

UNIVERSITATEA TEHNICĂ “GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI



În cotutelă cu

UNIVERSITATEA “AL. I. CUZA” IAȘI
FACULTATEA DE CHIMIE



Doctorand: chim. HANȚIU DELIA(căs. GREBINIȘAN)

**NOI DERIVAȚI DE GLUTAMINĂ BIOLOGIC
ACTIVI CUPLAȚI PE SUPORTURI
MACROMOLECULARE**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducători științifici:

Prof.univ dr.ing.dr.h.c. POPA MARCEL

Prof.univ.em.dr. ȘUNEL VALERIU

IAȘI- 2013

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 26 septembrie 2013 la ora 11 în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**NOI DERIVAȚI DE GLUTAMINĂ BIOLOGIC ACTIVI CUPLAȚI PE
SUPTURI MACROMOLECULARE**

elaborată de doamna chim. **DELIA HANȚIU** (căs. **GREBINIȘAN**) în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | | |
|----|--|-----------------------------------|
| 1. | Prof. univ. dr. ing. Silvia CURTEANU
Univ. „Gh. Asachi” Iași | președinte |
| 2. | Prof. univ. dr. ing. d.r.h.c. Marcel Popa
Univ. „Gh. Asachi” Iași | conducător științific |
| 3. | Prof. univ. em. dr. chim Valeriu ȘUNEL
Univ. „Al. I. Cuza ” Iași | conducător științific în cotutelă |
| 4. | Prof. univ. dr. ing Jacques DESBRIERES
Université de Pau et des Pays de l' Adour, Franța | membru |
| 5. | Conf. univ.dr.farm. Nela BIBIRE
Univ. de Med. și Farm. „Gr. T.Popa” Iași | membru |
| 6. | Conf. univ.dr chim. Lucian BĂRSĂ
Univ. „Al. I. Cuza ” Iași | membru |

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.


RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. **ION GIURMA**

Secretar universitate,


Ing. Cristina Nagi

Mulțumiri

Mulțumesc lui Dumnezeu că mi-a dat putere și m-a vegheat în toată munca mea[...].

Sunt recunoscătoare celor care au fost alături de mine în perioada aceasta:

Domnului prof.univ dr.ing.dr.h.c. **MARCEL POPA**, de la Univ. Tehn. “Gh. Asachi” Iași, pentru că m-a acceptat în echipă, a crezut în mine, mi-a îndrumat atent, decent și exigent fiecare pas în cercetare și mi-a demonstrat ce înseamnă performanța, dăruirea, și vocația de dascăl.

Domnului Prof.univ.em.dr. **VALERIU ȘUNEL** de la Univ. „Al. I. Cuza” Iași pentru că m-a învățat ce înseamnă rigoarea, ambiția și puterea de a nu renunța la idealuri, dorința de a fii mereu primul și cel mai bun, pentru timpul petrecut în laboratorul de sinteze și analize, pentru o memorie de invidiat.

Domnului prof.univ. dr.ing. dr.h.c **JACQUES DESBRIERES** de la *Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța*, pentru sprijinul acordat prin colaborarea „de suflet” și profesionistă pe care o are cu Univ. „Gh. Asachi” Iași, în mod special cu d-l prof Popa Marcel.

Distinșilor membri ai Comisiei care au avut amabilitatea analizării și evaluării obiectivelor științifice prezentate în această teză.

Doamnei prof. univ. dr. **DANA ORTANSA DOROHOI** de la Univ. „Al. I. Cuza” Iași pentru ajutorul acordat în determinările fizice, pentru calm și pentru încurajări.

Colegilor mei de la Univ. „Al.I. Cuza” și Univ. „Gh. Asachi” pentru colaborările de specialitate, dar și pentru prietenia lor, care m-a ajutat să perseverez în momente de cumpănă.

Mamei mele care este modelul meu de dragoste și ambiție.

Fiului și soțului meu pentru înțelepciune, răbdare, înțelegere, susținere necondiționată. Lor le dedic întru totul, această lucrare.

Cu deosebită considerație,
Delia Grebinișan

CUPRINS

STUDIU BIBLIOGRAFIC

INTRODUCERE.....	5
I. Considerații generale asupra combinațiilor ce conțin heterociclul Δ^2-oxazolinonic.....	9
I.1. Tipuri de Δ^2 -oxazolinone-5	9
I.2. Metode de sinteză a Δ^2 -oxazolinonelor-5	10
I. 2. 1. Sinteza Bergmann-Stern.....	10
I. 2. 2. Sinteza Erlenmeyer.....	11
I. 2. 3. Sinteza Dobnikar	13
I. 2. 4. Sinteze diverse.....	13
I. 3. Proprietăți fizice	16
I.4. Reactivitatea Δ^2 -oxazolinonelor-5.....	17
I. 4. 1. Reacții cu deschiderea heterociclului Δ^2 -oxazolinic-5.....	17
I. 4. 2. Reacții cu păstrarea heterociclului Δ^2 -oxazolinic-5	29
II. Polimeri-considerații generale	33
II.1. Biomateriale	34
II. 2. Polimeri naturali și aplicațiile lor	36
II. 3. Tipuri de polimeri sintetici utilizați pentru imobilizarea medicamentelor.....	37
II. 4. Metode de realizare a sistemelor polimer-medicament.....	40
II. 4. 1. Conjugate polimer-medicament.....	41
II. 4. 2. Includerea în hidrogeluri.....	43
II. 4. 3. Microîncapsularea	43
II. 5. Transportul medicamentelor	44
II.6. Interacțiunea medicament – organism.....	45
II. 7. Aspecte farmacocinetice și farmacodinamice privind eliberarea controlată a medicamentelor din sisteme polimer-medicament.....	47
II. 8. N-vinilpirolidona și copolimerii săi - aplicații în medicină.....	49
II. 9. Anhidrida itaconică și copolimerii săi - aplicații în medicină.....	52
REZULTATE PROPRII	
III. Materiale. Tehnici de sinteză. Tehnici de investigare	57
III. 1. Materiale	57
III. 2. Tehnici de sinteză a principiilor biologice active.....	58
III. 2. 1. N-(p-Nitrobenzoi)-L-glutamina.....	58
III. 2. 2. N-(p-Aminobenzoi)-L-glutamina.....	59
III. 2. 3. N-[p-(Formilamino)-benzoi]-L-glutamină.....	60
III. 2. 4. N-[p-(Acetilamino)-benzoi]-L-glutamină.....	60
III. 2. 5. α -N-[p-(Metilsalicilamidossulfonil)-benzoi]-L-glutamină.....	60
III. 2. 6. α -N-[p-(Metilfenoxiacetamidossulfonil)-benzoi]-L-glutamină.....	61
III. 2. 7. 2-(p-Nitrofenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5.....	61
III. 2. 8. 2-(p-Formilamino)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5.....	61
III. 2. 9. 2-(p-Acetilamino)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5.....	62
III. 2. 10. 2-[p-(Metilsalicilamidossulfonil)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5.....	62
III. 2. 11. 2-[p-(Metilfenoxiacetamidossulfonil)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5.....	62
III. 2. 12. α -N-(p-Nitrobenzoi)-D,L-glutaminil-hidrazida.....	62
III. 2. 13. α -N-[(p-Formilamino)-benzoi]-D,L-glutaminil-hidrazida	62
III.2.14. α -N-[(p-Acetilamino)-benzoi]-D,L-glutaminil-hidrazida.....	63
III. 2. 15. α -N-[(p-Metilsalicilamidossulfonil)-benzoi]-D,L-glutaminil-hidrazida.....	63
III. 2. 16. α -N-[(p-Metilfenoxiacetamidossulfonil)-benzoi]-D,L-glutaminil-hidrazida.....	63
III. 2. 17. Copolimer poli(N-vinilpirolidona- <i>alt</i> -anhidridă itaconică)	63
III. 2. 18. N-(p-Nitrobenzoi)-D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinil pirolidona - <i>alt</i> -acid itaconic).....	64

III. 2. 19. N-[(p-Formilamino)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida hidrazida poli(N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	64
III. 2. 20. N-[(p-Acetilamino)-benzoil]- D,L-glutaminil-hidrazida hidrazida poli(N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	64
III. 2. 21. α -N-[(p-Metilsalicilamididosulfonil)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	64
III. 2. 22. α -N-[(p-Metilfenoxiacetamididosulfonil)-benzoil]- D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	65
III. 2. 23. Carbetoxianilida poli(N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	65
III. 2. 24. N-(p-Nitrobenzoil)-D,L-glutaminilhidrazinanilida poli(N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	65
III. 2. 25. N- [(p-Formilamino)-benzoil]-D,L-glutaminilhidrazin-anilida poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	66
III. 2. 26. N-[(p-Acetilamino)-benzoil]-D,L-glutaminilhidrazin-anilida poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	66
III. 2. 27. Sarea de sodiu a L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	66
III. 2. 28. Esterul 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	67
III. 2. 29. Esterul 3-(carbetoxifenilamino)-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	67
III. 2. 30. Esterul 2-[di-(β -cloroetil)-amino]-etilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	67
III. 2. 31. Esterul 3-[di-(β -cloroetil)-amino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	68
III. 2. 32. Esterul 3-[di-(β -cloroetil)-aminocarboxifenilamino]-2-hidroxi-propil al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	68
III. 3. Tehnici de investigare.....	68
III. 3. a) Spectroscopie în infraroșu.....	68
III. 3. b) Spectroscopie de rezonanță magnetică și nucleară.....	68
III. 3. c) Analiza elementală calitativă.....	69
III. 3. d) Determinarea punctelor de topire.....	69
IV. Sinteză și caracterizarea unor noi derivați ai glutaminei	
IV. 1. Sinteză și caracterizarea N-(p-nitrobenzoil)-L-glutaminei (I).....	71
IV. 2. Sinteză și caracterizarea N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei (II).....	78
IV. 3. Sinteză și caracterizarea unor noi derivați la grupa aminică a N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei.....	83
IV. 3. 1. Sinteză și caracterizarea derivaților de N-[p-(acilamino)-benzoil]-L-glutamină.....	83
IV. 3. 2. Optimizarea reacției de obținere a derivaților de N-[p-(R)-benzoil]-L-glutamină.....	87
IV. 3. 3. Sinteză și caracterizarea derivaților de N-[p-(arilamididosulfonil)-benzoil]-L-glutamină.....	91
IV. 4. Sinteză și caracterizarea unor 2-(p-R-fenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinone-5 (VII-XI).....	97
IV. 5. Sinteză și caracterizarea unor noi hidrazide derivate de la N-(p-R-benzoil)-D,L-glutamină (XII-XVI).....	105
V. Conjugate polimer-principiu activ pe bază de derivați ai glutaminei	113
V.1. Sinteză și caracterizarea unor noi N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil-hidrazide cu suport polimeric.....	114
V.2. Sinteză și caracterizarea unor noi anilide cu suport polimeric.....	122
V. 2. 1. Sinteză și caracterizarea carbetoxianilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	122
V. 2. 2. Sinteză și caracterizarea unor noi N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminilhidrazin-anilide cu suport polimeric.....	125
V. 2. 3. Sinteză și caracterizarea sării de sodiu a L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt-acid itaconic</i>).....	132

V. 2. 4. Sinteza și caracterizarea esterului 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt</i> -acid itaconic).....	135
V. 2. 5. Sinteza și caracterizarea esterului 3-(carbetoxifenilamino)-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt</i> -acid itaconic)	138
V. 3. Grefarea grupării azotiperitice pe molecula unor conjugate derivate de la poli(N-vinilpirolidona- <i>alt</i> -acid itaconic).....	141
V. 3. 1. Sinteza și caracterizarea esterului 2-[di-(β-cloroetil)-amino]-etilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt</i> -acid itaconic).....	144
V. 3. 2. Sinteza și caracterizarea esterului 3-[di-(β-cloroetil)-amino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt</i> -acid itaconic).....	147
V. 3. 3. Sinteza și caracterizarea esterului 3-[di-(β-cloroetil)- aminocarboxi fenil-amino]-2 -hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona- <i>alt</i> -acid itaconic).....	150
VI. Activitatea biologică a unor derivați de glutamină și a unor conjugate polimer-derivat de glutamină	
VI. 1. Evaluarea toxicității compușilor sintetizați.....	155
VI. 2. Testarea activității antitumorale pe animale purtătoare de tumori experimentale.....	157
VI. 2. 1. Activitatea antitumorală a N-[p-(acilamino)-benzoil]-derivaților de L-glutamină.....	158
VI. 2. 2. Activitatea antitumorală a azotiperitelor cu suport polimeric.....	159
VI. 3. Activitatea tuberculostatică a unor N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil-hidrazide (XII-XIV) și a conjugatelor corespunzătoare.....	160
VI. 4. Studiul acțiunii derivaților de N-acil-L-glutamină (I, II) și N-[p-(acilamino)-benzoil]-L-glutamină (III, IV) asupra unor enzime digestive.....	162
VI. 4. 1. Acțiunea asupra tripsinei	163
VI. 4. 2. Acțiunea asupra lipazei.....	163
VI. 4. 3. Acțiunea asupra amilazei.....	164
VII. Concluzii	165
BIBLIOGRAFIE	173

ANEXA

INTRODUCERE

Terapia medicamentoasă se confruntă constant cu două situații: creșterea eficienței tratamentului medicamentos și eliminarea efectelor secundare de supradoză, respectiv de agresivitate a unor medicamente față de celulele sănătoase (spre exemplu citostaticele).

Amploarea pe care au luat-o cercetările în domeniul activității fiziologice și biochimice a aminoacizilor, se datorează rolului pe care aceștia îl au în organism. Pentru rezolvarea acestor probleme s-au conturat în timp două direcții:

- sinteza de noi produse medicamentoase cu specificitate ridicată, cu efecte secundare minime, între care aminoacizii și derivați ocupă un loc predominant.
- extinderea sintezei de conjugate care să conțină în structura lor substanțe active din punct de vedere biologic. Pentru astfel de structuri, Helmut Ringsdorf propune trei componente: molecula cu rol de principiu activ, suportul macromolecular și un spațiator, care optimizează legătura dintre primele două și acțiunea fluidelor fiziologice asupra primului.

Investigațiile care stau la baza elaborării prezentei teze de doctorat s-au integrat în ideea de a aduce unele contribuții originale la dezvoltarea chimiei aminoacizilor în general, L-glutaminei în mod special, prin obținerea unor noi derivați ai acestora și imobilizarea unora dintre ei pe suport polimeric.

Avantajul utilizării copolimerilor pe bază de N-vinil pirolidonă și anhidride ciclice este evident, biomaterialul în forma sa finală, fiind mult mai puțin susceptibil de a declanșa răspunsul imun sau efecte toxice.

Cercetările noastre au urmărit sinteza N-benzoil-L-glutaminei substituită în poziție *para* cu –NO₂, –NH₂, sau acilamino, arilamidossulfonil, precum și introducerea în moleculele acestora a unor grupări care să posede importante proprietăți farmacologice. În acest scop, s-a preparat o serie nouă de Δ^2 -oxazolinone-5 care prin deciclizare cu hidrazină a condus la noi hidrazide ce conțin în structura lor glutamina.

Într-o altă etapă, prin imobilizarea derivaților de glutamină pe suport polimeric s-a reușit să se sintetizeze noi conjugate polimer-principiu activ, în condiții normale de temperatură. Derivații de glutamină și conjugatele acestora au fost caracterizați fizico- chimic structura lor fiind confirmată prin analiză chimică elementală și spectrală, iar pe baza acestor analize s-au elucidat mecanismele de reacție pentru unele căi de sinteză abordate.

A fost determinat gradul de toxicitate și studiată activitatea biologică a conjugatelor sintetizate. Cu această ocazie, pentru compușii testați, s-a evidențiat acțiunea antitumorală, tuberculostatică și influența exercitată asupra activității enzimelor digestive.

Lucrarea de doctorat **"Noi derivați de glutamină biologic activi cuplați pe suporturi macromoleculare"** este structurată după cum urmează:

Partea teoretică, cu un caracter monografic, sistematizează în capitolul I, principalele metode de sinteză, precum și reactivitatea Δ^2 -oxazolinonei-5, în special acțiunea față de agenții nucleofili. Tot aici, într-un capitol distinct, II, sunt prezentate considerațiile generale despre polimeri. Se insistă asupra conjugatelor polimer-medicament și asupra compușilor macromoleculari pe bază de N-vinil-pirolidonă și anhidridă itaconică, întrucât în cadrul cercetărilor noastre le-am folosit ca suport polimeric.

Partea personală a lucrării se extinde pe mai multe capitole. În capitolul III sunt descrise procedeele experimentale utilizate și denumirea sistematică a tuturor compușilor sintetizați în cadrul cercetărilor care formează obiectul aceste lucrări.

În capitolul IV sunt expuse cercetările originale în domeniul sintezei unor noi derivați de L-glutamină. Sunt discutate reacțiile de obținere pentru N-(p-nitrobenzoil)-L-glutamină, N-(p-aminobenzoil)-L-glutamină, N-[p-(acilamino)-benzoil]-L-glutamină, N-[p-(arilamidossulfonil)]-L-glutamină, 2-(p-R-fenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinone-5, hidrazide derivate de la N-(p-R-benzoil)-D,L-glutamină. Tot aici sunt analizate mecanismele de reacție implicate în diferite etape ale sintezelor efectuate.

În capitolul V sunt prezentate conjugatele rezultate prin legarea chimică a compușilor micromoleculari anterior sintetizați, la poli(N-vinil pirolidonă – *alt* – anhidridă itaconică).

Stabilirea structurii noilor compuși s-a realizat prin analiză chimică (C, H, N -pentru derivații de L-glutamină; N- pentru sistemele conjugate) și spectrală (FT-IR, $^1\text{H-RMN}$).

Capitolul VI cuprinde studiul toxicității pentru toți compușii și testările biologice efectuate asupra unora dintre compușii sintetizați.

În capitolul VII sunt trecute concluziile ce se desprind din cercetările personale și care subliniază contribuția adusă la sinteza și caracterizarea fizico-chimică a noilor derivați de L-glutamină și conjugatelor acestora.

Bibliografia ce încheie lucrarea, cuprinde literatura indicată în text cu lucrări științifice din domeniul cercetat și personale, apărute până în anul 2013.

Lucrarea este însoțită de o listă de lucrări și o anexă ce cuprind publicațiile științifice în extenso, apărute pe baza cercetărilor realizate în cadrul tezei de doctorat.

Prezentul rezumat cuprinde, într-o formă sintetică, rezultatele cercetărilor personale, concluziile generale și un extras din bibliografie.

S-a păstrat numerotarea din teză a compușilor, a figurilor, tabelelor, formulelor matematice de calcul și indicațiilor bibliografice.

REZULTATE PROPRII

(EXTRAS)

IV. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR NOI DERIVAȚI AI GLUTAMINEI

IV.1. Sinteza și caracterizarea N-(p-nitrobenzoi)-L-glutaminei (I)

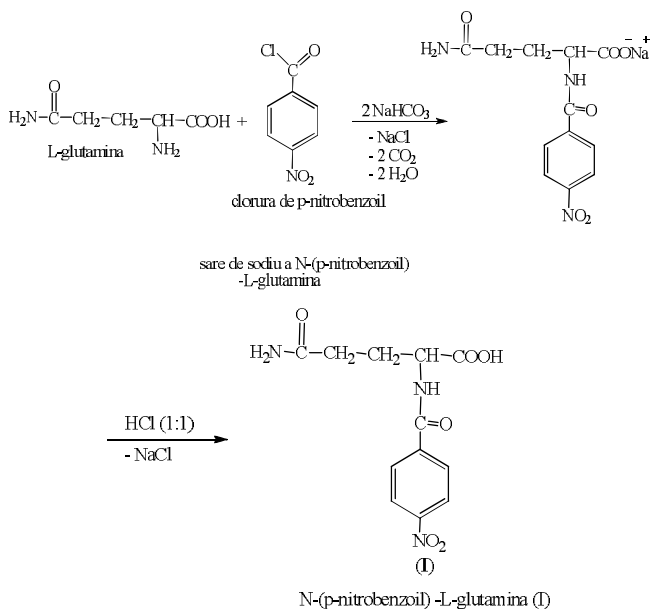
Aminoacizii și derivații lor au dovedit efecte biologice importante cum ar fi: antitumorale [238-245], hipoglicemiantă [246], analgezică [247], antihipertensivă [248, 249], antimicrobiană [33, 63, 74], tuberculostatică [81, 251], antiinflamatoare [26, 252].

Ne-am fixat asupra L-glutaminei deoarece joacă un rol important în reacțiile de transaminare și transdesaminare stabilind astfel legătura între metabolismul proteinelor și al hidraților de carbon, reglând totodată, conținutul de azot în organism [253].

În ultimul timp, mai mulți cercetători [255- 259] au constatat că L-glutamina exercită acțiune citostatică și toxicitate scăzută în tratarea diferitelor forme de cancer.

Luând în considerație aceste date ne-am propus să acilăm L-glutamina cu p-nitrobenzoi clorura în prezența unei soluții de bicarbonat de sodiu.

Lucrând în condițiile reacției Schotten-Baumann s-a obținut inițial sarea de sodiu a N-(p-nitrobenzoi)-L-glutaminei, din care, prin tratare cu acid clorhidric diluat, s-a pus în libertate N-(p-nitrobenzoi)-L-glutamina (I) [260] (Schema 1).



Schema 1. Sinteza N-(p- nitrobenzoi)-L-glutaminei (I)

Structura compusului (I) a fost confirmată prin analiză chimică elementală și spectrală (FT-IR, ^1H -RMN).

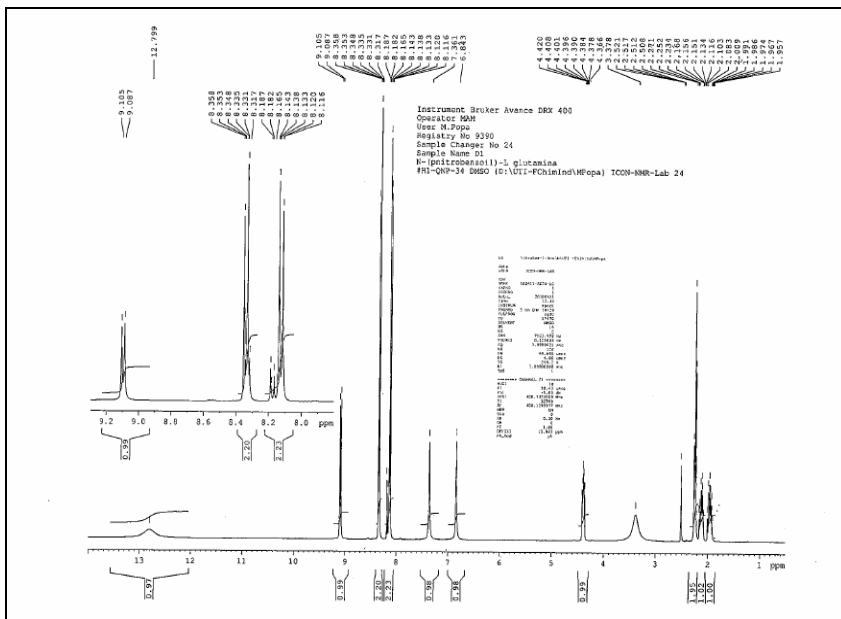


Figura 2. Spectrul ^1H -RMN al N-(p-nitrobenzoyl)-L-glutaminei (I)

IV.2.Sinteza și caracterizarea N-(p-aminobenzoyl)-L-glutaminei (II)

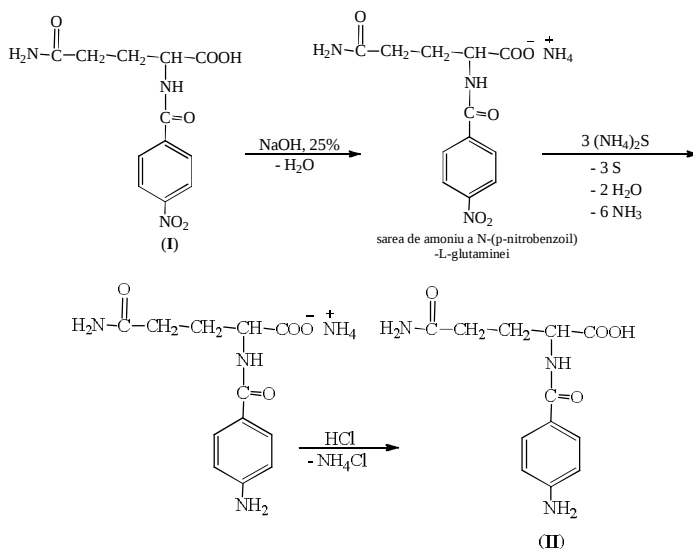
Sinteza unor noi derivați ai L-glutaminei prezintă interes, în special, prin faptul că acest aminoacid este considerat un omolog al acidului L-glutamic, putându-l înlocui în unele procese metabolice. Un derivat al acestuia din urmă, acidul N-(p-aminobenzoyl)-L-glutamic, se regăsește în structura acidului folic, compus cu importanță majoră în metabolismul nucleoproteidelor și acizilor desoxiribonucleici [65, 268-271]. Această proprietate i-a determinat pe unii autori să folosească acidul p-aminobenzoic drept unitate structurală într-o serie de noi derivați de aminoacizi și peptide [40, 57, 64, 68, 69, 80]. Acidul p-aminobenzoic și derivați sunt, de asemenea, cunoscuți prin efectele lor biologice remarcabile, care vizează multiple activități cum ar fi: antiaritmice [272], antifibrolitice [273, 274], vasodilatatoare [275], antimicrobiană [276], antihelmintică [277] și antitumorală [278-282].

Aceste fapte ne conduc la presupunerea că N-(p-aminobenzoyl)-L-glutamina ar

putea exercita rolul de antagonist al acidului N-(p-aminobenzoil)-L-glutamic într-o serie de procese biochimice, în special, în cele canceroase. Ca urmare am considerat oportun să ne ocupăm, în această etapă, de sinteza acestui derivat aminat, iar compusul (**I**) ne-a interesat în funcția lui de intermediar, susceptibil de reducere la grupa nitro.

În literatură există o rețetă de reducere a N-acil-aminoacizilor care au grupa nitro în poziția 4 [31, 40, 64], iar agentul reducător este sulfura de amoniu preparată prin barbotare de hidrogen sulfurat în soluție de amoniac 25%.

Prin această tehnică din N-(p-nitrobenzoil)-L-glutamină (**I**) am obținut N-(p-aminobenzoil)-L-glutamina (**II**) (Schema 5).



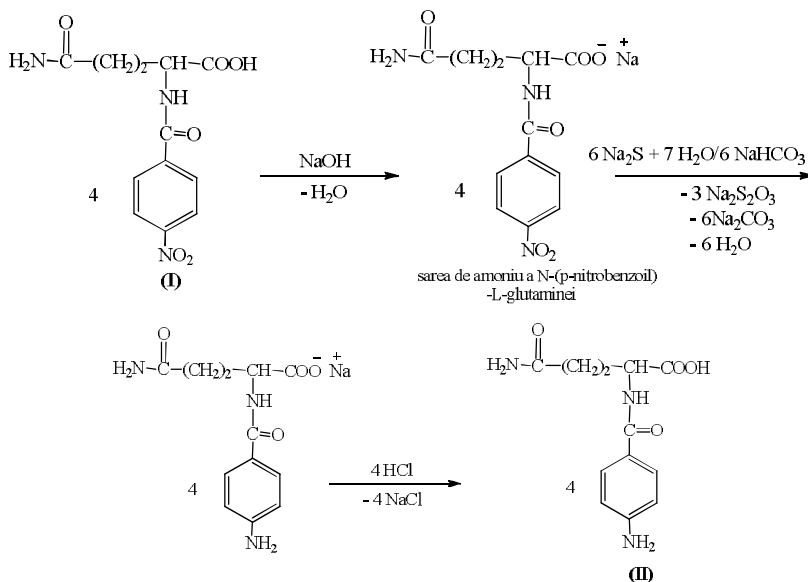
Schema 5. Sinteza N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei (**II**) prin reducerea nitroderivatului (**I**) cu (NH₄)₂S.

Produsul brut s-a purificat din apă cu temperatura 85-90°C, rezultând produsul pur cu randament de 48% și punctul de topire 199 – 200 °C.

Dificultatea legată de folosirea hidrogenului sulfurat în reducere sau în operația de îndepărtare a sulfului coloidal, precum și randamentul în produs finit scăzut, ne-a determinat să găsim o metodă mai simplă, eficientă, de reducere a nitroderivatului corespunzător.

Este cunoscut că sulfurile alcaline sunt frecvent utilizate în reducerea nitroderivaților aromatici [283-285]. În cazul nostru, sulfura de sodiu s-a dovedit activă, dar numai atunci când am folosit ca produs de plecare sarea de sodiu a N-(p-nitrobenzoil)-L-

glutaminei care, la rândul său am obținut-o prin refluxarea unui amestec de N-(p-nitrobenzoil)-L-glutamină, în soluție alcoolică, cu hidroxid de sodiu. În continuare, derivatul sodat izolat, s-a dizolvat în etanol și apoi s-a tratat cu o soluție apoasă, caldă, de sulfură de sodiu și bicarbonat de sodiu. Amestecul s-a refluxat 4 ore, după care s-a filtrat, s-a răcit și acidulat cu acid clorhidric (1:1) până la pH = 1-1,5. A precipitat produsul (II) care, după purificare (efectuată similar reducerii cu sulfură de amoniu) s-a obținut produsul pur, după acest procedeu parțial modificat de noi, cu randament de 74% și punctul de topire 200-201 °C [260] (Schema 6).



Schema 6. Sinteza N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei (II) prin reducerea sării de sodiu a nitroderivatului (I) cu Na₂S.

Se apreciază că ambele procedee sunt aplicabile, dar cu eficiență comparabilă.

Structura compusului aminat (II) a fost confirmată prin analiză chimică elementală și spectrală (FT-IR, ¹H-RMN).

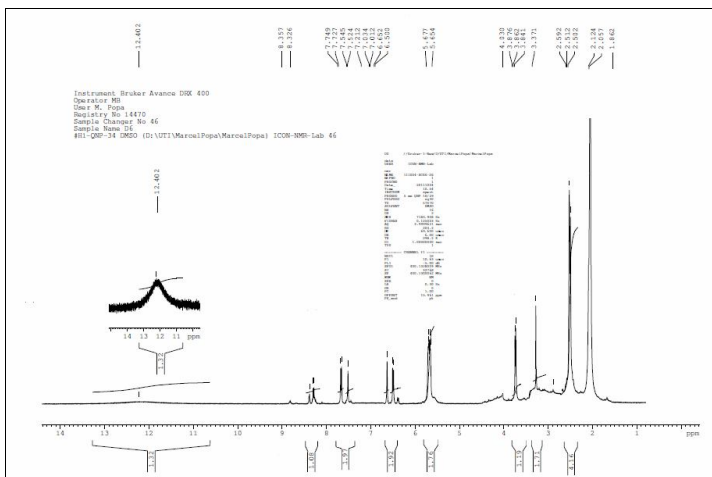


Figura 4. Spectrul ^1H -RMN al N-(p-aminobenzoyl)-L-glutaminei (**II**).

IV. 3. Sinteza și caracterizarea unor noi derivați la grupa aminică a N-(p-aminobenzoyl)-L-glutaminei

IV. 3. 1. Sinteza și caracterizarea derivaților de N-[p-(acilamino)-benzoyl]-L-glutamină (**III**, **IV**)

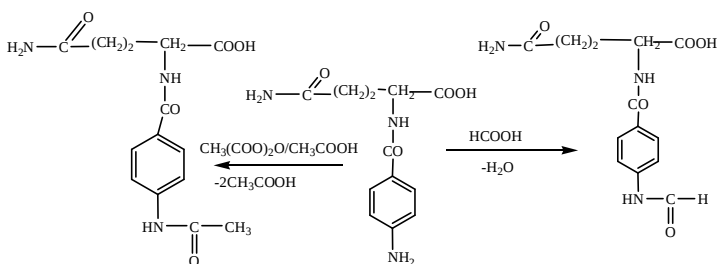
Printre substanțele care inhibă creșterea tumorilor maligne se numără atât antagoniștii acizilor aminici, cât și unii derivați funcționalizați la grupa aminică ai acidului p-aminobenzoic,[287-290].S-au sintetizat o serie de derivați ai α -aminoacizilor constatând pentru unii dintre ei o activitate citostatică exercitată prin efectul antagonist al acidului aminic sau a dipeptidului respectiv [42, 69, 245, 270, 282, 292, 297].

Ținând cont de aceste rezultate, am sintetizat noi derivați ai N-(p-aminobenzoyl)-L-glutaminei, urmărind ca ei să poată exercita rolul de antagoniști ai acidului N-(p-aminobenzoyl)-L-glutamic (component al acidului folic) în unele procese canceroase.

Practic am grefat diferiți substituenți la gruparea aminică a dipeptidei (**II**) și am obținut noi derivați cu acțiune antitumorală, funcționând ca antimetaboliți (Cap. VI. 2. 1). Astfel, prin acilarea grupei aminice a N-(p-aminobenzoyl)-L-glutaminei (**II**) cu acid formic sau anhidridă acetică în amestec cu acid acetic s-au obținut N-acil-dipeptidele cu structurile (**III**, **IV**) [260] (Schema 7).

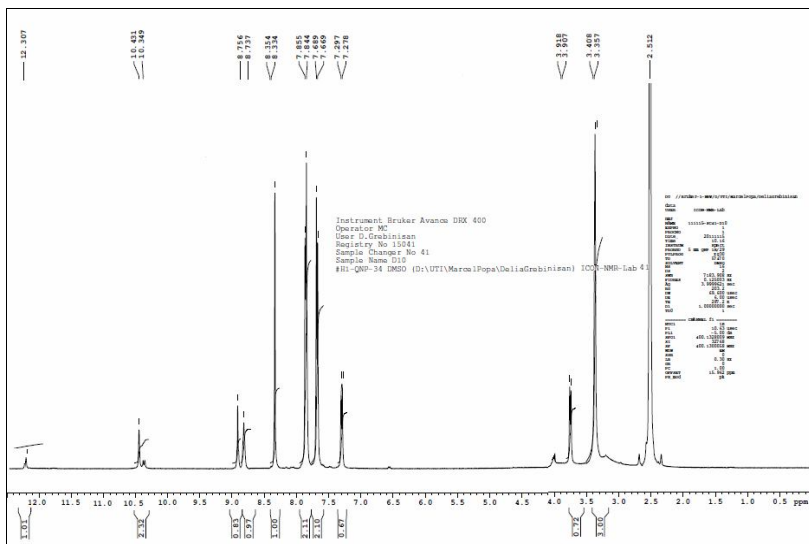
Reacția de formilare a N-(p-aminobenzoyl)-L-glutaminei (**II**) și obținerea N-[p-(formilamino)-benzoyl]-L-glutaminei (**III**) decurge cu randament de 63% dacă se efectuează

cu un exces de acid formic 80% la temperatură de 80-85°C. În cazul utilizării acidului formic 98% produsul de reacție rezultat a avut punctul de topire 268°C și rezultatul analizei elementale cantitative identic cu cel menționat de Zehra [298] pentru acidul p-(formilamino)-benzoic. Deci, în acest caz, are loc reacția de hidroliză a legăturii peptidice dintre cei doi aminoacizi. Prin reacția N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei (**II**) cu anhidridă acetică în amestec cu acid acetic glacial, la refluxare, s-a obținut N-[p-(acetilamino)-benzoil]-L-glutamina (**IV**), cu randament de 57% și punctul de topire 214-215 °C.



Schema 7. Sinteza N-[p-(formilamino)-benzoil]-L-glutaminei (**III**) și N-[p-(acetilamino)-benzoil]-L-glutaminei (**IV**).

Structura compușilor (**III**) și (**IV**) a fost stabilită pe baza analizelor elementale și spectrale (FT-IR, ^1H -RMN).



IV. 3. 2. Optimizarea reacției de obținere a derivaților de N-[p-(R)-benzoil]-L-glutamină

Faptul că derivații p-nitro și p-amino-benzoilați (**I-IV**) prezintă importanță din punct de vedere biologic a impus stabilirea condițiilor în care reacțiile de obținere a acestora să fie realizate cu randamente cât mai avantajoase.

Am considerat că randamentul de reacție (η) este un indicator al optimizării procedurii aplicat.

În vederea stabilirii condițiilor în care reacțiile decurg cu randamentul cel mai bun, s-a realizat pentru fiecare dintre acestea un experiment factorial de tipul 3^2 [299-301]. Acest experiment permite obținerea randamentului de reacție ca o funcție de gradul 2 în variabilele semnificative independente care să aibă și o reprezentare spațială tridimensională a funcției obținute.

Valorile variabilelor a-dimensionale și randamentul reacției pentru compușii studiați (**I-IV**) sunt date în tabelul 2.

Tabel 2. Valorile variabilelor adimensionale și randamentul reacției pentru compușii (**I-IV**)

Nr.	x_1	x_2	$\eta_I(\%)$	$\eta_{II}(\%)$	$\eta_{III}(\%)$	$\eta_{IV}(\%)$
1	-1	-1	53	40	46	61
2	-1	0	55	65	52	70
3	-1	1	52	42	47	61
4	0	-1	54	55	54	67
5	0	0	58	80	59	76
6	0	1	54	57	55	68
7	1	-1	53	43	47	62
8	1	0	56	66	53	71
9	1	1	53	45	50	63

Dependența randamentului reacției de variabilele a-dimensionale este ilustrată în figura 9a) și b) pentru compușii **II** și **IV**, compuși care au cele mai mari valori ale randamentului de reacție

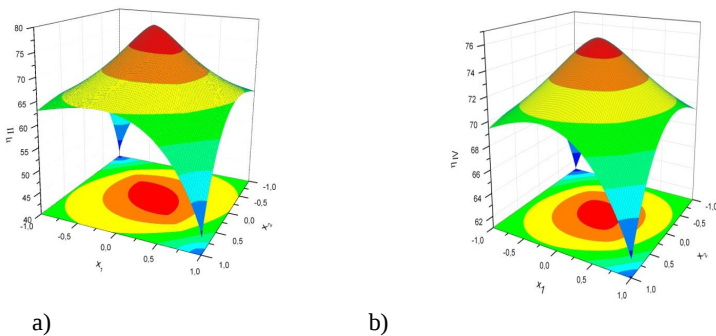


Figura 9. a); b). Randamentul reacției funcție de variabilele a-dimensionale corespunzătoare pentru compușii (II, IV).

Rezultatele obținute în această serie prezintă siguranță în alegerea celor mai adecvate condiții pentru sinteza compușilor (I-IV) cu un randament practic mai avantajos [305].

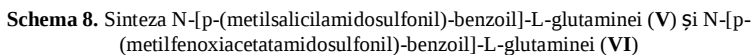
Folosind procedeele de optimizare, pe lângă randamentul superior în produs finit, se limitează totodată și numărul de încercări în sinteza compușilor (I-IV) activi în stimularea unor enzime din metabolismul intermediar

IV.3.3. Sinteza și caracterizarea derivaților de N-[p-(arilamidossulfonil)-benzoil]-L-glutamină (V, VI)

Ne-a preocupat ideea introducerii grupării sulfonil, grație importanței acesteia în activitatea chimioterapică a multor medicamente.

Sulfonele sunt considerate astăzi ca medicamente de selecție manifestând acțiune antimalarică [306], antihelmintică [307], antimicrobiană [41, 308, 309], antiinflamatorie [312], anti-HIV [314], antitumorală [315,]. Se cunosc, de asemenea, medicamente conținând grupa sulfonil și care au acțiune analgezică [312,318], antireumatică [319], antifungică [320-323], antispastică [309].

Drept reactanți, am utilizat N-(p-aminobenzoil)-L-glutamina (II) și 5-clorosulfonil-salicilat de metil, respectiv 2-hidroxi-4-clorosulfonil-fenoxiacetat de metil. S-a lucrat în dioxan anhidru, la 116-118°C, în prezența trietilaminei care să fixeze acidul clorhidric rezultat din proces. S-au obținut N-[p-(metilsalicilamidossulfonil)-benzoil]-L-glutamina (V) cu randament de 83%, respectiv N-[p-(metilfenoxiacetatamidossulfonil)-benzoil]-L-glutamina (VI) cu randament de 65% (schema 8)



16

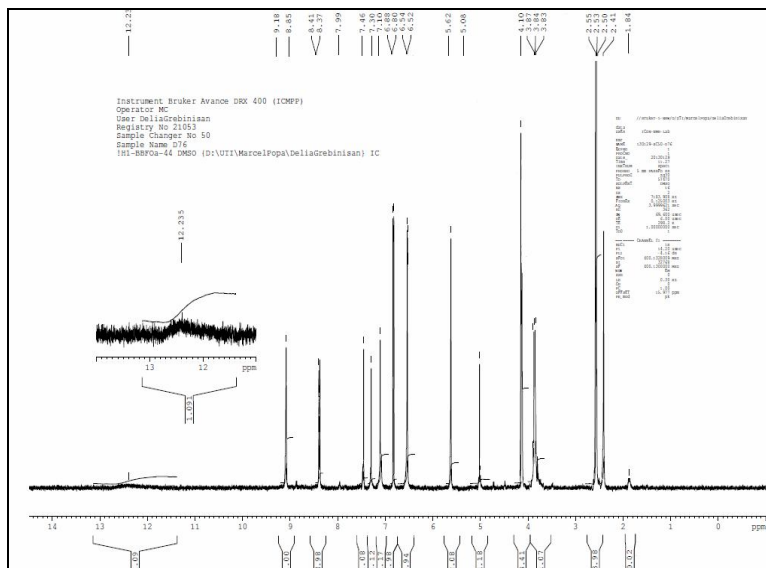
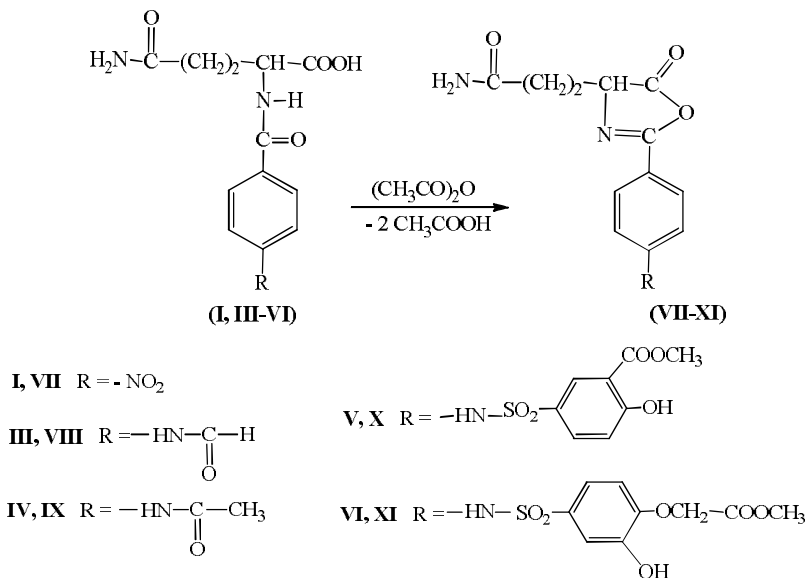


Figura 12. Spectrul ^1H -RMN al N-[p-(metilsalicilamidosulfonil)-benzoil]-L-glutaminei (**V**)

IV.4. Sinteza și caracterizarea unor 2-(p-R-fenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinone-5 (VII-XI)

Δ^2 -oxazolinonele-5 cunoscute ca intermediari reactivi în diverse sinteze joacă un rol important și în obținerea multor medicamente ca: antidepresive [334], antineoplazice [65, 80, 245, 282, 334], analgezice [338], antiinflamatoare [26, 339], antimicrobiene [340], antidiabetice [342], antiobezitate [343].

Am folosit aceste observații de ordin teoretic, experimental și farmacologic la sinteza unei noi serii de Δ^2 -oxazolinone-5 și anume: 2-(p-nitrofenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinonă-5 (**VII**); 2-[p-(formilamino)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinonă-5 (**VIII**), 2-[p-(acetilamino)-fenil]- Δ^2 -oxazolinonă-5 (**IX**), 2-[p-(metilsalicil-amidosulfonil)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinonă-5 (**X**), 2-[p-(metilfenoxiacetat-amidosulfonil)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinonă-5 (**XI**), prin ciclizarea derivaților de N-(p-(R)-benzoil)-L-glutaminei (**I**, **III-VI**), sub acțiunea anhidridei acetice în exces [344, 345] (Schema 10).



Schema 10. Sinteza 2-(p-R-fenil)-4-(γ-amidoetil)-Δ²-oxazolinonelor-5 (**VII-XI**)

Structura Δ²-oxazolinonelor-5 (**VII-XI**) a fost determinată pe baza analizelor elementale și prin analiză spectrală (FT-IR, ¹H-RMN).

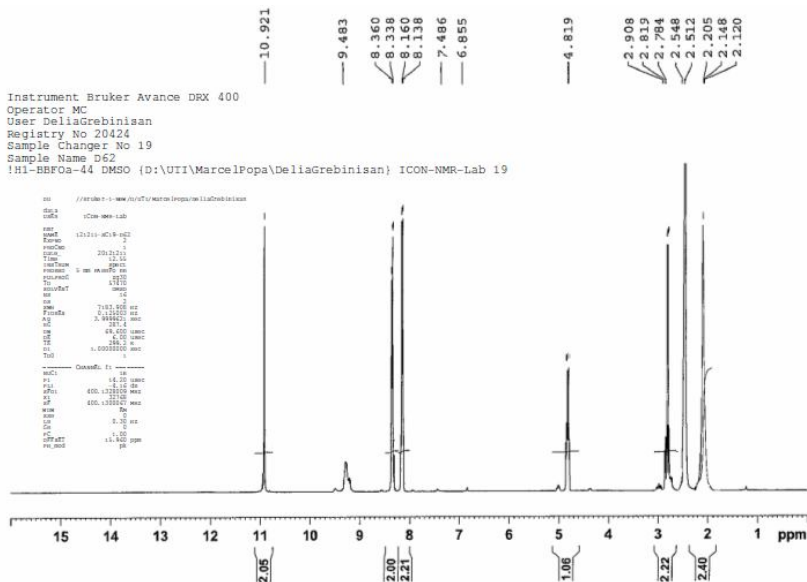


Figura 17. Spectrul ¹H-RMN al 2-(p-nitrofenil)-4-(γ-amidoetil)-Δ²-oxazolinonei-5 (**VII**)

IV.5. Sinteza și caracterizarea unor noi hidrazide derivate de la

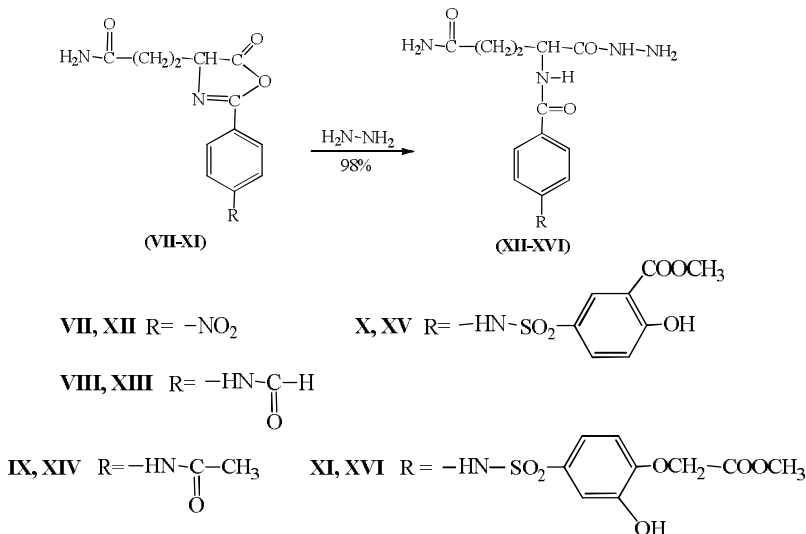
N-(p-R-benzoil)-D,L-glutamină (XII-XVI)

Hidrazidele sunt un grup de substanțe cu multiple proprietăți biologice: antimalarice [355], antifungice [357], anticonvulsivante [358], antiinflamatorii [26], antidepresivă [360], anti-HIV [363].

Este cunoscut că aminoacizii, metaboliții, sau unii polimeri cresc indicii chimioterapici, facilitând transportul grupării bioactive la nivel celular [26, 41, 79, 251].

Bazându-ne pe aceste date din literatură, ne-a interesat obținerea unor hidrazide cu suport de N-(p-R-benzoil)-D,L-glutamină. Sinteza acestui tip de hidrazide s-a făcut atât în scopul fixării lor pe copolimerul poli (N-vinilpirolidonă-alt- anhidridă itaconică), cât și pentru testarea acțiunii biologice (Cap. VI. 3).

În cazul nostru, prin deciclizarea Δ^2 -oxazolinonelor-5 (VII-XI) cu hidrazina s-au obținut noi derivați (XII-XVI) având restul de hidrazină grefat de N-(p-nitrobenzoil)-D,L-glutamină, N-(p-acilaminobenzoil)-D,L-glutamină sau N-(p-arilsulfonilamino benzoil)- D,L-glutamină[345]. (Schema 12)



Schema 12. Sinteza N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil-hidrazidelor (XII-XVI).

Structura hidrazidelor (XII-XVI) a fost demonstrată de rezultatele analizelor elementale și spectrale (FT-IR, ^1H -RMN) [345].

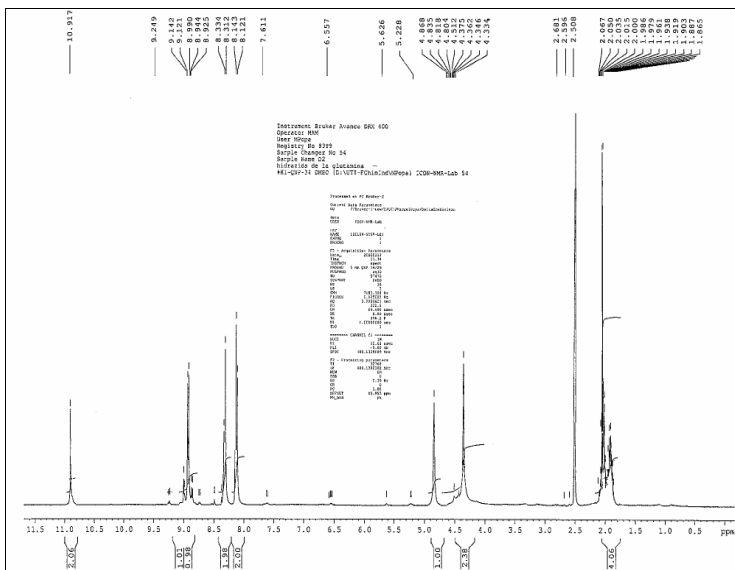


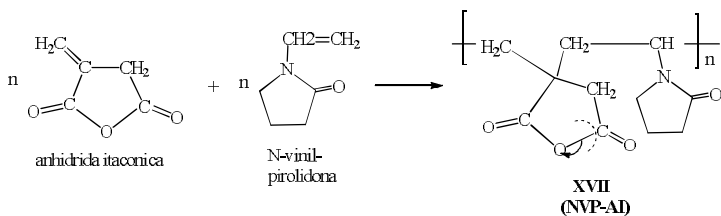
Figura 23. Spectrul ^1H -RMN al N-(p-nitrobenzoil)-D,L-glutaminil-hidrazidei (**XII**)

V. CONJUGATE POLIMER-PRINCIPIU ACTIV PE BAZĂ DE DERIVATI AI GLUTAMINEI

Conjugatele polimer-medicament obținute în urma imobilizării principiilor active pe suporturi de polimeri prin legături chimice, au fost menționate prima dată de Rigsdorf în anul 1975 [158].

Asocierea principiilor biologice active cu polimeri naturali sau sintetici îmbunătățește eficacitatea eliberării medicamentului, reducând toxicitatea compusului bioactiv concomitent cu retardarea acestuia [260, 364,365].

Eliberarea medicamentului poate fi realizată atât prin scindare enzimatică cât și prin scindare hidrolitică a legăturilor chimice create între acesta și copolimer [260, 364]. Copolimerul realizat între N-vinilpirolidonă și anhidridă itaconică (NVP-AI) prezintă proprietăți biomedicale importante [240, 367] și el a fost obținut prin polimerizare radicalică clasică, inițiată de azoizobutironitril (AIBN), utilizând ca solvent acetatul de etil, conform reacției [235]:



Schema 13. Sinteza copolimerului poli (N-vinilpirolidonă-alt-anhidridă itaconică) (XVII)

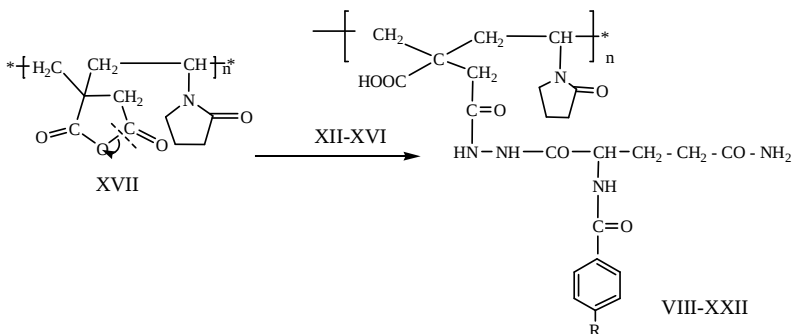
Din punct de vedere chimic, copolimerul denumit poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) - poli(NVPAlt) prezintă reactivitate mare determinată de inelul anhidridic din structura sa. Ca urmare, acest tip de polimer, poate fi cu ușurință supus unui proces de grefare cu produși ce posedă funcțiuni OH sau NH₂, grupări care au un caracter nucleofil pronunțat, deciclizând rapid inelul anhidridic.

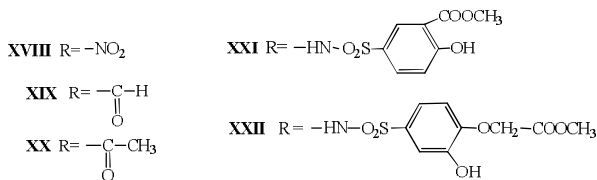
Printr-o astfel de reacție, se deciclicează aproape în întregime inelele anhidridice din copolimer, iar produșii rezultați sunt derivați ai poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic), iar denumirea lor se face în consecință.

V.1. Sinteza și caracterizarea unor noi N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil-hidrazide cu suport polimeric (XVIII-XXII)

Bazați pe faptul că produșii cu structură hidrazidică (XII-XVI) pot prezenta proprietăți biologice importante, am urmărit cuplarea lor la copolimerul poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XVII) în scopul obținerii unor sisteme conjugate cu toxicitate scăzută și eficacitate terapeutică (XVIII-XXII) (Cap. VI. 2. 2; Cap. VI. 3)

Conjugatele (XVIII-XXII) se obțin prin încălzirea poli(N-vinilpirolidonei-*alt*-acid itaconic) (XVII) cu hidrazidele (XII-XVI) în soluție de dioxan anhidru, la temperatura de 85-90°C, timp de 2 ore. După purificare produșii au puncte de topire nete, iar randamentul este cuprins între 75-88% [345]. (schema 14)





Schema 14. Sinteza N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil-hidrazidelor (**XVIII-XXII**) cu suport de poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic)

Analiza elementală de azot și datele spectrale (FT-IR, ¹H-RMN) au confirmat structura compușilor de cuplare (**XVIII-XXII**) [345].

Pe baza procentului de azot s-a determinat eficacitatea cuplării și raportul molar a hidrazidelor (**XII-XVI**) fixate la poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic)(tabelele 7-11)

Tabel 7-11. Eficacitatea cuplării și raportul molar a hidrazidei (XII-XVI) imobilizate la poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic (conjugatele XVIII-XXII)

Conjugat polimer-compus biologic activ	Eficacitatea cuplării %	Compus biologic activ cuplat pe copolimer mol/mol
XVIII	57,39	0,680
XIX	52,65	0,629
XX	61,33	0,820
XXI	42,00	0,504
XXII	51,89	0,621

Se poate menționa faptul că în patru cazuri, mai mult de jumătate dintre ciclurile anhidridice de pe lanțul de bază a copolimerului au reacționat, chiar dacă volumul substituentului introdus este mare. Totodată, deciclizarea procentual superioară în cazul hidrazidelor (**XII-XIV**), o considerăm drept consecință a influenței efectelor inductive și electromere existente în structura acestor agenți nucleofili.

Pentru conjugatele (**XVIII, XIX**) se prezintă spectrele ¹H-RMN în figurile 29 și 30.

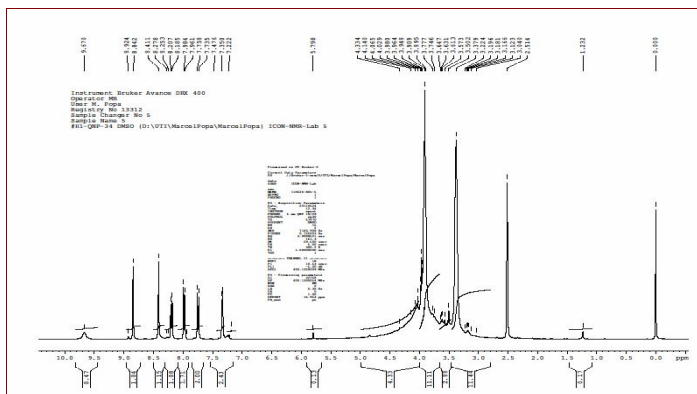


Figura 29. Spectrul ^1H -RMN al N-(p-nitrobenzoil)-D,L-glutaminil-hidrazidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (**XVIII**)

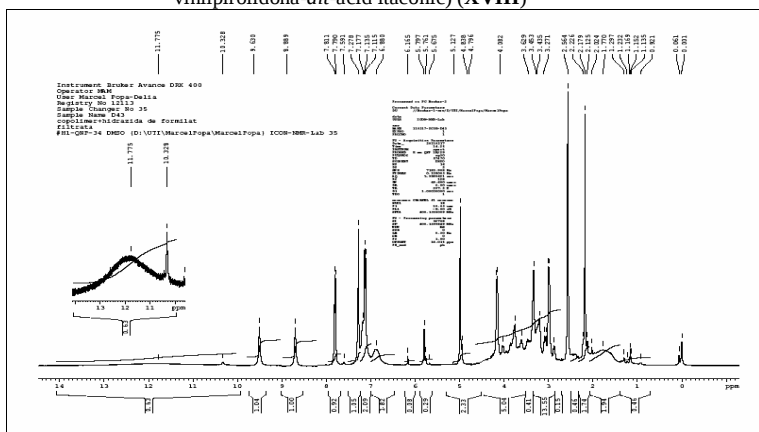


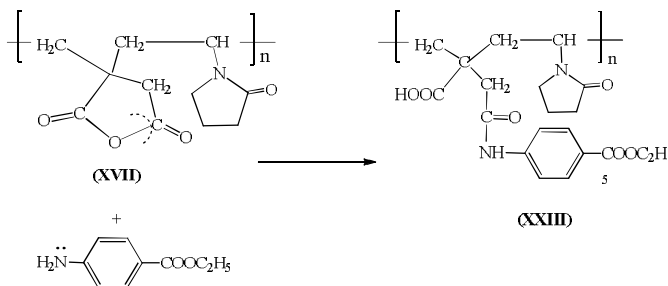
Figura 30. Spectrul ^1H -RMN al N-[(p-formilamino)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (**XIX**)

V.2. Sinteză și caracterizarea unor noi anilide cu suport polimeric (**XXIII** - **XXVI**)

Interesul pentru acest tip de conjugate este justificat prin importanța pe care o manifestă resturile amidice în multe substanțe medicamentoase [26, 33,41, 79,80,81,251, 282].

V.2.1. Sinteză și caracterizarea carboxianilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (**XXIII**)

Produsul sintetizat (**XXIII**) este o anilidă a poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic), rezultată printr-un proces de deciclizare a inelului anhidridic din copolimerul (**XVII**) sub acțiunea anestezinei, în mediu de dioxan anhidru, la 80-85°C, timp de 4-5 ore (Schema 15)



Schema 15. Obținerea carboxianilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic) (XXIII).

Analiza elementală de azot, cât și spectrală (FT-IR, ¹H-RMN) atestă structura acestui compus de aminoliză.

Pe baza analizei de azot s-a determinat eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a anesteziei pe poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic) (Tabel 12).

Tabel 12. Eficacitatea cuplării și raportul molar a anesteziei fixată pe poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic) (Conjugat XXIII).

Conjugat polimer-compus biologic activ	Eficacitatea cuplării %	Compus biologic activ cuplat pe copolimer mol/mol
XXIII	28,32	0,567

Eficacitatea scăzută a cuplării se poate explica prin faptul că electronii neparticipanți ai azotului anesteziei fiind implicați în sistemul de conjugare p-π, sunt mai puțin disponibili spre deciclizarea inelului anhidridic din copolimer.

În figura 33 este prezentat spectrul ¹H-RMN pentru conjugatul (XXIII)

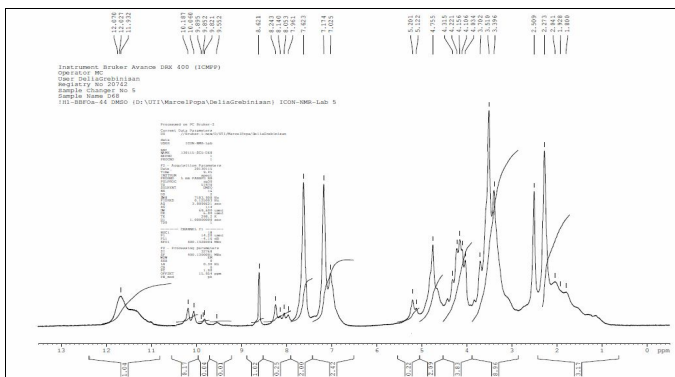
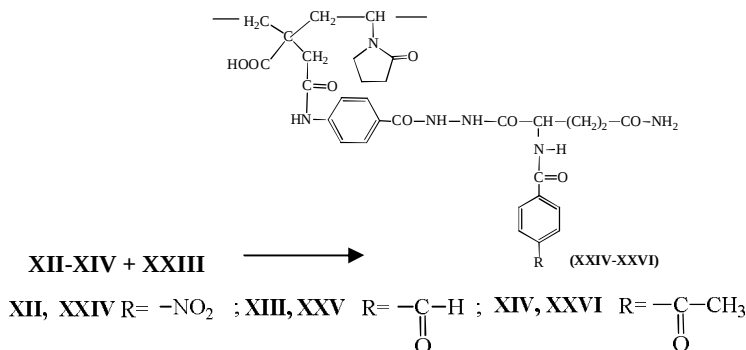


Figura 33. Spectrul ¹H-RMN al carboxianilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic) (XXIII)

V. 2. 2. Sinteza și caracterizarea unor noi N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil- hidrazin-anilide cu suport polimeric (XXIV-XXVI)

Mobilitatea atomilor de hidrogen din hidrazide fac posibilă o altă reacție – cea cu esterii aromatici. Având la dispoziție seria de hidrazide (XII-XIV) derivate de la N-(p-R-benzoil)-D,L-glutamină, toate cu substituenți în poziția *para* a inelului benzenic, ne-am propus să efectuăm reacția acestora cu carbetoxianilida poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXIII) rezultând conjugatele (XXIV-XXVI) (schema 16)



Schema 16. Sinteza N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminilhidrazin-anilidelor (XXIV-XXVI)

Reacția a avut loc între cantități echimoleculare de ester (XXIII) și hidrazidă (XII-XIV), în dioxan anhidru, iar ca element distinctiv este introducerea restului de anestezină, drept spațiator.

Structura conjugatelor (XXIV-XXVI) a fost investigată prin analiză de azot, spectre IR și ^1H -RMN.

Folosind procentul de azot s-a determinat eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a hidrazidelor (XII-XIV) la grupa esterică a carbetoxianilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (Tabelele 13-15).

Tabele 13-15. Eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a hidrazidelor (XII-XIV) fixate pe structura carbetoxianilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (conjugatele XXIV-XXVI)

Conjugat anilidă-copolimer-hidrazidă	Eficacitatea cuplării %	Hidrazidă cuplată pe anilida copolimerului mol/mol
XXIV	51,42	0,600
XXV	49,54	0,578
XXVI	42,85	0,50

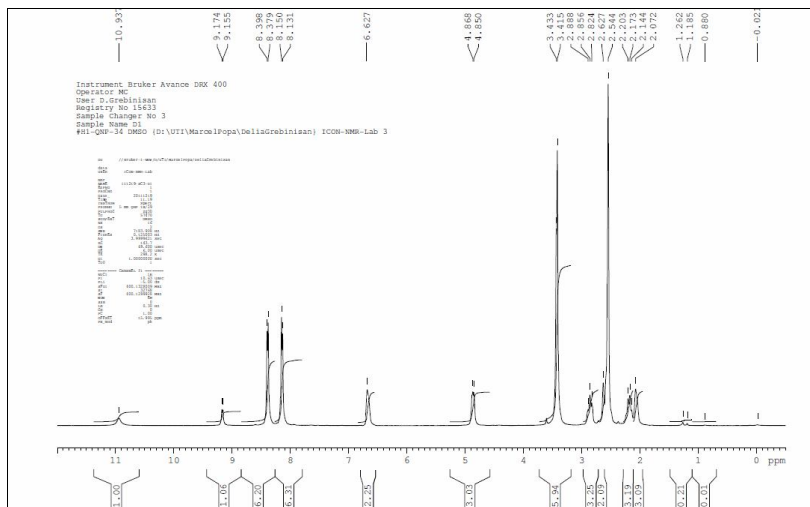
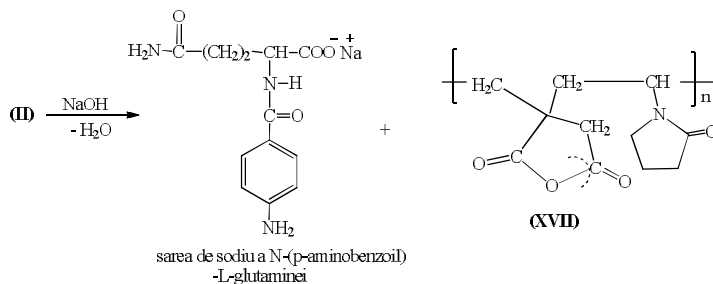


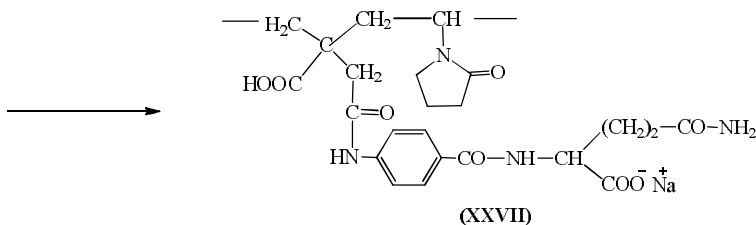
Figura 39. Spectrul ^1H -RMN al N-[(p-acetilamino)-benzoi]-D,L-glutaminilhidrazin-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (XXVI).

V.2.3. Sinteza și caracterizarea sării de sodiu a L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (XXVII)

Conjugatul (XXVII) ne-a interesat în funcția lui de intermediar, susceptibil de a reacționa cu unii compuși halogenați. Tris-(β -cloroetil)-amina și epiclorhidrina, au fost cele care ne-au captat atenția, având în vedere că, în calitate de substanțe reactive, ele se pretează la numeroase sinteze, unele încă neinvestigate.

S-a sintetizat glutamil-anilida sub formă de sare de sodiu (XXVII) prin deciclizarea, în dioxan anhidru, a copolimerului poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (XVII) cu sarea de sodiu a N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei (Schema 17)





Schema 17. Sinteza sării de sodiu a L-glutamyl-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVII).

Structura conjugatului (sare de sodiu) s-a dovedit cu ajutorul analizei de azot și spectrale (FT-IR, ^1H -RMN).

Cunoscând procentul de azot s-a calculat eficacitatea cuplării și raportul molar al sării de sodiu a N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei la inelul anhidridic poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (Tabel 16).

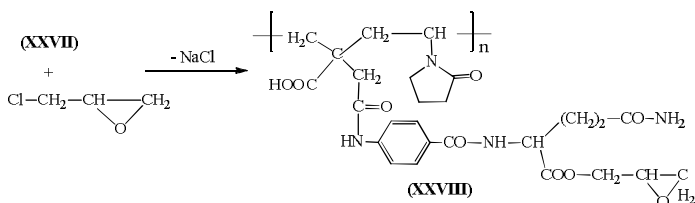
Tabel 16. Eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei sare sodică la poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVII) (Conjugat XXVII).

Conjugat polimer-compus biologic activ	Eficacitatea cuplării %	Compus biologic activ cuplat pe copolimer mol/mol
XXVII	46,67	0,64

Eficacitatea relativ scăzută a cuplării se datorează, în principal, implicării în conjugare a electronilor neparticipanți ai azotului aminic cu electronii π ai fragmentului aromatic, benzoil.

V. 2. 4. Sinteza și caracterizarea esterului 2,3-epoxi-propilic al L-glutamyl-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVIII).

În scopul obținerii unui intermediar cu reactivitate pronunțată față de agenții nucleofili am sintetizat un alt conjugat cu structură anilidică conținând gruparea epoxi. În acest sens s-a tratat sarea de sodiu a conjugatului (XXVII) cu epiclorhidrina, la 50-55°C, în mediu de dioxan anhidru (schema 18).



Schema 18. Sinteza esterului 2,3-epoxi-propilic al L-glutamyl-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVIII).

Pe baza procentului de azot s-a determinat eficacitatea cuplării și raportul molar a epiclorhidrinei la sarea de sodiu a L-glutamil- poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic)–**XXVII**) (Tabel 17).

Conjugat anilidă-copolimer- epiclorhidrină	Eficacitatea cuplării %	Epiclorhidrină cuplată pe anilidă-copolimer mol/mol
XXVIII	37,96	0,51

$$\begin{array}{ccc}
 \text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 & \xrightarrow{\text{t}^0/\text{izom.}} & \text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O} \\
 \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup & & \text{(a)} \\
 \quad \quad \quad \text{O} & & \\
 \text{(XXVIII)} & & \\
 & \searrow & \\
 & \text{R}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3 & \\
 & \quad \quad \parallel & \\
 & \quad \quad \text{O} & \\
 & \text{(b)} &
 \end{array}$$

(XXVIII) + $\longrightarrow$

(XXIX)

Cu procentul de azot găsit s-a calculat eficacitatea cuplării și raportul molar al

anesteziei la esterul 2,3 epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) - **XXVIII**). (Tabel 18).

Tabel 18. Eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a anesteziei la esterul 2,3 epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei - **XXVIII**) (Conjugatul **XXIX**).

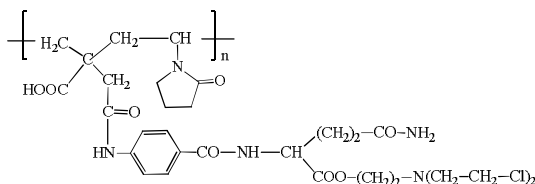
Conjugat anilidă-copolimer- anestezină	Eficacitatea cuplării %	Anestezină cuplată pe anilidă-copolimer mol/mol
XXIX	70,16	0,87

În acest caz, chiar dacă anestezina are o bazicitate mai slabă, sugerată de delocalizarea perechii de electroni neparticipanți de la azotul aminic spre gruparea carboxil, eficacitatea mare a cuplării o putem atribui reactivității pronunțate a inelului etilen-oxidic din conjugatul (**XXVIII**).

V. 3. Grefarea grupării azotiperitice pe molecula unor conjugate derivate de la poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic)

V. 3. 1. Sinteza și caracterizarea esterului 2-[di-(β-cloroetil)-amino]-etilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXX**)

Reacția s-a efectuat prin dizolvarea sării de sodiu a L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXVII**) în dioxan anhidru și tratarea soluției obținute cu tris-(β-cloroetil)-amină.



Schema 22. Sinteza esterului 2-[di-(β-cloroetil)-amino]-etilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXX**).

Pentru determinarea structurii acestui compus s-a făcut analiza chimică de azot, precum și analiza spectrală (FT-IR, ¹H-RMN). Pe baza procentului de azot s-a determinat eficacitatea cuplării și raportul molar a tris-(β-cloroetil)-aminei la sarea de sodiu a L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (Tabel 19).

Tabel 19. Eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a tris-(β-cloroetil)-aminei la sarea de sodiu a L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) - **XXVII**) (Conjugatul **XXX**).

Conjugat copolimer sare de sodiu- tris-(β-cloroetil)-amină	Eficacitatea cuplării %	tris-(β-cloroetil)-amină cuplată pe copolimer sare de sodiu mol/mol
XXX	56,00	0,70

Eficacitatea cu care s-a obținut azotiperita (**XXX**) dovedește că reacția s-a produs cantitativ la centrul nucleofil din molecula sării de sodiu a conjugatului (**XXVII**), respectiv oxigenul provenit din gruparea carboxil.

În figura 47 se prezintă spectrul ^1H -RMN al azotiperitei(**XXX**).

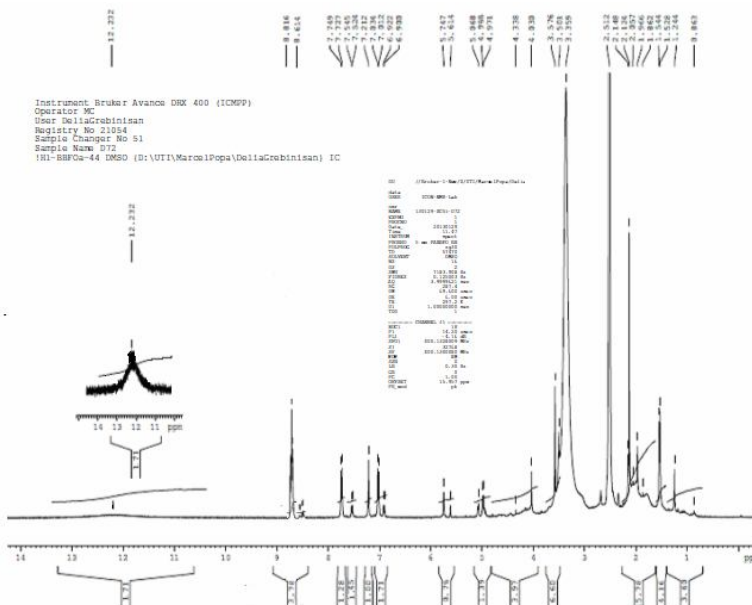
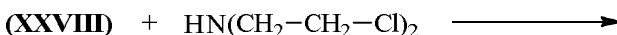
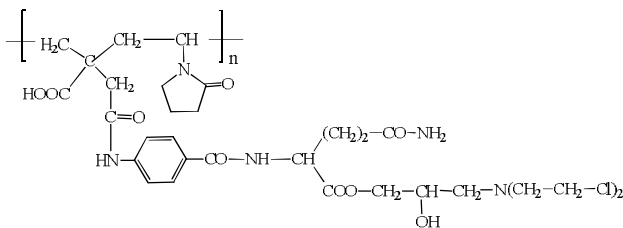


Figura 47. Spectrul ^1H -RMN al esterului 2-[di-(β-cloroetil)-amino]-etilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXX**).

În vederea obținerii unei azotiperite conținând în moleculă o grupă hidroxilică pentru a-i mări solubilitatea, s-a efectuat reacția dintre esterul (**XXVIII**) și di-(β-cloroetil)-amină. S-a folosit ca solvent dioxanul anhidru, iar temperatura de lucru a fost cuprinsă între 60-70°C.(schema 23)





Schema 23. Sinteza esterului 3-[di-(β-cloroetil)-amino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXXI**).

Structura azotiperitei (**XXXI**) a fost atribuită pe baza analizei de azot și analizei spectrale (FT-IR, ^1H -RMN).

Cu procentul de azot s-a determinat eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a di-(β-cloroetil)-aminei la esterul 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic). (Tabel 20).

Tabel 20. Eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a di-(β-cloroetil)-aminei la esterul 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXXI**).

Conjugat ester 2,3-epoxi-propilic al copolimerului-di-(β-cloroetil)-amină	Eficacitatea cuplării %	di-(β-cloroetil)-amină cuplată pe esterul copolimerului 2,3-epoxi-propilic mol/mol
XXXI	48,00	0,60

Eficacitatea cuplării a fost dictată de atacul nucleofil al azotului aminic asupra inelului etilen-oxidic care, puternic tensionat, se desface ușor.

În figura 49 conține spectrul ^1H -RMN al azotiperitei (**XXXI**).

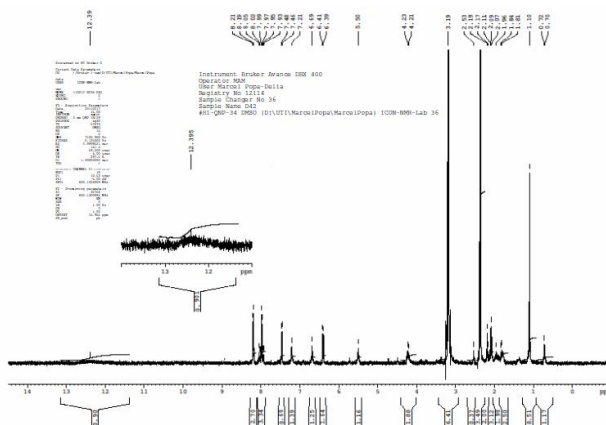
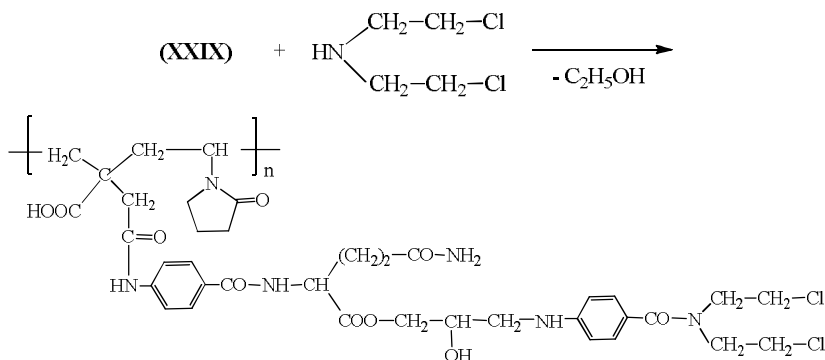


Figura 49. Spectrul ^1H -RMN al esterului 3-[di-(β-cloroetil)-amino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXXI**).

V.3.3. Sinteza și caracterizarea esterului 3-[di-(β-cloroetil)-aminocarboxifenilamino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (XXXII).

Ideea preparării unor azotiperite cu reactivitate redusă având gruparea di-(β-cloroetil)-aminică grefată pe structuri polimerice, prin intermediul unei funcțiuni amidice, reprezintă o posibilitate extrem de interesantă de a găsi derivați activi față de anumite tumori maligne. Totodată este de așteptat ca ei să fie puțin toxici, datorită inerției lor chimice marcate în timpul transportului la celula țintă.

În virtutea acestui principiu am sintetizat derivatul (XXXII) prin încălzirea esterului (XXIX) în dioxan anhidru, în prezența di-(β-cloroetil)-aminei. (schema 24).



Schema 24. Sinteza esterului 3-[di-(β-cloroetil)-aminocarboxifenilamino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) (XXXII).

Structura azotiperitei (XXXII) a fost stabilită prin analiză de azot și spectrală (FT-IR, ¹H-RMN).

Tabel 21. Eficacitatea cuplării și raportul molar de cuplare a di-(β-cloroetil)-aminei la esterul 3-(carbetoxifenilamino)-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic) -XXIX) (Conjugat XXXII).

Conjugat ester 3-(carbetoxi-fenilamino)-2-hidroxi-propilic al copolimerului-di-(β-cloroetil)-amină	Eficacitatea cuplării %	di-(β-cloroetil)-amină cuplată pe esterul 3-(carbetoxifenil- amino)-2-hidroxi-propilic al copolimerului mol/mol
XXXII	69,15	0,82

În această sinteză, reactivitatea mai scăzută a grupării aminice, este compensată de reactivitatea pronunțată a componentei esterice din restul de anestezină aflat în structura conjugatului (XXIX), ceea ce determină o eficacitate superioară a cuplării.

Spectrul ¹H-RMN al azotiperitei (XXXII), se regăsește în figura 51.

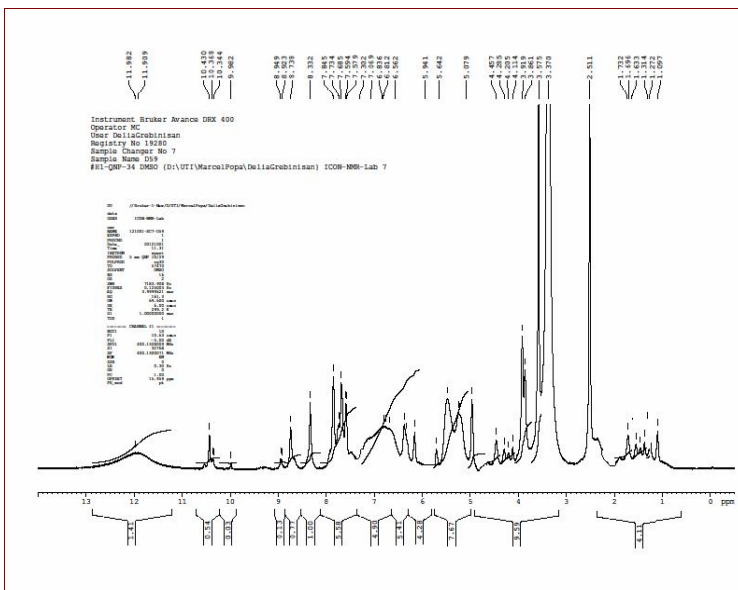


Figura 51. Spectrul ^1H -RMN al esterului 3-[di-(β -cloroetil)-aminocarboxifenilamino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XXXII**).

VI. ACTIVITATEA BIOLOGICĂ A UNOR DERIVAȚI DE GLUTAMINĂ ȘI A UNOR CONJUGATE POLIMER-DERIVAȚI DE GLUTAMINĂ

Testările pe animale de experiență folosite în scop științific s-au efectuat în baza Ordonanței nr. 37/2002 din 30/01/2002 publicată în Monitorul Oficial, Partea I, nr. 95 din 02/02/2002.

VI. 1. Evaluarea toxicității compuşilor (I - XXXII)

S-a determinat DL₅₀ folosind metoda Spearman- Karber [410] iar rezultatele obținute sunt trecute în tabelul 22 [260, 344, 345]

Tabel 22. Valorile DL₅₀ (mg/kg corp) pentru substanțele (I – XXXII)

Compusul	DL ₅₀ (mg/kg corp)			
	24 ore	48 ore	7 zile	Media
1	2	3	4	5
L-glutamină	11200	11200	11120	11173
I	8420	8420	7880	8240
II	9110	9110	8947	9155
III	8700	8700	8222	8540
IV	9350	9350	8900	9200
V	8500	8500	8350	8460
VI	8720	8720	8640	8693

VII	9000	9000	8580	8860
VIII	9700	9700	9280	9560
IX	9930	9930	9390	9750
X	8550	8550	8250	8450
XI	8670	8670	8620	8653
XII	8020	8020	7980	8006
XIII	8710	8710	8440	8620
XIV	9095	9095	8630	8940
XV	8350	8350	8280	8326
XVI	8510	8510	8475	8498
XVII	12250	12250	12200	12233
XVIII	8980	8980	8540	8833
XIX	9295	9295	8935	9175
XX	9455	9455	9125	9345
XXI	8670	8670	8580	8640
XXII	8745	8745	8715	8735
XXIII	10150	10150	10100	10133
XXIV	9670	9670	9590	9643
XXV	9940	9940	9915	9931
XXVI	9975	9975	9965	9971
XXVII	9880	9880	9845	9868
XXVIII	9820	9820	9790	9786
XXIX	9914	9914	9890	9906
di-(β-cloroetil)-amină				378
XXX	6240	6240	6150	6210
XXXI	6020	6020	6010	6016
XXXII	6370	6370	6280	6340

- derivații de glutamină (I - XVI) și conjugatele (XVIII-XXXII) indică valori ale DL₅₀ în limita valorilor admisibile screeningului de laborator.

VI.2. Testarea activității antitumorale pe animale purtătoare de tumori experimentale

VI.2.1. Activitatea antitumorală a N-[p-(acilamino)-benzoil]-derivaților de L-glutamină (III, IV)

În acest scop s-a utilizat ca tumoare experimentală ascita Ehrlich, iar ca animale de experiență șoareci A₂G în greutate de 25±2g proveniți din biobaza Institutului Oncologic "Prof. dr. Ion Chiricuță" Cluj-Napoca.

Inhibiția exercitată de peptidele luate în studiu s-a calculat după formula indicată în literatură [268, 412, 413], iar valorile acestea sunt prezentate în tabelul 23 [260].

Tabel 23. Inhibiția % prezentată de acil-dipeptidele (**III**, **IV**).

Substanța	Calea de administrare	Inhibiția, %		
		Ascita Ehrlich		
		400	200	40
III	i.p.	45	40	35
IV	i.p.	66	61	53
Metotrexat	i.p.	70	62	55

Analizând datele din tabel se poate constata că valorile inhibiției tumorii lichide sunt apreciable comparativ cu metotrexatul, antimetabolit de referință. Compusul **IV** prezintă valoarea inhibiției tumorii apropiată de metotrexat, situație influențată de restul p-acetil grefat pe molecula dipeptidei (**II**).

VI. 2. 2. Activitatea antitumorală a azotiperitelor cu suport polimeric (XXX-XXXII)

Studiul activității antitumorale a azotiperitelor cu structură polimerică (**XXX-XXXII**) s-a efectuat pe loturi de câte 10 șobolani Wistar purtători de carcinosarcom Walker 256, tratamentul fiind inițiat la 10 zile după grefarea tumorii.

Calcularea inhibiției creșterii tumorale s-a efectuat după aceeași formula [268, 412, 413] aplicată în cazul ascitei Ehrlich [260]. Rezultatele sunt date în tabelul 24.

Tabel 24. Activitatea antitumorală a azotiperitelor cu suport polimeric (**XXX-XXXII**)

Compusul	Calea de administrare	Inhibiția creșterii tumorii, %		
		Carcinosarcom Walker 256		
		(mg/kg corp)		
		400	200	40
XVII	i.p.	18	14	8
XXX	i.p.	55	30	17
XXXI	i.p.	62	38	20
XXXII	i.p.	78	60	24
Endoxan	i.p.	84		

Din datele noastre a rezultat:

- azotiperitele testate prezintă o evidentă acțiune citostatică, iar transportul selectiv al grupării citotoxice este realizat de către suportul polimeric ca o grupare activă mascată;

- azotiperita **XXXII**: esterul 3-[di-(β-cloroetil)-aminocarboxifenilamino]-2-hidroxi-propil al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) produce inhibiția carcinosarcomului Walker 256 la o valoare apropiată de aceea a endoxanului, citostatic de referință. Explicația o atribuim reactivității scăzute a grupării di-(β-cloroetil)-aminice datorită implicării electronilor neparticipanți *p* ai azotului în sistemul de conjugare

amidic, ceea ce face ca atacul alchilant să fie preponderent asupra elementelor celulei canceroase;

- gruparea carboxil ca și gruparea hidroxil ușurează solubilizarea azotipitelor și implicit administrarea lor intraperitoneal sau pe cale intravenoasă;
- difuzia prin membrana celulară pare a fi favorizată de gruparea carboxil neionizată;
- relația dintre suportul polimeric care prezintă el însuși o ușoară activitate de inhibiție citostatică și gruparea activă nu constă exclusiv în transport ci și în potențarea lor reciprocă, sub aspectul acțiunii asupra receptorului malign.

VI. 3. Activitatea tuberculostatică a unor N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil-hidrazide (XII-XIV) și a conjugatelor corespunzătoare (XVIII-XX)

S-a folosit tehnica diluției în serie, utilizând mediul lichid Youmans, cu ser de bou, iar ca inocul tulpina H₃₇R_v de *Mycobacterium tuberculosis*, în concentrație de 10⁻² mg/5mL mediu de cultură.

Compușii au fost testați în concentrație de 5 μg/mL, 10 μg/mL, 30 μg/mL și 40 μg/mL soluție dimetilsulfoxid-fosfat tampon (pH = 7) 1:4 (V/V).

Citirile au fost la 6 și 15 zile de la inoculare, iar rezultatul acțiunii tuberculostatice este trecut în tabelul 25 [174, 345].

Tabel 25. Activitatea *in vitro* asupra *Mycobacterium tuberculosis* a hidrazidelor (XII-XIV) și conjugatelor corespunzătoare (XVIII-XX)

Compusul	Concentrații de testare (μg/mL)										CMI* μg/mL
	5		10		20		30		40		
	6 zile	15 zile	6 zile	15 zile	6 zile	15 zile	6 zile	15 zile	6 zile	15 zile	
XII	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	55
XIII	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	-	-	45
XIV	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	15
Izoniazidă	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
XVIII	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	50
XIX	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	40
XX	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	10

- nici o creștere + dezvoltare redusă ++ dezvoltare moderată +++ dezvoltare intensă

Analizând datele prezentate în tabel se constată:

- hidrazidele și conjugatele corespunzătoare acestora nu manifestă activitate tuberculostatică la valori sub 10 µg/mL;
- substituirile în poziția *para* a nucleului benzenic din hidrazide sau conjugate produc modificări ale activității tuberculostatice;
- introducerea grupării acetilamino în molecula hidrazidei (**XIV**), respectiv în molecula conjugatului (**XX**) a dus la creșterea activității tuberculostatice, inhibând dezvoltarea bacteriană la concentrații reduse, aproape similar cu izoniazida;
- hidrazidele (**XII**, **XIII**) și conjugatele (**XVIII**, **XIX**) au valori ale CMI mult mai mari decât izoniazida, în timp ce hidrazida (**XIV**) prezintă o valoare a CMI apropiată de izoniazidă, iar conjugatul (**XX**) o valoare a CMI egală cu aceea a izoniazidei;

Lipsa dezvoltării *Mycobacterium tuberculosis*, în cazul ambelor citiri (6 și 15 zile) la hidrazida (**XIV**) și conjugatul (**XX**), pentru anumite concentrații (menționate în tabelul 25) permite afirmația că formele rezistente apar mai greu în aceste cazuri datorită prezenței grupei – NH–CO–CH₃ din poziția *para* a nucleului benzenic

VI. 4. Studiul acțiunii derivaților de N-acil-L-glutamină (**I**, **II**) și N-[p-(acilamino)-benzoil]-L-glutamină (**III**, **IV**) asupra unor enzime digestive

Având în vedere că modificările proceselor metabolice survin în urma modificărilor proceselor enzimatic, ca o consecință a acțiunii diverselor substanțe, s-a urmărit, *in vitro*, influența N-(p-nitrobenzoil)-L-glutaminei (**I**), N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei (**II**), N-[p-(formilamino)-benzoil]-L-glutaminei (**III**), N-[p-(acetilamino)-benzoil]-L-glutaminei (**IV**) asupra activității tripsinei, lipazei și amilazei, încercând totodată stabilirea de relații între structură și activitatea biologică a acestora [305].

Acțiunea asupra activității tripsinei s-a determinat după metoda Sørensen, [417], aprecierea activității lipazei s-a făcut conform metodei Bondi, Chiroy și Lebon descrisă în [418], iar acțiunea asupra amilazei s-a efectuat folosind metoda Benedikt [347, 414].

Tabel 26. Rezultatele privind influența compușilor (**I-IV**) asupra activității enzimelor digestive.

Substanță 20 mg	Concentrația enzimei (g/mL) în soluție triferment 3%		Activitatea enzimei exprimată în mL NaOH n/50 în soluție 3% triferment	
	Tripsină	Lipază	Tripsină	Lipază
I	3,3	1,81	1,7	1,2
II	3,3	1,81	3,2	1,8
III	3,3	1,81	4,1	2,9
IV	3,3	1,81	5,9	3,4

Din datele tabelului se deduc următoarele:

- existența unei acțiuni moderate a compușilor cercetați asupra activității tripsinei;
- se evidențiază acțiunea de stimulare a activității tripsinei provocată de N-(p-acilamino)-benzoil-derivații (**III**, **IV**) și de ușoară inhibare a activității tripsinei indusă de N-(p-nitrobenzoil)-L-glutamină (**I**), respectiv N-(p-aminobenzoil)-L-glutamină (**II**);
- N-[p-(acetilamino)-benzoil]-L-glutamina (**IV**) determină valoarea cea mai crescută a activității tripsinei, urmată de valoarea influențată de N-[p-(formilamino)-benzoil]-L-glutamină (**III**);
- derivații de L-glutamină (**I-IV**) afectează foarte puțin activitatea lipazei și practic nu afectează activitatea amilazei (motiv pentru care valorile pentru aceasta nu s-au mai inclus în tabel);
- compararea activității enzimelor influențată de compușii (**I-IV**) care diferă între ei prin tipul substituenților din poziția *para* a nucleului benzenic permite stabilirea unei corelații structură-activitate enzimă de interes teoretic, dar și aplicativ, în contextul valorificării potențiale a unor astfel de compuși, în calitate de stimulatori a activității unor enzime implicate în metabolismul intermediar.
-

VII CONCLUZII

Cercetările întreprinse cuprind sinteza, studiul fizico-chimic și biologic al unor noi derivați de glutamină și conjugate ale acestora cu poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic).

S-a ales pentru studiu domeniul derivaților de glutamină, întrucât existau date care sugerau potențiale avantaje biologice pe care le poate conferi prezența unor aminoacizi într-o structură polimerică folosită drept suport al principiului activ.

Rezultatele obținute permit formularea următoarelor concluzii generale:

1. Studiul acilării L-glutaminei cu clorura de p-nitrobenzoil, în condițiile reacției Shotten-Bauman, a confirmat o serie de aspecte prezentate în literatură, aducând și unele precizări:

a) Apariția colorației roșu-violet în cursul procesului de acilare se datorează formării, printr-o reacție secundară, a unei Δ^2 -oxazolinone-5 ca urmare a acțiunii excesului de clorură acidă asupra sării de sodiu a N-(p-nitrobenzoil)-L-glutaminei.

b) În mediu bazic, Δ^2 -oxazolinona-5 rezultată elimină un proton din poziția α , formând un anion a cărui structură admite extinderea sarcinii negative peste trei

grupări cromofore, generând structuri limită care determină colorația tranzitorie în sistemul reactant.

c) Proporția racemizării cât și randamentul reacției de acilare a aminoacidului depind de temperatura de lucru, timpul de contact, polaritatea solventului, tăria bazei folosite.

2. S-a efectuat reducerea N-(p-nitrobenzoil)-L-glutaminei (**I**) cu sulfura de amoniu, preparată *in situ* din amoniac și hidrogen sulfurat, obținându-se N-(p-aminobenzoil)-L-glutamina (**II**).

Metoda a fost considerată neconvențională din cauza toxicității hidrogenului sulfurat și a randamentului scăzut în produs finit.

3. Sinteza derivatului aminat s-a realizat și printr-un alt procedeu parțial modificat de noi. Acesta a constat în transformarea și separarea p-nitrobenzoil derivatului de glutamină sub formă de sare de sodiu care a fost supusă în continuare reducerii cu sulfură de sodiu, în mediu de etanol anhidru și în prezența bicarbonatului de sodiu.

Metoda este ușor de aplicat, iar randamentul în produs finit este superior tehnicilor de reducere descrise în literatură.

4. S-a realizat funcționalizarea grupei aminice din structura dipeptidei (**II**) urmărind prin aceasta valorificarea, din punct de vedere biologic, a noilor substanțe.

a) Folosind acidul formic sau anhidrida acetică în maestec cu cidul acetic, drept agenți acilanți ai N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei s-au sintetizat N-[p-(acilamno)-benzoil]-derivații (**III**, **IV**) glutaminei cu acțiune antitumorală, funcționând ca antimetaboliți.

b) Optimizarea reacției de obținere a N-[p-(R)-benzoil]-derivații (**I-IV**) de glutamină a permis alegerea celor mai adecvate condiții pentru sinteză asigurând, totodată, un randament mai avantajos în produs finit.

c) Prin reacția N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei cu unele sulfocloruri aromatice s-au obținut N-[p-(arilamodosulfonil)-benzoil]-derivați ai glutaminei (**V**, **VI**) cu posibilă activitate biologică.

5. S-au sintetizat 2-(p-R-fenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinone-5 (**VII-XI**) prin acțiunea deshidratantă a anhidridei acetice asupra N-[p-(R)-benzoil]-derivaților de glutamină (**I**, **III-VI**).

a) La tratarea cu baze 2-(p-nitrofenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5 (**VII**) dă o colorație violet –intens care, se explică prin formarea unui carbanion a cărui

sarcină negativă poate fi extinsă peste cele trei grupări cromofore: $>C=O$, $>C=N-$, $-NO_2$.

b) Spre deosebire de Δ^2 -oxazolinona 5 care derivă de la N-(p-aminobenzoil)-L-glutamină, 2-[p-(acilamino)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinonele-5 (**VIII**, **IX**) și 2-[p-(arilamidossulfonil)]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinonele-5 (**X**, **XI**) nu mai dau colorație roșie-violetă la tratare cu baze. De data aceasta carbanionul format nu mai poate admite extinderea sarcinii sale asupra grupării amidice din poziția *para* a nucleului benzenic substituit, ca în cazul precedent, când în această poziție se află gruparea nitro.

c) se apreciază că un rol important în stabilitatea Δ^2 -oxazolinonele-5 (**VII-XI**) sintetizate îl are restul de p-R-benzoil, greșit la grupa amino a L-glutaminei. Ca urmare, restul p-nitrofenil permite instalarea unei conjugări extinse ceea ce determină o stabilitate mai pronunțată a moleculei Δ^2 -oxazolinonele-5 (**VII**), în timp ce restul N-(acilamino)-fenil din Δ^2 -oxazolinonele-5 (**VIII**, **IX**) și restul N-(arilamidossulfonil)-fenil din Δ^2 -oxazolinonele-5 (**X**, **XII**) nu mai pot avea structurile limită ca în cazul precedent, întrerupând conjugarea și implicit diminuând stabilitatea acestui tip de Δ^2 -oxazolinone-5.

6. Pe baza datelor asimilate din literatură și a rezultatelor noastre experimentale vizând sinteza unor noi Δ^2 -oxazolinone-5 se propune un mecanism de ciclizare care implică formarea, mai întâi a unei anhidride mixte, etapă urmată de eliminarea unei molecule de acid acetic, sincron cu atacul nucleofil al oxigenului amidic asupra carbonului grupei carboxil.

7. S-au sintetizat noi hidrazide (**XII-XVI**) derivate de la N-(p-R-benzoil)-L-glutamină (**I**, **III-VI**) prin deciclizarea 2-(p-R-fenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinonelor-5 (**VII-XI**) cu hidrat de hidrazină. Am considerat că reacția debutează, probabil, cu formarea unui produs intermediar de adiție a hidratului de hidrazină la grupa carbonil din poziția 5 a Δ^2 -oxazolinonei. Acest, suferă la încălzire un proces de rearanjare a moleculei cu deciclizarea heterociclului Δ^2 -oxazolinonic. Sinteza acestui tip de hidrazide s-a realizat atât în scopul testării acțiunii biologice cât și pentru imobilizarea lor pe copolimerul poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XVII**).

8. Cea de-a doua direcție de cercetare a constat în imobilizarea principiilor active pe suport de poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic), în scopul obținerii de noi sisteme conjugate cu toxicitate scăzută și potențial biologic cât mai eficient.

9. Prin reacția copolimerului poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (**XVII**) cu hidrazide derivate de la N-(p-R-benzoil)-D,L-glutamină (**XII-XVI**) s-au obținut noi N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminil-hidrazide cu suport polimeric (**XVIII-XXII**), unele cu proprietăți tuberculostatice comparabile cu izoniazida, medicament de referință.

10. Folosind anestezina drept agent nucleofil s-a deciclizat inelul anhidridic din copolimerul (XVII), rezultând carbetoxianilida poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXIII), folosită drept produs de plecare în sinteza altor noi conjugate.

11. Mobilitatea atomilor de hidrogen a făcut posibilă reacția de condensare a hidrazidelor (XII-XIV) cu grupa esterică din carbetoxi anilida poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXIII), rezultând N-(p-R-benzoil)-D,L-glutaminilhidrazin- anilide cu suport polimeric (XXIV-XXVI), conjugate ce prezintă caracteristici structurale de interes biologic, cunoscută fiind importanța pe care o manifestă resturile amidice în diverse substanțe merdicamentoase.

12. Sinteza sării de sodiu a glutamil-anilidei poli (N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVII) ne-a interesat în funcția ei de intermediar, susceptibil de a reacționa cu unii compuși halogenați. Acest conjugat s-a obținut prin deciclizarea copolimerului (XVII) cu sarea de sodiu a N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminei în mediu de dioxan anhidru.

13. Sarea de sodiu a conjugatului (XXVII), în contact cu epiclorhidrina s-a dovedit suficient de reactivă conducând la esterul 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVIII) care, prin gruparea epoxi, poate fi considerat un intermediar cu reactivitate pronunțată față de agenții nucleofili. Reacția, deși aparent simplă, s-a dovedit mai greu controlabilă în ceea ce privește eficiența cuplării, din cauza formării de produși secundari rezultați în urma izomerizării, sub influența temperaturii, a restului de propilen-oxid din structura conjugatului.

14. Prin deciclizarea heterociclului epoxidic din esterul 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(acidului itaconic –*alt*-pirolidonat de vinil) (XXVIII) cu anestezina s-a reușit sinteza esterului 3-(carbetoxifenilamino)-2-hidroxi-propilic al L-glutamil- anilidei poli(acidului itaconic-*alt*-pirolidonat de vinil) (XXIX). Funcționalizarea restului propilen-oxidic ne-a fost utilă întrucât ea a deschis posibilitatea efectuării unor reacții de condensare la grupa carbetoxi a fragmentului de anestezină, reacții ce au putut genera catene alungite, în cazul nostru alte conjugate.

15. În vederea găsirii unor noi compuși azotipertitici activi față de unele tumori maligne, s-a grefat gruparea di-(β -cloroetil)-amină pe molecula unor conjugate constituite din poli(acid itaconic-*alt*-pirolidonat de vinil) și derivați ai glutaminei.

a) Prin tratarea sării de sodiu a L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVII) cu tris- (β -cloroetil)-amină s-a obținut esterul 2-[di-(β -cloroetil)-amino]- etilic al L-glutamil poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic)

(XXX), în care gruparea di-(β -cloroetil)-aminică este grefată pe substratul polimeric prin intermediul unei punți etilenice.

b) Prin deciclizarea heterociclului propilen-oxidic din structura esterului 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXVIII) cu di-(β -cloroetil)-amină s-a reușit sinteza esterului 3-[di-(β -cloroetil)-amino] -2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXXI), în care gruparea azotiperitică este grefată pe suportul polimeric prin intermediul unei punți hidroxi-propilice, influențând favorabil solubilitatea conjugatului citostatic.

c) Reacția de condensare la grupa carbetoxi a restului de anestezină din structura esterului 3-(carbetoxifenilamino)-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXIX) cu di-(β -cloroetil)-amina ne-a condus la esterul 3-[di-(β -cloroetil)-aminocarbetoxifenilamino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaconic) (XXXII) având gruparea azotiperitică grefată pe suport prin intermediul unei funcțiuni amidice. Într-o astfel de structură electronii neparticipanți ai azotului sunt blocați prin conjugare amidică, ceea ce are ca efect micșorarea toxicității și creșterea eficienței antitumorale.

d) Utilizarea suportului polimeric ca transportor al grupării citotoxice în țesutul tumoral a conferit noilor azotiperite o toxicitate redusă și selectivitate crescută ca urmare a eliberării fragmentului alchilant la celula țintă.

16. Eficiența reacției de cuplare precum și raportul molar suport polimeric/principiu activ sunt influențați de o serie de factori ca: structura și reactivitatea componentei de cuplare, timpul de contact, temperatura de lucru, solventul folosit.

17. S-au adus precizări privind mecanismele de reacție pentru unele dintre căile de sinteză elaborate.

18. Stabilirea structurii noilor compuși s-a realizat prin analiză chimică (C, H, N- pentru derivații de L-glutamină; N- pentru sistemele conjugare) și spectrală (FT-IR, ^1H -RMN).

19. S-a efectuat un studiu farmacologic pentru determinarea toxicității acute a celor 31 compuși sintetizați, testare care a confirmat următoarele:

a) derivații de L-glutamină (I-XVI) și conjugatele (XVIII-XXII) indică valori ale DL_{50} în limita valorilor admisibile screeningului de laborator;

b) micșorarea toxicității principiului activ odată cu imobilizarea lui pe suport polimeric:

- valoarea dozei letale(DL₅₀) a N-(p-R- benzoi)-D,L- glutaminil-hidrazidelor cu suport polimeric(**XVIII-XXII**) și N-(p-R- benzoi)-D,L – glutaminilhidrazin-anilidelor cu suport polimeric (**XXIV-XXVI**), crește față de aceea a N-(p-R- benzoi)-D,L- glutaminil-hidrazidelor libere (**XII-XVI**);

- conjugatele azotiperitice (**XXX-XXXII**) au valoarea dozei letale (DL₅₀) mult mai mare comparativ cu di-(β-cloroetil)-amina liberă.

20. Experimentarea biologică s-a efectuat asupra unui număr de 13 dintre compuși sintetizați: 7 derivați de glutamină și 6 conjugate polimer-principiu activ. Testările au abordat cercetarea acțiunii citostatice, tuberculostatice și influența asupra activității unor enzime digestive.

a) Un număr de 2 derivați de L-glutamină(**III,IV**) cu structură specifică antimetaboliților și 3 conjugate citostatice (**XXX-XXXII**) având grefată în structura lor grupa di-(β-cloroetil)-aminică, s-au testat din punct de vedere al activității antitumorale exercitate asupra tumorilor experimentale ascita Ehrlich și carcinisarcom Walker 256. Analizând rezultatele s-a constatat că produșii testați manifestă evidentă acțiune antizumorală. S-au găsit mai activi N-[p-(acetilamino)-benzoi]- L-glutamina (**IV**), care produce inhibarea ascitei Ehrlich la o valoare apropiată de a metotrexatului (animetabolit de referință) și esterul 3-[di -(β-cloroetil)-aminocarboxifenilamino]-2-hidroxi-propil al L- glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic) (**XXXII**), care determină regresia carcinosarcomului Walker 256 aproape la fel ca endoxanul (citostatic de referință). În acest caz relația dintre suportul polimeric, care prezintă el însuși o ușoară activitate de inhibiție citostatică și gruparea di-(β-cloroetil)-aminică nu constă exclusiv în transport ci și în potențarea lor reciprocă, sub aspectul acțiunii asupra receptorului malign.

b) A fost testată acțiunea tuberculostatică a unui număr de trei N-(p-R- benzoi)-D,L- glutaminil-hidrazide atât libere (**XII-XIV**) cât și grefate pe suport de poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic) (**XVIII-XX**), pe microbul *Mycobacterium tuberculosis*, comparativ cu izoniazida, medicament de referință. Rezultatele au indicat activitate tuberculostatică pentru toate hidrazidele, mai activ dovedindu-se conjugatul N-[(p-acetilamino)-benzoi] – D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona-*alt*-acid itaonic) (**XX**), a cărei concentrație minimă inhibitorie este egală cu aceea a medicamentului de referință, 10 μg/mL.

c) Cercetările privind influența asupra activității enzimelor digestive in vitro au arătat că produșii experimentați, derivați ai N-acil-L-glutaminei(**I, II**) și N-[p-

(acilamino)-benzoil]-L-glutaminei (**III**, **IV**) influențează diferit activitatea tripsinei și lipazei, remarcându-se favorabil N-[p-(acetilamino)-benzoil]-L-glutamina (**IV**) și nu afectează practic activitatea amilazei.

21. În cadrul cercetărilor efectuate au fost sintetizați 31 compuși (16 derivați de L-glutamină și 15 sisteme polimer-principiu activ) necitați în literatura de specialitate după cum urmează:

1. *N*-(*p*-Nitrobenzoil)-L-glutamina
2. *N*-(*p*-Aminobenzoil)-L-glutamina
3. *N*-[*p*-(Formilamino)-benzoil]-L-glutamină
4. *N*-[*p*-(Acetilamino)-benzoil]-L-glutamină
5. α -*N*-[*p*-(Metilsalicilamidossulfonil)-benzoil]-L-glutamină
6. α -*N*-[*p*-(Metilfenoxiacetatamidossulfonil)-benzoil]-L-glutamină
7. 2-(*p*-Nitrofenil)-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5
8. 2-(*p*-Formilamino)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5
9. 2-(*p*-Acetilamino)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5
10. 2-[*p*-(Metilsalicilamidossulfonil)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5
11. 2-[*p*-(Metilfenoxiacetatamidossulfonil)-fenil]-4-(γ -amidoetil)- Δ^2 -oxazolinona-5
12. α -*N*-(*p*-Nitrobenzoil)-D,L-glutaminil-hidrazida
13. α -*N*-[(*p*-Formilamino)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida
14. α -*N*-[(*p*-Acetilamino)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida
15. α -*N*-[(*p*-Metilsalicilamidossulfonil)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida
16. α -*N*-[(*p*-Metilfenoxiacetatamidossulfonil)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida
17. Copolimer poli(N-vinilpirolidona-alt-anhidridă itaconică) - poli (NVPAl)
18. *N*-(*p*-Nitrobenzoil)-D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
19. *N*-[(*p*-Formilamino)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
20. *N*-[(*p*-Acetilamino)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
21. α -*N*-[(*p*-Metilsalicilamidossulfonil)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
22. α -*N*-[(*p*-Metilfenoxiacetatamidossulfonil)-benzoil]-D,L-glutaminil-hidrazida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
23. Carbetoxianilida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
24. *N*-(*p*-Nitrobenzoil)-D,L-glutaminilhidrazinanilida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
25. *N*-[(*p*-Formilamino)-benzoil]-D,L-glutaminilhidrazin-anilida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)
26. *N*-[(*p*-Acetilamino)-benzoil]-D,L-glutaminilhidrazin-anilida poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)

27. *Sarea de sodiu a L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)*
28. *Esterul 2,3-epoxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)*
29. *Esterul 3-(carboxifenilamino)-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)*
30. *Esterul 2-[di-(β -cloroetil)-amino]-etilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)*
31. *Esterul 3-[di-(β -cloroetil)-amino]-2-hidroxi-propilic al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)*
32. *Esterul 3-[di-(β -cloroetil)-aminocarboxifenilamino]-2-hidroxi-propil al L-glutamil-anilidei poli(N-vinilpirolidona-alt-acid itaconic)*

22. Rezultatele originale prezentate în teză au fost publicate astfel: **1** lucrare în revistă din străinătate (cotaată **ISI**), **2** lucrări apărute în reviste de circulație internațională (cotate **ISI**), **1** lucrare în proceeding în țară, **1** poster în străinătate, **5** postere la manifestări științifice naționale.

BIBLIOGRAFIE (selectivă)

26. Moise, M., Șunel, V., Profire, L., Popa, M., Desbrieres, J., Peptu, C., *Molecules*, **14**, 162 (2009).
31. Budeanu, C. H., Șunel, V., *An. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, S.Ic.*, **20**, 59 (1974).
33. Pintilie, O., Moise, M., Profire, L., Șunel, V., *Farmacia*, **5**, 61 (2006).
40. Șunel, V., Lionte, C., Popa, M., Pintilie, O., Mungiu, O. C., Teleman, S., *Eurasian Chem. Tech. J.*, **4**, 201 (2002).
41. Moise, M., Șunel, V., Profire, L., Popa, M., Lionte, C., *Farmacia*, **16**, 283 (2008).
42. Șunel, V., Ciugureanu, C., Ungureanu, M., *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iași*, **109**, 671 (2005).
57. Paul, S., Nando, P., Grupto, R., Lopy, A., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 425 (2004).
63. Șunel, V., Budeanu, C. H., Mazilu, I., Apostolescu, M., *Bul. Inst. Polit. Iași, S. Iic*, **15** (19), 85 (1979).
64. Budeanu, C. H., Șunel, V., *An. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, S.Ic.*, **15**, 69 (1969).
65. Șunel, V., Cecal, A., Șoldea, C., Asandei, N., *Rev. Roum. Chim.*, **40**, 773 (1995).
68. Budeanu, C. H., Șunel, V., Iorga, T., Cecal, A., *Farmacia*, **28**, 1 (1980).
69. Budeanu, C. H., Șunel, V., *Bul. Inst. Polit. Iași, S. Iic*, **21** (25), 71 (1975).
74. Șunel, V., Băsu, C., Sirbu, D., Popa, M., Diaconu, E., Șoldea, C., *Acta Pharm.*, **51**, 35 (2001).
81. Șunel, V., Băsu, C., Oniscu, C., *Roum. Biotechnol. Lett.*, **4**, 122 (2000).
79. Șunel, V., Pintilie, O., Profire, L., Pui, A., Popa, M., *An. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, S.Ic.*, **2**, 13 (2007).
80. Șunel, V., Lionte, C., Băsu, C., Cheptea, C., *Chem. Indian Journal*, **2**, 1 (2005).
81. Șunel, V., Băsu, C., Oniscu, C., *Roum. Biotechnol. Lett.*, **4**, 122 (2000).
158. Ringsdorf, H., *J. Polym. Sci.*, **53**, 135 (1975).
174. **Grebinișan, D.**, Holban, M., Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., Sesiunea de Comunicări Științifice "Zilele Universității Al. I. Cuza", Iași, 27-28 octombrie, 2012.
235. Cismaru, L., Rezumatul tezei de doctorat, Univ. Tehnică "Gh. Asachi" Iași, 2007.
239. Larionov, L. F., *Cancer Res.*, **21**, 99 (1961).
240. Lyttle, M. H., Satyam, A., Hocker, M. D., Bauer, K. E., Caldwell, C. G., Hui, N. C., Morgan, A. S., Mergia, A., Kauvar, L. M., *J. Med. Chem.*, **37**, 1501 (1994).
241. Ware, D. C., Palmer, B. D., Wilson, W. R., Deny, W. A., *J. Med. Chem.*, **36**, 1839 (1993).

242. Williams, M. G., Earhart, R. H., Bailey, H., Govern, J., *Cancer Res.*, **50**, 5475 (1990).
243. Xiong, J., Zhu, H. F., Zho, Y. J., Lan, Y. J., Jiang, J. W., Yang, J. J., Zhang, S. F., *Molecules*, **14**, 3142 (2009).
244. Zunino, F., Savi, G., Giuliani, F., Gambetta, R., Supino, R., Tinelli, S., Pezzoni, G., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **20**, 421 (1984).
245. Moise, M., Șunel, V., Holban, M., Popa M., Desbrieres, J., Peptu, C., *J. Mater. Sci.*, **47**, 8223 (2012).
246. Schwanstecher, C., Meyer, M., Schwanstecher, M., Panten, U., *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 1023 (1998).
247. Walsh, N. E., Ramamurthy, S., Schoenfeld, L., Hoffman, J., *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **67**, 436 (1986).
248. Pintilie, O., Șunel, V., Profire, L., Popa, M., *An. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, S.I.c.*, **2**, 29 (2006).
249. Raiser, J. P., McLean, A., Olgive, A. D., Blackwell, A. D., Bamber, D. J., Goodyer, I., Jones, P. B., Sahakian, B. J., *Neuropsychopharmacology*, **30**, 775 (2005).
251. Moise, M., Șunel, V., Profire, L., Popa, M., Desbrieres, J., Peptu, C., *Bul. Inst. Polit., Iași, S.I.c.*, **55** (59), 55 (2009).
252. Stănculescu, R., Moise, M., Șunel, V., Dorohoi, D. O., *Bul. Inst. Polit., Iași, S.I.c.*, **56** (60), 135 (2010).
253. Schousboe, A., *Neurochem. Research*, **28**, 347 (2003).
255. Miller, A. L., *Altern. Med. Rev.*, **4**, 239 (1999).
256. Xu, X. D., Su, Y. S., Shao, Q. S., Hu, J. F., Qian, Z. Y., Zhou, Y. L., Ye, Z. Y., *Zhonghua Wei Chang Wai Ka Za Zhi*, **14**, 436 (2011).
257. Daniele, B., Perrone, F., Gallo, C., Pignata, S., Martino, S., Vivo, R., Barietta, E., Tambaro, R., Abbiati, R., D'Agostino, L., *Gut*, **48**, 28 (2001).
258. Choi, K., Lee, S., Oh, S. J., Lim, S. Y., Jean, W. K., Oh, T. Y., Kim, J. W., *Clin. Nutr.*, **26**, 57 (2007).
259. Gaurav, K., Goel, R. K., Shukla, M., Pondey, M., *Indian J. Med. Paedriatr. Oncol.*, **33**, 13 (2012).
260. **Grebinișan, D.**, Holban, M., Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., Lionte, C., *Cellulose. Chem. Technol.*, **45**, 571 (2011).
262. Nenițescu, C. D., *Chimie organică*, vol. I, II, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1980.
263. Avram, M., *Chimie organică*, vol. I, II, Ed. Academiei, București, 1983.
268. Larianov, L. F., *Chimioterapia tumorilor maligne*, Ed. Medicală, București, 1963.
269. Younova, A., *Comp. Read. Acad. Bulg. Sci.*, **55**, 49 (2002).
270. Elderfield, R. C., Liao, T. K., *J. Org. Chem.*, **26**, 4996 (1961).
271. Seydel, J. K., Butte, W., *J. Med. Chem.*, **20**, 439 (1977).
272. Pirianowicz, E., Skulski, L., *Acta. Pol. Pharm.*, **47**, 4349 (1990).
273. Trujillo, F., Montoya, C., Espinoza, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1825 (2003).
274. Hindersin, P., Endler, S., Heidrich, R., Lehmann, C., Dietrich, J., *Psychiatr. Neurol. Med. Psychol.*, **37**, 689 (1985).
275. Scorza, R., Santaniello, A., Salazar, G., Lenna, S., *Drugs. Pharm.*, **9**, 25 (2008).
276. Akberova, S. L., *Biol. Bull. Russian Acad. Sci.*, **29**, 390 (2002).
277. Agarwal, R., Agarwal, C., Kumar, P., *Res. Commun.*, **16**, 831 (1984).
278. Larianov, L. F., *Cancer Res.*, **21**, 99 (1961).
279. Xavier, S., McDonald, S., Roth, J., Farmenti, S., *J. Rond. Oncology*, **65**, 517 (2007).
280. Sheppard, G. S., Kawai, M., Craig, R. A., Davison, D. J., Majest, S. M., Bell, R. L., Henkin, J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 965 (2004).
281. Leyers, S., Hacker, H. G., Wiendlocha, J., Gutschow, M., Wiese, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4761 (2008).
282. Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., Profire, L., Pintilie, O., Lionte, C., *Molecules*, **13**, 177 (2008).
283. Sanielevici, H., Urseanu, F., *Sinteza de intermediari aromatici*, vol. I, Ed. Tehnică, București, 1983.
284. Iosif, A., *Fabricarea produșilor intermediari și a coloranților*, Ed. Tehnică, București, 1953.
285. Maity, K. S., Pradhon, C. N., Padwardhan, V. A., *Appl. Catalysis*, **301**, 251 (2006).
287. Syahrami, A., Panjaitan, T. S., Indrayanto, G., Wilkins, A. J., *Asian Nat. Prod. Res.*, **2**, 305 (2000).
290. Carerra, B. J., Vazquez, I., Espinoza, M., Trujillo F., *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 732 (2005).
292. Ross, W. C. J., Warwick, G. P., Roberts, J., *J. Chem. Soc.*, 3110 (1955).
297. Budeanu, C. H., Șunel, V., Ivaș, E., *Rev. de Chimie*, **32**, 454 (1981).
299. Fischer, I., *Design for environment, creating eco-efficient products and processes*, Ed. Mc Graw

Hill, New York, 1996.

300. Azzouz, A., Leontie, M., Dorohoi, D. O., Gheorghies, C., Elemente de strategie în design industrial, Ed. Plumb, Bacău, 1998.
301. Mazilu, C., Radu, D., Rotiu, E., Ionescu, I., Rev. de Chimie, **58**, 88 (2007).
305. **Grebinișan, D.**, Burlea, M., Cheptea, C., Lionte, C., Dorohoi, D. O., Șunel, V., Popa, M., Hurjui, I., Dig. J. Nanomater. Bios., **8**, 777 (2013).
306. Dominguez, J., Leon, C., Rodrigues, J., Gamboa, N., Gut, J., Rosenthal, P., Eur. J. Med. Chem., **44**, 1457 (2009).
307. Helmy, M., Fahmy, Z., Exp. Parasitol., **119**, 125 (2008).
308. Zaldivar, V., Lopez, M., Demare, P., Regla, I., Mufioz, R., Biochimie, **93**, 286 (2011).
309. Bonacorso, H., Wentz, A., Lourega, R., Cechinel, C., Moraes, T., Coelho, H., Zanatta, N., Martins, M., Höerner, M., Alves, S. J., Fluorine Chem., **127**, 1066 (2000).
312. Schaaf, G., Mukherjee, S., Waterson, A., Tetrahedron Lett., **50**, 1928 (2009).
315. Vankat, C., Verkade, J., J. Mol. Catalysis, **272**, 233 (2007).
319. Yamashita, D. S., Dodds, R. A., Pharm. Des., **6**, 1 (2000).
320. Xu, W., Yang, S., Bhadury, P., He, J., He, M., Gao, I., Hu, D., Song, B., Biochem. Physiol., **101**, 6 (2011).
334. Descas, P., Jarry, C., Eur. Pat., **392**, 929 (1990).
341. Boulos, L., Arsaninous, M., Ewies, E., Phosphorus, Sulphur and Silicon, **184**, 275 (2009).
342. Periera, E. R., Sancelme, M., Voldaire, A., Prudhomme, M., Bioorg. Med. Chem., **7**, 190 (1997).
343. Viti, G., Naminicine, R., Ricci, R., Pastelline, V., Abeli, L., Funo, M., Eur. J. Med. Chem., **29**, 401 (1994).
344. **Grebinișan, D.**, Holban, M., Aparaschivei, R., Crețu, M., Popa, M., Șunel, V., Sesiunea de Comunicări științifice "Zilele Universității" Iași, 12-13 noiembrie, 2010 (P-13).
345. **Grebinișan, D.**, Holban, M., Lionte, C., Peptu, C., Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., Polym-Plast. Technol, **52**, 1213 (2013).
346. Remli, M., Condom, R., Guedji, R., Bull. Soc. Chim. France, **6**, 864 (1986).
347. Budeanu, C. H., Budeanu, E., Ciugureanu, C., An. Șt. "Al. I. Cuza" Iași, S.Ic, **13**, 157 (1967).
355. Haack, T., Fattori, R., Napoletano, M., Pellacini, F., Franza, G., Raffaini, G., Ganazzoli, F., Bioorg. Med. Chem., **13**, 4425 (2005).
357. Turan, G., Altintop, M. D., Ozdemir, A., Mohsen, A., Kaplancikli, Z. A., J. Enz. Inhib. Med. Chem., **26**, 782 (2012).
358. Ragavendran, J., Sriram, D., Patel, S., Reddi, I., Bharathwajan, N., Stables, N., Yogeeswari, P., Eur. J. Med. Chem., **42**, 146 (2007).
360. Zeller, P., Pletscher, K. F., Gutmann, H., Hegedus, B., Straub, O., Am. New York Acad. Sci., **80**, 555 (2006).
363. Mohareb, R. M., Fleita, D. H., Sakka, O. K., Molecules, **16**, 16 (2011).
364. Holban, M., Șunel, V., Popa, M., Lionte, C., Cell. Chem. Technol., **45**, 191 (2011).
365. Aparaschivei, R., Holban, M., Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., Cellulose Chem. Technol., **46**, 301 (2012).
367. Bruchner, A., Garcia, M., Marsh, A., Gellman, S., Eur. J. Org. Chem., **10**, 3555 (2003).
412. Graff, A., Biolka, H., Probleme de oncologie experimentală, Ed. Academiei, București, 1962.
413. Winfield, A. J., Richards, M. E., Pharmaceutical practice, Ed. Elsevier, New York, 2004.
414. Dumitru, F. I., Iordăchescu, D., Enzyme, Ed. Medicală, București, 1974.
417. Bozgan, L., Busuioc, A., Cernătescu, I., Dumvravă, E., Gheorghiță, N., Iacubovici, A., Jerca, L., Pavel, M., Șerban, F., Turner, C., Biochimie medicală – lucrări practice, Institutul de Medicină și Farmacie, Iași, 1973.
418. Jurcă, V., Tănase, E., Budeanu, E., St. Cerc. Biochim., **21**, 220 (1978).

Listă lucrări științifice finalizate în perioada de pregătire a doctoratului

Articole publicate în reviste științifice din străinătate și internațional

- 1. Grebinișan, D.**, Holban, M., Lionte, C., Peptu, C., Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., **Drug-Grebinișan, D.**, Holban, M., Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., Lionte, C., **Novel Acyl Derivatives of N-(p-Aminobenzoyl)-L-Glutamine encapsulated in Polymeric**

Nanocapsules with Potential Antitumoral Activity, Cell.Chem.Technol., 45, 2011, p.571-577(ISI 0,55)

2. **Grebișișan, D.**, Burlea, M., Chepteia, C., Lionte, C., Dorohoi, D.O., Șunel, V., Popa, M., Hurjui, I.,

Optimization Reaction for Obtaining N-[p-(R)-benzoyl]-L-Glutamine Derivates with Pharmaceutical Action, Dig. J. Nanomater.Bios; 8, 2013, p.777-785 (ISI 1,2)

3. **Polymer Conjugates with Tuberculostatic Activity, Based on Poly(N-Vinyl Pyrrolidone-alt-Itaconic Anhydride) and Novel Aminoacid Hydrazides**, - Ppolym-Plast. Technol., 52, 2013, 1213 (ISI 1,48)

Lucrare apărută în proceeding

1. **Grebișișan, D.**, Șunel, V., Popa, M., Crețu, M.

Copolymer NVP-AI reaction with biologically active derivatives with p-acylamino- benzoyl-aminoacid moiety. Acta Chem.Univ „Al.I.Cuza” Iași, 19, 2012, p. 34-35

Comunicări prezentate la manifestări științifice în străinătate și în țară

1. **Grebișișan, D.**, Șunel, V., Popa, M., Holban, M., Desbrières J.,
Nouveaux dérivés de glutamine immobilisés sur support polymère et leur ction tuberculostatique, X-eme Collque franco-romain sur les polymères, Douai, France, 06-08.set, 2011 (poster-7)

2. **Grebișișan, D.**, Holban, M., Aparaschivei, R., Grebișișan, M., Crețu, M., Popa, M., Șunel, V.,
Noi derivați de glutamină imobilizați pe suport polimeric și testarea lor toxicologică, Sesiune de Comunicări Științifice- Zilele Universității „Al.I.Cuza”- Iași, 12-13 noiembrie, 2010(poster-13)

3. Holban, M., Șunel, V., Popa, M., **Grebișișan, D.**, Aparaschivei, R., Bârsă, M. L.
Noi sisteme de eliberare controlată pe bază de polimeri naturali, Sesiune de Comunicări Științifice -Zilele Universității „Al.I.Cuza”- Iași, 12-13 nov. 2010 (poster-12)

4. **Grebișișan, Hanțiu, D.**, Aparaschivei, R., Holban, M., Rață, D., Grebișișan, M., Popa, M., Șunel, V.,
Noi conjugate polimer-principiu activ. Sintează și caracterizare Sesiune de Comunicări Științifice - Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului-Iași, 7-19 noiembrie, 2010 (poster19)

5. **Hanțiu, Grebișișan, D.**, Holban, M., Popa, M., Șunel, V., Desbrieres, J.,
Noi acil-derivați ai N-(p-aminobenzoil)-L-glutamina cu potențială activitate antitumorală Sesiune de Comunicări Științifice Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului-Iași, 7-18 noiembrie, 2011 (poster20)

6. **Grebișișan, D.**, Holban, M., Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J.,
Sintesis and characterization of new hzdrazides derived from N-(p-aminobenzoil) -L- glutamine with potential tuberculostatic and their imobilization on polymer support of poli N-vinylpyrrolidone-alt- itaconic anhydride, Conferința Facultății de Chimie - Universitatea „Al.I.Cuza” Iași, 25-26 octombrie, 2012 (poster-9)

7. **Grebișișan, D.**, Șunel, V., Popa, M., Crețu, M.
Reacția copolimerului NVP-AI cu produși biologic activi derivați ai p- acilaminobenzoil-aminoacizilor Sesiune de Comunicări Științifice -Universitatea „Al.I.Cuza”- Iași, 26 mai 2012 (poster-7)

Lucrări colaterale domeniului de cercetare

1. **Grebișișan, D.**, Aparaschivei, R., Moise, M., Popa, M., Șunel, V., Desbrieres, J.,
Synthèse des nouveaux dérivés a potentiellé antituberculeuse et leur immobilisation sur le poly(anhydride maleique-alt-acetate de vinyle), X-eme Collque franco-romain sur les polymères, Alba Iulia, Roumanie, 27-29 Août, 2009 (poster-30),

2. Aparaschivei,R., **Grebișișan,D.**, Șunel,V.,Popa,M., Holban,M.N.,
Derivați benzoxazolici pe suport de poli(anhidridă maleică-alt-acetat de vinil),
Sesiune de Comunicări Științifice -Zilele Universității „Al.I.Cuza”- Iași, 12-13 noiembrie 2010 (poster-11)
3. Aparaschivei,R., Popa,M.,Șunel,V., **Grebișișan,D.**, Holban,M.N.,
Sinteza și caracterizarea unor conjugate polimer-principiu activ pe bază de derivați benzoxazolici și anestezină,
Sesiune de Comunicări Științifice Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului-Iași,7-19 noiembrie, 2010 (poster -17)
4. Rață, D., **Grebișișan,D.**, Popa,M.,Peptu, C. A.
Sinteza și caracterizarea de micro și nanocapsule pe bază de polimeri naturali și sintetici prin metoda de condensare interfacială,
Sesiune de Comunicări Științifice Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului-Iași,7-19 noiembrie, 2010 (poster -18)