

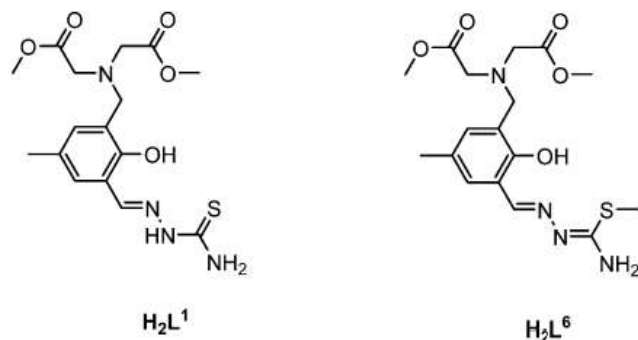
Invenția se referă la utilizarea unui compus coordinativ de cupru în bază de izotiosemicarbazone aromatice în calitate de remediu antibacterian și poate fi aplicată în medicină.

Tiosemicarbazonele și compușii coordinativi respectivi cu unele metale de tranziție, în special cupru, pot manifesta în unele cazuri un spectru larg de acivitate farmacologică [1, 2, 3]. Activitatea biologică a tiosemicarbazonei și compușilor lor coordinativi variază foarte larg în funcție de natura metalului, structura ligandului sau a complexului, natura substituenților atât din fragmentul carbonilic cât și la fragmentul tiosemicarbazidic. Ultimul poate fi derivatizat prin substituție la atomii de azot sau la sulful din gruparea tiocarbonilică.

Ca o ilustrare a dependenței activității biologice de structura ligandului sau a compusului coordinativ de metal pot servi complexii binucleari de cupru(II) cu tiosemicarbazonele  $N_4$ -substituite a hidroxiacetofenonei. Dimerii de cupru nu posedă o activitate de inhibare față de *Aspergillus niger*, dar în schimb sunt activi față de *Paecilomyces variotii* [4].

Alți complecși binucleari (dimeri) de cupru(II), și anume în baza ligandului binucleabil – bis(4-feniltiosemicarbazona) 2,6-diformil-4-metilfenolului, sunt inactivi față de diferite specii de bacterii sau fungi [5].

O cale relativ mai puțin utilizată pentru derivatizarea tiosemicarbazidelor constă în alchilarea atomului donor de sulf tionic cu obținerea S-alchilizotiosemicarbazidelor. În urma alchilării atomului de sulf, se reduce drastic capacitatea de coordonare a atomului tioeteric format cu majoritatea metalelor de tranziție. Ca urmare, atomul de sulf din fragmentul izotiosemicarbazidic nu mai participă la coordonare, iar locul lui în setul de atomi donor ai izotiosemicarbazidei este ocupat de atomul terminal  $N_4$ . Din datele din Stadiul tehnicii reiese că alchilarea sulfului din fragmentul tiosemicarbazidic în multe cazuri nu contribuie la ridicarea activității biologice a tiosemicarbazonei și compușilor coordinativi. De exemplu, pentru derivații S-alchilați ai 1,4-benzochinon-izotiosemicarbazona-guanilhidrazoni s-a stabilit că un rezultatul alchilării sulfului se micșorează activitatea antibacteriană comparativ cu tiosemicarbazona inițială [6]. Alt exemplu poate servi tiosemicarbazona aldehidei benzoice, care posedă o activitate antituberculoasă. Dar derivatul S-substituit S-alchilizotiosemicarbazona aldehidei benzoice nu mai este activ contra bacilului tuberculos [7]. Din studiul comparativ al activității antiproliferative al complecșilor metalelor, inclusiv al cuprului, cu tiosemicarbazone hidroxiaromatice nealchilate și S-metilzotiosemicarbazonele respective reiese că alchilarea sulfului reduce drastic capacitatea complecșilor de a inhiba proliferarea celulelor canceroase [8]. Efectul tiometilării atomului de sulf tiosemicarbazidic asupra activității biologice poate fi divergent. De exemplu, analogul S-metilic  $H_2L^6$  este mai citotoxic decât compusul nealchilat  $H_2L^1$ :



pe de altă parte compusul dimer  $[Cu_2L^6 Cl_3]$  posedă o activitate mai redusă față de liniile de celule canceroase decât  $[Cu_2HL^1 Cl_3]$  [9].

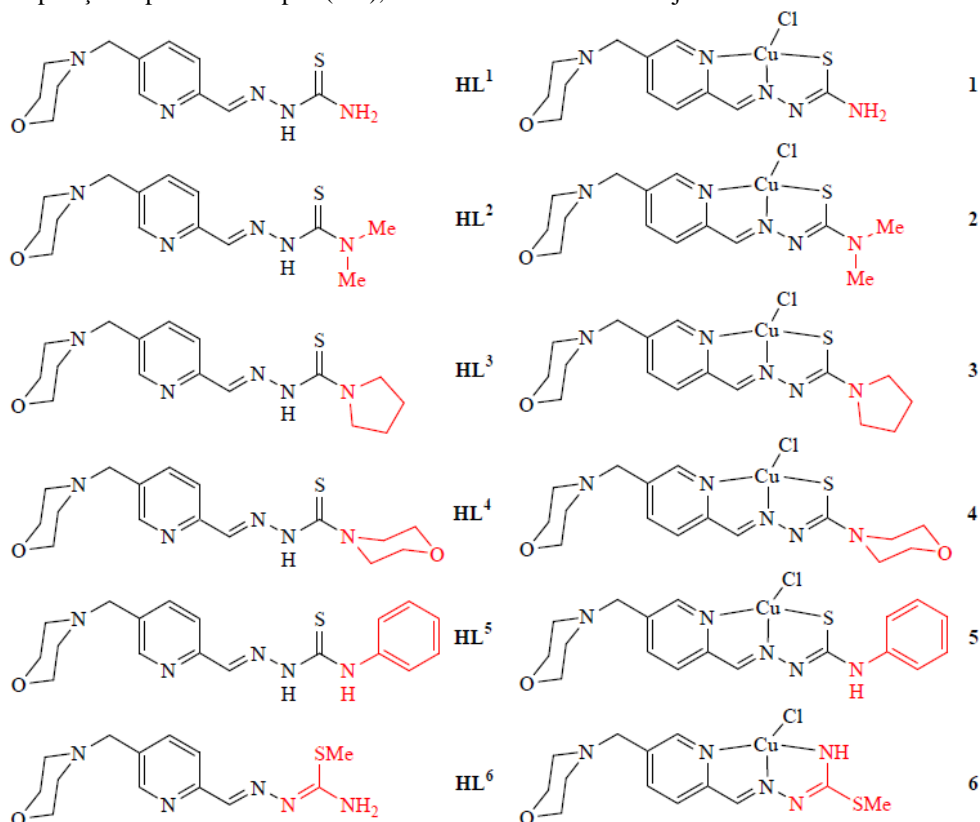
În unele cazuri coordonarea izotiosemicarbazonei cu metale poate să mărească activitatea biologică a S-metilzotiosemicarbazonei. De exemplu, S-alchilizotio-semicarbazonele aldehidei 5-metilsalicilice posedă o activitate antibacteriană redusă față de tulpinile *S. aureus*, *B. cereus* ș.a., concentrația minimă inhibitoare fiind la nivelul de 400  $\mu g/mL$ . În schimb compușii binucleari ai fierului trivalent ( $\mu$ -oxodimeri) cu  $N_1, N_4$ -bis(saliciliden)-S-metil-izotiosemicarbazida sunt activi față de tulpinile sus-menționate la concentrații de 10...50  $\mu g/mL$ , totodată compușii mononucleari sunt considerabil mai puțin activi, concentrația minimă inhibitoare situându-se în intervalul 100...500  $\mu g/mL$  [10]. Pe de altă parte sunt cunoscute date că unele tiosemicarbazone, necoordinate la ionii de metal, manifestă o activitate antimicrobiană semnificativ mai mare decât compușii respectivi dinucleari ai cuprului(II) [4].

Dezavantajul acestor compuși biologic activi constă în faptul că foarte mulți din ei sunt insolubili sau foarte puțin solubili în apă. Având în vedere că apa reprezintă solventul biologic natural din componența organismelor vii, și reieșind din considerentele practice de pregătire și aplicare a remediilor antimicrobiene, este foarte de dorit de a elabora ingrediente activi solubili în apă (hidrosolubili). Aceasta ar permite de a mări eficacitatea remediilor antibacteriene utilizate sub formă de soluții apoase, evitând folosirea solvenților organici, diferitor adjuvanți de solubilizare sau umectare, cu toate consecințele pozitive și pentru toxicitate, costuri economice etc. Majoritatea absolută de tiosemicarbazone și complecșii lor sunt insolubili în apă. O metodă de a conferi hidrosolubilitate constă în introducerea în ligandul organic a unor grupe hidrofile ca grupa sulfonică ( $-SO_3H$ ) sau carboxilică ( $-COOH$ ). Aceste grupe ușor se ionizează în mediul bazic cu formarea sărurilor respective ale metalelor alcaline sau amoniu, care de regulă conferă solubilitate în apă ligandului sau complexului respectiv.

Pe această cale au fost obținuți complecși hidrosolubili de cupru, zinc și nichel cu tiosemicarbazone ale aldehidelor aromatice sulfonate [11]. Solubilitatea lor în apă a permis testarea *in vivo* a activității biologice, în special a citotoxicității contra celulelor de leucemie cronică mieloidă umană. Un dezavantaj al acestor compuși constă în aceea că introducerea grupei sulfonice necesită stadii suplimentare de sinteză organică, în plus grupa sulfonică poate influența negativ asupra activității biologice.

În scopul de a obține tiosemicarbazone heteroaromatice și complecși de cupru(II) hidrosolubili cu activitate antiproliferativă contra celulelor anticanceroase, în nucleul heteroaromatic s-a introdus grupa morfolinică, care poate conferi o hidrosolubilitate și spori activitatea biologică a compușilor rezultați [12].

Au fost sintetizate diverse tiosemicarbazone pe bază de 5-metilmorfolin-piridin-2-carboxaldehidă (HL<sup>1</sup>-HL<sup>6</sup>) și complecșii respectivi de cupru (1-6), care s-a dovedit că sunt deja hidrosolubili:



S-a determinat că o parte din compușii coordinativi formează dimeri slabi (asociați) în stare solidă, care în soluție apoasă se scindează în monomerii reprezentați mai sus. Totodată liganzii și complecșii lor de cupru au fost testați și pentru activitate antibacteriană față de microorganismele Gram-pozitive *S.aureus* și Gram-negative *P. aeruginosa*. HL<sup>1</sup>-HL<sup>5</sup> împreună cu complecșii 1 – 5 au arătat o activitate antibacteriană considerabilă față de bacteriile *S.aureus*. În schimb ligandul HL<sup>6</sup> în bază de S-metilzotiosemicarbazidă și complexul 6, spre deosebire de ceilalți compuși, au manifestat un nivel foarte redus de activitate antibacteriană. Alt dezavantaj constă că sinteza 5-metilmorfolin-piridin-2-carboxaldehidei, care conferă în final hidrosolubilitate complecșilor, este destul de anevoioasă și necesită șapte stadii de sinteză.

Pentru compușii coordinativi ai Cu cu derivații S-metilzotiosemicarbazonelelor hidroxiaromatice, structural destul de apropiați de compusul utilizat de solicitanți în revendicări, anume cu 4-alil-S-metilzotiosemicarbazona 3,5-dibromosalicilaldehidei, s-a depistat că ei posedă o activitate antibacteriană [13]. Dezavantajul acestor compuși constă în faptul că nu sunt solubili în apă.

Recent au fost descriși compușii coordinativi ai cuprului(II) cu 4-alil-S-metilzotiosemicarbazona aldehidei salicilice care manifestă proprietăți antibacteriene pronunțate [14]. Acești compuși pot fi considerați ca cei mai apropiați din punct de vedere structural și după activitatea antibacteriană în raport cu compusul propus pentru utilizare în invenția revendicată. Dezavantajul compușilor din analogul proxim constă în faptul că ei nu sunt solubili în apă, iar activitatea antibacteriană nu este destul de înaltă.

Problema soluționată de invenție constă în extinderea gamei de remedii antibacteriene contra speciilor patogene în bază de compuși coordinativi (combinații complexe) ai cuprului(II) cu izotiosemicarbazone aromatice și care să fie solubile în apă (hidrosolubile).

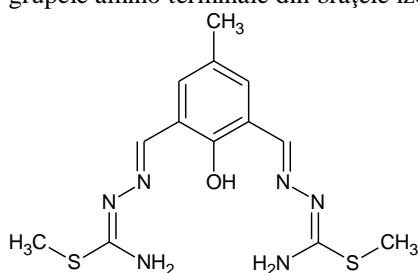
Problema s-a soluționat printr-o analiză și o selecție neevidentă dintre compușii coordinativi binucleari (dimeri) ai cuprului hidrosolubili cu derivați de izotiosemicarbazone aromatice binucleabile, urmată de sinteza și investigații microbiologice corespunzătoare. Totodată pentru referință au fost sintetizați doi compuși coordinativi hidrosolubili ai cuprului cu izotiosemicarbazone aromatice apropiate structural, dar pentru care solicitanții au depistat că ultimii

nu posedă o activitate antibacteriană înaltă. De aici rezultă că între activitatea antibacteriană și hidrosolubilitatea compușilor coordinativi ai cuprului(II) cu izotiosemicarbazone nu există o legătură cauzală univocă.

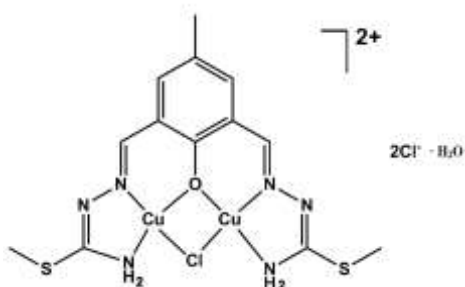
Esența invenției constă în aceea că pentru un compus binuclear al cuprului(II) hidrosolubil în bază de derivat S-alchilat al tiosemicarbazidei, și anume 2,6-bis(S-metilizotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru–hidrat, s-a depistat că în soluții apoase el posedă o activitate pronunțată contra bacteriilor patogene Gram-pozitive. În rezultat compusul dat se propune pentru utilizare în calitate de remediu antibacterian selectiv față de tulpinile patogene Gram-pozitive.

Rezultatul atins de invenție constă în faptul că în soluții apoase combinația complexă binucleară 2,6-bis(S-metilizotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru–hidrat posedă o activitate antibacteriană față de tulpinile patogene Gram-pozitive la concentrații minime inhibitorii sau bactericide în intervalul de valori de 0,5...2  $\mu\text{g/mL}$ .

Ligandul ( $\text{H}_3\text{DF-T}_1$ ) din componența compusului coordinativ este unul binucleabil, adică poate coordona simultan doi ioni de cupru cu utilizarea punții de fenolat și a patru atomi donori de azot  $\text{N}_1$  și  $\text{N}_4$  ale ambelor „brațe” izotiosemicarbazidice, deoarece, ca urmare a alchilării atomilor donori de sulf, ultimii nu se mai pot coordona la ionii de cupru(II). În medii neutre ligandul se coordonează în formă monodeprotonizată în urma disocierii grupei fenolice, iar în medii bazice – în formă trideprotonizată, datorită disocierii suplimentare a câte un proton de la grupele amino terminale din brațele izotiosemicarbazidice. Structura  $\text{H}_3\text{DF-T}_1$  este redată mai jos:



Compusul coordinativ se obține la interacțiunea  $\text{H}_3\text{DF-T}_1$  cu clorură de cupru(II) în mediu alcoolic și reprezintă un dimer de cupru coordonat cu ligandul monodeprotonizat, mai conține trei ioni de clor și o moleculă de apă de cristalizare - 2,6-bis(S-metilizotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru–hidrat. Reieșind din datele analizei elementale, spectrale și proprietăților chimice și magnechimice dimerul de cupru foarte probabil că are următoarea structură  $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{DF-T}_1)\text{-}\mu\text{-Cl}]\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ , unde  $\text{H}_2\text{DF-T}_1$  reprezintă ligandul inițial monodeprotonizat la atomul punte de oxigen fenolic, iar notarea  $\mu\text{-Cl}$  denotă faptul că un ion de clor are rolul de a doua punte între ionii de  $\text{Cu(II)}$ :

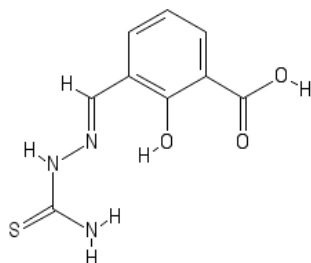


Nu este exclus că ceilalți doi anioni de clor să coordoneze apical la fiecare ion de cupru, iar la dizolvarea dimerului în apă să disocieze ușor din sfera internă a compusului coordinativ cu formarea electroliților de tipul 1:2, fapt ce ar contribui la hidrosolubilitatea dimerului de cupru. Conform regulilor de nomenclatură chimică denumirea desfășurată a compusului poate fi  $\{\mu\text{-cloro-[2,6-bis(S-metilizotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-N}_1, \text{N}_4, \text{N}'_1, \text{N}'_4, \mu\text{-O]dicupru(II)}\}$ -dicloro–hidrat. Din considerente practice dimerul de cupru utilizat în continuare va fi notat prin C1.

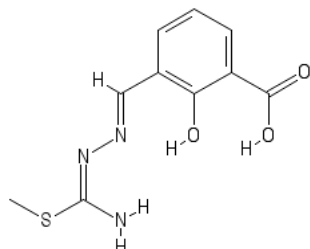
Complexul C1 este cunoscut din Stadiul tehnicii (Gerbelev N.V., Revenko M.D., Zhovmir F.K., Kuyavskaja B.Ya. Binuclear compounds of copper(II) with ligands based on chalcogensemicarbazides and 2,6-diformyl-4-methylphenol. Zhurn. Neorg. Khimii (J. Inorg.Chem. USSR), 1986, 31, No. 8, pp. 2017-2022), dar activitatea lui biologică nu a fost cercetată.

$[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{DF-T}_1)\text{-}\mu\text{-Cl}]\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  este solubil în apă și formează soluții verde-intens la concentrații relativ mici. Această hidrosolubilitate este una mai puțin obișnuită, deoarece dimerul analog de cupru cu tiosemicarbazona nealchilată, tot cu trei ioni de clor în componența sa, este insolubil în apă.

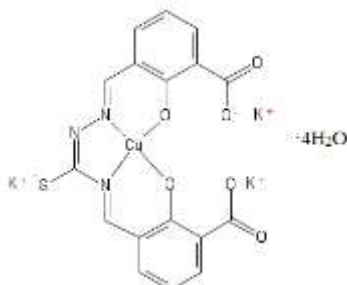
Rezultatul neevident al invenției este evidențiat de faptul că pentru comparație au fost sintetizați compuși coordinativi ai cuprului(II) cu liganzi structural foarte apropiați cu grupa funcțională carboxilică legată de inelul aromatic, care după analogie cu grupa sulfonică [11] pot forma săruri hidrosolubile a compușilor coordinativi ai cuprului. Pentru aceasta au fost utilizați următorii liganzi polifuncționali și binucleabili – tiosemicarbazona acidului 3-formilsalicilic ( $\text{H}_3\text{FSA-T}$ ):



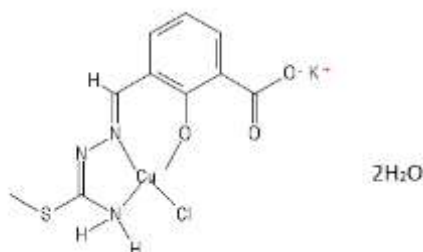
și S-metilizotiosemicarbazona acidului 3-formilsalicilic ( $H_3FSA-T_1$ ):



În rezultatul condensării template în mediu bazic dintre  $H_3FSA-T$  și acidul 3-formilsalicilic, a fost sintetizată sare hidrosolubilă de potasiu a compusului mononuclear de cupru (în continuare C2). Sinteza s-a efectuat în esență analogic cu sinteza compusului de nichel(II), similar după structură și hidrosolubilitate, descris anterior în literatura nonbrevet (Zhovmir F.K., Gerbelev N.V. Template synthesis and properties of coordination compounds of nickel(II) with binucleating ligands based on thiosemicarbazide and 3-formylsalicylic acid. Zhurn. Neorg. Khimii (J. Inorg.Chem. USSR), 1984, 29, No. 9, pp. 2304-2308). Compusul C2 are următoarea formulă:



La interacțiunea  $H_3FSA-T_1$  cu clorură de cupru(II) în mediu etanol-apă, în prezența unui exces mic de hidroxid de potasiu, s-a obținut compusul mononuclear (în continuare C3), în care grupa carboxilă este ionizată, fapt ce-i conferă hidrosolubilitate:



Ambii compuși C2 și C3, deși sunt solubili în apă, în urma testărilor microbiologice au arătat că posedă o activitate antibacteriană cu mult mai redusă față de C1 – aproximativ de 100 de ori mai mică.

În calitate de microorganisme-test pentru evaluarea activității antibacteriene au fost selectate tulpinile patogene Gram-pozitive de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, tulpinile patogene Gram-negative: *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-747.

Evaluarea activității antibacteriene s-a efectuat *in vitro* prin metoda diluțiilor succesive duble, conform protocolului standard.

După cum reiese din rezultatele testării activității antibacteriene soluțiile apoase puternic diluate a dimerului de cupru selectat posedă o activitate antibacteriană înaltă și selectivă față de bacteriile Gram-pozitive. Concentrația minimă bactericidă fiind în jur de  $1\mu\text{g/mL}$ . Față de bacteriile Gram-negative compusul C1 posedă o activitate antibacteriană redusă de aproximativ de 100 de ori. Totodată, pentru comparație, compusul coordinativ al cuprului(II) din analogul proxim clorura de [diaqua-4-alil-S-metilizotiosemicarbazidosalicilidenato(-)-cupru(II)]

manifestă o activitate antibacteriană semnificativ mai redusă față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [14]. Concentrația minimă inhibitorie sau bactericidă este de 120 μg/mL, adică mai mare cu două ordine față de C1.

Din Stadiul tehnicii se cunoaște că S-alchilarea tiosemicarbazidei diminuează activitatea antibacteriană a izotiosemicarbazonelor [6, 7, 12]. De aceea activitatea bactericidă față de bacteriile patogene a C1, care face parte din grupa de compuși coordinativi cu izotiosemicarbazone, este una neașteptată.

Avantajele invenției constau în următoarele:

- compusul coordinativ binuclear de cupru cu bis(S-metilzotiosemicarbazona) 2,6-diformil-4-metilfenolului este solubil în apă – mediul natural celular (*in vivo*);
- posedă o activitate bactericidă la concentrații mici, de ordinul unui μg/mL;
- sinteza compusului coordinativ este una relativ simplă și se realizează din precursori accesibili comercial.

În concluzie din cercetările microbiologice rezultă că compusul binuclear de cupru C1 poate fi aplicat în farmaceutică sub formă de soluții apoase diluate la combaterea diferitor bacterioze.

#### Exemple de realizare a invenției

##### Exemplul 1: sinteza compusului C1: $[Cu_2(H_2DF-T_1)-\mu-Cl]Cl_2 \cdot H_2O$

Ligandul precursor bis(S-metilzotiosemicarbazona) de 2,6-diformil-4-metilfenol ( $H_3DF-T_1$ ) și compusul de cupru C1 testat au fost descriși anterior (Gerbelev N.V., Revenko M.D., Zhovmir F.K., Kuyavskaia B.Ya. Binuclear compounds of copper(II) with ligands based on chalcogensemicarbazides and 2,6-diformyl-4-methylphenol. Zhurn. Neorg. Khimii (J. Inorg.Chem. USSR), 1986, 31, No. 8, pp. 2017-2022). Conform procedurii bine cunoscută a fost sintetizată hidriodura de S-metilzotiosemicarbazidă prin alchilarea tiosemicarbazidei cu iodmetan în mediu de etanol. În continuare hidriodura de izotiosemicarbazidă a fost condensată în mediu etanol-apă, în prezență de carbonat de sodiu, cu 2,6-diformil-4-metilfenol.

Ligandul este insolubil în apă, solubil în DMSO sau DMF și se caracterizează prin următoarele caracteristici. P.t. 208...211°C.

Benzile reprezentative în spectrul IR înregistrat cu spectrometrul FT-IR PerkinElmer Spectrum 100 (disc KBr,  $cm^{-1}$ ): 3484s, 3404s, asc, 3081s, 1636p, asc, 1607p, 1517fp, asc, 1299p, asc, 1016m, asc, 757p, asc, 691m, asc (unde s semnifică slab, m – mediu, p – puternic, fp – foarte puternic și asc – ascuțit).

Compusul coordinativ de cupru C1 s-a obținut conform unui procedeu modificat:

La suspensia de  $H_3DF-T_1$ , (1,70 g, 5 mmoli) în metanol (100 mL) se adaugă la temperatura camerei  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (1,70 g, 10 mmoli). Amestecul se agită magnetic timp de cca 15 min până dispare ligandul inițial de culoare galbenă, apoi se încălzește la temperatura de 50...60°C timp de 0,5 ore. După răcire, peste 4...6 ore produsul cristalin verde se filtrează, se spală cu metanol, apoi cu eter și se usucă la aer. Se obțin 2,86 g (97%) de produs cristalin (microace) de culoare verde.

Produsul (C1) este solubil în apă (cca 1%), DMSO sau DMF, în care formează soluții limpezi de culoare verde-intens. Soluțiile apoase peste 24 ore încep foarte lent să capete o nuanță nădărie fără a se forma un careva precipitat în decurs de 6 luni.

La păstrare în flacoane închise etanș, ferite de lumină, C1 este stabil cel puțin 3 ani de zile.

Spectrul IR(disc KBr,  $cm^{-1}$ ): 3503s, 3419s, asc., 3300s, 2797m, 1555fp, asc, 1315p, asc, 1144p, asc, 904m, asc, 713m.

##### Exemplul 2: sinteza compusului C2: $K_3[Cu((f_3sa)_2T)] \cdot 4H_2O$

Ligandul precursor tiosemicarbazona acidului 3-formilsalicilic ( $H_3FSA-T$ ), p.t. 211 °C, a fost descris anterior (Zhovmir F.K., Gerbelev N.V. Template synthesis and properties of coordination compounds of nickel(II) with binucleating ligands based on thiosemicarbazide and 3-formylsalicylic acid. Zhurn. Neorg. Khimii (J. Inorg.Chem. USSR), 1984, 29, No. 9, pp. 2304-2308).

Spectrul IR(disc KBr,  $cm^{-1}$ ): 3677s, 3442m asc., 3287m, 3168p, 2974s, 2902s, 1663p ( $\nu_{as}COOH$ ), 1611p, 1600p, 1549p, 1450m, 1412p, 1380m, 1225fp, 1151fp, 1108p, 1079p, 1064p, 946m, 754p, 702m, 672m asc.

Complexul hidrosolubil  $K_3[Cu((f_3sa)_2T)] \cdot 4H_2O$  a fost sintetizat prin condensarea templată pe matrice de Cu(II) a  $H_3FSA-T$  cu acidul 3-formilsalicilic ( $H_2FSA$ ) în mediu bazic puternic. Soluția de  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (1,70 g, 10 mmol) în metanol (100 mL) se adaugă cu picătura la agitare magnetică la o soluție de metanol-apă (7:3, 100 mL), încălzită la 50...60°C, care conține  $H_3FSA-T$  (2,50 g, ~10,1 mmol),  $H_2FSA$  (2,00 g, ~12 mmol) și KOH (12,0 g, ~214 mmol). După finalizarea adăugării se menține temperatura suspensiei cristaline formate de culoare cafenie-roșie aproximativ 0,5 ore și se lasă amestecul să se răcească pentru aproximativ 24 ore. Se filtrează precipitatul cristalin (microace) cafeniu-întunecat cu nuanță roșie, se spală cu metanol, apoi cu eter dietilic și se usucă la aer. Randamentul constituie 5,05...5,39g (79...84%).

Produsul este solubil în apă, DMSO și DMF, insolubil în etanol, acetoneitril. Soluțiile apoase posedă o culoare cafenie-roș foarte intensă și sunt stabile cel puțin o lună.

Rezultatele analizei elementale confirmă structura propusă:

Găsit, %: Cu – 10,45; C – 31,22; H – 2,28; N – 6,70.

Pentru  $C_{17}H_{16}CuK_3N_3O_{10}S$  calculat, %: Cu – 10,00; C – 32,14; H – 2,54; N – 6,61.

Spectrul IR(disc KBr,  $cm^{-1}$ ): 3203m, f. larg, 1601fp, 1535fp, 1418p, 1374p, 1305p, 1222m asc, 1122p, 1083p, 1035m, 986m, 881sl asc, 870sl, 830sl, 798sl, 745m. f. asc, 671sl.

*Exemplul 3: sinteza compusului C3:  $K[Cu(HFSA-T_1)Cl] \cdot 2H_2O$* 

Ligandul precursor S-metilzotiosemicarbazona acidului 3-formilsalicilic– hemihidrat ( $H_3FSA-T_1 \cdot 0,5H_2O$ ) a fost obținut conform procedurii descris (Zhovmir F.K., Gerbelev N.V. Template synthesis and properties of coordination compounds of nickel(II) with binucleating ligands based on thiosemicarbazide and 3-formylsalicylic acid. Zhurn. Neorg. Khimii (J. Inorg.Chem. USSR), 1984, 29, No. 9, pp. 2304-2308).

Spectrul IR(disc KBr,  $cm^{-1}$ ): 3541s, 3480s, 3241m, 2888m, 2681m, 1653p ( $\nu_{as}COOH$ ), 1628p, 1615p, 1598p, 1553m, 1475p asc, 1432fp asc, 1393fp asc, 1353m, 1289fp, 1188m, 1141 asc, 1066m, 956s, 940s, 842p asc, 811p, 762m asc, 737s, 664s asc.

Complexul de cupru C3 s-a obținut conform următorului procedeu:

Soluția de  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,87 g, 5 mmol) în etanol (30 mL) se adaugă cu picătura la agitare magnetică la o soluție de etanol-apă (20:8, 28 mL), la temperatura camerei, care conține  $H_3FSA-T_1 \cdot 0,5H_2O$  (1,31 g, ~10,1 mmol) și KOH (1,12 g, ~20 mmol). După finalizarea adăugării se menține aproximativ o oră agitarea suspensiei cristaline formate de culoare verde-kaki. Se filtrează precipitatul cristalin (microace) verde-kaki, se spală cu etanol, apoi cu eter dietilic și se usucă la aer. După uscare se obține 1,10g (54%) de praf cristalin verde-baltă cu nuanță surie.

Produsul este solubil în apă, DMSO sau DMF, insolubil în etanol, acetoneitril.

Pentru  $C_{10}H_{13}ClCuKN_3O_5S$  găsit, %: Cu – 15,35; C – 29,59; H – 3,06; N – 9,24, 9,55;

calculat, %: Cu – 14,94; C – 28,23; H – 3,08; N – 9,87.

Spectrul IR(disc KBr,  $cm^{-1}$ ): 1604m, 1590m, 1540p, 1487fp, 1418p, 1357p, 1283m, 1133m, 916m asc, 870m asc, 754m asc, 673m.

*Exemplul 4: evaluarea activității antibacteriene a compușilor*

Tulpinile de microorganisme selectate pentru testarea microbiologică au fost furnizate de Colecția Națională de Microorganisme Patogene. Au fost utilizate următoarele tulpini patogene Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778. În calitate de tulpini patogene Gram-negative au fost utilizate *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-747.

Evaluarea activității antibacteriene s-a efectuat *in vitro* prin metoda diluțiilor succesive duble, conform protocolului standard, care constă în aceea că la etapa inițială se iau șiruri de 10 eprubete în care se introduc câte 1 mL de bulion peptonat de carne de 2%, pH=7,0. Ulterior se picură 1 mL de preparat în prima eprubetă (din șirul de 10 eprubete). Se pipetează amestecul obținut, după care 1 mL din acesta se transferă în eprubeta următoare, astfel că procedura se repetă până la eprubeta nr.10 a șirului. În așa mod, concentrația preparatului inițial se micșorează de 2 ori în fiecare eprubetă următoare. În același timp, se prepară culturi de 24 ore de bacterii-test. Se prepară inițial suspensii de culturi bacteriene cu densitățile optice (D.O.) de 2,0 în conformitate cu indicele McFarland. Ulterior, se transferă 1 mL de suspensie bacteriană obținută într-o eprubetă ce conține 9 mL de apă distilată sterilă. Se amestecă conținutul obținut, după care se transferă 1 mL în eprubeta cu nr.2 din șirul de 5 eprubete ce conțin câte 9 mL de apă distilată sterilă. Din eprubeta cu nr.5 a șirului se ia câte 0,1 mL de suspensie bacteriană, ceea ce reprezintă doza de însămânțare, și se adaugă în fiecare eprubetă care conține preparatele titrate. Ulterior, eprubetele cu preparatele titrate în care s-au introdus dozele de însămânțare ale bacteriilor se plasează în termostat la temperatura de 35°C timp de 24 ore. A 2-a zi se analizează preliminar rezultatele obținute. Ultima eprubetă din șir în care nu se atestă o creștere vizibilă a bacteriilor se consideră a fi concentrația minimă inhibitorie (CMI) a preparatului. Pentru aprecierea concentrației minime bactericide (CMB), conținutul eprubetelor cu CMI și a eprubetelor cu concentrații mai înalte ale preparatelor se însămânțează pe agarul peptonat solid din cutiile Petri cu ajutorul ansei bacteriologice. Cutiile însămânțate se plasează în termostat la temperatura de 35°C pentru 24 ore. Concentrația preparatelor care nu permit creșterea nici a unei colonii bacteriene se consideră a fi concentrația minimă bactericidă a compusului.

Pentru evaluare s-au pregătit soluții proaspete de 0,5% ale compușilor sintetizați C1, C2 și C3 în apă distilată.

Rezultatele testării activității antibacteriene exprimate în valorile concentrațiilor minime inhibitorii (CMI) și concentrațiilor minime bactericide (CMB) în  $\mu g/mL$  pentru dimerul de cupru revendicat C1 și compușii de referință sintetizați (C2, C3) sunt prezentate în tabelul de mai jos. Totodată pentru comparație în tabel au fost incluse datele din Stadiul tehnicii privind activitatea antibacteriană a analogului proxim structural C4 - compusul  $[Cu(L)(H_2O)_2]Cl$ , (notat ca (1) în [14]), unde HL reprezintă 4-alil-S-metilzotiosemicarbazona aldehidei salicilice.

Tabel

Activitatea antibacteriană a compușilor testați (concentrațiile minime sunt date în  $\mu g/mL$ )

Tulpina	C1		C2		C3		C4 ([14])	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	2	125	250	31	63	120	120
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,5	1	250	500	31	63	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,5	1	125	250	31	63	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	250	500	-	-	-	-	120	120
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-747	250	500	-	-	-	-	-	-

Din datele prezentate în tabel rezultă că C1 posedă o activitate antibacteriană mai mare de peste 60...100 de ori, comparativ cu alți complecși hidrosolubili ai cuprului(II) cu S-metilizotiosemicarbazone hidroxiaromatice (C2, C3) sau cu C4 din analogul proxim. Totodată efectul antibacterian al C1 este unul selectiv – efectul este unul pronunțat doar pentru bacteriile Gram-pozitive.

Compusul C1, fiind solubil în dimetilsulfoxid (DMSO), poate fi utilizat în cazuri speciale și sub formă de soluții în DMSO pentru diluția ulterioară cu apă, totodată în soluțiile apoase foarte diluate orice interferență a DMSO va fi neglijabilă.

În concluzie, compusul dimer de cupru cu formula  $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{DF-T}_1)\text{-}\mu\text{-Cl}]\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  (C1) poate fi aplicat în farmaceutică sub formă de soluții apoase în concentrații foarte mici, de ordinul miimelor de procent (0,001% = 10 $\mu\text{g/mL}$ ) și mai jos, pentru combaterea bacteriozelor provocate de bacteriile patogene Gram-pozitive.