



MD 4905 C1 2025.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4905** (13) **C1**
(51) Int.Cl: **C07C 337/08** (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
A23K 50/90 (2016.01)
A01K 67/033 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

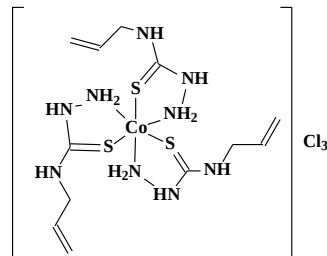
(21) Nr. depozit: a 2023 0014 (22) Data depozit: 2023.05.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2024.10.31, BOPI nr. 10/2024
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GARBUZ Olga, MD; GRAUR Vasilii, MD; ȚAPCOV Victor, MD; TODERAȘ Ion, MD; GULEA Aurelian, MD (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Clorura de tris[N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamid]cobalt(III), care posedă proprietăți de stimulator al statutului antioxidant total al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și apicultură, în particular la un compus coordinativ biologic activ de cobalt, din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Compusul coordinativ stimulează statutul antioxidant total al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora, mărind rezistența lor la boli.

Conform invenției, se revendică compusul coordinativ clorură de tris[N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamid]cobalt(III) cu formula:



Compusul revendicat extinde arsenalul de stimulatori sintetici ai statutului antioxidant total al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora, cu activitate biologică înaltă.

Revendicări: 2

MD 4905 C1 2025.05.31

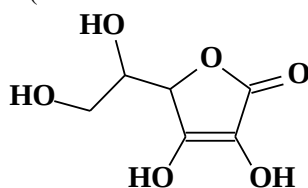
Descriere:

Invenția se referă la chimie și apicultură, în particular la un compus coordinativ biologic activ de cobalt, din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Compusul coordinativ stimulează statutul antioxidant total (SAT) al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora, mărind rezistența lor la boli.

Stresul oxidativ este un factor important în dezvoltarea multor boli și procese patologice la insecte. În urma activării proceselor de formare a radicalilor liberi, are loc modificarea oxidativă a lipidelor, proteinelor, acizilor nucleici, ceea ce duce, în cele din urmă, la deteriorarea și moartea celulelor, țesuturilor și a unor organe.

Pentru aprecierea stării funcționale a sistemului antioxidant al albinelor și larvelor acestora, ca indicator se folosește SAT.

Din compușii chimici descriși în literatură, care reglează SAT al hemolimfei, cel mai înalt efect stimulator a fost obținut în cazul vitaminei C (lat: *Acidum ascorbinicum*) [1] cu formula:



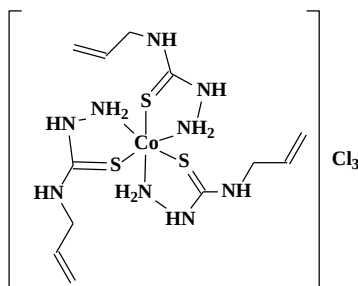
Acest compus manifestă activitate antioxidantă cu $IC_{50}=13,14\pm 1,52$ mg/mL în cazul hemolimfei albinelor și $IC_{50}=6,31\pm 0,96$ mg/mL în cazul hemolimfei larvelor de albine. Vitamina C găsește utilizare în analiza biochimică în calitate de etalon pentru determinarea activității antioxidante a produselor naturale și sintetice.

Dezavantajul vitaminei C constă în faptul că întrebuințarea ei în apicultură este limitată, deoarece ea nu posedă o activitate antioxidantă înaltă.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui compus coordinativ nou, care extinde arsenalul de stimulatori sintetici ai statutului antioxidant total al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor lor cu activitate biologică înaltă.

Anterior combinațiile coordinative ale biometalelor cu tiosemicarbazide nu au fost folosite în calitate de stimulatori ai statutului antioxidant total al hemolimfei albinelor și larvelor acestora (analogul structural lipsește).

Esența invenției constă în obținerea stimulatorului sintetic al statutului antioxidant total al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora în baza clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamid]cobalt(III) cu formula:



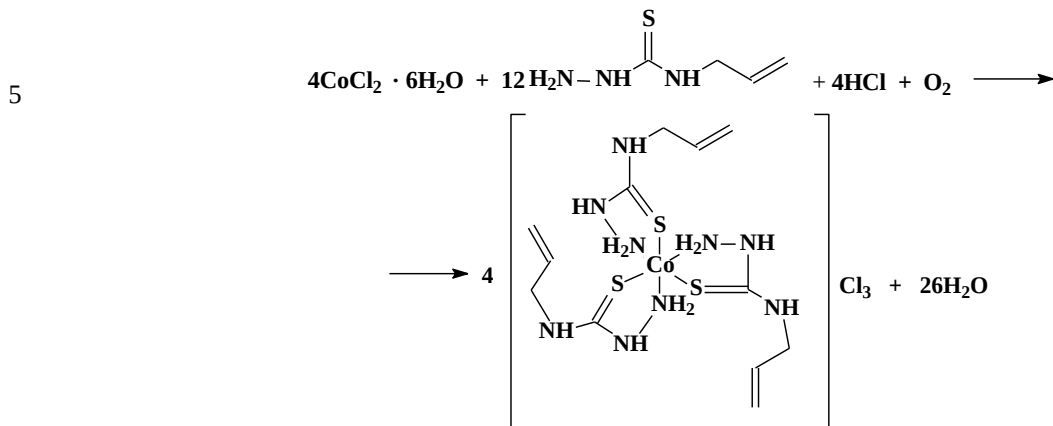
Rezultatul tehnic al invenției constă în creșterea SAT în hemolimfa albinelor și a larvelor de albine de până la 8 ori în comparație cu martorul și de 5 ori în comparație cu vitamina C, utilizată în biochimie ca etalon al activității antioxidante. Proprietatea stabilită a clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamid]cobalt(III) sus-numită este nouă, deoarece până acum nu este descrisă utilizarea acestui compus în calitate de antioxidant.

Analiza comparativă a compusului revendicat cu vitamina C demonstrează că ei reprezintă diferite clase de compuși chimici incomparabili după structură.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de stimulator al SAT al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor lor se propune clorura de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamid]cobalt(III), care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

Clorura de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III) revendică se obține la interacțiunea soluției etanolice fierbinți (50-55°C) ale hexahidratului clorurii de cobalt(II) cu *N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamida, luate în raport molar de 1:3 în prezența acidului clorhidric. Reacția decurge în 50-60 min conform următoarei scheme:



Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul, că în timpul sintezei, în amestecul reactant, în prezența oxigenului din aer are loc adăuga la ionul de cobalt(2+) a trei molecule de *N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă, care joacă rolul de ligand-N,S bidentat neutru. Tioamida coordonată crează un câmp cristalin puternic, care favorizează oxidarea cu oxigenul din aer a atomului central de cobalt până la starea de oxidare +3 și formarea cationului complex octaedric.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Obținerea clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III).

Se amestecă 20 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de hexahidrat al clorurii de cobalt(2+) cu 30 mL soluție alcoolică, care conține 30 mmol de *N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă și 3-4 picături de acid clorhidric concentrat. Amestecul reactant este încălzit (50-55°C) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 50-60 min cu barbotare permanentă de aer. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare roșu-marou, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate la aer. Randamentul produsului final alcătuiește 87% față de cel calculat teoretic.

S-a determinat, %: C – 25,95; H – 4,78; Cl – 19,32; Co – 10,72; N – 22,83; S – 17,42. Pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{Cl}_3\text{CoN}_9\text{S}_3$ s-a calculat, %: C – 25,79; H – 4,87; Cl – 19,03; Co – 10,54; N – 22,56; S – 17,21.

În baza determinării conductibilității electrice molare (Λ) a soluției clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III) în metanol a fost stabilit, că compusul dat este electrolit de tip 1:3 [$\Lambda = 312 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 20°C, $C_M = 0,001 \text{ mol/L}$].

La temperatura camerei (290 K) complexul este diamagnetic.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : $\nu(\text{NH}) = 1542$; $\delta(\text{C-N}) = 1195$; $\nu(\text{C=S}) = 1047$; $\nu(\text{C-N}) = 993, 958, 930$; $\nu(\text{Co-N}) = 538, 503$; $\nu(\text{Co-S}) = 471, 438$.

Procedul de obținere al compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. *N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamida inițială a fost sintetizată după metoda descrisă în literatură [Zhao W., Zhao M. Synthesis and characterization of some multi-substituted thiosemicarbazones as the multi-dental ligands of metal ions. Chin. J. Org. Chem., 2001, vol. 21 (9), p. 681-684]. Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcoolii alifatici, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

Exemplul 2. Evaluarea efectului de stimulator al clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III) asupra SAT al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora. 10 grupuri de *Apis mellifera* (în 10 stupi) au fost hrănite timp de două săptămâni cu sirop de zahăr de 50% îmbogățit cu clorura de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III), iar alte 10 grupuri de *Apis mellifera* (în 10 stupi) nu au fost hrănite cu compus bioactiv și a servit ca grupul de control. O soluție apoasă de clorură de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III) cu o concentrație de 1 mg/100 mL a fost pregătită și amestecată cu sirop de zahăr în raport de 60 mL la 1 L de sirop, adică 0,6 mg/L, și adăugată în hrană pentru albi. Coloniile au fost hrănite după iernare, cu o doză de 120 mL de amestec pentru fiecare șir de rame populat cu albine, la fiecare 2 zile, timp de două săptămâni.

Stupii de testare conțin de obicei 10 rame. În medie, 1 litru de sirop este administrat la fiecare 2 zile timp de 14 zile, ceea ce corespunde la 7 litri. Probele biologice studiate (hemolimfa de la albine și larve) au fost recoltate și înregistrate la stupina experimentală RM (Ocolul Silvic Ghidighici). La sfârșitul

lunii mai se colectează hemolimfa albinelor și larvelor acestora. Materialul biologic obținut este examinat de cel puțin 3 ori, în intervalul de concentrații de la 0,01 la 100,00 mg/mL.

Înainte de a începe analiza antioxidantă (AOA), probele sunt centrifugate timp de 5 min la 2000 r/min, apoi supernatantul este îndepărtat cu un dozator fără a perturba precipitatul. Radicalii liberi de cation $ABTS^{+}$ (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolină-6-sulfonat), trebuie adăugați în etanol de 96%, pentru a evita precipitarea după adăugarea probelor de testat. Soluțiile de lucru cu radicali liberi sunt adăugate câte 180 μ L pe plăci cu 96 de godeuri. În continuare, probele de testat sunt adăugate câte 20 μ L la soluțiile de lucru și incubate într-un loc întunecat la temperatura camerei timp de 30 de min. După terminarea timpului, s-au făcut măsurători optice folosind un spectrofotometru cu lungimea de undă 734 nm pentru a măsura activitatea probelor prin metodele $ABTS^{+}$. Diferența optimă între absorbanta în control este de 0,7-0,8. Intensitatea culorii fiecărui godeu corespunde capacității probelor de a inactiva radicalii liberi. Pentru caracteristicile comparative ale probelor testate se folosește valoarea concentrației semimaximale de inhibare (IC_{50}).

Determinarea SAT al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora.

Hemolimfa albinelor și larvelor în etanol de 96% a fost incubată într-un termostat la 25°C timp de două zile. Materialul biologic a fost studiat în intervalul de concentrații 0,01 - 100 mg/mL într-un triplet. Înainte de a începe măsurătorile absorbantei, probele au fost centrifugate timp de 5 min la 2000 r/min, apoi supernatantul a fost îndepărtat, 20 μ L probe au fost adăugate la 180 μ L (0,02 M) $ABTS^{+}$ în etanol în 96 godeuri. Probele au fost incubate într-un loc întunecat la temperatura camerei timp de 30 de min.

Absorbanța a fost măsurată cu un spectrofotometru la 734 nm pentru metode $ABTS^{+}$.

Partea de radicali liberi ai $ABTS^{+}$ inhibată (I, %) a fost calculată conform următoarei ecuații:

$$I (\%) = \frac{Abs_{734\text{ nm }0} - Abs_{734\text{ nm }1}}{Abs_{734\text{ nm }0}} \times 100, \quad \text{unde}$$

$Abs_{734\text{ nm }0}$ este absorbanta soluției de control;

$Abs_{734\text{ nm }1}$ este absorbanta în prezența soluțiilor de probă sau a standardelor pentru

controalele pozitive.

Rezultatele experimentale - SAT al hemolimfei albinelor și larvelor fără prezența substanței biologice active revendicate sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

SAT al hemolimfei albinelor și larvelor acestora din grupul de control

Grupul de control	Concentrația materialului biologic, mg/mL	$ABTS^{+}$				
		Abs (734 nm)	% inh	SD (%)	IC_{50} (mg/mL)	SD (mg/mL)
Hemolimfa albinelor	100,00	0,156	81,43	2,02	13,56	0,37
	10,00	0,482	42,56	2,27		
	1,00	0,701	16,49	0,42		
	0,10	0,805	4,17	0,51		
Hemolimfa larvelor de albine	50,00	0,061	92,74	4,55	9,95	0,70
	5,00	0,627	25,36	1,68		
	0,50	0,755	10,06	0,08		
	0,05	0,835	0,54	0,08		

SD – deviere standard

Rezultatele analizei antioxidative a hemolimfei albinelor și larvelor acestora după expunerea cu clorură de tris[N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonat]cobalt(III) sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

SAT al hemolimfei albinelor și larvelor acestora din grupul cu clorură de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III)

5

Grupul cu clorură de tris[<i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III)	Concentrația materialului biologic, mg/mL	ABTS ^{•+}				
		Abs (734 nm)	% inh	SD (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	SD (mg/mL)
Hemolimfa albinelor	100,00	0,044	94,76	0,17	2,48	0,02
	10,00	0,066	92,08	0,25		
	1,00	0,696	17,14	0,01		
	0,10	0,809	3,69	0,17		
Hemolimfa larvelor de albine	50,00	0,045	94,38	0,01	1,26	0,12
	5,00	0,084	89,44	1,68		
	0,50	0,642	19,69	0,09		
	0,05	0,758	5,25	0,35		

SD – deviere standard

Rezultatele cercetării au arătat că în cazul clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III) testată cresc SAT în hemolimfa albinelor și larvelor de albine respectiv de până la 5 și 8 ori, comparativ cu martorul.

Efectul stimulator al clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III) asupra SAT al hemolimfei depășește activitatea vitaminei C de până la 5 ori.

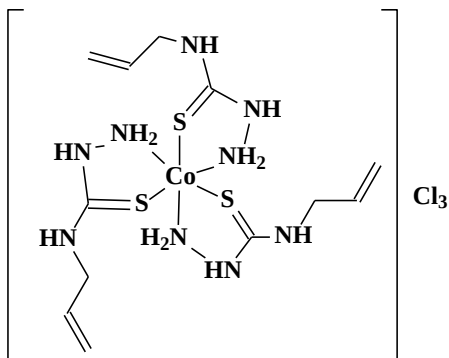
Proprietățile depistate ale clorurii de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamid]cobalt(III) prezintă interes pentru biotehnologie și apicultură din punct de vedere al extinderii arsenalului de stimulatori ai statutului antioxidant total al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Mariola Slowinska et al. Total antioxidant capacity of honeybee haemolymph in relation to age and exposure to pesticides, and comparison to antioxidant capacity of seminal plasma. *Apidologie*, 2016, vol. 47, p. 227-236, găsit în Internet la data de 15.07.2024 URL: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13592-015-0391-9>>

(57) Revendicări:

1. Clorură de tris[*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotioamid]cobalt(III) cu formula:



2. Compus coordinativ, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** posedă proprietăți de stimulator al statutului antioxidant total al hemolimfei albinelor *Apis mellifera* și larvelor acestora.