

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



New 4-Substituted Benzocoumarins As Potential Bioactive Agents

A Thesis

Submitted to the Committee of Postgraduate Studies

College of Pharmacy/ University of Mosul

**As a Partial Fulfilment of the Requirements for the Master
Degree in Pharmacy**

By

Sarah Ahmed Mohammed Waheed

(B.SC. Pharmacy 2012)

Supervised by

Prof. Dr. Yasser Fakri Mustafa

2022 A.D.

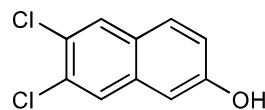
1443 A.H.

Abstract

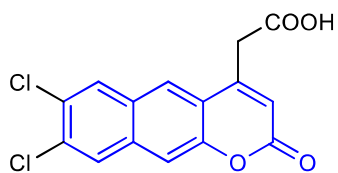
In the literature, there are a huge number of compounds synthesised through various reactions and techniques. However, the usefulness of most of these compounds in human life is still below the desired level. To handle this concern, a series of novel benzocoumarins were synthesised from a new naphthalene-based derivative, and their various biomedical activities were investigated. From these investigations, the biomedical profiles of these benzocoumarins are almost completed, clearing their therapeutic effects and directing the incoming efforts to improve the concluded goals.

In this work, a series of eight novel compounds were synthesised and then tested for antimicrobial, antioxidant, hypoglycaemic, and antitumor activities. Also, their pharmacokinetic parameters were evaluated *in silico* using pre-ADMET, a free online program. The synthetic scenario involves three sequential steps. Firstly, the synthesis of **SA0** by diazotization and Sandmeyer reactions using 6-amino-7-chloronaphthalen-2-ol, triethylbenzylammonium chloride, copper dichloride, 1,1-dimethylethyl nitrite, and *p*-toluenesulphonic acid. anhydrous CaCl₂ was utilised for drying the organic layer, followed by recrystallization of the sample from aqueous EtOH. Secondly, **SA1** was synthesised by the Pechmann type condensation reaction of **SA0** with acetone dicarboxylic acid catalysed by conc. H₂SO₄. Lastly, the synthesis of **SA2-SA7** was done by the reaction of **SA1** with SOCl₂ in order to convert the carboxylic acid group in **SA1** into an acid chloride-derived product. This is followed by reacting the resultant intermediate with phenolic derivatives to create the final product. Each of the resultant compounds has a different group substituted in the para position of the benzene ring, which are methoxy for **SA2**, methyl for **SA3**, fluoride for **SA4**, chloride for **SA5**, bromide for **SA6**, and iodide for **SA7**.

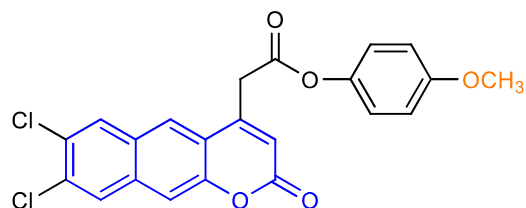
The chemical structures of these new compounds, shown below, were confirmed by FTIR, $^1\text{H-NMR}$, as well as $^{13}\text{C-NMR}$.



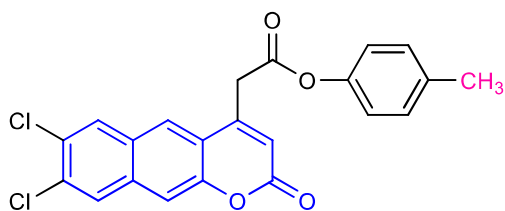
SA0



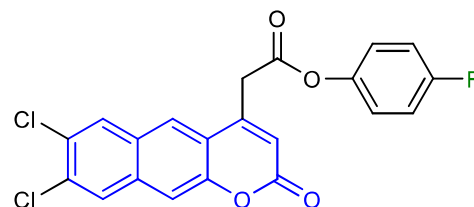
SA1



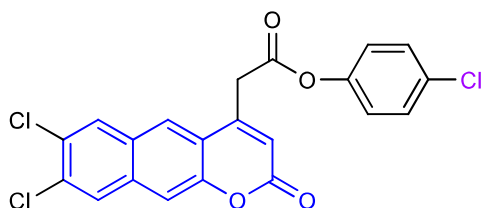
SA2



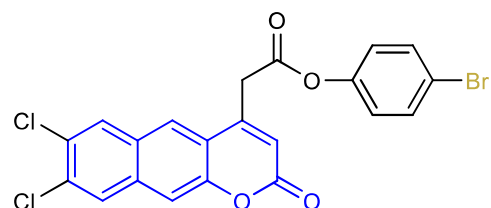
SA3



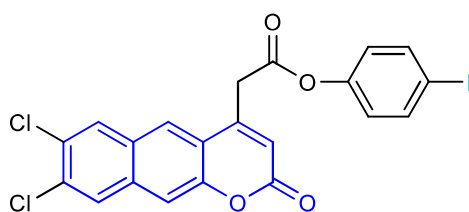
SA4



SA5



SA6



SA7

Then the pharmacokinetic parameters were evaluated *in silico* and revealed that the synthesised compounds have excellent penetration across the gastrointestinal mucosa and most of them have poor penetration across the blood-brain barrier. These findings suggest good oral bioavailability along with low neurological toxicity profiles.

After that, these novel compounds underwent biological evaluation in order to check their possible activities as antimicrobial, antioxidant, hypoglycaemic, and antitumor.

The antimicrobial activity evaluation was done by using the famous method of broth dilution to test these new compounds' activities versus six gram-negative aerobic bacterial strains, namely *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, and *Salmonella typhi*, four anaerobic bacterial strains, namely *Prevotella melaninogenica*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, and *Fusobacterium necrophorum*, and two pathogenic fungal strains, namely *Aspergillus niger* and *Candida albicans*. The safety profile was tested on the normal flora, a non-pathogenic *Escherichia coli* strain.

The antioxidant activity evaluation was done by testing these novel compounds' capabilities to neutralise hydroxyl as well as 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals using L-ascorbic acid as a standard. The new compounds were also tested for hypoglycaemic activity against two blood-controlling enzymes, yeast α -glucosidase and porcine α -amylase.

Lastly, their antitumor activity was checked using the well-known MTT cell viability test versus six cancerous cell lines, namely KYSE-30 (94072011, human Asian oesophageal squamous cell carcinoma), SK-OV-3 (91091004, Caucasian ovary adenocarcinoma), SKG (C27676, human papillomavirus-related cervical squamous cell carcinoma), AMN3 (CVCL-M395, murine mammary

adenocarcinoma), HeLa (93021013, epithelioid cervix carcinoma), and MCF-7 (86012803, Caucasian breast adenocarcinoma). Their toxicity to normal cells was also investigated using the normal cell line RWPE-1 (human normal prostate epithelial cells).

The results obtained from the antimicrobial activity assessment of these novel compounds revealed a number of important observations. Firstly, **SA4** and **SA5** were the most powerful among these compounds versus the tested bacteria. Secondly, these compounds were much safer on normal flora compared to ciprofloxacin, the standard, with **SA4** having bacteriostatic rather than bactericidal potential. Thirdly, our compounds demonstrated a weak-to-moderate bactericidal effect against the tested anaerobic bacterial strains, which was significantly lower than the employed criterion, metronidazole. Finally, the antifungal activity of most of these novel compounds was very high as compared to nystatin, the standard, and **SA4** and **SA5** were the most active versus the tested pathogenic fungi.

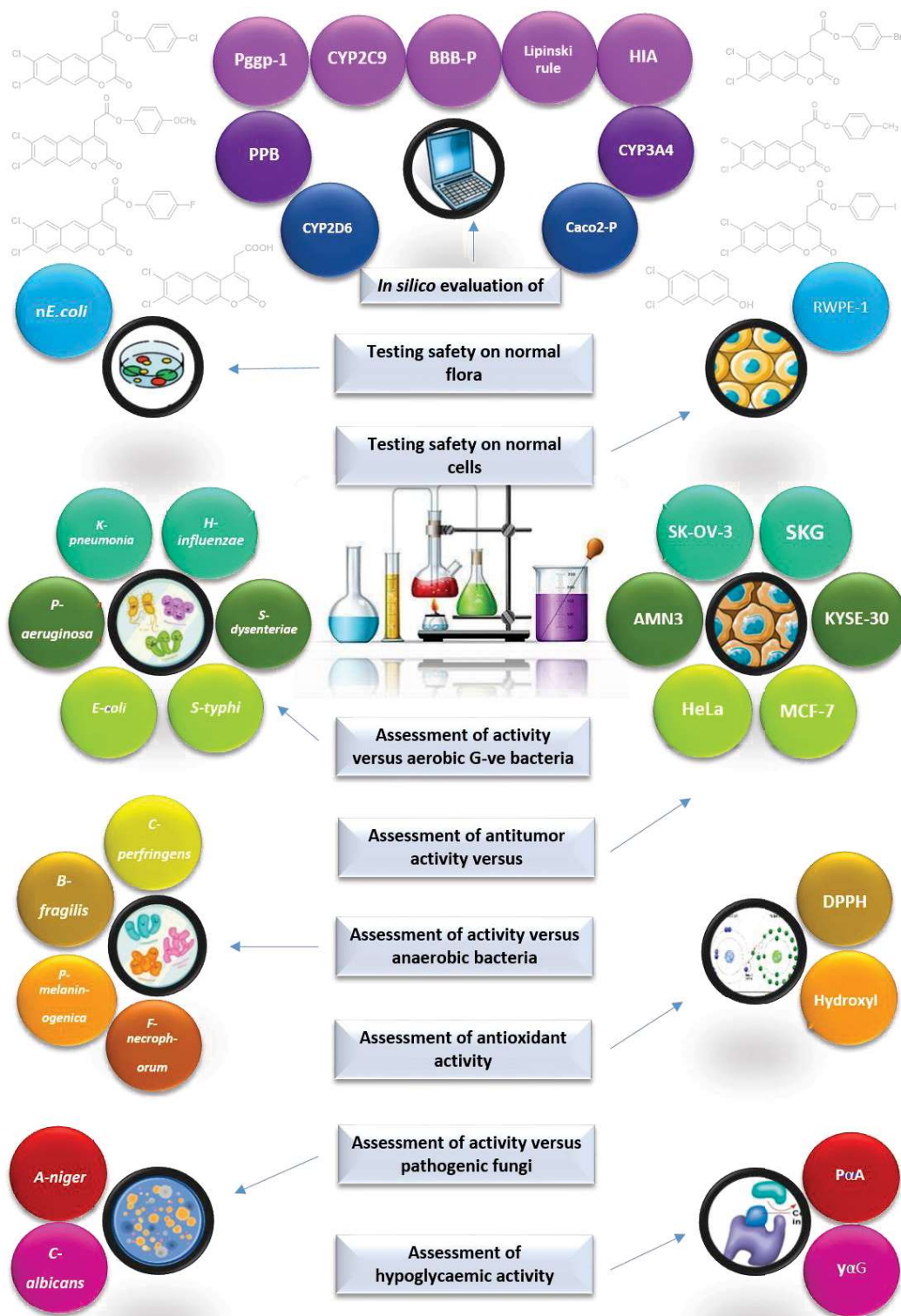
From the outcomes obtained from investigating the antioxidant activity of these new compounds, **SA0** was the most powerful antioxidant against both hydroxyl and DPPH free radicals among these compounds as compared to L-ascorbic acid.

The hypoglycaemic test results revealed that, when compared to Acarbose, **SA4** and **SA5** had the highest suppression activity against both yeast α -glucosidase and porcine α -amylase enzymes.

Finally, the gathered outcomes from testing the antitumor activity of these new compounds reveal some important observations. Firstly, **SA4** and **SA5** had the most potent antitumor activity compared to 5-fluorouracil, the standard. Secondly, regarding the safety profile of these compounds, **SA4** was the safest one on the normal cell line, RWPE-1.

From the aforementioned observations, **SA4** and **SA5**, the fluorinated and chlorinated compounds, respectively, have promising activities as antibacterial, antifungal, hypoglycaemic, and antitumor agents, along with an excellent safety profile for **SA4** on normal flora and normal cell line. On the other hand, **SA0**, a dichloronaphthol compound, has the strongest antioxidant activity and could provide a valuable platform for creating a new antioxidant drug in the future.

Graphical abstract





جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية الصيدلة

البيزنوكومارينات الجديدة المعوضة على الموقع (٤) كمواد فعالة حيويًا

رسالة مقدمة الى

– لجنة الدراسات العليا في كلية الصيدلة جامعة الموصل

كجزء من متطلبات الحصول على شهادة الماجستير في الصيدلة

من قبل

سارة أحمد محمد وحيد

بكالوريوس صيدلة ٢٠١٢

باشراف

أ.د. ياسر فخري مصطفى

٢٠٢٢م

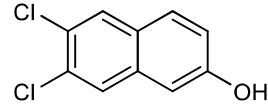
١٤٤٣هـ

الخلاصة

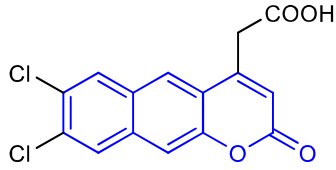
في الأبحاث، هناك عدد كبير من المركبات التي يتم تصنيعها من خلال تفاعلات وتقنيات مختلفة. ومع ذلك ، فإن فائدة معظم هذه المركبات في حياة الإنسان لا تزال أقل من المستوى المطلوب. للتعامل مع هذا الأمر ، تم تصنيع سلسلة من البنزوكومارينات الجديدة من مشتق جديد قائم على النفتالين ، وتم التحقق من أنشطتها الطبية الحيوية المختلفة. من خلال هذه التحقيقات ، اكتملت الملامح الطبية الحيوية لهذه البنزوكومارينات تقريبا ، مما وضع آثارها العلاجية لتتوجه الجهود القادمة لتحسين الأهداف النهائية.

في هذا البحث ، تم تصنيع سلسلة من ثمانية مركبات جديدة ثم اختبارها للأنشطة المضادة للميكروبات ومضادات الأكسدة وارتفاع سكر الدم ومضادات الأورام. كما و تم تقييم معلمات الحرائك الدوائية الخاصة بهم باستخدام برنامج مجاني عبر الإنترنت. يتضمن سيناريو التصنيع ثلاث خطوات متتابعة. أولا ، تخليق SA0 عن طريق الديازوت وتفاعلات ساندمير باستخدام 6-امينو-7-فينيل كلورو نفتالين ، كلوريد ثلاثي إيثيل بنزلامونيوم ، ثنائي كلوريد النحاس ، 1،1-ثنائي ميثيل اثيل نايتريت ، وحمض باراتولوينوسلفون. تم استخدام كلوريد الكالسيوم اللامائي لتجفيف الطبقة العضوية ، تليها إعادة تبلور العينة من الايثانول المائي. ثانيا ، تم تصنيع SA1 بواسطة تفاعل تكثيف نوع بيجمان من SA0 مع حمض الأسيتون ثنائي الكربوكسيل بمساعدة حامض الكبريتيك المركز. وأخيرا ، تم تخليق SA2-SA7 عن طريق تفاعل SA1 مع كلوريد الثيونيل من أجل تحويل مجموعة حمض الكربوكسيل في SA1 إلى منتج مشتق من كلوريد الحمض. ويتبع ذلك تفاعل الوسيط الناتج مع المشتقات الفينولية لإنشاء المنتج النهائي. ولكل مركب من المركبات الناتجة مجموعة مختلفة تم تعويضها في الموضع بارا لحلقة البنزين، وهي ميثوكسي ل SA2 ، وميثيل ل SA3 ، وفلوريد ل SA4 ، وكلوريد ل SA5 ، وبروميد ل SA6 ، ويوديد ل SA7.

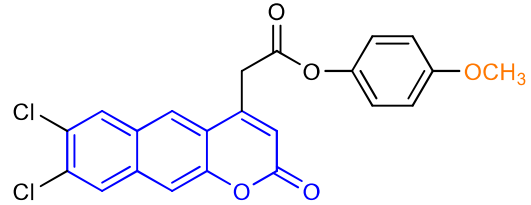
تم تأكيد الهياكل الكيميائية لهذه المركبات الجديدة ، الموضحة أدناه ، بواسطة تحليل الاطياف تحت الحمراء، الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والرنين النووي المغناطيسي للكربون.



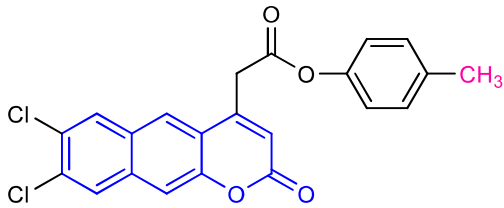
SA0



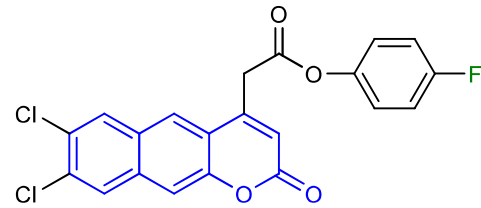
SA1



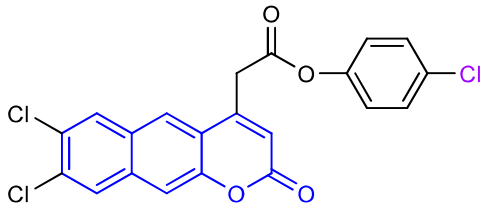
SA2



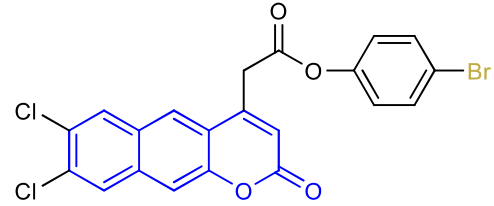
SA3



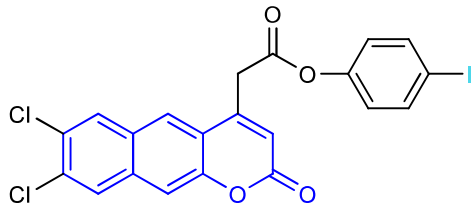
SA4



SA5



SA6



SA7

ثم تم تقييم المعلمات الدوائية في جهاز الكومبيوتر وكشفت أن المركبات المصنعة لها اختراق ممتاز عبر الغشاء المخاطي في الجهاز الهضمي ومعظمها لديه اختراق ضعيف عبر حاجز الدم في الدماغ. تشير هذه النتائج إلى التوافر البيولوجي الجيد عن طريق الفم جنبا إلى جنب مع انخفاض سمات السمية العصبية.

بعد ذلك ، خضعت هذه المركبات الجديدة لتقييم بيولوجي من أجل التحقق من أنشطتها المحتملة كمضادات للميكروبات ومضادات الأكسدة ومضادة لارتفاع سكر الدم ومضادة للأورام.

تم إجراء تقييم النشاط المضاد للميكروبات باستخدام الطريقة الشهيرة لتخفيف الوسط لاختبار أنشطة هذه المركبات الجديدة مقابل ست سلالات بكتيرية هوائية سالبة الجرام ، وهي الكلبسيلا الرئوية، الزائفة الزنجارية، الإشريكية القولونية، المستدمية النزلية ، شيجيلا الزحار ، و السالمونيلا التيفية ، أربع سلالات بكتيرية لاهوائية ، وهي بريفوتيليا ميلانينوجينيكا ، بكتريديو فراجلس ، كلوستريديوم بيرفرينجنز ، و فوسوباكتريوم نيكروفوروم. وسلالتان فطريتان مسببتان للأمراض ، وهما الرشاشيات النيجر و المبيضات البيضاء. تم اختبار الامان على سلالة البكتريا النافعة، وهي سلالة الإشريكية القولونية غير المسببة للأمراض.

تم إجراء تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبار قدرات هذه المركبات الجديدة على تحييد الهيدروكسيل بالإضافة إلى الجذور الحرة ١,١-ثنائي فينيل -٢-بكريل هايدرازيل باستخدام حمض الأسكوربيك كمعيار.

كما تم اختبار هذه المركبات الجديدة لنشاط تقليل السكر في الدم ضد اثنتين من الإنزيمات التي تتحكم في الدم ، α -غلوكوزيداز الخميري و α الأميليزز الخنزيري.

وأخيرا ، تم فحص نشاطهم المضاد للورم باستخدام اختبار جدوى خلايا ٣-٤] ، ٥-ثنائي ميثيل ثيازول-٢-يل-٢-٥] ثنائي فينيل رباعي الزوليم بروميد المعروف مقابل ستة خطوط خلايا سرطانية ، وهي : سرطان الثدي القوقازي الغدي، سرطان عنق الرحم الظهاري، سرطان الخلايا الحرشفية العنقي المرتبط بفيروس الورم الحليمي البشري، سرطان الغدة الثديية في الفئران، سرطان الغدي في المبيض القوقازي، و سرطان الخلايا الحرشفية في المريء الآسيوي البشري . كما تم التحقيق في سميتها للخلايا الطبيعية باستخدام خط الخلايا الطبيعي المعروفة بالخلايا الظهارية الطبيعية للبروستاتا البشرية.

وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها من تقييم النشاط المضاد للميكروبات لهذه المركبات الجديدة عن عدد من الملاحظات الهامة. أولا ، كان SA4 و SA5 الأقوى بين هذه المركبات مقابل البكتيريا التي تم اختبارها. ثانيا ، كانت هذه المركبات أكثر أمانا على البكتريا النافعة مقارنة بدواء السيبروفلوكساسين ، المعيار، مع SA4 لديها إمكانات مضادة لنمو البكتريا بدلا من قتل البكتريا. ثالثا ، أظهرت مركباتنا تأثيرا ضعيفا إلى معتدلا ضد السلالات البكتيرية اللاهوائية التي تم اختبارها ، والذي كان أقل بكثير من فعالية المعيار المستخدم ، ميترونيدازول. أخيرا، كان النشاط المضاد للفطريات لمعظم هذه المركبات الجديدة

مرتفعا جدا مقارنة بدواء النيساتين ، المعيار ، وكان **SA4** و **SA5** الأكثر نشاطا مقابل الفطريات المسببة للأمراض التي تم اختبارها.

من النتائج التي تم الحصول عليها من التحقيق في النشاط المضاد للأكسدة لهذه المركبات الجديدة ، كان **SA0** أقوى مضادات الأكسدة ضد كل من الجذور الحرة الهيدروكسيل و ١,١-ثنائي فينيل-٢-بكريل هايدرازيل بين هذه المركبات مقارنة بحمض الأسكوربيك.

كشفت نتائج اختبار قدرة تقليل السكر في الدم أنه بالمقارنة مع دواء الاكاربوز، كان **SA4** و **SA5** أعلى نشاط قمع ضد كل من α -غلوكوزيداز الخميري و α الأميليزز الخنزيري.

وأخيرا، تكشف النتائج التي تم جمعها من اختبار النشاط المضاد للورم لهذه المركبات الجديدة عن بعض الملاحظات المهمة. أولا ، كان لدى **SA4** و **SA5** النشاط المضاد للأورام الأكثر فعالية مقارنة بدواء ٥- فلورويوراسيل ، المعيار. ثانيا ، فيما يتعلق بملف تعريف السلامة لهذه المركبات ، كان **SA4** هو الأكثر أمانا على خط الخلايا الطبيعية.

من الملاحظات المذكورة أعلاه ، **SA4** و **SA5** ، المركبات المفلورة والمكلورة ، على التوالي ، لها أنشطة واعدة كعوامل مضادة للبكتيريا ومضادة للفطريات ومضادة لارتفاع السكر في الدم ومضادة للأورام ، إلى جانب أمان ممتاز ل **SA4** على البكتريا النافعة وخط الخلية الطبيعي. من ناحية أخرى ، يحتوي **SA0** ، وهو مركب ثنائي كلورونافثول ، على أقوى نشاط مضاد للأكسدة ويمكن أن يوفر بداية مبشرة لإنشاء دواء جديد مضاد للأكسدة في المستقبل.