

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 546.56:547-304.6

SÎRBU ANGELA

**SINTEZA, STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE COMPUȘILOR
COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU UNELE
TIOSEMICARBAZONE SOLUBILE ÎN APĂ**

141.01. CHIMIE ANORGANICĂ

Rezumatul tezei de doctor în chimie

CHIȘINĂU, 2020

Teza a fost elaborată la Facultatea Chimie și Tehnologie Chimică USM, Departamentul Chimie, LCS „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică”

Conducător științific:

REVENCO Mihail doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar

Consultant științific:

ARION Vladimir doctor habilitat în științe chimice, conferențiar universitar

Referenți oficiali:

ANDRUH Marius academician AȘR, doctor în științe chimice, profesor universitar, Universitatea din București, România

LOZAN Vasile doctor în științe chimice, conferențiar cercetător, Institutul de Chimie MECC

Componența Consiliului Științific Specializat:

- 1. Gulea Aurelian** președinte, academician, doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar
- 2. Bîrcă Maria** secretar științific, doctor în științe chimice, conferențiar universitar
- 3. Rudic Valeriu** academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
- 4. Bulhac Ion** doctor habilitat în științe chimice, conferențiar cercetător
- 5. Melnic Silvia** doctor în științe chimice, conferențiar universitar
- 6. Verejan Ana** doctor în științe chimice, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la 13 aprilie 2020, ora 14⁰⁰, în ședința Consiliului Științific Specializat **D 141.01-04** din cadrul Universității de Stat din Moldova, or. Chișinău, str. A. Mateevici 60, blocul 4, bir. 222.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca Universității de Stat din Moldova și la pagina web a ANACEC (www.cnaa.md).

Rezumatul a fost expediat la 12 martie 2020.

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat,
BÎRCĂ Maria, dr. în științe chimice, conf. univ.

Consultant științific

ARION Vladimir, dr. hab. în științe chimice, conf. univ.

Autor

SÎRBU Angela

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
CONȚINUTUL TEZEI	7
1. COMPUȘI COORDINATIVI AI METALELOR DE TRANZIȚIE CU LIGANZI ÎN BAZA ALDEHIDEI SALICILICE	7
2. METODE DE SINTEZĂ ȘI CERCETARE	7
3. FORMAREA ȘI STABILITATEA ÎN SOLUȚII A COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU TIOSEMICARBAZONELE ALDEHIDEI SALICILICE 5-SUBSTITUITE	7
3.1. Caracteristicile spectrale și stabilitatea compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-sulfosalicilice și derivații ei.....	7
3.2. Compuși coordinativi ai cuprului(II), nichelului(II), cobaltului(II) cu derivați ai tiosemicarbazonei aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice și aplicațiile lor	11
4. SINTEZA, STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU DERIVAȚI AI TIOSEMICARBAZONELOR ALDEHIDEI SALICILICE 5-SUBSTITUITE	15
4.1. Sinteza și structura compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-sulfosalicilice și unii derivați ai acesteia.....	15
4.2. Structura compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice.....	16
4.3. Proprietățile electrochimice ale compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei 5-sulfosalicilice.....	18
4.4. Studiul proprietăților antiproliferative ale compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei 5-sulfosalicilice	20
4.5. Inducerea ROS și activarea protecției antioxidante.....	21
4.6. Activitatea antiproliferativă a complexilor cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice.....	24
4.7. Caracterizarea compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-sulfosalicilice și derivaților ei cu ajutorul spectroscopiei de rezonanță electronică paramagnetică (REP). Stabilitatea tiosemicarbazonelor aldehidei 5-sulfosalicilice și complexilor acestora cu cupru(II) la radiații UVA.....	25
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	27
BIBLIOGRAFIE	29
LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI	30
ADNOTARE	32
АННОТАЦИЯ	33
ANNOTATION	34

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei abordate

Chimia coordinativă este una din ramurile chimiei moderne, care poate pune la dispoziție numeroși compuși coordinativi cu proprietăți prestabilite. Compușii coordinativi pot fi diversificați prin schimbarea metalului, a naturii liganzilor, a seturilor de atomi coordinați, a naturii legăturilor chimice, a interacțiunilor intermoleculare, prin gama unităților structurale etc. Astfel, prin modelarea speciei organice poate fi influențată structura, aranjarea unităților moleculare în spațiu și proprietățile materialelor finale.

Așa cum tiosemicarbazonele formează cu metalele de tranziție compuși coordinativi cu diferite proprietăți chimice, fizice, structurale, biologice, ele prezintă un interes deosebit pentru cercetătorii chimiști. Tiosemicarbazonele reprezintă produsele de condensare ale tiosemicarbazidelor cu diferiți compuși carbonilici. Posibilitatea de a varia substituții și pozițiile lor poate asigura diversitatea tiosemicarbazonelor cu o anumită capacitate de coordinare și geometrie. Ele reacționează, de obicei, ca liganzi chelatanți cu ionii metalelor de tranziție, coordinând prin atomii de sulf și azot hidrazinic cu formarea unui metalociclu din cinci atomi. Grupul N-C=S posedă un interes chimioterapeutic considerabil și este responsabil pentru activitatea farmacologică.

Caracterizarea compușilor coordinativi cu activitate biologică, de obicei, se efectuează în fază solidă sau în solvenți organici, dar aceste tehnici nu pot furniza informații suficiente despre biotransformările medicamentelor în fluidele biologice. De aceea, cunoașterea celor mai posibile forme chimice ale acestor complecși în soluții apoase, în special la pH-ul fiziologic, este o condiție obligatorie pentru o înțelegere mai completă a mecanismelor echilibrelor protolitice și ar putea fi utile pentru obținerea celor mai eficiente și selective chimioterapeutice. Unul din dezavantajele esențiale ale reactivilor în baza tiosemicarbazonelor este solubilitatea lor redusă în apă, care limitează posibilitățile realizării studiilor echilibrelor protolitice în soluții apoase. Problema solubilității poate fi rezolvată prin funcționalizarea agenților de coordinare cu grupe ușor ionizabile. În literatura de specialitate sunt disponibile puține informații despre compușii coordinativi ai tiosemicarbazonelor solubile în apă.

Astfel, studierea compușilor coordinativi ai metalelor cu tiosemicarbazonele solubile în apă, punerea în evidență a unor proprietăți utile noi, evaluarea lor în contextul celor cunoscute, rămâne a fi o problemă actuală, cu rezultate promițătoare.

Scopul lucrării a fost de a studia procesele de formare și separare ale compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehydelor 5-sulfosalicilice și

5-metiltrimetilamoniusalicilice, de a stabili structura, proprietățile compușilor obținuți și de a determina posibilități de valorificare a proprietăților lor utile.

Obiectivele cercetării

Pentru atingerea scopului, au fost trasate și rezolvate următoarele obiective: sinteza tiosemicarbazonelor aldehydelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice; studiul procesului de formare a compușilor coordinativi în soluții apoase (determinarea parametrilor spectrofotometrici, componenței, stabilității, domeniului de pH ș.a.); stabilirea condițiilor de izolare și optimizarea metodelor reproductibile de sinteză în stare solidă a compușilor coordinativi; determinarea structurii moleculare a compușilor obținuți prin metoda difracției cu raze X; stabilirea proprietăților chimice, electrochimice și activității biologice ale compușilor cercetați.

Ipoteza de cercetare

În baza analizei literaturii de specialitate s-a presupus că introducerea grupelor ușor ionizabile în componența tiosemicarbazonelor aldehydelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice va conduce la creșterea solubilității în apă a compușilor organici cercetați. Reieșind din acestea au fost determinați parametrii de formare ai complexilor tiosemicarbazonelor aldehydelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice cu cupru(II) în soluții apoase; a fost stabilit modul de coordonare al liganzilor, structurile moleculare și cristaline ale compușilor coordinativi obținuți; a fost determinat comportamentul electrochimic și activitatea antiproliferativă a compușilor coordinativi ai cuprului(II), elucidat mecanismul de acțiune biologică, în special capacitatea lor de a induce specii ROS la nivel intracelular. A fost demonstrat că, la expunerea la radiații UVA, tiosemicarbazonele se comportă ca fotosensibilizatori, care generează anionul radicalului superoxid și radicalul hidroxil prin fotoactivarea oxigenului molecular.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese

Pentru realizarea obiectivelor propuse și atingerea scopului a fost studiată metodologia de cercetare și utilizată experiența acumulată de către colaboratorii de la Departamentul Chimie, în Laboratorul „Materiale avansate în biofarmaceutică și tehnică” de la Universitatea de Stat din Moldova. În studiul și interpretarea rezultatelor cristalografice au fost folosite complexe de program utilizate în Laboratorul Metode fizice de studiere a solidului „T. Malinowski” din cadrul Institutului de Fizică Aplicată și în Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași, România, iar pentru cercetarea proprietăților biologice - metodologia elaborată la Departamentul Chimie, Universitatea Națională din Singapore, Institutul de Chimie Anorganică a Universității din Viena, Austria, Departamentul de Chimie Anorganică și Analitică, Universitatea din Szeged, Ungaria. Proprietățile spectro-electrochimice au fost studiate la Institutul de Chimie Fizică și

Fizică Chimică, Facultatea de Tehnologie Chimică și Alimentară, Universitatea Slovacă de Tehnologie din Bratislava, Slovacia.

Studiul structural și al proprietăților compușilor coordinativi sintetizați a fost efectuat cu ajutorul unui set de metode moderne de cercetare, precum analiza elementală, spectre IR, spectre RMN, spectrofotometrie UV-Vis, voltametrie ciclică, analize structurale cu raze X, metode de determinare a proprietăților medico-biologice ș.a.

Pentru interpretarea rezultatelor s-a făcut apel la baza teoretico-științifică recunoscută și materialele publicate în literatura de specialitate.

Problema științifică care a fost soluționată constă în stabilirea parametrilor formării complexilor cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehydelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice în soluții apoase, determinarea activității antiproliferative a acestor compuși coordinativi, în special capacitatea lor de a genera specii ROS la nivel intracelular, care promovează mecanismul de apărare antioxidantă mediată de proteina nrf2.

Pentru prima dată a fost efectuat studiul procesului de formare în soluții apoase a compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehydei salicilice substituie în poziția 5 cu grupe ușor ionizabile, a fost acumulată informația despre formarea și stabilitatea lor în soluții apoase. A fost stabilită structura compușilor coordinativi în stare solidă, au fost determinate unele proprietăți biologice ale complexilor coordinativi ai cuprului(II).

Valoarea aplicativă constă în sinteza noilor compuși solubili în apă cu stabilitate înaltă și evidențierea activității antiproliferative, în special capacitatea de a produce specii ROS în celule canceroase și elucidarea fotostabilității tiosemicarbazonelor cercetate și a compușilor coordinativi ai acestora.

Rezultatele prezentate în lucrare au constituit obiectul a 17 publicații științifice, inclusiv 4 articole științifice (2 articole în reviste cu factor de impact și 2 articole în reviste naționale) și 13 rezumate la diferite conferințe naționale și internaționale. Publicații fără coautori – 3.

Sumarul capitolelor tezei

Lucrarea constă din introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 228 surse științifice citate. Materialul este expus pe 130 pagini de text de bază, conține 10 tabele, 81 figuri și 6 anexe.

CONȚINUTUL TEZEI

INTRODUCEREA include actualitatea și importanța temei abordate, scopul lucrării, obiectivele cercetării, ipoteza de cercetare, sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese, sumarul capitolelor tezei.

1. COMPUȘI COORDINATIVI AI METALELOR DE TRANZIȚIE CU LIGANZI ÎN BAZA ALDEHIDEI SALICILICE

Primul capitol al lucrării cuprinde o trecere în revistă a cercetărilor științifice referitor la sinteza, structura și proprietățile fizico-chimice, medico-biologice și analitice ale compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție cu chalcogensemicarbazonele aldehydei salicilice, coordonate ONS și chalcogensemicarbazonele tridentate coordonate ONN și derivații acestora.

2. METODE DE SINTEZĂ ȘI CERCETARE

Capitolul doi conține o descriere a metodelor de sinteză și izolare a agenților de coordonare și a compușilor coordinativi, rezultatele analizelor elementale, metodologia de stabilire a structurii și proprietăților, precum și o descriere informativă a echipamentului și tehnicilor utilizate în procesul de studiu.

3. FORMAREA ȘI STABILITATEA ÎN SOLUȚII A COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU TIOSEMICARBAZONELE ALDEHIDEI SALICILICE 5-SUBSTITUITE

3.1. Caracteristicile spectrale și stabilitatea compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehydei 5-sulfosalicilice și derivații ei

Unul din dezavantajele esențiale ale tiosemicarbazonele este solubilitatea lor redusă în apă, care limitează studiile echilibrului protolitic în soluții apoase. Problema solubilității poate fi rezolvată prin funcționalizarea agenților de coordonare cu grupe ușor ionizabile. În literatura de specialitate sunt disponibile foarte puține informații despre stabilitatea complexelor cu derivații tiosemicarbazonei aldehydei salicilice.

Prin reacția de condensare a tiosemicarbazidei 4-substituie și aldehydei 5-sulfosalicilice sub formă de sare de sodiu în metanol au fost obținute patru tiosemicarbazone ale aldehydei 5-sulfosalicilice sub formă de sare de sodiu cu substituenți diferiți R la atomul de azot terminal al fragmentului tiosemicarbazidic H, Me, Et, Ph: NaH_2L^1 , NaH_2L^2 , NaH_2L^3 , NaH_2L^4 (Figura 1).

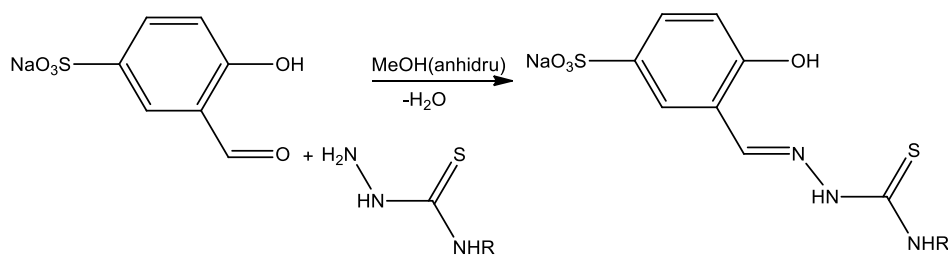


Fig. 1. Schema reacției de condensare a aldehidei 5-sulfosalicilice și tiosemicarbazidei 4-substituite

Procesele de disociere ale tiosemicarbazonei aldehidei 5-sulfosalicilice (NaH_2L^1) și derivaților săi NaH_2L^2 , NaH_2L^3 , NaH_2L^4 au fost cercetate prin metoda spectrofotometrică (Figura 2). Studiile au fost efectuate în soluții apoase. Solubilitatea în apă la 25 °C a tiosemicarbazonei investigate reprezintă 100 g/L pentru NaH_2L^1 , 70 g/L pentru NaH_2L^2 , 25 g/L pentru NaH_2L^3 și 6 g/L pentru NaH_2L^4 .

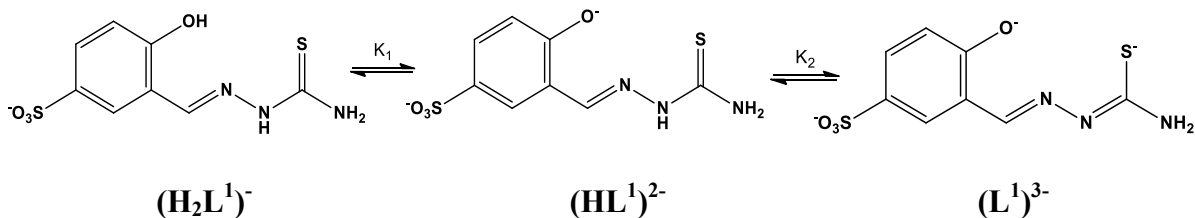


Fig. 2. Treptele de disociere ale tiosemicarbazonei aldehidei 5-sulfosalicilice

Disocierea tiosemicarbazonei aldehidei 5-sulfosalicilice a fost însoțită de schimbări spectrale caracteristice la variația pH-ului soluției (Figura 3). În mediul acid soluțiile apoase ale reactivului au fost incolore și s-au caracterizat spectral prin absorbanta maximă la lungimile de undă egale cu 302 nm, specific cromoforului azometinic și 328 nm - pentru fragmentul fenolic. În mediul alcalin colorația soluțiilor a devenit slab verzuie, care spectral a dezvăluit apariția unei benzi puternice cu maximumul de absorbție la 367 nm.

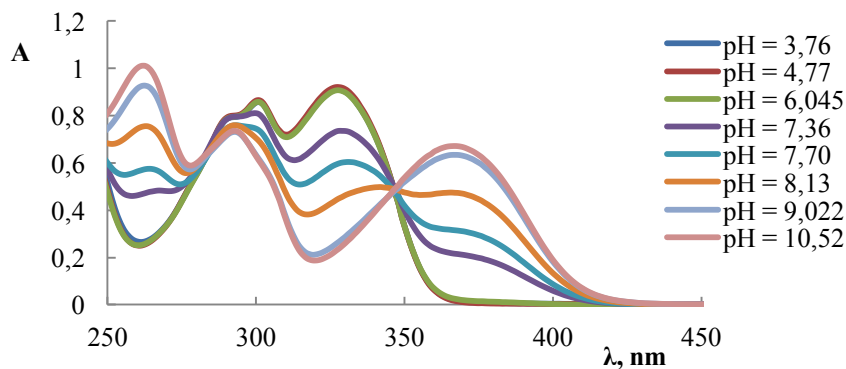


Fig. 3. Spectrele electronice de absorbție ale soluțiilor de NaH_2L^1 la diferite valori de pH ($C(\text{NaH}_2\text{L}^1) = 4.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $I = 0.1 \text{ M KCl}$)

Tiosemicarbazona NaH_2L^1 conține doi protoni disociabili. Pe întregul interval de pH studiat gruparea sulfonat a rămas deprotonată datorită caracterului său puternic acid, fapt ce a confirmat solubilitatea sporită a ligandului în apă. Prima treaptă de disociere a $(\text{H}_2\text{L}^1)^-$ a fost atribuită deprotonării grupei fenolice și este redată de pK_1 , în timp ce pK_2 aparține grupei hidrazinice $\text{N}^2\text{-H}$ a fragmentului tiosemicarbazidic, iar sarcina negativă este localizată pe atomul de sulf prin intermediul echilibrului tautomic tion-tiol (Figura 2). Conform datelor bibliografice pentru tiosemicarbazona aldehidei salicilice nesubstituite au fost obținute constantele de disociere $\text{pK}_1 = 8.84$ și $\text{pK}_2 = 12.57$ în solvent mixt 30% DMSO/apă [1]. Este remarcabil faptul, că pK_2 are o valoare destul de ridicată, de aceea deprotonarea are loc într-un domeniu al pH-lui puternic bazic, unde măsurările devin nesigure și limitează determinarea exactă a constantei din cauza erorii electrodului de sticlă. Reieșind din acestea, pentru liganzii studiați este posibilă determinarea constantei pK_1 pe baza spectrelor electronice de absorbție înregistrate.

Deplasarea batocromă a benzilor de absorbție cu valori λ_{max} mai mari (367-370 nm) a fost observată pentru toți liganzii datorită deprotonării grupei fenolice, ceea ce a dus la extinderea sistemelor conjugate de electroni π . Valorile pentru pK_1 determinate au fost introduse în Tabelul 1. Substituenții la azotul terminal nu au avut nici o influență semnificativă asupra pK_1 . Aceste valori (7.73-7.82) au fost considerabil mai scăzute, comparativ cu cea a ligandului de referință, tiosemicarbazona aldehidei salicilice TSCAS (8.84).

La adăugarea ionilor de cupru(II) la NaH_2L^1 culoarea soluției s-a schimbat de la incolor la verde deschis, într-un interval vast de pH. Această schimbare a culorii se datorează formării compusului coordinativ al cuprului(II) cu NaH_2L^1 . Înregistrarea spectrului în variantă diferențială $(\text{NaH}_2\text{L}^1 + \text{Cu(II)})/\text{NaH}_2\text{L}^1$ la aceleași valori de pH conduce la separarea componentei compusului coordinativ, caracterizat prin maxim de absorbție $\lambda = 375 \text{ nm}$. În Figura 4 sunt prezentate spectrele electronice de absorbție ale ligandului NaH_2L^1 în absența și în prezența ionilor de cupru(II) și spectrul electronic de absorbție în variantă diferențială $(\text{NaH}_2\text{L}^1 + \text{Cu(II)})/\text{NaH}_2\text{L}^1$.

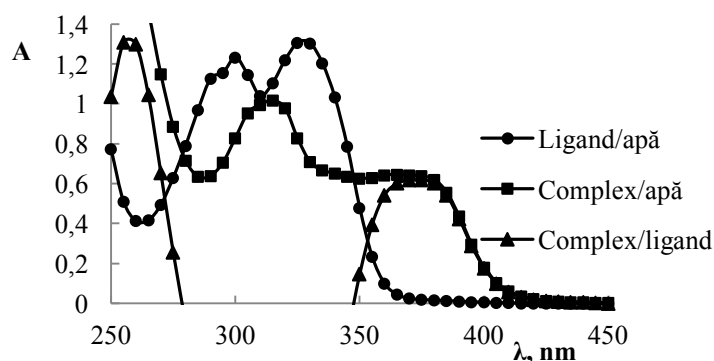


Fig. 4. Modificarea spectrului electronic de absorbție al soluției de NaH_2L^1 la adăugarea sărurilor de cupru(II) ($C(\text{Cu}^{2+}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $C(\text{Lig}) = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH} = 5.75$, $I = 0.1 \text{ M KCl}$)

Raportul molar de combinare a componentelor a fost studiat prin mai multe metode. Atât metoda variațiilor continue, cât și cea a raporturilor molare demonstrează că în condițiile date se formează un compus cu raportul molar de combinare $\text{Cu}:\text{NaH}_2\text{L}^1 = 1:1$.

Ceilalți trei derivați (NaH_2L^2 , NaH_2L^3 , NaH_2L^4) au fost de asemenea investigați, folosind aceeași abordare pentru a elucida efectul substituenților la azotul terminal al fragmentului tiosemicarbazidic asupra formării complexului de cupru(II) în soluții apoase.

Pe baza valorilor absorbanțelor înregistrate prin metoda raporturilor molare, s-ar putea concluziona că formarea complexelor este practic cantitativă în condițiile aplicate. Aceasta nu a permis determinarea directă a constantelor aparente (condiționale) de formare (β') ale complexelor de cupru(II) $[\text{CuL}^R]$. Prin urmare, constantele de formare condiționale pentru acești complecși au fost determinate spectrofotometric prin reacții competitive cu EDTA la $\text{pH} = 5.75$, utilizând programul PSEQUAD [2]. Atât tiosemicarbazona cercetată, cât și EDTA, formează complecși de tipul $[\text{CuL}]$ în condițiile efectuării experimentului. În plus, atât EDTA, cât și tiosemicarbazona au o contribuție neglijabilă la valorile absorbantei compușilor, măsurate la lungimea de undă 375 nm. Calculele efectuate au furnizat valorile medii ale absorbivității molare (ϵ) a complexelor formați. Valorile obținute sunt prezentate în Tabelul 1. Prezența substituenților H, metil, etil și fenil la atomul terminal de azot al tiosemicarbazonei a influențat valorile absorbivității molare a complexelor. În special pentru NaH_2L^4 absorbția a crescut semnificativ datorită conjugării π -electronilor inelului benzenic. Constantele de stabilitate condițională au fost similare, reflectând capacitățile de formare ale legăturilor tiosemicarbazonelor studiate cu cupru(II), cu excepția derivatului fenil, care are o constantă mai mare cu circa jumătate de ordin. Folosind valorile pK_1 și constantele de stabilitate condițională ale complexelor $[\text{CuL}^R]$ au fost de asemenea calculate constantele totale de stabilitate (β)

(Tabelul 1). Valorile constantelor condiționale și totale de stabilitate obținute au reflectat formarea complexilor de cupru(II) foarte stabili cu toți cei patru liganzi și gradul de disociere al acestor complecși la pH fiziologic a fost estimat a fi mai mic de 1% chiar la concentrația $\leq 1 \mu\text{M}$.

Tabelul 1. Valorile constantelor de disociere pK_1 ale liganzilor, parametrii spectrofotometrici ai liganzilor și complexilor Cu(II), valorile constantelor condiționale de stabilitate (β') și constantelor totale de stabilitate (β) pentru complecșii Cu(II) cu NaH_2L^1 , NaH_2L^2 , NaH_2L^3 , NaH_2L^4

Parametrul	Ligandul			
	NaH_2L^1	NaH_2L^2	NaH_2L^3	NaH_2L^4
Maximumuri în spectrele electronice ale reactivilor (λ , nm)	302, 328, 367	302, 328, 367	302, 329, 367	303, 332, 370
Constanta de disociere pK_1	7.73 ± 0.02	7.82 ± 0.02	7.79 ± 0.02	7.73 ± 0.04
Maximumul de absorbție al compusului coordinativ (λ , nm)	375	375	375	380
Raportul molar de combinare Cu:L	1:1	1:1	1:1	1:1
Domeniul optim de formare (pH)	5.1 - 6.3	5.3 - 6.3	5.3 - 6.3	4.8 - 6.0
Absorbțivitatea molară (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) la λ_{max}	10890	12462	13025	17825
$\lg\beta'$ pentru $[\text{Cu L}^R]$ la pH=5.75	12.81 ± 0.06	12.87 ± 0.06	12.77 ± 0.07	13.50 ± 0.04
$\lg\beta$ ($\beta = \beta' \times \alpha_H$)	14.79	14.94	14.81	15.48
Domeniul de concentrații unde se respectă legea Lambert-Bouguer-Beer (μM)	6 - 100	10 - 100	10 - 100	6 - 100

3.2. Compuși coordinați ai cuprului(II), nichelului(II), cobaltului(II) cu derivați ai tiosemicarbazonei aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice și aplicațiile lor

Tiosemicarbazona aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice ($(\text{H}_2\text{L}^5)\text{Cl}$) are structură ionică, este solubilă în apă și formează soluții stabile în timp. Spectrele electronice de absorbție în domeniul UV-vizibil demonstrează modificări caracteristice în funcție de pH-ul soluțiilor.

Aăugarea soluțiilor ionilor de Cu(II), Ni(II), Co(II) la soluțiile apoase ale tiosemicarbazonei aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice provoacă schimbări în spectrul electronic, ceea ce denotă formarea compușilor coordinați. Intensitatea benzii de absorbție pentru compușii noi formați depinde de natura metalului, tiosemicarbazonei și de raportul de

combinare. Studiul a demonstrat că, în soluții apoase cuprul(II) și nichelul(II) formează compuși în care raportul molar de combinare metal:ligand este 1:1, iar pentru cobalt(II) - 1:2. Ioni de cupru și nichel au tendința de a forma compuși cu structură plan-pătrată și permite coordinarea unui singur ligand tridentat. Ionul de cobalt(II) formează compuși cu structură octaedrică și raportul de combinare 1:2 pare a fi firesc. Domeniul de formare a complexilor coordinativi este practic același pentru toți ioni studiați, ceea ce denotă că are loc complexarea cu una și aceeași formă deprotonată a ligandului.

În baza studiului realizat a fost propusă o metodă de determinare concomitentă a conținutului de cupru(II) și cobalt(II) în apă cu reactivul $(H_2L^5)Cl$. Erorile relative ale analizelor efectuate se încadrează în limitele erorilor admisibile pentru metodele spectrofotometrice.

Pentru determinarea influenței prezenței substituentului și naturii lui de la azotul terminal al fragmentului tiosemicarbazidic au fost sintetizați și studiați trei derivați ai $(H_2L^5)Cl$ – clorura 4-metil-, 4-etil-, 4-fenil- tiosemicarbazonei aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice $((H_2L^6)Cl, (H_2L^7)Cl, (H_2L^8)Cl)$. Solubilitatea în apă la 25 °C a tiosemicarbazonelor reprezintă 10 g/L pentru $(H_2L^5)Cl$, 30 g/L pentru $(H_2L^6)Cl$, 5 g/L pentru $(H_2L^7)Cl$ și 2 g/L pentru $(H_2L^8)Cl$. Parametrii spectrofotometrici ai soluțiilor liganzilor și complexilor de Cu(II) sunt prezentați în Tabelul 2.

Tabelul 2. Valorile constantelor de disociere pK_1 pentru liganzi, raportul molar de combinare Cu:L, condițiile optime de formare și parametrii spectrofotometrici pentru complexii Cu(II) cu $(H_2L^5)Cl, (H_2L^6)Cl, (H_2L^7)Cl, (H_2L^8)Cl$

Parametrul	Ligandul			
	$(H_2L^5)Cl$	$(H_2L^6)Cl$	$(H_2L^7)Cl$	$(H_2L^8)Cl$
Maximumuri în spectrele electronice ale reactivilor (λ , nm)	302, 328 367	302, 328 367	302,329 367	303, 332 371
Constanta de disociere pK_1	7.46 ± 0.01	7.54 ± 0.02	7.31 ± 0.01	7.03 ± 0.01
Maximumul de absorbție al complexului (λ , nm)	375	375	375	380
Raportul de combinare Cu:L	1:1	1:1	1:1	1:1
Domeniul optim de formare (pH)	4.7 - 5.9	5.3 - 6.2	5.2 - 6.4	4.8 - 6.2
Absorbțivitatea molară (ϵ , $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) la λ_{max}	10500	12925	12527	17927
Domeniul de concentrații unde se respectă legea Lambert-Bouguer-Beer (μM)	6 - 100	10 - 100	10 - 100	6 - 100

Procesele de disociere ale liganzilor $(H_2L^5)Cl, (H_2L^6)Cl, (H_2L^7)Cl, (H_2L^8)Cl$ au fost studiate prin titrări spectrofotometrice UV-Vis în soluții apoase în domeniul de pH 1-11.5.

Spectrele electronice de absorbție înregistrate ale soluțiilor $(H_2L^5)Cl$ (Figura 5) prezintă modificări caracteristice ale benzilor de tranziție suprapuse $\pi \rightarrow \pi^*$ și $n \rightarrow \pi^*$ dependente de pH, provenite datorită cromoforului azometinic ($\lambda_{max} \sim 302$ nm) și grupei fenolice ($\lambda_{max} \sim 328$ nm). Cu toate acestea, acești liganzi conțin doi protoni disociabili, și anume atomii de hidrogen al grupei OH fenolice și NH-ului hidrazinic. Doar o etapă de deprotonare a putut fi observată în intervalul de pH studiat pe baza apariției punctelor izobestice la 230, 280 și 347 nm. Prin urmare, doar o valoare pK_1 a fost determinată pentru fiecare ligand, reieșind din prelucrarea spectrelor (Tabelul 3).

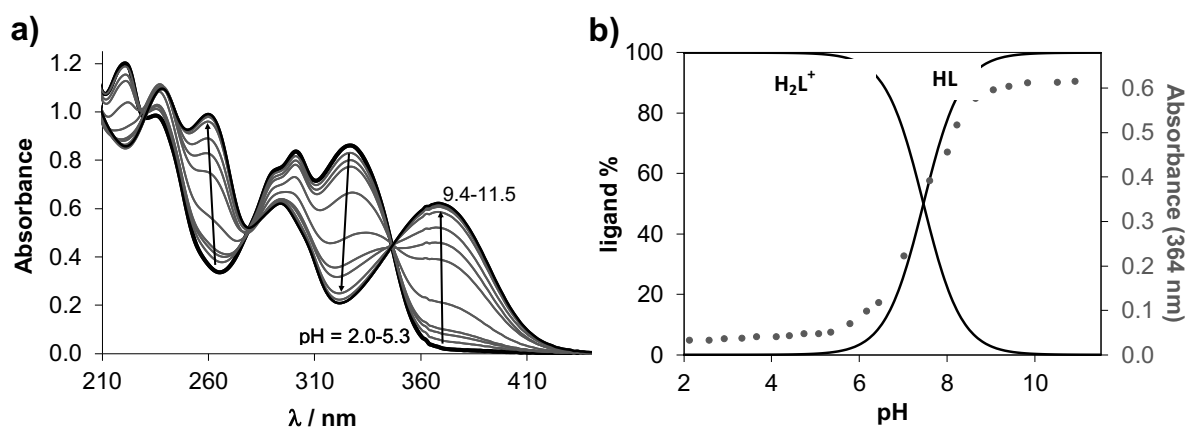


Fig. 5. Spectrele electronice de absorbție ale $(H_2L^5)Cl$ înregistrate la diferite valori de pH (a) și diagrama de distribuție a formelor procesului de disociere reprezentate împreună cu modificările absorbției la 364 nm (●) (b) ($C_L = 50 \mu M$, $I = 0.1 M$ (KCl), $t = 25^\circ C$)

Derivații monometilați și monoetilați la azotul terminal au valori pK_1 similare cu cele ale ligandului nesubstituit, în timp ce gruparea fenil în această poziție are ca rezultat o aciditate mai sporită. Diagrama de distribuție a concentrației calculată din valorile pK_1 (Figura 5(b) prezentată pentru $(H_2L^5)Cl$) arată că acești compuși sunt parțial deprotonați la pH fiziologic: 42-55% din ligand este sub formă HL neutră în cazul $(H_2L^5)Cl$, $(H_2L^6)Cl$, $(H_2L^7)Cl$, iar pentru $(H_2L^8)Cl$ - 70%. În mod special, această formă neutră HL formează un zwitterion datorită prezenței grupelor NMe_3^+ și O^- , ceea ce duce la o solubilitate sporită în apă. Caracterul lipofil al liganzilor la pH 7.4, exprimat prin coeficienți de distribuție ($\log D_{7.4}$ din Tabelul 3), a fost caracterizat prin metoda tradițională a balonului de agitare, folosind spectrele UV-Vis obținute după înregistrare. Valorile $\log D_{7.4}$ determinate dezvăluie faptul că introducerea grupărilor metil, etil și fenil mărește lipofilitatea în următoarea ordine: $(H_2L^5)Cl < (H_2L^6)Cl < (H_2L^7)Cl < (H_2L^8)Cl$. Acești compuși sunt mult mai hidrofilii decât compusul de referință nesubstituit, tiosemicarbazona aldehidei salicilice (TSCAS) ($\log D_{7.4}$: +1.74) [1].

Tabelul 3. Valorile constantelor de disociere pK_1 ale liganzilor cercetați, constantele totale de stabilitate ($\log\beta$), pK_a și pK_{derivat} pentru complexii Cu(II) cu $(H_2L^5)Cl$, $(H_2L^6)Cl$, $(H_2L^7)Cl$, $(H_2L^8)Cl$, valorile pCu calculate ($I = 0.1 \text{ M (KCl)}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$), coeficienții de distribuție ($\log D_{7.4}$) ai liganzilor și complexilor la $pH = 7.4$, constantele de viteză observate (k_{obs}) obținute pentru reacția redox a complexilor cu GSH ($pH = 7.4$; $C_{\text{complex}} = 25 \text{ } \mu\text{M}$, $C_{\text{GSH}} = 1.25 \text{ mM}$)

	$(H_2L^5)Cl$	$(H_2L^6)Cl$	$(H_2L^7)Cl$	$(H_2L^8)Cl$
$pK_1 (H_2L^+)$	7.46 ± 0.01	7.54 ± 0.01	7.31 ± 0.01	7.03 ± 0.01
% HL la pH 7.4	47%	42%	55%	70%
$\log D_{7.4}(\text{ligand})$	-0.84 ± 0.03	-0.39 ± 0.01	$+0.06 \pm 0.04$	$+0.68 \pm 0.04$
$\log\beta[CuHL]^{2+}$	12.00 ± 0.01	11.73 ± 0.02	11.66 ± 0.03	11.26 ± 0.02
$\log\beta[CuL]^+$	8.14 ± 0.01	7.76 ± 0.02	7.67 ± 0.03	8.55 ± 0.02
$\log\beta[CuLH_{-1}]^a$	-1.66 ± 0.02	-1.48 ± 0.08	-1.65 ± 0.09	-1.31 ± 0.05
$pK_a[CuHL]^{2+}$	3.86	3.97	3.99	2.71
$pK_a[CuL]^+$	9.80	9.24	9.32	9.86
$\log K_{\text{derivat}}[CuL]^{+b}$	0.68	0.22	0.36	1.52
pCu^c	12.21	11.79	11.82	12.80
$\log D_{7.4}(\text{complex})$	-1.00 ± 0.01	-0.79 ± 0.01	-0.40 ± 0.01	-0.17 ± 0.01
$k_{\text{obs}} (\text{min}^{-1})$	0.061 ± 0.022	0.073 ± 0.002	0.058 ± 0.001	0.025 ± 0.005

^a $[CuLH_{-1}] = [CuL(OH)]$. ^b $\log K_{\text{derivat}} = \log\beta[CuL]^+ - pK_a(H_2L^+)$ la echilibrul: $Cu^{2+} + H_2L^+ \rightleftharpoons [CuL]^+ + 2H^+$. ^c $pCu = -\log[Cu(II)]$ la $pH = 7.4$; $C_{Cu(II)} = 10 \text{ } \mu\text{M}$; $C_L = 10 \text{ } \mu\text{M}$.

Atât valorile $\log K_{\text{derivat}}[CuL]^+$, cât și pCu (Tabelul 3) dezvăluie următoarea abilitate de coordinare a cuprului(II) cu liganzii: $(H_2L^6)Cl \sim (H_2L^7)Cl < (H_2L^5)Cl \ll (H_2L^8)Cl$. Prin urmare, doar substituentul fenil la azotul terminal a mărit stabilitatea complexului de cupru(II).

Activitatea anticancer a complexilor de cupru(II) ale tiosemicarbazonelor este adesea sugerată a fi legată de reacția lor de oxidoreducere cu tioli celulari, cum ar fi L-glutation (GSH). GSH este capabil să reducă complexul de cupru(II)-TSC, cu formare de specii de cupru(I), a căror reoxidare are ca rezultat apariția speciilor ROS [3]. A fost investigată reacția de oxidoreducere directă a complexilor de cupru(II) cu GSH cu metoda spectrofotometrică în condiții strict anaerobe la $pH = 7.4$. Modificările spectrale au demonstrat un proces de oxidoreducere reversibil.

4. SINTEZA, STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE COMPUȘILOR COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU DERIVAȚI AI TIOSEMICARBAZONELOR ALDEHIDEI SALICILICE 5-SUBSTITUITE

4.1. Sinteza și structura compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-sulfosalicilice și unii derivați ai acesteia

La interacțiunea NaHL^1 și, respectiv NaHL^2 cu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ în DMSO au fost separați compușii coordinativi $[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{DMSO})_2]$ (**1**) și $[\text{Cu}(\text{HL}^2)(\text{DMSO})_2]$ (**2**), iar $[\text{Cu}_2(\text{HL}^1)_2(\text{H}_2\text{O})_3]$ (**1'**) și $[\text{Cu}(\text{HL}^3)(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**3**) au fost obținuți prin reacții asemănătoare în apă. Compușii **1** și **2** cristalizează într-un sistem cristalin monoclinic cu grupul spațial $P\bar{1}$. Analiza prin difracție cu raze X a relevat prezența unei unități mononucleare, în care unitatea asimetrică conține un ligand dianionic coordonat la ionul cupru(II) și două molecule de DMSO coordonate. Poliedrul de coordinare al ionului de cupru(II) a fost asigurată de setul donor ONS al bazei Schiff și doi atomi de oxigen ai moleculelor de DMSO, unul fiind situat în planul bazal al poliedrului, iar celălalt în poziție apicală. Grupa sulfonat a ligandului din **1** și **2** nu participă la coordonarea cuprului(II). Astfel, poliedrul de coordinare al atomului central de cupru are forma unei piramide pătrate ușor distorsionate (valoarea $\tau = 0.098$ și 0.111 [4] pentru **1** și, respectiv, **2**), iar numărul de coordinare al ionului de metal este 4+1 (Figura 6).

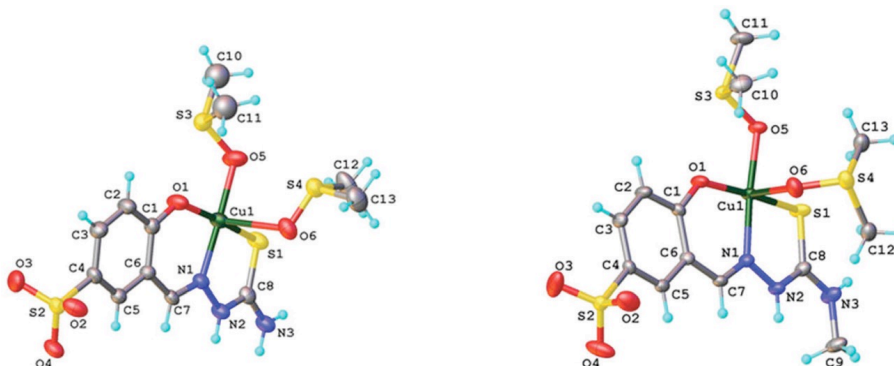


Fig. 6. Reprezentarea ORTEP a structurii moleculare a compusului 1 (în stânga), 2 (în dreapta)

Spre deosebire de **1** și **2**, una dintre grupările sulfonat din compusul **1'** participă la formarea legăturii Cu–O prin intermediul unuia dintre atomii de oxigen cu atomul de cupru(II) al fragmentului vecin (Figura 7). Două fragmente $\text{Cu}(\text{HL}^1)$, notate A și B sunt unite prin legătura $\text{Cu1A}-\text{O2B}$ $2.432(2)$ Å. Ca urmare, ambii atomi de cupru sunt coordinați tridentat prin setul ONS al liganzilor $(\text{HL})^{2-}$ și poliedrul de coordinare al atomului Cu1A este completat de o moleculă de apă, iar pentru Cu1B – de două molecule de apă. Structura cristalului $[\text{Cu}_2(\text{HL}^1)_2(\text{H}_2\text{O})_3]$ este determinată de legăturile de hidrogen $\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}$ și $\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}$, ce au dus la formarea unei rețele tridimensionale.

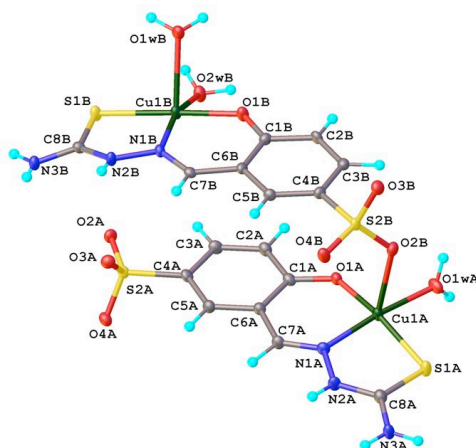


Fig. 7. Reprezentarea ORTEP a structurii moleculare a compusului 1'

Structura derivatului centrosimetric tetranuclear $[\text{Cu}(\text{HL}^3)(\text{H}_2\text{O})]_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**3**) este formată din două unități asimetrice $[\text{Cu}(\text{HL}^3)(\text{H}_2\text{O})]_2$ legate prin punți sulfonat (Figura 8). Pe lângă aceasta, structura complexului este susținută suplimentar prin legături de hidrogen, care implică molecule de apă coordonate și interacțiuni $\pi \cdots \pi$, confirmată prin distanța centroid-centroid 3.682 Å. După cum se poate observa, rolul celor patru grupări sulfonat este diferit: două dintre grupările sulfonat nu se coordonează la atomii de cupru, în timp ce celelalte două acționează ca niște punți bidentate, distanța $\text{Cu1A} \cdots \text{Cu1B}'$ este egală cu 4.795(3) Å.

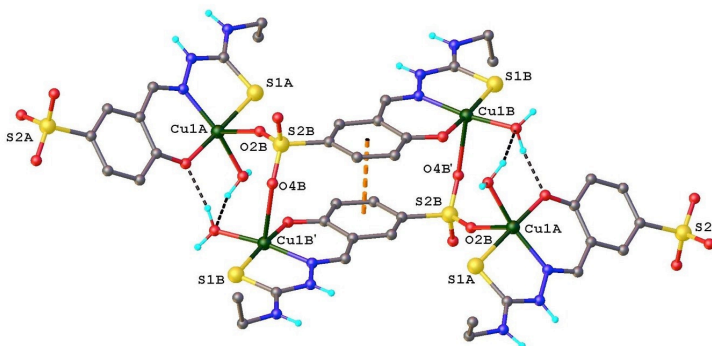


Fig. 8. Structura moleculară a complexului tetranuclear 3. Interacțiunea centroid-centroid este indicată printr-o linie oranj întreruptă

4.2. Structura compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice

Studiul cu raze X al monocristalelor de tiosemicarbazonă a aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice a stabilit că acest compus cristalizează în formă de sare, cu formula $(\text{H}_2\text{L}^5)\text{Cl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$, în care sarcina cationului organic $(\text{H}_2\text{L}^5)^+$ este compensată de cea a anionului Cl. La interacțiunea $(\text{H}_2\text{L}^5)\text{Cl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ cu diferite săruri de cupru(II) în medii neutre au fost obținuți patru compuși cu formulele $[\text{Cu}(\text{HL}^5)\text{Cl}]_2\text{Cl}_2 \cdot 4.5\text{H}_2\text{O}$ (**5**),

[Cu(HL⁵)(Cl)(NO₃)]·2H₂O (**9**), [Cu(H₂L⁵)Cl]SO₄·0.75H₂O (**10**) și [Cu(HL⁵)Cl]₂(ClO₄)₂·3.5H₂O (**11**). Studiul cu raze X a stabilit, că raportul cupru:ligand organic în compușii finali **5**, **9**, **10**, **11** este 1:1. Trei compuși ai cuprului sunt compuși ionici, formați din cationul complex [Cu(HL⁵)Cl]⁺ ori [Cu(H₂L⁵)Cl]²⁺, anionii fiind Cl⁻, ClO₄⁻ și SO₄²⁻ respectiv, iar compusul ce conține anionul NO₃⁻ este un complex molecular. Toți compușii conțin molecule de apă de solvatare. Liganzii organici (HL⁵)⁰/(H₂L⁵)⁺ în acești compuși ai Cu(II) coordonează tridentat prin setul de atomi donori ONS în formă de ion bipolar, singur fiind electroneutral, însă conținând două centre ionice (zwitterion) în **5**, **9**, **11** și în forma sa protonată în **10** (Figura 9). În rezultatul coordinării, liganzii organici (HL⁵)⁰/(H₂L⁵)⁺ suferă schimbări conformaționale, fapt ce le-a permis acestor liganzi să coordoneze prin setul ONS, formând cu Cu(II) două cicluri metalice chelate asociate, unul fiind format din șase membri (CuOCCCN), iar celălalt din cinci membri (CuNNCS).

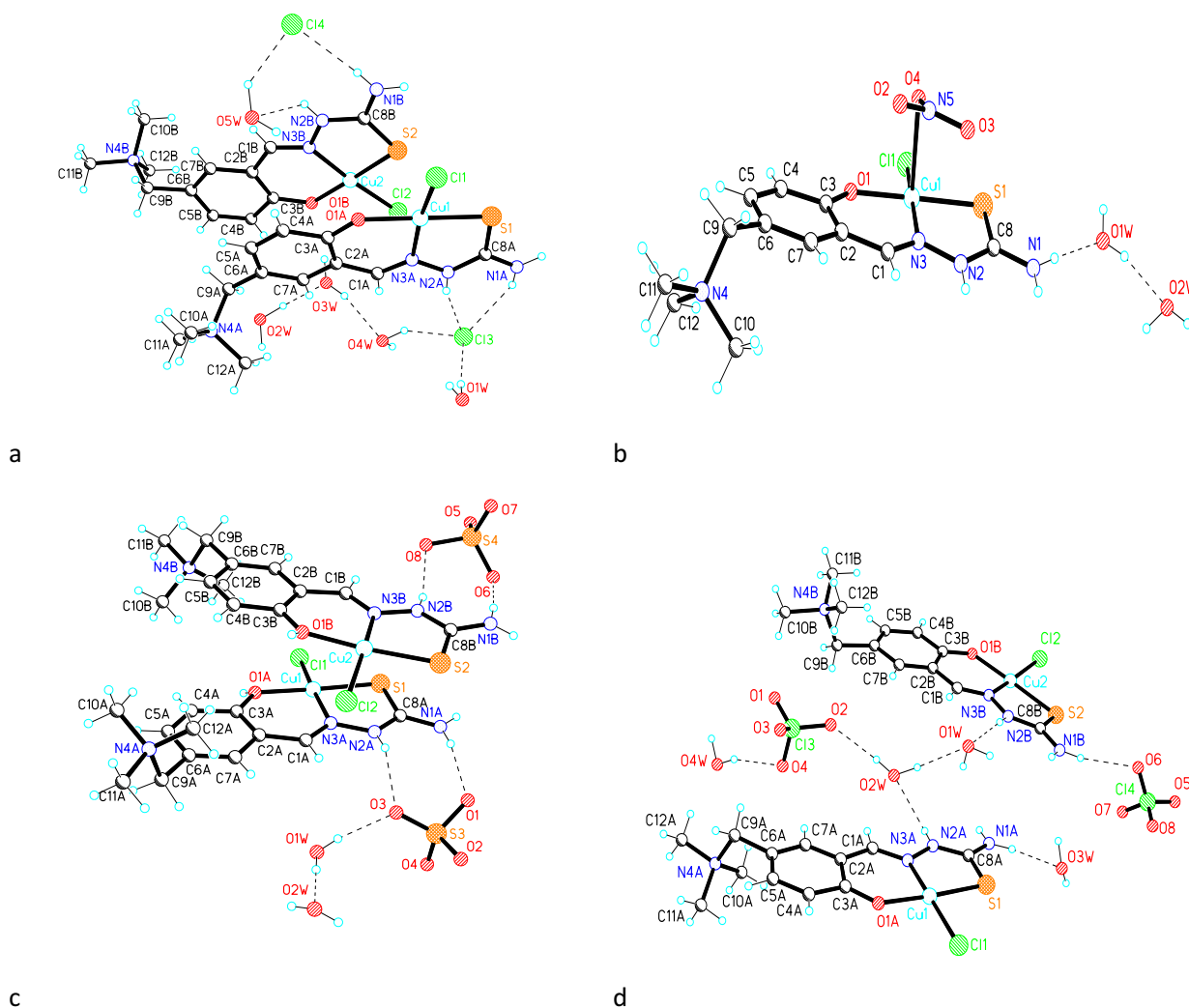


Fig. 9(a-d). Unitățile cristalografic independente din cristalele compușilor de Cu(II) **5**, **9**, **10**, **11**

4.3. Proprietățile electrochimice ale compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei 5-sulfosalicilice

Ciclul de oxidoreducere între stările Cu(II) și Cu(I) joacă un rol important în activitatea biologică a compușilor cuprului(II). Transformările redox de tip Fenton în sistemele Cu(I)/Cu(II)/H₂O₂/O₂ sunt responsabile pentru producerea unei varietăți de specii reactive de oxigen (ROS), inclusiv HO· și O₂^{•-}. Prin urmare, s-a investigat comportamentul redox al compușilor **1-4** în DMSO, în care toți cei patru compuși prezintă o solubilitate bună. Pentru compușii **1-3**, ce conțin hidrogen sau substituent alifatic la atomul de azot N³ al tiosemicarbazidei, au fost obținute rezultate similare. Voltamogramele ciclice corespunzătoare în DMSO/*n*Bu₄NPF₆ la viteza de baleiaj de 100 mVs⁻¹ sunt prezentate în Figura 10.

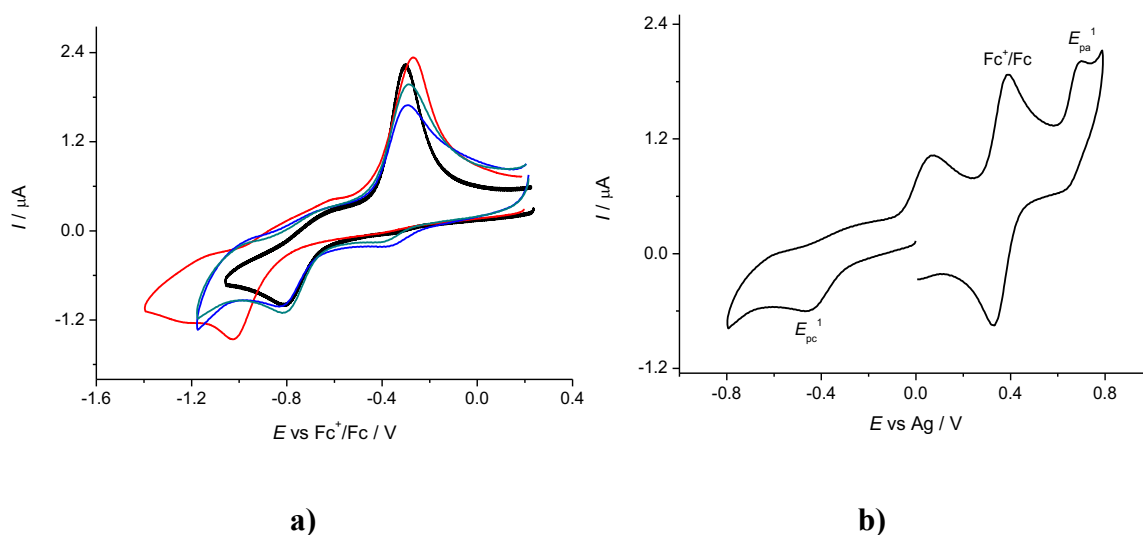


Fig. 10. Voltamogramele ciclice ale compușilor 1 (linie neagră), 2 (linie albastră), 3 (linie verde) și 4 (linie roșie) cu concentrația 0.5 mM, în DMSO/*n*Bu₄NPF₆, la viteza de baleiaj de 100 mV s⁻¹ (a). Voltamograma ciclică a compusului 2 (0.25 mM) în prezența ferocenului (0.25 mM), în DMSO/*n*Bu₄NPF₆, la viteza de baleiaj de 100 mV s⁻¹ (b)

Voltamogramele se caracterizează printr-un pic de reducere care se presupune că este cauzat de procesul de reducere Cu(II) → Cu(I) și un pic de reoxidare deplasat puternic pentru speciile Cu(I) formate după reducere. Complecșii **1-3** au arătat picuri de reducere ireversibilă similare cu $E_{pc}^1 = -0.81$ V față de Fc⁺/Fc⁰, care au fost atribuite reducerii Cu(II) → Cu(I). Apariția picului de oxidare intens în timpul scanării inverse la aproximativ -0.3 V față de Fc⁺/Fc⁰ a prezentat caracteristici tipice ale unui proces de redizolvare. În consecință, procesul de reducere în regiunea primului pic catodic a fost ireversibil electrochimic și a condus la depunerea complecșilor de cupru(I) mai puțin solubili pe suprafața electrodului. La fel se comportă și compusul **4**, dar a fost observată și o schimbare a potențialului primului pic catodic la

$E_{pc}^1 = -1.02$ V față de Fc^+/Fc^0 , indicând faptul că substituția la atomul marginal de azot al tiosemicarbazidei cu grupa fenil a dus la o creștere a potențialului catodic de reducere a $Cu(II)$. Este de remarcat faptul, că la ciclurile de oxidoreducere răspunsul voltametriei ciclice a prezentat schimbări neglijabile în forma voltamogramelor corespunzătoare în partea catodică, confirmând repetabilitatea proceselor observate. După redizolvarea complexului de cupru(I) prin reoxidare, la scanarea inversă, complexul de cupru(II) recuperat ar putea fi din nou redus la același potențial catodic.

Un comportament de oxidoreducere analog electrochimiei în DMSO, cu un pic de reducere înalt și un pic de reoxidare puternic deplasat, a fost observat pentru **1-4** în soluții apoase de 0.1 M NaCl netamponate, la viteza de baleiaj de 100 mVs^{-1} cu electrodul de lucru de platină (Figura 11). Trebuie remarcat faptul că pentru studiile voltametrice ciclice au fost folosite soluții saturate ale complecșilor respectivi. Cea mai redusă solubilitate în apă a fost observată pentru compusul **4**, iar cea mai mare pentru compusul **1**.

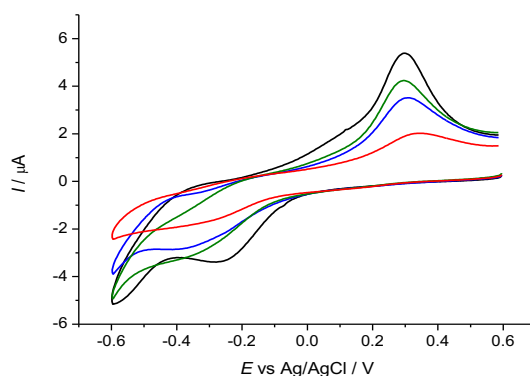


Fig. 11. Voltamogramele ciclice ale soluțiilor saturate pentru compușii 1 (linie neagră), 2 (linie albastră), 3 (linie verde) și 4 (linie roșie) în $H_2O/NaCl$ la o viteză de baleiaj de 100 mVs^{-1}

Deplasările potențialului de oxidare anodică a complecșilor **1-4** prin înlocuirea DMSO aprotic cu mediul apos donor de protoni sunt determinate de energia de solubilitate preconizată pentru DMSO și H_2O și prin implicarea protonilor în procesul redox în apă în contrast cu mediul aprotic [5, 6]. Cel mai mic potențial de reducere $E_{pc}^1 = -0.27$ V vs. Ag/AgCl a fost observat pentru **1** cu gruparea terminală $-NH_2$ în ligand. Pentru comparație, potențialul de oxidoreducere în soluțiile apoase netamponate a fost recalculat față de potențialul (Fc^+/Fc^0), reieșind din potențialele redox cunoscute pentru Ag/AgCl (0.197 V) și ferocen (0.64 V), în comparație cu electrodul standard de hidrogen. În consecință, potențialul picului catodic pentru **1** în sistemul $H_2O/NaCl$ ar corespunde potențialului -0.71 V față de Fc^+/Fc^0 . Pentru **2-4**, au fost observate

voltamograme ciclice foarte asemănătoare cu primul pic catodic larg, cu un maxim la aproximativ -0.35 V față de Ag/AgCl ($E_{pc}^1 = -0.79$ V față de Fc^+/Fc^0), similar cu cele înregistrate când a fost folosit DMSO ca solvent.

4.4. Studiul proprietăților antiproliferative ale compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei 5-sulfosalicilice

Compușii cuprului(II) și tiosemicarbazonele aldehidei 5-sulfosalicilice corespunzătoare au fost testate pentru citotoxicitate împotriva unui grup de linii de celule canceroase umane, care includ adenocarcinomul mamar MCF7, carcinomul ovarian (A2780 și A2780cis), adenocarcinomul de sân uman MDA-MB-231 și celulele necanceroase umane embrionare HEK293. Valorile IC_{50} sunt prezentate în Tabelul 4.

Tabelul 4. Citotoxicitatea tiosemicarbazonelor studiate și a compușilor coordinativi ai cuprului(II) 1-4

Compusul	$IC_{50}(\mu M)^a$				
	A2780	A2780cisR	MCF7	MDA-MB-231	HEK293
NaH₂L¹	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
NaH₂L²	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
NaH₂L³	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
NaH₂L⁴	516 ± 210	>1000	>1000	>1000	>1000
1	56 ± 9	84 ± 14	61 ± 5	97 ± 14	>95
2	30 ± 3	40 ± 3	35 ± 1	>40	>40
3	59 ± 15	106 ± 2	93 ± 9	134 ± 22	>120
4	78 ± 14	134 ± 19	131 ± 5	116 ± 36	>170
cisplatina	0.60 ± 0.05	11 ± 2	22 ± 7	27 ± 8	4.3 ± 1.0

^a50% concentrații de inhibiție (IC_{50}) în linii celulare de adenocarcinom de sân uman MCF7, carcinomul ovarian A2780, A2780cis, adenocarcinomul de sân uman MDA-MB-231 și celulele umane embrionare HEK293, determinate cu ajutorul testului MTT după expunere timp de 72 de ore. Valorile reprezintă mediile ± deviațiile standard, obținute din cel puțin trei experimente independente.

Rezultatele obținute au demonstrat că tiosemicarbazonele nu posedă citotoxicitate semnificativă împotriva liniilor de celule canceroase testate, cu excepția NaH_2L^4 . La coordinarea lor cu cupru(II), a fost observată o creștere de 10-30 ori a citotoxicității. Nu s-au putut stabili relații clare între structură și activitate, deoarece complexii de cupru(II) nu au fost analogi din punct de vedere structural. Cu toate acestea, **1** și **2**, fiind coordinați cu doi liganzi DMSO, au demonstrat citotoxicități mai mari decât **3** și **4**, care conțineau liganzi H_2O în loc de DMSO. Împotriva carcinomului ovarian A2780 și a A2780cisR, rezistent la cisplatină, complexii testați au arătat eficacități similare cu o creștere de 1.3-2 ori a activităților în A2780cisR comparativ cu cea din linia de celule parentale A2780. Linia celulară A2780cisR a fost derivată din A2780 prin

expunere cronică la cisplatină și marcată de niveluri ridicate de proteine de reparație și de glutaționare [7, 8].

Complecșii cu cupru(II) sunt toxici pentru celulele normale datorită activității lor redox și afinității pentru pozițiile de legătură tipic ocupate de alte metale (de exemplu, fier). Prin urmare, complecșii au fost testați împotriva liniei celulare renale embrionare netumorigenă HEK293 ca model al celulelor sănătoase. Pe baza rezultatelor testului MTT, **1-4** au demonstrat o citotoxicitate ușor scăzută împotriva celulelor necanceroase.

4.5. Inducerea ROS și activarea protecției antioxidante

Complecșii cuprului(II) pot iniția reacții Fenton intracelular, care au ca rezultat acumularea ROS, mecanismul presupus al activității biologice pentru mulți complecși de cupru(II). Într-adevăr, majoritatea studiilor descriu activitățile anticanceroase observate, luând în considerație potențialul de oxidoreducere al complecșilor de cupru(II). Reducerea Cu(II) la Cu(I) are loc în prezența tiolilor intracelulari, cum ar fi glutatationul (GSH), rezultând o epuizare a grupurilor de GSH [9, 10]. În reacția cu oxigenul molecular, Cu(I) este reoxidat la Cu(II), generând astfel radicali reactivi de superoxid ($O_2^{\cdot-}$), care sunt dăunătoare proceselor celulare. Generarea speciilor ROS are loc și ca o consecință a metabolismului și celulele dezvoltă sisteme antioxidante ca un mecanism de apărare.

Pe baza rezultatelor experimentelor electrochimice, s-a așteptat ca activitatea de oxidoreducere a complecșilor **1-4** să mărească semnificativ cantitatea de ROS în celulele canceroase. Intervalul potențialului de oxidoreducere biologic accesibil din celule este de la -0.4 V până la +0.8 V față de electrodul normal de hidrogen, iar reacțiile cu potențiale mai mari sau mai mici nu pot să aibă loc în mediul celular. Așa cum se poate vedea în Figura 11, potențialul de reducere al tuturor complecșilor apare în intervalul accesibil din punct de vedere biologic, ceea ce înseamnă că pot fi reduse cu GSH și favorizează generarea de radicali. În plus, în voltamogramele ciclice s-au înregistrat picuri de oxidare. Prin urmare, era de așteptat ca în celulele canceroase Cu(I) să se reoxidizeze în Cu(II) în reacțiile Fenton.

Acumularea ROS a fost evaluată pe linia celulară MDA-MB-231 de cancer de sân triplu-negativ cu rezistență mare, utilizând diacetat de 2',7'-diclorodihidrofluoresceină ($H_2DCF-DA$), considerată drept probă. Acesta traversează membrana celulară prin difuzie pasivă și este reținută în celulă după scindarea enzimatică. La oxidarea cu ROS, H_2DCF nefluorescent este transformat în 2',7'-diclorofluoresceină (DCF) cu fluorescență înaltă, ca indicație a nivelurilor ROS intracelulare semnificative. Pentru a stabili dacă inducerea ROS ar putea duce la moartea celulelor, au fost detectate speciile ROS la un moment timpuriu de 5 ore după incubarea cu

compușii cercetați. Valorile au fost normalizate la fluorescența celulelor netratate și au fost prezentate ca schimbare relativă față de fluorescența celulelor tratate cu proba fluorescentă. Valorile fluorescenței medii generate au fost reprezentate pe o diagramă pentru o vizualizare comodă (Figura 11). Terț-butilhidroperoxidul (TBHP, 50 μM), un peroxid organic, a fost utilizat drept control pozitiv în testul ROS.

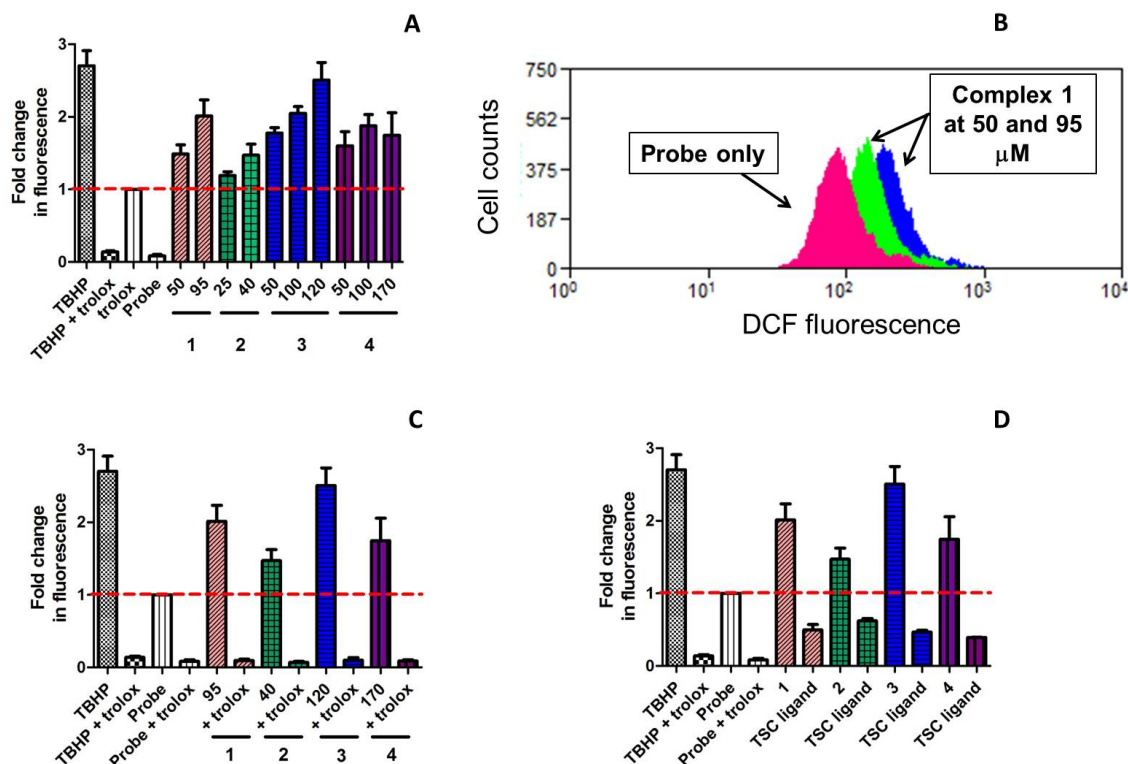


Fig. 12. Detectarea ROS cu H₂DCF-DA (20 μM) după expunerea celulelor MDA-MB-231 cu TBHP (control pozitiv), trolox și complexii 1–4 la concentrațiile indicate (A), complexii 1–4 la concentrațiile indicate și complexii corespunzători tratați cu trolox (C), complexii 1–4 la concentrațiile indicate și TSC corespunzătoare (D). Valorile reprezintă mediile \pm abateri standard de la cel puțin trei experimente reproductibile independente cu timpul de expunere de 5 ore. Histograme reprezentative pentru creșterea fluorescenței DCF la tratament cu compusul 1 (B)

Complexii cuprului(II) 1-4 au demonstrat o inducere semnificativă a speciilor ROS într-o manieră dependentă de doză după 5 ore de incubare (Figura 12A). Nivelul speciilor ROS generate a fost comparabil cu cel al TBHP. Toți complexii au indus o cantitate similară de ROS în condiții identice, corelate cu potențialul lor de reducere similar. În contrast, tiosemicarbazonele corespunzătoare nu au arătat nici o generare a speciilor ROS (Figura 12D).

De fapt, nivelul lor de fluorescență a fost chiar mai mic decât fluorescența probei, ceea ce a indicat rolul cuprului(II) în generarea ROS. Vitamina E solubilă în apă, analog al troloxului (100 μM), este folosită pentru a proteja celulele împotriva stresului oxidativ, de aceea troloxul a fost utilizat în acest test ca un agent de captare ROS [11]. Celulele au fost preincubate cu trolox timp de 30 de min și expuse la **1-4** timp de încă 5 ore. După cum se vede din Figura 12C, nivelurile fluorescenței intracelulare au scăzut semnificativ în prezența troloxului, chiar și după expunere la TBHP, ceea ce indică stingerea efectivă a ROS. Aceste rezultate sugerează, că complexii de cupru(II) acționează prin inducerea unor nivele critice de specii reactive de oxigen.

După generarea ROS, celulele își pot activa sistemul de apărare antioxidant ca mecanism de supraviețuire, care va avea ca rezultat exprimarea factorului de transcripție nrf2. Proteina nrf2 reglementează un număr de gene în aval responsabile de creșterea celulelor și apoptoza, repararea ADN-ului și răspunsul inflamator. Rolul acestor gene în aval este de a contracara efectele mortale ale ROS excesive care, atunci când sunt lăsate necontrolate, vor conduce la un nivel ridicat de stres oxidativ și, în consecință, la moartea celulelor.

Întrucât **1-4** au indus o cantitate semnificativă de ROS, a fost investigată exprimarea nrf2 în celulele MDA-MB-231 după expunere. Deoarece inducerea speciilor ROS au început la punctele timpurii, celulele au fost expuse complexilor și ligandului NaH_2L^3 la concentrațiile indicate timp de 24 de ore. Ulterior, exprimarea nrf2 a fost determinată prin Western blot. Așa cum se poate vedea în Figura 13, toți complexii au indus exprimarea marcantă a nrf2 într-o manieră dependentă de concentrație și cea mai puternică reglare a corespuns concentrațiilor IC_{50} .

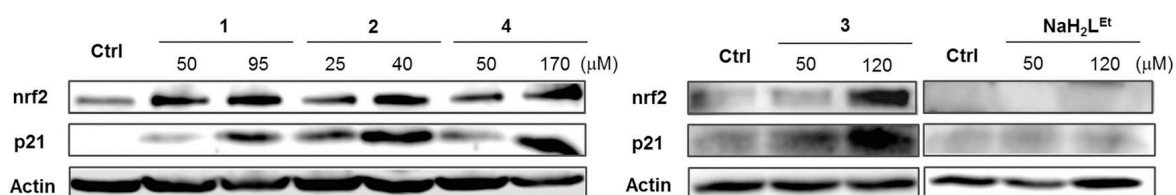


Fig. 13. Analiza Western blot a proteinelor nrf2 și p21. Celulele MDA-MB-231 au fost colectate după incubare cu compușii investigați, la concentrațiile indicate timp de 24 de ore. Lizatele au fost izolate și examinate prin Western blot. Actinul a fost folosit ca o probă de control.

Pentru validarea ulterioară, a fost examinată și exprimarea proteinei p21. Proteina p21 este un inhibitor de kinază dependentă de ciclină (cdk), despre care se știe că este o țintă majoră a stopării ciclului celular mediată de proteina p53 [12].

La afectarea ADN-ului celulelor canceroase de către compușii citotoxici, p21 activează oprirea ciclului celular între faza G1 și S pentru a permite celulelor repararea completă a

ADN-ului înainte de a trece la o altă fază a ciclului celular. După cum era de așteptat, nivelurile de proteină p21 au fost reglate în mod dependent de doză, în acord cu reglarea nrp2. În plus, au fost testate efectele compusului **3**, în comparație cu proliferarea corespunzătoare a ligandului NaH_2L^3 la concentrații similare și a fost constatat, că NaH_2L^3 nu a indus nici un răspuns antioxidant în celulele canceroase MDA-MB-231. În mod concludent, rezultatele au demonstrat rolul-cheie al cuprului(II) pentru activitatea citotoxică a acestei clase de complecși și a implicat inducerea ROS ca mod de bază al acțiunii.

4.6. Activitatea antiproliferativă a complecșilor cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice

Activitatea de inhibare a creșterii celulare a tiosemicarbazonele aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice (H_2L^{5-8})Cl și complecșilor de cupru(II) **5-8** a fost determinată pe linii celulare de adenocarcinom colonic uman Colo205 sensibil la doxorubicină, adenocarcinom colonic uman Colo320 rezistent la medicamente, neuroblastom SH-SY5Y și linii celulare necanceroase de fibroblast embrionar uman MRC-5. În calitate de medicament de referință a fost utilizată cisplatina. Reieșind din valorile IC_{50} (Tabelul 5), tiosemicarbazona cu substituentul etil la atomul de azot marginal al fragmentului tiosemicarbazidic (H_2L^7)Cl a prezentat activitate citotoxică mai mare în linii celulare Colo320 și neuroblastom SH-SY5Y în comparație cu alte tiosemicarbazone studiate. Toate celelalte tiosemicarbazone cercetate nu au atins valorile IC_{50} în intervalul investigat de concentrații până la 100 μM . La coordinarea cuprului(II) cu tiosemicarbazonele respective are loc creșterea efectului citotoxic. Complecșii **7** și **8** (cu substituenții 4-etil- și 4-fenil-) au demonstrat citotoxicități mai mari în comparație cu **5** și **6**.

Tabel 5. Citotoxicitatea tiosemicarbazonele (H_2L^{5-8})Cl și a compuşilor coordinativi ai cuprului(II) 5-8

Linii celulare Compusul	IC_{50} (μM)			
	MRC5	Colo205 sensibil	Colo320 rezistent	SH-SY5Y
(H_2L^5)Cl	>100	>100	>100	>100
(H_2L^6)Cl	>100	>100	>100	>100
(H_2L^7)Cl	>100	>100	63.83 ± 3.92	88.13 ± 9.19
(H_2L^8)Cl	>100	>100	>100	>100
5	>100	88.79 ± 4.4	>100	45.44 ± 9.1
6	>100	73.4 ± 2.24	>100	23.35 ± 3.57
7	57.79 ± 2.65	27.51 ± 1.68	30.47 ± 3.26	10.34 ± 2.65
8	52.71 ± 6.49	36.99 ± 3.06	45.02 ± 2.49	38.07 ± 5.18
cisplatina	55.67 ± 4.06	68.82 ± 5.08	12.69 ± 0.79	26.03 ± 2.38

Cel mai înalt efect citotoxic a fost observat pentru complexul **7** în linia celulară SH-SY5Y cu $IC_{50} = 10.34 \pm 2.65 \mu M$, acesta fiind mai mare decât efectul produs de compusul de referință cisplatina cu $IC_{50} = 26.03 \pm 2.38 \mu M$. În linii celulare Colo205 sensibil la doxorubicină complexii **7** și **8** cu $IC_{50} = 27.51 \pm 1.68 \mu M$ și respectiv $IC_{50} = 36.99 \pm 3.06 \mu M$ au arătat activități mai pronunțate, decât cisplatina ($IC_{50} = 68.82 \pm 5.08 \mu M$). Împotriva neuroblastomului SH-SY5Y complexii **6** ($IC_{50} = 23.35 \pm 3.57 \mu M$) și **7** ($IC_{50} = 10.34 \pm 2.65 \mu M$) au demonstrat un efect citotoxic mai pronunțat decât cisplatina ($IC_{50} = 26.03 \pm 2.38 \mu M$). Analiza datelor experimentale denotă că compusul coordinativ al Cu(II) cu 4-etiltiosemicarbazona aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice posedă activitate antiproliferativă pronunțată în toate liniile de celule canceroase testate.

4.7. Caracterizarea compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-sulfosalicilice și derivaților ei cu ajutorul spectroscopiei de rezonanță electronică paramagnetică (REP). Stabilitatea tiosemicarbazonelor aldehidei 5-sulfosalicilice și complexilor acestora cu cupru(II) la radiații UVA

Crearea medicamentelor anticanceroase este o sarcină multilaterală, care necesită elucidarea fotostabilității medicamentelor posibile într-un mediu biocompatibil, pentru a evita descompunerea rapidă nedorită a speciilor active. Instabilitatea fotochimică a unor produse farmaceutice poate duce la efecte secundare nedorite în timpul aplicării lor, precum și la probleme în manipulare și administrare. De aceea a fost studiat efectul expunerii radiației UVA asupra liganzilor NaH_2L^1 , NaH_2L^2 , NaH_2L^3 , NaH_2L^4 și complexilor de cupru(II) ai acestora (**1-4**) și, în special, capacitatea compușilor de a genera specii ROS la iradiere. Tehnica de captare a spinului în rezonanța paramagnetică electronică (REP) cu ajutorul 5,5-dimetil-1-pirolină-N-oxidului (DMPO), drept captură de spin, a fost aplicată pentru a genera specii ROS după iradierea UVA a complexilor **1-4** și liganzilor NaH_2L^1 - NaH_2L^4 în apă sau DMSO. Complexii Cu(II) au arătat o fotostabilitate ridicată și o capacitate limitată de a produce ROS. Totuși, după expunerea la radiații UVA, fotoexcitarea liganzilor NaH_2L^1 - NaH_2L^4 a cauzat schimbări semnificative în spectrele lor electronice. Aceste schimbări au fost atribuite interacțiunilor cu specii ROS generate (radicali hidroxil, anioni radicali de superoxid), identificate, folosind captura de spin. În plus, a fost confirmată formarea radicalilor hidroxil în experimente fără celule, investigând proprietățile de oxidoreducere a complexilor de Cu(II) cu peroxidul de hidrogen, prin realizarea experimentelor REP de captare a spinului. Datele obținute sunt în concordanță cu cele raportate anterior pentru celulele canceroase.

Pentru a urmări interacțiunea dintre peroxidul de hidrogen și complexii de Cu(II) **1-4**, însoțită de generarea speciilor ROS, au fost efectuate experimente REP de captare a spinului utilizând drept captură de spin DMPO. Adăugarea peroxidului de hidrogen în soluțiile apoase de **1-4**, conținând DMPO, a condus la apariția unui semnal REP cu patru linii caracterizat prin parametrii hamiltonieni de spin $A_N = 1.485$ mT, $A_H = 1.480$ mT și $g = 2.0057$, atribuite aductului de spin \cdot DMPO-OH [13, 14]. Figura 14a demonstrează spectrul REP al aductului de spin DMPO-OH monitorizat într-o soluție apoasă al complexului **2**, în prezența H_2O_2 și DMPO. Intensitatea semnalului REP a \cdot DMPO-OH a crescut proporțional cu concentrația H_2O_2 , care a fost adăugată la complexii **1-4** cu concentrații exacte. Această creștere a intensității semnalului demonstrează un mecanism de reacție complicat de generare a radicalilor hidroxilici. Mecanismele exacte ale reacțiilor care au loc în sistemul dat nu pot fi determinate, dar experimentele REP cu H_2O_2 au confirmat formarea aductului de spin-radical hidroxilic numai în soluțiile de complecși ai Cu(II) **1-4**. Un semnal cu intensitate scăzută a \cdot DMPO-OH a fost monitorizat în soluțiile de liganzi NaH_2L^1 - NaH_2L^4 , conținând H_2O_2 și DMPO (Figura 14b) și, de asemenea, în sistemul de referință (soluție apoasă DMPO conținând H_2O_2). Aceasta reflectă interacțiunea capturii de spin reactive cu H_2O_2 .

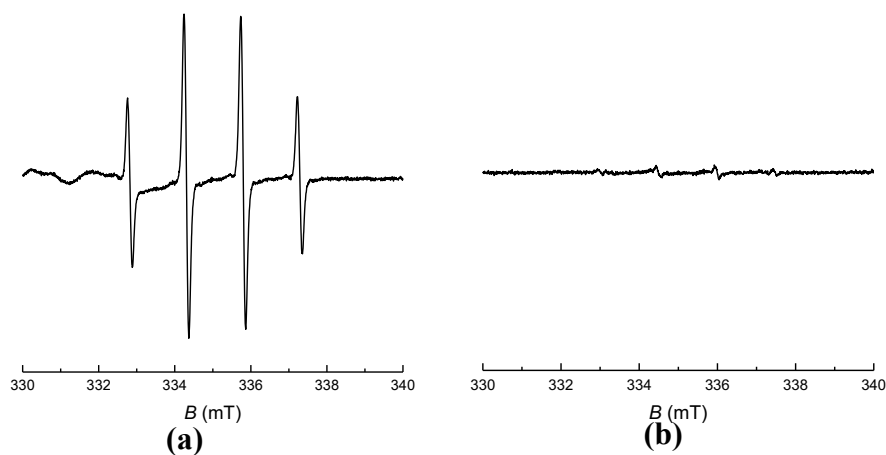


Fig. 14. Spectrul REP al aductului de spin \cdot DMPO-OH măsurat la 298 K în soluțiile: (a) $2/H_2O_2/DMPO/H_2O$ și (b) $NaH_2L^2/H_2O_2/DMPO/H_2O$. Concentrațiile inițiale: $C_0(2) = 0.4$ mM, $C_0(NaH_2L^2) = 0.4$ mM, $C_0(H_2O_2) = 0.4$ M, $C_0(DMPO) = 0.04$ M.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Au fost sintetizați opt agenți de coordinare, ce au cristalizat în formă de săruri (tip cationic și anionic) solubile în apă și optimizate metode de sinteză și separare a doisprezece compuși coordinativi noi ai cuprului(II) cu acești liganzi.
2. Modificarea substituenților la atomul de azot terminal al tiosemicarbazonelor nu influențează asupra valorilor constantei de disociere a liganzilor (pK_1), cu excepția fenil derivatului. În soluții apoase, derivații tiosemicarbazonelor aldehydelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice reacționează cu ionii de cupru(II), formând compuși cu raportul molar de combinare metal:ligand 1:1, care manifestă stabilitate înaltă. Coeficientul molar de absorbție al soluțiilor de complecși este dependent de natura substituentului de la atomul de azot terminal.
3. Prin metoda de difracție cu raze X pe monocristal a fost stabilit modul de coordinare al liganzilor, structura moleculară și cristalină a unei tiosemicarbazone și opt compuși coordinativi. Rezultatele demonstrează că, liganzii coordonează tridentat prin setul de atomi O, N, S, în formă neutră sau ionică, iar forma poliedrului de coordinare al atomului central și componența sferei interne depind de natura anionului și a substituenților din ligand.
4. Pentru compușii coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehydei 5-metiltrimetilamoniusalicilice a fost investigată reacția de oxidoreducere directă cu L-glutation (GSH) în condiții strict anaerobe la pH = 7.4. Cercetările au demonstrat că GSH poate să reducă complecșii de cupru(II) cu formare de specii de cupru(I). La barbotarea O_2 prin soluție complecșii de cupru(II) au fost aproape regenerați, ceea ce sugerează un proces de oxidoreducere reversibil.
5. Proprietățile electrochimice ale compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehydei 5-sulfosalicilice au fost investigate prin voltametrie ciclică în apă și DMSO. Potențialul de reducere al tuturor complecșilor apare în intervalul accesibil din punct de vedere biologic, ceea ce înseamnă că pot fi reduși cu GSH. Diferențele potențialelor de reducere a Cu(II) și oxidare a Cu(I) demonstrează ireversibilitatea acestor procese.
6. Activitatea antiproliferativă a tuturor compușilor a fost testată pe diferite linii de celule canceroase cu rezistență diferită față de chimioterapie. Tiosemicarbazonele au fost necitotoxice pentru toate concentrațiile testate, iar complecșii de cupru(II) au demonstrat activitate antiproliferativă semnificativă. Modul de acțiune al complecșilor cuprului(II) poate fi legat de inducerea stresului oxidativ sever, deoarece s-a demonstrat că ei induc semnificativ specii ROS în celulele canceroase, care promovează mecanismul de apărare

antioxidantă mediată de proteina nrf2. Rezultatele demonstrează rolul atomului de cupru(II) în mecanismul de acțiune al compușilor relați.

7. Experimentele REP de captare a spinului au demonstrat că la expunerea la radiații UVA tiosemicarbazonele aldehidei 5-sulfosalicilice se comportă ca fotosensibilizatori, care generează anionul radicalului superoxid și radicalul hidroxil prin fotoactivarea oxigenului molecular. Fotoactivarea oxigenului molecular și generarea speciilor ROS sunt diminuate semnificativ de fotoexcitarea cu radiații UVA a complecșilor de cupru(II). Capacitatea de oxidoreducere a ionului central de cupru(II) cu peroxidul de hidrogen a dus la formarea radicalilor hidroxil, detectați ca aductul de spin $^{\bullet}\text{DMPO-OH}$.

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea problemei științifice importante: stabilirea parametrilor formării complecșilor cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehydelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice în soluții apoase, determinarea activității antiproliferative a acestor compuși coordinativi, în special capacitatea lor de a genera specii ROS la nivel intracelular, care promovează mecanismul de apărare antioxidantă mediată de proteina nrf2.

Recomandări

Capacitatea compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei 5-sulfosalicilice de a produce specii ROS în celulele canceroase, care promovează mecanismul de apărare antioxidantă mediată de proteina nrf2, permite a recomanda compușii cercetați în studiile următoare, pentru a fi utilizați în industria farmaceutică.

Compusul coordinativ al cuprului(II) cu 4-etiltiosemicarbazona aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice se recomandă în următoarele studii biologice, deoarece posedă activitate antiproliferativă pronunțată în toate liniile de celule canceroase testate.

Tiosemicarbazona aldehidei 5-metiltrimetilamoniusalicilice poate fi recomandată pentru determinarea microcantităților de cupru(II) prin metoda spectrofotometrică.

BIBLIOGRAFIE

1. ENYEDY, E.A. et al. Complex-formation ability of salicylaldehyde thiosemicarbazone towards Zn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III) and Ga(III) ions. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2012, 25, pp. 4036-4047. DOI: 10.1002/ejic.201200360.
2. DOLOMANOV, O. V. et al. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* 2009, 42, pp. 339-341. DOI: 10.1107/S0021889808042726.
3. PARK, K.C. et al. Copper and conquer: copper complexes of di-2-pyridylketone thiosemicarbazones as novel anti-cancer therapeutics. *Metallomics*. 2016, 8, pp. 874-886. DOI: 10.1039/C6MT00105J.
4. ADDISON, A.W. et al. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(*N*-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1984, pp. 1349-1356. DOI: 10.1039/DT9840001349.
5. ROSSINI, E., KNAPP, E.-W. Proton solvation in protic and aprotic solvents. *J. Comput. Chem.* 2016, 37, pp. 1082-1091. DOI: 10.1002/jcc.24297.
6. GALSTYAN, A., KNAPP, E.-W. Accurate redox potentials of mononuclear iron, manganese, and nickel model complexes. *J. Comput. Chem.* 2009, 30, pp. 203-211. DOI: 10.1002/jcc.21029.
7. MASUDA, H. et al. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1988, 48, pp. 5713-5716. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/48/20/5713.full-text.pdf>.
8. GODWIN, A.K. et al. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, 89, pp. 3070-3074. DOI: 10.1073/pnas.89.7.3070.
9. MAJUMDER, S. et al. The role of a novel copper complex in overcoming doxorubicin resistance in Ehrlich ascites carcinoma cells in vivo. *Chem.-Biol. Interact.* 2006, 159, pp. 90-103. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.10.044.
10. BASU, S. et al. Detection and characterization of a glutathione conjugate of a novel copper complex. *In Vivo*. 2009, 23, pp. 401-408. <http://iv.iarjournals.org/content/23/3/401.full.pdf>.
11. MESSIER, E.M. et al. Trolox contributes to Nrf2-mediated protection of human and murine primary alveolar type II cells from injury by cigarette smoke. *Cell Death Dis.* 2013, 4, pp. 560-573. DOI: 10.1038/cddis.2013.96.
12. FRASER, J.A. Regulation and function of the original p53-inducible p21 gene. *Springer*. 2010, pp. 100-116. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4419-8231-5.pdf>.

13. BUETTNER, G.R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* 1987, 3, pp. 259–303. DOI: 10.1016/S0891-5849(87)80033-3.
14. DVORANOVÁ, D., BARBIERIKOVÁ, Z., BREZOVÁ, V. Radical intermediates in photoinduced reactions on TiO₂ (An EPR spin trapping study). *Molecules* 2014, 19, pp. 17279–17304. DOI: 10.3390/molecules191117279.

LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI

Articole în reviste științifice:

1. HRICOVÍNI, M., MAZÚR, M., SÎRBU, A., PALAMARCIUC, O., ARION V.B., and BREZOVÁ, V. Copper(II) thiosemicarbazone complexes and their proligands upon UVA irradiation: an EPR and spectrophotometric steady-state study. *Molecules*. 2018, 23, p. 721. DOI:10.3390/molecules23040721, **IF: 3,06**.
2. SÎRBU, A., PALAMARCIUC, O., BABAK, M.V., LIM, J.M., OHUI, K., ENYEDY, E.A., SHOVA, S., DARVASIOVÁ, D., RAPTA, P., ANG, W.H. and ARION, V.B. Copper(II) thiosemicarbazone complexes induce marked ROS accumulation and promote nrf2-mediated antioxidant response in highly resistant breast cancer cells. *Dalton Transaction*. 2017, 46, pp. 3833–3847. DOI: 10.1039/c7dt00283a, **IF: 4,052**.
3. SÎRBU, A., SECU, M., BOUROȘ, P., PALAMARCIUC, O. Sinteza și structura compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-(metilentrimetilamoniu)salicilice. *Studia Universitatis Moldaviae*. 2016, nr.6(96), pp. 214 -224. ISSN1814-3237, (Categorie B).
4. SÎRBU, A. Studiul spectrofotometric al compușilor coordinativi ai cobaltului(II), nichelului(II) și cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-(metilentrimetilamoniu)salicilice. *Studia Universitatis Moldaviae*. 2016, nr.1(91), pp. 149-155. ISSN1814-3237, (Categorie B).

Rezumate la conferințe naționale și internaționale:

1. SÎRBU, A. Proton dissociation processes of 5-methylenetrimethylammoniusalicylaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Faculty of Chemistry Conference “Alexandru Ioan Cuza” University Days*. Iași, România, 2019, p. 61.
2. SÎRBU, A., PALAMARCIUC, O. Proton dissociation constants of 5-sulfonate-salicylaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Faculty of Chemistry Conference “Alexandru Ioan Cuza” University Days*. Iași, România, 2018, p. 56.
3. SÎRBU, A., PALAMARCIUC, O. Studiul echilibrilor protolitice ale derivaților tiosemicarbazonei aldehidei 5-sulfosalicilice. *Conferința științifică “Integrare prin cercetare și inovare”*. Chișinău, 2018, p. 193.

4. **SÎRBU, A.**, PALAMARCIUC, O. Biologic properties of 5-sulfonate-salicylaldehyde thiosemicarbazones derivatives in copper(II) compounds. *Faculty of Chemistry Conference "Alexandru Ioan Cuza" University Days*. Iași, România, 2017, p. 57.
5. PALAMARCIUC, O., **SÎRBU, A.**, SHOVA, S. Synthesis, structure and properties of Cu(II) coordination compounds with water soluble thiosemicarbazone. *Faculty of Chemistry Conference "Alexandru Ioan Cuza" University Days*. Iași, România, 2016, p. 12.
6. **SÎRBU, A.**, PALAMARCIUC, O. Sinteza și proprietățile compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-sulfosalicilice. *Conferința științifică "Integrare prin cercetare și inovare"*. Chișinău, 2016, p. 213.
7. PALAMARCIUC, O., PALAMARCIUC, T., CORJA, I., STRATULAT, E., **SÎRBU, A.**, Activizarea tiosemicarbazonei aldehidei salicilice pentru sinteza materialelor inovative. *Conferința științifică "Integrare prin cercetare și inovare"*. Chișinău, 2016, p. 206.
8. PALAMARCIUC, O., **SÎRBU, A.**, PALAMARCIUC, T., SHOVA, S. Structural studies of products obtained on the activation of salicylaldehyde thiosemicarbazone with 3d transition metals. *8th International conference on materials science and condensed matter physics*. Chișinău, Moldova, 2016, p. 118.
9. **SÎRBU, A.**, SECU, M., REVENCO, M. The interaction of cobalt(II), nickel(II) and copper(II) with 5-(methylenetriethylammonium)salicylaldehyde thiosemicarbazone. *The XVIII-th International Conference "Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry"*. Chisinau, Moldova, 2015, p. 140.
10. **SÎRBU, A.**, SHOVA, S., PALAMARCIUC, O. Synthesis and structure of copper(II) complex with 5-sulfosalicylaldehyde thiosemicarbazone. *Faculty of Chemistry Conference "Alexandru Ioan Cuza" University Days*. Iași, România, 2015, p. 70.
11. **SÎRBU, A.** Studiul spectrofotometric al cuprului(II) cu tiosemicarbazona aldehidei 5-(metilentrietilamoniu)salicilice. *Conferința științifică "Integrare prin cercetare și inovare"*. Chișinău, 2015, p. 122.
12. **SÎRBU, A.**, SECU, M., REVENCO, M.. Spectrophotometric determination of the copper(II) with 5-(methylenetriethylammonium)salicylaldehyde thiosemicarbazone. *The International conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. Chisinau, 2014, p. 119.
13. **SÎRBU, A.**, SECU, M., REVENCO, M., BOUROSH, P. Synthesis and structure of new copper(II) complexes of 5-(methylenetriethylammonium)salicylaldehyde thiosemicarbazone. *7th International Conference on Materials Science and Condensed Matter Physics*. Chisinau, 2014, p. 170.

ADNOTARE

Sîrbu Angela, „Sinteza, structura și proprietățile compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu unele tiosemicarbazone solubile în apă”, teză de doctor în chimie, Chișinău, 2020.

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 228 referințe, 6 anexe, 130 pagini de text de bază, 81 figuri și 10 tabele. Rezultatele obținute au fost publicate în 17 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: compuși coordinativi ai cuprului(II), solubilitate în apă, tiosemicarbazonele derivaților aldehidei salicilice, stabilitatea complexilor, activitate antiproliferativă, specii reactive de oxigen.

Scopul lucrării: studiul proceselor de formare și separare ale compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice, stabilirea structurii, proprietăților compușilor obținuți și determinarea posibilităților de valorificare a proprietăților lor utile.

Obiectivele cercetării: sinteza tiosemicarbazonelor aldehidelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice; studiul procesului de formare a compușilor coordinativi în soluții apoase (determinarea parametrilor spectrofotometrici, componenței, stabilității, domeniului de pH ș.a.); stabilirea condițiilor de separare și optimizarea metodelor reproductibile de sinteză a compușilor coordinativi; determinarea structurii moleculare a compușilor prin metoda difracției cu raze X; stabilirea unor proprietăți chimice, electrochimice și activității biologice ale compușilor cercetați.

Noutatea și originalitatea științifică: sinteza a douăzeci de compuși organici și coordinativi ai cuprului(II) solubili în apă, determinarea parametrilor de formare a complexilor tiosemicarbazonelor aldehidelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice cu cupru(II) în soluții apoase; stabilirea modului de coordonare al liganzilor, structurilor moleculare și cristaline ale compușilor coordinativi obținuți; determinarea comportamentului electrochimic și activității antiproliferative a compușilor coordinativi ai cuprului(II), elucidarea mecanismului de acțiune biologică, în special capacitatea lor de a induce specii ROS la nivel intracelular. A fost demonstrat că, la expunerea la radiații UVA, tiosemicarbazonele se comportă ca fotosensibilizatori, care generează anionul radicalului superoxid și radicalul hidroxil prin fotoactivarea oxigenului molecular.

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea problemei științifice importante: stabilirea parametrilor de formare a complexilor cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidelor 5-sulfosalicilice și 5-metiltrimetilamoniusalicilice în soluții apoase, determinarea activității antiproliferative a acestor compuși coordinativi.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării: pentru prima dată a fost efectuat studiul procesului de formare în soluții apoase a compușilor cuprului(II) cu tiosemicarbazonele aldehidei salicilice substituite în poziția cinci cu grupe ușor ionizabile, a fost acumulată informația despre condițiile de formare și stabilitatea lor în soluții. A fost stabilită structura compușilor coordinativi în stare solidă, determinate proprietățile biologice ale compușilor coordinativi ai cuprului(II). Valoarea aplicativă constă în sinteza noilor compuși solubili în apă, cu activitate antiproliferativă, elucidarea fotostabilității complexilor și tiosemicarbazonelor cercetate.

Implementarea rezultatelor științifice: a fost demonstrată capacitatea compușilor coordinativi de a produce în celule canceroase specii ROS, care promovează mecanismul de apărare antioxidantă mediată de proteina nrf2.

АННОТАЦИЯ

Сырбу Анжела, „Синтез, структура и свойства координационных соединений меди(II) с некоторыми водорастворимыми тиосемикарбазонами”, диссертация на соискание учёной степени доктора химии, Кишинэу, 2020.

Структура диссертации: введение, 4 главы, выводы и рекомендации, библиография, включающая 228 наименований; 6 приложений, 130 страниц основного текста, 81 рисунок, 10 таблиц. Результаты опубликованы в 17 научных работах.

Ключевые слова: координационные соединения меди(II), растворимость в воде, тиосемикарбазоны производных салицилового альдегида, стабильность комплексов, антипролиферативная активность, активные формы кислорода.

Цель работы: изучение процессов образования и выделения координационных соединений меди(II) с тиосемикарбазонами 5-сульфосалицилового и 5-метилентриметиламмонийсалицилового альдегидов, определение структуры, свойств полученных соединений и применение их свойств.

Задачи исследования: синтез тиосемикарбазонов 5-сульфосалицилового и 5-метилентриметиламмонийсалицилового альдегидов; изучение процесса образования координационных соединений в водных растворах (определение спектрофотометрических параметров, состава, стабильности, области рН и т. д.); установление условий выделения и оптимизация воспроизводимых методов синтеза координационных соединений; определение молекулярной структуры выделенных соединений методом рентгеноструктурного анализа; установление некоторых химических, электрохимических свойств и биологической активности исследованных соединений.

Научная новизна и оригинальность: синтез двадцати водорастворимых органических и координационных соединений меди(II), определение параметров образования тиосемикарбазоновых комплексов меди(II) в водных растворах; установление молекулярных и кристаллических структур полученных соединений; определение электрохимического поведения и антипролиферативной активности координационных соединений меди(II), выяснение механизма действия, в частности их способности индуцировать виды АФК на внутриклеточном уровне. Было показано, что при воздействии УФ-излучения тиосемикарбазоны ведут себя как фотосенсибилизаторы, которые генерируют анион супероксидного радикала и гидроксильный радикал путем фотоактивации молекулярного кислорода.

Полученные результаты, способствующие решению важной научной проблемы: установление параметров образования комплексов меди(II) с водорастворимыми тиосемикарбазонами 5-сульфосалицилового и 5-метилентриметиламмонийсалицилового альдегидов и определение антипролиферативной активности этих координационных соединений.

Теоретическое и прикладное значение работы: впервые проведено исследование процесса образования в водных растворах соединений меди(II) с тиосемикарбазонами салицилового альдегида, замещенного в пятом положении легкоионизируемыми группами, накоплена информация об условиях их образовании и устойчивости в растворе. Была определена структура координационных соединений в твёрдом состоянии, определены биологические свойства координационных соединений меди(II). Практическое значение работы состоит в синтезе новых водорастворимых координационных соединений, с антипролиферативной активностью, описание фотостабильности комплексов и исследованных тиосемикарбазонов.

Внедрение научных результатов: продемонстрирована способность координационных соединений продуцировать в раковых клетках активные формы кислорода, которые индуцируют механизм антиоксидантной защиты, опосредованного белком nrf2.

ANNOTATION

Sirbu Angela, „Synthesis, structures and properties of coordination compounds of copper(II) with some water-soluble thiosemicarbazones”. PhD thesis in chemistry, Chisinau, 2020.

Thesis structure: introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, 228 references, 6 annexes, 130 pages of the basic text, 81 figures and 10 tables. The results are published in 17 scientific publications.

Keywords: coordination compounds of copper(II), aqueous solubility, thiosemicarbazones of salicylaldehyde derivatives, stability of complexes, antiproliferative activity, reactive oxygen species.

The aim of the thesis: study the ways of formation and isolation of the coordination compounds of copper(II) with the thiosemicarbazones of the 5-sulfosalicylic and the 5-methylenetrimethylammoniumsalicylic aldehydes, establishing the structure, the properties of the obtained compounds and determination the ways to exploit their useful properties.

The objectives of the thesis: synthesis of the thiosemicarbazones of 5-sulfosalicylic and 5-methylenetrimethylammoniumsalicylic aldehydes; the study of the formation the coordination compounds in aqueous solutions (determination the spectrophotometric parameters, the composition, the stability, the formation domain, etc.); establishing the conditions of isolation and optimizing the reproducible synthesis methods in solid state of the coordinating compounds; determination of the structure of the compounds by the X-ray diffraction method; establishment of the chemical, electrochemical properties and biological activity of the investigated compounds.

Scientific novelty and originality: synthesis of 20 water-soluble organic and coordination compounds of copper(II), determination of the formation parameters of the copper(II) thiosemicarbazones of 5-sulfosalicylic and 5-methylenimethylammoniumsalicylic aldehydes in aqueous solutions; elucidation of the coordination mode of the ligands, molecular and crystal structures of the obtained compounds; investigation of the electrochemical behavior and antiproliferative activity of the copper(II) complexes, elucidation of the mechanism of action, especially their ability to induce ROS species at the intracellular level. It has been shown that, when exposed to UVA radiation, thiosemicarbazones behave as photosensitizers, which generate the superoxide radical anion and the hydroxyl radical by photoactivation of molecular oxygen.

The obtained results that contribute to the solving of an important scientific problem: establishing the parameters of the copper(II) complex formation with thiosemicarbazones of 5-sulfosalicylic and 5-methylenetrimethylammoniumsalicylic aldehydes in aqueous solutions, study of the antiproliferative activity of coordination compounds.

Theoretical significance and practical value: for the first time, the study of the process of formation in aqueous solutions of the compounds of copper(II) with thiosemicarbazones of salicylic aldehyde substituted in position 5 with slightly ionizable groups was carried out, information about their formation and stability in solutions was accumulated. The structure of the coordination compounds in solid state was determined, the biological properties of the coordinating compounds of copper(II) were investigated. The applicative value consists in the synthesis of the new water-soluble compounds, with antiproliferative activity, the elucidation of the photostability of the investigated complexes and metal free thiosemicarbazones.

Implementation of scientific results: the ability of the coordination compounds to produce ROS species in cancer cells with the promotion of the mechanism of antioxidant defense mediated by the nrf2 protein, has been demonstrated.

SÎRBU ANGELA

**SINTEZA, STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE COMPUȘILOR
COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU UNELE
TIOSEMICARBAZONE SOLUBILE ÎN APĂ**

141.01. CHIMIE ANORGANICĂ

Rezumatul tezei de doctor în chimie

Aprobat spre tipar: 10.03.2020

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tirajul 50 ex.

Coli de tipar: 2,0.

Comanda Nr. 19/20

Tipografia CEP USM

Str. A. Mateevici, 60, MD-2009, Chișinău, Moldova