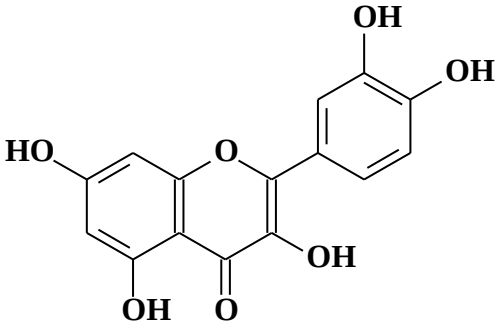
Invenţia se referă la chimie şi medicină, şi anume la un compus coordinativ de cupru biologic activ din clasa izotiosemicarbazidaţilor metalelor de tranziţie. Acest complex inhibă exacerbarea proceselor de afectare a moleculelor organice cu radicali superoxizi în organism. Datorită acestor proprietăţi el poate găsi aplicare în medicină în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi în organism, prevenind astfel dezvoltarea leziunilor celulare şi tisulare, ateroscleroza şi carcinogeneza.

În patogenia bolilor cronice şi degenerative (celor mai râspândite boli) un rol important se atribuie radicalilor liberi ai oxigenului (RLO), în special, radicalului superoxid $\mathbf{O_2^{\cdot -}}$ (RSO), care se formează prin captarea unui electron la activarea O_2. Datorită marii reactivităţi RSO este responsabil de multiple acţiuni nocive asupra organismului (Maan Hayyan, Mohd Ali Hashim, Inas M. AlNashef. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. Chem. Rev., 2016, vol.116, nr. 5, p. 3029–3085), cum ar fi inflamaţia, leziuni de reperfuzie, leziuni prin radiaţie, tulburări metabolice, îmbătrânire celulară, ateroscleroză şi carcinogeneză.

Prin urmare, inhibarea terapeutică a RSO este o contribuţie nouă, deoarece compuşii cu activitate antiradicalică manifestă un puternic efect curativ, prevenind dezvoltarea leziunilor celulare şi tisulare (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, v. 23(1), p. e98-e117).

Respectiv, una din direcţiile prioritare ale chimiei aplicative moderne reprezintă sinteza noilor compuşi, care captează şi neutralizează RSO, în special, radicalul superoxid, prevenind astfel dezvoltarea leziunilor celulare şi tisulare, inclusiv, procesele inflamatorii în organismul uman, ateroscleroza şi carcinogeneza.

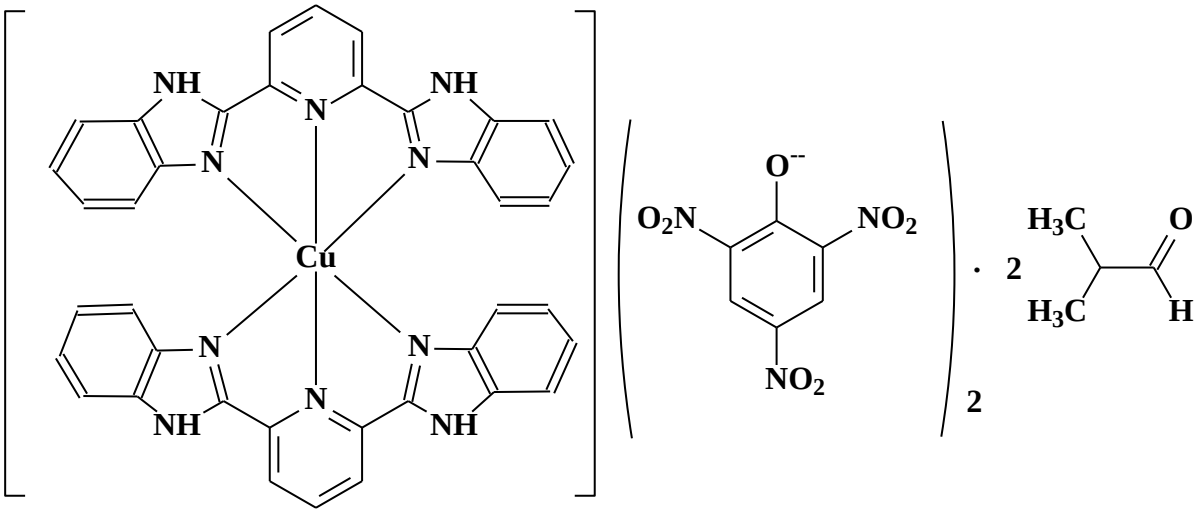
În calitate de etalon pentru determinarea activităţii de captare a radicalilor superoxizi se utilizează quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxiflavona) cu formula:



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

Dezavantajul quercetinei constă în faptul, că ea nu posedă o activitate antiradicalică înaltă (concentraţia de inhibare semimaximală (IC_{50}) constituind 16-35 μmol/L), precum şi că ea poate provoca efecte secundare.

Din compuşii chimici sintetici, care manifestă o activitate antiradicalică înaltă, descrişi în literatură, cel mai înalt efect inhibitor asupra radicalilor superoxizi a fost obţinut 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 [2] cu formula:

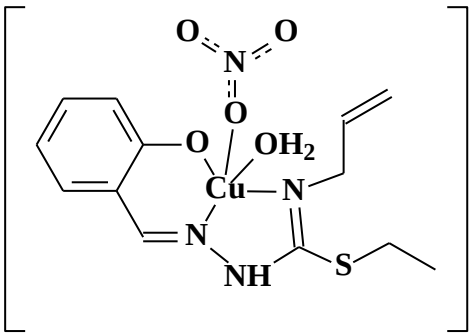


Compusul dat are concentraţia semimaximală de inhibare a radicalilor superoxizi IC_{50} = 0,99 μmol/L.

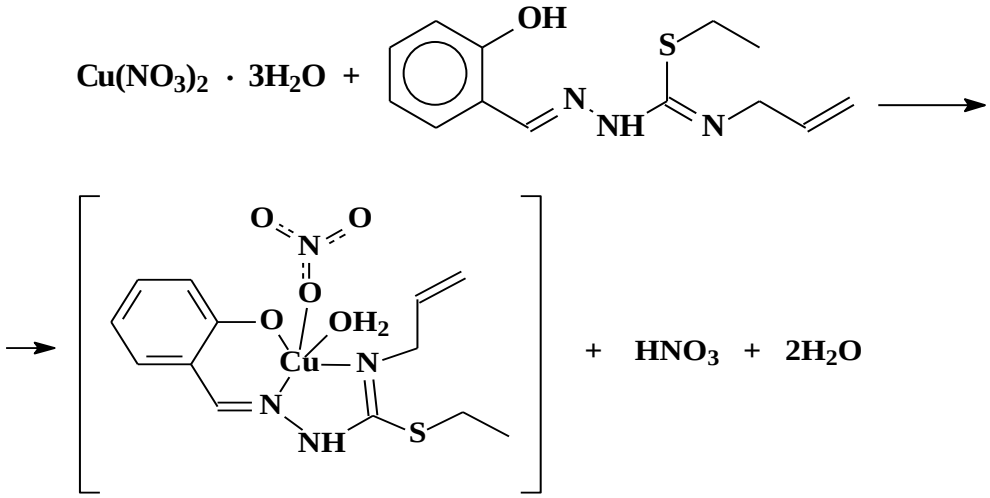
Dezavantajul bis(2,4,6-trinitrofenolatului) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvatului constă în faptul că compusul dat nu posedă o activitate inhibitoare a radicalilor superoxizi suficient de înaltă şi până acum nu a găsit aplicare în medicină.

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

Esenţa invenţiei constă în obţinerea unui inhibitor sintetic al radicalilor superoxizi în baza nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)-carbonoimidoil]-hidraziniliden}metil)fenolato]aqua-cupru cu formula:



Compusul dat, proprietăţile lui şi procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.
Rezultatul tehnic al invenţiei constă în stabilirea la compusul revendicat a activităţii anti-radicalice cu IC_{50} egală cu 0,86 μmol/L, care este de 71,1 ori mai înaltă decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activităţii de inhibare a radicalilor superoxizi şi este de 1,15 ori mai efectiv decât soluţia cea mai apropiată. Proprietatea stabilită a nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]-hidraziniliden}metil)fenolato]aqua-cupru susnumit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.
Analiza comparativă a nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbono-imidoil] hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru cu soluţia cea mai apropiată demonstrează că ei se deosebesc prin aceea că aparţin diferitor clase de compuşi coordinativi ai cuprului(II) şi în compusul revendicat se realizează o combinare nouă de legături chimice.
Nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}-metil)fenolato] aquacupru revendicat se obţine la interacţiunea soluţiei etanolice fierbinţi (50-55°C) a trihidratului nitratului de cupru(II) cu etil-2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-etilizotiosemicar-bazona 2-hidroxibenzaldehidei], luate în raport molar de 1:1. Reacţia decurge în 50-60 min conform următoarei scheme:



Mecanismul prezentei reacţii este legat de faptul că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adiţia la ionul de cupru(2+) a moleculei de 4-alil-S-etilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei, care joacă rolul de ligand-O,N,N tridentat monodeprotonat. Al patrulea loc în sfera internă este ocupat de atomul de oxigen al moleculei de apă, iar al cincilea loc este ocupat de un atom de oxigen al nitrat-ionului monodentat.
Exemplu de obţinere a nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil] hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru.
Se amestecă 20 ml de soluţie etanolică, care conţine 10 mmol de etil-2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-etilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei] cu 10 mmol de $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, dizolvat în 10 ml de alcool. Amestecul reactant este încălzit (50-55°C) şi amestecat în permanenţă cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 50-60 min. La răcire din soluţie se depun cristale mărunte de culoare verde întunecată, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu o cantitate mică de etanol, eter şi uscate la aer. Randamentul produsului final alcătuieşte 75% de la cel calculat teoretic.
S-a determinat, % : C –38,54; H –4,30; Cu -15,47; N- 13,87; S – 7,77.
Pentru $C_{13}H_{18}CuN_4O_5S$ s-a calculat, % : C –38,47; H – 4,47; Cu -15,65; N- 13,80; S – 7,90.
Benzile de absorbţie în spectrul IR, cm^{-1} : 3407 (ν(OH), H_2O); 3080 ν(N^2H); 1642 ν($C=C_{alil}$); 1600, 1548 ν(C=N); 1214 ν(C-O); 1119 ν(CH_2-S); 655 ν(C-S); 529, 510, 486, 478 ν(M-N; M-O).
μ_{ef} = 1,83 m. B. (294K)

Procedeul de obţinere a compusului declarat este simplu în executare, substanţele iniţiale sunt accesibile. Etil-2-(2-hidroxi-benziliden)-N- (prop-2-en-1-il)hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-etilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei] a fost sintetizată după metodica descrisă în (Pahontu E., Usataia I., Graur V., Chumakov Yu., Petrenk, 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, Nr. 12, p. 4544).
Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puţin solubil în apă şi alcooli alifatici, este solubil în dimetilformamidă şi dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.
La recristalizarea hidratului de nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil] hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru din soluţie etanolică au fost obţinute 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_α.
Procedeele de determinare a parametrilor celulei elementare şi de integrare a datelor experimentale au fost efectuate cu ajutorul setului de programe “CrysAlis package Oxford Diffraction”. Pentru structura cercetată soluţia a fost determinată prin metoda directă cu ajutorul programului SHELXS-97 şi fitată prin metoda patratelor minimale în cadrul programului SHELXL-97 în varianta anizotropică pentru toţi atomii cu masă molară mai mare decât a atomului de hidrogen. Atomii de hidrogen au fost introduşi în poziţii idealizate (d_{CH} = 0.96 Å) utilizând modelul pivot cu fixarea parametrilor izotropici de deplasare la valoarea de 120% faţă de valorile respective ale atomilor de carbon cu care sunt legaţi. Formula empirică a compusului investigat $C_{34}H_{38}ClCuN_6O_6S_2$, grupa spaţială P-1, parametrii celulei elementare, [Å]: a = 7,4464(9); b = 9,9324(7), c = 12,1455(9); α = 92,397(6)°, β = 101,133(8)°, γ = 105,318(8)°.
A fost stabilit că nodul coordinativ al compusului complex investigat are structură tetragonal-piramidală distorsionată (Figura: Structura nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil) (prop-2-en-1-il)-carbonoimidoil]hidraziniliden}metil) fenolato] aquacupru).
În sfera internă a atomului central se află o moleculă de izotiosemicarbazonă tridentată, care coordinează la atomul de cupru prin atomii de oxigen fenolic deprotonat [d(Cu-O) = 1,895 Å], atomii de azot azometinic [d(Cu-N) = 1,939 Å] şi azot tiocarnamidic N^4 [d(Cu- N^4) = 1,963 Å], formând două metalocicluri din şase şi cinci atomi. În favoarea coordinării azometinei prin atomul de azot tiocarnamidic N^4 vorbeşte şi distanţa d(C-S) = 1,748 Å. Legătura dublă în molecula de izotiosemicarbazona coordinată se află între atomii de carbon şi azot N^4 [d(C^3 - N^4) = 1,287Å]. Distanţa între atomii de carbon şi azot N^3 este mai lungă [d(C^3 – N^1) = 1,362Å]. Al patrulea loc în sfera internă a atomului de cupru îl ocupă atomul de oxigen al moleculei de apă [d(Cu – O_w) = 1,981Å], iar al cincilea loc în sfera internă a complexului este ocupat de atomul de oxigen al nitrat-ionului cu distanţa d(Cu-O) = 2,453Å. Alte distanţe interatomice şi unghiurile de valenţă sunt standarde pentru compuşii din această clasă.
Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor şi a cercetărilor fizico-chimice, a fost stabilită compoziţia şi structura compusului declarat.
Esenţa invenţiei poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.
Exemplu al utilizării nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden} metil)fenolato]aquacupru în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.
Activitatea de captare a radicalului superoxid a fost determinată prin metoda spectrofotometrică, descrisă în (Fontana M., Mosca L. and Rosei M.A. Interaction of enkephalines with oxyradicals. Biochemical Pharmacology, 2001, Vol. 61. p 1253-1257; Robak J. and Gryglewski R. J. Flavonoids Are Scavengers of Superoxide Anions. Biochemical Pharmacology, 1988, Vol. 37, Nr. 5, p. 837-841) 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 diluţiile de lucru ale substanţelor testate în soluţie de DMSO în concentraţiile 0,1; 1,0; 10,0; 100 µM/l. Apoi, se pipetează câte 20 µl de fiecare diluţie de lucru ale substanţelor testate în godeurile microplăcii cu 96 godeuri. Fiecare diluţie se toarnă în dublicat. După aceasta se adaugă câte 180 µl de mediu (amestec) de reacţie ce conţine soluţie de 20 mM tampon fosfat (pH 7,4), NADH (0,1 mM) şi NBT (0,09 mM). Proba de control se montează la fel ca şi proba de cercetat, dar în loc de diluţii ale substanţelor de testat se toarnă o cantitate echivalentă de soluţie de 20 mM tampon fosfat (pH 7,4). Se pregăteşte în dublicat. Se amestecă şi se măsoară absorbanţa la 560 nm [Ao]. Apoi, în toate godeurile se adaugă câte 20 µl de soluţie de 8,0 µM fenazin metosulfat (FMS), se agită 10-15 s şi se incubează la temperatura camerei 5 min. Se măsoară din nou absorbanţa Abs la 560 nm [A_1]. În calitate de substanţă de referinţă se foloseşte quercetina în concentraţiile 0,1; 1,0; 10,0; 100 µM/l.
Activitatea de captare a radicalilor superoxizi (ACRS) se calculează (%) după formula:
ACRS (%) = [100-(A_1/Ao)] x 100
Datele experimentale obţinute privind studierea proprietăţilor inhibitoare ale nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]-hidraziniliden}metil)-fenolato]aquacupru sunt prezentate în Tabel, din care se observă, că el manifestă activitate anti-radicalică cu IC_{50} egală cu 0,86 µmol/L, care este de 71,1 ori mai înaltă decît a quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activităţii de inhibare a radicalilor superoxizi şi este de 1,15 ori mai efectiv decât soluţia cea mai apropiată.

Proprietăţile depistate ale nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil] hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori sintetici ai radicalilor superoxizi.

Tabel
Activitatea anti-radicalică a compusului revendicat în comparaţie cu quercetina şi soluţia cea mai apropiată

Compusul	IC_{50}, μmol/L
Quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxiflavona) [1]	61,86
Bis(2,4,6-trinitrofenolatului) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvatul (prototipul)	0,99
Nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]-hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru	0,86