

SINTEZA UNOR NOI DERIVAȚI AI 1,2,4-TRIAZOLULUI CU GRUPĂRI TIOUREIDICE ȘI CERCETAREA PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE

Anna ZATÎC, Roman RUSNAC

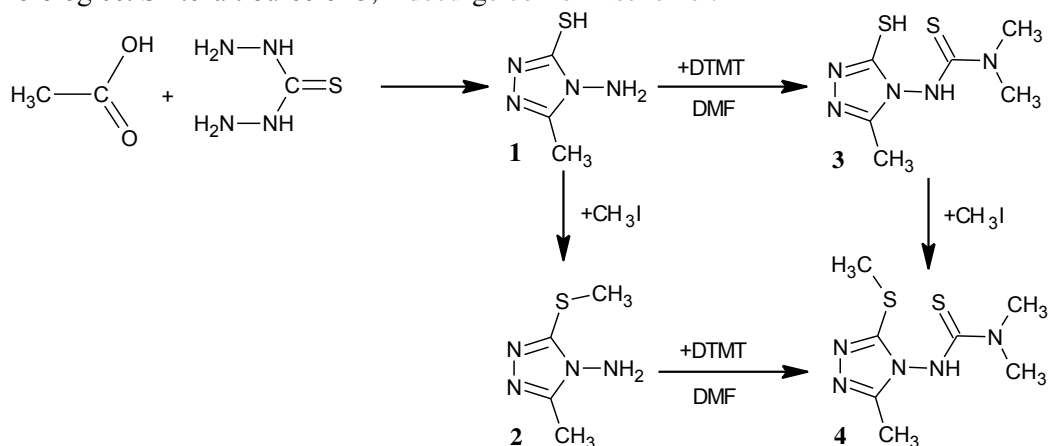
Universitatea de Stat din Moldova

Rezumat: În lucrarea dată s-a studiat sinteza 1,1-dimetil-3-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)tioureea (3) și 1,1-dimetil-3-[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]tioureea (4), structurile cărora au fost stabilite cu ajutorul spectrelor $^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$. Tioureea (3) și (4) sunt necunoscute în sursele de specialitate și pot fi utilizate ca potențial biologic activ. A fost efectuat studiul biologic al tioureei (4), asupra celulelor de cancer. Rezultatele au dovedit o bună inhibiție a celulelor de cancer la concentrații destul de mici 0,1 ($\mu\text{M/L}$), cu o inhibiție de 7.97 %.

Cuvinte cheie: 1,2,4-triazol, antiproliferativ, celule de cancer;

În ultimii ani, chimia triazolilor și derivații lor au primit o atenție considerabilă datorită sintezei acestora și importanței biologice efective. Compuși triazolici cu grupări N,N-dimetiltioureidice în literatură lipsesc. Studiu literaturii de specialitate arată că derivații 1,2,4-triazolului prezintă o gamă largă de activități biologice, inclusiv: antibacteriene, antitumorale, antituberculoase, anticancer și antiproliferative [1-3].

Noi am avut ca scop sinteza 1,1-dimetil-3-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il) tioureea (3), 1,1-dimetil-3-[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]tioureea (4), stabilirea structurii și cercetarea unor proprietăți biologice. Sinteza tioureeilor 3, 4 decurge conform schemei:



Aminotriazolii 1, 2 sunt cunoscuți. Aminotriazolul 1 se obține prin refluxarea acidului acetic cu tiocarbohidrazidă, cu un randament de 91 %. Aminotriazolul 2 sub formă de iod hidrat se obține în urma reacției dintre iod-metan și aminotriazolul 1 în metanol cu un randament de 37 % [4]. Noi am perfecționat aceasta metodă. La refluxarea aminotriazolului 1 cu iod-metan în tetrahidrofuran (THF), aminotriazolul 2 a fost obținut sub formă de iod hidrat cu un randament de 94 %.

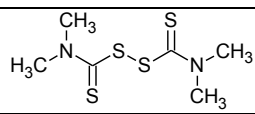
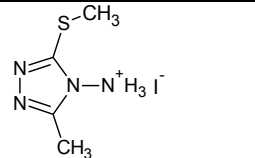
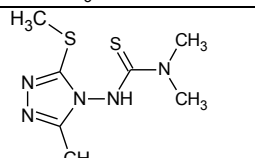
A fost cercetată dependența randamentului tioureeilor 3, 4 de anumiți factori. Sa constatat că aminotriazolul 1 la încălzire cu disulfura de tetrametiltiouran (DTMT), la un raport molar de 1 : 1.1 timp de opt ore la temperatura de 100-105 $^{\circ}\text{C}$ conduce la tioureea 3 cu un randament de 83 %. Aminotriazolul 2 în condiții similare dă un randament al tioureei 4 numai de 57 %. O așa mare diferență în randamente poate fi explicată prin creșterea dificultăților sterice ce apar la aminotriazolul 2 în reacția cu DTMT, când gruparea SH este înlocuită cu SCH_3 . La tratarea tioureeilor 3, 4 cu iod-metan se așteaptă formarea S-metilziotioureeilor respective. Cercetările acestor reacții au demonstrat, că numai tioureea 3 se metilează la grupa SH, iar grupa $\text{C}=\text{S}$ tioureidică 3, 4 rămâne neafectată, probabil din cauza dificultăților sterice. Structura tioureeilor 3, 4 a fost confirmată de spectrele $^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$. A fost studiată proprietatea tioureei 4 de a induce apoptoza în celulele tumorale umane din linia Mew-164 (celule de melanom), și HeLa (celule epiteliale de cancer de col uterin), și a fost examinat efectul inhibitor asupra proliferării liniilor celulare "normale" Aw-4 (fibroblaste umane) și MDCK (celule epiteliale renale de câine). S-a constatat că tioureea 4 are o citotoxicitate mică, deoarece promovează proliferarea liniei celulare "normale" Aw-4. Pentru a evalua inhibarea proliferării celulelor a fost aplicată metoda MTT spectrofotometria pe baza capacităților dehidrogenazelor mitocondriale de a reduce sarea de tetrazoliu MTT (bromura de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-

2,5-difeniltetrazoliu) până la formazan (5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan). Măsurarea a fost realizată cu ajutorul spectrofotometrului (Hamilton HR700) la o lungime de undă de 540 nm [3].

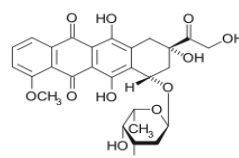
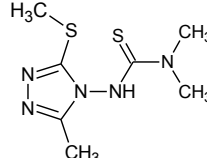
Tabelul 1. Datele experimentale obținute la cercetarea activității biologice a tioureei **4** pe celule de melanom și fibroblast, ca substanță pentru comparație este luată Doxorubicina.

Codul	Mr	Concentrația (μM/L)	Mew-164 Melanom		Aw-4 Fibroblast	
			Inhibiția (%)	IC ₅₀ (μM)	Proliferarea (%)	IC ₅₀ (μM)
Doxorubicina	543.5			4.34		
4	231.0	10	89.60 ± 0.4	0.45	109.38 ± 2	22.2
		1	59.79 ± 1		111.13 ± 4	
		0.1	7.97 ± 4		109.38 ± 6	

Tabelul 2. Concentrația minimă de inhibiție (CMI) și concentrația bactericidă minimală (CBM) a substanțelor: DTMT, **2** și **4** față de microorganismele gram-pozitive și gram-negativ (mg/ml).

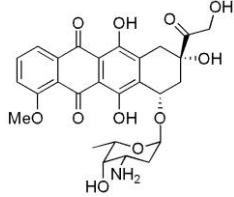
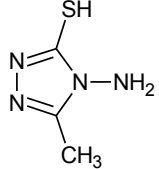
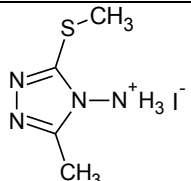
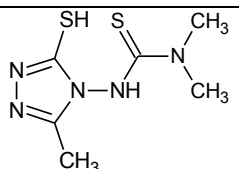
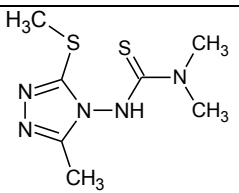
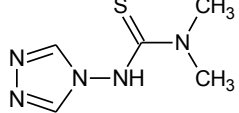
Codul	Formula	E. coli G -		Kl. pneumoniae		S. aureus G +		C. albicans	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
DTMT		0.0007	0.0007	0.06	0.12	0.0007	0.0007	0.0007	0.0007
2		0.5	0.5	0.5	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5
4		0.5	0.5	0.5	0.5	0.007	0.007	0.5	0.5

Tabelul 3. Cercetarea proprietăților antioxidante a tioureei **4**.

Formula	Codul	Mr	(μM) pentru ABTS	(μM) pentru DPPH
	ADR	580.0	9.3	≥100
C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Trolox	250.3	30	46
	4	231.3	29	≥100

Tabelul 4. Datele experimentale obținute la cercetarea activității biologice a substanțelor **1**, **2**, **3**, **4** pe celule de HeLa și MDCK, ca substanță pentru comparație este luată Doxorubicina.

Codul	Formula	Mr	Concentrația	HeLa	MDCK (Madin Darby Canine Kidney)

			($\mu\text{M/L}$)	% de inhibiție	IC ₅₀ μM	SD	% de inhibiție	IC ₅₀ μM	SD
Doxoru- bicina		543.5	10	57.4	3.1	2	58.5	4.0	9
			1	45.3			41.0		
			0.1	19.2			-2.3		
			0.01	4.3			-1.0		
1		130.1	100	-1.3	≥ 100	4	0,0	≥ 100	3
			10	-2.0			-7.2		
			1	-2.8			-2.1		
			0.1	0.7			4.7		
2		272.0	100	-	≥ 10	6	-15.0	≥ 100	3
			10	14.7			-16.0		
			1	12.4			-9.0		
			0.1	8.7			-7.0		
3		217.3	100	-4.0	≥ 100	8	-0.7	≥ 100	2
			10	-2.2			-7.7		
			1	16.3			1.9		
			0.1	22.2			1.9		
4		231.3	100	-	≥ 10	3	3.5	≥ 100	2
			10	8.2			-8.8		
			1	1.3			4.9		
			0.1	6.5			8.8		
5		171.0	100	13.3	≥ 100	3	29.1	≥ 100	4
			10	-5.2			6.2		
			1	1.0			1.7		
			0.1	-1.8			0.5		

Partea experimentală:

4-Amino-5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-tiol (1). Amestecul format din 2.120 g (0.02 mol) tiocarbhidrazidă și 6 ml acid acetic glacial se refluxează o oră jumate, apoi se răcește. Cristalele căzute se filtrează, se spală cu apă rece și se usucă. Filtratul se concentrează, se răcește și se obține încă o porțiune de produs. Randamentul constituie 2.520 g (91 %), p.t 194-196 °C – corespunde cu cel din literatură. $R_f = 0.45$ (eluent - benzen, etil-acetat 1:1).

Spectrele RMN: $^1\text{H-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 2.24 (s, 3H CH_3); 5.50 (s, 2H NH_2); 13.41 (s, 1H SH). $^{13}\text{C-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 10.86 ($-\text{CH}_3$); 149.64 (S- CH_3); 165.84 (C-S).

3-Metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-amino-iodhidrat (2). Amestecul format din 1.300 g (0.01 mol) 4-amino-5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-tiol, 1.420 g (0.01 mol) iod-metan și 20 ml THF, se refluxează 3 ore. Din reacție rezultă cristale incolore de aminotriazol iodhidrat **2** insolubil în THF. După răcire produsul se filtrează, se spală cu THF și se usucă. Se obțin 2.540 g (94 %), p.t. 163-164 °C.

Spectrele RMN: $^1\text{H-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 2.27 (s, 3H CH_3); 2.52 (s, 3H $\text{CH}_3\text{-S}$); 5.83 (s, 2H NH_2). $^{13}\text{C-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 10.17 ($-\text{CH}_3$); 13.42 ($-\text{CH}_3\text{-S}$); 152.44 (C- CH_3); 153.70 (C-S- CH_3).

1,1-Dimetil-3-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)tioureea (3). Amestecul format din 1.300 g (0.01 mol) 4-amino-5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-tiol (**1**), 2.640 g (0.011 mol) DTMT și 4 ml DMF, se încălzește la temperatura 100-105 °C opt ore într-un balon înzestrat cu un refrigerent ascendent. Refrigerentul ascendent se înlocuiește cu altul descendent și se distilează solventul la presiune redusă. Restul organic se tratează sub agitare cu 10 ml soluție 1M de hidroxid de sodiu, se filtrează rapid sulful iar filtratul

se neutralizează cu acid clorhidric (pH = 7). Tioureea **3** se filtrează, se spală cu apă și se usucă. Se obțin 1.800 g (83 %), p.t. 234-236 °C. $R_f = 0.22$ (eluent - benzen, etilacetat 1:1).

Spectrele RMN: $^1\text{H-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 2.18 (s, 3H CH_3); 3.30 (s, 6H $(\text{CH}_3)_2\text{N}$); 10.45 (s, 1H NH); 13.51 (s, 1H SH). $^{13}\text{C-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 11.20 ($-\text{CH}_3$); 150.88 (C- CH_3); 167.49 (C-S); 182.38 (C=S).

1,1-Dimetil-3-[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]tioureea (4) Amestecul alcătuit din 2.720 g (0.01 mol) 3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-amino-iodhidrat (**2**), 2.640 g (0.01 mol) DTMT, 0.840 g (0.01 mol) hidrogenocarbonat de sodiu și 5 ml DMF, se încălzește cu refrigerent ascendent opt ore la temperatura 100 °C. Amestecul se răcește la temperatura camerei și se filtrează sedimentul, o parte de sulf, apoi din filtrat se distilează solventul la presiune redusă. Solidul, tioureea **4** se purifică prin extragerea sulfului cu benzen. Apoi solidul se recristalizează din apă. Se obțin 1.320 g (57 %) tiouree **4** p.t. 94-95 °C. $R_f = 0.4$ (eluent - benzen, izopropanol 1:1).

Spectrele RMN: $^1\text{H-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 2.19 (s, 3H CH_3); 2.53 (s, 3H $\text{CH}_3\text{-S}$); 3.29 (s, 6H $(\text{CH}_3)_2$); 10.68 (s, 1H NH). $^{13}\text{C-RMN}$, 400 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 10.43 ($-\text{CH}_3$); 15.04 ($-\text{CH}_3\text{-S}$); 152.18 (C- CH_3); 153.30 (C-S- CH_3); 182.02 (C=S).

Interacțiunea 1,1-dimetil-3-(3-metil-5-sulfanil-4(H)-1,2,4-triazol-4-il)tioureei (3) cu iod-metan. Amestecul format din 0.430 g (0.002 mol) tiouree **3**, 0.284 g (0.002 mol) iod-metan și 3 ml THF se încălzește într-o fiolă închisă trei ore. Solventul se distilă, produsul se tratează cu soluție diluată de tiosulfat de sodiu, se spală cu apă și se usucă. Se obțin 0.277 g (60 %), produs identic după punctul de topire, R_f și spectrele $^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$ cu tioureea **4**.

Concluzii

Au fost sintetizați doi derivați noi **3**, **4** ai 1,2,4-triazolului, au fost cercetate proprietățile biologice a acestor derivați și a substanțelor inițiale. Rezultatele au arătat că tioureea **4** a demonstrat activitatea antiproliferativă cu mult mai bună $\text{IC}_{50} = 0.45 \mu\text{M}$, în comparație cu substanța martor - doxorubicina $\text{IC}_{50} = 4.34 \mu\text{M}$, pe celule de melanom (Mew-164). În același timp **4** are proprietate de proliferare a celulelor normale fibroblaste (Aw-4). Pentru celule de cancer cervical substanțele **2** și **4** au demonstrat o activitate mai puțin pronunțată. Substanța inițială DTMT a demonstrat rezultate antibacteriene foarte bune CMI 0.0007 mg/ml, iar substanțele **2** și **4** au CMI 0.007 mg/ml și respectiv 0.06 mg/ml. Tioureea **4** are proprietăți antioxidante $\text{IC}_{50} = 29 \mu\text{M}$ comparative cu troloxul.

Bibliografie

1. Vandana Sharma, Birendra Shrivastava, Rakesh Bhatia, Mukesh Bachwani, Rakhi Khandelwal, Jyoti Ameta. *Pharmacologyonline 1*: 2011, p.1192-1222.
2. Pahontu E., Julea F., Tudor R., Purcarea, Chumacov Yu., Petrenco P., Gulea A. *Antibacterial, antifungal and in vitro antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones*, J. Cell. Mol. Med. Vol.19 N4, 2015, IF=3.698 ISSN: 1582-4934 p. 865-878.
3. Elzbieta Anuszevska, Bozena Chtopkiewicz, Beata Gruber, Jadwiga Marczevska, Waldemar Priebe and Henryk Skurzak. *Estimation of dna damage and cytotoxicity of anthracycline analogs in human melanoma cells on early and late passages*. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 63 N4, 2006 ISSN: 0001-6837 p. 321-324.
4. Carl-Friedrich Kröger, Ernst Tenor und Hans Beyer *Über 1,2,4-triazole, II* Justus Liebigs Annalen der Chemie Volume 643, Issue 1, 1961, p. 121-128.