



MD 4600 C1 2019.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4600** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/04* (2006.01)
C07C 65/11 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

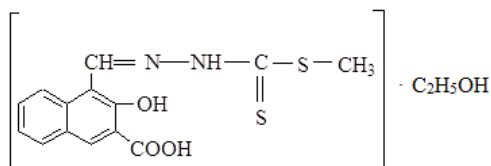
(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2017 0061 (22) Data depozit: 2017.06.06</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.11.30, BOPI nr. 11/2018</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: LAZARESCU Ana, MD; MELNIC Elena, MD; BOUROȘ Pavlina, MD; ZARICIUC Elena, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p>	

(54) Compus hidrazonic al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic care manifestă activitate antimicrobiană

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimia organică și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa ditioidrazonelor, derivat al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu formula:



care posedă activitate antimicrobiană față de microorganismele grampozitive și gramnegative.

Revendicări: 2

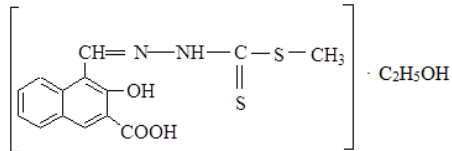
Figuri: 1

MD 4600 C1 2019.06.30

(54) 4-Formyl-3-hydroxy-2-naphthoic acid hydrazone compound exhibiting antimicrobial activity

(57) Abstract:

1
The invention relates to organic chemistry and medicine, in particular to a biologically active organic compound of the dithiohydrazone class, 4-formyl-3-hydroxy-2-naphthoic acid derivative of the Formula:



2
which possesses antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative microorganisms.

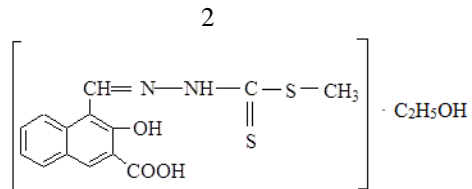
Claims: 2

Fig.: 1

(54) Гидразоновое соединение 4-формил-3-гидрокси-2-нафтойной кислоты, проявляющее противомикробную активность

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к органической химии и медицине, а именно к биологически активному органическому соединению класса дитиогидразонов, производному 4-формил-3-гидрокси-2-нафтойной кислоты формулы:



2
которое обладает антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

П. формулы: 2

Фиг.: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

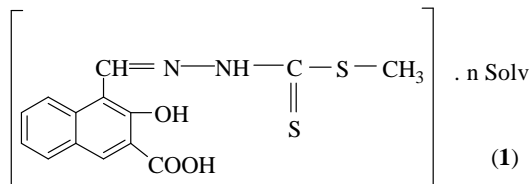
5 Invenția se referă la compuși organici din clasa hidrazonelor, derivat al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic.

Hidrazonele, produși ai condensării compușilor carbonilici cu hidrazina sau derivatii ei, sunt studiate pe larg ca agenți de chelatare a metalelor tranziționale, fiind menționați în literatura de specialitate cu un spectru larg de activități biologice, cum sunt: antivirale, antifungice, anticancer și antibacteriene. Gama largă de proprietăți biologice este determinată de diversitatea liganzilor, posibilă de obținut în funcție de aldehida sau cetona parentală, precum și de substituții prezenți în fragmentul hidrazinic, de setul de atomi donori (Lakshmi Narayana Suvarapu et al. Review on Analytical and Biological applications of Hydrazones and their Metal Complexes. E-Journal of Chemistry, 2012, vol. 9, nr. 3, p. 1288-1304; D. Nagakavitha și K Hussain Reddy. Synthesis, Spectral Characterization and DNA Binding Properties of Copper(II) Complexes of Functionalized Hydrazones. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2014, vol. 5, nr. 3, p. 1806-1815; Angel A. Recio Despaigne et al. ROS-Mediated Cytotoxic Effect of Copper(II) Hydrazone Complexes against Human Glioma Cells. Molecules, 2014, vol. 19, p. 17202-17220). Anterior a fost inițiată sinteza a 2 compuși organici din clasa hidrazonelor, și anume tio- și feniltiosemicarbazonele acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic, care au manifestat activitate antimicrobiană contra tulpinilor de bacterii grampozitive și gramnegative, cum sunt *E. coli* (-) și *St. Aureus* (+) [1].

Utilizarea din ce în ce mai frecventă a antibioticelor are ca efect apariția unui număr tot mai mare de tulpini bacteriene rezistente la un număr tot mai mare de antibiotice. În asemenea condiții de creștere a agresivității bolilor bacteriene, adaptării patogenilor la preparatele existente, emergența speciilor rezistente noi (Richard J. Fairl și Yitzhak Tor. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. Perspectives in Medicinal Chemistry, 2014, vol. 6, p. 25-64; Helen W. Boucher et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. The Infectious Diseases Society of America Report, 2009, vol. 48, nr. 1, p. 1-12), există necesitatea creării și reînnoirii preparatelor chimice ce ar combate creșterea și dezvoltarea microorganismelor patogene. Ținând cont de faptul, cunoscut din literatură, că mărirea numărului de atomi de sulf în compoziția moleculelor organice și/sau în compușii respectivi cu ionii metalici conduce la mărirea activității antimicrobiene, s-a sintetizat și caracterizat un compus ditioidiazonic nou $H_3L \cdot C_2H_5OH$ (**1**), derivat al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic și esterului metilic al acidului ditiocarbonic $NH_2NH-C(S)-SCH_3$.

Problema pe care o rezolvă invenția revendicată constă în extinderea gamei de substanțe prin sinteza unui ligand ditioidiazonic polifuncțional nou S-metil- β -N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbamat (IUPAC: acid 3-hidroxi-4-((2-((metiltio)carbonotioil)-hidraziniliden)metil)-2-naftoic) care manifestă activitate antimicrobiană la concentrații mai mici comparativ cu preparatele cunoscute.

40 Esența invenției constă în sinteza unui compus hidrazonic $H_3L \cdot C_2H_5OH$ (**1**), derivat nou al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu mărirea numărului de atomi de sulf în moleculă până la 2:



care manifestă proprietăți de combatere a unor tulpini de bacterii, cum sunt: a) *E. coli* (-), b) *Kl. Pneumoniae*(-), c) *S. aureus*(+), d) *C. albicans* (+).

45 Compusul **1** reprezintă o hidrazonă a acidului inițial cu formula brută $C_{16}H_{12}N_2O_4S_2$ ($M_r = 360,40$ g/mol, $t_{top} = 234$ °C).

Rezultatul invenției constă în aceea că, variind condițiile de sinteză, a fost separat un compus hidrazonic biologic activ, derivat nou al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic, cu proprietăți antibacteriene. Testările *in vitro* au demonstrat că compusul **1** manifestă activitate antibacteriană atat contra tulpinilor de microorganisme grampozitive (*S. aureus*, *C. albicans*) cât și celor gramnegative (*E. coli*, *Kl. Pneumoniae*) la concentrații de aproximativ 4...8 ori mai mici decat analogul acestuia conform celei mai apropiate soluții.

Au fost determinate concentrațiile minime de inhibiție (CMI) și minimă bactericidă (CMB). Invenția este explicată prin figură, care reprezintă structura ligandului organic H₃L-EtOH (**1**), confirmat experimental prin difracție de raze X pe monocristal. Structura ligandului organic H₃L-EtOH (**1**) și notația atomilor (a); formarea dimerului centrosimetric prin intermediul sintonului R₂²(8) (b).

Compusul revendicat **1** se obține prin reacția de condensare Schiff a esterului metilic al acidului ditiocarbonic cu acidul 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic. Compusul este caracterizat prin analiză elementală (C, H, N, S), spectroscopie în IR, prin metoda difracției de raze X pe monocristal. O analiză a Bazei de Date Structurale Cambridge (BDSC) (Allen, F.H. Acta Crystallogr. 2002, vol. B58, p. 38) a evidențiat puține structuri cu liganzi necoordinați ce conțin fragmentul =NNH-C(S)-SCH₃ și lipsa totală a unui asemenea derivat în baza acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic. O comparație a ligandului sintetizat H₃L cu cele similare din BDSC a stabilit că conformația fragmentului central al ligandului nou sintetizat este asemănătoare cu cea din (Yanqiu Liu et al. Synthesis, crystal structures and third-order nonlinear optical properties in the near-IR range of two novel Ni(II) complexes. Optical Materials, 2014, vol. 36, nr. 3, 2014, p. 687-696; Hamid Khaldei et al. Benzyl N'-(4,6-dimeth-oxy-2-methyl-3-phenyl-1H-indol-7-ylmethyl-ene) hydrazinecarbodi-thio-ate. Acta Crystallographica Section E, 2008, vol. E64, nr. 12, p. o2442; Fiona N.-F. How et al. 2-Quinolylmethyl N'-[1-(m-tolyl)ethylidene]hydrazinecarbodithioate. Acta Crystallographica Section E, 2007, vol. E63, nr. 6, p. o2912) având aceeași transpoziționare a atomilor terminali de azot și sulf nealchilat în raport cu legătura centrală N-C. O analiză comparativă a distanțelor interatomice din fragmentul ditiocarbometoxihidrazonice al ligandului [H₃L] (S(1)-C(13), S(2)-C(13), N(2)-C(13), N(2)-N(1) și N(1)-C(1), egale respectiv cu 1,748(5), 1,668(5), 1,336(6), 1,368(6), 1,290(6) Å), cu cele din (Yanqiu Liu et al. Synthesis, crystal structures and third-order nonlinear optical properties in the near-IR range of two novel Ni(II) complexes. Optical Materials, 2014, vol. 36, nr. 3, p. 687-696; Hamid Khaldei et al. Benzyl N'-(4,6-dimeth-oxy-2-methyl-3-phenyl-1H-indol-7-ylmethyl-ene) hydrazinecarbodi-thio-ate. Acta Crystallographica Section E, 2008, vol. E64, nr. 12, p. o2442; Fiona N.-F. How et al. 2-Quinolylmethyl N'-[1-(m-tolyl)ethylidene]hydrazinecarbodithioate. Acta Crystallographica Section E, 2007, vol. E63, nr. 6, p. o2912) indică o delocalizare a densității electronice. Planaritatea moleculei H₃L în cristal este stabilizată de legătura de hidrogen intramoleculară, în care ca donor de proton acționează gruparea hidroxică, iar ca acceptor un atom de oxigen din gruparea carboxilică (Fig. a, Tab. 3). În rețeaua cristalină a ligandului necoordinat, unitățile H₃L-EtOH (**1**) sunt legate între ele, formând dimeri centrosimetrici prin intermediul sintonilor R₂²(8) formați prin legăturile de hidrogen N(2)-H...S(2) (Tab. 3, Fig. b), iar moleculele de etanol de cristalizare sunt antrenate la formarea legăturilor de hidrogen atât ca donori de proton în O(1E)-H...O(2), cât și ca acceptori în O(3)-H...O(1E).

Ligandul organic sintetizat (**1**) reprezintă o substanță mărunț cristalină de culoare galbenă, bine solubilă în majoritatea solvenților organici: alcooli etilic, metilic, acetonă, acetonitril, tetrahidrofuran, DMF, DMSO, PEG 400, și insolubil în benzen, toluen și apă. Temperatura de topire a compusului **1** este de 234°C. În spectrul IR al ligandului sintetizat se găsesc benzi de absorbție în domeniul 3240, 2998 și 1057 cm⁻¹, care sunt caracteristice vibrațiilor de valență ν(OH), ν(N-H) și ν(C=S). Banda puternică din domeniul 1713 cm⁻¹ caracteristică vibrațiilor de valență ale grupării (C=O) din gruparea carboxilică nedeprotonată -COOH este prezentă în ligand, ceea ce confirmă realizarea reacției de condensare.

Tab. 1. Datele cristalografice și parametrii de structură pentru compusul **1**.

Compusul	1
Formula	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂
Mr, g/mol	360,40
Singonia	Monoclinică
Grupul spațial	C2/c
Z	8
a (Å)	25,825(5)
b (Å)	5,2443(10)
c (Å)	26,470(6)
β, (grad)	97,40(2)
V (Å ³)	3555,1(12)
D _{calc} (g/cm ⁻³)	1,347

$\mu(\text{mm}^{-1})$	0,321
F(000)	1488
Nr. reflexii colectate /unice	5423/3126
Reflexe [$I > 2\sigma(I)$]	1575
Parametrii fitați	207
GOOF	1,007
$R_1, wR_2 [I > 2\sigma(I)]$	0,0830, 0,2084
R_1, wR_2 (pentru toate datele)	0,1548, 0,2506

Tab. 2. Parametrii legăturilor de hidrogen intra- și intermoleculare din **1**.

D–H...A	Distanța, A			Unghi ul DHA	Coordonatele acceptorului A
	D–H	H...A	D...A		
1					
O1–H...O2	0,82	1,87	2,603(3)	148	x, y, z
O3–H...O1E	1,06	1,78	2,825(3)	170	x, y, z
N2–H...S2	0,86	2,69	3,526(4)	164	$-x, -y+1, -z$
O1E–H...O2	0,85	1,81	2,659(4)	176	$-x, y, -z+1/2$

5 Analiza elementală la C, H, N, S pentru substanța **1** a fost efectuată de grupul de Analiză al Institutului de Chimie al Academiei de Științe a Republicii Moldova (Климова В.А. Основные микрометоды анализа органических соединений, 1975, Изд-во “Химия”, 217 p.).

10 Temperatura de topire a ligandului a fost determinată utilizând aparatul Melting Point Meter A.KRUSS OPTRONIC (Germany). Spectrele în IR (ATR) pentru combinațiile studiate au fost înregistrate la aparatul SPECTRUM 100FT – IR SPECTROMETER (Perkin Elmer) în domeniul 4000...600 cm^{-1} . Spectrele în IR au fost atribuite în baza datelor din literatură (Накомото К. Инфракрасные спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений. Москва, Мир, 1991, 504 p.; Margareta Avram, G.D. Mateescu. Spectroscopia în IR cu aplicații în chimia organică. Editura Tehnică București, 1966).

15 Toate măsurătorile pentru substanța **1** s-au efectuat la difractometrul modern automatizat Xcalibur E, înzestrat cu detector spațial-sensibil CCD, utilizând iradierea $\text{MoK}\alpha$, $\lambda=0,71073\text{Å}$ (monocromatorul fiind din grafit) la temperatura camerei. Datele cristalografice și parametrii ajustării structurii sunt incluse în tab. 1. Structura cristalină a compusului s-a determinat prin metode directe și a fost precizată prin metoda celor mai mici pătrate în cadrul complexului de programe
20 SHELXS-97 (Sheldrick G.M. Acta Crystallographica A, 2008, vol. 64, Nr. 1, p. 112), precizarea pentru atomii nehidrogenici fiind efectuată în aproximația anizotropică, iar a atomilor de hidrogen – în aproximația izotropică. Valorile distanțelor interatomice și ale unghiurilor de valență din poliedrele de coordonare ale atomului de metal sunt prezentate în Tab. 2, iar parametrii legăturilor de hidrogen din compușii studiați – în Tab. 3.

25 Exemple de realizare

Sinteza ligandului $\text{H}_3\text{L}\cdot\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (**1**)

30 La soluția de acid 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic (0,216 g, 0,001 mol) dizolvat în 30 mL de alcool etilic se adaugă 0,206 g (0,001 mol) de $\text{NH}_2\text{NH}\cdot\text{C}(\text{S})\cdot\text{SCH}_3$ (G. Bähr și Gerhard Schleitzer Zeitschrift. Über emprotide Schwermetall-Innerkomplexe der α -Diketondi-thiosemicarbazone (Thiazone). IV. Untersuchungen zur Konstitution. Komplexe von Thiazon-Analogen. Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie, 1955, vol. 280, nr. 4, p. 161-240) dizolvat în 15 mL alcool etilic. După amestecarea soluțiilor are loc formarea unui precipitat floconos de culoare galben-oranj. După agitare timp de 0,5 ore produsul condensat a fost filtrat și spălat cu porții mici de alcool etilic și uscat la aer. Randamentul constituie 54%. IR, cm^{-1} : 3674, 3240, 2988, 2913,
35 1713, 1625, 1605, 1578, 1524, 1454, 1389, 1371, 1308, 1295, 1239, 1205, 1176, 1124, 1103, 1057, 1000, 954, 936, 858, 785,757, 740, 701, 672. $t_{\text{top.}} = 234^\circ\text{C}$. Pentru formula $\{\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2\cdot\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}\}$ (**1**) găsit, în %: C 55,03, H 5,15, N 7,89, S 17,28; calculat, în %: C 55,17, 5,17, N 8,04, S 17,75%.

Activitatea biologică

- Determinarea activității antimicrobiene a substanței revendicate **1** se efectuează în bulion peptonat de 2%. În calitate de culturi de referință în experimentul *in vitro* sunt folosite 4 tulpini standard, reprezentanți al tipurilor grampozitive și gramnegative: *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 (G+), *Candida albicans* FICK 885 (G+), *Escherichia coli* ATCC 25923 (G-) și *Klebsiella pneumoniae* (G-). Cultivarea microorganismelor, obținerea suspensiei, determinarea CMI și CMB se realizează după metoda diluțiilor succesive (Krivosein I.S. Compendiu pentru lucrari practice la microbiologia medicala si diagnostic de laborator al bolilor infecțioase. Chișinău, Lumina, 1990, 318 p.).
- Bulionul Hottinger se toarnă în 10 eprubete puse în rând. Se pregătește soluția de 2% a preparatului și în prima eprubetă se adaugă 1 mL de preparat, din care se transferă în următoarea s.a.m.d. până la a 9-a eprubetă, din care se înlătură 2 mL. Combinațiile sintetizate au fost testate în formă de soluții în dimexid. În calitate de control servește eprubeta a 10-a care nu conține soluție de antibiotic. Cultura de microorganisme timp de 24 ore se standardizează după standardul de turbiditate. În toate eprubetele randului, începând cu cea de control, se introduc câte 0,2 mL de suspensie de microorganisme obținută. Rezultatele experienței se determină după incubare în termostat timp de 24 ore la 37°C. Concentrația minimă inhibitoare (CMI) a preparatului se determină după ultima eprubetă cu bulion transparent în comparație cu creșterea intensă a microorganismelor în eprubeta de control. CMB se determină prin metoda diluțiilor succesive pe medii solide (cutia Petri). Paralel cu proba de compus se testează furacilina. Rezultatele experimentale obținute la studierea proprietăților antibacteriene ale compușilor sunt prezentate în Tab. 3.

Tab. 3. Concentrația minimă de inhibare (CMI, $\mu\text{g/mL}$) și concentrația minimă bactericidă (CMB, $\mu\text{g/mL}$) a compusului revendicat **1** față de tulpini de microorganisme grampozitive și gramnegative.

Formula substanței	Tulpini de referință							
	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)		<i>Candida albicans</i> (G+)		<i>Escherichia coli</i> , (G-)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> , (G-)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
H ₃ L·C ₂ H ₅ OH (1)	30	30	30	30	60	120	60	120
C ₁₃ H ₁₁ N ₃ SO ₃ ·CH ₃ OH [1]	120	250	-	-	250	500	-	-
Furacilină	700	1500	700	1500	700	1500	1500	3000

- Din datele prezentate, urmează că compusul revendicat **1** manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă atât contra microorganismelor grampozitive, cât și celor gramnegative. Din Tab. 3 este evident că substanța **1** manifestă o activitate mai pronunțată față de tulpinile grampozitive (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*).

- Astfel, derivatul hidrazinic nou al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic posedă o activitate antimicrobiană de 4...8 ori mai pronunțată contra microorganismelor grampozitive în comparație cu cea mai apropiată soluție și de 23...50 ori în comparație cu furacilina. Pentru cazul microorganismelor gramnegative, activitatea compusului **1** este de 4 și 11...25 ori mai pronunțată în comparație cu cea mai apropiată soluție și, respectiv, furacilina.

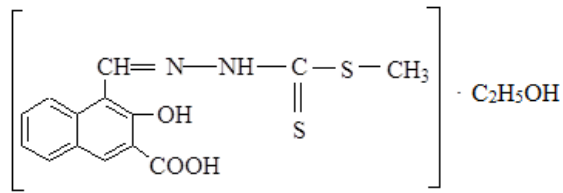
Soluțiile acestor substanțe au perspectiva de a fi folosite în diferite domenii ale medicinei, veterinare și agricultură, unde este necesară prelucrarea antiseptică a materialelor.

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. MD 4174 B1 2012.06.30

(57) Revendicări:

1. Compus hidrazonic al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu formula 1:



2. Compus conform revendicării 1, care manifestă activitate antimicrobiană față de microorganismele grampozitive și gramnegative.

