

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچ مشتقات جدید پیرازولو[۳و۴-d]پیریمیدین

محمدرضا مقدم‌منش^۱، سارا حسین‌زادگان^۲، حمید بیضائی^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۲/۰۲

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: ترکیبات هتروسیکلی در طبیعت به فراوانی یافت می‌شوند، این ترکیبات دارای خاصیت‌های بیولوژیکی بسیاری می‌باشند و بسیاری از داروها نیز دارای یک یا چند حلقه هتروسیکلی می‌باشند. در این تحقیق خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچ هفت ترکیب هتروسیکلی پیرازولو[۳و۴-d]پیریمیدین جدید که در ایران سنتز شده و خواص ضد باکتریایی خوبی آن‌ها نیز گزارش شده است مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار: بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) مورد ارزیابی قرار گرفته و بررسی خاصیت ضدقارچی با استفاده از استاندارد CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) و بر مبنای قطر هاله، حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی مورد ارزیابی قرار گرفته و آزمون با داروهای ضدقارچی موجود از جمله کتوکونازول و نیستاتین و تولنافتات انجام گرفته و نتایج بررسی مشتقات سنتز شده با داروها مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: غلظت‌های ۰.۲۵، ۰.۵۰، ۰.۷۵ و ۱.۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از مشتقات در متانول تهیه و پس از انجام آزمون آنتی‌اکسیدانی با DPPH درصد مهار آن‌ها گزارش و علاوه بر این IC₅₀ برای هر ترکیب محاسبه و در نهایت آزمون برای آسکوربیک اسید انجام و نتایج مورد مقایسه قرار گرفت، در بررسی فعالیت ضدقارچ، پس از تهیه غلظت مشخص از مشتقات نتایج قطر هاله و حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی آن‌ها نیز گزارش و آزمون‌های مذکور برای داروهای کتوکونازول و نیستاتین و تولنافتات صورت گرفته و مورد مقایسه گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص گردید که ترکیبات جدید سنتزی پیرازولو[۳و۴-d]پیریمیدین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده علاوه بر این ترکیبات دارای خاصیت ضدقارچ قوی بوده حتی برخی مشتقات نتایج و اثرگذاری بهتری از داروهای ضدقارچی تجاری دارند.

کلیدواژه‌ها: فعالیت ضد اکسیدانی، فعالیت ضدقارچ، ترکیبات هتروسیکلی جدید، پیرازولو[۳و۴-d]پیریمیدین

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره سوم، صص ۱۷۳-۱۶۳، خرداد ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: زاهدان، اداره کل استاندارد سیستان و بلوچستان، تلفن: ۰۵۴۳۲۲۴۱۳۵۰

Email: Mrm.manesh@gmail.com

مقدمه

سلول متلاشی می‌شود (۴-۵). همچنین این ترکیبات مهم‌ترین عامل اکسید مواد غذایی و از بین رفتن ارزش غذایی آن‌ها از طریق از بین بردن ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری می‌باشند، در نهایت رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد ترکیبات سمی و منجر به بیماری‌های التهابی، دیابت، ایست‌های قلبی و مغزی، سرطان، نقص ایمنی و پیری در بدن انسان‌ها می‌شود (۶-۱۰).

قارچ‌ها دارای گونه‌های متفاوتی بوده و باعث ایجاد بیمارهای مختلفی در انسان‌ها می‌شود (۱۱). همچنین این میکروارگانیسم‌ها

رادیکال‌های آزاد ترکیباتی هستند که دارای الکترون جفت نشده‌اند (۱). این ترکیبات می‌توانند باعث تغییرات مولکولی و جهش ژنی در بعضی موجودات زنده شوند (۲). این تغییرات می‌تواند شامل فرآیند اکسیداسون باشد. مولکول‌های مورد اثر توسط رادیکال‌های آزاد شامل پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه آزاد، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها می‌باشد (۳). به‌عنوان مثال رادیکال‌های آزاد سبب اکسیداسیون لیپید غشاء سلولی شده و در نتیجه آن غشا ناپایدار و

^۱ دانشجوی دکتری شیمی آلی، اداره کل استاندارد استان سیستان و بلوچستان، سازمان ملی استاندارد، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ دانشجوی دکتری شیمی آلی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ایران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

^۳ دانشجوی دکتری شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

^۴ دانشیار، شیمی آلی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

ضمن سنتز مشتقات جدید پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین فعالیت آنتی-اکسیدانی آن‌ها را روی اکسیدان‌های معروف از جمله نیتریک اکسید، هیدروژن پراکسید و ... مورد بررسی قرار داده و نتایج مفیدی گزارش کردند (۲۸). در سال ۲۰۱۲ Saundane Anand و Raghunath ترکیبات سنتزی پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین خود را بر روی چندگونه قارچی مورد ارزیابی قرار داده و نتایج به دست آمده را برحسب قطر هاله گزارش کردند (۲۹).

با توجه به گزارشات ارائه شده در مورد خواص بیولوژیکی پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین، سنتز و بررسی فعالیت‌های بیولوژیکی این ترکیبات مهم و حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق به بررسی فعالیت‌های آنتی-اکسیدان و ضدقارچ هفت مشتق جدید پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین می‌پردازیم که در ایران (دانشگاه زابل) سنتز شده و دارای خاصیت ضدباکتریایی قوی نیز می‌باشد (۲۴). بررسی خاصیت آنتی-اکسیدانی این ترکیبات با استفاده از روش DPPH صورت گرفته و فعالیت ضدقارچی این ترکیبات برحسب قطر هاله، حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی گزارش شده است.

مواد و روش کار

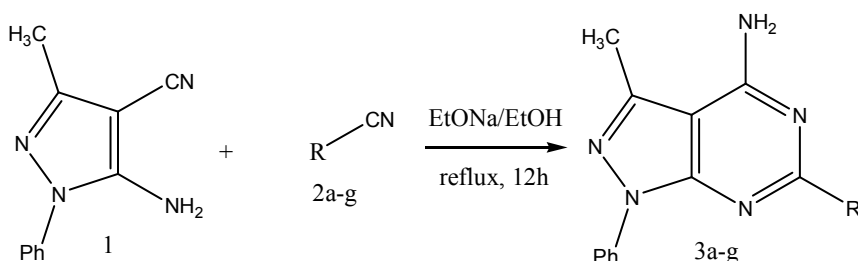
کلیه حلال‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک و سیگما آلد ریچ تهیه گردید.

ترکیبات سنتزی جدید پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین (3a-g) از واکنش ۵-آمینو-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازول کربونیتریل (1) با مشتقات نیتریل (2a-g) در حضور سدیم اتوکسید به عنوان کاتالیزور تحت شرایط رفلکس به مدت ۱۲-۸ ساعت تهیه شد (شکل ۱). ماده اولیه آمینو-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازول کربونیتریل از واکنش تری اتیل اورتواسات، مالونونیتریل و فنیل هیدرازین در حضور استیک اسید به عنوان کاتالیزور تحت شرایط رفلکس به مدت ۱۲ ساعت تهیه شد (۲۴).

در فساد مواد غذایی به خصوص مواد غذایی انباری با رشد بر روی آن‌ها بسیار دخیل می‌باشند (۱۲). کاندیدا آلبیکنس مخمری است که به صورت همزیست در دستگاه تناسلی و دستگاه گوارش به عنوان عنوان فلور نرمال می‌باشد و در حالت طبیعی بیماری خاصی ایجاد نمی‌کند (۱۳) ولی یک مخمر بیماری‌زا فرصت طلب است (۱۴). در صورت به هم خوردن تعادل محیط زیست بدن این قارچ به صورت بی‌رویه رشد کرده و سبب عفونت‌های شدید مخاطی، عفونت واژن و برفک دهان می‌شود و باعث عفونت‌های منتشره و کشنده هم می‌گردد (۱۵ و ۱۶). در بیماران آلوده به ویروس HIV، کاندیدایزیس دهانی (اوروفارنژیتال کاندیدایزیس) به عنوان اولین نشانه بیماری در مرحله ایدزی مطرح می‌باشد (۱۷).

آسپرژیلوس فومیگاتوس به عنوان یک قارچ ساپروفیت محیطی می‌باشد که در شرایط محیطی مختلف می‌تواند زنده بماند و به راحتی توسط استنشاق وارد بدن شود (۱۸ و ۱۹). این مخمر در افراد با سیستم ایمنی سالم توسط سیستم‌های دفاعی ریوی از بین رفته و ایجاد بیماری نمی‌کند اما افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند این قارچ می‌تواند باعث بیماری‌های حاد ریوی شود (۲۰).

پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین با دارا بودن هسته پورینی جزء مهم‌ترین ترکیبات هتروسیکلیک اتصال یافته و در ترکیبات طبیعی نیز یافت می‌شود (۲۱). مشتقات زیادی از این ترکیبات سنتز شده است که دارای خاصیت‌های بیولوژیکی نظیر خاصیت ضدسرطان (۲۲)، ضدالتهاب و درد (۲۳)، آنتی باکتریال و ... می‌باشد (۲۴). علاوه بر خواص بیولوژیکی ذکر شده بررسی‌های ضدقارچ و آنتی-اکسیدانی نیز روی این ترکیبات صورت گرفته و نتایج خوب و مؤثری از این ترکیبات به عنوان آنتی-اکسیدان و ضدقارچ مؤثر نیز گزارش شده است (۲۵ و ۲۶). Metwally و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشتقاتی از پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین با خاصیت آنتی-اکسیدانی قوی سنتز کردند (۲۷). Nan Wu و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱



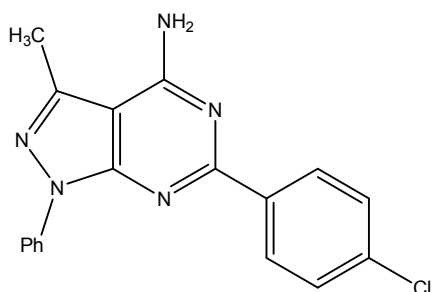
3a, R = CH₃; 3b, R = C₆H₅; 3c, R = 4-CH₃-C₆H₄; 3d, R = 4-BrC₆H₄;
3e, R = 4-NO₂-C₆H₄; 3f, R = 4-Cl-C₆H₄; 3g, R = 2,4-Cl-C₆H₃

شکل (۱): روش سنتز مشتقات پیرازولو[۳-۴d]پیریمیدین

ساختار ترکیبات سنتزی توسط طیف‌سنجی‌های IR، $^1\text{H NMR}$ ، $^{13}\text{C NMR}$ و تجزیه عنصری تأیید گردید.

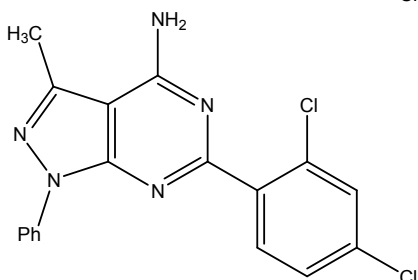
جدول (۱): نام و ساختار مشتقات جدید پیرازولو [d-۴و۳] پیریمیدین مورد بررسی

شماره ترکیب	نام ترکیب	ساختار
3a	۳-۶-دی‌متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو [d-۴و۳] پیریمیدین-۴-آمین	
3b	۳-متیل-۱-و-۶-دی‌فنیل-۱H-پیرازولو [d-۴و۳] پیریمیدین-۴-آمین	
3c	۳-متیل-۱-فنیل-۶-p-تولیل-۱H-پیرازولو [d-۴و۳] پیریمیدین-۴-آمین	
3d	۶-(۴-برموفنیل)-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو [d-۴و۳] پیریمیدین-۴-آمین	
3e	۳-متیل-۶-(۴-نیتروفنیل)-۱-فنیل-۱H-پیرازولو [d-۴و۳] پیریمیدین-۴-آمین	



۳f-۶-(۴-کلروفنیل)-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو[۳،۴-d]پیریمیدین-۴-آمین

3f



۳g-۶-(۲-دی‌کلروفنیل)-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو[۳،۴-d]پیریمیدین-۴-آمین

3g

داده‌های طیفی و ساختاری ترکیبات:

۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو[۳،۴-d]پیریمیدین-۴-آمین (3a)

¹H NMR, δ : 2.37 (s, 3H, Me pyrimidine), 2.50 (s, 3H, Me pyrazole), 7.32 (t, 2H, J = 7.4 Hz, NH₂), 7.52 (t, 3H, J = 7.7 Hz, Ar), 8.07 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar). ¹³C NMR, δ : 13.89, 22.80, 98.91, 120.63, 125.79, 129.47, 139.26, 143.11, 154.10, 160.43, 166.10. IR (m/cm-1): 3494 (NH₂), 1676 (C=N). Anal. Calcd. for C₁₃H₁₃N₅ (%): C, 65.25; H, 5.48; N, 29.27. Found (%): C, 65.17; H, 5.49; N, 29.34.

۳-متیل-۱-و-۶-دی‌فنیل-۱H-پیرازولو[۳،۴-d]پیریمیدین-۴-آمین (3b)

¹H NMR, δ : 2.67 (s, 3H, Me), 7.32 (t, 2H, J = 7.3 Hz, NH₂), 7.52 (m, 3H, Ar), 7.58 (t, 3H, J = 7.7 Hz, 3-H, Ar), 8.32 (d, 2H, J = 7.9 Hz, Ar), 8.45 (m, 2H, Ar). ¹³C NMR, δ : 15.00, 99.63, 120.61, 125.90, 128.56, 128.80, 129.61, 130.88, 138.39, 139.62, 143.39, 155.94, 158.97, 162.12. IR (m/cm-1): 3497, 3312 (NH₂), 1650 (C=N). Anal. Calcd. for C₁₈H₁₅N₅ (%): C, 71.74; H, 5.02; N, 23.24. Found (%): C, 71.64; H, 5.04; N, 23.32.

۳-متیل-۱-فنیل-۶-پ-تولیل-۱H-پیرازولو[۳،۴-d]پیریمیدین-۴-آمین (3c)

¹H NMR, δ : 2.40 (s, 3H, Me benzene), 2.66 (s, 3H, Me pyrazole), 7.31 (t, 2H, J = 8.2 Hz, NH₂), 7.34 (d, 2H, J = 8.1 Hz, 2 H), 7.58 (t, 3H, J = 7.7 Hz, 30-H, Ar), 8.31 (d, 2H, J = 7.9 Hz, Ar), 8.34 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar). ¹³C NMR, δ : 14.99, 21.52, 99.53, 120.58, 125.85, 128.56, 129.41, 129.61, 135.71, 139.65, 140.58, 143.35, 156.00, 158.99, 162.20. IR (m/cm-1): 3497, 3313 (NH₂), 1655 (C=N). Anal. Calcd. for C₁₉H₁₇N₅ (%): C, 72.36; H, 5.43; N, 22.21. Found (%): C, 72.27; H, 5.46; N, 22.27.

۶-(۴-بروموفنیل)-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو[۳،۴-d]پیریمیدین-۴-آمین (3d)

¹H NMR, δ : 2.66 (s, 3H, Me), 7.33 (t, 2H, J = 7.4 Hz, NH₂), 7.57 (t, 3H, J = 7.6 Hz, Ar), 7.73 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar), 8.27 (d, 2H, J = 7.7 Hz, Ar), 8.37 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar). ¹³C NMR, δ : 14.97, 99.68, 120.72, 124.63, 125.99, 129.61, 130.51, 131.81, 137.62, 139.51, 143.42, 155.76, 158.96, 161.15. IR (m/cm-1): 3497, 3318 (NH₂), 1653 (C=N). Anal. Calcd. for C₁₈H₁₄BrN₅ (%): C, 56.86; H, 3.71; N, 18.42; Br, 21.01. Found (%): C, 56.91; H, 3.77; N, 18.38; Br, 20.94.

۳-متیل-۶-(۴-نیتروفنیل)-۱-فنیل-۱H-پیرازولو[۳،۴-d]پیریمیدین-۴-آمین (3e)

$^1\text{H NMR}$, δ : 2.68 (s, 3H, Me), 7.55–7.62 (m, 3H, Ar), 7.60 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, NH_2), 8.05 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz Ar), 8.10–8.14 (m, 2H, Ar), 8.35 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ar). $^{13}\text{C NMR}$, δ : 14.98, 9,9.80, 120.77, 125.86, 129.68, 133.69, 135.36, 139.46, 140.44, 143.47, 149.58, 153.75, 159.06, 167.43. IR (m/cm-1): 3373, 3178 (NH_2), 1657 (C=N). Anal Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_2$ (%): C, 62.42; H, 4.07; N, 24.27; O, 9.24. Found (%): C, 62.37; H, 4.01; N, 24.21; O, 9.32.

۶- (۴-کلروفنیل)-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو[۳-۴-d]پیریمیدین-۴-آمین (3f)

$^1\text{H NMR}$, δ : 2.66 (s, 3H, Me), 7.33 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, NH_2), 7.56–7.62 (m, 5H, Ar), 8.27–8.29 (m, 2H, Ar), 8.42–8.45 (m, 2H, Ar). $^{13}\text{C NMR}$, δ : 14.97, 99.64, 120.71, 126.01, 128.90, 129.62, 130.24, 135.68, 137.24, 139.51, 143.42, 155.76, 158.96, 161.04. IR (m/cm-1): 3497, 3311 (NH_2), 1650 (C=N). Anal Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClN}_5$ (%): C, 64.38; H, 4.20; N, 20.86; Cl, 10.56. Found (%): C, 64.32; H, 4.13; N, 20.90; Cl, 10.65

۶- (۲-دی کلروفنیل)-۳-متیل-۱-فنیل-۱H-پیرازولو[۳-۴-d]پیریمیدین-۴-آمین (3g)

$^1\text{H NMR}$, δ : 2.68 (s, 3H, Me), 7.29 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, NH_2), 7.49–7.57 (m, 4H, 30-H, Ar), 7.74–7.79 (m, 2H, Ar), 8.21 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, Ar). $^{13}\text{C NMR}$, δ : 14.97, 99.39, 120.70, 126.11, 127.62, 129.55, 129.95, 133.04, 133.20, 134.40, 137.97, 139.31, 143.47, 154.98, 158.95, 162.08. IR (m/cm-1): 3491, 3308 (NH_2), 1647 (C=N). Anal Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_5$ (%): C, 58.39; H, 3.54; N, 18.92; Cl, 19.15. Found (%): C, 58.32; H, 3.62; N, 20.90; Cl, 18.84.

بررسی اثرات ضدقارچ:

اثرات ضدقارچ ترکیبات سنتزی بر اساس روش بیضائی و همکاران که مطرح گردیده بر طبق استاندارد CLSI صورت گرفته، مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۲).

سویه‌های مورد مطالعه کانیدیدا البیکنس (PTTC 5027)، اسپرژیلوسفومیگاتوس (PTTC 5009) بوده و از مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های صنعتی ایران تهیه شد.

سوسپانسیون قارچی همگن با استفاده از معیار کدورت سنج استاندارد نیم مک فارلند (1×10^5 CFU/mL) در ناحیه ۵۳۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفوتومتر در محیط سابورو دکستروز برات تهیه شد.

برای بررسی حداقل غلظت بازدارندگی، غلظت اولیه ۸۱۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیبات سنتزی در حلال DMSO تهیه شد. حداقل غلظت بازدارندگی با روش برات میکرو دایلوژن در پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل در محیط سابورو دکستروز برات صورت گرفت.

ابتدا به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سابورو دکستروز برات اضافه گردید، سپس به اولین چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مشتقات سنتزی اضافه و گردید و پس از مخلوط کردن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن را برداشته و به چاهک دوم اضافه و به همین ترتیب رقیق‌سازی ترکیبات سنتزی در چاهک‌ها صورت گرفت، سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی به چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت در خانه آخر هر ردیف ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت، ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به‌عنوان کنترل منفی اضافه گردید. پلیت‌ها را به مدت ۴۸

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال آزاد

DPPH

اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات سنتزی با استفاده از روش مطرح‌شده توسط Reddy و همکاران بررسی شد (۳۰). DPPH ترکیب بنفش‌رنگ می‌باشد. این ترکیب به دلیل داشتن گروه‌های فنیل توانایی پایدار کردن رادیکال را دارد و به‌عنوان رادیکال آزاد پایدار در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرد. DPPH دارای جذب در ناحیه ۵۱۷ نانومتر می‌باشد و با گرفتن هیدروژن یا الکترون از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش کاهش ظرفیت رادیکالی (RSC: radical scavenging capacity) رنگ آن از بنفش به زرد تغییر کرده و می‌توان با استفاده از جذب، غلظت آن و درصد مهار توسط ترکیب آنتی‌اکسیدان را اندازه گرفت. DPPH اولین بار در سال ۱۹۵۸ توسط Blois برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی مطرح گردید (۳۱).

برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ابتدا غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیبات سنتزی در حلال متانول آماده و یک میلی‌لیتر از آن‌ها به ۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۴ درصد وزنی DPPH در متانول اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه جذب DPPH (کنترل) و جذب مخلوط DPPH و نمونه در ناحیه ۵۱۷ نانومتر گرفته شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل} = \frac{\text{درصد مهار}}{(\text{جذب کنترل})} \times 100$$

برای هر سوبه مقدار ۱۵ میکرولیتر DMSO به‌عنوان کنترل منفی نیز جداگانه روی دیسک بلانک تزریق شد. کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار و نتایج به‌صورت میانگین گزارش شد.

یافته‌ها

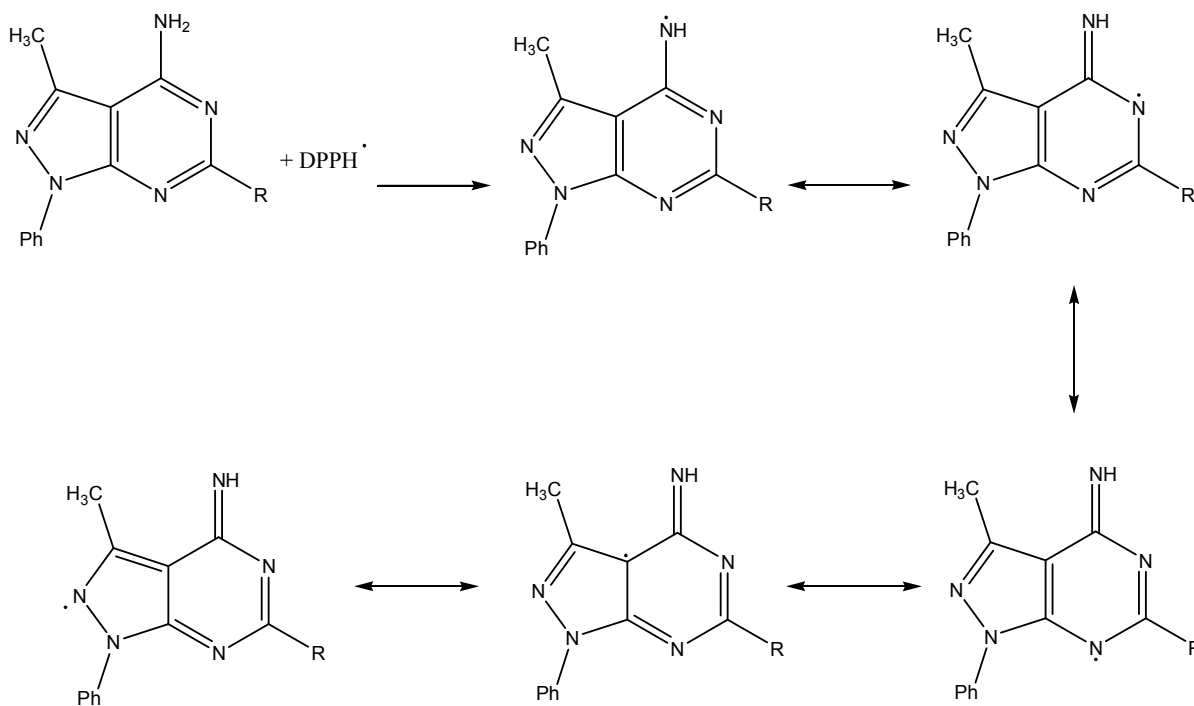
اثرات آنتی‌اکسیدانی

غلظت IC_{50} آنتی‌اکسیدانی برای ترکیبات سنتزی بین ۲۲/۱۳ تا ۳۵/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست‌آمده است و برای اسکوربیک اسید ۳/۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. مکانیسم پایداری رادیکال آزاد DPPH در شکل ۲ آورده شده است. نتایج درصد مهار و غلظت IC_{50} ترکیبات جدید سنتزی و اسکوربیک اسید در جدول ۲ آورده شده است.

ساعت داخل انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. شفاف بودن چاهک‌ها حاکی از عدم رشد قارچ و کدورت نشان‌دهنده وجود قارچ در آن چاهک است، اولین چاهکی که شفافیت از آن شروع شده به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش شد.

برای بررسی حداقل غلظت کشندگی چاهک‌هایی که شفاف بوده را جداگانه به سوآپ آغشته و روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت داده پس از ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد غلظتی را که قارچ رشد نکرده به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد.

برای بررسی قطر هاله سوبه‌های قارچ را توسط سوآپ روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت و مقدار ۱۵ میکرولیتر از حداقل غلظت بازدارندگی رشد ترکیبات بر روی دیسک بلانک استریل تزریق شد و بعد از ۴۸ ساعت قطر هاله با کولیس اندازه‌گیری شد



شکل (۲): مکانیسم پیشنهادی پایداری رادیکال DPPH توسط مشتقات جدید پیرازولو [۳،۴-d] پیریمیدین

جدول (۲): درصد مهار و مقدار IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) مشتقات جدید پیرازولو [۳،۴-d] پیریمیدین و اسکوربیک اسید

ترکیبات	درصد مهار				IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	غلظت ($\mu\text{g/ml}$)				
	۵	۱۰	۱۵	۲۰	
3a	۲۵/۴۳	۳۵/۴۱	۳۷/۷۱	۳۹/۸۶	۲۲/۱۳
3b	۲۵/۸۹	۳۱/۹۷	۳۷/۰۰	۴۶/۱۲	۲۰/۵۵
3c	۱۵/۱۹	۱۷/۲۴	۲۴/۴۳	۲۷/۶۶	۳۵/۶۳

ترکیبات	درصد مهار				IC50 (µg/ml)
	غلظت (µg/ml)				
	۵	۱۰	۱۵	۲۰	
3d	۱۷/۷۰	۲۵/۶۸	۳۰/۴۷	۳۳/۹۶	۲۷/۶۲
3e	۲۱/۳۵	۲۸/۹۶	۳۲/۱۷	۳۵/۶۷	۲۶/۰۵
3f	۲۴/۱۷	۲۶/۹۴	۳۰/۶۰	۳۲/۰۴	۲۹/۳۲
3g	۲۰/۸۹	۲۶/۱۶	۲۹/۴۵	۳۳/۴۰	۲۸/۵۹
اسکوربک اسید	۸۷/۵۰	۹۲/۳۵	۹۷/۰۸	۹۸/۹۸	۳/۹۳

اثرات ضدقارچ:

البیکس هیچ‌گونه اثری ندارد. نیستاتین روی کاندیدا البیکس اثرگذار نبوده و مقدار حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی آن روی اسپرژیلوس فومیگاتوس به ترتیب ۳۲ و ۱۲۸ می‌باشد. کتوکونازول روی اسپرژیلوس فومیگاتوس دارای مقادیر ۵۱۲ و ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی و مقادیر آن روی کاندیدا البیکس به ترتیب مقادیر ۲۵۶ و ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. نتایج بررسی در جدول ۳ آورده شده است.

هفت مشتق سنتزی جدید روی اسپرژیلوس فومیگاتوس اثر گذاشته و یک مشتق سنتزی روی کاندیدا البیکس اثرگذار بود. بیشترین اثرگذاری مربوط به مشتق 3g می‌باشد، این ترکیب به ترتیب با مقادیر ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای مبنای حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی روی گونه‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس و تنها مشتق اثرگذار روی گونه کاندیدا البیکس می‌باشد. تولنافتات روی اسپرژیلوس فومیگاتوس و کاندیدا

جدول (۲): قطر هاله مهار رشد (میلی‌متر)، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر) و حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشتقات و داروهای ضدقارچ بر روی کاندیدا البیکس و اسپرژیلوس فومیگاتوس

مشتقات	۵۰۰۹				۵۰۲۷	
	قطر هاله	حداقل غلظت بازدارندگی رشد	حداقل غلظت کشندگی	قطر هاله	حداقل غلظت بازدارندگی رشد	حداقل غلظت کشندگی
6a	۱۰/۱۷	۴۰۹۶	۸۱۹۲	-	-	-
6b	۷/۹۴	۸۱۹۲	۱۶۳۸۴	-	-	-
6c	۱۰/۴۵	۱۰۲۴	۲۰۴۸	-	-	-
6d	۹/۶۱	۲۰۴۸	۴۰۹۶	-	-	-
6e	۱۲/۲۹	۵۱۲	۱۰۲۴	-	-	-
6f	۱۴/۵۳	۱۲۸	۲۵۶	-	-	-
6g	۱۰/۳۶	۶۴	۱۲۸	۲۶/۸۴	۶۴	۱۲۸
کتوکونازول	۱۴/۶۳	۲۵۶	۵۱۲	۸/۱۳	۵۱۲	۱۰۲۴
نیستاتین	۲۱/۴۵	۳۲	۱۲۸	-	-	-
تولنافتات	-	-	-	-	-	-

بحث و نتیجه‌گیری

متصل شده به حلقه پیریمیدین می‌باشد و فاقد گروه کشنده یا دهنده روی آن می‌باشد بنابراین از نظر الکترونی مساعد بوده و بهترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشد. مشتقات جدید پیرازولو[۳-۴-d]پیریمیدین و داروهای تولنافتات، نیستاتین و کتوکونازول روی ۲ گونه قارچی اسپرژیلوس فومیگاتوس و کاندیدا

مشتقات جدید پیرازولو[۳-۴-d]پیریمیدین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و نتایج بررسی آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات مشخص نمود که بیشترین اثرگذاری مربوط به مشتق 3b می‌باشد، با توجه به مکانیسم پیشنهادی، ترکیب 3b که دارای حلقه فنیل

بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی کم تر از ترکیب 3g می- باشد همچنین ترکیب 3f نیز اثرگذاری قوی تری نسبت به کتوکونازول روی آسپرژیلوس فومیگاتوس دارد. ترکیب 3g حاوی دو و ترکیب 3f حاوی یک گروه کلر می باشد، تأثیرات بالای این ترکیبات به دلیل حضور اتم کلر با خاصیت گندزدایی می باشد. بنابراین مشتقات جدید پیرازولو[3,4-d]پیریمیدین بررسی شده با توجه به اینکه اثرات ضدباکتریایی قوی آن ها قبلاً گزارش شده (۲۶)، در این پژوهش اثرات ضد قارچ و آنتی اکسیدانی آن ها نیز بررسی و تأیید گردید، لذا حائز اهمیت می باشد.

البیکنس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بررسی نشان داد که این ترکیبات به خصوص ترکیب 3g اثرات بسیاری خوبی روی ۲ گونه مورد بررسی دارد. پس از ترکیب 3g ترکیب 3f بهترین اثرگذاری را دارا می باشد. نتایج بررسی داروها نیز مشخص نمود که تولنافتات روی آسپرژیلوس فومیگاتوس و کاندیدا البیکنس هیچ اثری ندارد و نیستاتین فقط روی آسپرژیلوس فومیگاتوس اثر و روی کاندیدا البیکنس اثرگذار نبود و کتوکونازول روی هر دو گونه اثرگذار بوده اما قدرت اثرگذاری آن بر مبنای پارامترهای حداقل غلظت

References:

- 1- Thomas MJ. The role of free radicals antioxidants. *Nutrition* 2000; 16(7/8): 716-7.
- 2- Kamkar A. The study of antioxidant activity of essential oil and extract of Iranian *Anethum graveolens*. *Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal* 2009; 15(3) 11-7. (Persian)
- 3- Halliwall B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, casuse, or consequence. *Lancet* 1994: 334.
- 4- Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *Int J Food Sci Tech* 2001; 36: 703–25.
- 5- Shukla Sh, Mehta A, Bajpai VK, Shukla S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 2338-43.
- 6- Henry C, Heppell N. Nutritional losses and gains during processing: future problems and issues. *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 145-8.
- 7- Robards K, Kerr A, Patsalides E. Rancidity and its measurement in edible oils and snackfoods: a review. *Anal* 1988; 113: 213-24.
- 8- Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequence, measurement and dietary influences. *Food Sci Nutr* 1996; 47: 233-61.
- 9- Estevez M, Cava R. Effectiveness of rosemary essential oil as inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Sci* 2006; 72: 348-56.
- 10- Tamaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Salfaro V, Pasquale AD, et al. Influence of heating on antioxidant activity and chemical composition of some spice essential oil. *Food Chem* 2005; 89: 549-54.
- 11- Salehi M, Hashemi Karuie SM, Omran AN, Mobini M, Asghar Hedari M. Antifungal activity of in vitro aqueous and alcoholic extracts of Barije root (*Ferula gummosa*). *J Birjand Univ Med Sci* 2015; 21 (4): 444-50. (Persian)
- 12- Thanaboripat D. Control of Aflatoxins in Agricultural Products using Plant Extracts. *KMITL Sci Tech J* 2011; 11: 1–35.
- 13- Odds FC. *Candida and candidosis: a review and bibliography*. Bailliere Tindall; 1988.
- 14- Gow NAR. *Microbe Profile: Candida albicans: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans*". *Microbiology* 2017; 163 (8): 1145-7.
- 15- *Candida albicans* at NCBI Taxonomy browser, url accessed 2006-12-26 tez
- 16- Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal

- extracts on *Candida Albicans*. *Chin J Integr Med* 2015; 23(3): 201-7.
- 17- Calderone A, Clancy CJ. *Candida and Candidiasis* (2nd ed.). ASM Press; 2012.
- 18- Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 2009; 11:919-27.
- 19- . Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 310-50.
- 20- Ibrahim-Granet O, Dubourdeau M, Latgé JP, Ave P, Huerre M, Axel A. Brakhage, B Matthias. Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cell Microbiol* 2008; 10(1): 134-48.
- 21- Beyzaei H, Aryan R, Moghaddam-Manesh M, Ghasemi B, Karimi P, S.Delarami H, et al. Evaluation and structure-activity relationship analysis of a new series of 4-imino-5H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-5-amines as potential antibacterial agents. *J Mol Struct* 2017; 1144: 273-9.
- 22- Ismail N.S.M, Ali E.H.M, Ibrahim D.A, Serya R.A.T, El Ell D.A, Future J. Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine based scaffold derivatives targeting kinases as anticancer agents. *FJPS* 2016; 2(1): 20-30.
- 23- Kadry H. H. Synthesis, biological evaluation of certain pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as novel anti-inflammatory and analgesic agents. *Med Chem Res* 2014; 23: 5269-81.
- 24- Beyzaei H, Moghaddam-Manesh M, Aryan R, Ghasemi B, Samzadeh-Kermani A. Synthesis and in vitro antibacterial evaluation of 6-substituted 4-amino-pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *Chem Pap* 2017; 71(9): 1685-91.
- 25- Larsen SD, Connell MA, Cudahy MM, Evans BR, May PD, Meglasson MD, et al. Synthesis and biological activity of analogues of the antidiabetic/antiobesity agent 3-guanidinopropionic acid: Discovery of a novel aminoguanidinoacetic acid antidiabetic agent. *J Med Chem* 2001; 44: 1217-30.
- 26- Chauhan M, Kumar R. Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: A review. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.07.027>
- 27- Metwally MA, Gouda MA, N. Harmal A, Khalil AM, 3-Iminobutanenitrile as Building Block for the Synthesis of Substituted Pyrazolo[1,5a]pyrimidines with Antitumor and Antioxidant Activities. *Int J Mod Org Chem* 2012; 1(2): 96-114.
- 28- Wu N, Kong Y, Fu Y, Zu Y, Yang Z, Yang M, et al. In Vitro Antioxidant Properties, DNA Damage Protective Activity, and Xanthine Oxidase Inhibitory Effect of Cajanin stilbene Acid, a Stilbene Compound Derived from Pigeon Pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Leaves. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 437-43.
- 29- Raghunath SA, Manjunatha Y, Rayappa K. Synthesis, antimicrobial, and antioxidant activities of some new indole analogues containing pyrimidine and fused pyrimidine systems. *Med Chem Res* 2012; 21: 3809-17.
- 30- Reddy M. V. B, Srinivasulu D, Peddanna K, Apparao CH and Ramesh P. Synthesis and Antioxidant Activity of New Thiazole Analogues Possessing Urea, Thiourea, and Selenourea Functionality. *Synth Commun* 2015; 45(22): 2592-600.
- 31- Khademi S, Mardaninezhad SH. Evaluation of the antioxidant activity of some rosaceae plant as an alternative to the synthetic antioxidant in food industry. *J Food Technol Nutr* 2015; 12(2): 33-40. (Persian)

32- Beyzaei H, Motraghi Z, Aryan R, Zahedi MM and Samzadeh-Kermani A. Green One-pot Synthesis of Novel Polysubstituted Pyrazole

Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Acta Chim Slov* 2017, *64*, 911–8.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL PROPERTIES OF NEW DERIVATIVES OF PERAZOLO [3,4-D]PYRIMIDINE

Mohammadreza Moghaddam-manesh^{*1,2}, Sara Hosseinzadegan³, Hamid beyzaei⁴

Received: 05 Feb, 2019; Accepted: 22 Apr, 2019

Abstract

Background & Aims: Heterocyclic compounds are found to be abundant in nature, these compounds have many biological properties, and many drugs also contain heterocyclic rings. In this study, antioxidant and anti-fungal properties of the seven pyrazolo[3,4-d]pyrimidine compounds has been studied that synthesized in Iran and their good antibacterial properties have been reported

Materials & Methods: Antioxidant properties were evaluated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. Antifungal property was evaluated using CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institut) standard based on inhibition zone diameter, minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration and compared with anti-fungal drugs including Ketoconazole, Nystatin and Tolnaftate.

Results: Concentrations of 25, 50, 75 and 100 µg/mL of the derivatives were prepared in methanol, after performing an antioxidant test with DPPH, the percentage of inhibition was reported, in addition, the IC₅₀ was calculated for each compound, and finally the test for ascorbic acid was done and the results were compared. In the study of antifungal activity, after the preparation of specific concentrations of derivatives, the results of inhibition zone diameter, minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration were reported and the tests were performed for Ketoconazole, Nystatin and Tolnaftate drugs and finally the results of the derivatives with the drugs were compared.

Conclusion: In this study, new synthetic compounds of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine showed antioxidant activity. In addition, these compounds have strong antifungal properties, and even some derivatives have better results and effective than anti-fungal commercial drugs.

Keywords: Antioxidant activity, antifungal activity, new heterocyclic compounds, perazolo[3,4-d]pyrimidine

Address: Zahedan, Shariati St., General Bureau of Standard Sistan and Baluchestan

Tel: 05432241350

Email: Email: Mrm.manesh@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2019; 30(3): 173 ISSN: 1027-3727

¹ PhD Candidate in Organic Chemistry, General Bureau of Standard Sistan and Baluchestan Province, Iranian National Standards Organization (Corresponding Author)

² PhD Candidate in Organic Chemistry, Young Researchers and Elite Club, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

³ PhD Candidate in Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

⁴ Associate Professor, Organic chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran