

Invenția se referă la chimie și agricultură, în special la utilizarea unui derivat de diaminogloximă în calitate de remediu antibacterian.

Sunt cunoscuți derivați de oxime heterociclice care datorită activității lor citotoxice, manifestă proprietăți antibacteriene și antifungice, la fel și complexii acestora cu metalele tranzitionale manifestă proprietăți antibacteriene [1].

Sunt cunoscuți derivați ai dioximelor, și anume, diaminogloxime, care se obțin la condensarea diclorgloximei cu 2-sau 4-toluenamine (toluidine sau metilaniline). De exemplu, cu 4-toluenamina s-a obținut N,N'-bis(4-tolil)diaminogloxima (TDAGH<sub>2</sub>) [2]. De asemenea au fost descrise dioxime similare (DsamH<sub>2</sub>) obținute din sulfanilamidă [3]. Sulfanilamida este bine cunoscută și utilizată în calitate de remediu antibacterian. Activitatea biologică a compușilor obținuți nu a fost testată.

De asemenea, este cunoscut un compus din clasa dioximelor care a fost obținut în urma condensării unei amine organice cu monoclorgloxima, neajunsul acestui compus dioximic fiind lipsa activității antibacteriene și antifungice, aceste proprietăți fiind manifestate doar de compușii complecși în baza lui cu ioni de metale tranzitive [4].

Problema tehnică rezolvată de invenție constă în extinderea gamei de compuși dioximici, care să manifeste proprietăți antibacteriene și antifungice sporite în stare liberă, necoordinată cu ioni de metale.

Esența invenției constă în obținerea unui solvat nou a N,N'-bis(4-tolil)diaminogloximei și anume a compusului bis-(N,N'-bis(4-tolil)diaminogloxim)-4-metilanilin-trihidrat ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O), care prevede condensarea diclorgloximei cu *p*-aminotoluenul în alcool neabsolut. Structura solvatului a fost stabilită cu metoda difracției razelor X pe monocristal, produsul manifestând activitate antimicrobiană, fiind propus pentru utilizare în calitate de remediu antibacterian în agricultură.

Rezultatul tehnic al invenției constă în aceea că se propune pentru utilizare în calitate de remediu antibacterian un compus solvat nou cristalin - bis-(N,N'-bis(4-tolil)diaminogloxim)-4-metilanilin-trihidrat ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O), care manifestă o activitate antibacteriană și antifungică superioară și care poate fi utilizat, în special contra tulpinilor fitopatogene de *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora* și *Erwinia carotovora*.

Avantajele invenției constau în faptul că pentru utilizare se propune un compus organic accesibil, cristalin, stabil și relativ ieftin, deoarece el conține în componența sa un radical de 4-tolilamină, ultima fiind o substanță ieftină și accesibilă. Totodată pentru manifestarea proprietăților antibacteriene și antifungice nu este necesar de utilizat compusul în stare coordinată (complexată) cu ioni de metale ca în analogul proxim.

Invenția este explicată prin fig. 1a, care reprezintă structura moleculară și cristalină bis-(N,N'-bis(4-tolil)diaminogloxim)-4-metilanilin-trihidrat; și

(1b) - un fragment din structura cristalină cu modul de împachetare a componentelor în cristal.

#### Exemple de realizare a invenției

##### Exemplul 1. Sinteza compusului bis-(N,N'-bis(4-tolil)diaminogloxim)-4-metilanilin-trihidrat

Se prepară soluția ce conține 0,24 g (0,2 mmol) 4-metilanilină (para-toluidină) și 0,16 g (0,1 mmol) diclorgloximă în 10 mL etanol (soluție de culoare galbenă), care se pune la agitare. Peste 10 min se adaugă 0,12 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> și 1,5 mL H<sub>2</sub>O. Pentru dizolvarea completă a carbonatului de sodiu, amestecul reactant se încălzește la temperatura de 50°C și se agită timp de 40...50 min. După agitare se formează un sediment gelatinos de culoare galben-deschisă. Amestecul se mai lasă la agitare 2 ore, timp în care sedimentul trece în culoare albă. Amestecul se filtrează pe un filtru de sticlă, iar sedimentul separat se spală cu alcool etilic (cu 3 porții a câte 2 mL), apoi cu eter dietilic (cu 3 porții a câte 2 mL) și se usucă la aer. După spălare și uscare substanța capătă culoarea bej. S-a obținut 0,17 g, randamentul reacției constituind 26%. Substanța este solubilă în metanol, dimetilformamidă, dimetilsulfoxid, etanol și insolubilă în apă, acetonitril și eter dietilic. Din filtratul lăsat pentru cristalizare în 8 zile s-au format cristale slab-gălbui de forma unor ace, care au fost supuse difracției cu raze X.

Găsit, %: C 61,80; H 6,78; N 16,64.

Pentru C<sub>39</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>O<sub>7</sub>

Calculat, %: C 61,72; H 6,81; N 16,42.

Spectrul IR al ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O) a fost înregistrat la spectrometrul Perkin-Elmer 100 FT-IR în intervalul 4000-400 cm<sup>-1</sup> (suspensie în ulei de vazelină) și ATR în intervalul 4000-650 cm<sup>-1</sup>.

Benzi de absorbție, cm<sup>-1</sup>: 3676(s), 3401(s), 3371(m), 3308(m), 3187(m), 3126(m), 2972(p), 2922(p), 2786(m), 1892(s), 1877(s), 1649(p), 1624(f.p.), 1614(f.p.), 1516(f.p.), 1466(p), 1459(p), 1452(p), 1420(m), 1407(m), 1396(m), 1380(s), 1314(m), 1277(m), 1237(s), 1209(s), 1125(s), 1111(s), 1074(s), 1066(s), 1057(s), 1044(s), 1029(s), 1020(s), 991(s), 983(s), 964(p), 954(p), 894(p), 812(p), 806(p), 762(m), 727(s), 708(s), 679(m), 578(s), 491(s); (intensitatea benzii de absorbție, apreciată calitativ: f.p.- foarte puternică; p - puternică; m - medie; s - slabă).

Benzile de absorbție pot fi atribuite conform: Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. Изд-во МИР, Москва, 1965, с. 216. În compus ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O) sunt prezente benzile de absorbție: 3400cm<sup>-1</sup> ν(N-H)<sub>diox</sub>; 3371cm<sup>-1</sup> și 3308 cm<sup>-1</sup> ν<sub>as</sub>(NH<sub>2</sub>) și respectiv ν<sub>s</sub>(NH<sub>2</sub>) în molecula necondensată de 4-metilanilină; 3187cm<sup>-1</sup> și 3126 cm<sup>-1</sup> ν(OH)<sub>diox,apă</sub> participante la formarea legăturilor de hidrogen de tipul O-H...O. Oscilațiile ν(C-H) se manifestă în regiunea 3000-2700 cm<sup>-1</sup>. Banda de absorbție la 1649 este atribuită oscilațiilor ν(C=N)<sub>diox</sub>, iar benzile la 1624, 1516 și 1452 – oscilațiilor ν(C=C)<sub>in,arom.</sub>. Banda de intensitate înaltă la 954 cm<sup>-1</sup> se atribuie oscilațiilor ν(N-O)<sub>diox</sub>. Tipul de substituție 1,4- în inelul aromatic este confirmat de prezența benzii de

absorbție de intensitate înaltă  $\delta(\text{CH})$  la  $812\text{ cm}^{-1}$  (Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. Изд-во иностранной литературы, Москва, 1963, с. 590). Absența în spectrul dioximei a benzii de absorbție de intensitate înaltă  $\nu(\text{C-Cl})$  la  $851\text{ cm}^{-1}$  prezintă în spectrul diclorglioximei este o dovadă incontestabilă că a avut loc procesul de alchilare a 4-aminotoluenului cu diclorglioxima.

*Spectrele  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  RMN* au fost înregistrate la spectrometrul Bruker la 400,13 MHz pentru  $^1\text{H}$  și 100,61 MHz pentru  $^{13}\text{C}$  în DMSO- $d_6$  folosind TMS ca referință internă. Deplasările chimice ( $\delta$ ) sunt prezentate în părți per milion (ppm) și raportate la vârful solventului nedeuterat rezidual (2,49 pentru  $^1\text{H}$  și 39,70 pentru  $^{13}\text{C}$ ).

În spectrul  $^1\text{H}$  RMN al dioximei sunt prezente două semnale dublet în intervalul 6,68-6,86 ppm care aparțin grupărilor ( $=\text{CH}-$ ) ale inelului aromatic din dioximă și două semnale dublet în intervalul 7,34-7,37 ppm ale carbonilor terțiari ai moleculei de 4-metilanilină (p-toluidină). Grupărilor aminice ( $-\text{NH}_2$ ) și iminice ( $-\text{NH}-$ ) aparțin semnalele de la 7,91 și 8,43 ppm. De asemenea sunt bine vizibile semnalele pentru grupa hidroxilică ( $-\text{OH}$ ) la 10,36 ppm, pentru grupele metilice ( $-\text{CH}_3$ ) în intervalul 2,15-2,51 ppm, atât ale dioximei, cât și ale moleculei de MA necondensată.

În spectrul  $^{13}\text{C}$  RMN al dioximei sunt prezente semnalele atomilor de carbon terțiari ai inelului aromatic  $\delta(=\text{CH}-)$  la 119,76 și 129,26 ppm, atomii de carbon cuaternari ai inelului aromatic  $\delta(=\text{C}=\text{C})$  la 131,05 și 137,42 ppm și atomul cuaternar al grupei oximice  $\delta(=\text{C}=\text{O})$  la 143,55 ppm, ceea ce dovedește faptul că condensarea a avut loc. De asemenea într-un câmp mai slab este prezent semnalul pentru grupa metilică ( $-\text{CH}_3$ ) la 20,64 ppm.

### Exemplul 2. Difrakția cu raze X

Datele experimentale au fost obținute la temperatura camerei (293(2)K) la difractometrul Xcalibur E (radiație – MoK $\alpha$ , monocromator de grafit). Parametrii celulei elementare, fițiți în baza datelor experimentale complete, au fost obținuți utilizând pachetul software CrysAlis Oxford Diffraction (CrysAlis RED, O. D. L., Version 1.171.34.76, 2003). Structura compusului a fost determinată prin metode directe, iar pozițiile atomilor nehidrogenici au fost fițiți prin metoda celor mai mici pătrate în varianta anizotropă (SHELX-97) (Sheldrick G. M. A short history of SHELX. Acta Crystallographica Section A, 2008, 64(1), pp. 112. DOI:10.1107/s0108767307043930). Coordonatele atomilor de hidrogen au fost calculate din considerente geometrice și fitate izotropic în modelul „corp solid” cu  $U_{\text{ef}} = 1,2 U_{\text{ech}}$  sau  $1,5 U_{\text{ech}}$  corespunzător atomilor O, N și C. S-a stabilit că datele structurale obținute pentru compusul ((TDAGH $_2$ ) $_2$ ·MA·3H $_2$ O), ce conține bis-(N,N'-bis(4-tolil)diaminoglioxima sunt în deplin acord cu rezultatele evidențiate din spectrele IR și RMN. Datele cristalografice și caracteristicile experimentale pentru compusul dioximic sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Datele cristalografice și caracteristicile experimentale pentru (TDAGH $_2$ ) $_2$ ·MA·3H $_2$ O

Parametrii	Valoarea
Formula empirică	C $_{39}$ H $_{51}$ N $_9$ O $_7$
M	757,89
Sistemul cristalografic	monoclinic
Grupul spațial	<i>Pn</i>
<i>a</i> , Å	13,863(2)
<i>b</i> , Å	6,4122(14)
<i>c</i> , Å	23,213(5)
$\beta$ , °	99,512(18)
<i>V</i> , Å $^3$	2035,1(7)
<i>Z</i>	2
$\rho$ (calculată), g/cm $^3$	1,355
Dimensiunea cristalului, mm	0,55x0,3x0,08
Numărul reflexelor colectate	4083
Factorul de divergență final <i>R</i> $_1$	0,0446

Compusul ((TDAGH $_2$ ) $_2$ ·MA·3H $_2$ O) se cristalizează în grupul spațial monoclinic *Pn* și conține în partea asimetrică a celulei elementare două molecule de TDAGH $_2$ , cristalografic independente, obținute la condensarea 4-metilanilinei (MA) cu diclorglioxima (DCIH $_2$ ), o moleculă de MA și trei molecule de apă (fig. 1(a)). Ca urmare a fost obținut un agent nou de coordinare ((TDAGH $_2$ ) $_2$ ·MA·3H $_2$ O), care poate coordina la atomii de metal în mod diferit – de la mono- până la polidentat. În grupările oximice din ((TDAGH $_2$ ) $_2$ ·MA·3H $_2$ O) sunt următoarele lungimi de legătură: N(1)–C(1) 1,288(12) Å; N(1)–O(1) 1,431(9) Å; N(2)–C(2) 1,273(12) Å; N(2)–O(2) 1,417(10) Å; N(3)–C(3) 1,269(11) Å; N(3)–O(3) 1,429(10) Å; N(4)–C(4) 1,249(11) Å; N(4)–O(4) 1,446(9) Å. Unghiurile de valență C(1)–N(1)–O(1), C(2)–N(2)–O(2), C(3)–N(3)–O(3) și C(4)–N(4)–O(4) sunt 111,3(8)°, 110,2(8)°, 110,7(8)° și respectiv 109,0(7)°. Distanța dintre centrele celor două inele aromatice din aceste două molecule constituie 4,817 Å și respectiv 4,829 Å, ca urmare ele sunt stabilizate suplimentar de interacțiunile de tip  $\pi \cdots \pi$ . În cristal moleculele de apă și de MA sunt legate cu moleculele de dioximă printr-un sistem complicat de legături de hidrogen (tabelul 2, fig. 1(b)).

Tabelul 2

Parametrii legăturilor de hidrogen intermoleculare din compusul ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O)

D–H···A	Distanța interatomică, Å		Unghiul DHA, grad	Transformarea simetrică pentru A
	H···A	D···A		
N(9)–H(1)···O(1W)	2.19	3.14(1)	178	$x+1/2, -y, z-1/2$
N(9)–H(2)···O(1)	2.53	3.18(1)	132	$x+1/2, -y, z-1/2$
O(1)–H···O(1W)	1.83	2.64(1)	170	$x, y+1, z$
O(2)–H···O(2W)	1.90	2.70(1)	175	$x-1/2, -y, z+1/2$
O(3)–H···N(9)	1.93	2.72(1)	163	$x, y+1, z$
O(4)–H···O(3W)	1.83	2.64(1)	169	$x+1/2, -y, z-1/2$
O(1W)–H(1)···N(2)	2.07	2.83(1)	148	$x, y, z$
O(1W)–H(2)···N(4)	2.08	2.86(1)	152	$x-1/2, -y, z+1/2$
O(2W)–H(1)···O(3W)	2.00	2.87(1)	178	$x+1/2, -y+1, z-1/2$
O(2W)–H(2)···O(4)	2.09	2.97(1)	179	$x, y, z$
O(3W)–H(1)···N(1)	1.96	2.83(1)	177	$x, y, z$
O(3W)–H(2)···N(3)	1.94	2.82(1)	169	$x-1/2, -y+1, z+1/2$

*Exemplu 3. Evaluarea activității antibacteriene și antifungice a ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O) și a compusului martor DsamH<sub>2</sub>*

În calitate de bacterii-test pentru evaluarea activității antimicrobiene au fost selectate tulpini nepatogene de *Bacillus subtilis* CNMN BB-01, *Pseudomonas fluorescens* CNMN-PFB-01 și tulpini fitopatogene de *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* și 2 tulpini de funghi-drojii *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

În calitate de compus martor s-a utilizat compusul cunoscut cu structură foarte apropiată - DsamH<sub>2</sub> [3], care conține în molecula sa în loc de 4-tolil doi radicali de sulfanilamidă, larg cunoscută pentru activitatea antimicrobiană foarte pronunțată.

Activitatea antimicrobiană a fost testată utilizând metoda diluțiilor succesive duble care constă în aceea că la etapa inițială se iau șiruri de 10 eprubete în care se introduc câte 1 mL de bulion peptonat pentru bacterii și Sabouraud pentru funghi. Ulterior se picură 1 mL de preparat în prima eprubeta (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 microorganisme-test. Se prepară inițial suspensii de culturi bacteriene și fungice cu densitățile optice (D.O.) de 2,0 și 7,0, respectiv, în conformitate cu indicele McFarland. Ulterior, se transferă 1 mL de suspensie bacteriană sau fungică 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 sau fungică, 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 sau fungului 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 sau fungilor se consideră a fi concentrația minimă inhibitorie (CMI) a preparatului. Pentru aprecierea concentrației minime bactericide (CMB) sau fungicide (CMF), conținutul eprubetelor cu CMI și a eprubetelor cu concentrații mai înalte ale preparatelor se însămânțează pe agarul peptonat sau Sabouraud 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 sau fungice se consideră a fi concentrația minimă bactericidă sau fungicidă a preparatului. Rezultatele activității antibacteriene ale compusului revendicat și a compusului martor sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Rezultatele activității antibacteriene a compusului utilizat în revendicare și a compusului martor DsamH<sub>2</sub>

	Microorganismele testate	Compusul martor: (DsamH <sub>2</sub> 0,5% în DMSO)	Invenția: (soluția inițială de 0,5%)
CMB, %	<i>Ps. fluorescens</i>	0,06	0,015
	<i>B.subtilis</i>	0,06	0,007
	<i>X. campestris</i>	0,06	0,015
	<i>E. amylovora</i>	0,06	0,007
	<i>E. carotovora</i>	0,06	0,015
CMF, %	<i>C.utilis</i>	0,06	0,007
	<i>S.cerevisiae</i>	0,06	0,015

Conform datelor din tabelul 3 sporul activității antibacteriene a invenției în comparație cu compusul martor a constituit 4...8 ori în dependență de specia bacteriană testată și celei antifungice de 4...8 ori în dependență de specia de fungi testată. Aceste rezultate par a fi neașteptate, deoarece s-ar părea ca anume DsamH<sub>2</sub> să manifeste o activitate mai înaltă decât ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O), dat fiind faptul că martorul conține în molecula sa doi radicali de sulfanilamidă, compus cu o activitate antimicrobiană bine cunoscută și foarte pronunțată.

În concluzie, compusul ((TDAGH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·MA·3H<sub>2</sub>O) poate fi utilizat în agricultură, în special, în calitate de remediu antibacterian contra tulpinilor fitopatogene de *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora* și *Erwinia carotovora*.