

SINTEZA 4-(2-PIRIDIL)TIOSEMICARBAZIDEI ȘI A UNOR 4-(2-PIRIDIL) TIOSEMICARBAZONE ȘI ACTIVITATEA ANTIPROLIFERATIVĂ A CELULELOR LEUCEMICE HL-60

Tatiana CĂPĂȚÎNĂ, Aurelian GULEA, Alic BARBĂ

Catedra Chimie Anorganică

In the present work it was proposed a new method of synthesis of 4-(2-pyridyl) thiosemicarbazide and were synthesized eight 4-(2-pyridyl) thiosemicarbazons by the known method. The identity and purity of organic obtained compounds were demonstrated by chromatography, melting point, as well as by ^{13}C and ^1H NMR spectra. The synthesized substances were tested, studying the antiproliferative activity of HL-60 leukemia cells. The properties of compounds represent an interest for medicine in terms of expanding of an arsenal of inhibitors in human leukemia HL-60 myeloid, thiosemicarbazone manifest comparable activity with the one of such drugs as doxorubicin (Doxo) used in medicine for leukemia treatment.

Introducere

Tiosemicarbazonele aldehydelor și cetonelor conțin în componența lor un spectru larg de atomi donori și formează cu ionii metalelor de tranziție compuși coordinativi diferiți după compoziție și natură. Mulți din ei posedă proprietăți specifice, datorită cărora au găsit implementare în chimia analitică, în medicină și în veterinarie. Unii dintre acești compuși manifestă proprietăți antimicrobiene, antifungice, anticancer etc.

Este cunoscută metoda de obținere a 4-(2-piridil)tiosemicarbazidei prin interacțiunea 2-aminopiridinei cu sulfura de carbon în mediu bazic la rece, urmată de o încălzire ușoară a amestecului reactant în prezența hidrazinei [1]. A fost studiată tautomeria acestui compus [2], proprietățile antimicrobiene și antifungice [3], de asemenea compușii coordinativi cu platina [4].

Pe baza 4-(2-piridil)tiosemicarbazidei au fost obținute și cercetate tiosemicarbazone cu proprietăți antimalariale și antibacteriene [5,6], inclusiv unii complecși ai lor cu diferite metale [7-15], și anume: unii compuși coordinativi cu Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pd(II), ruteniu și dioxouraniu [8-11]. Au fost cercetate proprietățile antioxidative și antibacteriene ale compușilor coordinativi ai tiosemicarbazidei cu Mn(II), Co(II), Zn(II), Fe(III) și U(VI) [12], antifungice Pd(II) [13], antibacteriene și citotoxice Pt(IV) [14], antimicrobiene și antifungice Cr(III), Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) și Cd(II) [15]. Compușii cu structuri analoage contra leucemiei nu au fost cercetați.

Scopul acestei lucrări constă în elaborarea unei noi căi de sinteză a 4-(2-piridil)tiosemicarbazidei și în obținerea de 4-(2-piridil)tiosemicarbazone pentru cercetări biologice (anticancer).

I. Partea experimentală

I.1. Reactivi și metode de cercetare

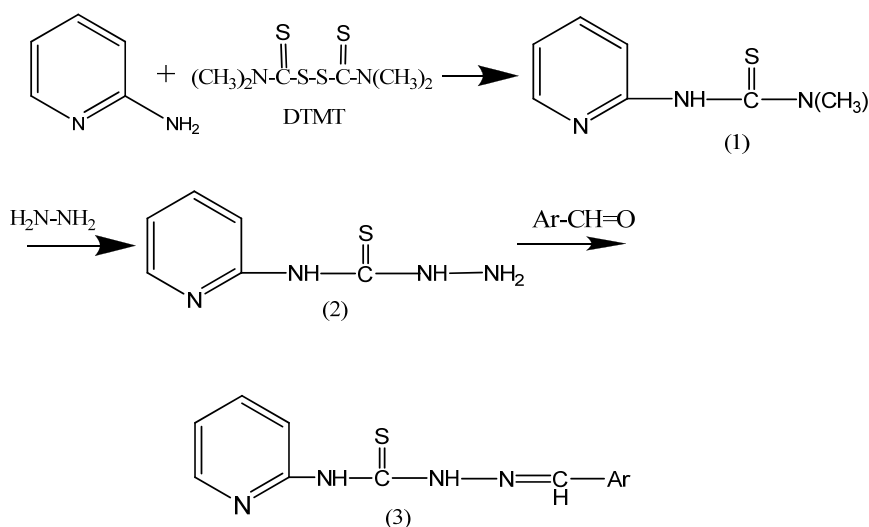
Toți reactivii și solvenții utilizați au fost de puritate analitică, procurați de la firma „Aldrich”. Spectroscopia Rezonanței Magnetice Nucleare (RMN) ^1H și ^{13}C a fost efectuată la temperatura camerei utilizând spectrometrul Bruker DRX-400. Toate datele (^1H , ^{13}C) sunt prezentate în ppm față de SiMe_4 . În calitate de solvent a fost utilizat DMSO-d_6 .

I.2. Metodica de cercetare a activității antiproliferative a celulelor leucemice HL-60

Celulele leucemiei umane mieloide HL-60 obținute din Colecția Culturilor Tip American (*American Type Culture Collection, Rockville, MD*) au fost cultivate în formă de suspensie în mediul RPMI-1640, suplimentat cu 10% (V/V) ser embrionic de bovine, 2 mM de L-glutamină, 100 IU penicilină/ml și 100 μg de streptomycină/ml și incubate în atmosferă umedă de 95% aer / 5% CO_2 la 37°C. Celulele au fost amestecate de 2-3 ori pe parcursul săptămânii, pentru a le păstra în fază omogenă. După aceasta, celulele au fost plasate în vase Falcon din plastic pentru culturi cu 24 de compartimente (2 cm^2 /celulă) la densitatea inițială de $1 \cdot 10^5$ celule/ml/compartiment și tratate cu soluții de diferită concentrație ale compusului în apă sterilă. Fiecare procedură de tratare cu aceeași concentrație a fost efectuată în câte trei compartimente.

I.3. Metode de sinteză

Tiosemicarbazida și derivații ei au fost obținuți după următoarea schemă:



Sinteza 4-(2-piridin)tiosemicarbazonelor a fost efectuată în conformitate cu prevederile generale. Timpul de reacție depinde de reactivitatea compușilor carbonilici (Tab.1).

Sinteza 1,1-dimetil-3-(piridin-2-il)tioureei (1). Amestecul format din 8,27 g (0,088 mol) 2-aminopiridină, 21,2 g (0,088 mol) disulfură de tetrametiluram (DTMT) și 30 ml dimetilformamidă se încălzește pe baia de apă (95°C) timp de 4 ore (DTMT în trei rate, câte ~ 7 g). Solventul din amestecul reactant se distilează la presiune redusă, iar produsul rămas se tratează cu soluție de acid clorhidric 2 M până la pH=4. Sulfur insolubil se filtrează, soluția se neutralizează cu hidroxid de sodiu până la pH=8, apoi sedimentul se filtrează. Se obțin 12,3 g (88%) dimetiltiouree, p.t.=110-113°C (din etanol).

Sinteza 4-(2-piridil)tiosemicarbazidei (2). Amestecul format din 2,7 g (0,015 mol) 1,1-dimetil-3-(piridin-2-il)tiouree (1), 0,9 g (0,018 mol) hidrat de hidrazină și 20 ml benzen se refluxează 2 ore. Sfârșitul reacției se determină cromatografic (silufol, eluent: benzen: acetat de etil, 1:1) după consumul de tiouree (1) în mediul reactant. Produsul de reacție, fiind rău solubil în benzen, se cristalizează în timpul reacției și după răcirea amestecului se filtrează. Se obțin 2 g (74%) tiosemicarbazidă (2), p.t.= 214-215°C (din etanol).

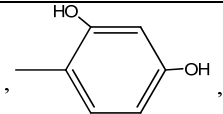
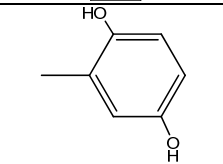
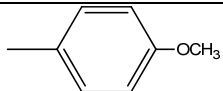
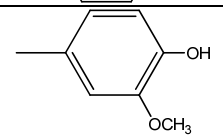
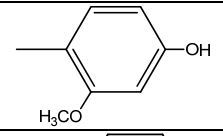
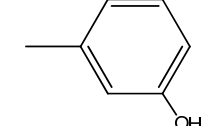
Sinteza 4-(2-piridil)tiosemicarbazonelor (3a-h). La soluția de 0,002 mol de 4-(2-piridil)tiosemicarbazidă (2), dizolvată într-o cantitate minimală de etanol, se adaugă 0,0022 mol compus carbonilic și amestecul se încălzește la temperatura de 70-80°C. Sfârșitul reacției se determină cromatografic (silufol, eluent benzen-acetat de etil, 1:1) în raport cu consumul de tiosemicarbazidă (2). Caracteristica tiosemicarbazonelor (3a-h) și timpul reacției sunt indicate în Tabelul 1. Structura lor este confirmată prin spectre ^1H și ^{13}C -RMN.

Tabelul 1

Caracteristica 4-(2-piridil)tiosemicarbazonelor

Nr. crt.	Compusul	Timpul de reacție	p.t., °C	η , %
1		4 h	110-113	88
2		2 h	214-215	74
3a		50 min.	181-184	60
3b		45 min.	191-193	82

Tabel 1 (continuare)

3c		45 min.	222-225	85
3d		45 min.	185-187	72
3e		50 min.	220-221	67
3f		45 min.	188-190	58
3g		1 h	220-221	55
3h		50 min.	208-209	76

I.5. Cercetări RMN ^1H și ^{13}C

1,1-dimetil-3-(piridin-2-il)tioureea (1). Spectrul ^1H RMN (DMSO- d_6): 9,48 (s, 1H, NH); 8,29; 7,69; 7,03 (m, 3H, piridina); 2,97; 2,51 (s, 2H, 3H, CH_3). Spectrul ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 181,52 (C=S); 154; 147,76; 137,10; 119,21; 118,36 (piridina); 41,45 (2 CH_3).

4-(2-piridil)tiousemicarbazida (2). Spectrul ^1H RMN (DMSO- d_6): 12,60 (1H, NH); 10,58 (1H, NH); 5,25 (2H, NH_2); 9,54; 8,30; 7,76; 7,22; 7,11 (piridina). Spectrul ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 176,81 (C=S); 154,57; 146,06; 118,25; 112,78 (piridina).

N-(piridin-2-il)tiousemicarbazona 2-hidroxi-benzenului (3a). Spectrul ^1H RMN (DMSO- d_6): 12,55 (1H, NH); 10,21 (1H, NH); 8,82; 8,16; 8,14; 7,78 (4H piridina); 7,14; 7,12; 7,56; 7,44 (4H, benzol); 12,41 (1H, OH). Spectrul ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 176,57 (C=S); 151,84; 150,24; 145,78; 136,71; 135,22 (piridina); 145,13 (N=CH); 158,87 (C-NH); 117,88; 117,85; 124,41 și 124,58 (benzol); 160,78 (C-O).

N-(piridin-2-il)tiousemicarbazona 2,2(2,4; 2,5)-dihidroxi-benzenului (3b-d). Spectrul ^1H RMN (DMSO- d_6): 12,61 (1H, NH); 10,58 (1H, NH); 8,64; 8,33; 8,24; 7,77 (4H piridina); 7,19; 7,17; 7,15 (3H, benzol); 10,06; 9,53 (2H, OH). Spectrul ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 177,03 (C=S); 151,84; 150,24; 145,78; 136,71; 135,22 (piridina); 146,22 (N=CH); 159,04 (C-NH); 118,66; 117,96; 113,21; 112,73; 108,61; 108,25 (benzol); 161,51; 160,78 (C-O).

2-(4-metoxibenziliden)-N-(piridin-2-il)tiousemicarbazona (3e). Spectrul ^1H RMN (DMSO- d_6): 12,63 (1H, NH); 10,60 (1H, NH); 8,41; 7,95; 7,89; 7,77 (4H piridina); 7,38; 7,16; 7,14; 6,96 (4H, benzol); 2,89; 2,73; 2,51 (3H, CH_3). Spectrul ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 176,99 (C=S); 154,08; 152,35; 143,09; 139,37; 132,06 (piridina); 146,04 (N=CH); 122,85; 121,65; 120,79; 118,03; 112,79; 111,44 (benzol); 162,76 (C-O).

2-(3-oxoindolin-2-iliden)-N-(piridin-2-il)tiousemicarbazona (3f-g). Spectrul ^1H RMN (DMSO- d_6): 12,59 (1H, NH); 10,57 (1H, NH); 8,85; 8,83; 8,29; 8,21 (4H piridina); 7,14; 7,09; 7,02; 7,00 (4H, benzol); 9,52 (1H, NH). Spectrul ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 176,84 (C=S); 154,14; 148,48; 146,09; 139,30; 137,78 (piridina); 119,96; 117,95; 114,51; 112,72 (benzol).

N-(piridin-2-il)tiousemicarbazona 3-hidroxi-benzenului (3h). Spectrul ^1H RMN (DMSO- d_6): 12,25 (1H, NH); 10,11 (1H, NH); 8,82; 8,16; 8,12; 7,78 (4H piridina); 7,14; 7,10; 7,76; 7,14 (4H, benzol); 13,41 (1H, OH). Spectrul ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 176,57 (C=S); 151,84; 150,24; 145,78; 136,71; 135,22 (piridina); 145,13 (N=CH); 158,87 (C-NH); 117,88; 117,85; 124,41 și 124,58 (benzol); 160,48 (C-O).

Rezultate și discuții

Tiosemicarbazidele și produșii lor de condensare, tiosemicarbazonele, posedă o activitate biologică sporită, fapt pentru care sunt pe larg utilizate în practica medicală. O atenție deosebită actualmente se acordă studiului proprietăților tiosemicarbazonelor și al reacțiilor ionilor unor metale cu acești liganzi biologic activi.

Cercetările proprietăților proliferative ale tiosemicarbazidei și tiosemicarbazonelor sintetizate au fost efectuate în Centrul Oncologic din orașul Laval (Canada). Datele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.

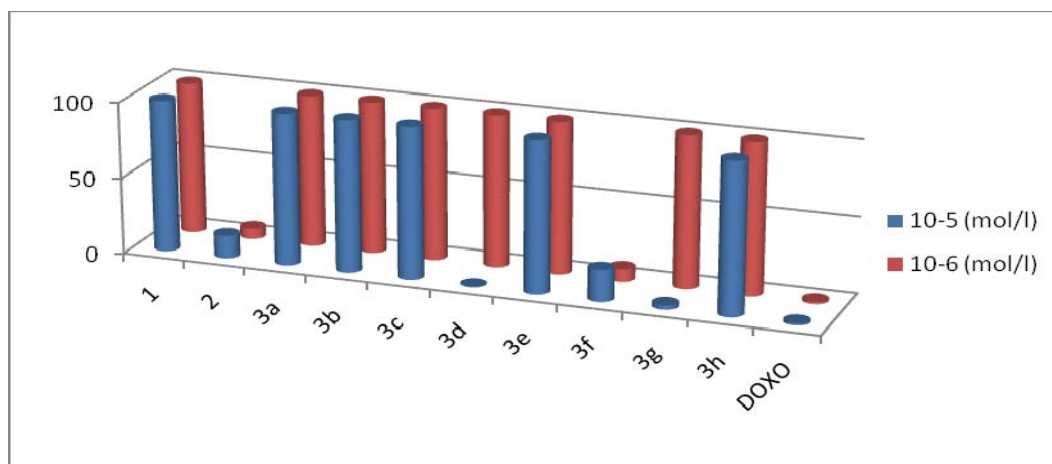
Tabelul 2**Partea celulelor de inhibare a leucemiei umane mieloide HL-60**

Nr. crt.	10^{-5} (mol/l), %	10^{-6} (mol/l), %
1	0	0
2	86,1	93,2
3a	0	0
3b	0	0
3c	0	0
3d	100,0	0
3e	0	0
3f	78,9	91,6
3g	97,3	0
3h	0	0

Tiosemicarbazonele obținute în baza 4-(2-piridil)tiosemicarbazidei substituie (3a-c, 3e și 3h) nu manifestă proprietăți cancerostatice, iar compușii sintetizați 3d, 3f și 3g substituiți inhibă. Datele din Tabelul 2 denotă că asupra activității anticancer a compușilor studiați influențează natura compusului carbonilic. Cea mai înaltă activitate au manifestat compușii obținuți în baza 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehidei, iar cea mai mică activitate – compușii în baza 2-metoxi-4-hidroxibenzaldehidei. Astfel, poziția grupei metoxi influențează asupra activității anticancer. Dacă fragmentul de hidroxibenzelidenic conține OCH_3 în poziția 2, atunci acest produs inhibă 97,3% de celule la concentrația 10^{-5} mol/l. Dacă grupa OCH_3 se află în poziția 3, atunci compusul manifestă activitate anticancer atât la concentrația de 10^{-5} (78,9%), cât și la cea de 10^{-6} M (91,6%).

4-(2-piridil)tiosemicarbazida (2) inhibă creșterea celulelor canceroase și manifestă activitate anticancer la ambele concentrații studiate, partea celulelor inhibitate fiind de 86,1% și 93,2%, respectiv.

1,1-dimetil-3-(piridin-2-il)tiourea (1) nu manifestă activitate anticancer la nici o concentrație.



Proprietățile depistate ale compușilor sintetizați prezintă interes pentru medicină din punctul de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai leucemiei mieloide umane HL-60. Tiosemicarbazonele manifestă o activitate comparabilă cu activitatea unor medicamente farmaceutice, precum doxorubicina (Doxo) utilizată în medicină pentru tratarea leucemiei.

Concluzii

În lucrare a fost sintetizată 4-(2-piridil)tiosemicarbazida printr-o metodă nouă, precum și 8 tiosemicarbazone. Puritatea compușilor organici obținuți a fost demonstrată prin cromatografie, punct de topire, precum și prin spectrele RMN ^1H și ^{13}C .

4-(2-piridil)tiosemicarbazida inhibă creșterea celulelor canceroase și manifestă activitate anticancer la concentrațiile de 10^{-5} mol/l și de 10^{-6} mol/l – de 86,1% și de 93,2%, respectiv.

1,1-dimetil-3-(piridin-2-il)tioureea nu manifestă activitate anticancer la nici o concentrație.

Asupra activității anticancer a compușilor studiați, care manifestă activitate anticancer, influențează natura compusului carbonilic. Cea mai înaltă activitate au manifestat compușii obținuți în baza 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldehydei.

Referințe:

1. Klarer J., Behnisch R. Thiosemicarbazides // No Corporate Source data Available, 1952.
2. Rapheal P.F., Manoj E., Kurup M.R. Prathapachandra; Suresh, E., -(Pyridin-2-yl)hydrazinecarbothioamide'' // Acta Crystallographica, Section E: Structure Reports Online, 2005, E6(17), p.2243-2245.
3. Vijey Aanandhi M., Shiny G., Vaidhyaligam V. Synthesis and antimicrobial activities of 1-(5-substituted-2-oxoindolin-3-ylidene)-4-(substituted pyridin-2-yl) // ARKIVOC, 2008 (11), p.187-194.
4. Bhowmik Sanjukta Ray, Gangopadhyay Snigdha; Gangopadhyay Pijush Kanti. Platinum coordination compounds of thiosemicarbazide derivatives: a new class of platinum blues // Journal of Coordination Chemistry, 2005, 58(9), p.795-801.
5. Klayman Daniel L, Bartosevich Joseph F., Griffin T. Scott, Mason Carl J., Scovill John P. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. // Journal of Medicinal Chemistry, 1979, 22(7), p.855-62.
6. Sriram Dharmajaran, Yogeewari Perumal, Dhakla Prathiba, Senthikumar Palaniappan. 5-nitrofuranyl derivatives: Synthesis and inhibitory activities against growing and dormant mycobacterium species // Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19(4), p.1152-1154.
7. Saxena R.C., Singh Y. Infrared and thermal studies of pyridyl thiosemicarbazone of pyridine-2-aldehyde complexes of dioxouranium(VI) // Journal of the Institution of Chemists (India), 1995, 67(5), p.155-158.
8. El-Ayaan Usama. El-Reash Gaber Abu, Weinberger Peter; Linert Wolfgang. Synthesis, spectral and magnetic investigation of 4-(2-pyridyl)-1-salicylaldehyde-3-thiosemicarbazone // Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chem., 2000, 30(9), p.1759-1772.
9. Jain C.L., Mundley P.N., Bajaj R. Iron(III), ruthenium(III), rhodium(III), palladium(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes with N-(a-pyridyl)furfural-2-aldehyde thiosemicarbazone and N-(a-pyridyl)thiophene-2-aldehyde thiosemicarbazone // Journal of the Indian Chemical Society, 1992, 69(11), p.777-779.
10. El-Ayaan Usama. El-Reash Gaber Abu, Weinberger Peter, Khattab Mohamed A. Synthesis, spectral and magnetic investigation of isatin 4-(2-pyridyl)-3-thiosemicarbazone complexes // Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry, 1992, 22(9), p.1417-1428.
11. Jain C.L., Mundley P.N., Kumar Yogendra, Sethi P.D. Magnetic and ligand field spectral studies on iron(III), ruthenium(III), rhodium(III), palladium(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes with N-(a-pyridyl)furfural-2-aldehyde thiosemicarbazone and N(a-pyridyl)thiophene-2-aldehyde // Journal of the Indian Chemical Society, 1989, 66(7), p.431-434.
12. El-Ayaan Usama. Youssef Magdy M., Al-Shihry Shar. Mn(II), Co(II), Fe(III) and U(VI) complexes of 2-acetylpyridine 4N-(2-pyridyl)thiosemicarbazone(HAPT); structural, spectroscopic and biological studies // Journal of Molecular Structure, 2009, 936(1-3), p.213-219.
13. Mishra A.K., Mishra S.B., Manav N., Kaushik N.K. Thermal and spectral studies of palladium(II) complexes // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007, 90(2), p.509-515.
14. Mishra A.K., Mishra S.B, Manav N., Kumar R., Sharad Chandra R., Saluja D., Kaushik N.K. Platinum(IV) thiohydrazide, thiodiamine and thiohydrazone complexes: A spectral, antibacterial and cytotoxic study // Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2007, 66A(4-5), p.1042-1047.
15. El-Reash, Gaber M. Abu, Kenawy Ibrahim M.M., El-Ayaan Usama, Khattab Mohamed A. Synthesis and characterization of chromium(III), manganese(II), iron(III), cobalt(II), nickel(II), copper(II), cadmium(II) and dioxouranium(VI), complexes of 4(2-pyridyl)-1-(2,4-dihydroxybenzaldehyde)-3-thiosemicarbazone // Indian Journal of Chemistry. Section A: Inorganical, Physical, Theoretical&Analytical Chemistry, 1994, 33A(10), p.914-18.

Prezentat la 03.07.2012