



MD 2003 B1 2002.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2003 (13) B1
(51) Int. Cl.⁷: C 07 F 1/08; C 07 C 47/55,
47/56, 337/08;
A 61 K 31/175, 31/30;
A 61 P 31/04, 31/10

(12) BREVET DE INVENȚIE

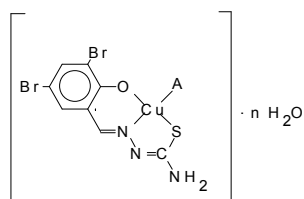
Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2001 0012 (22) Data depozit: 2001.01.10	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.09.30, BOPI nr. 9/2002
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: PRISACARI Viorel, MD; ȚAPCOV Victor, MD; BURACEVA Svetlana, MD; BÂRCĂ Maria MD; GULEA Aurelian, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(74) Reprezentant: VOZIANU Maria, MD	

(54) Complecși interni de cupru (II) cu acțiune antimicrobiană și antimicotică

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și
anume la compuși coordinativi din clasa tiosemi-
carbazonaților metalelor de tranziție.

Esența invenției constă în obținerea complec-
șilor interni de cupru cu formula:



I-VI

2
unde A=NH₃(I), 2-CH₃Py(II), 3-CH₃Py(III), 4-
CH₃Py(IV), 2-NH₂Py(V), 5-nitrofurfuriliden-2-izo-
nicotinoilhidrazonă(VI); n=0 (II, III, V), 1 (IV), 2
5
(I), 3 (VI) cu acțiune antimicrobiană și
antimicotică.

10
Ei pot găsi aplicare în medicină și în medicina
veterinară în calitate de preparate antibacteriene și
antimicotice cu spectru larg de acțiune biologică
sau în calitate de ingrediente pentru obținerea
mediilor nutritive selective.

Revendicări: 1

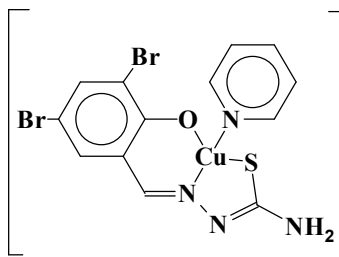
15

MD 2003 B1 2002.09.30

Descriere:

Invenția se referă la o grupă de compuși coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, și anume la 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidoamincupru dihidrat, 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-2-picolincupru, 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-3-picolincupru, 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-4-picolincupru monohidrat și 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-(5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazin)cupru trihidrat. Acești complecși manifestă activitate bacteriostatică înaltă față de un spectru larg de bacterii, fungi și pot găsi aplicare în medicină în calitate de preparate cu acțiune antimicrobiană și antimicotică sau ingrediente pentru crearea mediilor nutritive selective.

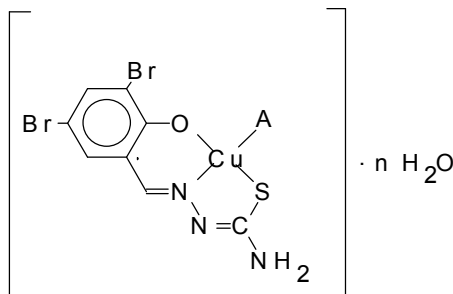
Complecșii declarați se aseamănă după structură cu 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidopiridincupru (cea mai apropiată soluție și analogul structural) [1], cu formula:



Compusul coordinativ dat este de 519...2083 ori mai activ față de bacteriile din genul *Staphylococcus* și *Streptococcus* decât furacilina, însă nu găsește aplicare în practica medicală din lipsa acțiunii antimicrobiene față de bacteriile gram-negative. Informația despre proprietățile lui antimicotice în literatură lipsește.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unei grupe de compuși noi, ce ar poseda un spectru larg de acțiune antimicrobiană și antimicotică.

Esența invenției constă în obținerea 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidoamincupru dihidratului, 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-2-picolincuprului, 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-3-picolincuprului, 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-4-picolincupru monohidratului și 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazido-(5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazin)cupru trihidratului cu formula generală:



I-VI

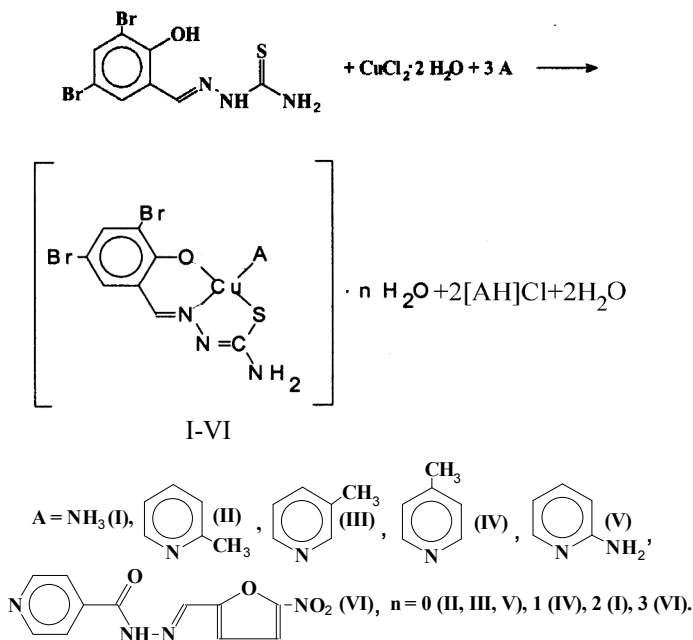
unde A=NH₃(I), 2-CH₃C₅H₄N(II), 3-CH₃C₅H₄N(III), 4-CH₃C₅H₄N(IV), 2-NH₂C₅H₄N(V), 5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazonă(VI); n=0(II, III, V), 1(IV), 2(I), 3(VI) cu acțiune antimicrobiană și antimicotică.

Rezultatul invenției constă în sinteza compușilor I-VI care manifestă activitate antimicrobiană față de microorganisme gram-pozitive la nivelul celei mai apropiate soluții. În același timp complecșii declarați după activitatea bacteriostatică față de bacteriile gram-negative sunt de 1034...16 ori mai activi decât analogul lor structural. În afară de aceasta, compușii I-VI posedă și acțiune antimicotică selectivă față de fungii levedurici și micelari în limitele concentrațiilor 9,35...600 μg/ml.

Analiza comparativă a complecșilor declarați cu analogul structural demonstrează că ei se deosebesc printr-o combinație nouă a tipurilor de legături chimice deja cunoscute, și anume: prin înlocuirea piridinei cu amina [amoniac(I), 2-(II), 3-(III), 4-(IV)picolina, 2-aminopiridina(V) sau 5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazina (VI)] în sfera coordinativă interioară a atomului de cupru. Datorită particularităților caracteristice compușilor I-VI se obține un rezultat net superior în comparație cu analogul structural.

Compușii declarați se obțin la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (45...50°C) ale dihidratului clorurii de cupru(2+) cu tiosemicarbazona aldehidei 3,5-dibromsalicilice luate în raport molar 1:1 în prezența aminei. Reacția decurge 45...50 min conform următoarei scheme:

MD 2003 B1 2002.09.30



Mecanismul reacției date constă în aceea că are loc deprotonizarea grupelor fenolice și tiolice ale tiosemicarbazonei în prezența aminei, care simultan joacă rolul de ligand și acceptor de protoni. Astfel obținut, anionul 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidic coordonează la ionul de cupru(2+) ca ligand O,N,S-tridentat dublu deprotonizat. Al patrulea loc în sfera internă a atomului central este ocupat de amină [amoniac(I), 2-(II), 3-(III), 4-(IV)picolină, 2-aminopiridină(V) sau 5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazină(VI)].

Procedeele de obținere a compușilor declarați este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 71...82% față de cel teoretic calculat. Toate substanțele sintetizate au culoarea verde întunecată, sunt stabile în contact cu aerul, puțin solubile în apă și alcooli alifatici, sunt solubile în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubile în eter.

Cercetarea la microscop a compușilor I-VI demonstrează că ei posedă omogenitate fazică. Din cauza dimensiunilor mici și absenței monocristalelor de acești compuși, pentru determinarea individualității componentei lor și structurii au fost utilizate metodele analizei elementelor, spectroscopiei IR, magnetochimiei și termogravimetriei (tabelele 1, 2).

În baza determinării în dimetilformamidă a conductibilității electrice molare a compușilor declarați s-a determinat că ei sunt neelectroliti [$\kappa = 3 \dots 6 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 20°C, $C_m = 0,001 \text{ M}$].

Studiul magnetochimic la temperatura camerei (294K) al compușilor I-VI a demonstrat că valorile calculate ale momentelor lor magnetice efective sunt apropiate de valoarea de spin pentru un electron necuplat (tabelul 2). Deci în condițiile efectuării măsurărilor nu se realizează interacțiunea de schimb între ionii de cupru(2+) paramagnetici și complexii studiați au structura monomerică.

În scopul determinării modului de coordonare a liganzilor cu ionul de cupru(2+) a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compușilor declarați și a analogului lor structural, descris în [1]. S-a stabilit (tabelul 2) că tiosemicarbazona în I-VI se comportă ca un ligand tridentat dublu deprotonizat, unindu-se cu ionul central prin intermediul atomului de oxigen fenolic, al azotului azometinic și al sulfurii, formând două metalocicluri din cinci și șase atomi. În favoarea acestui fapt vorbește dispariția în spectrele IR ale substanțelor declarate și a analogului structural a benzilor de absorbție $\delta(\text{OH})$, $\nu(\text{NH})$ și $\nu(\text{C}=\text{S})$, care în tiosemicarbazona liberă se observă corespunzător în domeniile 1245...1240, 1540...1535 și 1125...1120 cm^{-1} . În ambele grupe de complecși se observă banda de absorbție $\nu(\text{C}-\text{S})$ în domeniul 750...740 cm^{-1} , iar banda $\nu(\text{C}=\text{N})$ se deplasează cu 35...30 cm^{-1} spre frecvența mai mică [în tiosemicarbazonele inițiale $\nu(\text{C}=\text{N})$ se observă în domeniul 1620...1610 cm^{-1}], fiind însoțită de scindare în doi componenți. În afara de aceasta, în spectrele IR ale complecșilor în domeniul 600...405 cm^{-1} apar o serie de noi benzi de absorbție, care conform datelor din literatura de specialitate se detectează ca $\nu(\text{Cu}-\text{N})$, $\nu(\text{Cu}-\text{O})$ și $\nu(\text{Cu}-\text{S})$. Prezența în complecșii declarați a aminei se confirmă prin existența în spectrele lor a benzilor de absorbție caracteristice (ordonarea 2-aminopiridinei și 5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazinei în V și VI spre atomul central are loc prin azot piridinic).

Analiza termică a demonstrat (tabelul 2) că termoliza lor decurge prin trepte de deshidratare (70...95°C), de deaminare (145...205°C) și de destrucție termooxidativă a complexului (310...390°C). Natura aminei A din sfera internă a complexului influențează temperatura de deaminare și de descompunere completă a compusului și se modifică în următorul șir: amoniac < 2-aminopiridină ≤ 2-picolină < 5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazină < 4-picolină < 3-picolină.

Exemplu de obținere a 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidoamincupru dihidratului. La soluția etanolică, care conține 10 mmol de dihidrat al clorurii de cupru(2+) în 50 ml etanol, încălzită (45...50°C) și amestecată în

MD 2003 B1 2002.09.30

permanență cu ajutorul agitatorului magnetic, se adaugă soluție de 10 mmol de tiosemicarbazonă a aldehidei 3,5-dibromsalicilice în 100 ml de alcool etilic și se picură soluție apoasă de amoniac până la pH=8. La răcire din amestecul reactant se depun cristale mărunte de culoare verde întunecată, care se separă pe filtru de sticlă, se spală cu C₂H₅OH, eter și se usucă în aer.

După o metodă analogică, folosind în calitate de substanțe inițiale dihidrat al clorurii de cupru(2+), tiosemicarbazonă a aldehidei 3,5-dibromsalicilice (luate în raportul molar 1:1) și soluție etanolică de amină [2-(II), 3-(III), 4-(IV)picolină, 2-aminopiridină (V) sau 5-nitrofurfuriliden-2-izonicotinoilhidrazină (VI)] se sintetizează compușii II-VI. Denumirile lor și unele caracteristici fizico-chimice sunt prezentate în tabelele 1, 2.

Determinarea activității antimicrobiene a complexilor sintetizați, precum și a celei mai apropiate soluții lor, a fost efectuată în mediu nutritiv lichid [bulion peptonat de carne (pH 7,0) de 2%] prin metoda diluțiilor succesive [Методы экспериментальной химиотерапии / под редакцией Першина Т. Н. М., Медицина, 1971, с. 357]. În calitate de cultură de referință în experimentul *in vitro* au fost folosite tulpinile standard de *Staphylococcus aureus* (Wood-46, Smith, 209-P), *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* (O-111), *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* și *Proteus mirabilis*. Dizolvarea substanțelor studiate în dimetilformamidă, cultivarea microorganismelor, obținerea suspensiei, determinarea dozei minime de inhibare (DMI) și concentrației minime bactericide (CMB) au fost efectuate după metoda descrisă în [Методы экспериментальной химиотерапии / под редакцией Першина Т. Н. М., Медицина, 1971, с. 357].

Proprietățile antimicotice ale substanțelor declarate au fost cercetate *in vitro* pe tulpini de laborator: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* și *Penicillium*. Activitatea s-a determinat în mediul nutritiv lichid Sabouroud (pH 6,8). Inoculațiile se pregăteau din tulpini de fungi recoltate în decurs de 3...7 zile. Concentrația lor în suspensie constituie (2...4)•10⁶ unități formatoare de colonii într-un mililitru. Însămânțările pentru levuri au fost incubate în decurs de 7, iar miceliile de 14 zile la temperatura de 37°C.

Studierea toxicității complexului IV s-a efectuat *in vivo* pe șoareci albi prin introducerea în stomac a suspensiei substanței în apă fiartă.

Rezultatele experimentale, obținute la studierea activității antimicrobiene a compușilor I-VI, sunt prezentate în tabelele 3 și 4, din care se vede că ei posedă activitate bacteriostatică și bactericidă în limitele concentrațiilor 0,036...4000 μg/ml față de bacteriile atât gram-pozitive, cât și gram-negative. Pentru comparație în aceleași tabele sunt prezentate datele antimicrobiene caracteristice 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidopiridincuprului – celei mai apropiate soluții și analogului structural ai compușilor declarați, care manifestă una din cele mai înalte activități dintre substanțele din șirul tiosemicarbazonic, cunoscute în literatură. Datele experimentale obținute demonstrează că complexii I-VI manifestă activitate antimicrobiană față de microorganisme gram-pozitive la nivelul celei mai apropiate soluții. În același timp complexii declarați după activitate bacteriostatică față de bacteriile gram-negative sunt de 1034-16 ori mai activi decât analogul lor structural.

Datele experimentale obținute la studierea proprietăților antimicotice ale compușilor declarați sunt prezentate în tabelul 5, din care se vede că ei manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă selectivă în limitele concentrațiilor 9,3...600 μg/ml și față de tulpinile cercetate de fungi. Pentru comparație în același tabel sunt incluse datele privind activitatea nistatinei utilizate în medicină pentru tratamentul micozelor. Rezultatele prezentate în tabelul 5 demonstrează că substanțele declarate manifestă activitate antimicotică față de majoritatea fungilor micelari și levurici de 25,8...2,1 ori mai înaltă decât nistatina (excepție face tulpina de *Aspergillus fumigatus*, care este mai puțin sensibilă față de substanțele declarate).

Toxicitatea (LD₅₀) al complexului IV (unuia dintre cei mai activi din această grupă de substanțe) constituie 1420 mg/kg (face parte din clasa compușilor cu toxicitate mică). Ea este de 8,6 ori mai mică decât a furacilinei (LD₅₀=166,7 mg/kg) și de 1,2 ori mai mică în comparație cu analogul său structural (LD₅₀=1230 mg/kg) [3].

Proprietățile depistate ale compușilor sintetizați și studiați prezintă interes din punct de vedere al lărgirii arsenalului de remedii antimicrobiene și antimicotice.

MD 2003 B1 2002.09.30

6

Tabelul 1

Denumirea, randamentul și rezultatele analizei elementelor compușilor declarați

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută	Randa- mentul, %	Determinat/calculat, %			
				Br	Cu	N	S
I	3,5-Dibromsalicilidentiosemicarba- zidoamincupru dihidrat	C ₈ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₃ S	78	34,01/34,19	13,29/13,68	11,72/11,97	6,67/6,84
II	3,5-Dibromsalicilidentiosemicarba- zido-2-picolincupru	C ₁₄ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ OS	71	31,29/31,50	12,33/12,60	10,83/11,02	6,01/6,30
III	3,5-Dibromsalicilidentiosemicarba- zido-3-picolincupru	C ₁₄ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ OS	76	31,37/31,50	12,42/12,60	10,91/11,02	6,12/6,30
IV	3,5-Dibromsalicilidentiosemicarba- zido-4-picolincupru monohidrat	C ₁₄ H ₁₄ Br ₂ CuN ₄ O ₂ S	77	30,15/30,42	11,96/12,17	10,35/10,65	5,86/6,08
V	3,5-Dibromsalicilidentiosemicarba- zido-2-aminopiridincupru	C ₁₃ H ₁₁ Br ₂ CuN ₅ OS	72	31,24/31,43	12,42/12,57	13,51/13,75	6,08/6,29
VI	3,5-Dibromsalicilidentiosemicarba- zido-5-nitrofuriliden-2- izonicotinoilhidrazincupru trihidrat	C ₁₉ H ₁₉ Br ₂ CuN ₇ O ₈ S	82	21,70/31,95	8,52/8,78	14,15/14,44	4,12/4,39

5

Tabelul 2

Rezultatele cercetărilor fizico-chimice ale compușilor declarați

Compusul μ _{ef} , m .B. (294 K)	Benzile de absorbție în spectrele IR*, cm ⁻¹					Temperatura (°C) de			
	v(C=N)	v(C--O)	v(C--S)	v(Cu--N), v(Cu--O), v(Cu--S)	Ligandului A	deshid- ratare	deaminare	descompunere completă	
I	1,87	1582 1575	1225	748	540, 490, 410	v(NH) 3330, v(NH ₂) 3215, 3150	90	145	310
II	1,92	1578 1573	1228	745	535, 480, 415	δ(CNC) 1032	--	160	345
III	1,99	1580 1575	1226	745	530, 480, 410	δ(CNC) 1036	--	195	390
IV	1,79	1578 1576	1225	747	530, 485, 415	δ(CNC) 1042	70	190	380
V	1,83	1580 1576	1230	746	525, 490, 420	δ(CNC) 1030, v(NH ₂) 3235, 3175	--	165	325
VI	1,76	1595 1578 1575	1235	750	525, 480, 410	δ(CNC)1040; v(NH) 3362, 3295; v(C=O) 1690; v(COC) _{fur.} 1245, 1225; v _{as} (NO ₂) 1515, 1345	85	190	370

10 * Notă: În prealabil complexii au fost încălziți în etuvă la 105° C până la încetarea schimbării masei

MD 2003 B1 2002.09.30

Tabelul 3

Activitatea (DMI / CBM) antimicrobiană ($\mu\text{g/ml}$) a compușilor declarați față de microorganismele gram-
pozitive

Compusul	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
	<i>Wood-46</i>	<i>Smith</i>	<i>209P</i>		
Cea mai apropiată soluție *	0,009 / 0,09	0,009 / 0,018	0,009 / 0,018	0,009 / 0,009	0,036 / 0,072
I	0,29 / 0,29	0,29 / 0,58	0,58 / 0,58	0,29 / 0,29	0,036 / 0,072
II	0,29 / 0,29	0,29 / 0,58	0,29 / 0,58	0,29 / 0,29	0,29 / 0,58
III	0,145 / 0,145	0,29 / 0,29	0,29 / 1,16	0,145 / 0,145	1,16 / 2,33
IV	0,145 / 0,145	0,145 / 0,29	0,29 / 1,16	0,29 / 0,58	0,009 / 0,036
V	0,036 / 0,036	0,145 / 0,145	0,58 / 0,58	0,145 / 0,145	0,0045 / 0,018
VI	0,072 / 0,145	0,036 / 0,072	0,29 / 0,58	0,145 / 0,145	0,58 / 0,58

- 5 **Notă:** * Cea mai apropiată soluție și analogul structural -- 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidopiridincupru [1]

Tabelul 4

- 10 Activitatea (DMI / CBM) antimicrobiană ($\mu\text{g/ml}$) a compușilor declarați față de microorganismele gram-negative

Compusul	<i>Escherichia coli (O-111)</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Cea mai apropiată soluție *	>300 / >300	>300 / >300	>300 / >300	>300 / >300	>300 / >300	>300 / >300	>300 / >300
I	1,16 / 37,5	2,33 / 9,35	2,33 / 600	0,58 / 600	2000 / >4000	0,29 / 2000	2,33 / 1000
II	4,67 / 9,35	0,29 / 75	1,16 / 300	0,29 / 300	>4000 / >4000	1,16 / 150	1,16 / >4000
III	18,7 / 18,7	4,67 / 1000	4,67 / 2000	0,29 / 400	2000 / 4000	1,16 / 4000	9,35 / >4000
IV	9,35 / 9,35	4,67 / 4,67	9,35 / 9,35	1,16 / 300	1000 / 1000	1000 / >4000	1000 / >4000
V	0,58 / 1,16	0,58 / 0,58	0,58 / 2,33	1,16 / 2,33	1000 / 2000	0,58 / 1000	1000 / 1000
VI	4,67 / 9,35	1,16 / 300	0,58 / 150	0,58 / 18,7	4000 / >4000	2,33 / 150	9,35 / 300

- Notă:** * Cea mai apropiată soluție și analogul structural -- 3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazidopiridincupru [1]

15

Tabelul 5

Activitatea (DMI/ CBM) antimicrobică ($\mu\text{g/ml}$) a unora dintre compușii declarați în comparație cu nistatina

Compusul	Tulpinile de fungi			
	Miceliile		Levurile	
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Penicillium</i>
Nistatina	240 / 240	240 / 240	80 / 80	80 / 80
II	18,7 / 18,7	300 / 300	37,5 / 37,5	37,5 / 37,5
III	9,3 / 9,3	300 / 300	37,5 / 37,5	37,5 / 37,5
IV	150 / 150	300 / 300	37,5 / 37,5	18,7 / 18,7
VI	150 / 150	600 / 600	37,5 / 37,5	18,7 / 18,7

