

Invenția se referă la domeniul chimiei și medicinei, și anume la sinteza unui compus nou cu schelet hibrid terpenic și 1,3,4-tiadiazolic, care poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat antifungic.

Infecțiile provocate de fungi și bacterii sunt foarte răspândite și aduc prejudicii grave sănătății. Majoritatea preparatelor antifungice și antibacteriene existente nu asigură un efect curativ stabil și complet. Tratamentele existente, ca regulă, nu conduc la dispariția definitivă a oricărui semn de infecție, ci doar ameliorează temporar starea generală a pacienților, aceasta recidivând frecvent cu manifestări clinice mai pronunțate. Deseori, în rezultatul mutațiilor la fungi și bacterii apare rezistența la preparatele folosite pentru tratament, fapt ce stimulează cercetările în vederea obținerii de preparate noi.

Dintre preparatele frecvent utilizate în practica medicală este bine cunoscută Caspofungina, reprezentant al unei clase noi de antifungice numit echinocandine. Acest preparat inhibă sinteza (1→3)- β -D-glucanului și crește permeabilitatea celulelor fungice, fapt ce favorizează scurgerea conținutului citoplasmatic (citoliza) și ca urmare, moartea acestora [1].

Este cunoscută, de asemenea, Kanamicina, un agent antibacterian eficient din grupa aminoglicozidelor, frecvent utilizat pentru tratarea unei mari varietăți de infecții [2].

Preparatele menționate însă au și un șir de dezavantaje, ce constau în:

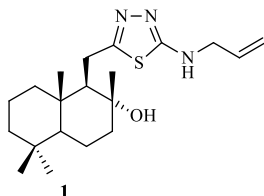
- potențialul curativ moderat;
- provoacă reacții alergice și iritații în locul aplicării;
- provoacă efecte adverse manifestate prin tulburări gastrointestinale, urinare etc.

Din stadiul tehnicii este cunoscut compusul cu schelet hibrid terpenic și tiadiazolic, (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol, care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene la valori MIC = 0,032 mg/mL și 0,094 mg/mL, respectiv [3]. Acesta este obținut în câteva etape din (+)-sclareolidă, un produs de degradare oxidativă a diterpenoidei labdanice naturale (-)-sclareol, izolat industrial din concretul de Salvie tămâioasă (*Salvia sclarea* L.). Procedul de obținere include și etapa de heterociclizare a hidrazidei intermediare ca urmare a interacțiunii cu disulfura de tetrametiltiuram (TMTD), care conduce la formarea inelului tiadiazolic, substituit în poziția 2- prin grupa sulfhidril (-SH).

Dezavantajul principal al procedului de sinteză a acestui compus constă în faptul ca el prezintă dificultăți în cazul aplicării la scară industrială. Reacția de heterociclizare este foarte sensibilă la raportul substrat:reagent (hidrazidă:TMTD) utilizat, iar în cazul nerespectării condițiilor optime din ea rezultă un amestec de produse de reacție, 5-(8 α -hidroxidriman-11-il)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-iona și (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olul dorit, care necesită suplimentar separare cromatografică.

Un alt dezavantaj al acestui procedeu constă în faptul că, disulfura de tetrametiltiuram (TMTD) este un reagent utilizat în cantități mici preponderent în sintezele de laborator. Conform prevederilor europene (EU Regulation (EC) No 1272/2008) acest reagent prezintă probleme de siguranță pentru persoanele implicate în procesul de sinteză și pentru mediu, pericol sporit pentru sănătatea acestora (iritarea pielii, ochilor, toxicitate la inhalare ș.a.) și pericol ecologic în special pentru mediile acvatice, atât el cât și produsele secundare derivate din el pe durata reacției. De asemenea, autorii menționează ca (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olul se caracterizează printr-o solubilitate scăzută în apă, ceea ce prezintă un dezavantaj pentru un preparat farmaceutic.

Din stadiul tehnicii sunt cunoscuți compușii hibridi cu proprietăți biologice din șirul tetranorlabdanic, obținuți din materie primă (+)-sclareolida, și care conțin suplimentar unitatea structurală 2-amino-1,3,4-tiadiazolică, substituită cu radicali alil, fenil sau 4-metil-fenil [4]. Compușii au fost testați *in vitro* atât pe tulpini de fungi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*) cât și pe tulpinile de bacterii Gram-pozitive (*Bacillus sp.*) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*). Autorii au stabilit că doar unul dintre compușii sintetizați, (1R,2R,8aS)-1-((5-(alilamino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidro-naftalen-2-olul **1**, cu formula:

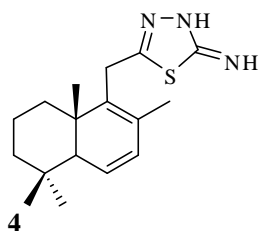


manifestă o activitate antifungică și antibacteriană ridicată în raport cu preparatele medicamentoase de referință caspofungina și kanamicina. Reieșind din proprietățile biologice și structura sa hibridă constituită din unități structurale relativ apropiate, compusul **1** poate fi selectat în calitate de analog proxim.

Dezavantajul compușilor descriși, inclusiv și al analogului proxim, constă în activitatea antifungică mai redusă a acestora în comparație cu compusul revendicat.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în lărgirea gamei de compuși enantiomeric puri, cu activitate antifungică ridicată, obținuți prin semisinteze din (+)-sclareolidă, o materie primă de origine vegetală, ieftină și accesibilă și care conțin nucleul tiadiazolic fără grupare funcțională tiolică în poziția 5-.

Problema se soluționează prin aceea că din materia primă vegetală (+)-sclareolida a fost sintetizat un nou compus hibrid 4 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-imina cu formula:



care manifestă proprietăți antifungice pronunțate. Compusul **4** în raport cu analogul proxim **1** conține în calitate de unități structurale gruparea homodrimandienică în loc de unitatea structurală tetranorlabdanică, hidroxilată în poziția 8, iar în calitate de unitate structurală tiadiazolică - 1,3,4-tiadiazol-2-imina nesubstituită la atomul de azot lateral.

Extinderea cercetărilor științifico-aplicative realizate în Republica Moldova în domeniul elaborării remediilor antifungice și antibacteriene cu activitate biologică ridicată are puncte forte deoarece oferă preparate la prețuri competitive cu cele de import, adică accesibile pentru populație, și are la bază materia primă locală. O valoare adăugată invenției oferă faptul că materia primă locală este renovabilă, accesibilă și poate fi obținută din deșeurile provenite din industria uleiurilor etero-oleaginoase.

Rezultatul invenției constă în obținerea unui compus nou, terpeno-tiadiazolic 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-imina (**4**), care poate fi utilizat pentru tratarea unor afecțiuni de natură fungică.

Rezultatul invenției a fost confirmat de testările biologice a acestuia *in vitro* pe speciile de fungi (*Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*). Totodată compusul revendicat pentru comparație a fost testat și pe tulpinile de bacterii Gram-pozitive (*Bacillus polymyxa*) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*).

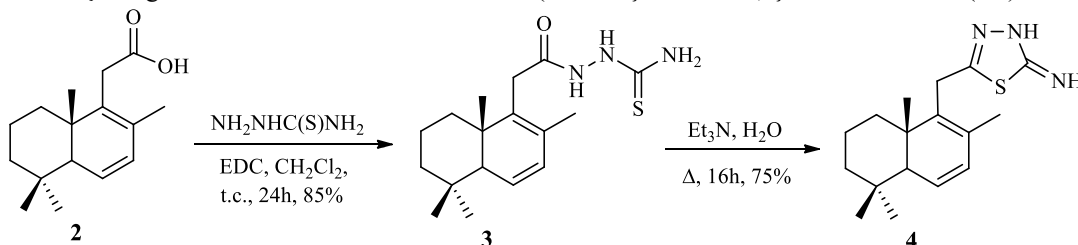
Avantajul compusului revendicat constă în faptul că el posedă o activitate antifungică net superioară în raport cu preparatul cunoscut caspofungina, iar în raport cu analogul proxim **1** - o activitate mai ridicată. Totodată pentru compusul revendicat materia primă este de origine locală și accesibilă.

Este necesar de menționat că activitatea biologică a compusului **4** este relativ selectivă, deoarece activitatea sa antibacteriană este mai inferioară față de analogul proxim **1**, dar mai ridicată comparativ cu preparatul antibacterian cunoscut kanamicina. De asemenea de menționat, că obținerea 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-iminei, dar și rezultatele testărilor biologice ale acestui compus nu au fost descrise anterior în literatura de specialitate.

În calitate de materie primă pentru obținerea compusului revendicat a fost utilizată (+)-sclareolida accesibilă comercial, care în câteva etape a fost transformată în acidul 11-homodrim-6,8-dien-12-oic **2**, cu un randament total de 53%, în conformitate cu metoda descrisă în literatură (Ciocarlan A., Aricu A., Lungu L., Edu C., Barba A., Shova S., Mangalagiu I.I., D'Ambrosio M., Nicolescu A., Deleanu C., Vornicu N. Synthesis of novel tetranorlabdane derivatives with unprecedented carbon skeleton. Synlett, 2017, vol. 28, nr. 5, p. 565-571).

În continuare, interacțiunea acidului **2** cu tiosemicarbazida în prezență de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă (EDC) în clorura de metilen a condus la obținerea compusului hibrid cu fragment homodrimanic și tiosemicarbazidic **3** intermediar. Aciltiosemicarbazida **3** a fost supusă reacției de ciclizare în prezență trietilaminei (Et_3N) în mediu apos, conform metodei descrise anterior (Aryanasab F., Halimehjeni A.Z., Saidi M.R. Dithiocarbamate as an efficient intermediate for the synthesis of 2-amino-1,3,4-thiadiazoles in water. Tetrahedron Letters. 2010, vol. 51, nr. 3, p. 790-792), cu formarea 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-iminei **4** revendicate, cu un randament total de 75% (Schema 1).

Structura compusului revendicat a fost confirmată prin metode de analiză obligatorii, spectroscopie în infraroșu (IR), rezonanță magnetică nucleară monodimensională (^1H , ^{13}C și ^{15}N RMN) și bidimensională (2D).



Schema 1. Sinteza 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-iminei **4**.

În rezultatul testărilor biologice s-a demonstrat că 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-imina manifestă proprietăți antifungice excelente și într-un grad mai mic antibacteriene la valori ale concentrației minime inhibitorie (CMI, $\mu\text{g/mL}$) de 0,125 și 2,5 $\mu\text{g/mL}$, respective, dar care sunt superioare celor caracteristice compușilor de referință caspofungina, kanamicina și compusul **1** (vezi tabelul).

Compusul revendicat **4** este stabil în contact cu aerul, parțial solubil în alcoolii și apă, solubil în dimetilsulfoxid (DMSO), clorura de metilen, acetat de etil și acetonă.

Exemplu de realizare a invenției

Sinteza 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-iminei **4**

Soluția formată din tiosemicarbazida **3** (1 mmol) în Et_3N (0,4 mL) și apă (3 mL) se agită la reflux timp de 16 ore, iar după răcire amestecul de reacție se toarnă în soluție apoasă de KOH (15 mL). După finisarea reacției, în amestec se

adaugă apă (10 mL) și acesta se extrage cu clorură de metilen (3 x 10 mL). Extractul organic combinat se spală cu apă (15 mL) și se usucă pe sulfat de sodiu anhidru. Produsul de reacție obținut după filtrarea extractului și distilarea solventului la presiune redusă, se purifică prin cromatografie pe coloană cu SiO₂, folosind în calitate de eluent un amestec format din MeOH/CH₂Cl₂, luați într-un raport de 0,2:9,8 (v/v). Ca rezultat se obține 5-(homodrim-6,8-dien-

11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3*H*)-imina **4** (randament 75%), compus cristalin p.t. = 210...211°C; $[\alpha]_D^{20} = -5,99^\circ$ (*c*=2,2, CHCl₃). Structura compusului **4** a fost confirmată de datele analizelor spectrale:

Spectroscopie în IR (ν, cm⁻¹): 3083, 2915, 1578, 1498, 1451, 1385, 1208, 1090, 994, 759.

Rezonanță magnetică ¹H RMN (DMSO-*d*₆, δ, ppm, J, Hz): 13.20 și 13.08 (ambele singlete monoprotone, NH), 5.89 (1H, dd, J 9.6, 2.9 Hz, H-7), 5.80 (1H, dd, J 9.6, 2.3 Hz, H-6), 3.36 (1H, d, J 16.2 Hz, H-11), 3.25 (1H, d, J 16.6 Hz, H-11), 1.95 (1H, t, J 2.70 Hz, H-5), 1.69 (3H, s, H-13), 0.89 (3H, s, H-14), 0.91 (3H, s, H-15), 0.74 (3H, s, H-16).

Rezonanță magnetică ¹³C RMN (DMSO-*d*₆, δ, ppm): 166.20 (C=N), 152.17 (C-12), 137.10 (C-9), 129.72 (C-7), 128.37 (C-8), 128.08 (C-6), 52.57 (C-5), 40.85 (C-3), 38.74 (C-10), 34.87 (C-1), 33.08 (C-4), 32.61 (C-14), 23.51 (C-11), 23.21 (C-15), 18.50 (C-13), 18.80 (C-2), 15.38 (C-16).

Rezonanță magnetică ¹⁵N RMN (DMSO-*d*₆, δ, ppm): 277.8, 208.0, 177.2.

Testarea activității biologice a 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3*H*)-iminei **4**

Activitatea biologică a compusului revendicat a fost testată *in vitro* pe 5 specii de fungi (*Aspergillus niger* ATCC 53346, *Fusarium solani* ATCC 20327, *Penicillium chrysogenum* ATCC 20044, *Penicillium frequentans* ATCC 10110 și *Alternaria alternata* ATCC 8741) provenite din culturi pure și 2 specii de bacterii: Gram-pozitive (*Bacillus polymyxa* ATCC 15970) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813). Rezultatele restării activității biologice exprimate în valori CMI (concentrația minimă inhibitorie) sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tabel

Rezultatele testării activității biologice a 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3*H*)-iminei **4**

Compusul	Concentrație minimă inhibitorie (CMI, μg/mL)						
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Compusul revendicat 4	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	2,5	2,5
Caspofungina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
Kanamicina	-	-	-	-	-	4,0	4,0
Analogul proxim 1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5

Microorganismele au fost furnizate de American Type Culture Collection (ATCC), USA.

Se pregătește soluția compusului revendicat în DMSO cu o concentrație de 0,5%. Pentru aceste determinări se utilizează plăci Petri cu mediul de cultură de tip agar-Sabouraud cu 4% dextroză (SDA) pentru fungi și mediu agar nutritiv-standard I pentru bacterii de la firma Merck (Germania).

Conform procedurilor standard de cultivare (SR-EN 1275:2006 și NCCLS guidelines) [National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Antimicrobial Susceptibility Standards (ATS) 2003, for M7 (CMI) and M100] se aplică metoda diluțiilor succesive pentru pregătirea suspensiei de microorganisme [Carrillo R., Martin V. S., López M., Martin T. Tetrahedron, 2005, vol. 61, nr. 34, p. 8177-8191].

Caspofungina (strip test) se utilizează ca un compus standard de referință pentru activitatea antifungică și kanamicina (strip test) se utilizează pentru activitatea antibacteriană. Compușii standard sunt furnizați de firma Liofilchem (Italia).

Încărcătura finală a inoculului-stoc astfel pregătit este de 1x10⁻⁴ μg/mL. Plăcile inoculate se incubează la temperatura de 30°C timp de 7 zile. Primele observații se fac după 48 de ore, iar analiza finală după 7 zile, stabilindu-se concentrația minimă inhibitorie (CMI) și densitatea viabilă a microorganismelor prezente. Valorile CMI se citesc direct pe banda standard în punctul în care marginea elipsei de inhibiție intersectează banda pentru fiecare tip de microorganisme.

Rezultatul invenției este condiționat de sinteza unui compus hibrid nou 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3*H*)-imină **4**, ce posedă proprietăți antifungice pronunțate comparativ cu compușii cunoscuți din stadiul tehnicii. Totodată compusul **4** posedă într-un grad mai mic și proprietăți antibacteriene, dar care sunt mai superioare comparativ cu preparatul cunoscut kanamicina.