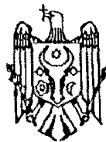




MD 4696 B1 2020.05.31

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4696** (13) **B1**  
(51) Int.Cl: *A61K 31/175* (2006.01)  
*A61K 31/155* (2006.01)  
*A61K 31/30* (2006.01)  
*A61P 31/10* (2006.01)  
*C07F 1/08* (2006.01)  
*C07C 337/08* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

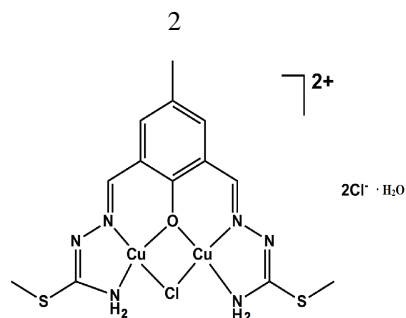
<b>In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului</b>	
(21) Nr. depozit: a 2019 0027 (22) Data depozit: 2019.04.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.05.31, BOPI nr. 5/2020
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE, MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: JOVMIR Tudor, MD; BURDUNIUC Olga, MD; POPA Tatiana, MD; DRUȚĂ Vadim, MD; GULEA Aurelian, MD; LOZAN Vasile, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE, MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

## (54) Compus hidrosolubil 2,6-bis(S-metilzotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru-hidrat pentru utilizare în calitate de remediu antimicrobic

## (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la utilizarea unui compus coordinativ binuclear de cupru în bază de izotiosemicarbazone hidroxiaromatice în calitate de remediu antimicrobic și poate fi aplicată în medicină.

Compusul binuclear de cupru(II) hidrosolubil cu formula  $[Cu_2(\mu-H_2DF-T_1)-\mu-Cl]Cl_2 \cdot H_2O$ , unde  $H_3DF-T_1$  reprezintă bis(S-metilzotiosemicarbazona) 2,6-diformil-4-metilfenolului:



posedă o activitate antimicrobică până la concentrații minime de 2...8 μg/mL.

Compusul binuclear de cupru sus-menționat poate fi aplicat sub formă de soluții apoase diluate pentru combaterea diferitor micoze.

Revendicări: 1

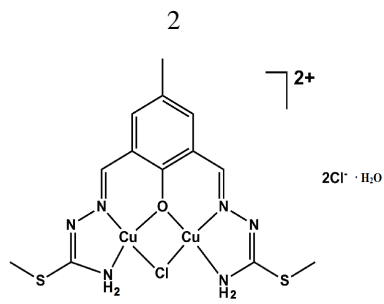
MD 4696 B1 2020.05.31

**(54) Water-soluble compound 2,6-bis(S-methylisothiosemicarbazido methylidene)-4-methylphenolato-trichloro-dicopper-hydrate for use as an antifungal agent**

**(57) Abstract:**

The invention relates to the use of a binuclear coordination compound of copper based on hydroxyaromatic isothiosemicarbazones as an antifungal agent and can be used in medicine.

A binuclear water-soluble copper(II) compound of the formula  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-H}_2\text{DF-T}_1)\text{-}\mu\text{-Cl}]\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , where  $\text{H}_3\text{DF-T}_1$  is bis(S-methylisothiosemicarbazone) 2,6-diformyl-4-methylphenol:



possesses antifungal activity to a minimum concentration of 2...8  $\mu\text{g/ml}$ .

The aforesaid binuclear copper compound can be used in the form of diluted aqueous solutions to combat various mycoses.

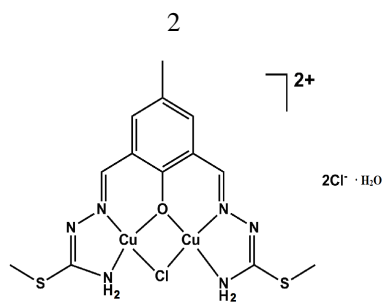
Claims: 1

**(54) Водорастворимое соединение 2,6-бис(S-метилизотиосемикарбазидометилиден)-4-метилфенолято-трихлор-димедь-гидрат для использования в качестве противогрибкового средства**

**(57) Реферат:**

Изобретение относится к использованию биядерного координационного соединения меди на основе гидроксисаароматических изотиосемикарбазонов в качестве противогрибкового средства и может найти применение в медицине.

Биядерное водорастворимое соединение меди(II) формулы  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-H}_2\text{DF-T}_1)\text{-}\mu\text{-Cl}]\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , где  $\text{H}_3\text{DF-T}_1$  означает бис(S-метилизотиосемикарбазон) 2,6-диформил-4-метилфенола:



обладает противогрибковой активностью до минимальных концентраций 2...8  $\mu\text{кг/мл}$ .

Вышеуказанное биядерное соединение меди может быть использовано в виде разбавленных водных растворов для борьбы с разными микозами.

П. формулы: 1

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

5 Invenția se referă la utilizarea unui compus coordinativ binuclear de cupru în bază de izotiosemicarbazone hidroxiaromate în calitate de remediu antimicotic și poate fi aplicată în medicină.

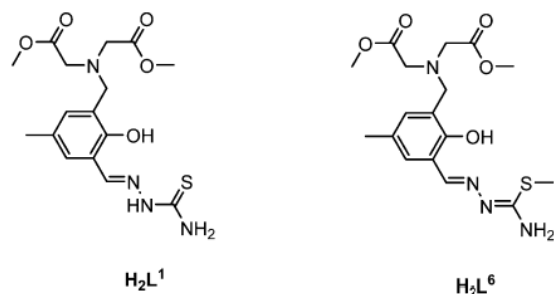
10 Rezistența tot mai sporită a fungilor față de remediile antimicotice (antifungice) existente face actuală elaborarea unor noi tipuri de remedii antimicotice mai eficiente. Printre caracteristicile dorite, pe care trebuie să le posedă aceste remedii se numără, pe lângă activitatea înaltă exprimată în concentrații minime inhibitorii (CMI) sau fungicide (CMF) cât mai joase, și o solubilitate a remediilor în apă (hidrosolubilitate). Ultima caracteristică este condiționată de faptul că apa reprezintă mediul biologic natural, solventul *in vivo* universal, din componența organismelor vii. Totodată reieșind din considerentele practice de pregătire și aplicare a remediilor antimicrobiene, este foarte de dorit de a elabora ingrediente activi solubili hidrosolubili. Aceasta ar permite de a spori eficacitatea remediilor antimicrobiene utilizate sub formă de soluții apoase, evitând folosirea solvenților organici, a diferitor adjuvanți de solubilizare sau umectare, cu toate consecințele pozitive pentru toxicitate, costuri economice etc.

20 O clasă promițătoare de remedii antimicrobiene, inclusiv antifungice, reprezintă derivații tiosemicarbazidei, în special produșii condensării cu aldehide sau cetone - tiosemicarbazonele. Este cunoscut că tiosemicarbazonele și compușii coordinativi respectivi cu unele metale de tranziție, în special cupru, pot manifesta un spectru larg de acivitate biologică [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.

25 Ca o ilustrare a dependenței activității biologice de structura ligandului sau a compusului coordinativ de metal pot servi complecșii binucleari de cupru(II) cu tiosemicarbazonele N<sub>4</sub>-substituie a hidroxiacetofenonei. Dimerii de cupru nu posedă o activitate de inhibare față de fungul *Aspergillus niger*, dar în schimb sunt activi față de *Paecilomyces variotii* [4].

30 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 fungi sau bacterii [5].

35 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<sub>4</sub>. Din datele din Stadiul tehnicii reiese că alchilarea sulfurii 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-izotiosemicarbazon-guanilhidrazinei s-a stabilit că în rezultatul alchilării sulfurii 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 hidroxiaromate nealchilate și S-metilizotiosemicarbazonele respective reiese că alchilarea sulfurii 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<sub>2</sub>L<sup>6</sup> este mai citotoxic decât compusul nealchilat H<sub>2</sub>L<sup>1</sup>:



pe de altă parte compusul dimer  $[\text{Cu}_2\text{L}^6 \text{Cl}_3]$  posedă o activitate mai redusă față de liniile de celule canceroase decât  $[\text{Cu}_2\text{HL}^1\text{Cl}_3]$  [9].

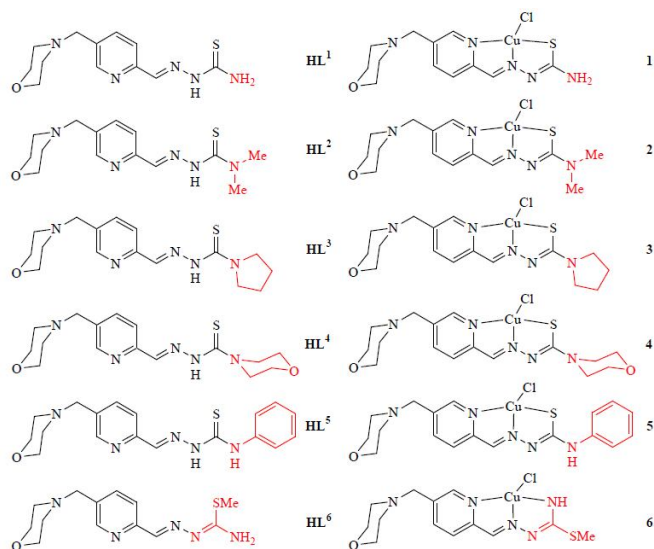
5 În unele cazuri coordonarea izotiosemicarbazonei cu metale poate să mărească activitatea biologică a S-metilizotiosemicarbazonei. De exemplu, S-  
 10 alchilizotiosemicarbazonele aldehidei 5-metilsalicilice posedă o activitate antibacteriană redusă față de tulpinile *S. aureus*, *B. cereus* ș.a., concentrația minimă inhibitoare fiind la nivelul de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . În schimb, compușii binucleari ai fierului trivalent ( $\mu$ -oxodimeri) cu  $\text{N}_1, \text{N}_4$ -bis(saliciliden)-S-metil-izotiosemicarbazida sunt activi față de tulpinile sus-menționate la  
 15 concentrații de 10...50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , totodată compușii mononucleari sunt considerabil mai puțin activi, concentrația minimă inhibitoare situându-se în intervalul 100...500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [10]. Pe de altă parte, este cunoscut că unele tiosemicarbazone necoordinate, manifestă o activitate antimicrobiană semnificativ mai mare decât respectivii compuși coordinați ai cuprului [3, p.61], [4].

20 Dezavantajul acestor compuși biologic activi constă în faptul că foarte mulți din ei sunt insolubili sau foarte puțin solubili în apă. Majoritatea absolută a tiosemicarbazonei și complexii lor sunt insolubili în apă. O metodă de a conferi hidrosolubilitate constă în introducerea în ligandul organic a unor grupe hidrofiele ca grupa sulfonică ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) sau carboxilică ( $-\text{COOH}$ ). Aceste grupe ușor se ionizează în mediul bazic cu formarea sărurilor  
 25 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 alchidelor aromatice sulfonate [11]. Solubilitatea lor în apă a permis  
 30 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 canceroase, în nucleul  
 35 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 ( $\text{HL}^1$ - $\text{HL}^6$ ) și complecși 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 derivații S-metilzotiosemicarbazonei hidroxiaromate, structural destul de apropiați de compusul utilizat de solicitanți în revendicări, anume pentru N<sub>4</sub>-alil-S-metilzotiosemicarbazona aldehidei 2-hidroxi-naftoice [13] sau pentru compusul coordinativ al cuprului cu N<sub>4</sub>-alil-S-metilzotiosemicarbazona 3,5-dibromosalicilaldehidei [14], s-a depistat o activitate antibacteriană și antimicrobică. Dezavantajul acestor compuși constă în faptul că nu sunt solubili în apă. Totodată nivelul activității antimicrobice (față de fungul *Candida albicans*) nu este destul de înalt - concentrațiile minime inhibitorii sau fungicide pentru primul compus ating valori de respectiv 700 μg/mL [13], iar pentru compusul coordinativ valori de 63 și 250 μg/mL [14].

Recent au fost descriși compușii coordinativi ai cuprului(II) cu 4-alil-S-metilzotiosemicarbazona aldehidei salicilice, care manifestă proprietăți antimicrobiene pronunțate [15]. Acești compuși pot fi considerați ca cei mai apropiați din punct de vedere structural și după activitatea antimicrobică 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 antimicrobică nu este destul de înaltă.

Problema soluționată de invenție constă în extinderea gamei de remedii antimicrobice în bază de compuși coordinativi (combinații complexe) ai cuprului(II) cu izotiosemicarbazone aromatice și care totodată să fie solubili în apă (hidrosolubili).

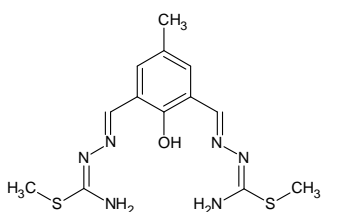
Problema s-a soluționat printr-o analiză și o selecție neevidentă dintre compușii coordinativi binucleari (dimeri) ai cuprului cu derivați de izotiosemicarbazone aromatice binucleabile, urmată de sinteza și investigații microbiologice corespunzătoare. Totodată pentru referință au fost sintetizați doi compuși coordinativi hidrosolubili ai cuprului cu izotiosemicarbazone aromatice apropiate structural, dar pentru care solicitanții au depistat că ultimii nu posedă o activitate antimicrobiană înaltă. De aici rezultă că pentru o activitate antimicrobiană înaltă, condiția de hidrosolubilitate a compușilor coordinativi este una necesară, dar nu și suficientă.

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-metilzotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru-hidrat, s-a depistat că în

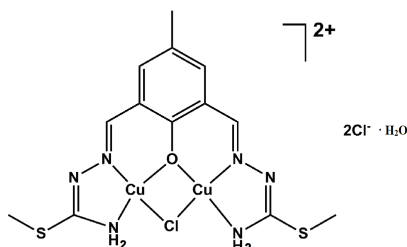
soluții apoase el posedă o activitate pronunțată contra diferitor fungi. În rezultat compusul dat se propune pentru utilizare în calitate de remediu antimicotic.

Rezultatul atins de invenție constă în faptul că în soluții apoase compusul coordinativ binuclear 2,6-bis(S-metilizotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru-hidrat posedă o activitate antimicotică la concentrații minime inhibitorii sau fungicide în intervalul de valori de 2...8 μg/mL.

Ligandul (H<sub>3</sub>DF-T<sub>1</sub>) din componența compusului coordinativ, produsul condensării S-metilizotiosemicarbazidei cu o dialdehidă hidroxiaromatică, este unul binucleabil, adică poate coordona simultan doi ioni de cupru cu utilizarea punții de fenolat și a patru atomi donori de azot N<sub>1</sub> și N<sub>4</sub> ale ambelor „brațe” izotiosemicarbazidice, deoarece, ca urmare a alchilării atomilor donori de sulf, ultimii nu se mai pot coordina la ionii de cupru(II). În medii neutre ligandul se coordonează în formă monodeprotonizată în urma disocierii grupei fenolice, iar în mediile bazice – în formă trideprotonizată, datorită disocierii suplimentare a câte un proton de la grupele amino terminale din brațele izotiosemicarbazidice. Structura H<sub>3</sub>DF-T<sub>1</sub> este redată mai jos:



Compusul coordinativ se obține la interacțiunea H<sub>3</sub>DF-T<sub>1</sub> cu clorura de cupru(II) în mediu alcoolic și reprezintă un dimer de cupru coordonat cu ligandul monodeprotonizat, care 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 proprietățile chimice și magnetochimice dimerul de cupru foarte probabil că are următoarea structură [Cu<sub>2</sub>(μ-H<sub>2</sub>DF-T<sub>1</sub>)-μ-Cl]Cl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, unde H<sub>2</sub>DF-T<sub>1</sub> reprezintă ligandul inițial monodeprotonizat la atomul punte de oxigen fenolic, iar notarea μ-Cl denotă faptul că un ion de clor are rolul de a doua punte între ionii de Cu(II):



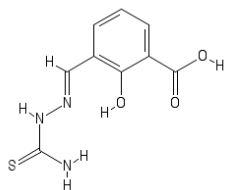
Nu este exclus că ceilalți doi anioni de clor să coordoneze apical la câte un ion de cupru, iar la dizolvarea dimerului în apă ei să disocieze ușor din sfera internă a compusului coordinativ cu formarea electroliților de tipul 1:2, o condiție ce ar contribui la hidrosolubilitatea dimerului de cupru. Conform regulilor de nomenclatură chimică denumirea desfășurată a compusului, în conformitate cu formula structurală de mai sus, poate fi {μ-cloro-[μ-2,6-bis(S-metilizotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-N<sub>1</sub>,N<sub>4</sub>,N<sub>7</sub>,N<sub>8</sub>,μ-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, însă activitatea lui biologică nu a fost cercetată (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).

[Cu<sub>2</sub>(μ-H<sub>2</sub>DF-T<sub>1</sub>)-μ-Cl]Cl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O este solubil în apă și formează soluții de culoare verde-intensă 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.

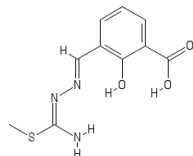
Rezultatul neevident al invenției este evidențiat de faptul că pentru comparație au fost sintetizați compuși coordinativi ai cuprului(II) cu liganzi structural foarte apropiați cu grupa

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 ( $H_3FSA-T$ ):



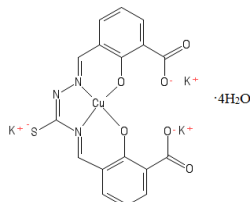
5

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



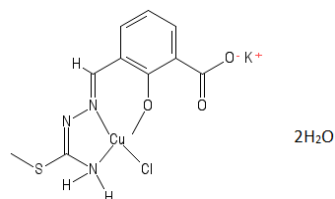
În rezultatul condensării template în mediu bazic dintre  $H_3FSA-T$  și acidul 3-formilsalicilic, a fost sintetizată sare hidrosolubilă de potasiu a compusului mononuclear de cupru (în continuare C2). Sinteza s-a efectuat în esență analogic cu sinteza compusului de nichel(II), similar după structură 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 structurală:

15



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 carboxilică este ionizată, fapt ce conferă o hidrosolubilitate compusului C3:

20



Ambii compuși C2 și C3, deși sunt solubili în apă, în urma testărilor microbiologice au arătat că posedă o activitate antimicrobică (antifungică) cu mult mai redusă față de C1, iar în unele cazuri chiar o lipsă a activității biologice.

25

În calitate de microorganisme-test pentru evaluarea activității antimicrobice au fost selectate tulpinile *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus neoformans* CECT 1043. Evaluarea activității antimicrobice s-a efectuat *in vitro* prin metoda diluțiilor succesive duble, conform protocolului standard.

30

După cum reiese din rezultatele testării activității antimicrobice soluțiile apoase, puternic diluate, a dimerului de cupru selectat posedă o activitate antimicrobică înaltă. Concentrația minimă fungicidă fiind în jur de 4...8  $\mu\text{g/mL}$ . Totodată, pentru comparație, compusul coordinativ al cuprului(II) din analogul proxim clorura de [diaqua- $N_4$ -alil-S-metilzotiosemicarbazidosalicilidenato(-)-cupru(II)] manifestă o activitate antifungică semnificativ mai mică de 7...8 ori față de *Candida albicans* ATCC 10231 [15].

Din Stadiul tehnicii se cunoaște că S-alkilarea tiosemicarbazidei poate diminua activitatea antimicrobiană a izotiosemicarbazonei [6, 7, 12]. De aceea activitatea fungicidă a C1, care face parte din grupa de compuși coordinați cu izotiosemicarbazone, este una neașteptată.

5 Avantajele invenției constau în următoarele:

- compusul coordinațiv binuclear de cupru cu bis(S-metilzotiosemicarbazona) 2,6-diformil-4-metilfenolului este solubil în apă – mediul biologic natural;

- C1 posedă o activitate antimicrobică la concentrații minime fungicide de 2...8 μg/mL;

10 - sinteza compusului coordinațiv 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 micoze.

### 15 Exemple de realizare a invenției

#### **Exemplul 1: sinteza compusului C1:** $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{DF-T}_1)\text{-}\mu\text{-Cl}]\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$

Ligandul precursor bis(S-metilzotiosemicarbazona) de 2,6-diformil-4-metilfenol ( $\text{H}_3\text{DF-T}_1$ ) și compusul de cupru C1 testat au fost descriși anterior (Gerbelev N.V., Revenko M.D., Zhovmir F.K., Kuyavskaya B.Ya. Binuclear compounds of copper(II) with ligands based on chalcogenosemicarbazides 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 hidroiodura de S-metilzotiosemicarbazidă prin alchilarea tiosemicarbazidei cu iodmetan în mediu de etanol. În continuare hidroiodura de izotiosemicarbazidă a fost condensată în mediu etanol-apă, în prezență de carbonat de sodiu, cu 2,6-diformil-4-metilfenol.

25 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,  $\text{cm}^{-1}$ ): 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 coordinațiv de cupru C1 s-a obținut conform unui procedeu modificat:

35 La suspensia de  $\text{H}_3\text{DF-T}_1$ , (1,70 g, 5 mmoli) în metanol (100 mL) se adaugă la temperatura camerei  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (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.

40 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 nucărie 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,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3503s, 3419s, asc., 3300s, 2797m, 1555fp, asc, 1315p, asc, 1144p, asc, 904m, asc, 713m.

#### 45 **Exemplul 2: sinteza compusului C2:** $\text{K}_3[\text{Cu}(\text{fsa})_2\text{T}]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Ligandul precursor tiosemicarbazona acidului 3-formilsalicilic ( $\text{H}_3\text{FSA-T}$ ), 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).

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

55 Complexul hidrosolubil  $\text{K}_3[\text{Cu}(\text{fsa})_2\text{T}]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a fost sintetizat prin condensarea templată pe matrice de Cu(II) a  $\text{H}_3\text{FSA-T}$  cu acidul 3-formilsalicilic ( $\text{H}_2\text{FSA}$ ) în mediu bazic puternic. Soluția de  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (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  $\text{H}_3\text{FSA-T}$  (2,50 g, ~10,1 mmol),  $\text{H}_2\text{FSA}$  (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%).

5 Produsul este solubil în apă, DMSO și DMF, insolubil în etanol, acetonitril. 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  $C_{17}H_{16}CuK_3N_3O_{10}S$

10 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, 870s, 830s, 798s, 745m. f. asc, 671s.

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

15 Ligandul precursor S-metilizotiosemicarbazona acidului 3-formilsalicilic– hemihidrat ( $H_3FSA-T_1 \cdot 0,5H_2O$ ) a fost obținut conform procedurii descrise (Zhovmir F.K., Gerbeleu 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).

20 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:

25 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 agitare 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.

30 Produsul este solubil în apă, DMSO sau DMF, insolubil în etanol, acetonitril. Soluțiile apoase nu sunt stabile - peste câteva zile din ele cade un precipitat sur greu solubil în DMF sau DMSO, probabil că are loc o reacție de polimerizare coordinativă.

Găsit, %: Cu – 15,35; C – 29,59; H – 3,06; N – 9,24, 9,55.

Pentru  $C_{10}H_{13}ClCuKN_3O_5S$  calculat, %: Cu – 14,94; C – 28,23; H – 3,08; N – 9,87.

35 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**

40 Tulpinile de microorganisme selectate pentru testarea microbiologică au fost furnizate de Colecția Națională de Microorganisme Patogene. Au fost utilizate următoarele tulpini de fungi: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus neoformans* CECT 1043.

50 Evaluarea activității antifungice 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 mediu nutritiv lichid Sabouraud (pH 6,8). 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 fung-test. Se prepară inițial suspensii de culturi de fungi cu densitățile optice (D.O.) de 2,0 în conformitate cu indicele McFarland. Ulterior, se transferă 1 mL de suspensie de fung 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 de fung, 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 fungilor, 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 fungului se consideră a fi concentrația minimă inhibitorie (CMI) a preparatului. Pentru aprecierea concentrației minime fungicide (CMF), 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 de fung se consideră a fi concentrația minimă fungicidă a compusului.

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

- 10 Rezultatele testării activității antimicotice (antifungice) exprimate în valorile concentrațiilor minime inhibitorii (CMI) și concentrațiilor minime fungicide (CMF) în  $\mu\text{g/mL}$  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 antifungică a analogului proxim structural C4 - compusul  $[\text{Cu}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ , (notat ca (1) în [15]), unde HL reprezintă  $\text{N}_4$ -alil-S-metilzotiosemicarbazona aldehidei salicilice.

Tabel

- 15 Activitatea antimicotică a compușilor testați (concentrațiile minime sunt date în  $\mu\text{g/mL}$ )

Tulpina	C1		C2		C3		C4 ([15])	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	4	8	-	-	31	63	30	60
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	4	8	-	-	125	250	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1043	2	4	63	125	31	63	-	-

- 20 Din datele prezentate în tabel rezultă că C1 posedă o activitate antimicotică superioară, fiind aproximativ de 10 ori mai mare, comparativ cu alți complecși hidrosolubili ai cuprului(II) cu S-metilzotiosemicarbazone hidroxiaromatice (C2, C3) sau comparativ cu C4 din analogul proxim.

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.

- 25 În concluzie, compusul dimer de cupru cu formula  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-H}_2\text{DF-T}_1)\text{-}\mu\text{-Cl}]\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  (C1) poate fi aplicat în farmaceutică sub formă de soluții apoase în concentrații de ordinul miimelor de procent (0,001% =  $10\mu\text{g/mL}$ ), pentru combaterea diferitor micoze, de exemplu, a candidozelor.

#### (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Lobana T.S., Sharma R., Bawa G., Khanna S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals - An overview. *Coordination Chemistry Revs*, 253 (7), 2009, p. 977-1055
2. Pelosi G. Thiosemicarbazone Metal Complexes: From Structure to Activity. *The Open Crystallography Journal*, 2010, vol. 3, p. 16-28
3. West D.X., Liberta A.E., Padhye S.B., Chikate R.C., Sonawane P.B., Kumbhar A.S., Yerande R.G. Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. *Coordination Chemistry Revs*, vol. 123, 1993, p. 49-71
4. West D.X., Yang Y., Klein T.L., Goldberg K.I., Liberta A.E., Valdes-Martinez J., Toscano R.A. Binuclear copper(II) complexes of 2-hydroxyacetophenone  $^4\text{N}$ -substituted thiosemicarbazones. *Polyhedron*, 1995, vol. 14 (12), p. 1681-1693
5. Naik A.D., Revankar V.K. Exchange coupled dicopper(II) complexes of thiosemicarbazones. *Indian J. Chem.*, vol. 43A, 2004, p. 1447-1453
6. Schulze W., Gutsche W., Wohlrabe K., Fleck W., Tresselt D. Zur Synthese und biologischen Wirksamkeit von Analogon des 1,4-Benzochinon-guanylhydrazon-thiosemicarbazons. *Farmazie*, 1985, 40(8), p. 540-541
7. Kitaev Iu. P., Buzikin B.I. *Hydrazones (in Russian)*. Moscow, Nauka, 1974, p. 383
8. Gulea A., Pourier D., Roy J., Stavila V., Bulimestru I., Țapcov V., Bîrcă M., Popovschi L. In

- vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: Chemical synthesis and structure-activity relationships. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2008, 23(6), p. 806-818
9. Zaltariov M.F., Hammerstad M., Arabshahi H.L., Jovanovic K., Richter K.W., Cazacu M., Shova S., Balan M., Andersen N.H., Radulovic S., Reynisson J., Andersson K.K. and Arion V.B. New Iminodiacetate-Thiosemicarbazone Hybrids and Their Copper(II) Complexes Are Potential Ribonucleotide Reductase R2 Inhibitors with High Antiproliferative Activity. *Inorganic Chemistry*, 2017, 56 (6), p. 3532-3549
10. Shleahov A.N., Malinovskii T.I., Shova S.G., Burdenko T.A., Simonova L.L. Antimicrobial activity of Fe<sup>3+</sup> complexes with S-alkylisothiosemicarbazones of substituted salicylic aldehydes (In Russian). *Khimiko-Farmatzevticheskii Zhurnal (Soviet Chemical Pharmaceutical Journal)*, 1984, vol. 18 (12), p.1464-1466
11. Hosseini-Yazdi S., Mirzaahmadi A., Khandar A.A., Eigner V., Dusek M., Lotfipour F., Mahdavi M., Soltani S., Dehghan G. Synthesis, characterization and in vitro biological activities of new water-soluble copper(II), zinc(II), and nickel(II) complexes with sulfonato-substituted Schiff base ligand. *Inorganica Chimica Acta*, 458, 2017, p. 171-180
12. Ohui K., Afanasenko E., Bacher F., Ting R., Zafar A., BlancoCabra N., Torrents E., Domotor O., May N.V., Darvasiova D., Enyedy E.A., Popovic-Bijelic A.D., Reynisson J., Rapta P., Babak M., Pastorin G. and Arion V.B. New Water-Soluble Copper(II) Complexes with Morpholine-Thiosemicarbazone Hybrids: Insights into the Anticancer and Antibacterial Mode of Action. *Journal of Medicinal Chemistry*, 03 decembrie 2018, p. 512-530
13. MD 4402 B1 2016.02.29
14. Usataia I., Graur V., Tsapcov V., Vasilca M., Bălan G., Burduniuc O., Gulea A. Antibacterial and antifungal activities of iron(III), cobalt(III), nickel(II) and copper(II) coordination compounds with 3,5-dibromosalicylaldehyde 4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone. *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (4<sup>th</sup> Edition)*. Chişinău, Moldova, 11-12 octombrie, 2018, pag. 57-58
15. Pahontu E., Usataia I., Graur V., Chumakov Y., Petrenko P., Gudumac V. and Gulea A. Synthesis, characterization, crystal structure of novel Cu(II), Co(III), Fe(III) and Cr(III) complexes with 2-hydroxybenzaldehyde-4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone: Antimicrobial, antioxidant and in vitro antiproliferative activity. *Applied Organometallic Chemistry* (published on-line by John Wiley & Sons, Ltd), 2018; e4544

**(57) Revendicări:**

Compus hidrosolubil 2,6-bis(S-metilizotiosemicarbazidometiliden)-4-metilfenolato-tricloro-dicupru-hidrat pentru utilizare în calitate de remediu antimicotic.