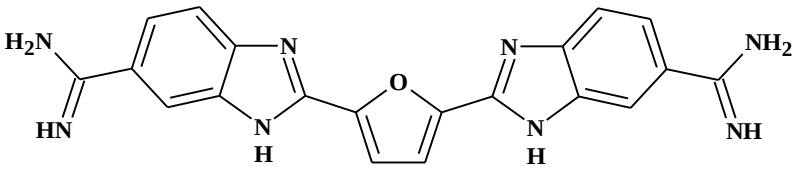
Invenţia se referă la chimie şi medicină, şi anume la un compus coordinativ biologic activ de cupru din clasa tiosemicarbazonaţilor metalelor de tranziţie. Acest complex inhibă proliferarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*. Datorită acestor proprietăţi el poate găsi aplicare în medicină şi veterinărie în calitate de preparat antifungic.

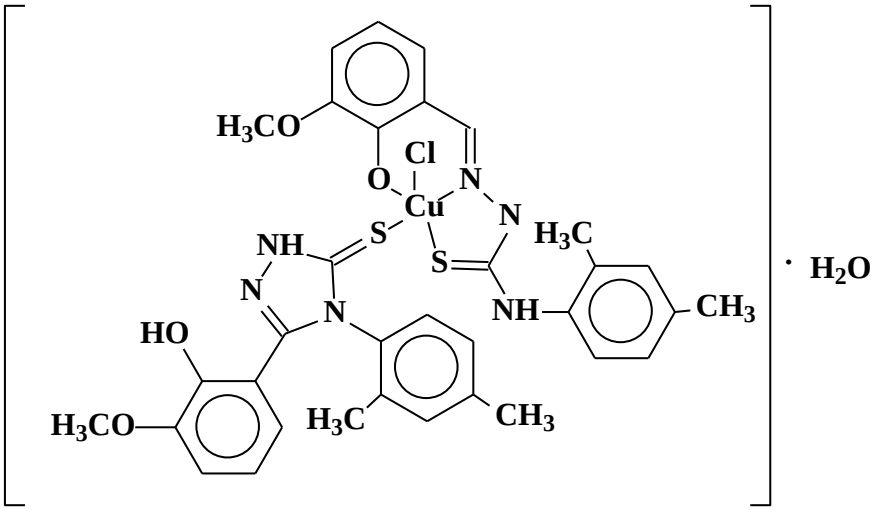
Din toţi compuşii chimici, care inhibă creşterea şi multiplicarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*, cel mai înalt efect antifungic a fost obţinut în cazul 2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolil)furanului [1] cu formula:



După activitatea antimicotică faţă de fungile din specia *Cryptococcus neoformans* acest compus depăşeşte de 25,8 ori caracteristicile respective ale fluconazolului, utilizat actualmente larg în medicină pentru tratarea şi profilaxia micozelor. Dezavantajul 2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolil)furanului constă în faptul, că el nu posedă o activitate antimicotică suficient de înaltă şi din această cauză nu a găsit o aplicare în medicină sau veterinărie.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenţie constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* cu activitate antimicotică înaltă.

Esenţa invenţiei constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* a hidratului de cloro-{[4−(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S}-{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru cu formula:



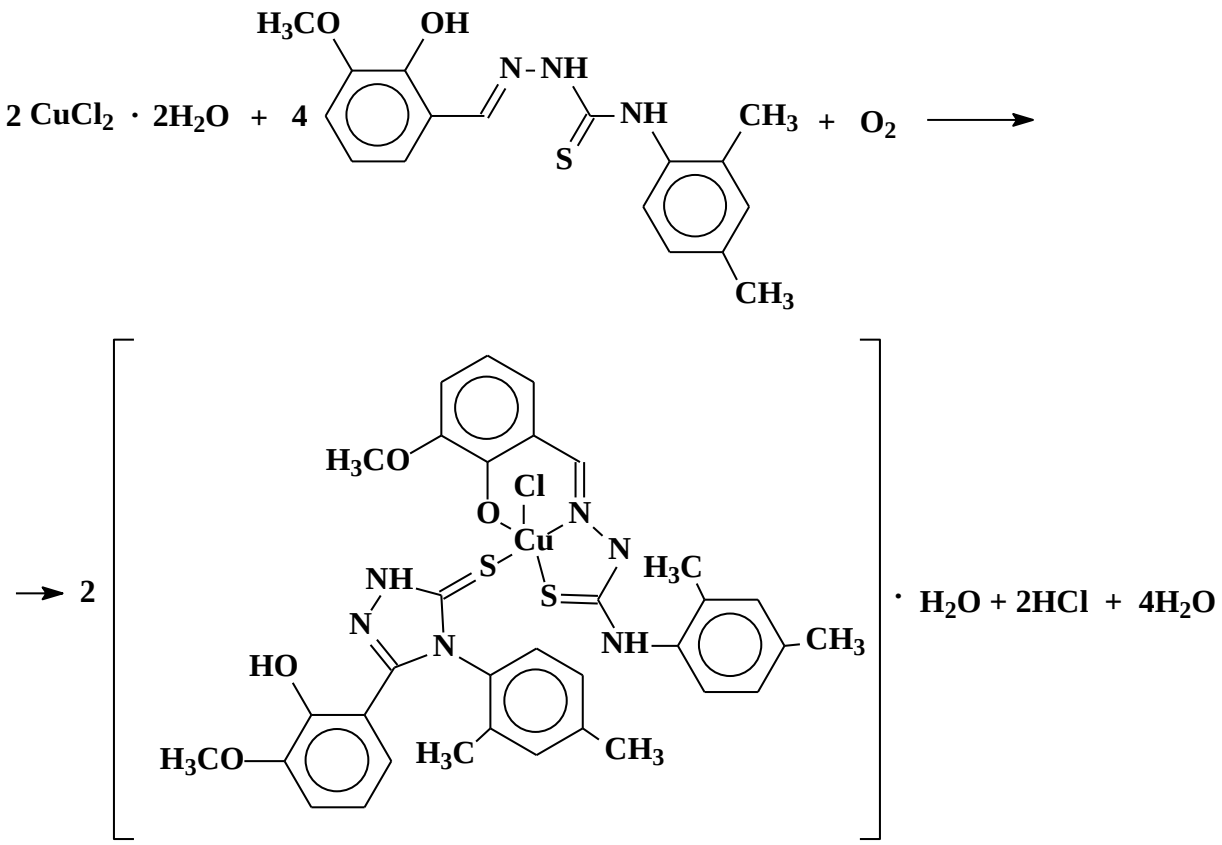
Complexul dat reprezintă un compus coordinativ de cupru cu liganzi micşti, în care doi liganzi polidentaţi obţinuţi din precursori identici manifestă diferită capacitate de dentare: primul este tridentat monodeprotonat, iar al doilea – monodentat şi ciclizat.

Rezultatul tehnic al invenţiei constă în obţinerea compusului coordinativ de cupru cu liganzi micşti, care manifestă activitate antimicotică faţă de fungii din specia *Cryptococcus neoformans* de 1,3 ori mai înaltă decât prototipul [1].

Proprietatea stabilită a hidratului de cloro-{[4−(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S}-{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru sus-numit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*.

Rezultatul tehnic obţinut se datorează faptului, că în compusul propus în invenţie se realizează o combinare nouă de legături chimice deja cunoscute.

Complexul revendicat se obţine la interacţiunea soluţiei etanolice fierbinţi (65…70°C) a dihidratului clorurii de cupru(2+) cu soluţia etanolică, care conţine 4−(2,4-dimetilfenil)-2-(hidroxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamidă, luate în raport molar 1:2. Reacţia decurge în 55…60 min conform următoarei scheme:



Mecanismul prezentei reacţii este legat de faptul, că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adiţia la ionul de cupru(2+) a primei molecule de N-2,4-dimetilfenil-tiosemicarbazonă a 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei, care joacă rolul de ligand-O,N,S tridentat monodeprotonat. Al patrulea loc în sfera internă a atomului central îl ocupă atomul de sulf de la a doua moleculă de tiosemicarbazonă, care în amestecul reactant în prezenţa templatului de cupru(2+) a fost supus ciclizării oxidative cu oxigenul din aer, formând 4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tionă. Al cincilea loc în sfera internă a complexului este ocupat de ionul clorură. În rezultatul acestor procese are loc formarea complexului de cupru(II) revendicat, care reprezintă o piramidă tetragonală. Conform bazei de date din Cambridge [November 2017 release of the Cambridge Structural Database System (version 5.39)], nu este cunoscută metoda de sinteză de aşa tioną substituită şi nu sunt cunoscuţi compuşi coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazone şi tione de un atare tip structural.

Exemplu de obţinere al hidratului de cloro-{[4−(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S}-{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru.

Se amestecă 20 mL de soluţie etanolică, care conţine 20 mmol de N-2,4-dimetilfeniltiosemicarbazonă a 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei cu 10 mmol de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, dizolvat în 10 mL de alcool. Amestecul reactant este încălzit (65…70°C) şi amestecat în permanenţă cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 55…60 min. La răcire din soluţie se depun cristale mărunte de culoare verde, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu o cantitate mică de etanol, eter şi uscate la aer. Randamentul produsului final alcătuieşte 75% de la cel calculat teoretic.

S-a determinat, %: C –52,74; H –4,47; Cl – 4,30; N- 10,77; S – 8,07.

Pentru $C_{34}H_{36}ClCuN_6O_5S_2$ s-a calculat, %: C –52,91; H – 4,70; Cl – 4,59; N- 10,89; S – 8,31.

Benzile de absorbţie în spectrul IR, cm^{-1}: ν(NH) = 1530; ν(C=N) = 1610, 1585; ν(C-OH) = 1275; δ(C-N) = 1200, 1175; ν(C=S) = 1045, 1040; ν(C-N) = 980, 955, 930, 890; ν(C-O) = 1220, 1205; ν(Cu-N) = 530, 423; ν(Cu-S) = 470, 460; ν(Cu-O) = 445.

Momentul efectiv magnetic μ_{ef} = 1,76 mB (294K).

Procedeul de obţinere al compusului declarat este simplu în executare, substanţele iniţiale sunt accesibile. 4-(2,4-Dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamida a fost sintetizată după metodica descrisă în brevetul MD 4452 B1 2016.12.31. Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puţin solubil în apă şi alcooli alifatici, este solubil în dimetilformamidă şi dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

La recristalizarea hidratului de cloro-{[4−(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S}-{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru din soluţie etanolică au fost obţinute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X. Măsurătorile cristalografice au fost efectuate utilizând un difractometru de tip Xcalibur E CCD Oxford-Diffraction cu monocromator de grafit înzestrat cu sursă de raze X de tip Mo-K_α. Procedeele de determinare a parametrilor celulei elementare şi de integrare a datelor experimentale au fost efectuate cu ajutorul setului de programe “CrysAlis

package Oxford Diffraction". Pentru structura cercetată soluţia a fost determinată prin metoda directă cu ajutorul programului SHELXS-97 şi fitată prin metoda pătratelor minimale în cadrul programului SHELXL-97 în varianta anisotropică pentru toţi atomii cu masă molară mai mare decât a atomului de hidrogen. Atomii de hidrogen au fost introduşi în poziţii idealizate (d_{CH} = 0,96 Å) utilizând modelul pivot cu fixarea parametrilor izotropici de deplasare la valoarea de 120% faţă de valorile respective ale atomilor de carbon cu care sunt legaţi. Formula empirică a compusului investigat $C_{34}H_{38}ClCuN_6O_6S_2$, grupa spaţială P 2_1/c, parametrii celulei elementare [Å]: a = 20,3254(14); b = 7,1080(5), c = 26,674(3); α = 90°, β = 101,667(8)°, γ = 90°; volumul – 3774,07 $Å^3$. A fost stabilit (figură – structura compusului revendicat), că nodul coordinativ al compusului complex investigat are structură tetragonal-piramidală distorsionată. În sfera internă a atomului central se află două molecule de tiosemicarbazonă, care îndeplinesc diferite funcţii. Prima moleculă de azometină este tridentată, coordinându-se la atomul de cupru prin atomii de oxigen fenolic deprotonat [d(Cu-O) = 1,9084Å], atomul de azot azometinic [d(Cu-N) = 1,9818Å] şi atomul de sulf [d(Cu-S) = 2,2930Å], formând două metalocicluri din şase şi cinci atomi. Această tiosemicarbazonă se află în sfera internă în forma tionică nedeprotonată. În favoarea acestui fapt vorbeşte distanţa d(C=S) = 1,6948Å, care corespunde legăturii duble. A doua moleculă de tiosemicarbazonă este ciclizată şi coordinează la atomul central prin atomul de sulf [d(Cu-S) = 2,3458Å], care se află în sfera internă în forma tionică [d(C=S) = 1,6983Å]. În afară de aceasta, în ligandul monodentat ciclizat distanţa $d(C\text{-}O)_{fenolic}$ = 1,358Å corespunde fragmentului fenolic cu atomul de oxigen protonat. Al cincilea loc în sfera internă a complexului este ocupat de ionul clorură cu distanţa d(Cu-Cl) = 2,7082Å. Alte distanţe interatomice şi unghiurile de valenţă sunt standarde pentru compuşii din această clasă.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor şi a cercetărilor fizico-chimice, a fost stabilită compoziţia şi structura compusului revendicat.

Esenţa invenţiei poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Proprietăţile antimicotice ale hidratului de cloro-{[4−(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S}-{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru au fost cercetate "*in vitro*" pe tulpina de laborator de micete levuriforme *Cryptococcus neoformans.* Activitatea antimicotică s-a determinat utilizând mediul RPMI 1640 suplimentat cu glucoză. Inoculul se pregătea, din subcultura de 48 ore cultivată pe Agar Sabouraud, în apă distilată sterilă până la o densitate de 0,5 McFarland (cca. 2-5x10^6 UFC/ml), după care se efectua o a doua diluţie cu apă distilată sterilă de 1:10, obţinându-se inoculul final. Rezultatul final se interpreta prin folosirea unui spectofotometru, înregistrându-se absorbanţa fiecărui godeu la 405 nm. CMI-ul se calcula ca fiind cea mai mică concentraţie care inhibă creşterea (comparativ cu martorul pozitiv).

Rezultatele studiului activităţii biologice a compusului revendicat sunt prezentate în tabel, din care se vede, că el posedă activitate fungiostatică şi fungicidă în limitele concentraţiilor 0,48…1,95 µg/mL faţă de fungile din specia *Cryptococcus neoformans*. După cum se vede din tabel, compusul coordinativ declarat manifestă activitate antimicotică, ce depăşeşte de 1,3 ori activitatea prototipului [1].

Proprietăţile depistate ale compusului nominalizat prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antimicotice şi permite utilizarea lui în cazul rezistenţei fungilor faţă de medicamentele tradiţionale.

Tabel

Activitatea antimicotică (µg/mL) a compusului revendicat în comparaţie cu prototipul

Tulpina	Compusul declarat[a]		Prototipul [1]	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Cryptococcus neoformans CECT 1043	0,48	1,95	0,62	b

[*]Notă: a) Compusul declarat - hidratul de cloro-{[4−(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S}-{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru, b) CMB prototipului în [1] nu a fost studiată.