CZU: 547.77:547.599.2:615.277 https://doi.org/10.59295/mabt2026.36

REACȚIA DE CICLOADDIȚIE [3+2] AZIDĂ–ALCHINĂ ȘI CITOTOXICITATEA DERIVAȚILOR DE (+)-3-CARENĂ

Sergiu COJOCARI[1], Serghei CURLAT[2], Fliur MACAEV[1]

[1]Institutul de Chimie al Universității de Stat din Moldova,
[2]Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Rezumat

Chimia „click” a devenit o metodă populară pentru sinteza rapidă de compuși farmaceutici, iar azidele și alchinele influențează semnificativ viteza și regioselectivitatea reacțiilor [3+2]. Derivații (+)-3-carenei cu centre chirale au fost transformați în azidoalcooli și ulterior în compuși heterorganici prin cicloaddiție [3+2], fiind analizat impactul substituenșilor și al condițiilor experimentale. S-au sintetizat molecule hibride cu fragmente de 2-carenă și heterocicluri azotate, obținându-se randamente variabile între 45–74%. Studiile de citotoxicitate au evidențiat nivelul de toxicitate scăzut pentru compușii **8, 9, 14** și **15**, în timp ce compușii **3, 4** și **5–7, 10–14, 16** au manifestat citotoxicitate moderată. Produsul **17** a prezentat cea mai mare activitate citotoxică, cu IC_{50} sub 10 μM pe toate liniile celulare studiate.

Cuvinte-cheie: **(+)-**3-carenă; [3+2] cicloadiție; heterocompuși; azidoalcooli; epoxid; 1,2,3-triazoli; 2-carenă.

CYCLOADDITION [3+2] AZIDE–ALKYNE REACTION AND THE CYTOTOXICITY OF (+)-3-CARENE DERIVATIVES

Abstract

“Click chemistry” has become a popular method for the rapid synthesis of pharmaceutical compounds, with azides and alkynes significantly affecting the reaction rate and regioselectivity in [3+2] cycloadditions. (+)-3-Carene derivatives with chiral centers were converted into azidoalcohols and subsequently into heterorganic compounds through [3+2] cycloaddition, with the effects of substituents and reaction conditions studied. Hybrid molecules containing 2-carene fragments and nitrogen-containing heterocycles were synthesized, achieving yields ranging from 45–74%. Cytotoxic activity was evaluated across multiple cell lines; compounds **8, 9, 14,** and **15** were non-toxic, while compounds **3, 4**, and heterocompounds **5–7, 10–14**, and **16** showed moderate activity. Product **17** exhibited the highest cytotoxic activity, with IC_{50} values below 10 μM across all cell lines.

Keywords: (+)-3-carene; [3+2] cycloaddition; heterocompounds; azido alcohols; epoxide; 1,2,3-triazoles; 2-carene.

Introducere

În ultimii decenii contextul dezvoltării unor strategii moderne pentru generarea rapidă a unei biblioteci extinse de compuși cu potențial farmaceutic, chimia „click” a dobândit o largă răspândire. Studiile asupra cicloaddiției [3+2] azidă–alchină reprezintă un instrument valoros datorită eficienței, selectivității și condițiilor blânde de reacție. Studiile au demonstrat că natura substraturilor implicate, respectiv azida și alchina, precum și sistemul catalitic utilizat, influențează în mod decisiv viteza reacției și regioselectivitatea acesteia. Astfel, catalizatorii pe bază de Cu(I) favorizează formarea regioizomerilor 1,4-disubstituiți ai 1,2,3-triazolilor, în timp ce catalizatorii pe bază de ruteniu conduc predominant la derivați 1,5-disubstituiți.

O direcție promițătoare în descoperirea de compuși biologic activi o constituie modificarea metaboliților naturali, menținând scheletul carbonic de bază. [1,2]. În acest context, hidrocarbura monoterpenică (+)-3-carenă **1** prezintă un interes deosebit datorită activităților sale biologice variate, inclusiv efecte de modulare a receptorilor GABα de tip benzodiazepinic, inhibarea ciclului celular în faza G2/M la *Saccharomyces cerevisiae* și activitate leishmanicidă. De

asemenea, pentru 2-carenă au fost raportate efecte antitumorale în modele de cancer mamar. [3–6].

Metode și materiale

Cu scopul determinării structurii și proprietăților compușilor sintetizați, a fost utilizată o gamă largă de metode fizico-chimice de analiză. Temperaturile de topire au fost determinate cu ajutorul aparatului „Boetius". Spectrele IR au fost înregistrate la spectrofotometrul „Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR". Spectrele RMN de ^{1}H, ^{13}C și ^{31}P au fost înregistrate la spectrometrul „Avance III Bruker 400", care funcționează la un câmp magnetic constant de 9,4 T. Monitorizarea procesului reacțiilor s-a realizat cu ajutorul cromatografiei în strat subțire (CSS) pe plăci de Silufol, developate în vapori de I_2. Pentru cromatografia pe coloană s-a utilizat silicagel L 100/400 μm sau silicagel 60 Fluka. Substanțele și reagenții chimici utilizați sunt disponibili comercial și au fost folosiți fără purificare suplimentară. (+)-3-carena **1** a fost procurată de la firma Sigma Aldrich.

Rezultate și discuții

În lucrare au fost descrise o serie de transformări ale carenelor menționate una în cealaltă, cu o conversie nesemnificativă [7,8]. Interesul pentru sinteza compușilor optic activi pe baza (+)-3-carenei **1** se explică din prezența a două centre chirale și a unei duble legături reactive în moleculă. Una dintre căile raționale de obținere a compușilor heteroorganici din seria caranică este utilizarea derivaților acestora, începând cu epoxidul **2 figura 1**.

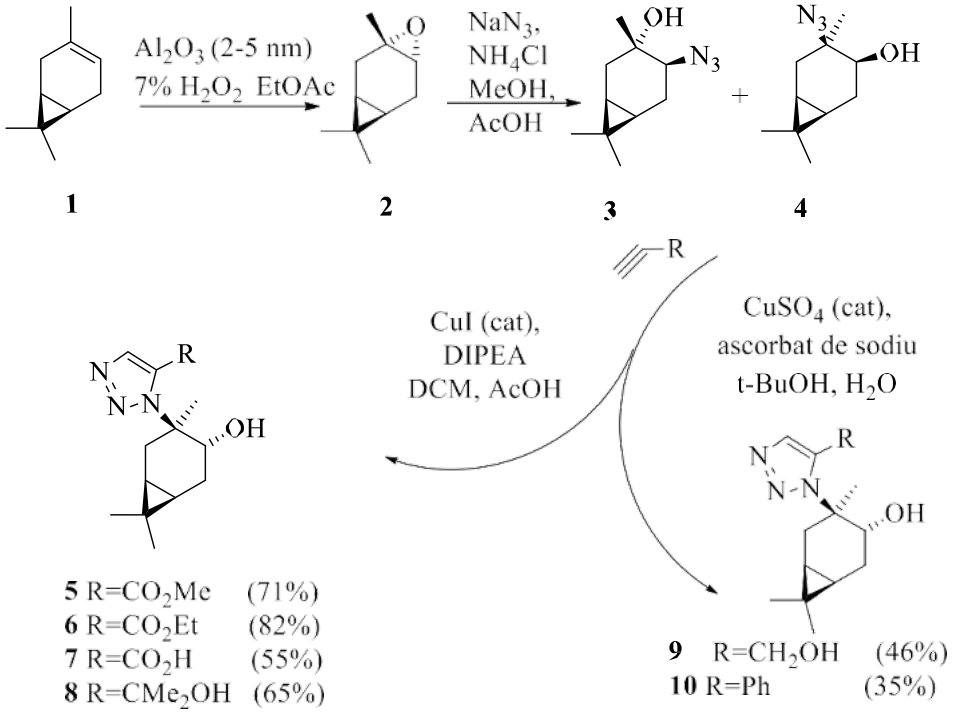


Figura 1. Schema de sinteză a 1,2,3-triazolilor din (+)-3-carena

Metodele cunoscute de obținere a azidelor **3** și **4** includ deschiderea ciclului epoxidic **2** cu NaN_3 în prezența NH_4Cl prin refluxare în metanol sau prin agitare cu NaN_3 în soluție apoasă de acid acetic la 30°C [9,10]. În primul caz se formează un amestec aproximativ echimolar de

azidoalcoolii regioizomeri **3** și **4** (randament total 49%), în timp ce modificăm condițiile de reacție observăm formarea preponderentă a compusului **4** (randament 65%), ceea ce nu corespunde datelor prezentate de alți cercetători [11], care au raportat un amestec de regiooizomeri (86:14) cu randament total de 92%.

În condițiile acidului acetic apos, în locul produsului cu punct de topire de 35°C, noi am izolat compusul predominant (randament 74%) cu punct de topire de 32°C [12].

În continuare a fost investigată influența naturii acetilenelor monosubstituite în reacția de cicloaddiție [3+2] cu utilizarea azidoalcoolului **4**. Ca prim model a fost propusă realizarea reacției catalizată de CuI între azidoalcool și esterul metilic al acidului acetilencarboxilic. Ca sistem catalitic s-a utilizat CuI : DIPEA : AcOH (1:2:0,2), propus pentru prima dată în studiul [13]. Prin utilizarea metodelor spectrale am confirmat produsul metal carboxilatul **5**.

Înlocuirea esterului metilic cu esterul etilic nu a influențat semnificativ nici durata reacției (4 ore), nici randamentul produsului final **6**. La trecerea la acidul acetilencarboxilic, durata reacției a crescut până la 12 ore, rezultând acidul **7** cu un randament de 55%.

S-a stabilit că înlocuirea acidului cu una gem-dimetilică a influențat favorabil reacția, astfel după 8 ore utilizând catalizator CuI în DCM, s-a determinata o conversie completă si formarea compusului **8**. De remarcat că înlocuirea grupării gem-dimetilice cu una metilenică in conditii de obtinere a compusului **8** a avut un efect negativ asupra reacției de cicloaddiție [3+2] (reacția nu a decurs în condițiile prezentate).

S-a constatat că înlocuirea sistemului catalitic CuI/DIPEA/AcOH cu $CuSO_4$/ascorbat de sodiu și desfășurarea reacției în *tert*-butanol apos la refluxare timp de 4 ore au favorizat formarea produsului final **9**. O situație similară a fost observată și în cazul fenilacetilenei. Doar în condiții de refluxare a amestecului de azidă, fenilacetilenă, $CuSO_4$ și ascorbat de sodiu în *tert*-butanol apos s-a observat formarea aductului **10**.

O altă parte a cercetărilor a fost dedicată studiului comparativ al influenței poziției grupării azidă în regioizomerul **3** asupra reacției de cicloaddiție [3+2] cu aceleași acetilene monosubstituite ca și în cazul azidoalcool 4. În cazul esterului metilic al acidului acetilencarboxilic, după 2 ore s-a înregistrat conversia completă a reactanților inițiali, cu o ușoară scădere a randamentului de reacție comparativ cu regioizomerul **5**. Conform datelor spectrale, produsul principal al reacției este compusul polifuncționalizat **11**.

Utilizarea esterului acetilen carboxilic a influențat negativ selectivitatea reacției de condensare a esterului etilic al acidului acetilencarboxilic. În final, după prelucrarea amestecului de reacție și purificarea acestuia prin cromatografie în strat subțire preparativă, a fost izolat esterul etilic optic activ **12**, cu un randament de 53%, ceea ce este cu 29% mai mic în comparație cu izomerul **6**.

În urma utilizării acidul acetilencarboxilic și azida **3** s-a observat o creștere a timpului de reacție, fenomen observat și pentru azida **4**. Diferența constă în faptul că substanța fanală **13** se formează cu un randament mai mare cu 19%.

La trecerea la 2-metilbut-3-in-2-ol s-a constatat atât o scădere a vitezei reacției cu utilizarea azidei **3** comparativ cu azida regioizomeră **4**, cât și a randamentului produsului final **14** (53%). Conform datelor cromatografiei pe strat subțire, conversia completă a fost observată după 12 ore, în timp ce pentru compusul **4** au fost necesare 8 ore.

S-a constatat că azida **3**, spre deosebire de azida regioizomeră **4**, reacționează cu prop-2-in-1-ol, formând produsul **15** cu un randament de 63% în decurs de 2 ore. Mai mult decat, reacția de cicloaddiție [3+2] decurge în prezența sistemului CuI/DIPEA/AcOH la temperatura camerei, în timp ce în cazul azidoalcoolului **4** au fost necesare condiții mai dure.

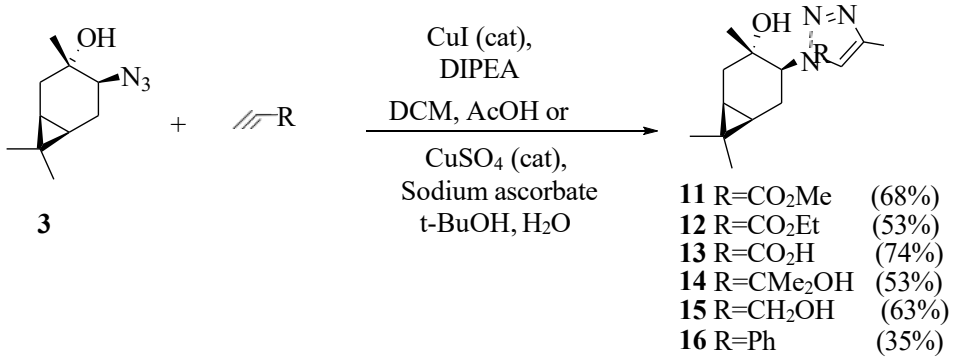


Figura 2. Obținerea 1,2,3-triazolilor din azidoalcoolul 3

Condensarea fenilacetilenei cu azidoalcoolul 3 a decurs analog cu cea a azidoalcoolului 4, timp de 8 ore, prin refluxare cu $CuSO_4$ și ascorbat de sodiu în *tert*-butanol apos, care a rezultat produsul cristalin 16.

În urma cercetărilor căutării noilor compuși biologic activi, a fost realizată sinteza moleculelor hibride care conțin fragmente de 2-carenă și fragmentul 1,2,3-triazol, conform schemei prezentate **figura 3**.

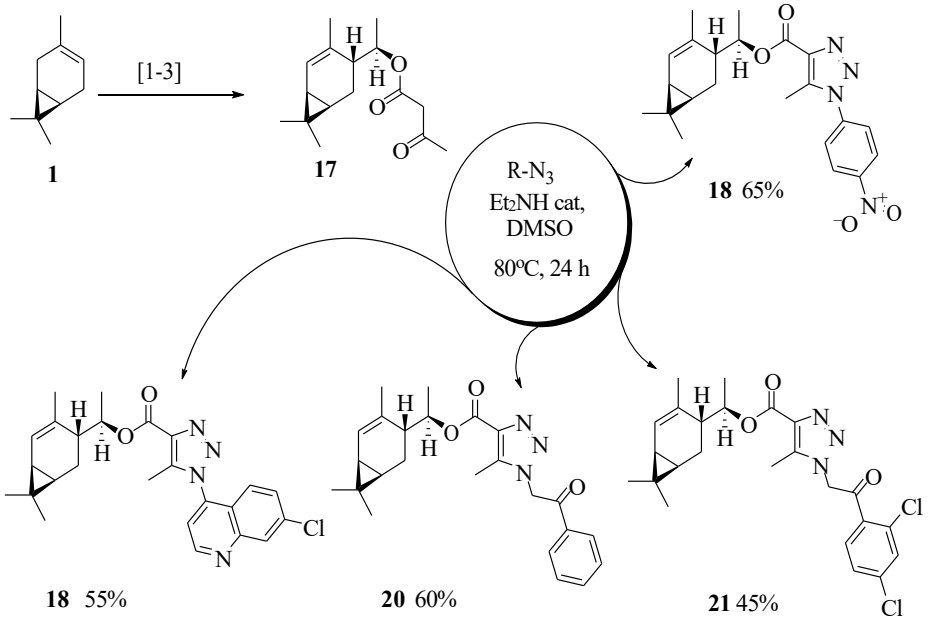


Figura 3. Sinteza triazolilor cu scheletul monoterpenei 2-carenei

Reacția compusului **7** cu 1-azido-4-nitrobenzen în prezența dietilaminei conduce la aductul **18**. Ca al doilea model a fost utilizată reacția acetooacetatului **7** cu 4-azido-7-clorochinolină. S-a constatat că compusul **18** poate fi obținut cu un randament de 55%.

Reacția terpenoidului 3-oxobutanoat **7** cu 2-azido-1-ariletanoni s-a realizat în mod similar în mediu DMSO. Condensarea compusului **7** cu 2-azido-1-feniletanona a decurs cu formarea compusului **20**, izolat cu un randament de 60% după cromatografie pe coloană pe silica gel. În

reacția compusului **7** cu 2-azido-1-(2,4-diclorofenil)etanona, randamentul produsului de ciclizare **17** nu a depășit 45%.

Activitatea citotoxică a compușilor sintetizați și a compusului de referință etopozidă a fost determinată prin metoda [14], prin stabilirea concentrației substanței care inhibă 50% (doza toxică IC_{50}) din viabilitatea celulelor tumorale pe celule Capan-1, HCT-116, LN-229, NCI-H460, DND-41, HL-60, K-562, Z-138.

In urma cercet au fost obținute date ce au demonstrat că azidoalcoolii **8, 9, 14** și **15** nu au prezentat citotoxicitate pe liniile celulare testate, în timp ce compușii **3** și **4** au demonstrat activitate citotoxică în intervalul de concentrații investigat. Compușii heterociclici **7, 10–14** și **16** au prezentat activitate moderată împotriva majorității liniilor celulare, cu valori IC_{50} între 15,7 și 100,0 μM, fiind citotoxicitate mai redusă comparativ cu cea a compușilor inițiali.

Produsul **17** s-a dovedit a fi unul dintre cei mai activi derivatii 2-careni substituiți, cu valori IC_{50} sub 10 μM pentru toate liniile celulare, ceea ce indică un efect citotoxic puternic.

Concluzie

În concluzie, studiul realizat demonstrează eficiența aplicării strategiei de chimiei „click”, în special a reacțiilor de cicloaddiție [3+2] azidă–alchină, pentru obținerea unor derivați heterociclici noi pe baza scheletului natural al (+)-3-carenei. S-a evidențiat în mod evident că natura substraturilor (azidă și alchină), precum și sistemul catalitic utilizat influențează semnificativ viteza reacției, randamentul și regioselectivitatea procesului, fiind observate diferențe notabile între regioizomerii azidici **3** și **4**.

Rezultatele au relevat că modificările structurale ale acetilenelor monosubstituite pot activa sau inhiba reacția, iar selectia condițiilor optime (de exemplu, CuI/DIPEA/AcOH sau $CuSO_4$/ascorbat de sodiu) este esențială pentru obținerea produselor dorite. De asemenea, s-a demonstrat că poziția grupării azidă în moleculă influențează nu doar cinetica reacției, ci și selectivitatea cât și randamentul produșilor finali.

Evaluarea biologică a compușilor sintetizați a relevat că majoritatea derivaților au demonstrat o activitate citotoxică moderată, iar anumite structuri hibride manifestă un potențial semnificativ proprietăți citotoxice pronunțate, in special compusul **17** s-a remarcat printr-o activitate citotoxică ridicată asupra tuturor liniilor celulare investigate, cu valori IC_{50} sub 10 μM, care poate sugera un candidat promițător pentru dezvoltarea ulterioară de agenți antitumorali.

Astfel, cercetarea confirmă valoarea derivaților carenelor prin metode de tip chimiei „click” ca o direcție viabilă în descoperirea de noi compuși biologic activi și deschide noi oportunități pentru optimizarea structurală și evaluarea proprietăților farmacologice aprofundată a acestor compusi.

Mulțumiri

Acest studiu a fost susținut de proiectul de cercetare „Studiul chimic al metaboliților secundari din surse naturale locale și valorificarea potențialului lor aplicativ prin extinderea diversității moleculare cu funcționalitate multiplă (MetNatVal)”, nr. 010601, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al Republicii Moldova.

Referințe:

1. Brill, Z. G., Condakes, M. L., Ting, C. P., Maimone, T. J. Navigating the Chiral Pool in the Total Synthesis of Complex Terpene Natural Products. *Chem. Rev.*, 2017, 117, 11753. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00834.
2. Curlat, S. Recent studies of (+)-3-carene transformations with the retention of the native framework. *Chem. J. Mold.*, 2019, 14(2), 32–55. DOI: 10.19261/cjm.2019.616.
3. Silva, A. R. S. T., Costa, A. M. B., Scher, R., Andrade-Neto, V. V., Sarmento, V. H. V., Santos, A. D. J., Torres-Santos, E. C., Jain, S., Nunes, R. d. S., Menna-Barreto, R. F. S., Dolabella, S. S. Effect of

3-Carene and the Micellar Formulation on Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 2023, 8, 324. DOI: 10.3390/tropicalmed8060324.
4. Woo, J., Yang, H., Yoon, M., Gadhe, C. G., Pae, A. N., Cho, S., Lee, C. J. 3-Carene, a Phytoncide from Pine Tree Has a Sleep-enhancing Effect by Targeting the GABAA-benzodiazepine Receptors. *Exp. Neurobiol.*, 2019, 28(5), 593. DOI: 10.5607/en.2019.28.5.593.
5. Nayila, I., Sharif, S., Lodhi, M. S., Ullah, R., Alotaibi, A., Maqbool, T., Hameed, S. Nanoformulated Terpenoids in Cancer: A Review of Therapeutic Applications, Mechanisms, and Challenges. *Arab. J. Chem.*, 2024, 17. DOI: 10.3390/cancers17183013.
6. Kumar, A., Dev, K., Sourirajan, A. S. Essential Oils of Rosmarinus officinalis L., Cymbopogon citratus (DC.) Stapf., and the phyto-compounds, delta-carene and alpha-pinene mediate cell cycle arrest at G2/M transition in budding yeast Saccharomyces cerevisiae. *Afr. J. Bot.*, 2021, 141, 296. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.05.008.
7. Sidorenko, A. Yu., Aho, A., Ganbaatar, J., Batsuren, D., Utenkova, D. B., Sen'kov, G. M., Wärnå, J., Murzin, D. Yu., Agabekov, V. E. Catalytic isomerization of α-pinene and 3-carene in the presence of modified layered aluminosilicates. *Mol. Catal.*, 2017, 443, 193. DOI: 10.1016/j.mcat.2017.10.014.
8. Macaev, F., Malkov, A. V. Use of monoterpenes, 3-carene and 2-carene, as synthons in the stereoselective synthesis of 2,2-dimethyl-1,3-disubstituted cyclopropanes. *Tetrahedron*, 2006, 62, 9–29. DOI: 10.1016/j.tet.2005.09.001.
9. Cimarelli, C., Fratoni, D., Palmieri, G. Synthesis of new enantiopure trans-3,4-diaminocaranes from (+)-3-carene. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2011, 22, 603–608. DOI: 10.1016/j.tetasy.2011.02.027.
10. Bakaleinik, G. A., Shagidullin, R. R., Chernova, A. V., Musin, R. Z., Karlin, V. V. Sintes i struktura stereoizomernykh azidospirtov iz α- i β-epoksikaranov. *Zhurnal Obshchei Khimii*, 1992, 62(3), 655–660.
11. Fringuelli, F., Piermatti, O., Pizzo, F., Vaccaro, L. Ring Opening of Epoxides with Sodium Azide in Water. A Regioselective pH-Controlled Reaction. *J. Org. Chem.*, 1999, 64, 6094. DOI: 10.1021/jo990368i.
12. Curlat, S., Prodius, D., Barba, A., Macaev, F. New synthesis, molecular and crystal structure of (1R,3R,4R,6S)-4-azido-4,7,7-trimethylbicyclo[4.1.0]heptan-3-ol. In: *Abstracts of Communications of the International Conference „Львівські хімічні читання - 2015"*. Lviv, 2015, p. 18.
13. Shao, C., Wang, X., Zhang, Q., Luo, S., Zhao, J., Hu, Y. Acid-base jointly promoted copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *J. Org. Chem.*, 2011, 76(16), 6832–6836. DOI: 10.1021/jo200869a.
14. Ciobanu, N., Sucman, N., Petrou, A., Gorincioi, E., Valica, V., Uncu, L., Fesatidou, M., Glamočlij, J., Ivanov, M., Persoons, L., Schols, D., Jonghe De, S., Geronikaki, A., Macaev, F. Biological and Computational Study of the Dual Antimicrobial and Anticancer Potential of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones and Thiones. *ChemistrySelect*, 2025, 10(26), e02768. DOI: 10.1002/slct.202502768.

Date despre autori:



Sergiu COJOCARI, cercetător științific, Institutul de Chimie al Universității de Stat din Moldova
e-mail: sergiu.cojocari@sti.usm.md
ORCID: 0000-0001-6825-5390



Serghei CURLAT, cercetător științific, dr. șt. chim. lector universitar, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
e-mail: sergiu.curlat@usmf.md
ORCID: 0000-0001-8921-7887



Fliur MACAEV, Membru corespondent al AȘM, doctor habilitat în științe chimice, Institutul de Chimie al Universității de Stat din Moldova, profesor cercetător
e-mail: fliur.macaev@sti.usm.md
ORCID: 0000-0002-3094-1990