Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Mosul
College of Pharmacy

Synthesis and Cytotoxicity Study of New Substituted Coumarin-Fused Pyrazoline Derivatives

A Thesis
Submitted to the Department of Pharmaceutical Chemistry and the Committee of Graduate Studies of the College of Pharmacy, University of Mosul in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of *Doctor of Philosophy in Pharmacy (Pharmaceutical Chemistry)*

By

MOATH KAHTAN BASHIR
(*B.SC. Pharmacy 2001*)
(*M.Sc. Pharmacy 2011*)

Supervised By

Ass. Prof. Dr. Nohad A. Al-Omari **Prof. Dr. Adnan O. Omar**

2018 A.D. **1439 A.H.**

Abstract

Pyrazoline and coumarin are important heterocyclic moieties that got a lot of interest from scientists in the last few decades because of their various pharmacological effects such as the antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, and anticancer activity, accordingly this study includes design and synthesis of conjugated compounds composed from coumarin derivatives with pyrazoline derivatives (first series) in an attempt to potentiate the cytotoxic activity (synergism effect). O-glycosylation of these conjugates (second series), and conjugation of 1,3-dioxolane ring with these conjugates (third series) were made in an attempt to exaggerate such cytotoxic activity.

The first series compounds were obtained according to Knoevenagel reaction by condensing of salicylaldehyde with ethyl acetoacetate to produce 3-acetylcoumarin which reacts with hydrazine hydrate or with one of its four defined derivatives to produce the final products A1-A5.

The second series compounds were also started with Knoevenagel reaction but through condensation of 2,4-dihydroxybenzaldehyde with ethyl acetoacetate to produce 3-acetyl-7-hydroxycoumarin which react with hydrazine hydrate or with one of its four defined derivatives to produce the final products (B1-B5). The O-glycosylation of these compounds were obtained through fusion reaction with glucose pentaacetate in the presence of ferric chloride as Lewis acid to yield the O-glycosylated final products B1-G to B5-G.

The third series compounds were also started with Knoevenagel reaction, but through condensation of 2,4,5-trihydroxybenzaldehyde with ethyl acetoacetate to produce 3-acetyl-6,7-dihydroxycoumarin; the

catechol moiety were methylated by dichloromethane to produce the conjugated 1,3-dioxolane ring using anhydrous potassium fluoride as a catalyst, then the product 3-acetyl-6,7-dioxolanocoumarin was reacted with hydrazine hydrate or with one of its four defined derivatives to produce the third series final products C1-C5.

The multi steps reaction procedures were monitored and its purity was checked by using TLC and FT-IR spectroscopy. The chemical structure of the final products were confirmed through measuring their melting points, FT-IR spectroscopy, elemental microanalysis (CHN), ^{1}H-NMR, and ^{13}C-NMR.

The *in vitro* cytotoxicity study was conducted through MTT assay by using two cell lines which are MCF-7 (breast cancer) and SKG cell line (esophagealcancer).

The cytotoxicity inhibition percentage results for series (A1-A5), (B1-B5), (B1-G to B5-G) and (C1-C5) in both MCF-7 and SKG cell lines showed that, the majority of prepared compounds possessed a gradual and significant higher growth inhibition percentages than 5-FU specially at higher concentrations (250 and 500 µg/ml).

In MCF-7 cell line, the IC_{50}(s) of the glycosylated compounds (B1-G, B2-G, B3-G, and B4-G) were significantly lower than non-glycosylated compounds which indicates the role of O-glycosylation in targeting cancer cells due to the higher expression of glucose transporter proteins. The IC_{50}(s) of compounds C1, C4, and C5 (with 1,3-dioxolane conjugation) were significantly lower than A1, A4, and A5 compounds (without 1,3-dioxolane conjugation) which may indicate the importance of this ring in cytotoxicity. In SKG cell line, the O-glycosylated compounds B1-G, B3-G, and B4-G showed significant lower IC_{50}(s) than

the same compounds without glycosylation which also reflect the role of glycosylation on potentiated cytotoxic activity. The IC_{50} (s) of compounds C1, C3, and C5 were also significantly lower than compounds A1, A3, and A5 due to the presence of 1,3-dioxolane ring.

The lowest IC_{50} value was 2.47 µg/ml for the O-glycosylated compound B3-G and such higher cytotoxicity may be attributed to glycosylation and to a proper interaction with the active site, however a mechanism study of such conjugate may be required to confirm the results.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية الصيدلة

تشييد و دراسة السمية الخلوية لبعض المعوضات الجديدة للكومارينات المندمجة مع البايرازولين

اطروحة مقدمة الى فرع الكيمياء الصيدلانية والى لجنة الدراسات العليا في كلية الصيدلة – جامعة الموصل كجزء من متطلبات الحصول على شهادة الدكتوراه في علوم الصيدلة (الكيمياء الصيدلانية)

من قبل

معاذ قحطان بشير

(*بكالوريوس صيدلة ٢٠٠١*)

(*ماجستير صيدلة ٢٠١١*)

باشراف

الاستاذ مساعد الدكتورة نهاد عبدالوهاب العمري **الاستاذ الدكتور عدنان عثمان عمر**

٢٠١٨ م **١٤٣٩ هـ**

الخلاصة

ان مركبات البايرازول والكومارين هي مركبات حلقية غير متجانسة لاقت اهتماما كبيرا من قبل العلماء في السنوات الاخيرة وذلك بسبب فعاليتها البايولوجية المختلفة كمضادات للبكتريا والفايروسات وكذلك مضادات للسرطان, ولذلك فقد ركزت هذه الدراسة على دمج مركبات البايرازولين مع مركبات الكومارين كمحاولة متوقعة لزيادة تأثيرها ضد السرطان (كما في السلسلة الاولى). كذلك تصنيع كلايكوسيدات مرتبطة مع هذه المركبات كمحاولة متوقعة لزيادة الفعالية بدرجة اكبر (كما في السلسلة الثانية), وأخيرا ربط حلقة ٣,١- الدايوكسولان مع المركبات المندمجة كمحاولة اخرى لزيادة الفعالية ضد السرطان (السلسلة الثالثة).

لقد تم تحضير مركبات السلسلة الاولى اعتمادا على تفاعل (Knoevenagel) وذلك بتكاثف الديهيد الساليسيل مع اسيتواسيتات الاثيل ليتكون مركب ٣-اسيتيل الكومارين والذي بدوره تفاعل مع الهيدرازين المائي ومشتقاته الاربعة للحصول على المركبات النهائية (A1-A5).

اما مركبات السلسلة الثانية فقد تم تحضيرها ايضا بداية من تفاعل (Knoevenagel) وذلك بتكاثف ٤,٢- ثنائي هيدروكسي بنزالديهيد مع اسيتواسيتات الاثيل ليتكون مركب ٣-اسيتيل-٧-هيدروكسي الكومارين والذي بدوره تفاعل مع الهيدرازين المائي ومشتقاته الاربعة للحصول على المركبات النهائية (B1-B5). ان ربط الكلايكوسيد بهذه المركبات تم بتفاعلها مع الكلوكوز خماسي الاسيتات بوجود كلوريد الحديديك (حامض لويس) ونتج عنها كلايكوسيدات السلسلة الثانية (B1-G to B5-G).

اما مركبات السلسلة الثالثة تم تحضيرها بداية من تفاعل (Knoevenagel) وذلك بتكاثف ٥,٤,٢- ثلاثي هيدروكسي بنزالديهيد مع اسيتواسيتات الاثيل ليتكون مركب ٣-استيل-٧,٦-ثنائي هيدروكسي الكومارين, وقد تم ادخال مجموعة الميثيل الى الكاتيكول في المركب بواسطة ثنائي كلوريدالميثان بوجود فلوريد البوتاسيوم اللامائي لتتكون حلقة ٣,١- الدايوكسولان ونتج المركب ٣-اسيتيل-٧,٦-دايوكسولان الكومارين, والذي بدوره تفاعل مع الهيدرازين المائي ومشتقاته الاربعة للحصول على المركبات النهائية (C1-C5).

ان عملية تصنيع المركبات المطلوبة قد تمت بطريقة التفاعل متعدد الخطوات وتمت مراقبة هذه التفاعلات والتأكد من نقاوة المركبات باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وكذلك التحليل الطيفي للاشعة تحت الحمراء. ولقد تم تشخيص التركيب الكيميائي للمركبات النهائية من خلال

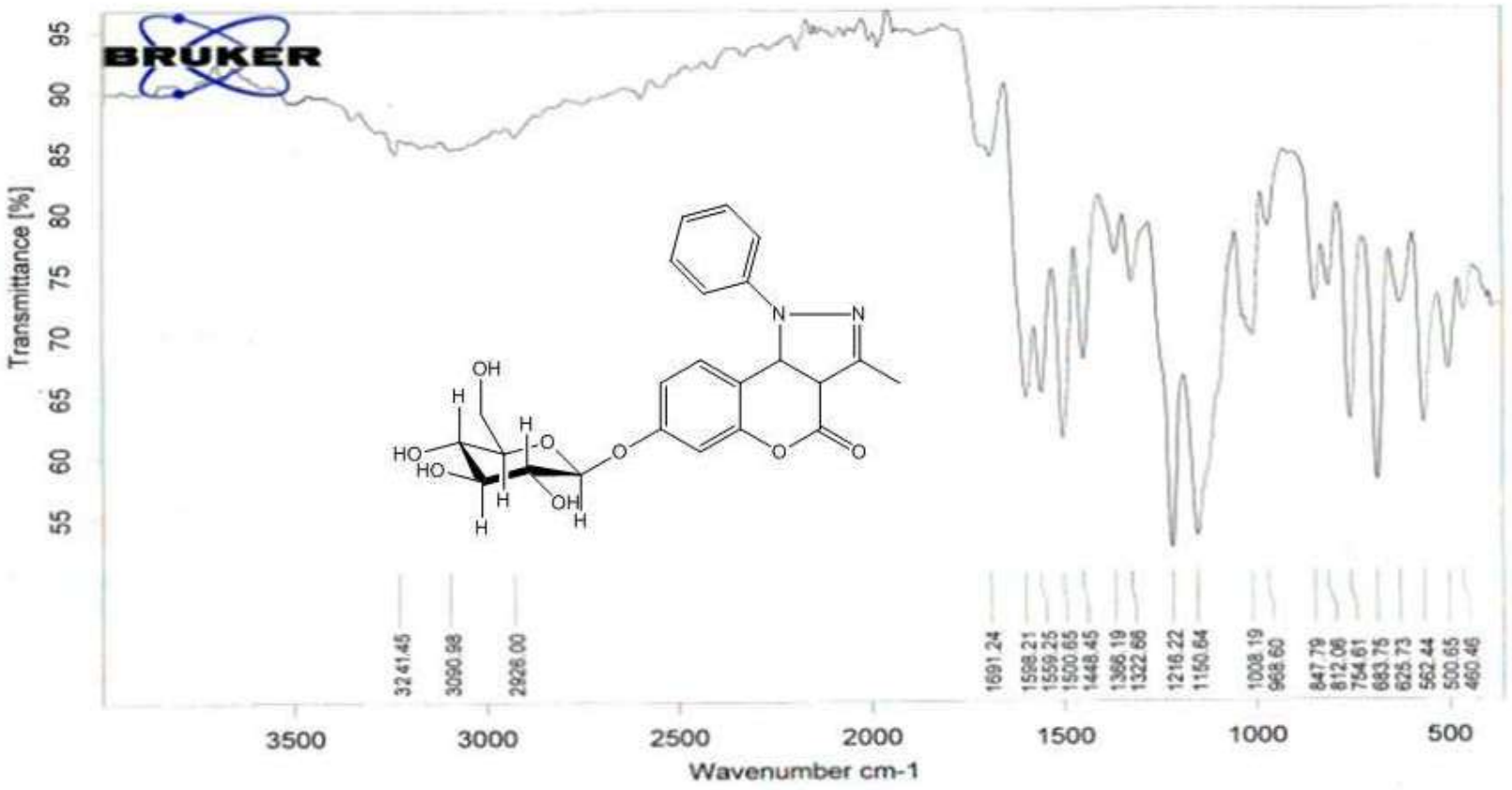

Figure 3-36:The IR Spectrum of Compound B2-G