
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Sinteza și caracterizarea chimică și biologică a unor calcone heterociclice

Doctorand **Teodora Constantinescu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Calcone	17
1.1. <i>Generalități</i>	17
1.2. <i>Metode de obținere</i>	18
1.3. <i>Calcone naturale și de sinteză cu potențial biologic</i>	18
2. Flavanone, flavone, hidroxiflavone și derivați acetilați	29
2.1. <i>Flavanone</i>	29
2.1.1. <i>Generalități</i>	29
2.1.2. <i>Metode de obținere</i>	27
2.1.3. <i>Flavanone naturale și de sinteză cu potențial biologic</i>	30
2.2. <i>Flavone și hidroxiflavone</i>	33
2.2.1. <i>Generalități</i>	33
2.2.2. <i>Metode de obținere</i>	33
2.2.3. <i>Flavone naturale și de sinteză cu potențial biologic</i>	35
2.3. <i>Derivați acetilați</i>	39
2.3.1. <i>Generalități</i>	39
2.3.2. <i>Metode de obținere</i>	39
2.3.3. <i>Derivați acetilați naturali și de sinteză cu potențial biologic</i>	39
3. Importanța biologică a nucleului tiazolic. Molecule hibride cu nucleu tiazolic	42
4. Concluzii	47
CONTRIBUTIA PERSONALĂ	49
1. Ipoteza de lucru. Obiective	51
2. Metodologie generală	53
3. Studiul 1. Sinteza și caracterizarea unor calcone tiazolice	55
3.1. <i>Introducere</i>	55
3.2. <i>Ipoteza de lucru. Obiective</i>	55
3.3. <i>Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a calconelor tiazolice</i>	57
3.3.1. <i>Materiale și metode</i>	57
3.3.2. <i>Rezultate și discuții</i>	59
3.3.3. <i>Partea experimentală</i>	61
3.3.4. <i>Concluzii</i>	68
4. Studiul 2. Ciclizarea orto-hidroxicalconelor la flavanone	69
4.1. <i>Introducere</i>	69
4.2. <i>Ipoteza de lucru. Obiective</i>	69
4.3. <i>Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a flavanonelor tiazolice</i>	70
4.3.1. <i>Materiale și metode</i>	70
4.3.2. <i>Rezultate și discuții</i>	73
4.3.3. <i>Partea experimentală</i>	75

4.3.4.	Concluzii	77
5.	Studiul 3. Ciclizarea oxidativă a orto-hidroxicalconelor la flavone și 3-hidroxi- flavone	79
5.1.	Introducere	79
5.2.	Ipoteza de lucru	79
5.3.	Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a flavonelor și 3- hidroxi- flavonelor	80
5.3.1.	Materiale și metode	80
5.3.2.	Rezultate și discuții	84
5.3.3.	Partea experimentală	85
5.3.4.	Concluzii	89
6.	Studiul 4. Acetilarea hidroxicalconelor și a 3- hidroxi- flavonelor	91
6.1.	Introducere	91
6.2.	Ipoteza de lucru. Obiective	91
6.3.	Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a derivaților acetilați	92
6.3.1.	Materiale și metode	92
6.3.2.	Rezultate și discuții	93
6.3.3.	Partea experimentală	95
6.3.4.	Concluzii	99
7.	Studiul 5. Evaluarea potențialului antioxidant pentru compuși tiazolici obținuți	101
7.1.	Introducere	101
7.2.	Ipoteza de lucru. Obiective	102
7.3.	Evaluarea potențialului antioxidant	102
7.3.1.	Materiale și metode	102
7.3.2.	Rezultate și discuții	103
7.3.3.	Concluzii	105
8.	Studiul 6. Evaluarea lipofiliei pentru calconele tiazolice și derivații acestora	107
8.1.	Introducere	107
8.2.	Ipoteza de lucru. Obiective	108
8.3.	Evaluarea experimentală și computațională a lipofiliei	108
8.3.1.	Materiale și metode	108
8.3.2.	Rezultate și discuții	109
8.3.3.	Concluzii	114
9.	Studiul 7. Evaluarea specificității calconelor tiazolice față de tubulină	115
9.1.	Introducere	115
9.2.	Ipoteza de lucru. Obiective	116
9.3.	Evaluarea computațională a specificității compușilor față de tubulină	116
9.3.1.	Materiale și metode	116
9.3.2.	Rezultate și discuții	117
9.3.3.	Concluzii	120
10.	Concluzii generale	121
11.	Originalitatea tezei	125

Cuvinte cheie: calcone, tiazol, ciclizare, lipofilie, antioxidant, tubulina

INTRODUCERE

Hibridarea moleculară este mult utilizată în chimia medicală deoarece reunirea a două sau mai multe entități biologice active într-o moleculă reprezintă un punct de plecare pentru identificarea unor compuși cu proprietăți farmacologice și/sau toxicologice superioare.

Flavonoidele naturale și de sinteză sunt compuși deosebit de importanți datorită numeroaselor proprietăți biologice și a siguranței terapeutice. Se cunoaște că activitățile farmacologice ale acestora sunt dependente de capacitatea lor antioxidantă. Natura scheletului de bază, poziția și natura substituenților sunt elemente determinante pentru tipul și intensitatea efectului terapeutic.

Dintre flavonoide, calcone sunt molecule cu o valoare imensă datorită proprietăților farmacologice diverse, cât și pentru faptul că sunt precursori pentru toate celelalte flavonoide și pentru diferiți compuși heterociclici biologici activi. Interesul crescut pentru acești compuși este determinat de structurile relativ simple, metodele variate prin care pot fi obținuți și lipsa toxicității acestora.

Introducerea unui heterociclu cu cinci atomi este frecvent utilizată. Dintre azoli, substituția cu un nucleu tiazolic constituie un punct de plecare pentru identificarea unor compuși biologici activi noi.

Prin inserarea unui heterociclu în structura calconelor se obțin molecule active cu proprietăți biologice noi și/sau cu o potență superioară.

Lucrarea are două părți. În prima secțiune sunt incluse aspecte generale preluate din literatură despre calcone, flavanone, flavone, derivați acetilați și compuși tiazolici. În a doua secțiune a tezei sunt prezentate rezultatele cercetărilor doctorale efectuate. Acestea sunt structurate în șapte studii care includ o introducere despre tema abordată, ipoteza de lucru și obiectivele urmărite, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute, modul în care a fost realizat fiecare obiectiv și concluziile obținute.

Compușii sintetizați și caracterizați în cadrul cercetărilor efectuate în vederea elaborării tezei de doctorat sunt calcone tiazolice, derivați de ciclizare ai orto-hidroxicalconelor (flavanone, flavone și 3-hidroxi flavone) și derivați acetilați ai

compuşilor cu grupe hidroxi în moleculă (orto și para-hidroxicalcone și 3-hidroxi flavone). Compuşii au fost purificați prin recristalizare sau prin cromatografie pe coloană. Caracterizarea substanțelor obținute s-a realizat prin puncte de topire, R_f , solubilitate și metode spectrale (^1H RMN, ^{13}C RMN și HPLC-MS). S-a evaluat potențialului antioxidant in vitro prin metoda de neutralizare a radicalului DPPH pentru hibridii moleculari obținuți (calcone, flavanone și flavone).

Deoarece lipofilia moleculelor este o caracteristică importantă pentru compușii biologic activi, fiind un indicator important pentru farmacodinamia și farmacocinetica moleculelor, această proprietate s-a studiat pentru compușii obținuți.

Un alt obiectiv al cercetării l-a reprezentat determinarea specificității față de tubulină pentru calconele tiazolice obținute și compararea rezultatelor cu afinitatea pentru tubulină a unor α -metilcalcone preluate din literatură. Motivația acestui studiu l-a constituit predicția mecanismului prin care calconele manifestă proprietăți anticanceroase.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Calcone (Fig.1), 1,3-difenil-2-propen-1-one, sunt precursori pentru toate flavonoidele. Cea mai utilizată metodă de obținere a acestor compuși este reacția de condensare Claisen-Schmidt. În prezent, există compuși din clasa calconelor care sunt aprobați pentru utilizarea terapeutică. Un efect mult studiat al calconelor este activitatea antioxidantă, această proprietate fiind corelată cu majoritatea proprietăților biologice ale acestora.

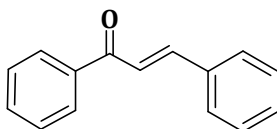


Fig.1 (E)-calcona

Flavanonele (Fig.2) sunt molecule care au în structură un rest de 2-aril-croman-4-onă și sunt obținute din plante sau prin ciclizarea 2-hidroxicalconelor. Prezintă numeroase activități biologice (de exemplu, proprietăți anticanceroase, antibacteriene și antifungice). Aceste proprietăți sunt datorate compușilor de bază, cât și unor metaboliți ai acestora.

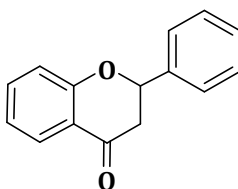


Fig.2 2-fenil-croman-4-ona

Flavonele (Fig.3) (2-fenilcromone) sunt molecule prezente în diferiți produși naturali și de sinteză și constituie un grup important de compuși heterociclici cu oxigen. Pot fi sintetizate prin diferite metode. Se consideră că proprietățile acestora sunt dependente de activitatea lor antioxidantă.

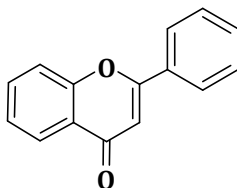


Fig.3 2-fenilcromonă

Se cunoaște că reacția de acetilare este foarte importantă pentru chimia organică, aceasta fiind utilizată pentru protejarea unor grupe funcționale. Există studii care arată că prin acetilarea hidroxiflavonelor au fost obținuți compuși cu proprietăți biologice superioare.

Tiazolul reprezintă un farmacofor important pentru numeroși agenți terapeutici. Există în prezent numeroși compuși naturali și de sinteză cu proprietăți antioxidante, antimicrobiene, antitumorale, antiinflamatoare și antioxidante.

CONTRIBUTIE PERSONALĂ

Pornind de la premisele prezentate anterior, scopul tezei de doctorat a fost sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor calcone tiazolice diferit substituie pe cele două resturi (aldehidă și acetofenonă) și a derivaților acestora din clasele flavanonele, flavonelor și 3-hidroxiflavonelor. De asemenea, compuși cu grupe hidroxi în moleculă au fost acetilați.

Obiectivele cercetării și activitățile importante realizate pentru efectuarea lucrării sunt:

- obținerea aldehidelor tiazolice;
- sinteza și caracterizarea fizico-chimică a 20 de calcone tiazolice și a derivaților acestora (flavanone, flavone, 3-hidroxiflavone și derivați acetilați);
- evaluarea *in vitro* a potențialului antioxidant pentru calconele, flavanonele și flavonele tiazolice sintetizate;
- determinarea lipofiliei pentru calconele, flavanonele, flavonele, 3-hidroxiflavonele tiazolice și a derivaților acetilați ai acestora, prin metode experimentale și computaționale;

- evaluarea computațională a specificității față de tubulină pentru cele 20 de calcone tiazolice și compararea rezultatelor obținute cu datele rezultate, din studiul de afinitate in silico, pentru 31 de calcone non-heterociclice preluate din literatură.

Compușii sintetizați, caracterizați și evaluați au în structură un rest de feniltiazol diferit substituit în poziția para. Prin ciclizarea orto-hidroxicalconelor s-au obținut flavanonele corespunzătoare. Reacția a fost efectuată prin trei metode. În funcție de condițiile de reacție, prin ciclizarea oxidativă a orto-hidroxicalconelor s-au obținut flavone sau 3-hidroxi flavone. Compușii care au în moleculă o grupă hidroxi (hidroxicalcone și 3-hidroxi flavone) au fost acetilați. Structurile generale ale seriilor de compuși obținuți sunt schematizate în Fig 4.

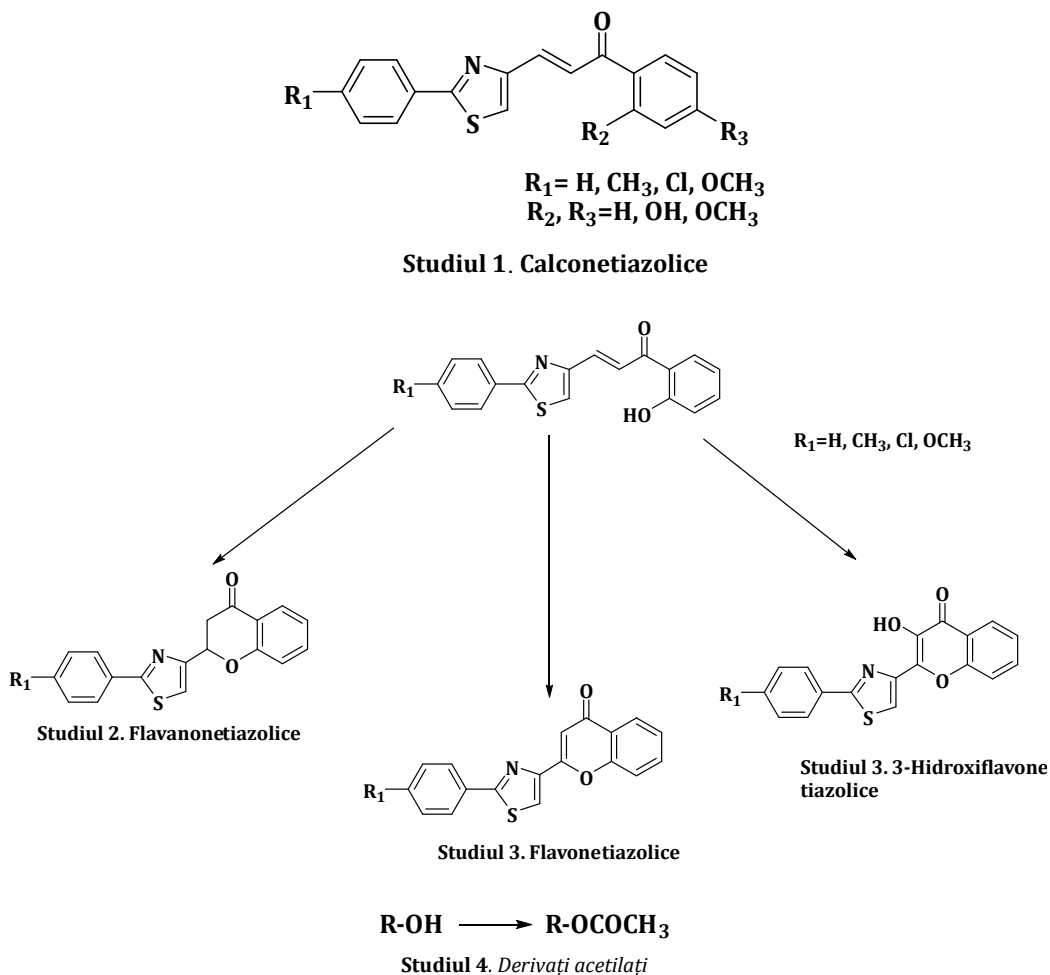


Fig 4. Structurile generale ale compușilor tiazolici obținuți

În **studiul 1** sunt prezente elemente legate de sinteza și caracterizarea a 20 de calcone tiazolice (metoxi- și hidroxicalcone). Acestea au fost obținute prin reacția de condensare Claisen-Schmidt în mediu bazic. S-a studiat corelația între natura și poziția substituenților și viteza de reacție. S-a constatat că metoxicalcone și dimetoxicalcone au o viteză de reacție mai mare comparativ cu hidroxicalcone. De asemenea, timpul de reacție este influențat și de poziția substituentului de pe restul de acetofenonă. Cele patru orto-hidroxicalcone anterior obținute au fost ciclizate la flavanonele tiazolice corespunzătoare (**studiul 2**). În vederea identificării celei mai bune posibilități de obținere, reacția a fost efectuată prin trei metode. Ciclizarea în prezența acidului sulfuric concentrat s-a dovedit cea mai eficientă, iar cea în prezența acidului acetic a fost cea mai puțin eficientă. S-a studiat și influența temperaturii și a naturii substituenților din poziția para a feniltiazolului asupra timpului de reacție. Molecula hibridă substituită cu metil în poziția para a feniltiazolului are cel mai mare timp de reacție (Fig. 5).

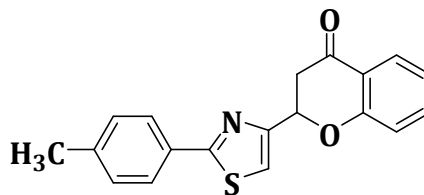


Fig. 5 2-(2-(*p*-tolil)thiazol-4-il)croman-4-onă

De asemenea, orto-hidroxicalcone au fost precursori pentru flavone și 3-hidroxiavone (**studiul 3**). S-au determinat condițiile optime de reacție ale ciclizării oxidative (pentru flavone temperatura, iar pentru 3-hidroxiavone agentul oxidant). În cazul flavonelor, s-a stabilit că temperatura optimă a reacției este de 160°C. Utilizarea complexului uree-peroxid de hidrogen este favorabilă pentru ciclizarea oxidativă a calconelor la 3-hidroxiavonele corespunzătoare.

În **studiul 4** au fost obținuți 12 compuși acetilați obținuți prin esterificarea hidroxicalconelor și a 3-hidroxicalconelor. A fost studiată influența poziției grupei hidroxi de pe restul de acetofenonă și de pe nucleul de cromană asupra condițiilor de reacție. În cazul orto-hidroxicalconelor și a 3-hidroxiavonelor a fost necesară utilizarea unui catalizator suplimentar.

Compușii obținuți în cele patru studii au fost caracterizați spectral prin ^1H RMN, ^{13}C RMN și HPLC-MS.

După sinteza și caracterizarea compușilor obținuți, a fost testată in vitro activitatea antioxidantă pentru 28 de compuși (calcone, flavanone și flavone) (**studiul 5**). Metoda utilizată a fost neutralizarea radicalului liber 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH). Standardele utilizate pentru studiile efectuate sunt acidul ascorbic și quercetina.

Motivul determinării acestei proprietăți pentru compușii obținuți este determinat de faptul că această activitate este corelată cu multe activități biologice ale acestora (de exemplu, proprietățile anticanceroase și antiinflamatoare). Flavanonele prezintă cea mai bună capacitate antioxidantă, fapt explicat prin posibilitatea acestora de a ceda un proton de la nivelul restului de croman-4-onă. Cea mai bună capacitate de inhibare a radicalului DPPH o prezintă flavanona substituită cu o grupă metil în poziția para a feniltiazolului (Fig.5).

În studiul 6 s-a determinat lipofilia pentru compușii obținuți în studiile 1-4 prin cromatografie pe strat subțire în fază inversă (RP-TLC). S-au efectuat corelații între structura chimică a compușilor și capacitatea de retenție a acestora. Dintre cei 44 de compuși analizați, cea mai mare capacitate de retenție o are para-hidroxicalcona substituită cu clor în poziția para a feniltiazolului (Fig.6).

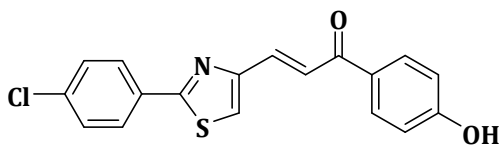


Fig.6 (E)-3-(2-(4-clorfenil)tiazol-4-il)-1-(4-hidroxfenil)prop-2-en-1-onă

Rezultatele obținute au fost comparate cu informațiile rezultate din modelul de regresie liniară multiplă. Din punct de vedere teoretic, compușii analizați se încadrează în moleculele de tip drug-like.

Ultimul subiect cuprins în teză (studiul 7) cuprinde aspecte legate de mecanismul anticanceros al calconelor. Pentru realizarea acestui obiectiv, ținta aleasă a fost tubulina. Rezultatele teoretice obținute pentru cele 20 de calcone tiazolice incluse în studiul 1 au fost comparate cu rezultatele obținute pentru 31 de α -metilcalcone preluate din literatură. Compușii hibridi analizați au o specificitate superioară față de α -metilcalcone.

CONCLUZII GENERALE

- Studiile din domeniul chimiei medicale confirmă potențialul biologic al calconelor și al derivaților acestora (flavanone, flavone, 3-hidroxi flavone, derivați acetilați). Activitățile biologice ale flavonoidelor sunt puternic corelate cu proprietățile antioxidante ale acestora.

- Hibridarea moleculară are ca scop identificarea unor noi compuși biologic activi. În cadrul cercetărilor efectuate și raportate în teză, au fost sintetizate calcone și derivați ai acestora (flavanone, flavone, 3-hidroxicalcone și derivați acetilați ai flavonoidelor cu o grupă OH în moleculă). Având în vedere importanța nucleului tiazolic, s-a introdus acest heterociclu în structura moleculelor sintetizate.

- Douăzeci de calcone tiazolice diferit substituie în poziția para a feniltiazolului au fost sintetizate prin reacția de condensare Claisen-Schmidt în mediu bazic (Studiul 1).

S-au optimizat condițiile de reacție și s-a evidențiat influența substituenților de pe cele două resturi aromatice (aldehidă tiazolică și acetofenonă) asupra vitezei de reacție

- *Patru flavanone tiazolice substituite în poziția para a feniltiazolului au fost obținute prin ciclizarea orto-hidroxicalconelor. Reacția de ciclizare s-a efectuat prin trei metode (**studiul 2**).*

- *Flavonele și 3-hidroxi flavonele au fost obținute prin ciclizarea oxidativă a orto-hidroxicalconelor (**studiul 3**).*

- *Pentru acetilarea orto-hidroxicalconelor și a 3-hidroxi flavonelor a fost necesară utilizarea unui catalizator suplimentar (**studiul 4**).*

- *Structurile tuturor compușilor sintetizați au fost confirmate prin ^1H RMN, ^{13}C RMN și HPLC-MS.*

- *S-a evaluat potențialul antioxidant al calconelor, flavanonelor și flavonelor tiazolice prin testarea in vitro a capacității de neutralizare a radicalului DPPH (**studiul 5**). Flavanonele prezintă cea mai bună capacitate antioxidantă, fapt explicat prin posibilitatea acestora de a ceda un proton de la nivelul restului de croman-4-onă.*

- *Dintre cei 44 de compuși analizați, cea mai mare capacitate de retenție o are para-hidroxicalcona substituită cu clor în poziția para a feniltiazolului. Teoretic, compușii analizați se încadrează în molecule de tip drug-like (**studiul 6**).*

- *În comparație cu 31 α -metilcalcone preluate din literatură și analizate, calcone tiazolice prezintă o specificitate superioară (**studiul 7**).*

ABSTRACT OF THE PhD THESIS

Synthesis and chemical and biological characterization of heterocyclic chalcones

PhD student **Teodora Constantinescu**

PhD supervisor **Prof. Dr. Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	15
5. CHALCONES	17
5.1. <i>Overviews</i>	17
5.2. <i>Methods of obtaining</i>	18
5.3. <i>Natural and synthetic chalcones with biological potential</i>	18
6. Flavanones, flavones, hydroxyflavones and acetyl derivatives	29
6.1. <i>Flavanones</i>	29
6.1.1. <i>Overviews</i>	29
6.1.2. <i>Methods of obtaining</i>	27
6.1.3. <i>Natural and synthetic flavanones with biological potential</i>	30
6.2. <i>Flavones și hydroxyflavones</i>	33
6.2.1. <i>Overviews</i>	33
6.2.2. <i>Methods of obtaining</i>	33
6.2.3. <i>Natural and synthetic flavones with biological potential</i>	35
6.3. <i>Acetyl derivatives</i>	39
6.3.1. <i>Overviews</i>	39
6.3.2. <i>Methods of obtaining</i>	39
6.3.3. <i>Natural and synthetic acetyl derivatives with biological potential</i>	39
7. Biological importance of thiazole nucleus. Hybrid molecules with thiazole nucleus	42
8. Conclusions	47
PERSONAL CONTRIBUTION	49
14. Working hypothesis. Objectives	51
15. General methodology	53
16. Study 1. Synthesis and characterization of some thiazole chalcones	55
16.1. <i>Working hypothesis. Objectives</i>	55
16.2. <i>Synthesis and physico-chemical characterization of thiazole chalcones</i>	57
16.2.1. <i>Materials and methods</i>	57
16.2.2. <i>Results and discussions</i>	59
16.2.3. <i>Experimental part</i>	61
16.2.4. <i>Conclusions</i>	68
17. Study 2. Cyclization of ortho-hydroxychalcones to flavanones	69
17.1. <i>Introduction</i>	69
17.2. <i>Working hypothesis. Objectives</i>	69
17.3. <i>Synthesis and physico-chemical characterization of thiazole</i>	70

<i>flavanones</i>		
17.3.1.	<i>Materials and methods</i>	70
17.3.2.	<i>Results and discussions</i>	73
17.3.3.	<i>Experimental part</i>	75
17.3.4.	<i>Conclusions</i>	77
18. Study 3. Oxidative cyclization of <i>ortho</i>-hydroxychalcones to flavones and 3-hydroxyflavones		79
18.1.	<i>Introduction</i>	79
18.2.	<i>Working hypothesis. Objectives</i>	79
18.3.	<i>Synthesis and physico-chemical characterization of flavones and 3-hydroxyflavones</i>	80
18.3.1.	<i>Materials and methods</i>	80
18.3.2.	<i>Results and discussions</i>	84
18.3.3.	<i>Experimental part</i>	85
18.3.4.	<i>Conclusions</i>	89
19. Study 4. Acetylation of hydroxychalcones and 3-hydroxyflavones		91
19.1.	<i>Introduction</i>	91
19.2.	<i>Working hypothesis. Objectives</i>	91
19.3.	<i>Synthesis and physico-chemical characterization of acetyl derivatives</i>	92
19.3.1.	<i>Materials and methods</i>	92
19.3.2.	<i>Results and discussions</i>	93
19.3.3.	<i>Experimental part</i>	95
19.3.4.	<i>Conclusions</i>	99
20. Study 5. Evaluation of antioxidant potential for obtained thiazole compounds		101
20.1.	<i>Introduction</i>	101
20.2.	<i>Working hypothesis. Objectives</i>	102
20.3.	<i>Evaluation of antioxidant potential</i>	102
20.3.1.	<i>Materials and methods</i>	102
20.3.2.	<i>Results and discussions</i>	103
20.3.3.	<i>Conclusions</i>	105
21. Study 6. Evaluation of lipophilicity for thiazole chalcones and their derivatives		107
21.1.	<i>Introduction</i>	107
21.2.	<i>Working hypothesis. Objectives</i>	108
21.3.	<i>Experimental and computational evaluation of lipophilicity</i>	108
21.3.1.	<i>Materials and methods</i>	108
21.3.2.	<i>Results and discussions</i>	109
21.3.3.	<i>Conclusions</i>	114
22. Study 7. Evaluation of specificity of thiazole chalcones to tubulin		115
22.1.	<i>Introduction</i>	115

22.2.	<i>Working hypothesis. Objectives</i>	116
22.3.	<i>Computational evaluation of specificity of compounds to tubulin</i>	116
	22.3.1. <i>Materials and methods</i>	116
	22.3.2. <i>Results and discussions</i>	117
	22.3.3. <i>Conclusions</i>	120
23.	General conclusions	121
24.	Originality contributions of the thesis	125
25.	REFERENCES	127
26.	ANNEXES	139
	Keywords: <i>chalcone, thiazole, cyclization, lipophilicity, antioxidant, tubulin</i>	

INTRODUCTION

Molecular hybridization is widely used in medicinal chemistry because bringing together two or more biologically active entities in a molecule is a starting point for identifying compounds with superior pharmacological and/or toxicological properties.

Natural and synthetic flavonoids are particularly important compounds due to their numerous biological properties and therapeutic safety. It is known that their pharmacological activities are dependent on their antioxidant capacity. Nature of basic skeleton, position and nature of substituents are determining factors for the type and intensity of therapeutic effect.

Among flavonoids, chalcones are molecules of immense value due to their diverse pharmacological properties, as well as for fact that they are precursors for all other flavonoids and for different biologically active heterocyclic compounds. Increased interest for these compounds is determined by the relatively simple structures, varied methods by which they can be obtained and lack of their toxicity.

Introduction of a five-atom heterocycle is commonly used. From azoles, substitution with a thiazole nucleus is a starting point for identification of new biologically active compounds.

By inserting a heterocycle into the structure of chalcones, active molecules with new biological properties and/or superior potency are obtained.

The work has two parts. The first section includes general aspects about chalcones, flavanones, flavones, acetylated derivatives and thiazolic compounds taken from literature. In the second section of thesis are presented results of doctoral research carried out. They are organised in seven studies including an introduction on topic addressed, working hypothesis and objectives pursued, used materials and methods, results, how each objective was achieved and conclusions.

Synthesized and characterized compounds carried out for development of the doctoral thesis are thiazoles chalcones, cyclization derivatives of ortho-hydroxychalcones (flavanones, flavones and 3-hydroxyflavones) and acetyl derivatives of hydroxy-group compounds in molecule (ortho/para-hydroxychalcones and 3-hydroxyflavones). Compounds have been purified by recrystallization or by column chromatography. Characterization of obtained substances was achieved by melting points, R_f, solubility and spectral methods (¹H NMR, ¹³C NMR and HPLC-MS). Evaluation of antioxidant potential in vitro was carried out by method of neutralizing DPPH radical for obtained molecular hybrids (chalcones, flavanones and flavones).

Since lipophilicity of molecules is an important feature for biologically active compounds, being an important indicator for pharmacodynamics and pharmacokinetics of molecules, this property has been studied for the thiazole compounds.

Another objective of research was to determine specificity of tubulin for thiazole chalcones and to compare results obtained with tubulin affinity of some α -methylchalcones taken from literature. Motivation of this study was the prediction of mechanism by which chalcones exhibit anticancer properties.

STATE OF THE ART

Chalcones (Fig.1), 1,3-diphenyl-2-propen-1-one, are precursors to all other flavonoids. The most commonly used method of obtaining these compounds is Claisen-Schmidt condensation reaction. Currently, there are compounds from chalcones class that are approved for therapeutic use. A much studied effect of chalcones is antioxidant activity, this property being correlated with most other biological activities.

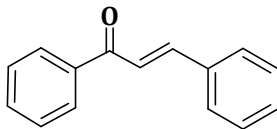


Fig.1 (E)-Chalcone

Flavanones (Fig.2) are molecules that have a remaining 2-aryl-chroman-4-one in their structure and are obtained from plants or from cyclization of 2-hydroxychalcones. It has many biological activities (e.g. anticancer, antibacterial and antifungal properties). These properties are due to both basic compounds and their circulating metabolites.

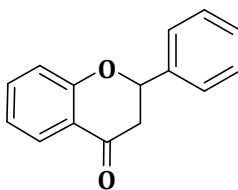


Fig.2 2-phenyl-chroman-4-one

Flavones (Fig.3) (2-phenylchromone) are molecules present in different natural and synthetic products and constitute an important group of heterocyclic oxygen compounds. They can be synthesized by different methods. Their properties are considered to be dependent on their antioxidant activity.

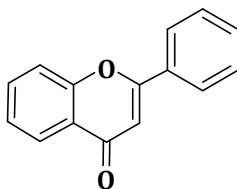


Fig.3 2-phenylchromone

It is known that acetylation reaction is very important for organic chemistry, which is used to protect some functional groups. There are studies showing that by acetylation of hydroxyflavones, compounds with superior biological properties were obtained.

Thiazole is an important pharmacophor for many therapeutic agents. There are currently numerous natural and synthetic compounds with antioxidant, antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory and antioxidant properties.

PERSONAL CONTRIBUTION

Based on premises presented above, the purpose of doctoral thesis was synthesis and physico-chemical characterization of different thiazole chalcones substituted on two subunits (aldehyde and acetofenone) and their derivatives from the classes of flavanones, flavones and 3-hydroxyflavones. Also, compounds with hydroxy groups in molecule were acetylated.

The objectives of research and the most important activities carried out to complete this activity are:

- *obtaining thiazole aldehydes;*
- *synthesis and physico-chemical characterization of 20 thiazole chalcones and their derivatives (flavanones, flavones, 3-hydroxyflavones and acetylated derivatives);*
- *evaluation in vitro of antioxidant potential for synthesized chalcones, flavanones and thiazole flavones;*
- *determination of lipophilicity for thiazole chalcones, flavanones, flavones, 3-hydroxyflavones and their acetylated derivatives by experimental and computational methods;*
- *computational evaluation of tubulin specificity for 20 thiazole chalcones and comparison of results obtained with resulting data from affinity study in silico for 31 non-heterocyclic chalcones taken from literature.*

Synthesized, characterized and evaluated compounds have in their structure a subunit of phenylthiazole different substituted on para position. Flavanones were obtained by cyclization of ortho-hydroxychalcones. Reaction was carried out by three methods. Depending on reaction conditions, flavones or 3-hydroxyflavones were obtained by

oxidative cyclization of *ortho*-hydroxychalcones. Compounds with a hydroxy group (hydroxychalcones and 3-hydroxyflavones) on molecule were acetylated. General structures of series of compounds obtained are summarized in Fig 4.

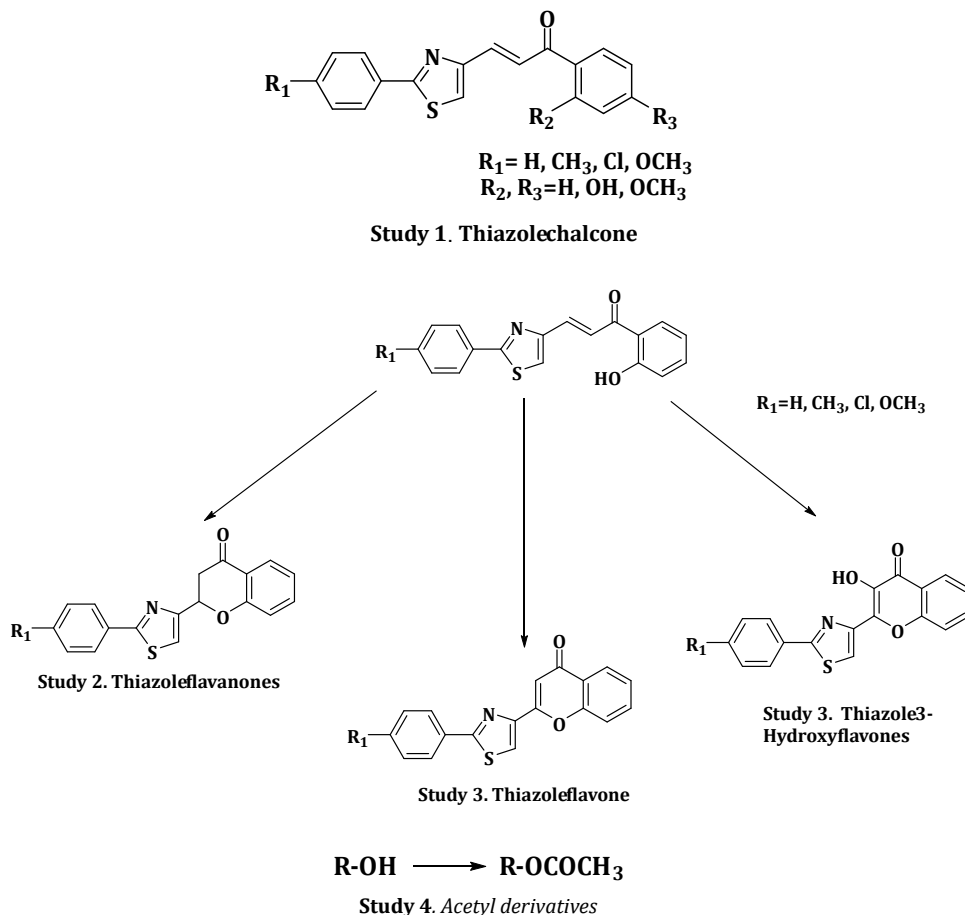


Fig 4. Structures of obtained thiazole compounds

In **study 1**, elements related to synthesis and characterization of 20 thiazolylchalcones (methoxy- and hydroxychalcones) are present. These were obtained by Claisen-Schmidt condensation reaction in basic environment. Correlation between nature and position of substituents and reaction speed was studied. Methoxychalcones and dimethoxychalcones were found to have a higher reaction rate compared to hydroxychalcones. Reaction time is also influenced by position of substituents on acetophenone. The four previously obtained *ortho*-hydroxychalcones were cyclised to the corresponding thiazole flavanones (**study 2**). In order to identify the best possibility of

obtaining, reaction was carried out by three methods. Cyclization in presence of concentrated sulphuric acid proved to be the most effective and cyclization in presence of acetic acid was the least effective. The influence of temperature and nature of substituents from para position of phenylthiazole on reaction time was also studied. Methyl-substituted in para position of phenylthiazole hybrid molecule has the highest reaction time (Fig. 5).

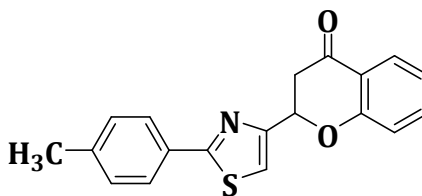


Fig. 5 2-(2-(*p*-Tolyl)thiazol-4-yl)chroman-4-one

Ortho-hydroxychalcones were also precursors to flavones and 3-hydroxyflavones (**study 3**). The optimal reaction conditions of oxidative cyclization (for flavone temperature, and for 3-hydroxyflavone the oxidizing agent) were determined. In case of flavones, it was established that optimal reaction temperature is 160°C. Use of hydrogen urea-peroxide complex is favorable for oxidative cyclization of chalcones to corresponding 3-hydroxyflavones.

In **study 4**, 12 acetylated compounds obtained by esterification of hydroxychalcones and 3-hydroxychalcones were obtained. The influence of position of hydroxy group on acetophenone and the chromene nucleus on reaction conditions has been studied. In case of *ortho*-hydroxychalcones and 3-hydroxyflavones, an additional catalyst was required.

Compounds obtained on the four studies were spectral characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HPLC-MS.

After synthesis and characterization of obtained compounds, antioxidant activity for 28 compounds (chalcones, flavanones and flavones) (**study 5**) was tested *in vitro*. The method used was neutralization of 2,2-diphenyl-picrilhydrazil free radical (DPPH). Standards used for studies are ascorbic acid and quercetin. The reason for determining this property of obtained compounds is determined by the fact that this activity is correlated with many of their biological activities (e.g. anticancer and anti-inflammatory properties). Flavanones have the best antioxidant capacity, which is explained by their ability to give up a proton from the rest of chroman-4-one. The best inhibition capacity of the DPPH radical is flavanone substituted with a methyl group in the para position of phenylthiazole (Fig.5).

In **study 6** lipophilicity was determined for compounds obtained in studies 1-4 by reverse-phase thin-layer chromatography (RP-TLC). Correlations were made between the chemical structure of compounds and their retention capacity. From 44 compounds analyzed, the highest retention capacity has *para*-hydroxychalcone substituted with chlorine in *para* position of phenylthiazole (Fig.6).

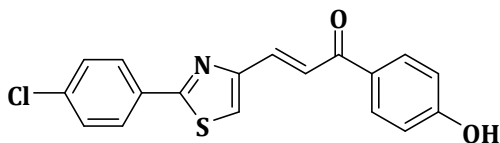


Fig.6 (E)-3-(2-(4-Chlorophenyl)thiazol-4-yl)-1-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one

Results obtained were compared with information derived from multiple linear regression model. Theoretical, analyzed compounds fall into drug-like molecules.

The last topic of thesis (**study 7**) includes aspects related to anticancer mechanism of chalcones. To achieve this goal, the chosen target was tubulin. Theoretical results obtained for the 20 thiazole chalcones included in study 1 were compared with results obtained for 31 α -methylchalcone taken from literature. Hybrid compounds analyzed have a higher specificity than α -methylchalcone.

GENERAL CONCLUSIONS

- Studies in field of medicinal chemistry confirm the biological potential of chalcones and their derivatives (flavanones, flavones, 3-hydroxyflavones, acetylated derivatives). Biological activities of flavonoids are strongly correlated with their antioxidant properties.

- Molecular hybridization aims to identify new biologically active compounds. In research carried out and reported on thesis, chalcones and their derivatives (flavanones, flavones, 3-hydroxychalcones and acetylated flavonoids with an OH group on molecule) were synthesized. Given importance of thiazole nucleus, this heterocycle was introduced into structure of synthesized molecules.

- Twenty different thiazole chalcones substituted in para position of phenylthiazole were synthesized by Claisen-Schmidt condensation reaction in basic environment (**study 1**). Reaction conditions were optimised and the influence of substituents on two aromatic subunits (thiazole aldehyde and acetophenone) on reaction rate was highlighted.

- Four thiazole flavanones substituted in para position of phenylthiazole were obtained by cyclization of ortho-hydroxychalcones. The cyclization reaction was carried out by three methods (**study 2**).

- Flavones and 3-hydroxyflavones were obtained by oxidative cyclization of ortho-hydroxychalcones (**study 3**).

- For acetylation of ortho-hydroxychalcones and 3-hydroxyflavones, an additional catalyst was required (**study 4**).

- Structures of all synthesized compounds were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HPLC-MS.

- *Antioxidant potential of thiazole chalcones, flavanones and flavones was evaluated by in vitro test of neutralization capacity of DPPH radical (study 5). Flavanones have the best antioxidant capacity, which is explained by their ability to give up a proton from the rest of chroman-4-one.*

- *From the 44 compounds analyzed, the highest retention capacity has para-hydroxychalcone substituted with chlorine in para position of phenylthiazole. Theoretical, compounds analyzed fall into drug-like molecules (study 6).*

- *Compared to 31 α -methylchalcone taken from literature and analyzed, thiazole chalcones has a higher specificity (study 7).*