



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTÀ DI FARMACIA
CORSO DI LAUREA IN FARMACIA

Dottorato di ricerca in Scienze Farmaceutiche

Sintesi e studi SAR di nuovi derivati
4-NO- e (4-ONNCN)-pirazolici

Tesi di Dottorato di
Angela Provino

Relatore

Ch.mo Prof. Enrico Aiello

Dipartimento Farmacochimico Tossicologico e Biologico
Anno Accademico 2010-2011

Introduzione

Il Regno dei Funghi è incredibilmente eterogeneo e i suoi membri, organismi unicellulari, eucarioti, aerobi o anaerobi facoltativi, occupano uno straordinario numero di nicchie ecologiche, vivendo negli strati superficiali del suolo o come commensali di vari organismi vegetali ed animali.

L'uomo vive in costante contatto con i funghi, inala migliaia di spore e ospita un'ampia varietà di specie sia sulla pelle che nel tratto gastrointestinale.

La maggior parte degli individui non trae danno da questi, ma sempre di più, funghi considerati non patogeni o innocui, stanno ora causando micosi profonde con esiti spesso fatali.

La crescente incidenza delle micosi sistemiche verificatasi in questi ultimi anni è il risultato di molti fattori, primo fra tutti l'aumento dei pazienti severamente immunocompromessi.

Tra questi ricordiamo i soggetti affetti da AIDS, i pazienti con neutropenia conseguente alla chemioterapia antineoplastica, i trapiantati di midollo osseo o di organo solido e quelli sottoposti a terapia immunosoppressiva.

Altri fattori che hanno contribuito a questo incremento sono rappresentati dal frequente uso di procedure mediche invasive, dai trattamenti con antibiotici ad ampio spettro, dalla terapia con glucocorticoidi, dalla nutrizione parenterale, dalla dialisi peritoneale e dall'emodialisi.[1]

FATTORI PREDISPONENTI	ESEMPI
Fisiologici	Gravidanza, età (anziani e bambini)
Traumi	Macerazioni, infezioni, ustioni, piaghe
Ematologici	Neutropenia, immunosoppressione cellulare (leucemia, linfoma, AIDS, anemia aplastica)
Endocrini	Diabete mellito, ipoparatiroidismo, malattia di Addison
Iatrogeni	Chemioterapici, corticosteroidi, contraccettivi orali, antibiotici, cateteri, protesi, interventi chirurgici
Altri	Somministrazione di droghe endovena, malnutrizione, malassorbimento

Gli agenti patogeni che causano micosi sistemiche possono essere divisi in due gruppi. I patogeni primari, che sono in grado di infettare individui con un sistema immunitario sano, come *Coccidoides*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Sporotrix*. I patogeni opportunisti come *Candida*, *Aspergillus*, *Criptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia* e *Trichosporum* che causano infezioni solo in circostanze in cui la difesa immunitaria non è pienamente funzionale. Essi possono infettare tutti gli organi del corpo o, meglio, ogni organo è particolarmente suscettibile ad un determinato agente patogeno o gruppo di patogeni.

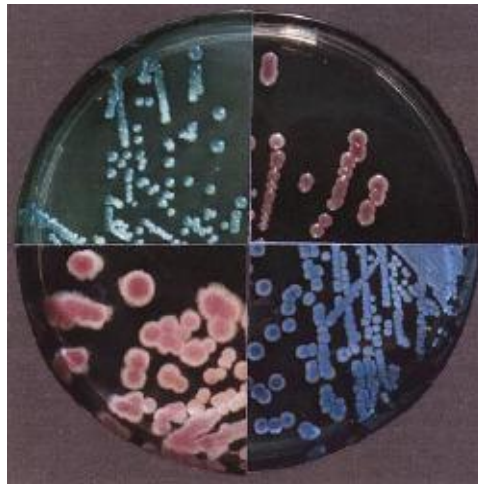
La *Candida*, ad esempio, infetta spesso il fegato, le valvole cardiache ed i reni nei pazienti che hanno subito il trapianto di questi organi.

L'*Aspergillus* e il *Criptococcus* causano soprattutto infezioni al polmone ma possono anche diffondersi nel cervello provocando

Comunque, in pazienti gravemente immunocompromessi, la preferenza per particolari siti scemba e tutti gli organi, come anche la pelle, possono essere infettati.

Negli anni più recenti è divenuto evidente che patogeni primari, che possono causare piccoli malori in un individuo sano, possono divenire devastanti in soggetti immunocompromessi.

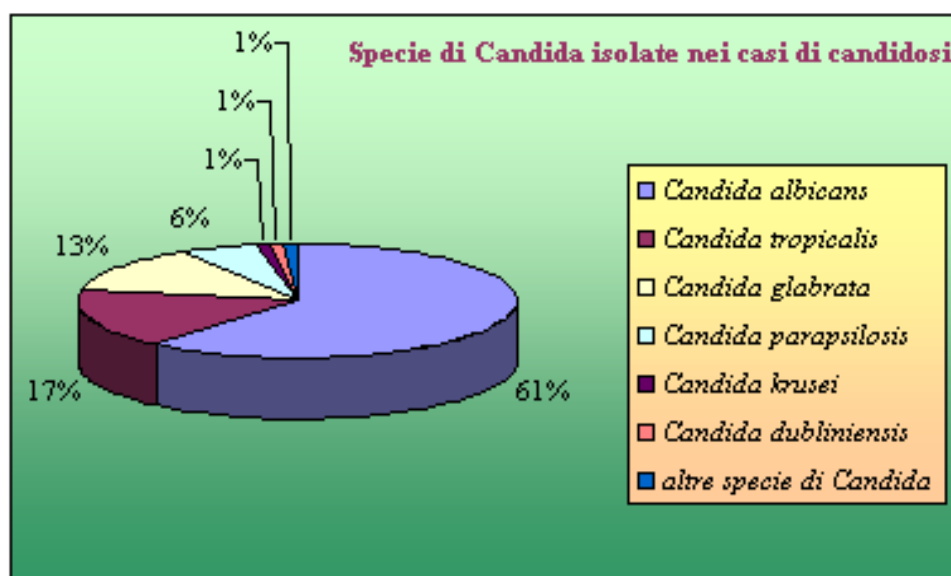
Vi sono poi casi di persone che avendo viaggiato in un'area dove un particolare fungo è comune, dopo molti anni, quando il loro sistema immunitario si è indebolito per l'età o per una malattia, sviluppano una micosi sistemica causata da quel fungo.



Le Candidosi

Le candidosi sono infezioni causate da funghi del genere *Candida* e sono le più comuni cause di micosi opportunistiche nel mondo.

Per dare un'idea della vastità del problema, si noti, ad esempio, che il 20-30% dei pazienti affetti da leucemia acuta muore a causa di un'infezione da *Candida*.



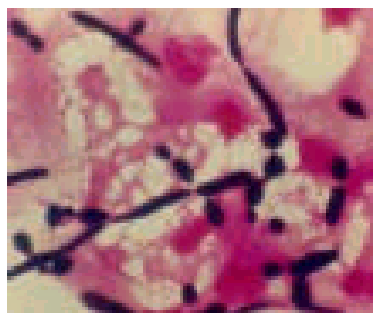
Circa il 50% dei pazienti malati di AIDS hanno avuto almeno un caso di infezione da *Candida* (qualche fonte riporta addirittura l'80%) e nella maggior parte dei casi si tratta di mugugno o di esofagite. Infatti, spesso questo è il primo segno della progressione dell'infezione HIV in AIDS vero e proprio.

Al genere *Candida* appartengono 154 specie ma solo sei sono quelle che si riscontrano per lo più nelle infezioni umane:

- *C. Albicans*
- *C. Tropicalis*
- *C. Glabrata*
- *C. Parapsilosis*
- *C. Krusei*
- *C. Lusitaniae*

Tra queste le più difficili da eradicare sono le infezioni causate da *C. Albicans* e *C. Krusei* [2]

La Candida Albicans



La *Candida Albicans* trova il suo habitat naturale nel cavo orale, nella vagina e nel tratto gastrointestinale; in particolari condizioni può diventare infettante determinando candidosi.

Tali condizioni sono rappresentate da fattori locali (umidità; macerazione cutanea; terapie locali con antibiotici e cortisonici) e fattori generali (uso prolungato di cortisonici, antibiotici, immunosoppressori; diabete, tumori, malattie debilitanti, deficit immunologici, gravidanza).

La *C.Albicans* penetra nell'organismo attraverso una ferita della mucosa o della cute.

Le sedi cutanee maggiormente interessate sono gli spazi interdigitali delle mani e dei piedi, gli angoli della bocca, le piaghe cutanee, il tessuto periungueale.

Le candidosi si manifestano con intenso eritema, fissurazioni, erosioni, causa di prurito di varia intensità, bruciore vivo e dolore.

Queste infezioni tendono a cronicizzare e le recidive sono frequenti.

La diffusione nel sangue può portare ad ascessi polmonari, endocarditi, meningiti, ascessi cerebrali, e spesso è causa di morte in pazienti immunodepressi.

La Candida Krusei



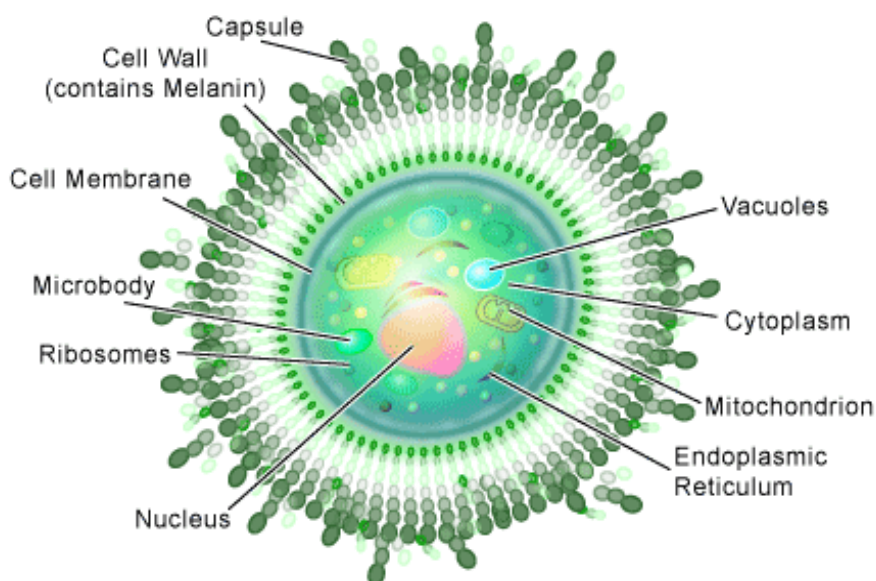
Le micosi provocate dalla *Candida krusei* possono coinvolgere qualsiasi organo o apparato. Vi sono le affezioni mucocutanee che riguardano il tratto orofaringeo, esofageo e vaginale oltre che la cute e i suoi annessi.

Le manifestazioni più gravi sono invece le candidosi invasive o sistemiche che possono essere acute o croniche.

L'infezione in questo caso inizia con la colonizzazione di un organo e successivamente può coinvolgere altri distretti. Gli organi maggiormente colpiti sono il fegato, la milza e il rene, ma anche il cuore, il tessuto osseo e il sistema nervoso centrale. In seguito si ha depressione del midollo osseo con comparsa di neutropenia, complicanza che può portare a gravi conseguenze.[2]

Inoltre, la *C. krusei* è un fungo dotato di resistenza intrinseca verso tutti i farmaci antifungini a struttura azolica, compreso il fluconazolo e pertanto questo tipo di candidosi può provocare patologie particolarmente gravi.

Le Criptococcosi



C. neoformans cell

Le criptococcosi sono infezioni fungine determinate dal *Cryptococcus Neoformans*, un micete ubiquitario responsabile abitualmente di infezioni benigne asintomatiche.

Piccioni e gabbiani possono veicolare questo lievito responsabile di gravi forme polmonari, cutanee ma soprattutto meningoencefaliche nell'uomo.

Il fungo, almeno per quanto riguarda la specie umana, colpisce solamente gli individui immunocompromessi e non è quindi pericoloso per gli immunocompetenti.

Oggi la criptococcosi colpisce sempre più frequentemente gli individui affetti da AIDS, coloro i quali hanno subito un trapianto d'organo o i malati di cancro che hanno assunto chemioterapici o corticosteroidi per lungo tempo.

L'infezione più grave è la meningite: le prime manifestazioni cliniche non sono specifiche né appariscenti.

La febbre non è distinguibile da quella di altre infezioni opportunistiche, così come il mal di testa la nausea o il vomito.

La durata di questi sintomi varia da un giorno a quattro mesi con una media di 30 giorni.

I sintomi classici di un'infezione meningea sono tipicamente croniche, data la lentezza di crescita del fungo, ma col passare del tempo compaiono disturbi psichici, deficit motori, disfunzione dei nervi cranici (afasia, sordità, visione doppia), segni cerebellari (difetti nella deambulazione e nell'equilibrio) e segni di aumentata pressione endocranica (come l'edema della papilla ottica).

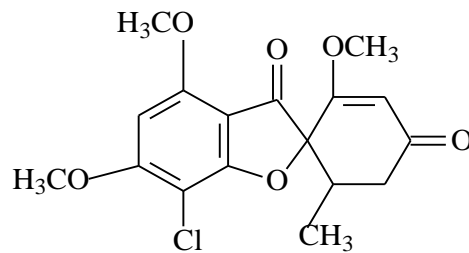
La cura di questi soggetti prevede una terapia soppressiva con farmaci antifungini che deve durare per tutta la vita, con la necessità di variare spesso la quantità e la qualità dei farmaci per ridurre il rischio di gravi effetti collaterali.

Farmaci antifungini

Nonostante la ricchezza di conoscenze nel campo della micologia medica, un'area ha progredito più lentamente delle altre: l'identificazione e lo sviluppo di agenti antifungini efficaci e sicuri utilizzabili per il trattamento delle micosi sistemiche.

La griseofulvina, i polieni, la 5-fluorocitosina e i derivati azolici, sono i farmaci attualmente disponibili nel trattamento delle infezioni sistemiche fungine.

GRISEOFULVINA (UK 1955)

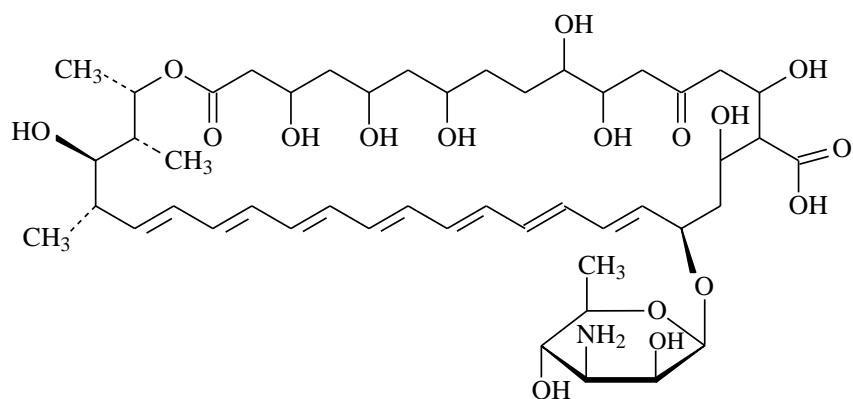


Appartenente alla classe degli antimicotici per uso sistemico, trova indicazioni per le infezioni micotiche della cute, delle unghie e dei capelli sensibili alla griseofulvina, nei casi in cui la terapia antimicotica topica si sia rivelata inefficace.

Tuttavia l'uso è stato ridotto per via delle controindicazioni come porfiria e insufficienza epatica, lupus eritematoso e condizioni correlate e per via degli effetti collaterali come neuriti, compromissione epatica e renale, ginecomastia nei bambini, fotosensibilizzazione.

POLIENI

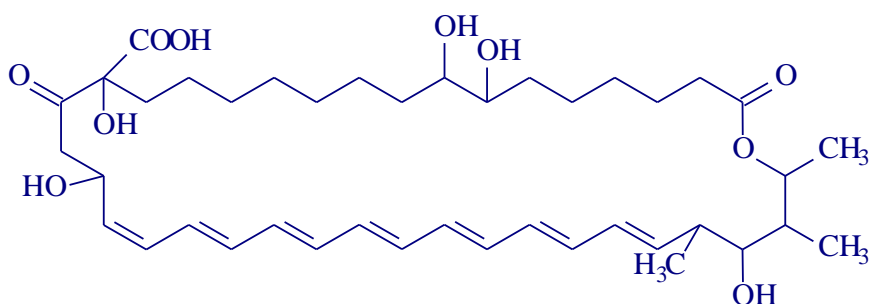
Nistatina (Usa 1952)



Trova impiego nella prevenzione e nel trattamento delle candidosi della cavità orale, dell'esofago e del tratto intestinale.

La nistatina è praticamente priva di tossicità e potere allergizzante; è ben tollerata da pazienti di tutte le età, compresi i lattanti debilitati, anche in caso di trattamento prolungato; solo a dosi orali elevate hanno occasionalmente causato diarrea, disturbi gastrointestinali, nausea e vomito.

Amfotericina B (Usa 1954)



amfotericina B

L'amfotericina B scoperta nel 1953, approvata e immessa in commercio nel 1957 è un antibiotico polienico prodotto da certi ceppi di *Streptomyces nodosus*.

Ha uno spettro d'azione molto ampio che comprende la maggior parte dei funghi patogeni per l'uomo: *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Mucoraceae* che vengono inibiti a concentrazioni di ~1 µg/ml.

L'amfotericina B è di solito somministrata per via endovenosa in quanto il farmaco è troppo irritante per essere somministrato per via sottocutanea, intramuscolo o intraperitoneale.

La sua eccellente attività antifungina nelle micosi profonde è sfortunatamente associata ad una tossicità che renderebbe inaccettabile il suo uso se vi fosse una buona alternativa.

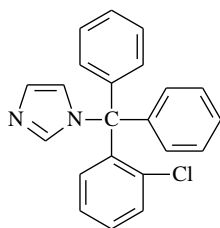
Essa induce effetti collaterali sia acuti che cronici. Le reazioni acute consistono generalmente in febbre e brividi, mentre la tossicità cronica, è in genere legata ad un danno renale che può variare, per gravità, da paziente a paziente, ma è anche dose-dipendente.

Ipocalemia, ipostenuria e ridotta capacità ad eliminare acidi risultano da un danno tubulare, la diminuita clearance della creatinina, riflette una diminuzione della filtrazione glomerulare e del flusso sanguigno renale.

La più importante istopatologia dei reni, resi afunzionali dall'amfotericina B, è la necrosi e la calcificazione dei tubuli renali.

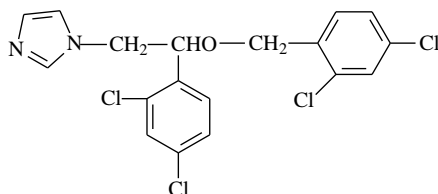
DERIVATI IMIDAZOLICI

Clotrimazolo (Bayer 1967)



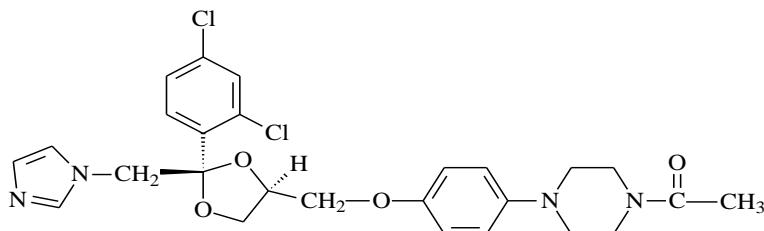
Viene usato in dermatologia per tutte le micosi superficiali o secondarie e in ginecologia

Miconazolo (Usa 1969)



E' utilizzato nel trattamento locale delle infezioni cutanee ed ungueali provocate da Dermatofiti o da Candida, nelle infezioni vulvo-vaginali micotiche (pure o miste); essendo dotato di attività antibatterica sui gram-positivi, può essere impiegato nel trattamento delle micosi con superinfezioni da tali microrganismi.

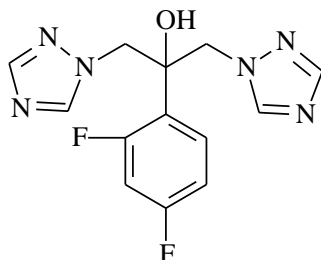
Ketoconazolo (Usa 1977)



Trova impiego nelle infezioni micotiche sistemiche e nelle infezioni cutanee da Candida e dermatofiti.

DERIVATI TRIAZOLICI

Fluconazolo (Pfizer 1982)



Poco attivo in vitro, presenta l'importante caratteristica di avere proprietà chimico-fisiche tali da consentire una notevole biodisponibilità in vivo e per questo mostra una notevole potenza di azione.

Molto solubile in acqua, si usa per via orale (buon assorbimento gastro-intestinale) o i.m.. Forma scarsi legami con le proteine plasmatiche, diffonde bene nei liquidi corporei compresi il liquido cerebro-spinale ed il fluido sinoviale (attivo nella meningite causata da criptococco).

Nonostante la sua forte attività antifungina, il fluconazolo, e in generale tutti i derivati azolici, presenta gravi effetti tossici secondari sia a livello epatico che causando il blocco della sintesi steroidea surrenalica (cortisolo, ormoni androgeni e testosterone per inibizione di enzimi coinvolti nel sistema del citocromo-P₄₅₀ dei mammiferi con meccanismo analogo a quello descritto per i funghi).

Per tanto l'aumentata incidenza delle infezioni fungine associata però all'insoddisfacente trattamento terapeutico in pazienti debilitati e la comparsa di ceppi azolo-resistenti, rende urgente la disponibilità di nuovi farmaci alternativi.[3]

5-Fluorocitosina (Roche USA 1962)

La 5-fluorocitosina è attiva su aspergillosi, candidiasi e criptococchi, cioè, su tutte quelle infezioni causate da funghi che hanno uno specifico enzima: la citosina deaminasi, che trasforma la fluorocitosina in 5-fluorouracile (5-FU), un potente antimetabolita nella sintesi del DNA fungino.

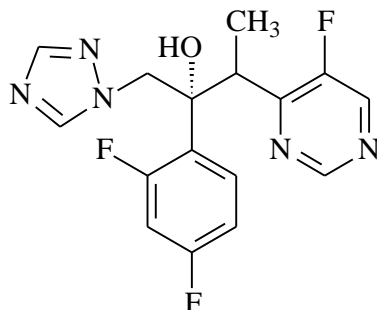


Inoltre lo stesso 5-FU, può essere incorporato nell'RNA o metabolizzato ad acido 5-fluoro-desossipuridilico (5-FdUMP) un potente inibitore della timidilato sintetasi fungina.

Il risultato di questa azione è il blocco di tutte le funzioni vitali della cellula fungina.

DERIVATI DI NUOVA GENERAZIONE

Voriconazolo (Pfizer 2002)

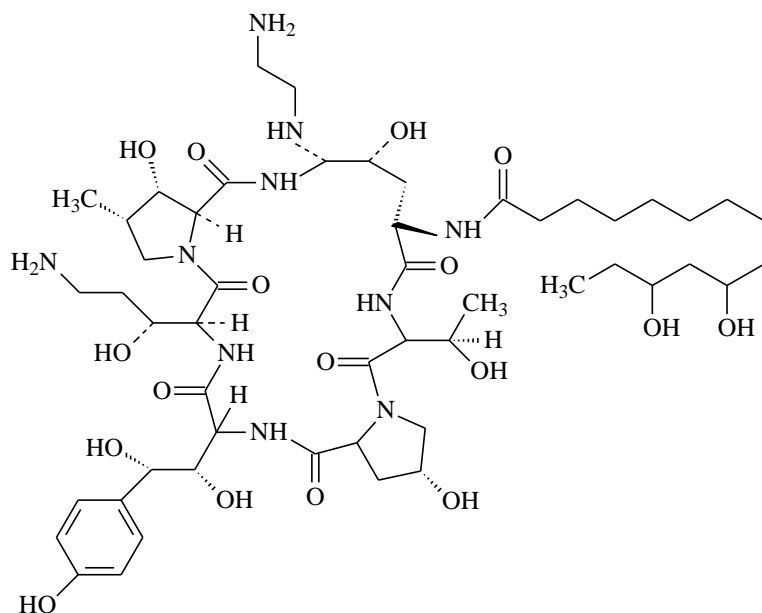


Il Voriconazolo è un nuovo agente antifungino a largo spettro di azione appartenente al gruppo dei farmaci a nucleo triazolico.

Ha dimostrato ottime attività contro tutte le specie di *Candida* e nei confronti del *Cr. neoformans*. Tuttavia gli effetti collaterali, tossicità oculare, epatotossicità, cardiotoxicità, tossicità renale, ne riducono attualmente l'utilizzazione. [4]

ECHINOCANDINE

Caspofungin (Merck Res 2001)



Il capostipite di questa nuova classe di antifungini è il Caspofungin, primo agente antifungino approvato negli USA ed in Europa per il trattamento delle infezioni micotiche invasive nel paziente adulto refrattario o intollerante ai trattamenti convenzionali con Amfotericina B o Itraconazolo.

È attivo contro le differenti specie di *Candida* e *Aspergillus*; uno dei meccanismi d'azione ipotizzato è inibizione della sintesi del beta-(1,3)-D-glucano, componente fondamentale della parete cellulare.[5,6]

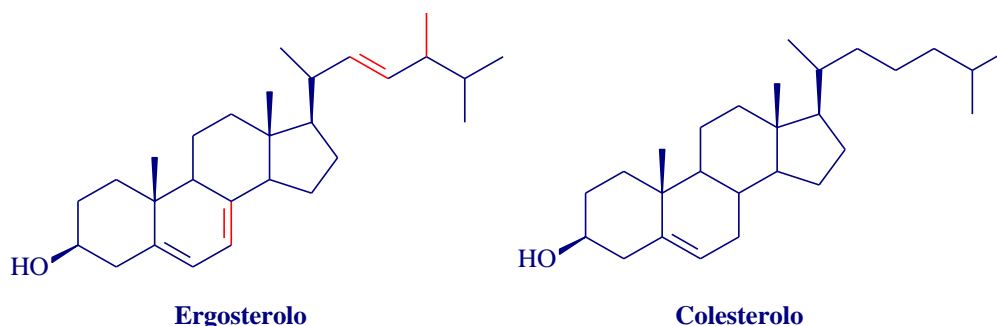
Sebbene si disponga di un discreto numero di farmaci, lo spettro d'azione degli antifungini a disposizione è ancora molto ristretto soprattutto per quanto riguarda le infezioni invasive le quali spesso hanno un esito fatale.

Inoltre, a causa della similarità fra la cellula fungina e quella dell'ospite, è assai difficile prevedere un sito bersaglio selettivo e quindi farmaci con ridotti effetti collaterali.

La difficoltà ad uccidere le cellule eucariotiche fungine senza danneggiare l'ospite è strettamente collegata al biochimismo della cellula, infatti la principale differenza, significativa dal punto di vista terapeutico, fra le cellule fungine e quelle dei mammiferi è dovuta alla diversa componente sterolica.

Gli steroli sono importanti componenti strutturali delle cellule dei funghi e dei mammiferi e sono determinanti per le peculiari funzioni di molti enzimi di membrana e delle proteine di trasporto ionico.

Le membrane cellulari dei mammiferi contengono colesterolo come componente sterolica, mentre i funghi contengono ergosterolo.



Sebbene i due steroli siano abbastanza simili, le due catene laterali sono notevolmente diverse e quando si costruiscono i modelli tridimensionali, il sistema di anelli dell' ergosterolo è piuttosto piatto a causa del doppio legame in più, presente nell' anello B.

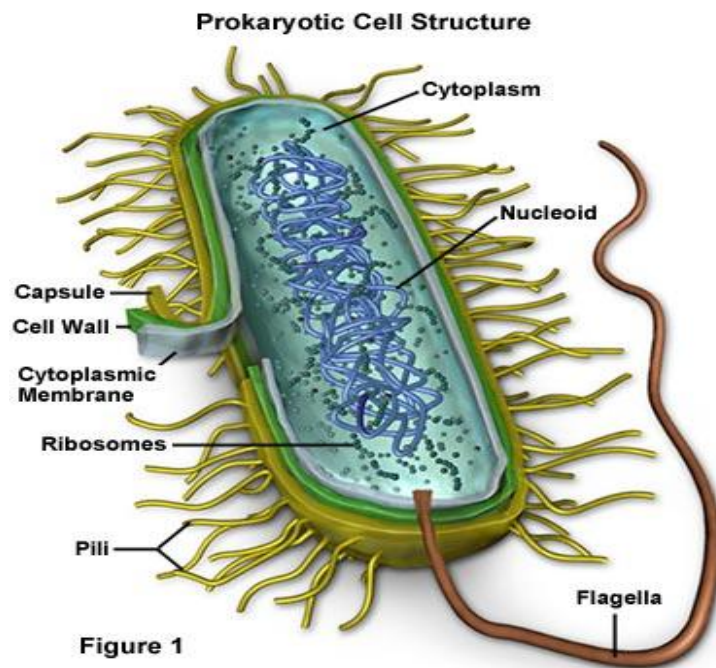
Questa differenza nella componente sterolica fornisce, con alcune piccole eccezioni, la base biochimica per giustificare la tossicità selettiva della maggior parte dei farmaci antifungini oggi in uso clinico.

Nonostante i progressi nel campo della chemioterapia antimicotica siano stati incoraggianti, l'insorgenza di ceppi sempre più resistenti ai farmaci in uso e il rischio sempre più frequente di pesanti effetti collaterali in pazienti in condizioni critiche, impongono la ricerca di nuove molecole ad attività antimicotica più specifica e ad ampio spettro d'azione.

I BATTERI

I batteri sono microrganismi unicellulari, procarioti, aerobi o anaerobi facoltativi.

All'interno della cellula batterica è presente un singolo cromosoma, immerso direttamente nel citoplasma e contenente DNA avvolto in una struttura superspiralizzata.



Nella cellula batterica si distinguono delle strutture fondamentali, presenti in tutti i batteri, e delle strutture accessorie; le **strutture fondamentali** sono la *parete cellulare*, la *membrana cellulare*, il *citoplasma* e il *nucleo*, mentre le **strutture accessorie** sono le *ciglia*, i *pili*, la *capsula* e le *spore*.

La parete cellulare differisce sia per struttura che per funzione dallo strato esterno delle cellule dei mammiferi .

Tre delle principali funzioni della parete batterica sono:

1. fornire una barriera semipermeabile tra l'interno e l'ambiente; esterno, attraverso cui possono passare solo le sostanze desiderabili
2. dare resistenza così da proteggere la cellula contro variazioni della pressione osmotica dell'ambiente;
3. prevenire la digestione da parte di enzimi dell'ospite;

La parete batterica è costituita da molecole di peptidoglicano: polimero costituito da due monomeri (amminozuccheri), N-acetilglucosammina (NAG) e acido acetil Muramico (NAM), uniti tra loro mediante legami glicosidici B 1-4 e B 1-6.

Ad ogni molecola di acido N-acetil Muramico sono legati 5 amminoacidi: L-alanina, D-glutammato, L-lisina e due di D-alanina.

Le molecole di peptidoglicano si uniscono tra loro per formare la parete batterica grazie all'azione dell'enzima *transpeptidasi* che catalizza la formazione del legame peptidico tra il terzo amminoacido di una catena ed il quarto della catena parallela.

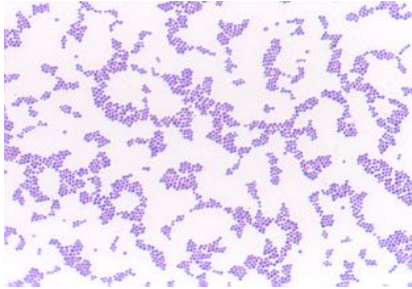
All'interno della famiglia dei batteri è possibile evidenziare delle differenze nella composizione della parete batterica.

Nel 1884 C. Gram introdusse una tecnica di colorazione che permise di classificare i batteri in base al diverso comportamento mostrato quando sottoposti alla colorazione di Gram, distinguendoli così in *Gram positivi* e *Gram negativi*.

I batteri che resistono all'azione del solvente e rimangono viola sono indicati come *Gram-positivi*, quelli che vengono decolorati e assumono il colore rosso sono indicati come *Gram-negativi*.

La spiegazione a questo fenomeno è che i Gram-positivi hanno una parete molto spessa che fissa il cristal-violetto della colorazione, non permettendo la sua eliminazione con etanolo.

Nei batteri Gram negativi invece, l'alcool scioglie i lipidi della membrana esterna e danneggia la sottile parete cellulare che non è più in grado di trattenere il complesso cristal violetto - ioduro (liposolubile).



Batterio Gram positivo
Micrococcus luteus



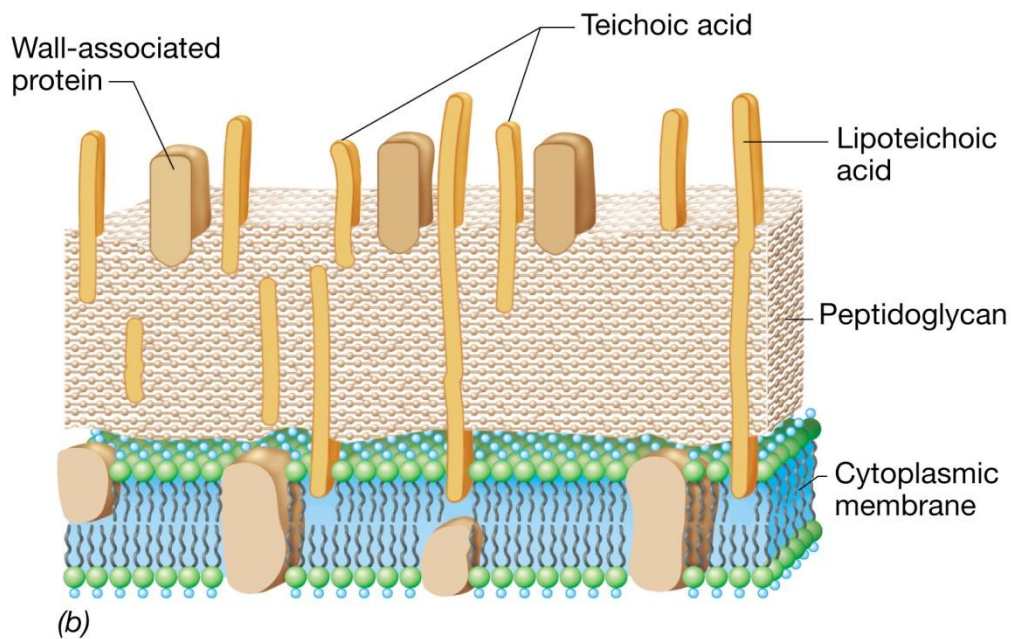
Batterio Gram negativo
Escherichia coli

Batteri Gram positivi

I batteri Gram-positivi possiedono uno spesso strato omogeneo di peptidoglicano che riveste la superficie esterna del batterio, costituendo così l'interfaccia tra il batterio e l'ambiente circostante.

Inserito nella parete di peptidoglicano vi è un grosso polisaccaride caricato negativamente: l'acido teicoico.

Parte delle molecole di acido teicoico è ancorata alla membrana citoplasmatica sottostante mediante una componente lipidica formando così dei complessi idrolipidici: *molecole dell'acido lipoteicoico (LTA)*, responsabili dei sintomi che si manifestano in seguito ad un'infezione batterica da gram-positivi.



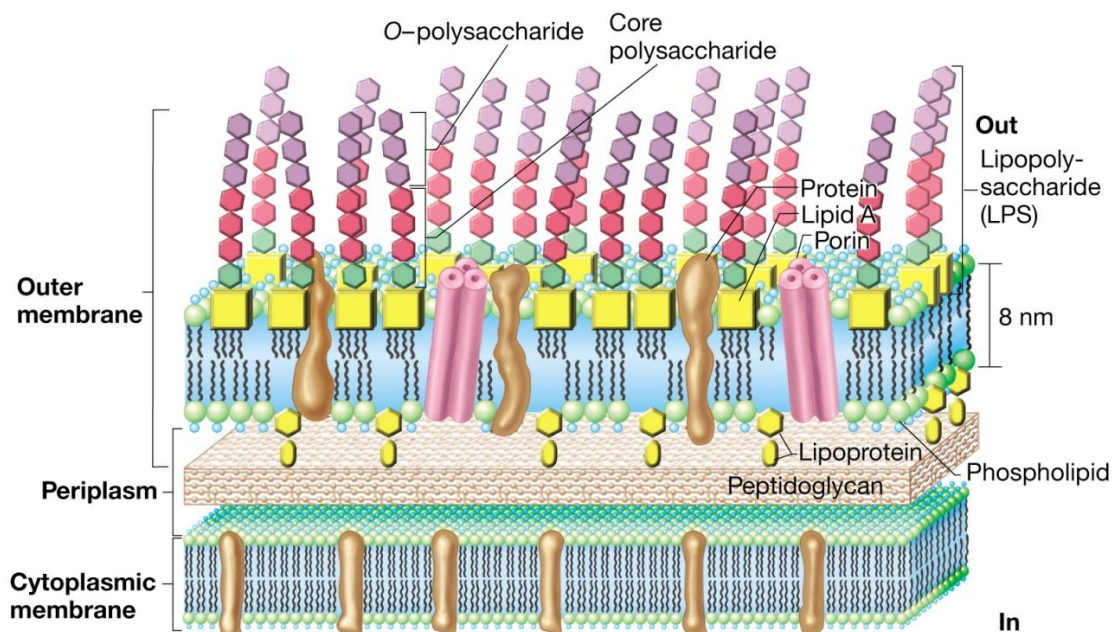
Batteri Gram negativi

I batteri gram-negativi possiedono una parete cellulare di gran lunga più complessa rispetto a quella dei gram-positivi.

Infatti, a differenza dei gram-positivi, possiedono un sottile strato di peptidoglicano che è rivestito da una membrana esterna costituita da uno strato di fosfolipidi.

Nello strato esterno è presente, inoltre, una molecola composta da lipidi e carboidrati chiamata lipopolisaccaride (**LPS**), che svolge la stessa funzione dell'LTA dei gram-positivi.

La membrana esterna dei gram-negativi è costellata di porine consentendo così alle piccole molecole, di cui il batterio necessita, di diffondere nel periplasma.



Il metabolismo batterico

La membrana citoplasmatica batterica somiglia a quella delle cellule eucariote e svolge tre funzioni essenziali per la vita dei batteri: seleziona e filtra materiale che dall'ambiente esterno entra nella cellula batterica; produce energia attraverso il sistema di trasporto degli elettroni (funzione che nelle cellule superiori è svolta dai mitocondri); partecipa alla divisione della cellula batterica.

La chemiosmosi è un processo che utilizza l'energia depositata sotto forma di gradiente protonico ai due lati della membrana per compiere lavoro cellulare.

La catena di trasporto dell'elettrone rimuove gli elettroni da un donatore di elettroni (NADH o FADH₂) e li trasporta ad un accettore finale di elettroni (O₂) attraverso una serie di reazioni redox.

Queste reazioni sono accoppiate alla creazione di un gradiente protonico tra citoplasma e ambiente esterno.

L'energia del gradiente di protoni può essere così utilizzata in diversi processi, quali la generazione di ATP (modello chemio-osmotico di formazione dell'ATP) o il trasporto di soluti.

Vi sono due meccanismi generali per la formazione di ATP negli organismi non fotosintetici: la *respirazione*, in cui il substrato organico o inorganico è ossidato completamente e gli elettroni sono trasportati attraverso una catena di trasporto di elettroni (catena respiratoria) fino all'accettore finale, che è l'ossigeno, nella respirazione aerobia, o un substrato diverso (NO₃⁻, SO₄⁻, CO₂, fumarato), in caso di respirazione anaerobica; la *fermentazione*, in cui il substrato organico è ossidato parzialmente e l'accettore finale di elettroni è un composto organico (assenza di una catena di trasporto di elettroni).

L'ATP si forma quando i protoni diffondono nella cellula attraverso le ATP-sintetasi, il passaggio dei protoni attraverso queste proteine determina la conversione enzimatica di ADP e fosfato in ATP.

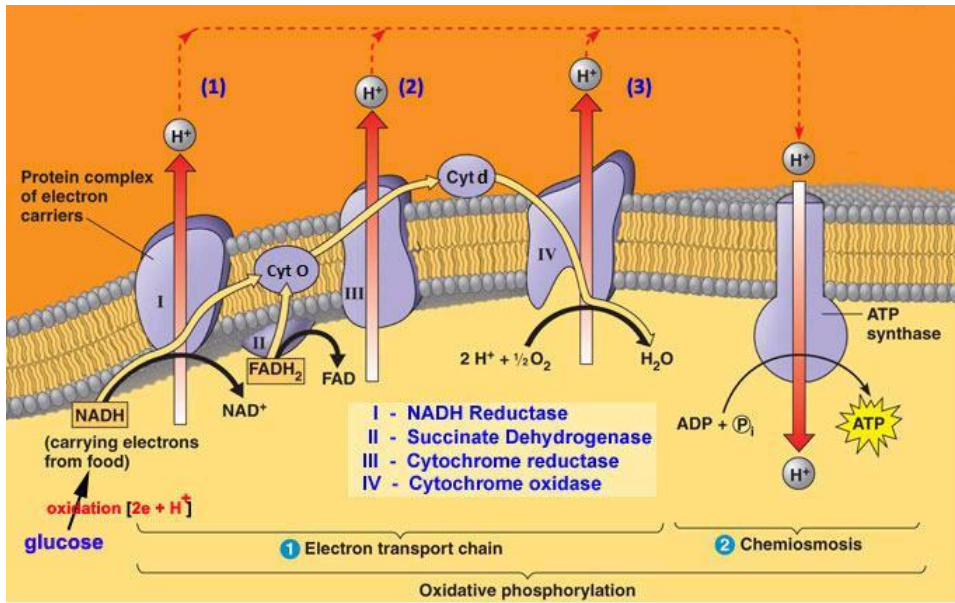
A tal proposito l' *E. Coli* è uno dei batteri più studiati. Si è visto che questo batterio può utilizzare diversi enzimi nella catena respiratoria a seconda delle condizioni ambientali, ovvero della presenza o meno di ossigeno e del tipo di substrato presente in caso di condizioni anaerobie (batteri facoltativi).

Infatti in condizioni aerobie, esso sintetizza due distinte citocromossidasi (citocromossidasi *o* e *d*), mentre in condizioni anaerobie può utilizzare nella catena respiratoria almeno cinque ossidoriduttasi terminali, che impiegano come accettori terminali di elettroni nitrato, dimetil-solfossido, trimetilamina-N-ossido o fumarato.

Nella catena respiratoria, un pool di chinoni accoppia l'ossidazione di NADH, ad opera della NADH-deidrogenasi, alla riduzione dell'accettore terminale di elettroni da parte delle ossidoreduttasi terminali.

La citocromossidasi *o* agisce prevalentemente quando sono presenti elevate concentrazioni di ossigeno; ma con il diminuire della concentrazione di O₂ i livelli della citocromossidasi *o* si riducono mentre quelli della citocromossidasi *d* aumentano.

In condizioni povere di ossigeno, la cellula procariota attiva i meccanismi del metabolismo anaerobio attraverso la sintesi degli enzimi della respirazione anaerobia.



Terapia antibatterica

La maggior parte dei farmaci antibatterici ha origine da microrganismi, come miceti (*Penicillium spp.*), streptomiceti (*Streptomyces spp.*) e da altri batteri (*Bacillus spp.*); altri invece sono di origine sintetica o semisintetica.

Nello scorso secolo la ricerca farmaceutica ha reso disponibili numerose molecole ad attività antibatterica, perseguendo l'obiettivo di incrementarne la selettività e l'attività, e di ridurre gli effetti tossici.

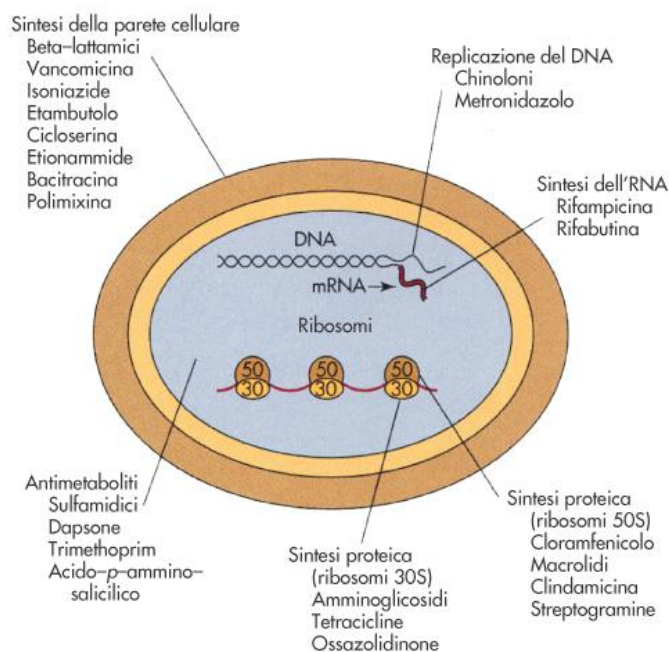
Le ormai numerosissime molecole disponibili inibiscono lo sviluppo dei batteri attraverso meccanismi di azione differenti, che mirano però essenzialmente a due obiettivi:

- a) distruggere l'involucro protettivo esterno della cellula batterica;
- b) interferire con le reazioni biochimiche che le consentono di sopravvivere e di riprodursi;

I bersagli dei principali agenti chemioterapici antimicrobici sono:

- Sintesi della parete cellulare (*penicilline, cefalosporine, monobattami, carbapenemi, cicloserina, vancomicina*)
- Metabolismo dell'acido folico (*trimetroprima, sulfonamidi*)
- Allungamento dell'RNA (*actinomicina*)
- DNA girasi (*acido nalidixico, ciprofloxacina, novobicina*)
- RNA polimerasi DNA dipendente (*rifampine, streptovaricine*)
- Sintesi proteica : inibitori della subunità 50S del ribosoma (*eritromicina, cloramfenicolo, clindamicina, lincomicina*)
- Sintesi proteica: inibitori della subunità 30S del ribosoma (*tetracicline, spectinomicina, streptomicina, gentamicina, tobramicina, kanamicina, amikacina, nitrofurani*)

BERSAGLIO	MECCANISMO	FARMACI	
PARETE CELLULARE	Demolizione	Lisozima	
	Inibitori della sintesi del peptidoglicano	β -Lattamici Glicopeptidici Bacitracina Fosfomicina Cicloserina	
	Demolizione	Polipeptidi bas., anfil.	
	Interazione ergosterolo	Macrolidi polienici	
MEMBRANA CELLULARE	Inibiz. bios. ergosterolo	Imidazoli	
	Sub. 30 S	Tetraciclina	
	Sub. 50 S	Macrolidi	
	Sub. 50 S	Lincomicine	
	Sub. 50 S	Cloramfenicolo	
FUNZIONE RIBOSOMIALE (sintesi proteica)	Sub. 30 S	Ammino-oligosaccaridi	
	Sintesi ac. FOLICO (inib. sintesi ac. nucleici)	Sintesi ac. Diidropteroico Inibizione DHFR batteri	Sulfamidici Antifolici
	FUNZIONE CROMOSOMIALE (replica e trascrizione DNA)	Inibiz. Trascrizione DNA	Rifamicine Chinoloni
Inibiz. Replicazione DNA		Antracicline Actinomicine	
Vario		Antivirali	



Fino a qualche anno fà si usava la distinguere gli antibiotici fra *ampio spettro* e *spettro limitato* ma la diffusa comparsa di ceppi batterici resistenti ad uno o più farmaci ha ridotto il significato di questi due termini.

Tuttavia è importante ricordare che esistono delle molecole che sono in grado di inibire un notevole numero di batteri, sia gram-positivi che gram-negativi, come le tetracicline, gli antibiotici beta lattamici di II° e III° generazione, il Cloramfenicolo e alcuni glicopeptidi, e altri che agiscono solo su poche specie, come la Vancomicina e i macrolidi.

Inoltre, a secondo dell'effetto finale sulla cellula batterica i vari farmaci vengono poi suddivisi in:

- *battericidi*, se ne provocano direttamente la morte;
- *batteriostatici*, se ne bloccano la crescita (lasciando così al sistema immunitario il compito di eliminarla definitivamente).

Attività battericida	Attività batteriostatica
B-lattamici	Cloramfenicolo
Bacitracina	Macrolidi
Chinoloni	Sulfamidici
Glicopeptidi	Trimethoprim
Polimixina	Tetracicline
Rifamicine	Nitrofurani
Sulfamidici+Trimethoprim	Spectinomicna
Fosfomicina	
Aminoglicosidi	
Isoniazide	

La capacità che hanno gli antibiotici di curare malattie infettive precedentemente incurabili ha fatto nascere l'idea che siano "farmaci miracolosi" dotati di "poteri" che vanno ben al di là di quelli che possono essere attribuiti alle loro reali caratteristiche farmaceutiche.

Nella maggior parte dei paesi europei gli antibiotici sono tra i farmaci più utilizzati, secondi solo ai comuni analgesici.

Sfortunatamente stiamo cominciando a pagare un prezzo molto alto per questa impostazione nei confronti dell'uso degli antibiotici. Infatti, il loro uso eccessivo e inadeguato in medicina e in agricoltura ha portato a un rapido aumento della frequenza dei microrganismi resistenti ai farmaci. Molti dei primi antibiotici sono diventati, infatti, inefficaci o molto meno affidabili di un tempo.

Parallelamente allo sviluppo di nuovi farmaci, i batteri hanno messo in campo le contromisure biologiche di cui sono dotati (modificazioni genetiche, adattamenti biochimici) per ridurre la propria suscettibilità all'effetto dei farmaci sviluppando così resistenza ai farmaci in uso.

Oggi, la farmaco-resistenza rappresenta uno degli ostacoli più grandi nel controllo delle infezioni batteriche e di conseguenza una delle maggiori emergenze sanitarie.

Le principali cause dello sviluppo di forme di resistenza da parte dei batteri sono:

- il trattamento delle infezioni a eziologia virale come infezioni batteriche
- l'uso a dosi diverse da quelle prescritte
- l'assunzioni per periodi di tempo insufficienti o troppo prolungati
- l'impiego del farmaco dopo che la resistenza batterica si sia sviluppata
- la conseguenza più grave è la nascita di nuovi ceppi batterici capaci di resistere contemporaneamente a diversi antibiotici

Le infezioni provocate da questi patogeni multi-farmacoresistenti costituiscono una sfida particolare, che comporta lunghe degenze in ospedale e costi notevolmente più elevati per la società, maggiori complicazioni cliniche con il rischio di gravi malattie, che in passato avrebbero potuto essere trattate in modo efficace.

La peggiore situazione possibile, che purtroppo non è improbabile, è che gli agenti patogeni diventino resistenti a tutti gli antibiotici precedentemente efficaci, provocando così epidemie incontrollabili di malattie batteriche che non possono più essere curate.

Nei paesi sviluppati, fino al 60 % delle infezioni contratte in ambiente ospedaliero sono dovute a microbi farmacoresistenti.

Tra questi, quelli apparsi più di recente sono l'Enterococco resistente alla vancomicina (VRE) e lo Stafilococco aureo resistente alla meticillina (MRSA). Queste infezioni nosocomiali cominciano ad apparire anche nel resto della popolazione.

È indispensabile sviluppare nuovi farmaci per dare accesso a trattamenti efficaci contro le infezioni batteriche particolarmente aggressive. Allo stesso modo, è indispensabile che questi nuovi farmaci, come anche quelli già esistenti, siano usati con maggiore parsimonia e solo in seguito a precise considerazioni mediche.

Ed è per questo che la comunità scientifica è sempre più impegnata nello sviluppo di nuovi farmaci ad attività antibiotica sempre più specifica e ad ampio spettro d'azione.

Introduzione agli studi su potenziali nuovi antibatterici

Per la maggior parte dei farmaci antibatterici (alifatici e aromatici nitro composti , chinoloni, chelanti, metallo derivati) è stato proposto un meccanismo di azione “unico”.

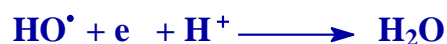
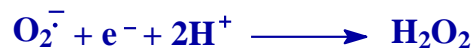
Infatti, si pensa che gli effetti tossici siano il risultato di alcune reazioni catalitiche a carico dell'ossigeno radicale che generalmente si forma durante le reazioni con trasferimento di elettroni.[7]

Lo stress ossidativo è definito come uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e metaboliti reattivi, cosiddetti ossidanti o specie reattive dell'ossigeno (ROS), e la loro eliminazione da parte di meccanismi di protezione, indicato come antiossidanti.

Questo squilibrio porta a danni a carico di importanti componenti cellulari, con un impatto potenziale su tutta la cellula batterica.

La maggior parte dei ROS sono generati nelle cellule della catena respiratoria.

Durante le reazioni di metabolismo endogeno, le cellule aerobiche producono ROS come anione superossido (O_2^-), perossido di idrogeno (H_2O_2) , radicale idrossile (OH^\bullet), e organici perossidi come normali prodotti della riduzione del biologico ossigeno molecolare[8].



Il batterio, per proteggersi contro questi pericolosi pro-ossidanti, usa un sistema complesso di antiossidanti enzimatici (superossido dismutasi (SOD), catalasi, glutazione perossidasi (GPx), glutazione reduttasi,) [8].

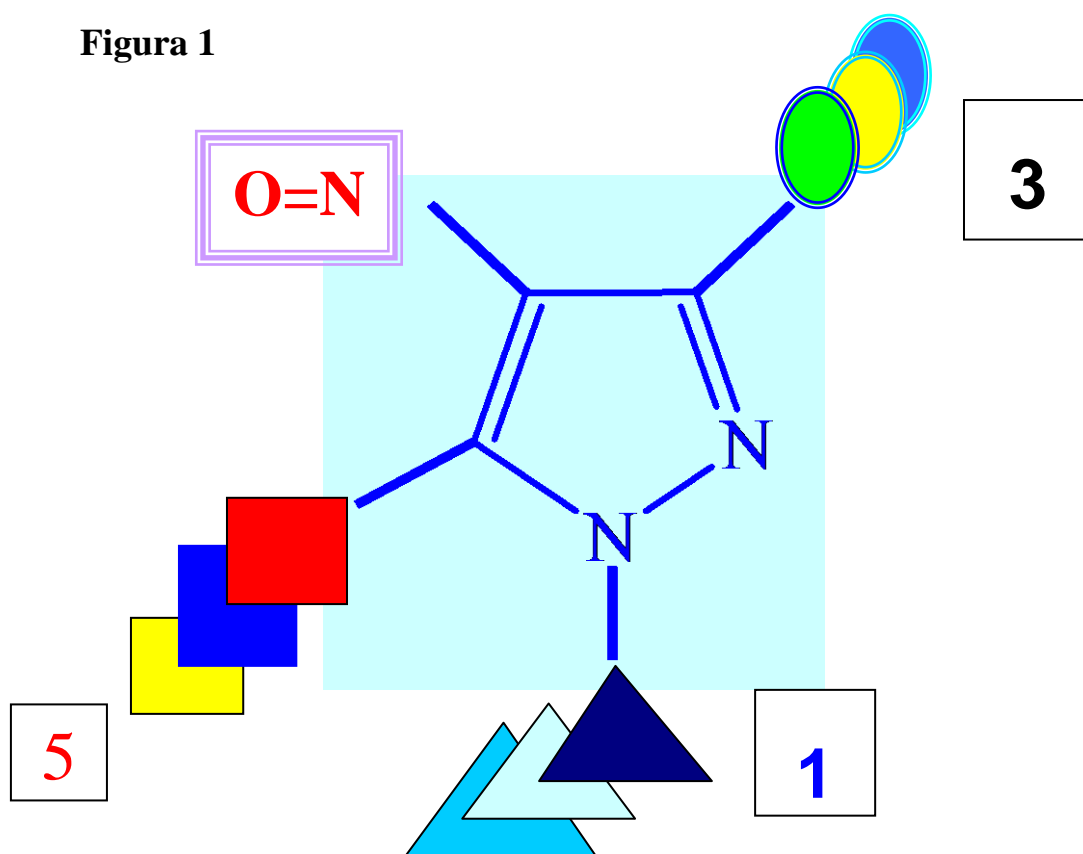


DISCUSSIONE

Il gruppo di ricerca coordinato dal prof. Enrico Aiello si è da tempo interessato allo studio di derivati 4-nitrosopirazolici che hanno mostrato attività antimicotica contro diverse specie fungine. [9-13]

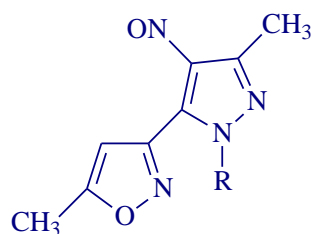
Il lavoro di ricerca, al quale io ho partecipato prima durante l'espletamento della mia tesi sperimentale di laurea e poi durante gli anni del mio dottorato, è stato impostato in diversi stadi, partendo dal presupposto di considerare la struttura 4-nitroso-pirazolica come nucleo farmacoforico fondamentale sul quale apportare idonee modifiche strutturali al fine di esaltare, da un lato, l'attività biologica e, dall'altro, di individuare nuovi elementi farmacoforici, (**Figura 1**)

Figura 1

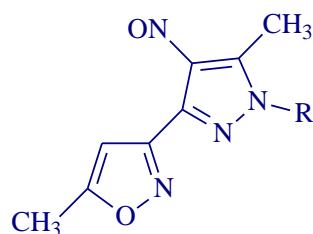


Fino ad oggi, infatti, non sono noti in letteratura tentativi di studi SAR su derivati 4-nitrosopirazolici, nonostante l'ampia bibliografia esistente su questi composti descritti come fungicidi, acaricidi, antibatterici e antielmintici che, peraltro, fa riferimento essenzialmente a derivati alchilici e arilici e solo in minima parte a nitrosopirazoli sostituiti da sistemi eterociclici. [14-21]

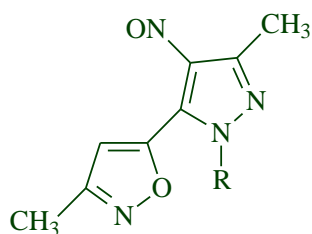
Lo studio SAR dei derivati 4-nitrosopirazoli è iniziato con la sintesi e la valutazione dell'attività biologica dei derivati 1-R-3-metil-4-nitroso-5-(5-metil-3-isossazolil)-1H-pirazolici, **SERIE 1**, gli isomeri 1-R-3-(5-metil-3-isossazolil)-4-nitroso-5-metil-1H-pirazoli, **SERIE 2**, 1-R-3-metil-4-nitroso-5-(3-metil-5-isossazolil)-1H-pirazoli, **SERIE 3**, e gli isomeri 1-R-3-(3-metil-5-isossazolil)-4-nitroso-5-metil-1H-pirazoli, **SERIE 4**, in cui era mantenuto in posizione **3** un gruppo metilico e inserendo nella posizione **1** gruppi via via più ingombranti: (-H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OH, n-CH₂CH₂CH₃, p-Cl-C₆H₅).



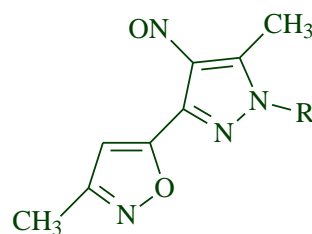
SERIE 1



SERIE 2



SERIE 3



SERIE 4

a R=H, **b** R=Me, **c** R=Et, **d** R=EtOH, **e** R=nPr, **f** R=p-Cl-Ph

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 1 e 2

Cpd	^a MIC µg/ml			
	<i>C. albicans.</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>
1a	64	64	64	0,5
1b	1	1	1	0.5
2b	1	0,5	2	1
1c	1	4	4	0.125
2c	1	1	8	≤0.25
1d	1	1	1	1
2d	≥64	≥64	≥64	≥64
1e	1	1	1	1
2e	1	1	1	1
1f	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo
2f	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo
Amfotericina B	≤0.125	≥4	≤0.125	≤0.125
Fluconazolo	≤0.25	≥64	≤4	≤0.125

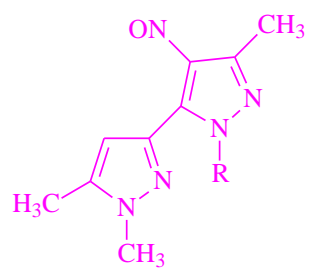
Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 3 e 4

Cpd	^a MIC µg/ml			
	<i>C. albicans.</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>
3a	2	1	≥64	4
3b	0.5	4	4	0.06
4b	1	2	0.125	0.06
3c	0.5	0.5	0.5	0.125
4c	1	1	8	≤0.25
3d	1	8	2	≤0.25
4d	32	32	>128	1
3e	0.5	1	2	0.25
4e	0.5	1	4	0.25
3f	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo
4f	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo
Amfotericina B	≤0.125	≥4	≤0.125	≤0.125
Fluconazolo	≤0.25	≥64	≤4	≤0.125

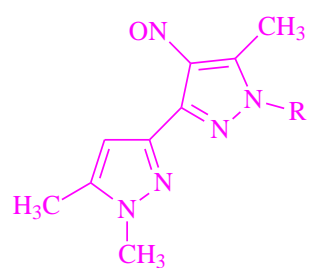
I risultati dei saggi biologici hanno mostrato che la potenza dei derivati sembra essere modulata dal tipo di sostituente e dalla lunghezza della catena carboniosa del gruppo alchilico legato all'azoto dell'anello pirazolico.

È stato osservato, infatti, che i derivati N-H mostrano modesta attività antifungina; viceversa, con l'incremento della lunghezza della catena alchilica, l'attività aumenta passando attraverso un massimo con il gruppo metilico ed etilico per diminuire di nuovo progressivamente con i gruppi propilico, idrossietilico ed infine con il p-Cl-fenile risultano essere completamente inattivi.

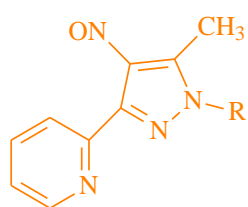
Alla luce dei risultati degli studi preliminari SAR formulati per queste quattro serie, sono stati sintetizzati nuovi derivati in cui venivano modulati i parametri sterici, elettronici ed lipofili, relativi ai sostituenti in posizione **5** che in questo caso vennero identificati in alcuni eterocicli come il *pirazolo*(**SERIE 5 e 6**), la *piridina*(**SERIE 7**), il *metil-pirazolo*(**SERIE 8**), la *chinolina* (**SERIE 9**), il *furano* (**SERIE 10 e 11**), il *tiofene* (**SERIE 12 e 13**).



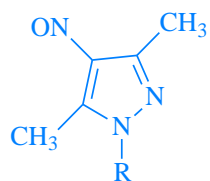
SERIE 5



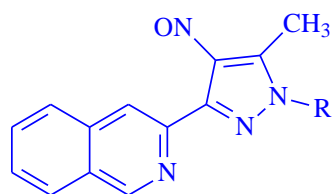
SERIE 6



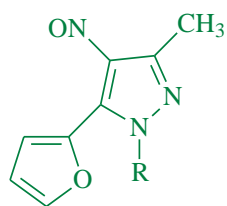
SERIE 7



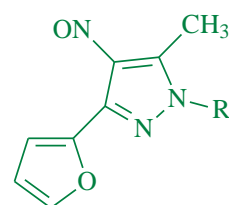
SERIE 8



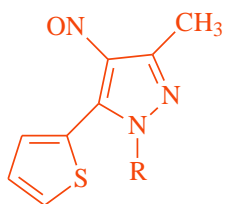
SERIE 9



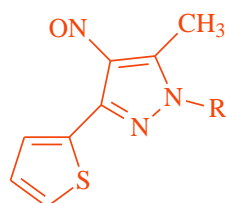
SERIE 10



SERIE 11



SERIE 12



SERIE 13

a R=H, **b** R=Me, **c** R=Et, **d** R=EtOH, **e** R=nPr, **f** R=p-Cl-Ph

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 5 e 6

^a MIC (µg/ml)				
Cpd.	C.albicans	C. krusei	C. tropicalis	C. neoformans
5a	4	16	32	2
6b	1	2	2	0,25
7b	2	8	32	0,5
6c	0,006	1	0,25	<0,5
7c	64	64	64	32
Fluconazolo	≤ 0,25	≥ 64	≤ 4	≤ 0,125
Amfotericina B	≤ 0,125	≥ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 7

^a MIC (µg/ml)				
Cpd.	C.albicans	C. krusei	C. tropicalis	C. neoformans
7a	1	4	32	0,5
7b	0,5	0,5	2	0,125
7c	0,5	1	8	0,125
7d	8	16	32	16
7e	64	64	64	32
Fluconazolo	≤ 0,25	≥ 64	≤ 4	≤ 0,125
Amfotericina B	≤ 0,125	≥ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 8 e 9

MIC ^a (µg/ml)				
Cpd.	C.albicans	C. krusei	C. tropicalis	C. neoformans
8a	4	0,25	32	16
8b	0,25	0,25	0,25	0,25
9b	0,5	0,25	2	1
8c	0,5	0,25	4	0,5
9c	4	2	16	0,5
8d	16	32	64	8
Fluconazolo	≤ 0,25	≥ 64	≤ 4	≤ 0,125
Amfotericina B	≤ 0,125	≥ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 10 e 11

MIC ^a (µg/ml)				
Cpd.	C.albicans	C. krusei	C. tropicalis	C. neoformans
10a	0,25	2	0,125	0,5
10b	0,125	0,125	0,125	0,125
11b	0,125	0,125	2	0,125
10c	0,125	0,125	0,125	0,125
11c	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
10d	8	8	8	0,125
11d	4	4	8	0,125
Fluconazolo	≤ 0,25	≥ 64	≤ 4	≤ 0,125
Amfotericina B	≤ 0,125	≥ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

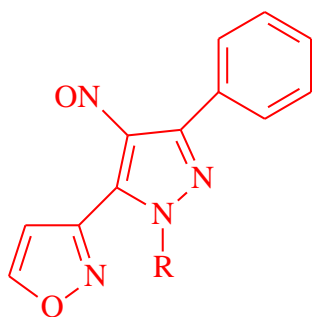
Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 12 e 13

MIC ^a (µg/ml)				
Cpd.	C.albicans	C. krusei	C. tropicalis	C. neoformans
12a	0,5	8	32	≤0,125
12b	≤0,125	0,25	1	≤0,125
13b	≤0,125	≤0,125	0,5	≤0,125
12c	≤0,125	≤0,125	0,5	≤0,125
13c	≤0,125	≤0,125	0,5	0,25
Fluconazolo	≤ 0,25	≥ 64	≤ 4	≤ 0,125
Amfotericina B	≤ 0,125	≥ 4	≤ 0,125	≤ 0,125

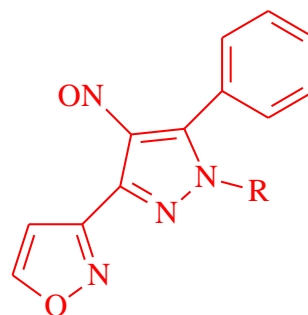
^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

A questo punto si è pesato di modificare la posizione **3**.

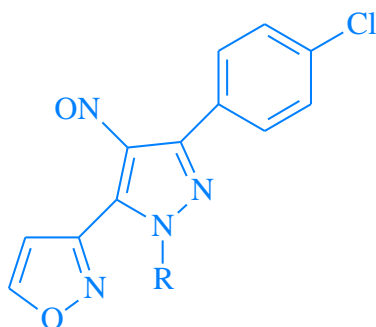
Le prime sostituzioni hanno portato a composti in cui la posizione **3** risulta sostituita con gruppi a elevato ingombro sterico (fenile, p-Cl-fenile, p-NO₂-fenile), **SERIE 14** e **15**, **16** e **17** e **18** e **19**, che non hanno mostrato attività antifungina significativa.



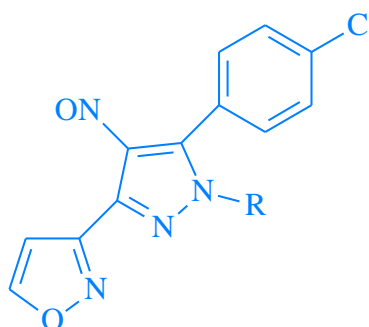
SERIE 14



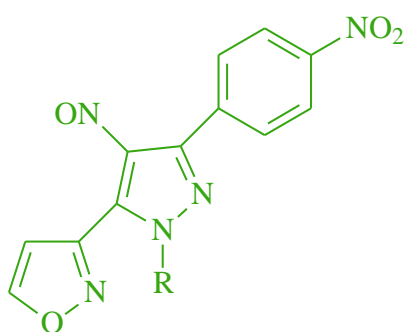
SERIE 15



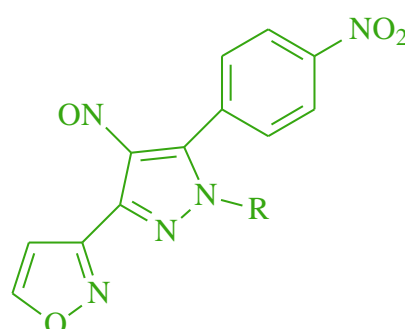
SERIE 16



SERIE 17



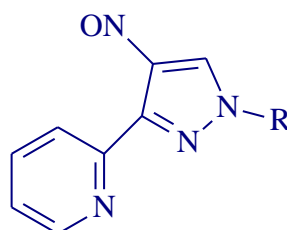
SERIE 18



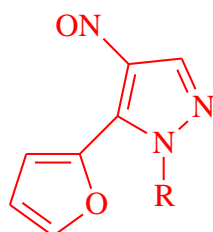
SERIE 19

a R=H, **b** R=Me, **c** R=Et, **d** R=EtOH, **e** R=nPr, **f** R=p-Cl-Ph

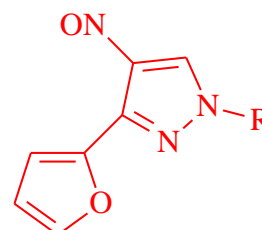
Successivamente sono stati sintetizzati i derivati delle **SERIE 20, 21, 22, 23 e 24** in cui la posizione **3** non è sostituita; questi hanno mostrato un'interessante attività antifungina.



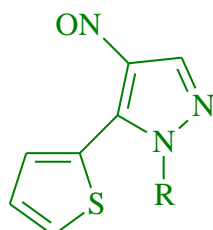
SERIE 20



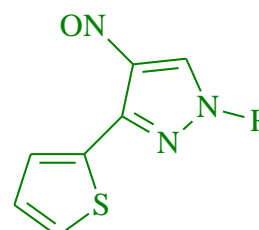
SERIE 21



SERIE 22



SERIE 23



SERIE 24

a R=H, **b** R=Me, **c** R=Et

I composti ottenuti sono stati testati per valutarne l'attività antimicotica contro alcuni funghi patogeni umani (*C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.neoformans*) usando come riferimento i valori di attività del Fluconazolo e l'Amfotericina B.

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella seguente.

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 20

Composto	MIC μ g/ml			
	C.albicans	C.krusei	C.tropicalis	C.neoformans
20 a	8	2	8	0,5
20 b	8	0,5	4	$\leq 0,06$
20 c	1	1	8	$\leq 0,06$
Amfotericina B	$\leq 0,125$	≥ 4	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Fluconazolo	$\leq 0,25$	≥ 64	≤ 4	$\leq 0,125$

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 21 e 22

Composto	MIC μ g/ml			
	C.albicans	C.krusei	C.tropicalis	C.neoformans
21 a	2	4	8	0,5
21 b	0,25	0,25	1	$\leq 0,06$
22 b	2	1	1	$\leq 0,06$
21 c	0,25	0,25	2	$\leq 0,06$
22 c	1	0,5	2	$\leq 0,06$
Amfotericina B	$\leq 0,125$	≥ 4	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Fluconazolo	$\leq 0,25$	≥ 64	≤ 4	$\leq 0,125$

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

Tabella delle attività antimicotiche delle SERIE 23 e 24

Composto	MIC μ g/ml			
	C.albicans	C.krusei	C.tropicalis	C.neoformans
23 a	2	4	4	1
23 b	0,25	0,25	0,25	\leq 0,06
24 b	2	1	1	0,03
23 c	0,25	0,25	2	\leq 0,06
24 c	1	0,5	1	\leq 0,06
Amfotericina B	\leq 0,125	\geq 4	\leq 0,125	\leq 0,125
Fluconazolo	\leq 0,25	\geq 64	\leq 4	\leq 0,125

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

I derivati delle nuove serie descritte, **20**, **21**, **22**, **23** e **24**, hanno mostrato, mediamente, ottime attività contro *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*.

È rilevante evidenziare che la sostituzione del gruppo CH₃ con l'H in posizione **3** abbia portato a composti molto selettivi ed estremamente potenti contro il *C.neoformans*

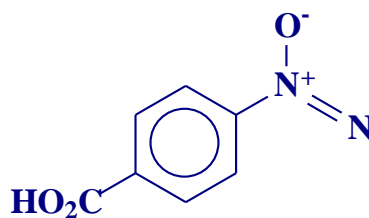
Il tiofene-derivato, in particolare, si è mostrato, **fino a quattro volte più potenti del Fluconazolo e dell' Amfotericina.**

I dati biologici ottenuti consentono pertanto di affermare che l'attività antimicotica dei 4-nitrosopirazoli è fortemente condizionata dai sostituenti in posizione 3 con limitati effetti sterici, lipofici ed elettronici.

NUOVI FARMACI ANTIBATTERICI

Gli ottimi risultati ottenuti in tutti questi anni di ricerca sui derivati 4-nitrosopirazoli ci hanno invogliato ad estendere le nostre ricerche su molecole ad attività antibatterica.

Durante le nostre ricerche bibliografiche in merito alle molecole note in letteratura per l'attività antibatterica, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'*Acido Calvatico* e su i suoi analoghi, i quali possiedono una interessante attività antibatterica, antifungina e antitumorale.

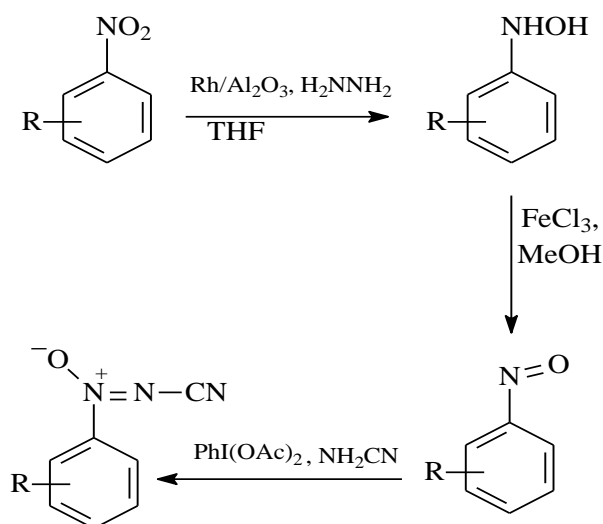


I

Infatti, nel tentativo di trovare nuove molecole ad attività antimicrobica, nel 1974 fu scoperta la molecola dell'Acido Calvatico: in Italia il gruppo di ricerca del prof. Gasco (Torino) la isolava dalla coltura di *Calvatia Lilacina* [22] e in Giappone il gruppo di ricerca del prof. Umezawa (Tokyo) dalla coltura di *Calvatia Craniformis* [23].

Entrambi i gruppi di ricerca hanno realizzato in laboratorio la sintesi completa della molecola e, successivamente, di molti suoi derivati.

Noi riportiamo qui di seguito la sintesi descritta dal gruppo del prof. Gasco di alcuni derivati azossiciano [24]:

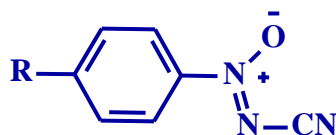


Gasco *et al* utilizzando un derivato R-nitrobenzenico come composto di partenza e operando una riduzione con rodio su allumina e idrazina idrata, hanno ottenuto l' idrossilamina corrispondente. [25]

Successivamente, per aggiunta di cloruro ferrico è stato ottenuto il nitroso-derivato che fatto reagire con cianamide, in presenza di iodobenzene-diacetato in cloroformio, ha condotto alla formazione di un derivato-azossiciano.

I saggi biologici dei derivati dell'acido calvatico così ottenuti, hanno evidenziato una scarsa attività antifungina, mentre per quanto riguarda l'attività antibatterica, si mostrati attivi sia nei confronti dei gram-positivi che dei gram-negativi.

In particolare l'attività antibatterica viene incrementata sostituendo il gruppo -COOH, presente nella molecola dell'acido calvatico, con altri gruppi più lipofili quali *p*-COOCH₃ e *p*-Cl.



I

Table 1. Antibacterial and antifungal spectra of phenylazoxycyanide and its *para*-substituted derivatives.

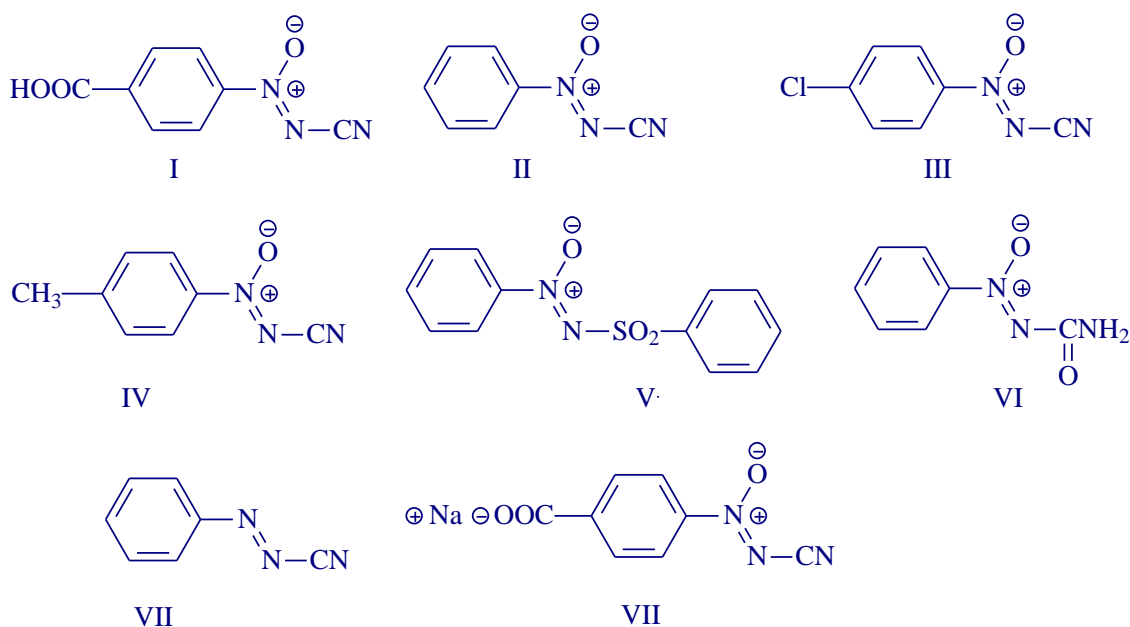
Test microorganisms	MIC (mcg/ml)				
	<i>p</i> -Substituted phenylazoxycyanide				
	-H	-COOH(I)	-COOCH ₃ (IV)	-CH ₃	-Cl
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	6.25	6.25	—	12.5	3.12
" " Smith	3.12	6.25	6.25	12.5	3.12
" " Terajima	—	1.56	—	—	—
<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	12.5	3.12	6.25	25	6.25
<i>Micrococcus flavus</i> FDA 16	12.5	3.12	3.12	25	6.25
<i>Corynebacterium bovis</i> 1810	12.5	3.12	3.12	25	6.25
<i>Bacillus anthracis</i>	3.12	6.25	<0.78	3.12	1.56
" <i>subtilis</i> NRRL B-558	12.5	12.5	—	12.5	3.12
" <i>cereus</i> ATCC 10702	3.12	3.12	—	12.5	3.12
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25
" " K-12	6.25	25	6.25	12.5	6.25
<i>Salmonella typhosa</i> T-63	6.25	12.5	6.25	12.5	3.12
<i>Shigella sonnei</i> 191-66	—	6.25	—	—	—
<i>Proteus vulgaris</i> OX 11	3.12	6.25	3.12	12.5	6.25
" <i>rettgeri</i> GN 311	6.25	100	—	50	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A3	100	>100	50	>100	100
" <i>fluorescens</i>	>100	>100	—	100	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607	25	>100	3.12	25	12.5
" <i>phlei</i>	—	>100	—	—	—
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	12.5	<0.78	—	3.12	3.12
<i>Vibrio anguillarum</i> NCBM 6	6.25	<0.78	—	1.56	1.56
<i>Candida albicans</i> 3147	50	>100	—	6.25	3.12
" Yu-1200	50	>100	—	6.25	3.12
" <i>pseudotropicalis</i> NI 7494	3.12	>100	—	<0.78	3.12
" <i>krusei</i> NI 7492	3.12	100	—	1.56	1.56
<i>Cryptococcus neoformans</i> NI 7496	3.12	>100	—	1.56	1.56
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.12	>100	—	1.56	<0.78
<i>Pyricularia oryzae</i>	25	>100	—	6.25	3.12
<i>Helminthosporium oryzae</i>	25	>100	—	25	12.5
<i>Xanthomonas oryzae</i>	12.5	3.12	—	3.12	1.56
<i>Pellicularia filamentosa</i>	6.25	100	—	6.25	25
<i>Trichophyton sateroides</i>	25	>100	—	25	12.5

Negli ultimi anni le arilazossicianidine hanno trovato applicazione nel campo agrochimico grazie alla loro capacità di agire sulle specie patogene che attaccano le piante senza determinare fitotossicità e quindi lasciando intatte le strutture vitali della pianta.[26]

In seguito a questi studi e ai risultati di attività ottenuti, si è pian piano giunti alla conclusione che l'attività dell'acido calvatico e dei suoi derivati possa essere attribuita al gruppo *azossiciano* (ONNCN) presente nella molecola.

Sulla base di questi studi e di successive ricerche alcuni ricercatori dell'università di Alagoas (brasil) in collaborazione con l'università di Torino hanno sviluppato un progetto di ricerca che aveva lo scopo di studiare una eventuale correlazione tra le caratteristiche elettrochimiche dei composti che contenevano la funzione azossiciano e azociano e l'attività molluscidica, con lo scopo di stabilire il possibile ruolo del potenziale redox nel meccanismo d'azione. [27]

A tal proposito sono stati sintetizzati sei derivati dell'acido calvatico



per i quali è stato valutato il potenziale redox in mezzo protico e in mezzo aprotico

Tabella 1

	Molluscicidal activity/ppm		E_{PIc}/V	
	DL ₅₀	DL ₉₀	Aprotic medium	Acqueous medium
I	3.33	6.99	-0.350	-0.338
II	2.38	3.19	-0.635	-0.346
III	1.17	1.36	-0.570	-0.300
IV	1.79	2.79	-0.680	-0.387
V	ND	>40	-0.710	-0.350
VI	ND	>40	-1.115	-0.481
VII	2.85	4.89	-0.240	-0.230

La facilità di un composto a ridursi viene espresso dai valori di E_{PIc} (potenziale redox dell'onda di riduzione, *catodo*).

La facilità dei derivati azossiciano a ridursi, è favorita da sostituenti con effetto elettron-attrattore.

In termini elettrochimici, il confronto con il gruppo -COOH non è possibile in quanto il gruppo carbossilico è soggetto a ionizzazione e quindi altera alcune condizioni elettrochimiche.

A questo punto i composti sono stati saggiati per valutarne la loro attività molluscidica.

Un valore di DL₉₀ < 10ppm, in generale, è indicativo di una significativa attività molluscidica.

Se correliamo i valori E_{PIc} con i valori di DL₉₀ viene fuori che affinché ci sia un'attività molluscidica i valori di E_{PIc} devono essere compresi tra -0,35 e -0,70. Come riportato in tabella 1 i composti **I-II-III-IV-VII**, i quali presentano il gruppo azossiciano o azociano, hanno valori di DL₉₀ inferiori a 10 ppm; invece, i composti **V-VI**, ovvero quelli in cui il gruppo azossiciano o azociano è stato sostituito con

un derivato azossi-benzensolfonico o azossicarbamidico, mostrano valori di attività notevolmente ridotta o assente.

Questi risultati sono avvalorati da uno studio in cui sono state valutate le interazioni di microsomi di fegato con l'acido calvatico e suoi analoghi strutturali, alcuni dei quali avevano mostrato proprietà antimicrotubulari.

Si è visto che questi farmaci diminuiscono il contenuto di citocromo P-450 attraverso un processo di ossidazione delle proteine; inoltre, l'aggiunta di cisteina o di GSH previene la diminuzione del citocromo P-450, il che suggerisce un coinvolgimento di gruppi sulfidrilici. [28]

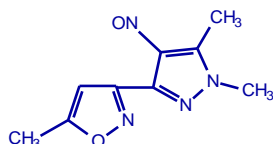
Sulla base di tali premesse è nata la collaborazione tra il gruppo di ricerca del prof. Aiello e il gruppo di ricerca del prof. Gasco.

Individuati i derivati 4-NO-pirazolici che avevano mostrato maggiore attività antifungina, abbiamo pensato di sostituire il gruppo nitroso con il gruppo *azossicianoamidico*, con lo scopo di ottenere nuove molecole ad attività antifungina e antibatterica potenziate rispetto ai corrispondenti 4-nitrosopirazoli e valutare le relazioni tra struttura e attività dei nuovi derivati.

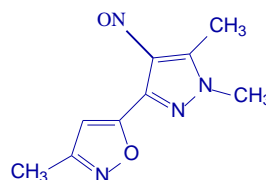
NO-derivati a maggiore attività antifungina:



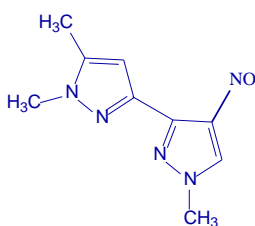
1b



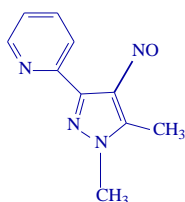
2b



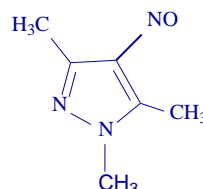
4b



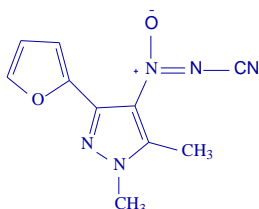
6b



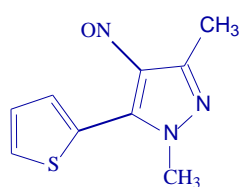
7b



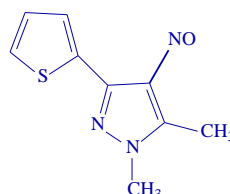
8b



11b



12b

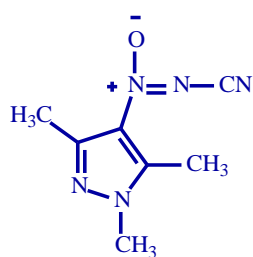


13b

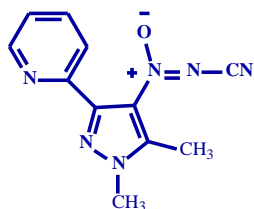
^a MIC($\mu\text{g/ml}$)				
Cpd	<i>C. albicans.</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.neoformans</i>
1b	1	0.5	inattivo	1
2b	1	1	1	0,5
4b	1	2	0.125	0,06
6b	2	8	32	0,5
7b	0.5	0,5	2	0,125
8b	1	0,5	2	0,5
11b	0,125	0,125	0,125	0,125
12b	$\leq 0,125$	0,25	1	$\leq 0,125$
13b	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	0,5	$\leq 0,125$
Amfotericina B	≤ 0.125	≥ 4	≤ 0.125	≤ 0.125
Fluconazolo	≤ 0.25	≥ 64	≤ 4	≤ 0.125

^aMIC: concentrazione minima di antimicotico in grado di inibire la crescita del ceppo saggiato

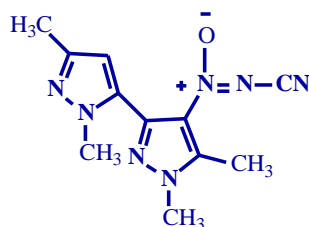
CN-NNO-derivati



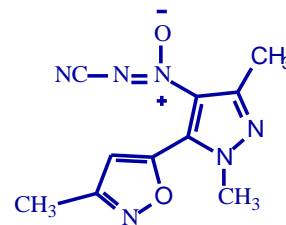
28



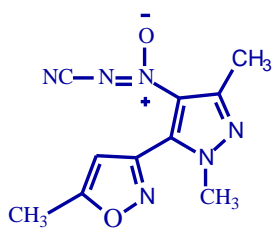
29



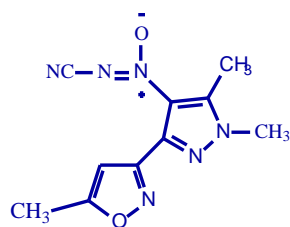
30



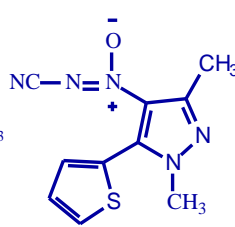
31



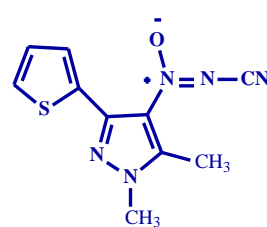
32



33



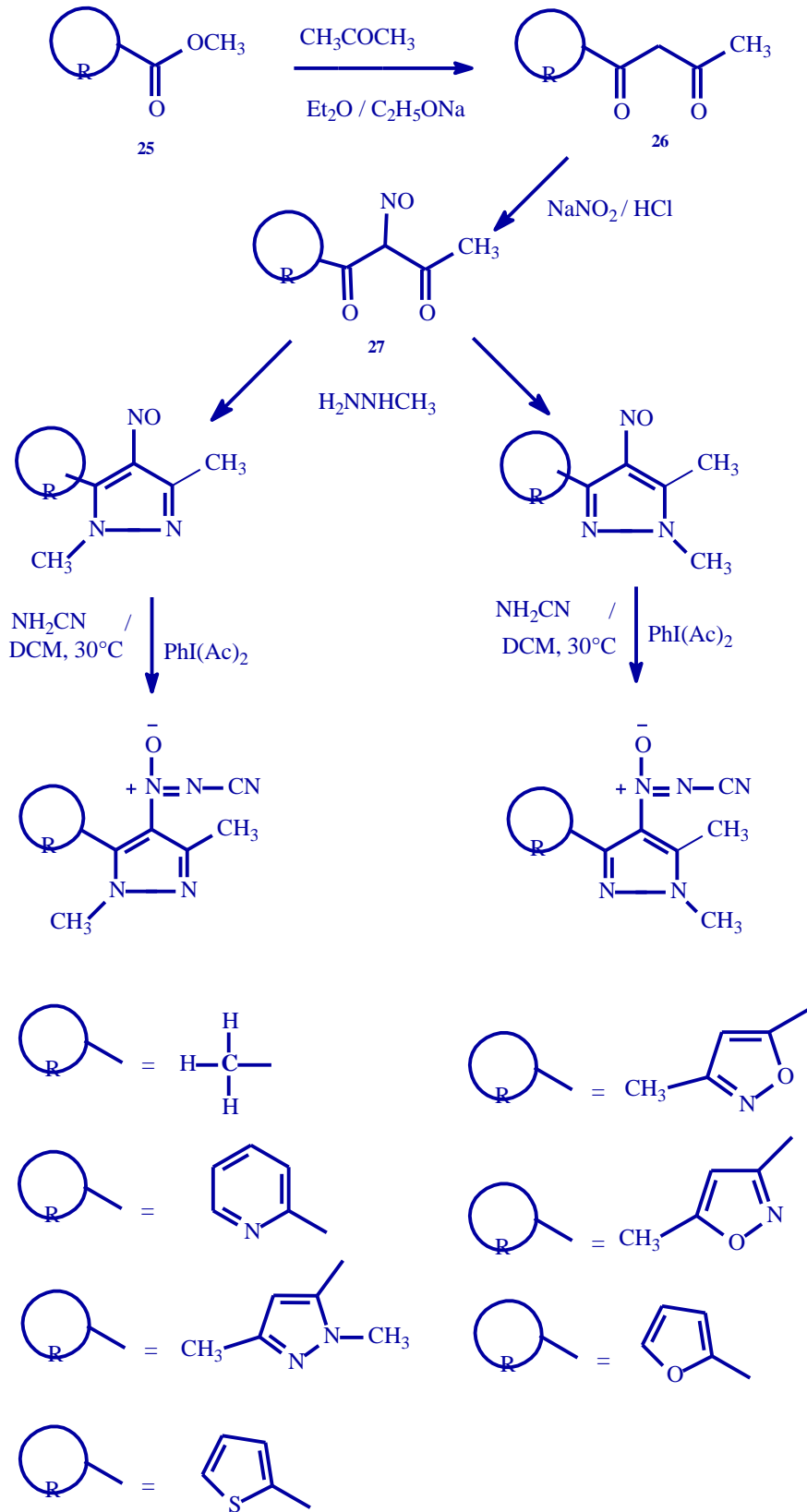
34



35

36

Schema di sintesi

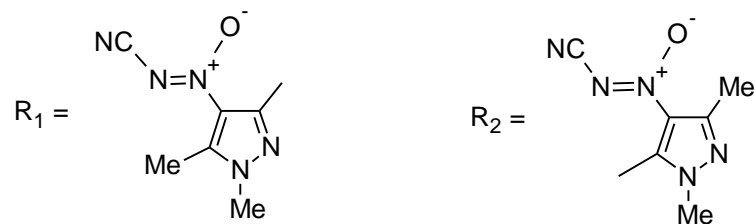


I composti così ottenuti sono stati saggiati in vitro per la loro attività antifungina e antibatterica.


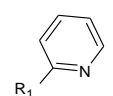
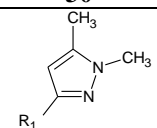
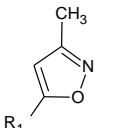
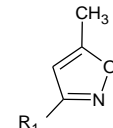
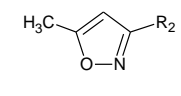
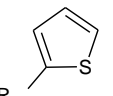
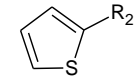
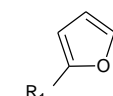
I dati di attività hanno mostrato in generale che i nuovi azzossiciano-derivati presentano una discreta attività antifungina anche se inferiore a quella dei corrispondenti NO-derivati.

Tra tutti i composti sintetizzati, i più attivi risultano essere anche in questo caso i composti aventi come sostituito in posizione 5 il tiofene e il furano.

In particolare i più attivi sono risultati il **34**, il **35** e il **36**, con valori di attività antifungina contro la *Candida Krusei* compresi tra 0,5 e 1 µg/mL e tra 0,25 e 0,5 µg/mL contro il *C. Neoformans*.



Attività antifungina in vitro (MIC, $\mu\text{g/mL}$)^a

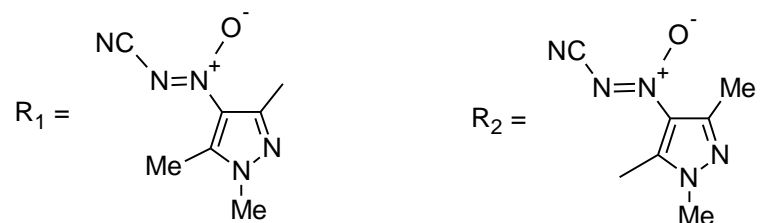
	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
											
	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	24h	48h	24h	48h
<i>C. alb.</i> 31	32	64	64	128	128	32	1	4	4	2	2
<i>C. alb.</i> 41	32	16	>128	64	128	32	0,5	1	2	1	1
<i>C. alb.</i> 47	32	128	>128	128	>128	128	1	2	4	2	4
<i>C. alb.</i> 48	32	128	>128	128	>128	128	1	4	4	2	4
<i>C. kr.</i> 31	32	16	>128	64	128	32	0,5	1	1	0,5	1
<i>C. kr.</i> 43	32	16	>128	32	64	32	1	1	1	1	2
<i>C. kr.</i> 48	32	8	>128	64	128	32	0,5	1	2	1	2
<i>C. tr.</i> 33	64	128	>128	128	>128	>128	8	16	32	64	128
<i>C. tr.</i> 11	128	128	>128	128	>128	128	8	16	32	32	32
<i>C. tr.</i> 15	64	128	>128	128	128	128	8	64	64	128	>128
<i>C. tr.</i> 22	64	128	>128	>128	>128	>128	16	32	32	64	128
<i>C. gl.</i> 30	64	64	>128	128	128	128	0,25	2	2	1	1
<i>C. gl.</i> 32	16	4	>128	32	64	16	0,25	2	2	1	2
<i>C. gl.</i> 46	64	64	>128	128	128	128	0,25	1	2	1	1
<i>C. gl.</i> 49	64	128	>128	128	128	64	0,25	2	2	1	1
<i>C. par.</i> 26	64	128	>128	128	128	128	8	8	16	4	8
<i>C. par.</i> 39	64	128	>128	128	128	128	8	8	16	4	16
<i>C. par.</i> 19	64	128	>128	128	128	>128	16	32	32	64	128
<i>Crypt. neof.</i> 14	32	16	16	2	4	8	2	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>Crypt. neof.</i> 27	32	16	16	2	4	8	2	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>Crypt. neof.</i> 30	32	8	16	2	8	8	2	0,5	0,5	0,25	0,25
<i>Crypt. neof.</i> 25	32	8	16	2	8	8	2	0,5	0,5	0,25	0,25
<i>C. alb.</i> ATCC	64	128	>128	128	128	128	8	2	4	1	1
<i>C. kr.</i> ATCC	16	16	>128	32	64	16	0,5	1	1	0,25	1
<i>C. par.</i> ATCC	32	128	>128	128	128	>128	16	16	32	32	32

^aThe experimental details are reported in ref Y. Abbreviations: *C. alb.* (*Candida albicans*), *C. gl.* (*C. glabrata*), *C. kr.* (*C. krusei*), *C. par.* (*C. parapsilosis*), *C. tr.* (*C. tropicalis*), *Crypt. neof.* (*Cryptococcus neoformans*)



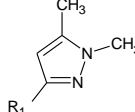
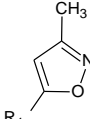
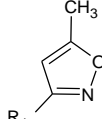
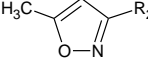
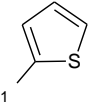
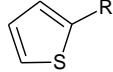
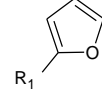
Per quanto riguarda l'attività antibatterica, i saggi sono stati effettuati su *Stapilococcus Aureus MS* (Meticillina Sensibile), *Stapilococcus Aureus MR* (Meticillina Resistente) , *Proteus mirabilise* ed *Escherichia Coli*. Di particolare interesse sono i dati di attività antibatterica degli azossiciano-derivati aventi in posizione 5 il tiofene, il 5-isossazolo e il furano i quali si sono mostrati attivi soprattutto nei confronti di *Staphylococcus aureus MR* (Meticillina Resistente) e *Staphylococcus aureus MS* (Meticillina Sensibile) .

In particolare, i composti **31**, **34**, 35 e 36 che hanno mostrato valori di attività compresi tra 2 e 8 µg/ml nei confronti di *Staphylococcus aureus MR*, rappresentano un importante risultato nel campo della ricerca di nuove molecole ad attività antibatterica.

Infatti, lo *S.aureus* negli anni ha sviluppato resistenza agli antibiotici più in uso condizionando le scelte terapeutiche.



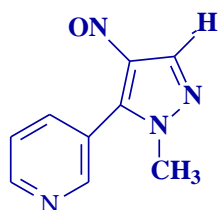
Attività antibatterica in vitro (*MIC*, $\mu\text{g/mL}$)^a

	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
											
	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	24h	48h	24h	48h
<i>Staph. aur. MR</i>	>128	32	32	2	8	>128	4	2	4	2	4
<i>Staph. aur. MS</i>	>128	64	32	4	16	>128	8	2	8	2	4
<i>Pr. mir.</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Esch. coli</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Ps. Aer.1</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Ps. Aer.2</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128

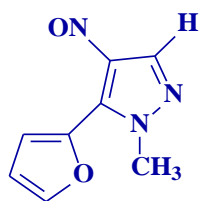
^aThe experimental details are reported in ref Y. Abbreviations: *Staph. aur.* (*Staphylococcus Aureus*), *Pr. mir.* (*Proteus mirabilis*), *Esch. coli* (*Escherichia Coli*)

Al fine di potenziare ulteriormente l'attività antibatterica dei derivati azossiciano, abbiamo selezionato i NO-derivati più attivi come antifungini della SERIE 20, 21 e 23 e anche a questi abbiamo sostituito il gruppo *nitroso* con il gruppo *azossicianoamidico*.

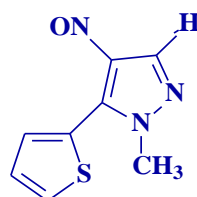
Per questi derivati si aspettano ancora i risultati dei saggi biologici .



20b

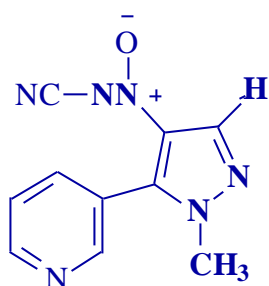


21b

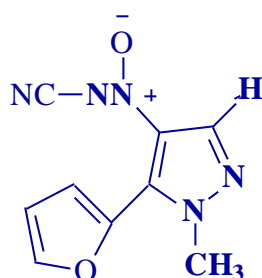


23b

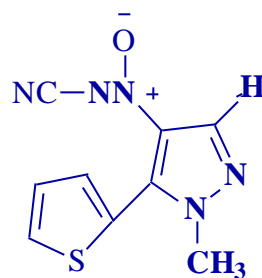
Composto	MIC μ g/ml			
	C.albicans	C.krusei	C.tropicalis	C.neoformans
20 b	8	0,5	4	$\leq 0,06$
21 b	0,25	0,25	1	$\leq 0,06$
23 b	0,25	0,25	0,25	$\leq 0,06$
Amfotericina B	$\leq 0,125$	≥ 4	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Fluconazolo	$\leq 0,25$	≥ 64	≤ 4	$\leq 0,125$



40

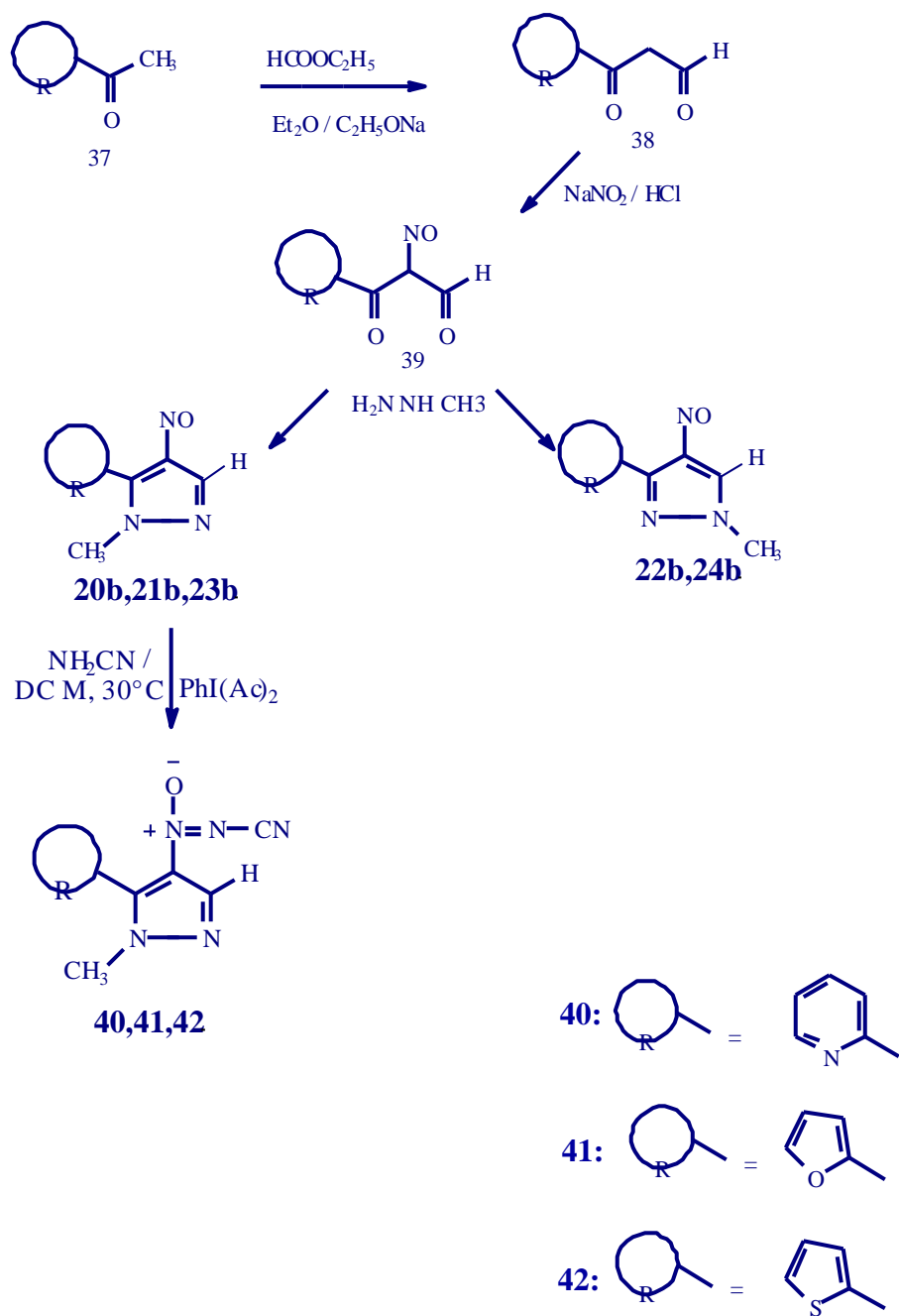


41



42

Schema di sintesi



Parte sperimentale

1-R-1,3-butandione (26)

Il composto è stato ottenuto apportando lievi modifiche al metodo riportato in letteratura [9].

Una soluzione eterea dell'estere metilico corrispondente (0,01 moli) in 50 ml di etere etilico anidro viene fatta percolare, goccia a goccia in una dispersione di 0,01 moli di etilato sodico in etere etilico anidro.

Finita la percolazione dell'estere, vengono addizionati analogamente 0,02 moli di acetone in 30 ml di etere etilico anidro.

A percolazione ultimata la sospensione di reazione viene messa a ricadere per circa un'ora.

Si ottiene un solido giallo intenso costituito dal sale sodico del dichetone. Le rese sono del 90%.

Per ottenere il **26**, il sale sodico del dichetone prima essiccato, viene sciolto in acqua e la soluzione acidificata con acido acetico fino a pH 5. La soluzione estratta con diclorometano, viene evaporata a pressione ridotta. Si ottiene un olio bruno costituito da 1-R-1,3 butandione (**26**).

1-R-2-nitroso-1,3-butandione (27)

Il composto è stato preparato in accordo alle procedure precedentemente riportate [9]

Una soluzione acquosa di **26** (0,01 moli) viene addizionata di una soluzione equimolecolare di idrossido di sodio e di nitrito di sodio (0,01 moli).

La soluzione così ottenuta viene acidificata con HCl 2N fino a pH 5 e lasciata ad agitare per circa 1 h. Si separa un precipitato giallo pallido costituito dal 1-R-2-nitroso-1,3-butandione.

1,3-dimetil-4-nitroso-5—R-pirazolo (1b,3b,8b,12b) e 1,5-dimetil-4-nitroso-3-R-pirazolo (2b,6b,7b,10b,11b)

Metodo generale di sintesi: ad una sospensione acquosa di **27** finemente polverizzato viene aggiunta, goccia a goccia e a temperatura ambiente, una quantità equimolare di metil-idrazina, sciolta o in pochi ml di acqua.

La miscela di reazione viene agitata (1-24 ore) fino a quando non si rileva più o quasi la presenza di prodotto di partenza (monitoraggio con TLC).

La reazione viene quindi estratta con diclorometano; gli estratti vengono quindi anidrificati, concentrati a pressione ridotta e cromato-grafati.

3-R-3oxo-propionaldeide (38)

Una soluzione eterea di 3 ml di 2-acetylpiridina (**37**) (0,027 moli) in 50 ml di etere etilico anidro viene fatta percolare, goccia a goccia, in una dispersione di 0,027 moli di etilato sodico in etere etilico anidro.

Terminata la percolazione viene addizionata una soluzione di formiato di etile (0,040 moli) in etere etilico anidro.

Precipita un solido giallo che diventa progressivamente più scuro fino all'arancione costituito dal sale sodico di **38**. La reazione viene lasciata sotto agitazione per 36 h fino a scomparsa del prodotto di partenza (monitoraggio con TLC).

Il precipitato viene filtrato sotto vuoto e lavato tre volte con 20 ml di etere etilico anidro.

Il sale sodico di **38**, acidificato lentamente con HCl 2N fino a pH 4 raffreddando in bagno di ghiaccio, lascia precipitare **38**. Un'ulteriore acidificazione comporta la completa dissoluzione del precipitato che viene estratto con CH₂Cl₂. Gli estratti, essiccati e concentrati, lasciano un residuo che cristallizza da etere di petrolio.

2-idrossimmino-3-oxo-3-R-propionaldeide (39)

Una soluzione di HCl 2 N viene fatta percolare su una miscela equimolare di sale sodico di **38** e NaNO₂ (0,013 moli).

La reazione viene mantenuta a 10° C sotto agitazione per circa un'ora e monitorata con TLC fino a scomparsa del prodotto di partenza.

Si ottiene una soluzione intensamente colorata di giallo che estratta con CH₂Cl₂, essiccata con Na₂SO₄ ed evaporata a pressione ridotta, fornisce un olio bruno costituito dal **39** che cromatografato su colonna di gel di silice da un residuo che cristallizza da etanolo.

1-metil-4-nitroso-5-R-1CH₃-pirazolo (20b-24b)

Alla soluzione acquosa di 1 g del sale sodico di **4** (0,006 moli) viene aggiunta una quantità equimolare di NaNO₂. Dopo un'ora viene aggiunta una quantità equimolare di NH₂NHCH₃ (0,006 moli) in 10 ml di acqua distillata mantenendo la temperatura a circa 10°C con un bagnetto di ghiaccio. La soluzione si colora intensamente di azzurro.

La reazione viene lasciata ad agitare per circa 30 min quindi viene estratta con etere etilico.

Si evapora il solvente a pressione ridotta e il residuo ottenuto viene cromatografato su colonna. Si ottiene così la separazione dei due isomeri. I composti così ottenuti vengono cristallizzati da etere di petrolio.

Procedura generale per la sintesi delle Azossicianidine (28-36, 40-42):

Una miscela di nitroso-derivato (3 mmol) e cianammide (3.6 mmol) in cloruro di metilene (5 ml) è stata trattata a 30 °C con diacetossi-iodobenzene (3.6 mmol) per 15 min.

La soluzione viene agitata per altri 15 minuti e successivamente lavata con acqua.

La fase organica, seccata su solfato di magnesio, viene tirata a secco e il residuo purificato mediante cromatografia flash (FC).

Per evaporazione del solvente si otterrà il derivato azossiciano puro.

4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,3,5-trimetil-1*H*-pirazolo (28)

2-[4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,5-dimetil-1*H*-pirazolo-3-il]piridine (29)

4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,1',5,5'-tetrametil-1*H*,1'*H*-3,3'-bipirazole (30)

5-[4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,5-dimetil-1*H*-pirazol-3-yl]-3-metil-1,2-ossazolo (31)

3-[4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,5-dimetil-1*H*-pirazolo-3-yl]-5-metil-1,2-ossazolo(32)

3-[4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo-5-yl]-5-metil-1,2-ossazolo (33)

4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,5-dimetil-3-(*R*-2-yl)-1*H*-pirazolo (34)

4-(ciano-*NNO*-azossi)-1,3-dimetil-5-(tiofene-2-yl)-1*H*-pirazolo(35)

4-(ciano-*NNO*-azossi)-3-(furano-2-yl)-1,5-dimetil-1*H*-pirazolo(36)

Dati NMR

Comp.	P.f.(°C)	Eluente (y)	Resa %	m/	Formula	I.R (cm ⁻¹)	DATI NMR (CDCl ₃) ¹ H NMR (ppm), 200 MHz ¹³ C NMR (ppm) 50.3 MHz
28	90-91	a	76	179	C ₇ H ₉ N ₅ O	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2200 (C≡N), 1416, 1348.)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 6.32 (s, 1H, 4-H), 3.95 (s, 3H, 1'-CH ₃), 2.69 (s, 3H, 5'-CH ₃), 2.50 (s, 3H, 5-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 169.9, 154.8, 140.8, 137.2, 127.8#, 110.5, 102.9, 38.0, 12.3, 12.2.
29	156-157	b	72	242	C ₁₁ H ₁₀ N ₆ O	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2195 (C≡N), 1443, 1354 (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 8.77 (d, ³ J = 4.8 Hz, 1H, 6-H), 7.88 (dt, ³ J _{4,3,5} = 7.8 Hz, ⁴ J _{4,6} = 1.8 Hz, 1H, 4-H), 7.53 (d, ³ J _{3,4} = 7.8 Hz, 1H, 3-H), 7.46 (ddd, ⁴ J _{5,3} = 1.1 Hz, ³ J _{5,6} = 4.8 Hz, ³ J _{5,4} = 7.2 Hz, 1H, 5-H), 3.77 (s, 3H, 1'-H), 2.58 (s, 3H, 5'-H) ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 150.1, 146.6, 145.6, 140.8, 136.8, 128.8*, 126.4, 124.8, 110.8, 38.3, 14.6.
30	151-152	c	90.5	259	C ₁₁ H ₁₃ N ₇ O	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2193 (C≡N), 1425, 1308 (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 6.50 (s, 1H, 4'-H), 3.92 (s, 3H, 1-CH ₃), 3.85 (s, 3H, 1'-CH ₃), 2.66 (s, 3H, 5-CH ₃), 2.32 (s, 3H, 5'-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 141.5, 140.2, 139.2, 127.2 *, 111.0, 107.4, 37.6, 36.5, 12.4, 11.3.
31	144-145	d	93	246	C ₁₀ H ₁₀ N ₆ O ₂	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2191 (C≡N), 1444, 1340 (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 6.77 (s, 1H, 4-H), 3.99 (s, 3H, 1'-CH ₃), 2.71 (s, 3H, 5'-CH ₃), 2.39 (s, 3H, 3-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 160.2, 159.6, 140.9, 135.4, 126.9 #, 110.4, 107.4, 38.1, 12.4, 11.5.
32	107-108	d	90	246	C ₁₀ H ₁₀ N ₆ O ₂	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2194 (C≡N), 1439, 1385 (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 6.32 (s, 1H, 4-H), 3.95 (s, 3H, 1'-CH ₃), 2.69 (s, 3H, 5'-CH ₃), 2.50 (s, 3H, 5-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 169.9, 154.8, 140.8, 137.2, 127.8#, 110.5, 102.9, 38.0, 12.3, 12.2.
33	153-154	e	84	246	C ₁₀ H ₁₀ N ₆ O ₂	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2196 (C≡N), 1429, 1327 (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 6.30 (s, 1H, 4-H), 3.90 (s, 3H, 1'-CH ₃), 2.58, 2.56 (2s, 6H, 5-CH ₃ and 3'-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 170.9, 152.1, 146.0, 131.8, 128.8#, 110.5, 103.9, 39.3, 14.6, 12.5.
34	131-132	f	85	247	C ₁₀ H ₉ N ₅ OS	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2195 (C≡N), 1460, 1326 (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 7.72 (dd, ³ J _{5,4'} = 3.7 Hz, ⁴ J _{5,3'} = 1.2 Hz, 1H, 5'-H), 7.43 (dd, ³ J _{3,4'} = 5.1 Hz, ⁴ J _{3,5'} = 1.2 Hz, 1H, 3'-H), 7.11 (dd, ³ J _{4,3'} = 5.1 Hz, ³ J _{4,5'} = 3.7 Hz, 1H, 4'-H), 3.90 (s, 3H, 1-CH ₃), 2.66 (s, 3H, 5-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 141.7, 140.7, 131.3, 129.8, 128.1, 127.5, 126.4 *, 110.8, 37.6, 12.6.
35	93-94	g	30	247	C ₁₀ H ₉ N ₅ OS	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): MANCA!!! (C≡N), (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 7.63 (d, J = 4.8 Hz, 1H, 5'-H), 7.21-7.18 (m, 2H, 3'-H and 4'-H), 3.75 (s, 3H, 1-CH ₃), 2.55 (s, 3H, 5-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 146.0, 136.1, 131.5, 130.3, 128.5#, 127.6, 125.4, 110.8, 38.1, 14.7.
36	156-157	h	14	231	C ₁₀ H ₉ N ₅ O ₂	(KBr DRIFT /cm ⁻¹): 2188 (C≡N), 1453, (N(O)=N)	¹ H NMR (CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm): 7.56 (d, ³ J _{5,4} = 0.9 Hz, 1H, 5'-H), 7.22 (d, ³ J = 3.6 Hz, 1H, 3'-H), 6.54 (dd, ³ J _{4,3} = 3.6 Hz, ³ J _{4,5} = 1.8 Hz, 1H, 4'-H), 3.95 (s, 3H, 1-CH ₃), 2.68 (s, 3H, 5-CH ₃). ¹³ C NMR (CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm): 144.05, 143.98, 140.5, 138.4, 126.1 #, 114.2, 111.7, 110.8, 37.9, 12.7.

a) CH₂Cl₂/EtOAc 9.75/0.25 b) Cl₂ H₂/EtOAc 8/2 c) Cl₂ H₂/EtOAc 5/5 d) Cl₂ H₂/Acetone 98/2

e) Cl₂H₂/Acetone 99/1 f) Petroleum Ether/EtOAc 7/3 g) Hexane/EtOAc 75/25 h) Cl₂ H₂/Acetone 99.75/0.25

SAGGI BIOLOGICI dei ciano-*NNO*-azossi-DERIVATI

Composti. I composti testati sono stati sciolti in DMSO ad una concentrazione iniziale di 200 μ M e successivamente opportunamente diluiti nel mezzo di coltura.

Cellule. Le linee cellulari provengono dall'American Type Culture Collection (ATCC); i ceppi batterici e fungini o sono stati isolati (ottenuti dalla Clinica Dermosilopatica dell'Università di Cagliari) o provengono dall'ATCC.

Le cellule H9/III_B, MT-4 e C8166 [cresciute in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale di vitello (FCS), 100 UI/mL di penicillina G e 100 μ g/mL di streptomicina] sono state usate per i saggi anti-HIV-1.

Le colture cellulari sono state periodicamente controllate per verificare l'assenza di contaminazione da micoplasma con un MycoTec Kit (Gibco).

Saggi antimicotici. I ceppi sono descritti nel documento M27-A dell'NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Prima dell'esecuzione del saggio, i ceppi di *C. albicans* ATCC 90029, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, sono stati subcoltivati su agar destrosio Sabouraud per costatarne vitalità e caratteristiche di crescita ottimali.

Tutti i lieviti sono stati mantenuti a -70°C .

Sospensione dell'inoculo:

I ceppi di *Candida* coltivati per una notte su agar destrosio Sabouraud a 37°C, sono stati sospesi in 5 ml di acqua bidistillata sterile e centrifugati per ottenere una sospensione omogenea.

La torbidità (letta ad una lunghezza d'onda di 530 nm), è stata sottoposta a 0,05 Mc Farland (1 Mc per *Cryptococcus neoformans* coltivato per due notti su agar destrosio Sabouraud).

Queste sospensioni (approssimativamente $1-5 \times 10^6$ CFU/ml) sono state utilizzate per il test di sensibilità dopo opportuna diluizione secondo il protocollo standardizzato.

Metodo di microdiluizione in brodo:

Il saggio è stato effettuato secondo le raccomandazioni contenute nel protocollo M27-A dell'NCCLS (NCCLS, 1997).

Schematicamente in piastre microtiter da PG pozzetti (otto file da 12) sono stati distribuiti 100 μ l (per pozzetto) di RPMI 1640 contenente glucosio al 2% e tamponato fino al raggiungimento di pH 7,0 con HOPS (acido morfolinpropansulfonico) 0,165M.

Una fila delle piastre conteneva soltanto il terreno, sia per il controllo di sterilità del terreno sia per il controllo di crescita del lievito da saggiare.

I pozzetti dalla fila A alla H contenevano il farmaco a concentrazioni comprese fra 0,06 μ g/ml a 128 μ g/ml.

Su ogni piastra è stato saggiato un ceppo.

Per ciascun lievito la sospensione d'inoculo (0,5 Mc Farland in acqua bidistillata sterile e 1 McF per *C.neoformans*) è stata diluita due volte con terreno RPMI 1640 (1:50 e successivamente 1:20) e 100 μ l della seconda diluizione sono stati posti in pozzetti contenenti le varie concentrazioni di farmaci e in quelli contenenti soltanto il terreno per il controllo di crescita.

Le piastre sono state incubate a 37°C.

Dopo opportuna incubazione, la lettura è stata effettuata visivamente e il valore di MIC è stato riferito alla concentrazione minima di crescita visibile del ceppo saggiato.

SAGGI BIOLOGICI

Il lievito isolati utilizzati in questo studio sono stati raccolti da campioni umani sterili clinici. Per inoculo e dopo la crescita durante la notte su Sabouraud Destrosio Agar a 35 ° C, ogni lievito isolato è stato sospeso in 5 ml di acqua distillata sterile e completamente miscelati per ottenere una sospensione omogenea.

La torbidità (lettura alla lunghezza d'onda di 530 nm) è stato adeguato a uno standard di 0,5 McFarland con l'acqua. Questa sospensione (circa 1-5 x 10⁶ UFC / ml) è stata utilizzata per i test di sensibilità.

L'antibiogramma per gli antifungini è stata eseguita con un metodo di micro diluizione in brodo in “*microtiter*” con novantasei pozzi. Ogni pozzo contiene una singola molecola sciolta in DMSO e diluiti in RPMI 1640 tamponato con MOPS 0,165 M e aggiunte di 2% di glucosio. Ogni riga contiene dieci concentrazioni scalari del farmaco che vanno da 0,25 mg/L a 256 mg/L. Per ogni isolato, la sospensione di inoculo è stato diluito due volte con RPMI 1640 (1:100 e quindi 1:20). Le aliquote (0,1 mL) delle ultime diluizioni sono state poi collocate in 11 pozzi di una singola riga (10 pozzetti contenenti la droga, l'11° utilizzato per la crescita di controllo e il 12 ° per il bianco). Le piastre sono state incubate a 35 ° C.

Una lettura visiva iniziale è stata effettuata dopo 24 h di incubazione e la più bassa concentrazione che aveva inibito la crescita visibile è stata registrata come il MIC. Dopo 48 ore di incubazione, i pannelli sono stati analizzati spettrofotometricamente (dopo agitazione) e il MIC è stato registrato come la concentrazione che ha prodotto una riduzione del 50% in torbidità rispetto a quello del controllo della crescita.

I tre ceppi di controllo di qualità che sono stati inclusi sono: *C. krusei* ATCC ® 6.258, *C. parapsilosis* ATCC ® 22.019, *C. albicans* ATCC ® 90.028.

Conclusioni

Il mio lavoro di tesi ha riguardato in una prima fase la sintesi di numerosi derivati 4-NO-pirazolici e la valutazione della loro attività antifungina.

I relativi studi SAR hanno consentito di individuare e sintetizzare nuovi derivati 4-NO-pirazolici ad elevata attività antimicotica.

Gli ottimi risultati ottenuti sui derivati 4-nitrosopirazolici ci hanno invogliato ad estendere le nostre ricerche su derivati che potessero mostrare anche attività antibatterica.

Lo sviluppo delle ricerche è stato suggerito dalle attività antifungine e antibatteriche possedute dall'Acido Calvatico e da i suoi derivati.

Pertanto in collaborazione con i ricercatori della facoltà di Farmacia dell'Università degli Studi di Torino e considerato che derivati azossiciano dell'acido calvatico ad attività antibatterica prevedevano, per la loro sintesi, l'utilizzazione di NO-derivati, è stata operata una selezione dei 4-NO-pirazoli precedentemente sintetizzati e che avevano mostrato una peculiare attività antifungina, e di questi sono stati sintetizzati i corrispondenti azossiciano-derivati.

I composti così ottenuti sono stati saggiati in vitro per la loro attività antifungina e antibatterica.

I dati di attività hanno mostrato in generale che i nuovi azzossiciano-derivati presentano una discreta attività antifungina anche se inferiore a quella dei corrispondenti NO-derivati.

Tra tutti i composti sintetizzati, i più attivi risultano essere anche in questo caso i composti aventi come sostituente in posizione 5 il tiofene e il furano.

In particolare i più attivi sono risultati il **34**, il **35** e il **36**, con valori di attività antifungina contro la *Candida Krusei* compresi tra 0,5 e 1 µg/mL e compresi tra 0,25 e 0,5 µg/mL contro il *C. Neoformans*.

Per quanto riguarda l'attività antibatterica, i saggi sono stati effettuati su *Staphylococcus Aureus MS* (Meticillina Sensibile), *Staphylococcus Aureus MR* (Meticillina Resistente) , *Proteus mirabilise* ed *Escherichia Coli*. Di particolare interesse sono i dati di attività antibatterica degli azossiciano-derivati aventi in posizione 5 il tiofene, il 5-isossazolo e il furano i quali si sono mostrati attivi soprattutto nei confronti di *Staphylococcus aureus MR* (Meticillina Resistente) e *Staphylococcus aureus MS* (Meticillina Sensibile) .

In particolare, i composti **31**, **34**, **35** e **36** che hanno mostrato valori di attività compresi tra 2 e 8 µg/ml nei confronti di *Staphylococcus aureus MR*, rappresentano un importante risultato nel campo della ricerca di nuove molecole ad attività antibatterica.

Bibliografia

- [1] Marangoni E, Guanziroli A, Perduca M, Filice G. *Prevalenza di infezioni micotiche in pazienti ospedalizzati*. B.M.L. 15 (2), 7-10; **1995**
- [2] J.H. Rex, T.J. Walsh, E.A. Anaissie. *Fungal infections in iatrogenically compromised hosts*. Adv. Intern. Med. 43:321-371; **1998**
- [3] A. S. Orozco, L. M. Higginbotham, C. A. Hitchcock, T. Parkinson, D. Falconer, A.S. Ibrahim, M.A. Ghannoum and S.G. Filler. *Mechanism of Fluconazole Resistance in Candida krusei*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, October **1998**, 2645-2649, Vol 42, No 10
- [4] Ruhnke M. *Voriconazole- application and perspectives*. Mycoses. **2002**;45 Suppl 3; 42-7 Review.German
- [5] K. Pettengell , J. Mynhardt, T. Kluyts, P. Soni. *A multicenter study to determine the minimal effective dose of FK463 for the treatment of esophageal candidiasis in HIV-positive patients*. 39th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy, *Abstr.* No. 1421. **1999**
- [6] Cornely OA, Schmitz K, Aisenbrey S. *The first echinocandin: caspofungin*. Mycoses. **2002**; 45 Suppl 3:56-60. Review
- [7] James, M. Ryan and P. Kovacic *Mechanism of antibacterial action: Electron transfer and oxy radicals*. Journal of free Radicals in Biology & Medicine **1996**, Volume 2, 377-391
- [8] Simone Reuter, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, Bharat B. Aggarwal: *Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?* Free Radical Biology & Medicine **2010**, 49 1603–1616]
- [9] Aiello E., *J. Heterocycl. Chem.* **1971**, 8, 1035

[10] Aiello, E.; Mingoia, F.; Bacchi, A.; Pelizzi, G.; Musiu, C.; Pani, A.; La Colla, P.; Marongiu, M.E.; Italian-Hungarian-Polish Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Taormina, September 28-October 1, **1999**

[11] Aiello E.; Invidiata, F.P.; Simoni, D.; Mingoia, F.; Moscato, B.; Bacchi, A.; Musiu, C.; Pani, A.; La Colla, P.; Marongiu, M.E.; Italian-Hungarian-Polish Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Taormina, September 28-October 1, **1999**

[12] Aiello, E.; Aiello, S.; Mingoia, F.; Bacchi, A.; Pelizzi, G.; Musiu, C.; Setzu, M.G.; Pani, A.; La Colla, P.; Marongiu, M.E.; Bioorg.Med.Chem. **2000**, 8,1692

[13] Aiello E, Aiello S.,Invidiata F.P., XVI Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica. Società Chimica Italiana, Sorrento, 18-22 settembre **2002**

[14] Freeman, W. A.; and Slack, R. U.S. Patent 2,751,395, 1956; Chem. Abstr. **1957** , 51, 2054a

[15] Freeman, W. A.; Pain, D. L.; Slack, R. U.S Patent 2,827,415, 1958; Chem Abstr. **1958**, 52, 14957h

[16] Freeman, W. A.; Pain, D. L.; Chelsea, R. U.S. Patent 2,831,866, 1958; Chem. Abstr. **1958** , 52, 15595g

[17] O'Callaghan, C. N.; Twomey, D. Proc. Roy. Irish Acad. ,Sect B. **1965**, 64, 187

[18] Mauer, F.; Riebel, H. J.; Paulus, W.; Genth, H. Ger. Offen. DE 3030192 A1 19800809 Application: DE: 80-3030192 19800809, 1982; Chem. Abstr. **1982**, 96, 199682j

- [19] Hagiwara, K.; Suzuki, H.; Sano, C.; Yamanaka, H.; Matsuda, M.; Mitsui, J. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 08,193,067 [96,193,067], 1996; Chem. Abstr. **1996**, 125, 247808a
- [20] Beck, J. R.; Gajewski, R. P.; Hackler, R. F. Ger. (East) DD 210, 265, 1984; Chem. Abstr. **1985**, 102, 220868d
- [21] Morimoto, H.; Ishibuchi, M.; Fukunari, A.; Inoue, H.; Naka, Y. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP.10 310,578 [98 310,578], 1998; Chem. Abstr. **1999**, 130, 52414k
- [22] Gasco, A.; A. Serafino, V. Mortarini, E. Menziani, M. A. Bianco & J. C. Scurti: *An antibacterial and antifungal compound from Calvatia lilacina*. Tetrahedron Lett. 1974: 3431- 3432, **1974**
- [23] Umezawa, H.; T. Takeuchi, H. Iinuma, M. Ito, M. Ishizuka, Y. Kurakata, Y. Umeda, Y. Nakanishi, T. Nakamura, A. Obayashi & O. Tanabe: *A new antibiotic, calvatic acid*. J. Antibiotics 28: 87-90, **1975**
- [24] R. Calvino, R. Fruttero e A. Gasco A. Miglietta e L. Gabriel *Chemical and biological studies on calvatic acid and its analogs* The Journal of antibiotics. (Tokyo) 39 (**1986**) 864
- [25] Fruttero, R.; G. Mulatero, R. Calvino & Gasco: *A directed synthesis of alkyl, aryl and heteroaryl-ONN-azoxycyanides*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1984: 323 - 324, 1984 and references therein reported
- [26] Werner Simon, Huffelsheim, Germany. *Biocidal compounds their preparation and use*. **1998** PATENT NUMBER 5,795,878
- [27] Francine Santos de Paula, Alessandra G. Cioletti, Jorge F. da Silva Filho, Antonio Euzébio G. Santana, Aldenir F. dos Santos, Marília O.F. Goulart, Maura Vallaro, Roberta Fruttero: *Electrochemical studies of biologically active arylazoxy compounds. The relationship between redox potentials and molluscicidal activities*. Journal of Electroanalytical Chemistry 544 (**2003**) 25-34

[28] Miglietta A, Gadoni E, Buffa M, Olivero A, Gabriel L. *Interactions between calvatic acid and related compounds with rat liver microsomes*. Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale, University of Torino, Italy. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. **1995** Oct-Dec;20(4):249-54