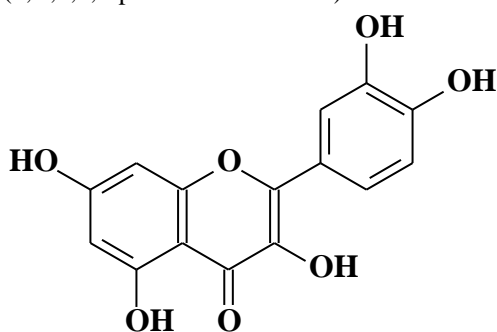


Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ biologic activ de cupru din clasa izotiosemicarbazidaților metalelor de tranziție. Acest complex manifestă activitate antiradicalică, inhibând radicalii superoxizi în organism. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat care previne dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza.

Radicalul superoxid  $O_2^-$  (RSO) este implicat în mai multe procese biologice dăunătoare, cum ar fi denaturarea proteinelor și peroxidarea lipidelor, în patogeneza bolilor umane, cum ar fi boala Parkinson, bolile cardiovasculare, cancerul [Maan Hayyan, Mohd Ali Hashim, Inas M. AlNashef. Superoxide Ion: generation and chemical implications. Chem. Rev., 2016, vol.116 (5), pag. 3029–3085]. Producția excesivă de RSO poate contribui la fibroză alveolară, displazie bronhopulmonară și sindrom de detresă respiratorie, dezvoltarea cataractei. În plus, RSO este implicat în etiologia îmbătrânirii. În afară de aceasta, RSO este o specie derivată din oxigen, care este potențial citotoxic și cauzează deteriorarea ADN-ului.

Prin urmare, inhibarea terapeutică a RSO este o contribuție nouă, deoarece compușii cu activitate antiradicalică manifestă un puternic efect curativ, prevenind dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza [Babizhayev M.A., Yegorov Y. E. Reactive oxygen species and the aging eye: specific role of metabolically active mitochondria in maintaining lens function and in the initiation of the oxidation-induced maturity onset cataract- a novel platform of mitochondria-targeted antioxidants with broad therapeutic potential for redox regulation and detoxification of oxidants in eye diseases. Am. J. Ther., 2016, 23(1), e98-117].

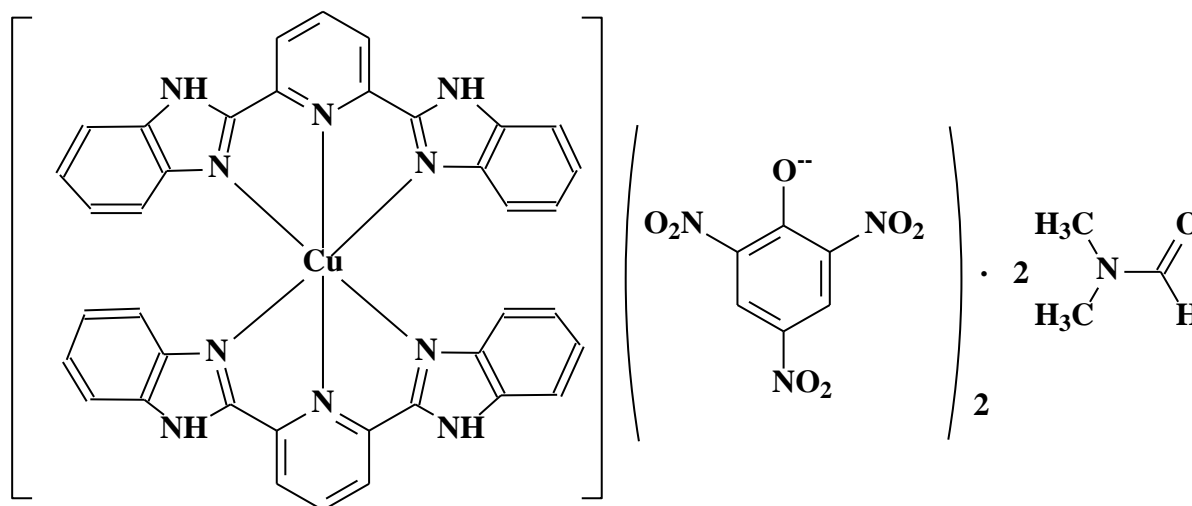
În calitate de etalon pentru determinarea activității inhibitoare a radicalilor superoxizi se utilizează quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxi flavona) cu formula:



care reprezintă un flavonol natural din grupa de flavonoizi polifenolici [1].

Dezavantajul quercetinei constă în faptul, că ea nu posedă o activitate antiradicalică înaltă [concentrația de inhibare semimaximală ( $IC_{50}$ ) constituie doar 61,86  $\mu\text{mol/L}$ ], precum și în provocarea efectelor secundare.

Din compușii chimici sintetici, care manifestă o activitate antiradicalică înaltă, descriși în literatură, cel mai înalt efect inhibitor al radicalilor superoxizi a fost obținut în cazul bis(2,4,6-trinitrofenolatului) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvatului (prototipul) [2] cu formula:

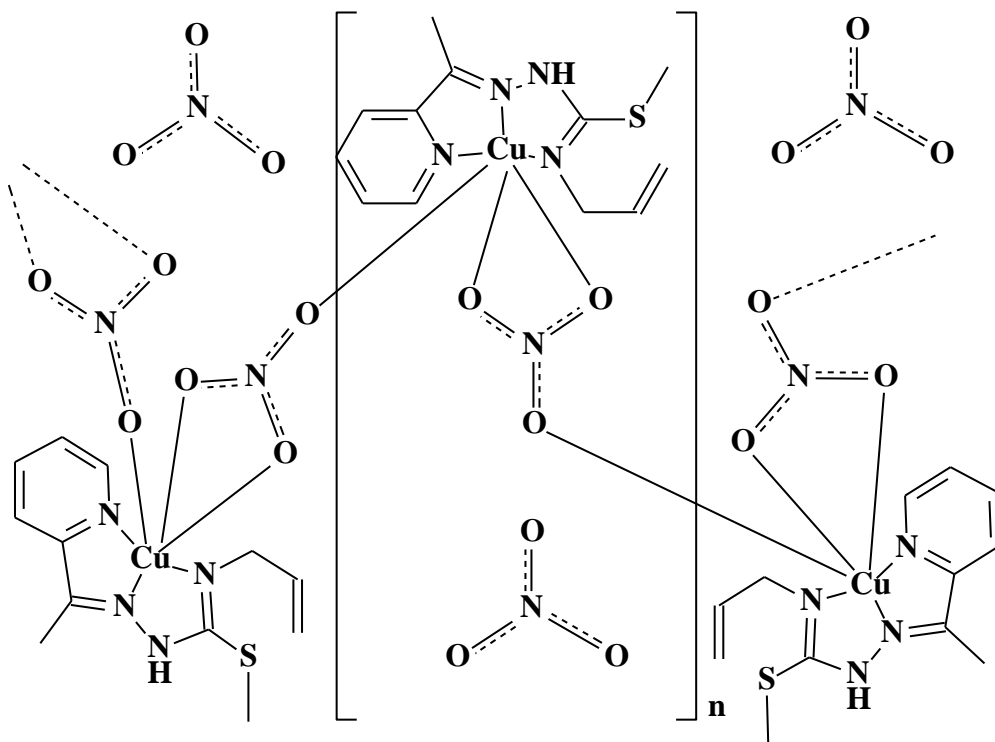


Compusul dat are concentrația semimaximală de inhibare a radicalilor superoxizi  $IC_{50} = 0,99 \mu\text{mol/L}$ .

Dezavantajul bis(2,4,6-trinitrofenolatului) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvatului (prototipului) [2] constă în faptul, că compusul dat nu posedă o activitate inhibitoare a radicalilor superoxizi suficient de înaltă și până acum nu a găsit aplicare în medicină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui compus coordinativ nou, care extinde arsenalul de compuși cu activitate inhibitoare a radicalilor superoxizi înaltă.

Esența invenției constă în obținerea unui inhibitor sintetic al radicalilor superoxizi în baza nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidioat}cupru(II) cu formula:



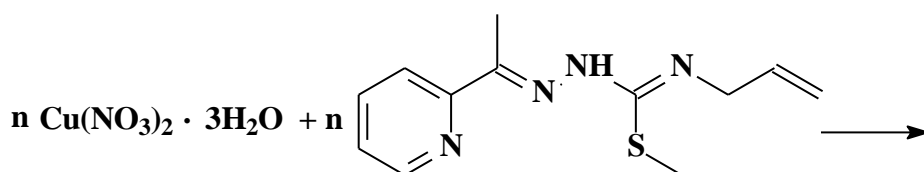
unde  $n$  este limitat de dimensiunile cristalului.

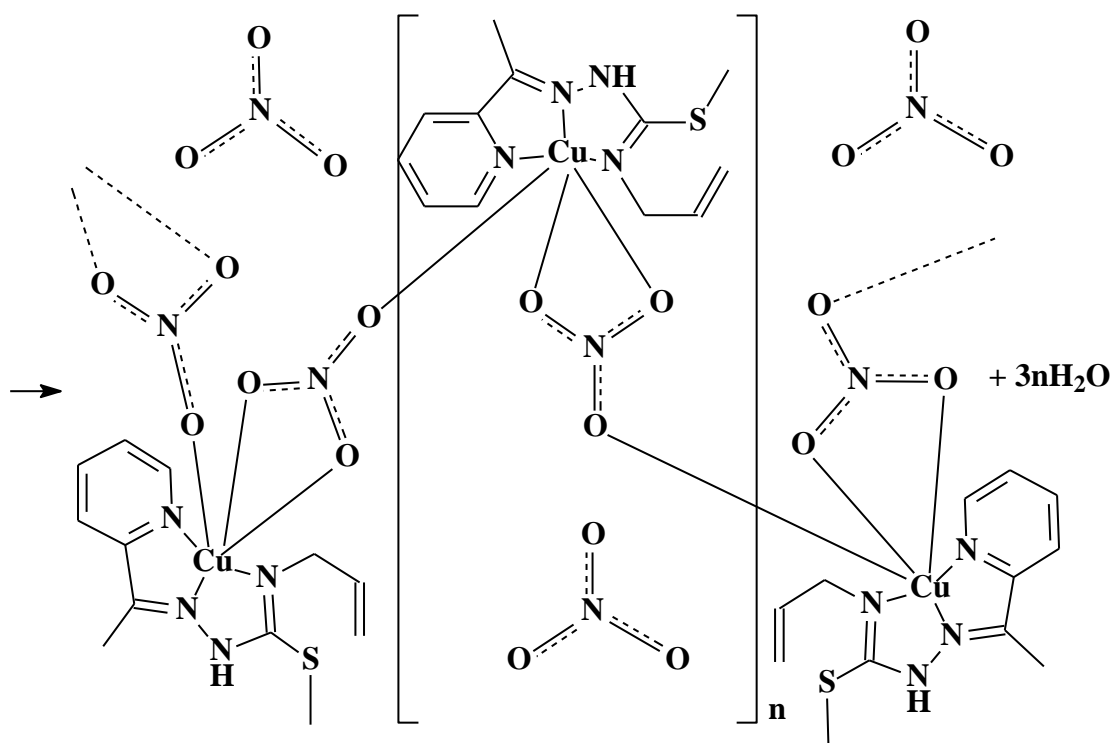
Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anti-radicalice cu  $IC_{50}$  egală cu  $0,54 \mu\text{mol/L}$ , care este de 114,6 ori mai înaltă decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 1,8 ori mai efectiv decât prototipul. Proprietatea stabilită a nitrului de catenă-( $\mu$ -nitrato- $O,O'$ - $O''$ )-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotoat}-cupru(II) sus-numit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.

Rezultatul tehnic obținut este cauzat de faptul că în compusul revendicat se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Nitrul de catenă-( $\mu$ -nitrato- $O,O'$ - $O''$ )-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotoat}cupru(II) revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți ( $50 \dots 55^\circ\text{C}$ ) ale trihidratului nitrului de cupru(II) cu metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotoat [4-*alil-S*-metilizotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei], luate în raport molar 1:1. Reacția decurge în  $50 \dots 60$  min conform următoarei scheme:





unde  $n$  este limitat de dimensiunile cristalului.

Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul, că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adăuția la ionul de cupru(2+) a moleculei de 4-alil-S-metilzotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei, care joacă rolul de ligand-N,N,N tridentat. Al patrulea și al cincilea loc în sfera internă a atomului central sunt ocupate de doi atomi de oxigen ai unui nitrat-ion, care îndeplinește funcția de punte în molecula de polymer coordinativ, unindu-se prin al treilea atom de oxigen cu atomul de cupru al moleculei vecine. Al șaselea loc în sfera internă este ocupat de un atom de oxigen al nitrat-ionului moleculei vecine. În rezultatul acestor procese are loc formarea cationului coordinativ polimeric, sarcina cărui se compensează cu nitrat-ionii din sfera externă.

*Exemplu de obținere a nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrat-o,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II).* Se amestecă 20 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-metilzotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei] cu 10 mmol de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , dizolvat în 10 mL de alcool. Amestecul reactant este încălzit ( $50 \dots 55^\circ\text{C}$ ) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 50...60 min. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde întunecată, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu o cantitate mică de etanol, eter și uscate la aer. Randamentul produsului final alcătuiește 77% de la cel calculat teoretic.

S-a determinat, % : C -35,87; H -4,39; Cu -13,47; N- 12,87; S - 6,70.

Pentru  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{CuN}_6\text{O}_6\text{S}$  s-a calculat, % : C -36,09; H - 4,76; Cu -13,64; N- 18,04; S - 6,88.

Benzile de absorbție în spectrul IR,  $\text{cm}^{-1}$  : 3088  $\nu(\text{N}^2\text{H})$ ; 1639  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{ali}})$ ; 1600, 1558, 1526  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1109  $\nu(\text{CH}_3\text{-S})$ ; 644  $\nu(\text{C-S})$ ; 535, 516, 475, 468, 447, 412  $\nu(\text{M-N})$ .

Compusul complex revendicat are  $\mu_{\text{ef}} = 1,82$  m. B. (293K).

Invenția se explică cu ajutorul desenelor din fig. 1 și 2, care reprezintă:

- fig. 1, structura fragmentului elementar al nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrat-o,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II);
- fig. 2, structura nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrat-o,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II).

Procedul de obținere a compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. Metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-metilzotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei] a fost sintetizat după metoda descrisă în sursa: Pahontu E., Usataia I., Graur V., Chumakov Yu., Petrenko P., Gudumac V., Gulea A. Synthesis, characterization, crystal structure of novel Cu(II), Co(III), Fe(III) and Cr(III) complexes with 2-hydroxybenzaldehyde-4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone: Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* antiproliferative activity. Appl Organomet Chem., 2018, vol 32 (12), pag. 4544e. Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, este solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

La recristalizarea nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrat-o,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) din soluție etanolică au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X. Măsurătorile cristalografice au fost efectuate utilizând un difractometru

de tip Xcalibur E CCD Oxford-Diffraction cu monocromator de grafit înzestrat cu sursă de raze X de tip Mo-K $\alpha$ . Procedeele de determinare a parametrilor celulei elementare și de integrare a datelor experimentale au fost efectuate cu ajutorul setului de programe "CrysAlis package Oxford Diffraction". Pentru structura cercetată soluția a fost determinată prin metoda directă cu ajutorul programului SHELXS-97 și fitată prin metoda pătratelor minime în cadrul programului SHELXL-97 în varianta anizotropică pentru toți atomii cu masă molară mai mare decât a atomului de hidrogen. Atomii de hidrogen au fost introduși în poziții idealizate ( $d_{CH} = 0,96 \text{ \AA}$ ) utilizând modelul pivot cu fixarea parametrilor izotropici de deplasare la valoarea de 120% față de valorile respective ale atomilor de carbon cu care sunt legați. Formula empirică a compusului investigat  $C_{14}H_{22}CuN_6O_6S$ , grupa spațială P 2 $_1$ /n, parametrii celulei elementare, [Å]: a = 9,1955(5); b = 8,7084(5), c = 22,2895(9);  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 91,488(4)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ .

A fost stabilit (fig. 1, fig. 2), că compusul investigat reprezintă un polimer coordinativ, în care fragmentul elementar este un cation complex de cupru(II) cu structură tetragonal-bipiramidală distorsionată. În sfera internă a atomului central se află o moleculă de S-metiloziosemicarbazonă tridentată, care coordonează la atomul de cupru prin atomii de azot piridinic [ $d(\text{Cu-N}) = 2,005 \text{ \AA}$ ], azometinic [ $d(\text{Cu-N}) = 1,928 \text{ \AA}$ ] și tiocarbamidic  $N^4$  [ $d(\text{Cu-N}^4) = 1,969 \text{ \AA}$ ], formând două metalocicluri din cinci atomi. În favoarea coordonării azometinei prin atomul de azot tiocarbamidic  $N^4$  vorbește și distanța  $d(\text{C-S}) = 1,748 \text{ \AA}$ . Legătura dublă în molecula de izotiosemicarbazonă coordonată se află între atomii de carbon și azot  $N^4$  [ $d(\text{C}^3 - \text{N}^4) = 1,283 \text{ \AA}$ ]. Distanța între atomii de carbon și azot  $N^3$  este mai lungă [ $d(\text{C}^3 - \text{N}^3) = 1,371 \text{ \AA}$ ]. Al patrulea și al cincilea loc în sfera internă a atomului de cupru îl ocupă doi atomi de oxigen ai nitrat-ionului cu distanțele  $d^1(\text{Cu-O}) = 1,899 \text{ \AA}$  și  $d^2(\text{Cu-O}) = 1,982 \text{ \AA}$ . Al șaselea loc în sfera internă a atomului central este ocupat de atomul de oxigen din nitrat-ionul vecin cu distanța  $d^3(\text{Cu-O}) = 2,344 \text{ \AA}$ . În sfera exterioară a cationului complex polimeric se află al doilea nitrat-ion. Alte distanțe interatomice și unghiurile de valență sunt standarde pentru compușii din această clasă.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și a cercetărilor fizico-chimice, a fost stabilită compoziția și structura compusului declarat.

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

*Exemplu al utilizării nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.*

Activitatea de captare a radicalului superoxid a fost determinată prin metoda spectrofotometrică, descrisă în [1] și [Fontana M., Mosca L., Rosei, M.A. Interaction of enkephalins with oxyradicals. Biochemical Pharmacology, 2001, vol. 61, pag. 1253-1257] cu unele modificări.

Metoda se bazează pe generarea radicalilor superoxizi de către sistemul fenazin metosulfat/nicotinamidă adenină dinucleotid redusă (FMS/NADH) prin oxidarea NADH, iar radicalii superoxizi reduc sarea de tetrazoliu - nitro blue tetrazolium (NBT) în formazan de culoare albastră-purpurie.

Metoda se efectuează în felul următor: se pregătesc diluțiile de lucru ale substanțelor testate în soluție de DMSO în concentrațiile 0,1; 1,0; 10,0; 100  $\mu\text{M/L}$ . Apoi, se pipetează câte 20  $\mu\text{L}$  de fiecare diluție de lucru ale substanțelor testate în godeurile microplăcii cu 96 godeuri. Fiecare diluție se toarnă în duplicat. După aceasta se adaugă câte 180  $\mu\text{L}$  de mediu (amestec) de reacție ce conține soluție de 20 mM tampon fosfat (pH 7,4), NADH (0,1 mM) și NBT (0,09 mM). Proba de control se montează la fel ca și proba de cercetat, dar în loc de diluții ale substanțelor de testat se toarnă o cantitate echivalentă de soluție de 20 mM tampon fosfat (pH 7,4). Se pregătește în duplicat. Se amestecă și se măsoară absorbanta la 560 nm [A<sub>0</sub>]. Apoi, în toate godeurile se adaugă câte 20  $\mu\text{L}$  de soluție de 8,0  $\mu\text{M}$  fenazin metosulfat (FMS), se agită 10...15 s și se incubează la temperatura camerei 5 min. Se măsoară din nou absorbanta Abs la 560 nm [A<sub>1</sub>]. În calitate de substanță de referință se folosește quercetina în concentrațiile 0,1; 1,0; 10,0; 100  $\mu\text{M/L}$ .

Activitatea de captare a radicalilor superoxizi (ACRS) se calculează (%) după formula:

$$\text{ACRS (\%)} = [100 - (A_1/A_0)] \times 100$$

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților inhibitoare ale nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) sunt prezentate în tabel, din care se observă, că el manifestă activitate antiradicalică cu IC<sub>50</sub> egală cu 0,54  $\mu\text{mol/L}$ , care este de 114,6 ori mai înaltă decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 1,8 ori mai efectiv decât prototipul.

Proprietățile depistate ale nitratului de catenă-( $\mu$ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori sintetici ai radicalilor superoxizi.

Tabel

Activitatea antiradicalică a compusului revendicat în comparație cu quercetina și prototipul

Compusul	IC <sub>50</sub> , $\mu\text{mol/L}$
Quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxi flavona) [1]	61,86
Bis(2,4,6-trinitrofenolatul) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvat (prototipul) [2]	0,99
Nitratul de catenă-( $\mu$ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II)	0,54