141].

Aydin și colaboratorii au studiat recent acțiunea unor compuși din clasa acilhidrazonelor asupra unor linii celulare implicate în cancerul ovarian și leucemie [Aydin, S. și colab., “*Microwave assisted synthesis of some novel flurbiprofen hydrazidehydrazones as anti-HCV NS5B and anti-cancer agents*”, *Marmara Pharm. J.*, 2013, 17, 26–34]. Un derivat de acilhidrazonă obținut de Salum L. B. și colaboratorii prezintă efect antiproliferativ cu potență similară colchicinei atât prin inducerea apoptozei, cât și prin inhibarea polimerizării microtubulilor ceea ce îl poate face util în tratamentul leucemie limfoblastice acute [Salum, L. B. și colab., “*N-(1'-naphthyl)-3,4,5-*

*trimethoxybenzohydrazide as microtubule destabilizer: Synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and in vivo activity against acute lymphoblastic leukemia*”, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, 96, 504-518].

Zheng și colaboratorii au sintetizat derivați de acilhidrazone cu acțiune antiproliferativă asupra liniilor celulare din cancerul pulmonar, A-549 [Zheng, L. W. și colab., “*Synthesis of novel substituted pyrazole-5-carbohydrazide hydrazone derivatives and discovery of a potent apoptosis inducer in A549 lung cancer cells*”, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17(5), 1957-1962]. Gürsoy și Güzeldemirci au raportat activitatea antitumorală a unor astfel de derivați asupra cancerului de prostată [Gürsoy, E. și Güzeldemirci, N. U., “*Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new imidazo[2,1-b]thiazole derivatives*”, *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, 42(3), 320–326].

Acțiunea citotoxică a fost pusă în evidență la o serie de compuși dintre care doi derivați de acilhidrazone care au avut o acțiune comparabilă cu a colchicinei folosită ca substanță de referință în testul de evaluare a efectului antiproliferativ [Govindaiah, P. și colab., “*Design, synthesis, biological and in silico evaluation of coumarin-hydrazone derivatives as tubulin targeted antiproliferative agents*”, *Bioorg. Chem.*, 2019, 91, 103143].

Sreenivasulu și colaboratorii au sintetizat un compus din clasa acilhidrazonelor ce conține un nucleu indolic care a manifestat acțiune antitumorală prin inducerea apoptozei celulare [Sreenivasulu, R. și colab., “*Synthesis, antiproliferative and apoptosis induction potential activities of novel bis(indolyl)hydrazide-hydrazone derivatives*”, *Bioorg. Med. Chem.*, 2019, 27(6), 1043-1055].

Potrivit unui studiu recent, un derivat acilhidrazonic ce conține un ciclu 1,2,4-triazolic a prezentat efect inhibitor marcant al kinazei implicate în replicarea celulară (MARK4) prezentând un efect antiproliferativ simultan cu creșterea producției de specii reactive de oxigen inducând apoptoza [Aneja, B. și colab., “*Design and development of Isatin-triazole hydrazones as potential inhibitors of microtubule affinity-regulating kinase 4 for the therapeutic management of cell proliferation and metastasis*”, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, 163, 840-852].

Compușii cu nucleu dibenzo[a,d][7]anuleninic au numeroase aplicații farmacologice dintre care cea mai importantă este cea psihotropă, de tip antidepresiv (protriptilina, demexiptilina, ciclobenzaprina) [Gillman, P. K., “*Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated*”, *Br. J. Pharmacol.*, 2007, 151(6), 737–748], antihistaminică (ciproheptadina) [Wu, K. G. și colab., „*A comparative study of loratadine syrup and cyproheptadine HCL solution for treating perennial allergic rhinitis in Taiwanese children aged 2-12 years*”, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2012, 25(1), 231-237], anticonvulsivă (citenamida), inhibitoare a metalo-proteazelor [Ilies, M. și colab., “*Protease Inhibitors: Synthesis of Bacterial Collagenase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors Incorporating*

*Arylsulfonylureido and 5-Dibenzo-suberenyl/suberyl Moieties*”, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11 (10), 2227-2239], antimicrobiană [Rosowsky, A. și colab., “*Synthesis of 2,4-diaminopyrido[2,3-d]pyrimidines and 2,4-diaminoquinoxalines with bulky dibenzo[b,f]azepine and dibenzo[a,d]cycloheptene substances at the 6-position as inhibitors of dihydrofolatereductase from pneumocytis carinii, toxoplasma gondii, and mycobacterium avium*”, *J. Heterocycl. Chem.*, 2000, 37(4), 921-926], antiparazitară [Evans, A. T. și Croft, S. L., “*Antileischmanial actions of tricyclic neuroleptics appear to lack structural specificity*”, *Biochem. Pharmacol.*, 1994, 48(3), 613-616].

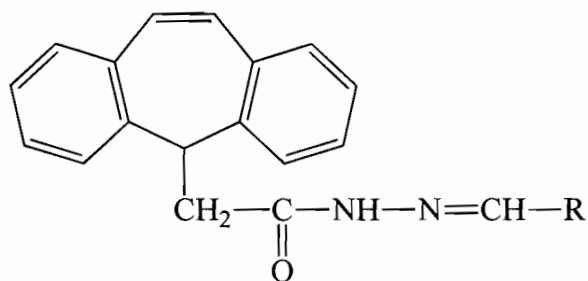
Având în vedere aceste date de literatură și cercetările noastre anterioare în domeniul compușilor ce conțin un nucleul dibenzo[a,d][7]anulenic [Socea, L. I. și colab., “*Synthesis and root growth activity of some new acetylhydrazinecarbothioamides and 1,2,4-triazoles substituted with 5H-dibenzo[a,d]annulene moiety*”, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2012, 77(11), 1541-1549; Socea, L. I. și colab., “*Synthesis and cytotoxicity evaluation of new 5H-dibenzo[a,d][7]annulen-5-yl-acetylhydrazones*”, *Rev. Chim.*, 2015, 66(8) 1122-1127; Socea, L. I. și colab., “*New 1,2,4-triazoles and 1,3,4-oxadiazoles derivatives with a 5H-dibenzo[a,d][7]annulene moieties with potential antimicrobial activity*”, *Rev. Chim.*, 2014, 65(2), 156-159; Socea, L. I. și colab., „*Synthesis and in vitro antibacterial activity of some 1,2,4-triazoles and 1,3,4-oxadiazoles derivatives*”, *Rev. Chim.*, 2014, 65(3), 253-256] s-a realizat sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unei noi serii de compuși în structura cărora s-au reunit două centre farmacofore respectiv: nucleul dibenzo[a,d][7]anulenic și un fragment acilhidrazonic cu efect citotoxic.

Invenția de față se referă la procedeul de obținere a noi acilhidrazone ce conțin un nucleu dibenzo[a,d][7]anulenic și la evaluarea citotoxicității lor, în vederea utilizării în terapia antitumorală.

Obiectul invenției constă în: procedeul de obținere a patru noi *N*-acilhidrazone cu nucleu dibenzo[a,d][7]anulenic, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea *in vitro* a citotoxicității acestora, utilizând biotestul *Daphnia magna*. În testarea acțiunii citotoxice, determinările s-au realizat atât în cazul noilor *N*-acilhidrazone cu nucleu dibenzo[a,d][7]anulenic, cât și în cazul intermediarului din care au fost sintetizate, 2-(5H-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazida, cu scopul de a se compara proprietățile *N*-acilhidrazonelor cu cele ale precursorului.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în obținerea unor noi compuși din clasa acilhidrazone cu structuri și proprietăți fizico-chimice, cu potențial anticanceros, dar care să nu afecteze excesiv celule normale și să nu perturbe procesele celulare normale.

Noii compuși din clasa *N*-acilhidrazone ce conțin un nucleul dibenzo[a,d][7]anulenic conform invenției, sunt reprezentați prin formula generală I:



în care: R = 2-clorofenil, 3-bromofenil, 1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-4-il sau 2-metoxifenil.

Conform invenției, procedeul general de obținere a noilor acilhidrazone parcurge următoarele etape:

a) Sinteza 2-(5*H*-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **II**

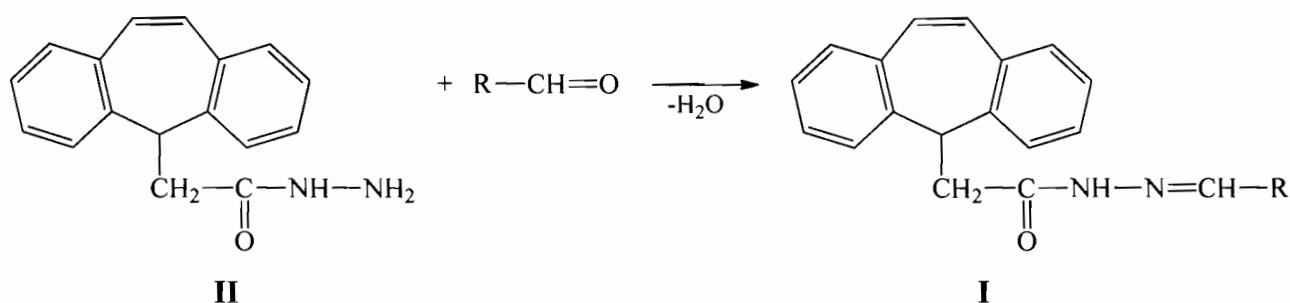
Pentru obținerea compușilor noi din clasa acilhidrazonelor, la care se referă invenția, s-a folosit ca materie primă 2-(5*H*-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazida **II** care a fost sintetizată la rândul său, în mai multe etape, conform datelor din literatură [Nossek, N., “*Compuși dibenzocicloalcanici bioogic activi*”, Bull. Științific Stud., I.P.B. Seria Chimie-Metalurgia, 1977, I(1), 80-89; Șaramet, I. și colab. “*Synthesis of new substituted 3-mercapto-1,2,4-triazols possessing 5-H-dibenzo[a,d]ciclohepten moieties*”, Heterocycl. Comm., 2003, 9, 653-658].

b) Sinteza 2-(5*H*-dibenzo[a,d][7]anulen-5-ilacetil)hidrazonelor **I** (conform schemei 1)

Sinteza 2-(5*H*-dibenzo[a,d][7]anulen-5-ilacetil)hidrazonelor **I** s-a realizat prin reacția de condensare a 2-(5*H*-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **II** cu diverse aldehide.

Materia primă, 2-(5*H*-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazida **II** s-a solubilizat în etanol prin încălzire la reflux pe o plită electrică, sub agitare magnetică (cu o viteză de rotație de 1100 rpm). Apoi s-a adăugat aldehida corespunzătoare și s-a continuat refluxarea pe o plită electrică, sub agitare magnetică (cu o viteză de rotație de 600 rpm). În general, după 10-30 minute s-a observat formarea unui precipitat. La obținerea unei acilhidrazone a fost necesară adăugarea unei cantități suplimentare de etanol. Timpul de refluxare a variat între 8-18 h, în funcție de aldehida folosită. Amestecul de reacție a fost lăsat să se răcească, iar produsul solid format a fost filtrat și spălat cu mici cantități de etanol. Purificarea produșilor s-a realizat prin recristalizare din etanol.

S-a urmărit optimizarea condițiilor de reacție prin modificarea cantității de solvent folosită și prin studiul influenței timpului de reacție. S-a stabilit că utilizarea unui volum mai mare de solvent, precum și prelungirea timpului de reacție determină în anumite cazuri creșterea randamentului de reacție și a purității compușilor obținuți.



Schema 1

Datorită nucleului dibenzo[a,d][7]anulenic și a legăturii amidice, noii compuși pot exista sub forma a patru izomeri de conformație, motiv pentru care în spectrele de RMN se constată o dedublare a semnalelor [Socea, L. I. și colab., „*New N-acylhydrazones with Potential Cytotoxic Activity*”, *Rev. Chim.*, 2018, 69(12), 3341-3344].

*Avantajele aplicării invenției* sunt:

- compușii din clasa acilhidrazonelor cu nucleu dibenzo[a,d][7]anulenic pot fi sintetizați cu randamente de reacție mari, cu o puritate ridicată, într-un interval de timp scurt, la reflux;

- comparativ cu compuși din aceeași clasa sintetizați anterior [Socea, L. I. și colab., “*Synthesis and cytotoxicity evaluation of new 5H-dibenzo[a,d][7]annulen-5-yl-acetylhydrazones*”, *Rev. Chim.*, 2015, 66(8), 1122-1127; Socea, L. I. și colab., „*New N-acylhydrazones with Potential Cytotoxic Activity*”, *Rev. Chim.*, 2018, 69(12), 3341-3344], datorită particularităților structurale și a proprietăților fizico-chimice, compușii obținuți prezintă avantajul unei bune acțiuni citotoxice, dar și a lipsei de teratogenitate demonstrată prin examenul morfologic al naupliilor de *Artemia salina*;

- derivații acilhidrazonelor cu nucleu dibenzo[a,d][7]anulenic obținuți pot fi folosiți ca intermediari pentru sinteza unor combinații complexe cu acțiune antitumorală superioară liganzilor [Despaigne, A. A. R. și colab., “*2-Acetylpyridine-and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium (III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells*”, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 50, 163–172].

*Reactivi, aparatură și metode de analiză utilizate*

Toți reactanții și solvenții folosiți au fost achiziționați comercial cu cea mai mare puritate și au fost utilizați fără purificare ulterioară.

Sinteza s-a realizat cu ajutorul unui agitator magnetic cu încălzire model AREC.T, la 200 °C, cu viteză de agitare reglabilă.

Temperaturile de topire sunt necorectate și au fost determinate cu un aparat Bötius, cu o viteză a încălzirii de 3 °C/min.

Spectrele de absorbție în UV-Viz au fost înregistrate folosind un spectrofotometru Analytic Jena AG Specord 40 (soluție în metanol de concentrație  $\approx 10^{-5}$  sau  $1,5 \cdot 10^{-5}$  M), în intervalul 200-600 nm.

Spectrele absorbție în IR au fost înregistrate folosind un spectrometru FT-IR, Bruker Vertex 70, prin pastilare în KBr, în intervalul 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Spectrele de RMN au fost înregistrate folosind un aparat Varian Gemini 300BB, la 300 MHz pentru  $^1\text{H}$ -RMN și la 75 MHz pentru  $^{13}\text{C}$ -RMN, la temperatura camerei, în solvent deuterat dimetilsulfoxidul deuterat (DMSO- $d_6$ ) (cu grad de deuterare de minim 98%). Ca standard intern s-a folosit tetrametilsilanul (TMS). Deplasările chimice ( $\delta$ ) sunt raportate în părți pe milion (ppm) față de TMS și constantele de cuplaj ( $J$ ) sunt exprimate în hertz (Hz). În  $^1\text{H}$ -RMN, pentru exprimarea multiplicității semnalelor s-au folosit următoarele abrevieri: s – singlet; sl – singlet larg; d – dublet; dl – dublet larg; m – multiplet.

Analiza elementală a fost efectuată utilizând un microanalizor elemental Costech ECS 4010.

Se dau în cele ce urmează patru exemple de realizare a invenției.

#### Exemplul 1.

Sinteza *N*'-(2-clorobenziliden)-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **I** (R = 2-clorofenil)

La 0,934 g (0,00353 moli) 2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazidă **II** s-au adăugat 40 mL etanol și s-a refluxat amestecul sub agitare magnetică pe o plită electrică până la solubilizare (viteză de rotație 1100 rpm). După solubilizare, s-au adăugat 0,40 mL (puritate = 99%,  $d = 1,248$  g/mL, 0,00353 moli) 2-clorobenzaldehida și s-a continuat refluxarea pe o plită electrică, sub agitare magnetică (viteză de rotație 600 rpm). S-a obținut o soluție limpede din care la rece s-a separat un precipitat. Timpul de refluxare a fost 10 h. Amestecul de reacție a fost lăsat să se răcească, iar produsul solid format a fost filtrat și spălat cu mici cantități de etanol. Purificarea produsului s-a realizat prin recristalizare din etanol, obținându-se cristale alb-gălbui.

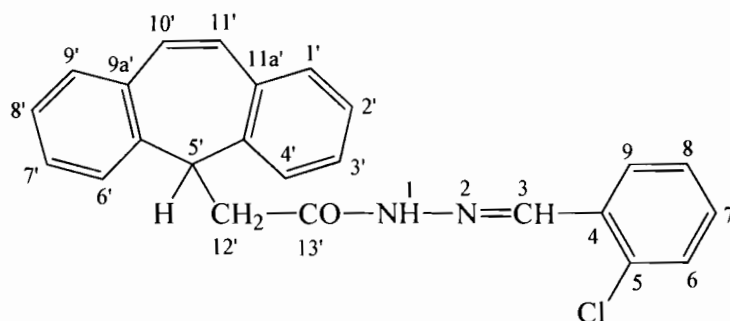
Rezultă 1,158 g compus; randament = 84,71%; p.t. = 222-224 °C (etanol).

Analiza UV-Viz (soluție în metanol de concentrație  $\approx 1,5 \cdot 10^{-5}$  M,  $\lambda$  nm): 210,0, 289,0;

Analiza FT-IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3189 (N-H), 3021, 3009 (C-H nucleu aromatic), 2956, 2932, 2870 (CH, CH<sub>2</sub>), 1672 (C=O), 1595 (C=N), 1560, 1490 (C=C), 801 (C-Cl);

Analiza RMN:





$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 12,01; 11,57; 11,37; 11,24 (s, NH); 8,47; 8,23 (1H, s,  $\text{H}^3$ ); 7,85 (2H, m,  $\text{H}^9$ ,  $\text{H}^6$ ); 7,15-7,25 (10 $\text{H}_{\text{ar}}$ , m); 7,05; 7,03 (2H, s,  $\text{H}^{10'-11'}$ ); 4,72-4,64 (1H, m,  $\text{H}^5$ ); 3,01; 2,59 (2H,  $\text{H}^{12'}$ , d, 7,7).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 172,25 ( $\text{C}^{13}$ ); 141,62 (2Cq); 139,62 (C3); 138,33 (2Cq); 134,81 (Cq); 133,86 (Cq); 133,73 (Cq); 132,90 (Cq); 132,71 (Cq); 131,82; 131,01 ( $\text{C}^{10'-11'}$ ); 129,67 (CH); 129,61 (CH); 129,49 (CH); 128,70 (CH); 127,53 (CH); 126,49 (CH); 126,34 (CH); 125,42 (CH); 49,47; 49,09 ( $\text{C}^5$ ); 35,22; 32,87 ( $\text{C}^{12'}$ ).

Analiza elementală: Calculat pentru  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}$  (386,87 g/mol): C, 74,51; H, 4,95; N, 7,24%.  
Găsit: C, 74,50; H, 4,97; N, 7,22%;

### Exemplul 2.

Sinteza *N'*-(3-bromobenziliden)-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **I** (R = 3-bromofenil)

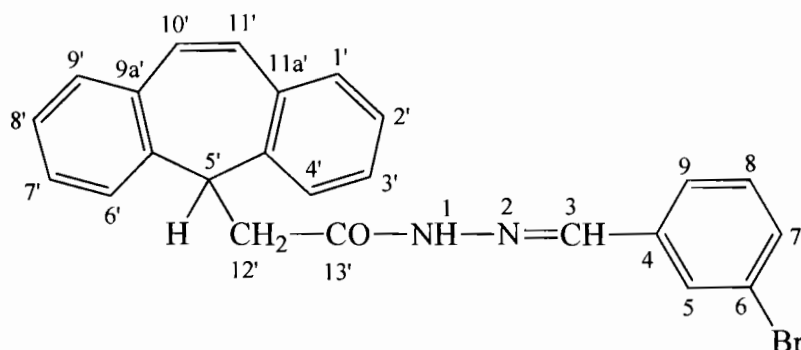
Compusul, sub formă de cristale de culoare albă, s-a obținut prin metoda generală descrisă în exemplul 1, din 0,42 mL (puritate = 97%,  $d = 1,587$  g/mL, 0,00353 moli) 3-bromobenzaldehidă.

Rezultă 1,289 g compus; randament = 84,66%; p.t. = 237-238 °C (etanol).

Analiza UV-Viz (soluție în metanol de concentrație  $\approx 10^{-5}$  M,  $\lambda$  nm): 210,0, 288,0;

Analiza FT-IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3179 (N-H), 3064, 3024 (C-H nucleu aromatic), 2950, 2881, 2852 (CH,  $\text{CH}_2$ ), 1666 (C=O), 1607 (C=N), 1593, 1557, 1495, 1469 (C=C), 684, 567 (C-Br);

Analiza RMN:



$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 11,24; 11,18 (s, NH); 8,04; 7,96 (1H, s,  $\text{H}^3$ ); 7,86 (1H, sl,  $\text{H}^5$ ); 7,78 (1H, dl,  $\text{H}^5$ , 7,1); 7,70-7,15 (8 $\text{H}_{\text{ar}}$ , m); 7,05 (2H, s,  $\text{H}^{10'-11'}$ ); 4,65 (1H, m,  $\text{H}^5$ ); 2,99 (2H,  $\text{H}^{12'}$ , d, 8,0); 2,58 (2H,  $\text{H}^{12'}$ , d, 7,7).

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 172,30; 172,19 ( $\text{C}^{13}$ ); 143,86; 140,31 ( $\text{C}^3$ ); 139,57 (2Cq); 138,80 (Cq); 136,33 (2Cq); 133,85 (Cq); 133,73 (Cq); 132,28 (Cq); 132,05 (Cq); 131,27; 130,95 ( $\text{C}^{10'-11'}$ ); 130,83 (CH); 130,70 (CH); 129,92 (CH); 129,62 (CH); 129,50 (CH); 129,41 (CH); 128,76 (CH); 128,38 (CH); 127,57 (CH); 125,95 (CH); 123,03 (CH); 122,76 ( $\text{C}^6$ ); 49,70; 49,09 ( $\text{C}^5$ ); 35,18; 33,00 ( $\text{C}^{12}$ ).

Analiza elementală: Calculat pentru  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}$  (431,32 g/mol): C, 66,83; H, 4,44; N, 6,49%. Găsit: C, 66,84; H, 4,42; N, 6,50%.

### Exemplul 3.

Sinteza  $N'$ -[(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-4-il)metilen]-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **I** (R = 1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-4-il)

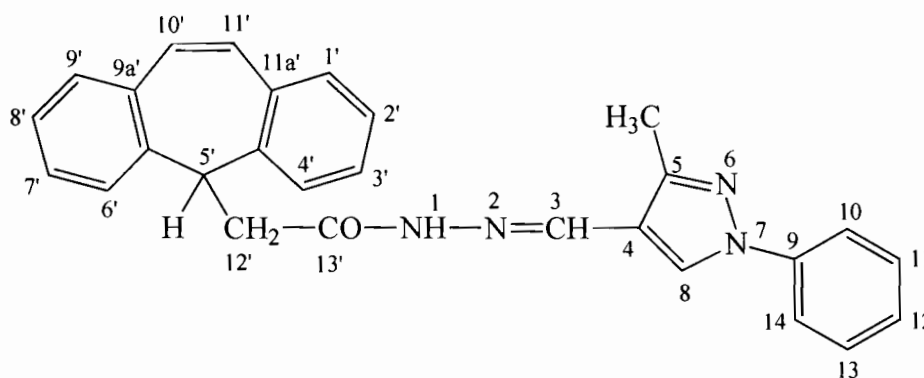
Compusul, sub formă de cristale de culoare albă, s-a obținut prin metoda generală descrisă în exemplul 1, din 0,6791 g (puritate = 97%, 0,00353 moli) 3-metil-1-fenil-1*H*-pirazol-4-carbaldehidă și s-au folosit 50 mL etanol. La 10 minute după adăugarea aldehidei s-a obținut un precipitat. A fost necesară adăugarea unei cantități suplimentare de etanol (10 mL). Timpul de reacție a fost 8 h.

Rezultă 1,415 g compus; randament = 92,60%; p.t. = 246-247 °C (etanol).

Analiza UV-Viz (soluție în metanol de concentrație  $\approx 10^{-5}$  M,  $\lambda$  nm): 210,0, 296,0;

Analiza FT-IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3178 (N-H), 3096, 3051, 3017 (C-H nucleu aromatic, pirazolic), 2956, 2921, 2854 (CH,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1672 (C=O), 1635, 1599 (C=N), 1557, 1509, 1490 (C=C), 1341 (N-N pirazolic);

Analiza RMN:



$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 11,65; 10,94; 10,82 (s, NH); 8,62 (1H, s,  $\text{H}^3$ ); 7,80-7,10 (14 $\text{H}_{\text{ar}}$ , 1H pirazol-  $\text{H}^8$ , m); 7,03 (2H, s,  $\text{H}^{10'-11'}$ ); 5,02 ( $\text{H}^5$ , t, 6,6), 4,71 ( $\text{H}^5$ , t, 6,6); 2,99 (2H,  $\text{H}^{12'}$ , d, 6,6); 2,43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 171,50 ( $\text{C}^{13'}$ ); 148,56 (Cq); 139,94 (2Cq); 136,22 ( $\text{C}^3$ ); 133,87 (2Cq); 133,67 (CH); 131,19 ( $\text{C}^{10'-11'}$ ); 130,69 (CH); 129,46 (CH); 128,89 (CH); 127,51 (CH); 126,37 (CH); 117,99 (2CH); 48,92 ( $\text{C}^{5'}$ ); 32,90 ( $\text{C}^{12'}$ ); 14,08 ( $\text{CH}_3$ ).

Analiza elementală: Calculat pentru  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$  (432,52 g/mol): C, 77,75; H, 5,59; N, 12,95 %.  
Găsit: C, 77,75; H, 5,61; N, 12,94%.

#### Exemplul 4.

Sinteza *N'*-(2-metoxibenziliden)-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **I** (R = 2-metoxifenil)

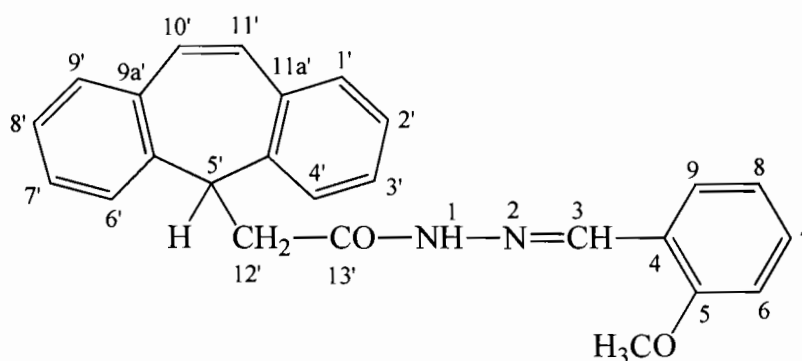
Compusul, sub formă de cristale de culoare albă, s-a obținut prin metoda generală descrisă în exemplul 1, din 0,491 g (puritate = 98%, 0,00353 moli) 2-metoxibenzaldehidă și s-au folosit 55 mL etanol. Timpul de reacție a fost 18 h.

Rezultă 1,08 g compus; randament = 79,94%; p.t. = 206-208 °C (etanol).

Analiza UV-Viz (soluție în metanol de concentrație  $\approx 1,5 \cdot 10^{-5}$  M,  $\lambda$  nm): 210,0, 282,0;

Analiza FT-IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3183 (N-H), 3063, 3018 (C-H nucleu aromatic), 2971, 2935, 2866, 2838 (CH,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1671 (C=O), 1609 (C=N), 1572, 1519, 1487 (C=C), 1257, 1027 (C-O-C)

Analiza RMN:



$^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 11,67; 11,22; 11,02; 10,09 (s, NH); 8,10 (1H, s,  $\text{H}^3$ ); 7,80-6,80 (12 $\text{H}_{\text{ar}}$ ,  $\text{H}^{10'-11'}$ , m); 4,62 (1H,  $\text{H}^{5'}$ , t, 7,7), 3,76 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ ); 2,94 (2H,  $\text{H}^{12'}$ , d, 7,7).

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 171,88 ( $\text{C}^{13'}$ ); 157,40 (Cq); 139,76 (2Cq); 137,94 ( $\text{C}^3$ ); 133,90 (2Cq); 131,30 ( $\text{C}^{10'-11'}$ ); 130,71 (CH); 129,73 (CH); 129,50 (CH); 128,69 (CH); 126,51 (CH); 122,26 (Cq); 120,69 (CH); 111,77 (CH); 55,62 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ); 49,4 ( $\text{C}^{5'}$ ); 33,04 ( $\text{C}^{12'}$ ).

Analiza elementală: Calculat pentru  $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$  (382,45 g/mol): C, 78,51; H, 5,80; N, 7,32%.  
Găsit: C, 78,53; H, 5,78; N, 7,32%.

### Evaluarea citotoxicității

Evaluarea citotoxicității noilor compuși sintetizați s-a realizat prin două metode alternative de testare: biotestul *Daphnia magna* și biotestul *Artemia salina*. De asemenea, s-a realizat și examenul morfologic al larvelor de *Artemia salina* pentru evaluarea potențialului teratogen.

#### Biotestarea pe *Daphnia magna*

Metoda este utilizată în determinarea toxicității medicamentelor, a biocompușilor, a extractelor vegetale, precum și în evaluări ecotoxicologice [Guilhermino, L. și colab., „*Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile Daphnia magna*”, *Chemosphere*, 1996, 32(4), 727-738]. Daphniile utilizate în experiment provin dintr-o cultură partenogenetică de femele din specia *Daphnia magna*, înființată în 2012, în cadrul Facultății de Farmacie din UMF „Carol Davila”, București. Principiul metodei constă în menținerea nevertebratelor *Daphnia magna* în diluții succesive obținute dintr-o substanță de testat și numărarea supraviețuitorilor după 24 și 48 h.

S-a folosit metoda descrisă în literatura de specialitate cu unele modificări [Olaru, O. T. și colab., „*Anticancer potential of selected Fallopia Adans species*”, *Oncology letters*, 2015, 10(3), 1323-1332]. Daphniile utilizate în experiment sunt menținute în condiții de temperatură și iluminare constante (temperatură:  $25 \pm 1$  °C; ciclul iluminare: 16 ore lumină și 8 ore întuneric) și hrănite cu *Saccharomyces cerevisiae*. Au fost folosite exemplare în vârstă de 7-10 zile. Loturile au fost alcătuite din 10 daphnii, la un volum final de 4 mL. Determinările s-au realizat pe 6 concentrații (2,3 – 74 μg/mL) pentru fiecare compus. Pe toată perioada experimentului, organismele nu au fost hrănite, iar mediul nu a fost aerat. Determinările au fost efectuate în duplicat.

Tabelul 1

Rezultatele biotestului *Daphnia magna*

Compus testat	LC50 24h (μg/mL)	IC95% 24h (μg/mL)	LC50 48h (μg/mL)	IC95% 48h (μg/mL)
2-(5H-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazida II	ND	ND	18,07	14,94 – 21,84
Exemplul 1	64,86	55,83 – 75,34	21,73	11,20 – 16,38
Exemplul 2	ND	ND	ND	ND
Exemplul 3	ND	ND	18,21	9,40 – 35,26
Exemplul 4	ND	ND	47,48	41,09 – 54,86

LC50 - concentrație letală 50%.

IC95% - interval de încredere de 95% al LC50.

ND - nedeterminat datorită valorilor letalității mai mici de 20%.

Testarea a evidențiat o toxicitate scăzută pentru derivatul din **exemplul 2** și medie până la ridicată pentru derivații din **exemplele 1, 3 și 4**. La 48 h, citotoxicitatea cea mai ridicată a fost

indusă de derivatul din **exemplul 3**, fiind aproximativ egală cu cea a 2-(5H-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **II**. Chiar dacă valorile LC50 obținute pentru derivatul din **exemplul 1** sunt mai mari, valorile obținute pentru intervalele de încredere indică o citotoxicitate similară cu cea a derivatului din **exemplul 3** și a 2-(5H-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **II**. Compusul din **exemplul 4** a indus o toxicitate medie – ridicată, valoarea LC50 la 48 h fiind situată aproape de limita de 50 µg/mL.

#### Testarea pe *Artemia salina*

Testul de letalitate pe *Artemia salina* L. a fost efectuat utilizând protocolul descris în literatură [Meyer, B. și colab., “*Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents*”, *Planta medica*, 1982, 45(5), 31-34] cu unele modificări [Seremet, O. și colab., “*Toxicity of plant extracts containing pyrrolizidine alkaloids using alternative invertebrate models*”, *Molecular medicine reports*, 2018, 17(6), 7757-7763]. Nauplii de *Artemia salina* au fost obținuți din ouă în mediu salin, iar după 24 h au fost expuse derivaților din exemplele 1-4 la 6 concentrații între 2 – 64 µg/mL. La 24 și 48 de ore s-a numărat numărul de supraviețuitori și s-a calculat procentul de letalitate. Nauplii au fost considerați morți dacă nu și-au mișcat apendicele timp de 20 secunde în timpul observației. Determinările au fost efectuate în duplicat.

Tabelul 2

Rezultatele biotestului *Artemia salina*

Compus testat	LC50 24h (µg/mL)	IC95% 24h (µg/mL)	LC50 48h (µg/mL)	IC95% 48h (µg/mL)
2-(5H-dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazida <b>II</b>	26,47	20,67 - 33,91	7,23	4,293 – 12,19
Exemplul 1	35,98	25,86 - 50,06	18,51	ND*
Exemplul 2	96,05	ND*	26,1	ND*
Exemplul 3	ND**	ND**	16,00	15,57 - 16,44
Exemplul 4	78,10	33,75 - 180,7	26,37	23,34 - 29,79

LC50 - concentrație letală 50%.

IC95% - interval de încredere de 95% al LC50.

ND - nedeterminat datorită valorilor letalității.

\* - intervalul de încredere este prea larg.

\*\* - nu s-a calculat datorită L% mai mici sau egale de 30%.

La 24 h, testarea a evidențiat o toxicitate scăzută pentru derivatul din **exemplul 3** și medie până la ridicată pentru derivații din **exemplele 1, 2 și 4**. La 48 h, toți derivații testați au avut o toxicitate crescută. 2-(5H-Dibenzo[a,d][7]anulen-5-il)acetohidrazida **II** a avut cea mai ridicată toxicitate, fiind urmată de derivații din **exemplele 3, 1, 2 și 4**.

La concentrații mici, toți compușii au indus o letalitate mai mică de 30%, iar examinarea microscopică a naupliilor a relevat lipsa modificărilor morfologice. Astfel, nauplii expuși la concentrații mici (2 – 12  $\mu\text{g/mL}$ ) au prezentat același stadiu de dezvoltare ca cei din lotul martor, fără modificări morfologice. Riscul de teratogenitate este scăzut pentru toți compușii, inclusiv pentru materia primă (2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazida **II**).

### Concluzii

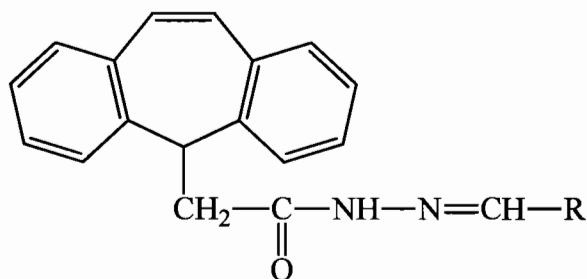
S-a realizat sinteza și caracterizarea a patru noi compuși din clasa acilhidrazonelor ce conțin un nucleul dibenzo[*a,d*][7]anulenic, prin adăugarea nucleofilă a 2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazidei **II** la diverse aldehide.

Evaluarea *in vitro* a citotoxicității utilizând biotestele *Daphnia magna* și *Artemia salina* a pus în evidență faptul că toți derivații sintetizați prezintă o toxicitate medie - ridicată, aceasta indicând activitate o potențială acțiune anticanceroasă. Mai mult, compușii cercetați nu prezintă potențial teratogen asupra *Artemia salina*.



## Revendicări

1. Derivați de *N*-acilhidrazone cu nucleu dibenzo[*a,d*][7]anulenic cu formula generală I:



caracterizați prin aceea că R este 2-clorofenil, 3-bromofenil, 1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-4-il sau 2-metoxifenil.

a. Derivat de *N*-acilhidrazonă cu nucleu **5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulenic** în poziția 2 și un substituent 2-clorfenil la azotul *N* cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este ***N*-(2-clorobenziliden)-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazida**

b. Derivat de *N*-acilhidrazonă cu nucleu **5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulenic** în poziția 2 și un substituent 3-bromofenil la azotul *N* cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este ***N*-(3-bromobenziliden)-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazida**

c. Derivat de *N*-acilhidrazonă cu nucleu **5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulenic** în poziția 2 și un substituent 1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-4-il la azotul *N* cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este ***N*-[(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-4-il)metilen]-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]annulen-5-il)acetohidrazida**

d. Derivat de *N*-acetilhidrazidă cu nucleu **5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulenic** în poziția 2 și un substituent 2-metoxifenil la azotul *N* cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este ***N*-(2-metoxibenziliden)-2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazida.**

2. Procedeu de obținere a derivaților de *N*-acilhidrazonă cu nucleu **5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulenic** în poziția 2 și un substituent la azotul *N* cu formula generală I, definiți în revendicarea 1, prin adăugarea nucleofilă a 2-(5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulen-5-il)acetohidrazidei II la diverse aldehide.

3. Derivați de *N*-acilhidrazonă cu nucleu **5*H*-dibenzo[*a,d*][7]anulenic** în poziția 2 și un substituent la azotul *N* cu formula generală I, definiți în revendicarea 1, cu utilizare pentru efectul citotoxic.