

CZU: 547.791: 577

SINTEZA ȘI CERCETAREA PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE UNOR DERIVAȚI AI 4-AMINO-5-METIL-4H-1,2,4-TRIAZOLULUI-3-TIOL

*Anna RUSNAC, Roman RUSNAC,
Olga GARBUZ, Nicanor BARBĂ, Aurelian GULEA*

Universitatea de Stat din Moldova

În prezenta lucrare a fost realizată sinteza 1,1-dimetil-3-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)tioureei (**5**) și a 1,1-dimetil-3-[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]tioureei (**6**), ale căror structuri au fost stabilite cu ajutorul spectrelor ¹H-RMN și ¹³C-RMN. Pe celule de cancer cervical substanțele iodhidrat de 3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-amină (**2**) și **6** au demonstrat o activitate ne semnificativă. Disulfura de tetrametiltiuram (DTMT) a demonstrat rezultate antibacteriene bune CMI 0,0007 mg/mL, iar substanțele **6** și **2** au CMI 0,007 mg/mL și, respectiv, 0,06 mg/mL. Tioureea **6** are proprietăți antioxidante IC₅₀ = 29 μM/L aproximativ egale cu ale troloxului.

A fost realizată sinteza N-[4-(3-metil-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]-tiadiazin-6-il)fenil]-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamidae (**11**) și a bazei Schiff {[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]imino}metil]fenol (**3**). La compusul **3** a fost efectuată difracția cu raze X în monocristal.

Cuvinte-cheie: 1,2,4-triazol, antiproliferativ, celule de cancer, bază Schiff, antibacterian.

SYNTHESIS AND STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF NEW 4-AMINO-5-METHYL-4H-1,2,4-TRIAZOLE-3-THIOL DERIVATIVES

In the present work the synthesis of 1,1-dimethyl-3-(3-methyl-5-sulfanyl-4H-1,2,4-triazol-4-yl)thiourea (**5**) and 1,1-dimethyl-3-[3-methyl-5-(methylsulfanyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]thiourea (**6**) was carried out. The structures were determined using ¹H; ¹³C-NMR spectra. For cells HeLa of cervical cancer, substances 3-methyl-5-(methylsulfanyl)-4H-1,2,4-triazol-4-aminohydroiodide (**2**) and **6** have demonstrated not pronounced activity. Tetramethylthiuram disulfide (DTMT) showed good antibacterial activity MIC 0.0007 mg/mL, but substances **6** and **2** have MIC 0.007 mg/mL and 0.06 mg/mL respectively. The thiourea **6** has antioxidant properties IC₅₀ = 29 μM/L approximately equal to trolox.

Synthesis of N-[4-(3-methyl-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]-thiadiazin-6-yl)phenyl]-2-[1-(pyridin-2-yl)ethylidene]hydrazinecarbothioamide (**11**) and Schiff base: 2-[[3-methyl-5-(methyl-sulfanyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]imino}methyl]phenol (**3**) was carried out. The compound **3** was studied by conducted single-crystal X-ray diffraction.

Keywords: 1,2,4-triazole, antiproliferative, cancer cells, Schiff base, antibacterial.

Introducere

În ultimul deceniu cercetătorii s-au ocupat cu sinteza sistemelor heterociclice care conțin un număr mare de atomi de azot, deoarece posedă o varietate mare de aplicații, ca de exemplu: propulsoare, explozivi, piro-tehnică și în special chimeoterapie. Astăzi o atenție considerabilă se acordă sintezei derivaților 1,2,4-triazolului care au importanță biologică efectivă, toxicitate scăzută și bune profiluri în domeniul farmacocineticii și farmodinamicii. Studiul literaturii de specialitate arată că derivații 1,2,4-triazolului prezintă o gamă largă de activități biologice, inclusiv: antibacteriene, antifungice, analgezice, antitumorale, antituberculoase, antivirale, anti-cancer și antiproliferative [1-7].

Există mai multe metode de obținere a derivaților 1,2,4-triazolici. Pentru obținerea substanței inițiale 4-amino-5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-tiolului am utilizat următoarea metodă de sinteză: acidul acetic glacial se tratează cu tiocarbhidrazidă la reflux obținându-se produsul cu randament de 91% [8]. Varietatea 4-amino-5-alchil(aril)-4H-1,2,4-triazol-3-tiolilor depinde nu doar de natura acizilor carboxilici, dar și de transformările chimice la care pot participa grupele active NH₂ și SH (individual sau împreună). Un exemplu de transformare chimică pe grupa SH a fost efectuat în [6]. În această lucrare autorii au sintetizat derivați 5-substituiți-3-[5-hidroxi-4-pirone-2-il-metimercapto]-4-amino-1,2,4-triazoli prin substituție nucleofilă dintre 5-hidroxi-2-clorometil-4H-piran-4-onă cu 4-amino-5-alchil(aril)-4H-1,2,4-triazol-3-tiolilor. A fost cercetat efectul lor inhibitor pe ciuperci tirozinazei. Rezultatele au arătat că majoritatea acestor compuși au o activitate inhibitoare semnificativă. Sunt cunoscute și modificări pe grupa NH₂, baze Schiff [2-5]. Acestea se obțin la condensarea 4-amino-5-alchil(aril)-4H-1,2,4-triazol-3-tiolilor cu aldehide aromatice. Unele dintre acestea posedă o activitate antidepresantă bună [2], iar cele cu radicali, R = D-glucoheptonichexitol-1-il, sunt regulatori de creștere la

grâu și ridiche [3]. Sunt cunoscute transformările chimice unde la reacție participă ambele grupe. Iată un exemplu: prin condensarea 4-amino-5-(piridin-3-il)-4*H*-1,2,4-triazol-3-ului cu diferite chalcone au fost obținute 3-pipiridil-1,2,4-triazolo[3,4-*b*]-1,3,4-tiadiazine [7]. Cercetările biologice au demonstrat că compușii testați au proprietăți antibacteriene și antifungice modeste. Compuși triazolici cu grupări *N,N*-dimetiltioureidice nu sunt cunoscuți în literatură.

Sunt cunoscute tiosemicarbazona 2-acetilpiridinei cu proprietăți anticancer [9]. Scopul propus în această lucrare a fost de a introduce nuclee 1,2,4-triazolice în tiosemicarbazona 2-acetilpiridinei pentru a îmbunătăți activitatea anticancer a acestora și a micșora gradul lor de toxicitate, precum și obținerea bazelor Schiff cu derivați ai 1,2,4-triazolului.

I. Partea experimentală

I.2. Reactivi și metode de cercetare

Toți reactivii și solvenții utilizați au fost de puritate analitică, procurați de la firma „Aldrich”. Spectrele de Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN) ^1H și ^{13}C au fost înregistrate la temperatura camerei utilizând spectrometrul Bruker DRX-400. Deplasările chimice sunt prezentate în ppm față de SiMe_4 . În calitate de solvent a fost utilizat DMSO-d_6 .

I.3. Metoda de cercetare a activității antiproliferative

Celule de cancer cervical HeLa și celule „normale” MDCK au fost cultivate în formă de monostraturi în mediul DMEM cu conținut înalt de glucoză, L-glutamină, suplimentat cu (V 7,5%) 0,2%v/v, soluție tampon HEPES (acidul *N*-2-hidroxiethylpiperazin-*N'*-2-etansulfonic) 20 mM, antibiotic: penicilină-streptomicină (concentrația finală de 100 U/mL penicilină și 100 $\mu\text{g/mL}$ sulfat de streptomicină) și suplimentat cu ser fetal bovin 10% v/v în condiții de cultură (2% CO_2 , în atmosferă 78% umiditate și temperatura de 37°C). Celulele au fost tratate cu acidul tripsin etilendiaminotetraacetic (tripsină-EDTA) 0,05% și numărat sub un microscop inversat (OLYMPUS). Testul de proliferare celulară [10] a fost realizat folosind resazurin (sarea de sodiu 7-hidroxi-3*H*-fenoxazin-3-onă-10-oxid), care permite măsurarea numărului de celule viabile. Compușii studiați au fost dizolvați în dimetilsulfoxid (DMSO) cu concentrația de 10 mM. Compușii studiați și doxorubicina au fost diluați cu medii de cultură; la fiecare s-a adăugat godeu, după care au fost incubati timp de 24 de ore. Apoi la fiecare probă se adaugă 20 μL soluție de resazurin și se incubează timp de 4 ore. Ulterior, absorbanta a fost înregistrată la 570 nm și 600 nm cu filtru. Datele au fost prelucrate de către aparatul hibrid imagistic (Synergy H1, BioTek). Rezultatele screeningului pentru identificarea substanțelor care inhibă proliferarea celulelor canceroase liniei: HeLa (cancer cervical). Pentru a evalua citotoxicitatea substanțelor, am folosit linia de celule „normale” MDCK (celulele epiteliale renale de câine).

I.4. Metoda de cercetare a activității antimicrobiene

Activitatea antimicrobiană a fost determinată în mediul nutritiv lichid [bulion peptonat din carne 2%, pH 7,0] prin metoda diluțiilor succesive. În calitate de cultură de referință în experimentul *in vitro* au fost folosite tulpinile standard de *Staphylococcus aureus* (*S.aureus* G+), *Escherichia coli* (*E.coli* G-), *Klebsiella pneumoniae* (*Kl. pneumoniae*), *Candida albicans* (*C. albicans*). Dizolvarea substanței studiate în dimetilsulfoxid, cultivarea microorganismelor, obținerea suspensiei, determinarea concentrației minime de inhibare (CMI) și a concentrației minime bactericide (CMB) au fost efectuate după metoda standard descrisă în [11].

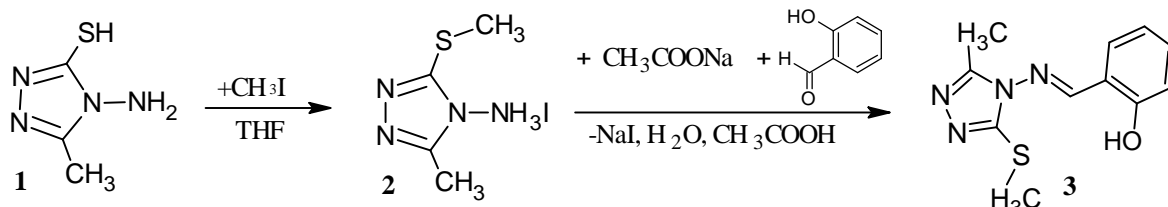
I.5. Metoda de cercetare a activității antioxidante

Pentru obținerea datelor referitoare la activități antioxidante ale tioureei **6** au fost utilizate două metode: ABTS și DPPH. A fost folosită măsurarea spectrofotometrică a densității optice a soluțiilor care conțin radicali liberi - colorați (cation radicalul ABTS (acidul 2,2'-azino-bis-3-ethylbenziazolin-6-sulfonic) și radicalul DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)), la care se adaugă substanțe (doxorubicina, troloxul, tiourea **6**) de diferite concentrații, unde troloxul și doxorubicina sunt utilizați în calitate de martori. În acest fel a fost determinată capacitatea substanțelor ce reacționează cu radicali ABTS și DPPH.

Activitatea antioxidantă prin metoda ABTS a fost evaluată în conformitate cu metoda descrisă de Re și colab. [12]. Activitatea antioxidantă prin metoda DPPH a fost efectuată în conformitate cu metoda descrisă de M.Burits [13].

I.6. Sinteza unor noi derivați ai 4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-tiolului (**1**) și iodhidrat de 3-metil-5-metilsulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-4-amină (**2**)

Aminotriazolii **1**, **2** sunt substanțe cunoscute [8,14], iar baza Schiff **3** nu este cunoscută în literatură.



Schema 1. Obținerea 2-[[3-metil-5-(metilsulfanil)-4*H*-1,2,4-triazol-4-il]imino}metil]-fenolului (**3**)

Iodhidrat de 3-metil-5-metilsulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-4-amină (**2**)

Amestecul format din 1,30 g (0,01 mol) 4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-tiol, 1,42 g (0,01 mol) iodmetan și 20 mL tetrahidrofuran (THF) se refluxează timp de 3 ore. Din reacție rezultă cristale incolore de iodhidrat **2** insolubile. După răcire produsul se filtrează, se spală cu THF și se usucă. Se obțin 2,54 g (93,5%) de iodhidrat **2**, p.t. 163-164°C, ce corespunde cu cel din literatură [14].

Spectrele RMN:

¹H-RMN, 400 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 2,27 (s, 3H CH₃); 2,52 (s, 3H CH₃-S); 5,83 (s, 2H NH₂). ¹³C-RMN, 100 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 10,17 (-CH₃); 13,42 (-CH₃-S); 152,44 (C-CH₃); 153,70 (C-S-CH₃).

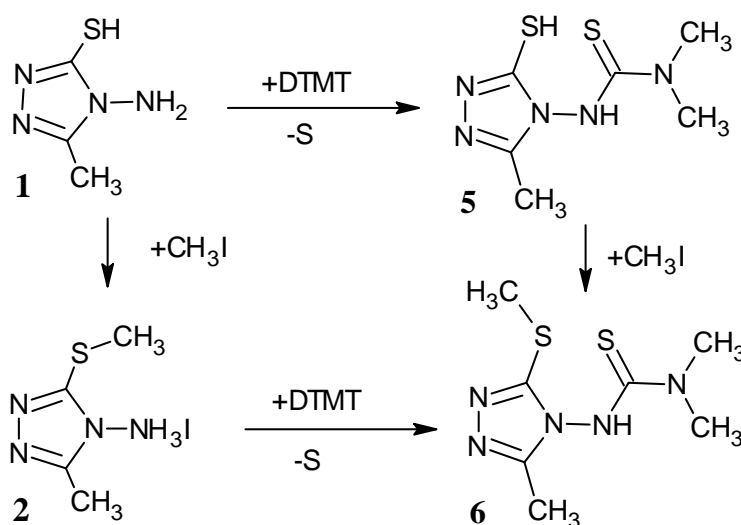
2-[[3-Metil-5-(metilsulfanil)-4*H*-1,2,4-triazol-4-il]imino}metil]fenol (**3**)

La soluția formată din 1,5 g (0,0055 mol) de iodhidrat de 3-metil-5-metilsulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-4-amină (**2**), 0,451 g acetat de sodiu și 3 mL etanol se adaugă 0,7 g (0,0057 mol) de aldehydă salicilică. Amestecul se refluxează timp de 5 ore, apoi se răcește la temperatura camerei. Produsul cristalin se filtrează și se spală cu etanol rece. Se obțin 1,19 g (87%) de produs **3**, cu p.t. 205-208°C. R_f=0,66 (eluent: benzen – etilacetat, 2:1).

Spectrele RMN:

¹H-RMN, 400 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 2,42 (s, 3H CH₃-C); 2,61 (s, 3H CH₃-S); 6,96 (s, H β CH); 6,99 (d, H β CH); 7,01 (t, H γ CH); 7,45 (d, H α CH); 7,85 (s, H CH=N); 10,58 (s, H OH). ¹³C-RMN, 100 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 11,34 (-CH₃); 15,80 (-CH₃-S); 117,18 (C-OH); 118,40 (CH) din Ph; 120,19 (CH) din Ph; 128,03 (-CH=N); 135,10 (CH) din Ph; 147,28 (CH) din Ph; 149,94 (C-CH₃); 158,97 (C-S-CH₃); 161,33 (CH) din Ph.

La încălzirea compușilor **1**, **2** cu disulfura de tetrametiluram (DTMT) în dimetilformamidă (DMF) au fost obținute tioureele **5**, **6** (Schema 2):



Schema 2. Obținerea 1,1-dimetil-3-[3-metil-5-(metilsulfanil)-4*H*-1,2,4-triazol-4-il]tioureei (**6**).

1,1-Dimetil-3-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazot-4-il)tioureea (5)

Amestecul format din 1,3 g (0,01 mol) 4-amino-5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-tiol (**1**), 2,64 g (0,011 mol) DTMT și 4 mL DMF se încălzește la temperatura de 95-100°C, timp de 8 ore într-un balon înzestrat cu un refrigerent ascendent. Refrigerentul ascendent se înlocuiește cu altul descendent și se distilează solventul la presiune redusă. Restul se tratează sub agitare cu 10 mL soluție 1 M de hidroxid de sodiu, se filtrează sulful, iar filtratul se neutralizează cu acid clorhidric (pH=7). Tioureea **5** se filtrează, se spală cu apă și se usucă. Se obțin 1,8 g (83%) de tiouree **5**, 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). $^{13}\text{C-RMN}$, 100 MHz (d^6 - dmsO) δ , ppm: 11,20 ($-\text{CH}_3$); 150,88 (C=N); 167,49 (C-S); 182,38 (C=S).

1,1-Dimetil-3-[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]tioureea (6)

Amestecul alcătuit din 2,72 g (0,01 mol) iodhidrat de 3-metil-5-metilsulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-amină (**2**), 2,64 g (0,01 mol) DTMT, 0,84 g (0,01 mol) carbonat de sodiu și 5 mL DMF se încălzește cu refrigerent ascendent timp de 8 ore la temperatura de 95-100°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 se spală cu apă și se usucă. Acesta conține puțin sulf și se recristalizează din toluen. Se obțin 1,32 g (57%) de tiouree **6**, p.t. 94-95°C. $R_f = 0,4$ (eluent: benzen-izopropanol, 1:1).

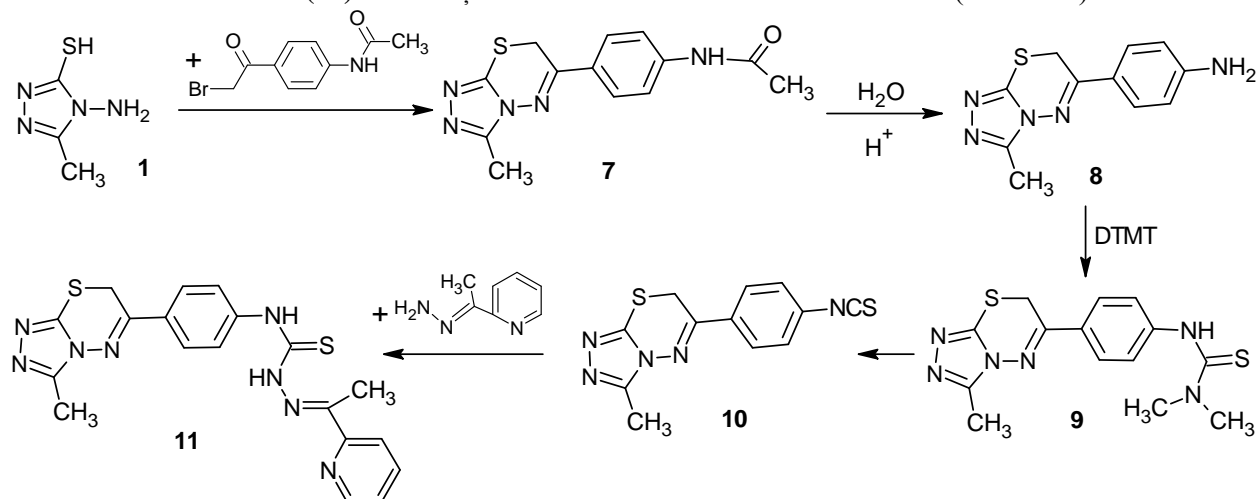
Spectrele RMN:

$^1\text{H-RMN}$, 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). $^{13}\text{C-RMN}$, 100 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-4H-1,2,4-triazol-4-il)tioureei (5) cu iod-metanul

Amestecul format din 0,43 g (0,002 mol) tiouree **5**, 0,284 g (0,002 mol) iodmetan și 3 mL THF se încălzește într-o fiolă închisă timp de 3 ore. Solventul se distilează, produsul se tratează cu soluție diluată de tiosulfat de sodiu, se spală cu apă și se usucă. Se obțin 0,28 g (60%) de tioureea **6**, produs identic după punctul de topire, R_f și spectrele $^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$ cu tioureea **6**.

N-[4-(3-Metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)-fenil]-2-[1-(piridin-2-il)etiliden] hidrazincarbotioamida (11) a fost obținută conform următoarelor transformări (Schema 3):



Schema 2. Obținerea tiousemicarbazonei **11**.

N-[4-(Bromoacetil)fenil]acetamida

Se obține prin bromurarea N-(4-acetilfenil)acetamidei analogic metodei cunoscute [15]. În amestecul format din 3,54 g (0,02 mol) de N-(4-acetilfenil)acetamidă, 20 mL de dioxan absolut și 5 mL de THF se picură, sub agitare, 3,2 g (0,02 mol) brom la temperatura de 40°C. Peste o oră amestecul reactant se răcește, produsul cristalin se filtrează, se spală cu dioxan și se usucă. Se obțin 4,62 g (90%) de N-[4-(bromoacetil)fenil] acetamidă; p.t.=198-200°C, ce corespunde cu cel din literatură [15].

N-[4-(3-Metil-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)fenil]acetamida (7)

Amestecul format din 1,56 g (0,012 mol) 4-amino-5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-ol, 3,072 g (0,012 mol) N-[4-(bromoacetil)fenil]acetamidă și 45 mL de THF se încălzește la temperatura de 65°C timp de 2 ore. Sedimentul căzut la răcire se filtrează și se spală cu THF. Se obțin 3,95 g (85%) de produs **7**, cu p.t. = 279-280°C, ce corespunde cu cel din literatură [16].

4-(3-Metil-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)anilina (8)

Amestecul format din 3,86 g (0,01 mol) de N-[4-(3-metil-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)fenil]acetamida (**7**), 6 mL HCl (c) și 20 mL H₂O se încălzește la temperatura de 95°C timp de 3 ore, apoi se neutralizează cu NaHCO₃. Sedimentul se filtrează și se spală cu apă. Se obțin 2,44 g (99,6%) de produs **8**, R_f = 0,6 (eluent: benzen – izopropanol, 2:1), cu p.t. = 227-228°C, ce corespunde cu cel din literatură [16].

Spectrele RMN:

¹H-RMN, 400 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 2,43(s, 3H CH₃-C); 4,20 (t, 2H CH₂-S); 6,00 (s, H NH₂); 6,7 (d, 2H (CH)₂); 7,70 (d, 2H (CH)₂); (const. J = 8.6); ¹³C-RMN, 100 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 10,30 (-CH₃); 22,80(-CH₂); 119,90 (C-C); 113,80((CH)₂); 129,6((CH)₂); 144,50 (C-NH₂); 150,40 (C-S); 153,10 (C-CH₃); 155,03 (C-CH₂).

1,1-Dimetil-3-[4-(3-metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)fenil]tiourea (9)

La 1,47 g (0,006 mol) de 4-(3-metil-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il) anilina (**8**) se adaugă 1,44 g (0,006 mol) de DTMT și 6 mL de DMF. Amestecul se încălzește timp de 8 ore la temperatura de 95°C, solventul se distilează DMF la presiune redusă, iar produsul se tratează de două ori cu câte 12 mL de benzen pentru a izola sulfurul. Se obțin 1,36 g (68%) de tiourea **9**, cu p.t. = 185-188°C, R_f = 0,21 (eluent: benzen – etilacetat, 2:1).

Spectrele RMN:

¹H-RMN, 400 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 2,25 (s, 3H CH₃-C); 2,50 (t, 2H S-CH₂); 3,29 (s, 6H (CH₃)₂); 7,58 (d, 2H (CH)₂); 7,77 (d, 2H (CH)₂); 9,38 (s, H NH). ¹³C-RMN, 100 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 11,86 (-CH₃); 41,63((-CH₃)₂); 46,89 (CH₂-S); 146,55 (C-S); 146,99; 147,08 (C=N) din triazol; 124,00; 125,00; 128,00 (C-C) din Ph; 174,34 (C=S).

6-(4-Izotiocianatofenil)-3-metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazina (10)

La 0,42 g (0,0013 mol) de 1,1-dimetil-3-[4-(3-metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)fenil]tiourea (**9**) în 30 mL de dioxan se adaugă 0,13 g (0,0013 mol) anhidridă acetică. Amestecul se încălzește la temperatura de 95°C, timp de 30 min. Se distilează la vid solventul, iar produsul obținut se purifică cromatografic prin coloană cu silicagel. Se obțin 0,33 g (88%) de produs **10**, cu R_f = 0,68 (eluent: benzen – etilacetat, 2,5:1), p.t. = 200-202°C, ce corespunde cu cel din literatură [16].

N-[4-(3-Metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)fenil]-2-[1-(piridin-2-il)-etiliden]hidrazincarbotoamida (11)

Soluția formată din 0,248 g (0,00086 mol) de 6-(4-izotiocianatofenil)-3-metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazină (**10**), 0,116 g (0,00086 mol) 2-[1-hidrazinilidenetil]piridină și 4 mL benzen se refluxează timp de 30 min.; sedimentul obținut se filtrează și se spală cu benzen. Se obțin 0,16 g (85%) de produs **11**, cu p.t. 177-180°C, R_f = 0,68 (eluent: etilacetat).

Spectrele RMN:

¹H-RMN, 400 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 2,20 (s, 3H CH₃-C) din triazol; 2,42 (s, 3H CH₃-C); 3,6 (t, 2H S-CH₂); 7,79 (d, 2H (CH)₂); 7,86 (d, 2H (CH)₂); 8,43 (d, Hβ-C)piridinil; 8,45 (d, Hβ-C)piridinil; 8,55 (d, Hγ-C)piridinil; 8,56 (d, α-C)piridinil; 10,36 (d, H NH-C); 10,93 (d, HNH-N); ¹³C-RMN, 100 MHz (d⁶ - dmsO) δ, ppm: 174,50 (C=S).

II. Rezultate și discuții**II.1. Sinteza derivaților noi ai 1,2,4-triazolului**

Aminotriazolul **2** sub formă de iodhidrat (Schema 1) se obține în urma reacției dintre iodmetan și aminotriazolul **1** în metanol cu un randament de 37% [14]. La înlocuirea metanolului cu tetrahidrofuran (THF) am obținut aminotriazolul **2** cu un randament de 94%. Transformarea aminotriazolului **2** iodhidrat în 2-[[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]imino]metil]-fenol (**3**) –Bază Schiff decurge mai eficient dacă

neutralizarea se face cu acetat de sodiu. În așa caz se elimină acid acetic care catalizează produsul. Acest compus **3** la recristalizare din etanol formează monocristale, care au fost cercetate cu difracția de raze X în monocristal. Rezultatele sunt prezentate în Figura 1:

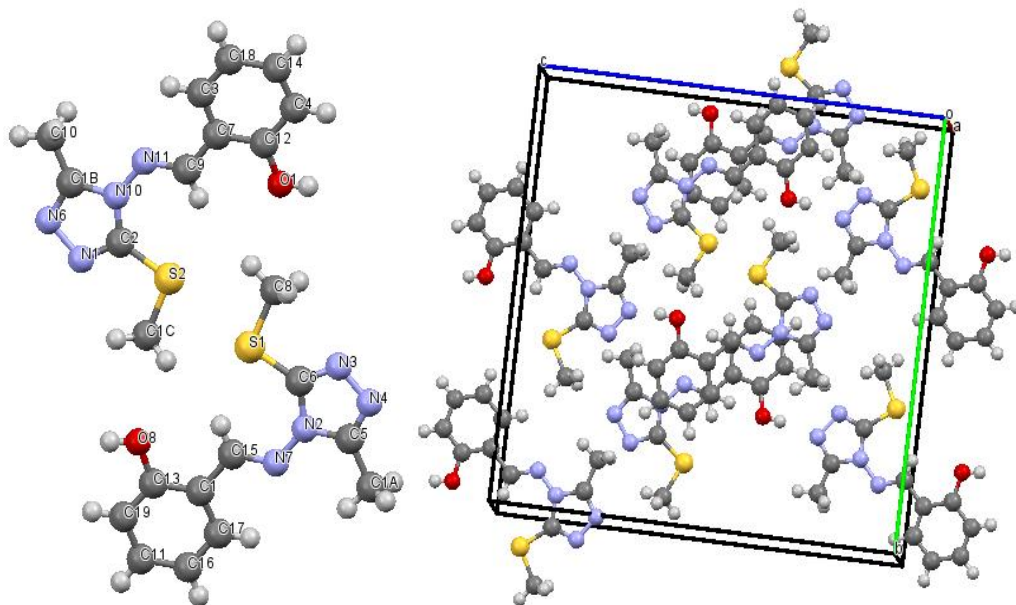


Fig.1. Structura cristalină a compusului **13** și împachetarea în celulă.

A fost cercetată dependența randamentului tioureeilor **5**, **6** (Schema 2) de anumiți factori. S-a constatat că aminotriazolul **1** la încălzire cu DTMT la un raport molar de 1:1,1 timp de 8 ore la temperatura de 95-100°C conduce la un randament de 83% pentru **5**. Aminotriazolul **2** în condiții similare dă un randament de 57% pentru **6**. 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 SCH₃.

O anumită influență asupra randamentului tioureeilor **4**, **5**, **6** are modul de izolare a sulfului din mediul de reacție. În [17] sulfurul se izolează prin tratarea produsului de reacție cu acid clorhidric concentrat, în care se dizolvă tioureea **4**. Sulfurul insolubil se filtrează, iar tioureea **4** se obține (67%) prin diluția soluției cu apă. Noi am reușit să obținem tioureea **4** cu un randament de 83% prin recristalizare din amestec de apă și etanol, în care sulfurul este insolubil. Tioureea **5** se dizolvă în soluție de hidroxid de sodiu și sulfurul se izolează prin filtrare. Tioureea **6** se purifică prin extragerea sulfului cu benzen. După distilarea DMF din amestecul reactant produsul rămas se refluxează cu benzen, în care se dizolvă sulfurul. După răcire la temperatura camerei tioureea **6** se filtrează și se recristalizează din apă.

La tratarea tioureeilor **4**, **5**, **6** cu iodmetan se așteaptă formarea S-metilzioureeilor respective [18]. Cercetările acestor reacții au demonstrat că numai tioureea **5** se metilează la grupa SH (Schema 1), iar grupa C=S tioureidică în compușii **5**, **6** rămâne neafectată, probabil din cauza dificultăților sterice.

În seria N¹-aril-N,N-dimetiltioureeilor trisubstituite sunt cunoscute reacții [19,20] cu diferiți agenți nucleofili (hidrat de hidrazină, 2-amino etanol și alții), care decurg în benzen la reflux cu randamente înalte. Tioureele **4**, **5**, **6** cu structuri analoge nu reacționează.

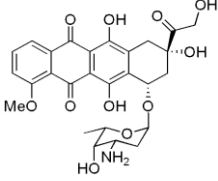
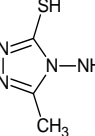
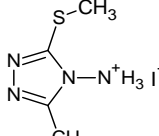
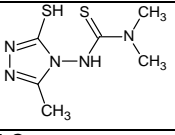
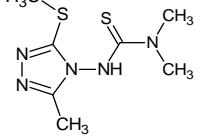
Reacții cu caracter acid (clorura de hidrogen, clorura de acetyl, anhidrida acetică și al.) la încălzire în dioxan sau în THF descompun ușor N¹-aril-N,N-dimetiltioureele cu formarea de arilizotiocianați [21,22]. Cercetările noastre au demonstrat că tioureele **4**, **5**, **6** în condiții similare sunt indiferente față de acești reactanți.

Tioureea **9**, necunoscută în literatură, a fost obținută la interacțiunea aminei **8** cu DTMT. În continuare ea a fost transformată în izotiocianat **10** la tratare cu anhidridă acetică în dioxan; randamentul constituie 88%. Menționăm că tioureele **5**, **6** cu grupele tioureidice NHCSN(CH₃)₂, legate în poziția 4 de nuclee 1,2,4-triazolice, nu formează izotiocianați respectivi. În continuare a fost obținută tiosemicarbazona **11** din izotiocianat **10** și 2-[1-hidraziniliden]piridină la încălzire în benzen, cu un randament de 85%.

II.2. Cercetări biologice

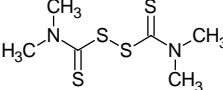
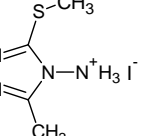
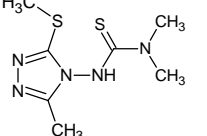
Tabelul 1

Activitatea antiproliferativă a substanțelor 1, 2, 4, 5, 6 pe celule HeLa și MDCK.
Ca substanță pentru comparație este luată Doxorubicina

Codul	Formula	Mr	Concentrația (μM/L)	HeLa		MDCK	
				% de inhibiție	IC ₅₀ μM/L	% de inhibiție	IC ₅₀ μM/L
Doxo		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	
5		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	
6		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	
			0,01	-5,5		-	

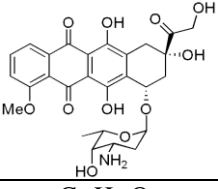
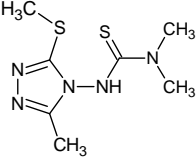
Tabelul 2

Concentrația minimală de inhibiție (CMI) și concentrația minimală bactericidă (CMB) a substanțelor: DTMT, 2 și 6 față de microorganismele gram-pozitive și gram-negate (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
6		0,5	0,5	0,5	0,5	0,007	0,007	0,5	0,5

Tabelul 3

Proprietățile antioxidante a tioureei 6

Formula	Codul	Mr g/mol	IC ₅₀ , (μM/L) metoda ABTS	IC ₅₀ , (μM/L) metoda DPPH
	Doxo-ru- bicina	543,5	9,3	≥100
C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Trolox	250,3	30	46
	6	231,3	29	≥100

Concluzii

Au fost obținuți 5 derivați noi ai 4-amino-5-metil-4H-1,2,4-triazolului-3-tiol:

2-[[[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]imino]metil]fenol (**3**);

1,1-dimetil-3-(3-metil-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-il)tioureea (**5**);

1,1-dimetil-3-[3-metil-5-(metilsulfanil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]tioureea (**6**);

1,1-dimetil-3-[4-(3-metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)fenil]tioureea (**9**);

N-[4-(3-metil-7H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-il)fenil]-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]-hidrazincarbotioamida (**11**).

A fost perfecționată metoda de obținere a 3-metil-5-metilsulfanil-4H-1,2,4-triazol-4-amino-iodhidratului (**2**), cu creșterea randamentului de la 37% la 94%.

Au fost cercetate proprietățile antiproliferative ale derivaților noi ai 1,2,4-triazolului: **2** și **6**. Pe celule de cancer cervical substanțele **2** și **6** au demonstrat o activitate antiproliferativă ne semnificativă și aproximativ de 3 ori mai mică decât Doxorubicina.

Cele mai sensibile microorganisme față de substanțele **2** și **6** sunt *Staphylococcus aureus*, cu CMI 0,06 mg/mL și, respectiv, 0,007 mg/mL. Iar față de DTMT microorganismele *Staphylococcus aureus*, *Escherihia coli* și *Candida albicans* au aceeași valoare de CMI 0,0007 mg/mL. Coinciderea valorilor CMI și CMB atestă caracterul bactericid al acțiunii biologice.

Proprietățile antioxidative ale tioureei **6** sunt aproximativ egale cu ale troloxului.

Referințe:

- Vandana Sharma, Birenda Shrivastava, Rakesh Bhatia. Exploring potential of 1,2,4-triazole: a brief review. India, Newsletter. In: *Pharmacologyonline*, 2011, no1, p.1192-1222.
- SELVARAJ, J., PRANABESH, S., SHANISH, A., RAJAGOPAL, K., BYRAN, G., SUBRAMANIAN, G. and KANNAN, E. Synthesis and biological evaluation of some schiff bases of [4-(amino)-5-phenyl-4h-1,2,4-triazole-3-thiol]. In: *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2011, vol.24, no.2, p.109-112.
- Xiao-Xia Ye, Zhen-Fei Chen, An-Jiang Zhang and Li-Xue Zhang. Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Schiffs Bases from 1,2,4-Triazole. In: *Molecules*, 2007, no.12, p.1202-1209.
- Xiang Li, Xue-Qiang Li, He-Mei Liu, Xue-Zhang Zhou and Zhi-Hui Shao. Synthesis and evaluation of antitumor activities of novel chiral 1,2,4-triazole Schiff bases bearing γ -butenolide moiety. Li et al. In: *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2012, p.1-5.
- Chandramouli, M.R. Shivanand, Thakar Bhaumik Nayanbhai, Bheemachari and UDUPI, R.H. Synthesis and biological screening of certain new triazole schiff bases and their derivatives bearing substituted benzothiazole moiety. In: *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2012, no.4(2), p.1151-1159.
- Welin Xie, Jingai Zhang, Xiaojing Ma, Wenqian Yang, Ying Zhou, Xufu Tang, Yan Zou, Hui Li, Jingjing He, Shimin Xie, Yunhui Zhao and Fengping Liu. Synthesis and biological evaluation of kojic acid derivatives containing 1,2,4-triazole as potent tyrosinase inhibitors. In: *Chem. Biol. Drug.*, 2015, no.86, p.1087-1092.

7. SUBA GEETHA, A., VIJAYARAJ, R., RAJ KUMAR, T., SANKAR ANAND R. *Synthesis of Certain 3-Pyridyl [1,2,4] Triazolo [3,4-B] [1,3,4] Thiadiazepines and Evaluation of their Possible Biological Activities*. Vol.2(1), 2011, p.155-159.
8. CHANDRAMOULI, M.R. Shivanand, Thakar Bhaumik Nayanbhai, Bheemachari and UDUPI, R.H. Synthesis and biological screening of certain new triazole schiff bases and their derivatives bearing substituted benzothiazole moiety. In: *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2012, no.4(2), p.1151-1159.
9. SOARES, M.A., LESSA, J.A., MENDES, I.C. N⁴-Phenil-substetuted 2-acetilpyridine tiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor calls, structure-activity relationship studies and investigation on the mecanism of action. In: *Biol. Med. Chem.*, 2012, no.20, p.3396-3407.
10. ANOOPKUMAR-DUKIE, S., CAREY, J.B., CONERE, T., O'SULLIVAN, E., VANPELT, F.N., ALLSHIRE, A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. In: *British Journal of Radiology*, 2005, no.78, p.945-947.
11. PAHONTU, E., JULEA, F., ROSU, T., PURCAREA, V., CHUMAKOV, Yu., PETRENCO, P., GULEA, A. Anti-bacterial, antifungal and in vitro antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones. In: *J. Cell. Med.*, 2015, vol.19, no.4, p.865-878.
12. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activitate aplicarea unui ABTS cation radical test îmbunătățită decolorare. In: *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, no.26, p.1231-1237.
13. BURITS, M. BUCAR, F. Activitatea antioxidantă a uleiului de Nigella Sativa esserntial. In: *Phytother. Res.*, 2000, no.14, p.323-328.
14. KRÖGER, C.-F., TENOR, E. und BEYER, H. Über 1,2,4-triazole, II. In: *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, vol.643, Issue 1, 1961, p.121-128.
15. RÎBKOVSKAIA, Z. *Sinteza și studiul 5-aril-1,3,4-oxadiazol-2-tiolilor și derivaților lor*: Teză de doctor. Chișinău, 2013.
16. RAO, B., SRINIVASA, K., SASTRY, C., REDDY, V. Synthesis and anthelmintic activity of 6-isothiocyanatophenyl-7H-1,2,4-triazolo-(3,4-b)(1,3,4)-thiadiazines. In: *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1993, vol.55(3), p.108.
17. GUȚU, I., BOI, L.V., MAIGA, S., BARBĂ, N., TĂROBĂSANU-MIHAILĂ, C. *Interacțiunea disulfurii de tetrametiluram cu aminele din șirul heterociclic*. Olănești-Vâlcea: Centrul de cercetări „Olthim”, 1996, p.72.
18. GUȚU, I., BARBĂ, N., PUTAN, T. Noi derivați ai tioureei cu proprietăți pesticide. În: *Lucrările sesiunii științifice „Prezent și perspectivă în horticultură”*. Cluj-Napoca: Universitatea de Științe Agricole, 1994, p.156-157.
19. ГУЦУ, Я.Е., АБДУЛКАДЕР, А.А., БОЙ, Л.В., РЕВЕНКО, М.Д., БАРБА, Н.А. 4-Арилтиосемикарбазиды и некоторые аналитические реагенты на их основе. В: *Сб. Координационные и полимерные соединения. Синтез и свойства*. Кишинёв: ШТИИЦ, 1991, с.90-94.
20. ГУЦУ, Я.Е., БОЙ, Л.В., БАРБА, Н.А. *Способ получения N -арил-N¹-(2-гидроксиалкил) тиомочевин*. Авт. свид. СССР 176859, 1992.
21. ГУЦУ, Я.Е., КРОЙТОР, В.Н. *Способ получения арилизотиоцианатов*. Авт. свид. СССР 1256393, 1986.
22. ГУЦУ, Я.Е., МЕГХЕЗЗИН, А., ПЕТРОВ, Г.М., ЖУНЧИЕТУ, Г.И., БОЙ, Л.В. Синтез арилизотиоцианатов на основе N¹-арил-N,N-диалкилтиомочевин. В: *Сб. Синтез, модификация и исследование полимерных и координационных соединений (вопросы химии и химической технологии)*. Кишинёв: ШТИИЦ, 1989, с.117-121.

Notă: Cercetările au fost efectuate cu susținerea finanțării din grantul instituțional 15.817.02.24.F

Prezentat la 14.11.2016