



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01243**

(22) Data de depozit: **28/11/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2017** BOPI nr. **11/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**30/08/2013** BOPI nr. **8/2013**

(73) Titular:

- **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI**,  
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE**  
**CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN**  
**DOMENIUL PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR**  
**BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ"**,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE**  
**CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU**  
**INGINERIE ELECTRICĂ ICPE - CA**,  
SPLAIUL UNIRII NR.313, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **PAHONTU ELENA MIHAELA**,  
STR. IZBICENI NR. 38, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;
- **LEABU MIRCEA**, BD. UNIRII NR. 37,

BL. A4, SC. 4, AP. 100, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **BUDRUGEAC PETRU**,  
STR.STOIAN MILITARU NR.101, BL.3,  
SC.E, ET.3, AP.48, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **ROȘU TUDOR**, BD. CAMIL RESSU  
NR. 39, BL. Z5, SC. 1, ET. 1, AP. 6,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**TUDOR ROȘU, ELENA PAHONTU,**  
**CĂTĂLIN MAXIM, RODICA GEORGESCU,**  
**NICOLAE STANICĂ, GABRIELA LAURA**  
**ALMĂJAN, AURELIAN GULEA,**  
**"SYNTHETISIS, CHARACTERIZATION**  
**AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME**  
**NEW COMPLEXES Cu(II), Ni(II), Vo(II),**  
**Mn(II) WITH SCHIFF BASE DERIVED**  
**FROM**  
**4-AMINO-2,3-DIMETHYL-1-PHENYL-3-PYR**  
**AZOLIN-5-ONE", POLYHEDRON 29,**  
**PAG. 757-766, 2010**

(54) **COMBINAȚII COMPLEXE ALE Cu (II) CU BAZĂ SCHIFF**  
**DERIVATĂ DE LA INDOL-3-CARBOXALDEHIDĂ**



Invenția se referă la combinații complexe ale Cu (II), cu baza Schiff (L) derivată de la indol-3-carboxaldehidă, care au un rol important în domeniul farmaceutic.

Este cunoscut faptul că nucleul indol este un ciclu comun multor compuși biologic activi, și ocupă o poziție importantă în cadrul sistemelor heterociclice folosite drept medicamente [R. J. Sundberg, *Indoles*, Academic Press (New York) 1996; J. A. Joule, *Science of Synthesis Houben-Weyl. Methods of Molecular Transformations*, Georg Thieme Verlag (Stuttgart) vol. 10, 2000, 361].

Prin urmare, deși derivații indolului au fost ținta unor investigații sintetice pe parcursul multor ani, există încă o serie de cercetări care pot furniza în mod eficient derivați substituiți și funcționalizați ai indolului [M. Somei, F. Yamada, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 843-867].

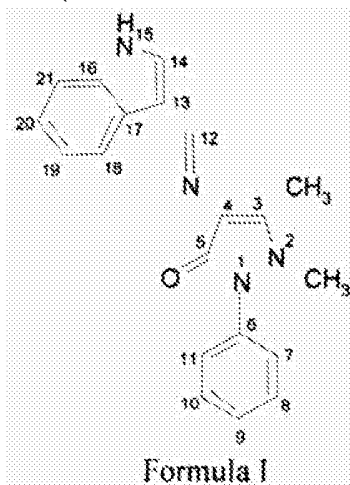
Bazele Schiff obținute prin condensarea aminelor și aminoacizilor cu 1H-indol-3-carboxaldehida s-au bucurat de o atenție deosebită datorită descoperirii activității citostatice împotriva celulelor canceroase și efectelor bacteriostatice [D. Sinha, A. K. Tiwari, S. Singh, G. Shukla, P. Mishra, H. Chandra, A. K. Mishra, *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (2008) 160-165; A. Garg, J. P. Tandon, *Transition Metal Chemistry* 12 (1987) 42-45; G. Shukla, A. K. Tiwari, D. Sinha, R. Srivastava, H. Chandra, A. K. Mishra, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 24 (2009) 209-214; K. K. Upadhyay, A. Kumar, S. Upadhyay, P. C. Mishra, *Journal of molecular structure*, 873 (2008) 5-16]. Studiile asupra relației structură-activitate pun în evidență aportul grupării fenilglicinol, ca parte a lanțului lateral din indol, care pare a fi crucial pentru activitatea anticancerigenă [P. Singh, P. Kaur, V. Luxami, S. Kaur, S. Kumar *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 2386-2395; A. S. Shawali, N. M. S. Harb, K. O. Badahdah, *J. Heterocyclic Chem.* 22 (1985) 1397-1403; K. Y. Lau, A. Mayr, K. K. Cheung, *Inorg. Chim. Acta* 285 (1999) 223-2328-10]. Un număr mic de lucrări descriu sinteza și caracterizarea combinațiilor complexe ale Cu (II) cu baze Schiff derivate de la indol [M. Nair Sivasankara, R. S. Joseyphus, C. J. Dhanaraj, *Polish Journal of Chemistry* 89 (2009) 1529-1535; H. M. Ali, M. I. Najwa, M.-J. Xie, S. W. Ng, *Acta Crystallographica Section E*, 62 (2006) m2627-m2628]. Combinațiile complexe care fac obiectul prezentei invenții reprezintă o continuare a studiilor noastre sistematice în acest domeniu [T. Roșu, S. Păsculescu, V. Lazăr, C. Chifiriuc, R. Cernat, *Molecules* 11 (2006) 904-914; T. Roșu, A. Gulea, A. Nicolae, R. Georgescu, *Molecules* 12 (2007) 782-796; M. V. Angelușiu, G. L. Almăjan, T. Roșu, M. Negoiu, E. R. Almăjan, J. Roy, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2009) 3323-3329; T. Roșu, M. Negoiu, S. Păsculescu, E. Pahonțu, D. Poirier, A. Gulea, *Europea Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 774-781; T. Roșu, E. Pahonțu, C. Maxim, R. Georgescu, N. Stanică, G. L. Almăjan, A. Gulea, *Polyhedron* 29 (2010) 757-766; T. Roșu, E. Pahonțu, S. Păsculescu, R. Georgescu, N. Stanică, A. Curaj, A. Popescu, M. Leabu, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2010) 1627-1634].

Problema tehnică pe care invenția își propune să o rezolve este aceea de a elabora compuși care să prezinte activitate antibacteriană și/sau acțiune inhibitorie asupra celulelor tumorale.

# RO 128706 B1

Invenția se referă la combinații complexe ale Cu (II) cu formula generală  $[Cu(L)_2X_2]$ , unde: 1

L este 1-fenil-2,3-dimetil-4-(N-indol-3-carboxaldehid)-3-pirazolin-5-onă cu formula I: 3

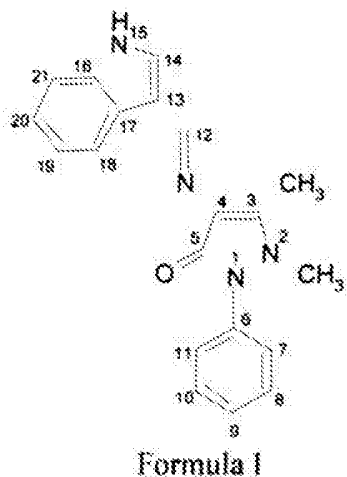


și 5

X este  $Cl^-$  sau  $OAc^-$ ; ( $OAc^- = CH_3COO^-$ ). 7

Invenția se mai referă la o combinație complexă a Cu (II) cu formula generală  $[Cu(L)_2](NO_3)_2$ , unde: 9

L este 1-fenil-2,3-dimetil-4-(N-indol-3-carboxaldehid)-3-pirazolin-5-onă cu formula I: 11



Invenția mai prevede utilizarea combinației complexe  $[Cu(L)_2(OAc)_2]$  ca medicament antibacterian și, respectiv, utilizarea combinațiilor complexe  $[Cu(L)_2X_2]$ , unde  $X = G^-, OAc^-$ , ca medicament cu acțiune inhibitorie asupra proliferării celulelor tumorale. 13

În conținutul descrierii combinațiile complexe se vor nota astfel:  $[Cu(L)_2Cl_2]$  (1);  $[Cu(L)_2](NO_3)_2$  (2);  $[Cu(L)_2(OAc)_2]$  (3). 15

Avantajele compușilor conform invenției sunt: 17

- compușii 1 și 3 inhibă proliferarea celulelor HeLa în diferite moduri; 19
- compusul 2 poate fi utilizat ca agent antibacterian (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028); 21
- activitatea antimicrobiană depinde de structura compusului testat - apare o nouă viziune de sinteză a compușilor cu proprietăți predictibile. 23

În continuare se prezintă sinteza, studiile spectrale și proprietățile noilor complexe mononucleari ai Cu (II) cu baza Schiff (L), derivată de la antipirină și 1H-indol-3-carboxaldehidă, care sunt în legătură cu schemele 1 și 2 și cu fig. 1...3: 25

- schema 1, ligandul bază Schiff, L ; 27
- schema 2, structurile propuse pentru combinațiile complexe conform invenției; 29

# RO 128706 B1

- fig. 1, a) structura moleculei L; b) legături de hidrogen;  
- fig. 2, a) spectrul RPE al complexelor 1, 3, în stare policristalină la 298 K; b) la 77 K;  
- fig. 3, efectele ligandului L și complexelor 1, 2 și 3 asupra proliferării celulelor HeLa și MCF7 investigate prin videomicroscopie în timp real.

Complexii și ligandul au fost testați pentru activitatea lor biologică atât asupra celulelor procariote, cât și asupra celor eucariote. Activitatea lor antibacteriană și antifungică *in vitro* a fost evaluată împotriva tulpinilor: *Staphylococcus aureus* var. Oxford 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 100131, *Legionella monocytogenes* ATCC 35182, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Candida albicans* și *Aspergillus flavus*. Pentru activitățile antiproliferative pe eucariote, au fost utilizate două tipuri diferite de linii celulare, HeLa și MCF7.

Comparațiile complexe au fost preparate prin reacția directă dintre ligandul 1-fenil-2,3-dimetil-4-(N-indol-3-carboxaldehid)-3-pirazolin-5-onă și sărurile metalice corespunzătoare:  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pentru complexul 1),  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (pentru complexul 2),  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (pentru complexul 3) (toate provin de la Merck).

## Exemplul 1

Sinteza combinațiilor complexe  $[\text{Cu}(\text{L})_2\text{Cl}_2]$  (1),  $[\text{Cu}(\text{L})_2](\text{NO}_3)_2$  (2),  $[\text{Cu}(\text{L})_2](\text{OAc})_2$  (3)

Sarea metalică (1 mmol) dizolvată în 15 ml soluție apă/etanol (1:2 v/v) a fost adăugată peste ligandul L (2 mmoli) dizolvat în 15 ml metanol cald, și refluxată cu agitare timp de 2 h. Precipitatul obținut a fost filtrat, spălat cu apă caldă, etanol, apoi cu eter, și uscat în vacuum.

Comparațiile complexe obținute sunt solide microcristaline, stabile în aer, și care au diferite puncte de topire (tabelul 1). Sunt insolubile în solvenți organici, cum ar fi: acetonă, eter, cloroform, dar solubile în DMF și DMSO.

Valorile conductanței molare pentru complexii solubili în DMF indică faptul că, în timp ce complexul 2 este un electrolit ( $78 \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ ), complexii 1 și 3 sunt neelectroliti ( $8\text{-}12 \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ ) [W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81-122].

Tabelul 1

Date analitice și fizice pentru complexii metalici (1-3)

| Formula moleculară                           | Masa moleculară (g/mol) | Randament (%) | P.T. (°C) | Analiza elementară (%) calculată (experimental) |             |               |             | $\mu$ (MB) | Geometrie               |
|----------------------------------------------|-------------------------|---------------|-----------|-------------------------------------------------|-------------|---------------|-------------|------------|-------------------------|
|                                              |                         |               |           | C                                               | H           | N             | M           |            |                         |
| $[\text{Cu}(\text{L})_2\text{Cl}_2]$ (1)     | 792,5                   | 82            | 137       | 60,56 (61,03)                                   | 4,29 (4,07) | 14,13 (13,98) | 8,01 (7,89) | 1,86       | Octaedric distorsionat  |
| $[\text{Cu}(\text{L})_2](\text{NO}_3)_2$ (2) | 845,5                   | 78            | > 220     | 56,77 (57,12)                                   | 4,02 (3,87) | 16,55 (16,33) | 7,51 (7,37) | 1,90       | Tetraedric              |
| $[\text{Cu}(\text{L})_2](\text{OAc})_2$ (3)  | 839,5                   | 76            | 135       | 62,89 (63,12)                                   | 4,76 (4,42) | 13,34 (13,05) | 7,56 (7,29) | 2,02       | Tetragonal ( $D_{4h}$ ) |

Baza Schiff L folosită a fost obținută în acord cu metoda descrisă [T. Roșu, S. Păsculescu, V. Lazăr, C. Chifiriuc, R. Cernat, *Molecules* 11 (2006) 904-914], prin refluxarea în etanol (20...30 ml) a unui amestec echimolecular de 1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-3-pirazolin-5-onă și indol-3-carboxaldehidă.

**Exemplul 2***Sinteza bazei Schiff L*

O soluție de indol-3-carboxaldehidă (0,145 g, 1 mmol în etanol 10 ml) a fost adăugată peste o soluție de 4-amino-1-fenil-2,3-dimetil-3-pirazolin-5-onă (0,203 g, 1 mmol în 20 ml etanol). Amestecul a fost agitat 1 h la temperatura camerei, apoi refluxat pentru 2 h și păstrat timp de două zile la temperatura de 4°C. S-a obținut un precipitat galben care s-a filtrat, s-a spălat cu metanol și s-a uscat. Structura ligandului a fost stabilită prin spectrometrie IR, UV-VIS, <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN.

Randament: 82%. M. p. 295°C. Analize: calculat (%) pentru C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O (330,41 g/mol): C, 72,72; H, 5,45; N, 16,96. Experimental: C, 73,28; H, 5,07; N, 16,68. IR(KBr, cm<sup>-1</sup>): 1615 (CH = N, st. intense), 1630 (C = O), 3162 (N-H); <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>; δ, ppm): δ = 9,92 (s, 1H, H-15); 9,73 (s, 1H, H-12); 8,3 (s, 1H, H-14); 7,84-7,55(m, 4H, H-18, 19, 20, 21); 7,40-7,19 (m, 5H, H-7, 8, 9, 10, 11); 3,09 (s, 3H, H-23); 2,85 (s, 3H, H-22). <sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>; δ, ppm): δ = 160,3 (C-12); 152,4 (C-3); 150,9 (C-5); 137,3 (C-6); 135,0 (C-16); 131,7 (C-8,10); 129,1 (C-17); 126,4 (C-14); 122,7 (C-19); 122,6 (C-18); 122,2 (C-20); 120,6 (C-9); 118,3 (C-7,11); 115,8 (C-21); 112,4 (C-4); 111,9 (C-13); 35,9 (C-23); 10,0 (C-22).

Datele analizei elementale pentru baza Schiff și complexii corespunzători sunt compatibile cu structura ligandului prezentată în schema 1, și cu formulele complexșilor prezentate în schema 2.

*1. Caracterizarea structurală a ligandului L*

Structura moleculară a ligandului, împreună cu schema de numerotare, este reprezentată în fig. 1.

Principalele date cristalografice, împreună cu detaliile structurale, sunt prezentate în tabelul 2, în timp ce distanțele dintre atomi și unghiurile dintre legături sunt prezentate în tabelul 3. Molecula ligandului L este în esență plană, cu excepția inelului fenil al antipirinei, care este rotit cu 65°. În principal cristalul de L este împachetat sub forma unor lanțuri în zigzag paralele pe direcția (010), ca urmare a forțelor de interacție Van der Waals. Fiecare lanț este construit din specii L (fig. 1b) asociate prin legături de hidrogen intermoleculare N-H...O, formate între atomul N4 al inelului indol-3-carboxaldehidei și atomul de oxigen O1 al inelului antipirinic (3 - x, 0,5 + y, 0,5 + z) 2,80 (1) Å, N4-H...O1' 1,97 Å, N4-H...O1' 164°.

*Tabelul 2**Date cristalografice și parametri de rafinare structurală pentru L*

|                      |                                                  |
|----------------------|--------------------------------------------------|
| Formula empirică     | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O |
| Greutatea moleculară | 330,38                                           |
| Temperatură (K)      | 293 (2)                                          |
| Lungimea de undă (Å) | 0,71073                                          |
| Sistem cristalin     | Orthorhombic                                     |
| Grupul spațial       | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>    |
| a, (Å)               | 6,8751(4)                                        |
| b, (Å)               | 15,7786 (6)                                      |
| c, (Å)               | 16,5079 (10)                                     |
| V, (Å <sup>3</sup> ) | 1790,76 (16)                                     |

# RO 128706 B1

Tabelul 2 (continuare)

|                                                                             |                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Z                                                                           | 4                                       |
| $D_{\text{calc}}$ (g/cm <sup>3</sup> )                                      | 1,225                                   |
| $\mu$ (mm <sup>-1</sup> )                                                   | 0,079                                   |
| Reflecții colectate                                                         | 4663/3195 [ $R_{\text{int}} = 0,0284$ ] |
| Dimensiunea cristalului (mm)                                                | 0,20 x 0,15 x 0,15                      |
| $R_1^a$                                                                     | 0,0434                                  |
| $wR_2^b$                                                                    | 0,0580                                  |
| GOF <sup>c</sup>                                                            | 1,035                                   |
| $\Delta\rho_{\text{max}}$ and $\Delta\rho_{\text{min}}$ [eÅ <sup>-3</sup> ] | 0,103 and - 0,150                       |

<sup>a</sup> $R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ , <sup>b</sup> $wR_2 = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2]\}^{1/2}$ .

<sup>c</sup>GOF =  $\{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / (n - p)\}^{1/2}$ , unde n este numărul de reflecții și p este numărul total al parametrilor de rafinare.

Tabelul 3

Lungimea legăturilor (Å) și unghiurile de legătură (°) pentru L

|            |          |           |            |
|------------|----------|-----------|------------|
| N2-C9      | 1,365(2) | N2-N1     | 1,397(2)   |
| N2-C10     | 1,458(3) | O1-C7     | 1,234(2)   |
| N3-C12     | 1,280(3) | N3-C8     | 1,402(2)   |
| C9-C8      | 1,353(3) | C9-C11    | 1,486(3)   |
| N1-C7      | 1,395(3) | N1-C1     | 1,433(3)   |
| C12-C13    | 1,445(3) | C8-C7     | 1,443(3)   |
| N4-C15     | 1,358(3) | N4-C14    | 1,365(3)   |
| C20-C19    | 1,382(3) | C20-C15   | 1,409(3)   |
| C20-C13    | 1,448(3) | C1-C2     | 1,358(3)   |
| C1-C6      | 1,360(3) | C19-C18   | 1,381(3)   |
| C15-C16    | 1,394(4) | C13-C14   | 1,376(3)   |
| C5-C4      | 1,356(3) | C5-C6     | 1,399(3)   |
| C4-C3      | 1,363(4) | C3-C2     | 1,400(3)   |
| C16-C17    | 1,364(3) | C17-C18   | 1,399(4)   |
| C9-N2-N1   | 106,6(2) | C9-N2-C10 | 124,2(2)   |
| N1-N2-C10  | 117,2(2) | C12-N3-C8 | 121,4(2)   |
| C8-C9-N2   | 110,1(2) | C8-C9-C11 | 128,6(2)   |
| N2-C9-C11  | 121,3(2) | C7-N1-N2  | 109,67(18) |
| C7-N1-C1   | 123,3(2) | N2-N1-C1  | 119,4(2)   |
| N3-C12-C13 | 120,1(2) | C9-C8-N3  | 121,1(2)   |

Tabelul 3 (continuare)

|             |          |             |          |    |
|-------------|----------|-------------|----------|----|
| C9-C8-C7    | 108,5(2) | N3-C8-C7    | 130,3(2) | 1  |
| O1-C7-N1    | 124,0(2) | O1-C7-C8    | 131,9(3) | 3  |
| N1-C7-C8    | 104,2(2) | C15-N4-C14  | 109,0(3) |    |
| C19-C20-C15 | 120,0(3) | C19-C20-C13 | 134,4(2) | 5  |
| C15-C20-C13 | 105,6(2) | C2-C1-C6    | 120,7(2) |    |
| C2-C1-N1    | 119,2(3) | C6-C1-N1    | 120,1(2) | 7  |
| C18-C19-C20 | 118,2(2) | N4-C15-C16  | 129,4(3) |    |
| N4-C15-C20  | 109,0(2) | C16-C15-C20 | 121,6(3) | 9  |
| C14-C13-C12 | 125,0(3) | C14-C13-C20 | 106,5(2) |    |
| C12-C13-C20 | 128,5(2) | N4-C14-C13  | 109,9(3) | 11 |
| C4-C5-C6    | 120,1(3) | C1-C6-C5    | 119,3(3) |    |
| C5-C4-C3    | 120,6(3) | C4-C3-C2    | 119,3(3) | 13 |
| C17-C16-C15 | 117,3(3) | C16-C17-C18 | 121,6(3) |    |
| C1-C2-C3    | 119,9(3) | C19-C18-C17 | 121,2(3) | 15 |

## 2. Spectrul IR și modul de coordonare

Ligandul și complexii au fost caracterizați în detaliu prin înregistrarea spectrului IR. Comparând spectrul IR al complexilor cu cel al ligandului liber, s-au observat modificări care ar putea apărea datorită reacției de complexare. Atribuirile propuse sunt bazate pe rezultatele anterioare [T. Roșu, E. Pahonțu, C. Maxim, R. Georgescu, N. Stanică, G. L. Almăjan, A. Gulea, *Polyhedron* 29 (2010) 757-766] și date din literatură [K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley and Sons, New York, 1986; K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, fifth ed., Wiley-Interscience, New York, 1997; P. Mosae Selvakumar, E. Suresh and P. S. Subramanian, *Polyhedron* 26 (2007) 749-754; S. S. Konstantinovic, B. C. Radovanovic, Z. Cakic, V. Vasic, J. Serb. Chem. Soc. 68 (2003) 641-647; M. M. Mashaly, T. M. Ismail, S. B. El-maraghy, H. A. Habib, J. Coord. Chem. 57 (2004) 1099-1123; H. Yin, M. Hong, H. Xu, Z. Gao, G. Li, D. Wang, Eur. J. Inorg. Chem. (2005) 572-578; A. Cukurovali, I. Yilmaz, S. Kirbag, *Transition Met. Chem.* 31(2006) 207-213; M. Belicchi-Ferrari, F. Bisceglie, C. Cavalieri, G. Pelosi, P. Tarasconi, *Polyhedron* 26 (2007) 3774-3782]. În spectrul IR al ligandului apare o bandă puternică la  $1617\text{ cm}^{-1}$ , atribuită  $\nu(\text{C}=\text{N})$ . În spectrele complexilor corespunzători, această bandă este deplasată spre frecvențe mai mici cu circa  $10\text{--}14\text{ cm}^{-1}$ , sugerând coordonarea ligandului la metalul central, prin atomul de azot azometinic. De asemenea, frecvența de întindere  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a grupării antipirinică, datorată grupării carbonil exociclice de la  $1664\text{ cm}^{-1}$  din ligandul liber, este deplasată în spectrul IR al complexilor (1...3), la numere de undă mai mici cu  $17\text{--}20\text{ cm}^{-1}$ . Aceasta indică faptul că atomul de oxigen carbonilic exociclic este legat de ionul metalic [K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley and Sons, New York, 1986; K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, fifth ed., Wiley-Interscience, New York, 1997; P. Mosae Selvakumar, E. Suresh and P. S. Subramanian, *Polyhedron* 26, 749-754]. Complexul 2 prezintă o singură bandă la circa

1382 cm<sup>-1</sup>. Aceasta este atribuită grupării NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ionice. Complexul 3 cu acetat are două benzi puternice la 1687 și 1390 cm<sup>-1</sup>, corespunzătoare  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  și, respectiv,  $\nu_s(\text{COO}^-)$ , cu o diferență între frecvențe de 297 cm<sup>-1</sup>. Această diferență confirmă natura monodentată a coordonării grupării acetat [K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley and Sons, New York, 1986; K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, fifth ed., Wiley-Interscience, New York, 1997; P. Mosae Selvakumar, E. Suresh and P. S. Subramanian, *Polyhedron* 26 (2007) 749-754; M. Belicchi-Ferrari, F. Bisceglie, C. Cavalieri, G. Pelosi, P. Tarasconi, *Polyhedron* 26 (2007) 3774-3782].

### 3. Spectrul electronic și momentul magnetic

Spectrul electronic de absorbție este foarte important în evaluarea investigațiilor structurale. Spectrul electronic în stare policristalină al ligandului L indică tranziții intraligand  $\pi \rightarrow \pi^*$  și  $n \rightarrow \pi^*$ , cu absorbția maximă la 39520...37340 cm<sup>-1</sup> și, respectiv, 31120...27810 cm<sup>-1</sup> [A. Sreekanth, S. Sivakumar, M. R. P. Kurup, *J. Mol. Struct.* 655 (2003) 47-53; R. P. John, A. Sreekanth, M. R. P. Kurup, S. M. Mobin, *Polyhedron* 21 (2002) 2515-2521].

Aceste benzi sunt deplasate spre energii mai mici după complexare, și apar noi benzi la 29880...26980 cm<sup>-1</sup>, care pot fi atribuite benzilor cu transfer de sarcină N → M(II).

În spectrul electronic al complexului 1 apar trei benzi de absorbție de intensitate medie la 9430, 12200 și, respectiv, 18520 cm<sup>-1</sup>. Aceste benzi pot fi atribuite tranzițiilor d-d:  $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$ ,  $d_z^2 \rightarrow d_{xy}$ ,  $d_z^2 \rightarrow d_{xz, yz}$ . În complexul tetragonal, electronul impar se află în orbitalul  $d_z^2$  cu termenul stării fundamentale  $^2A_{1g}$  [C. A. Bates, W. Smoore, K. J. Standley, K. W. H. Stevens, *Proc. Phys. Soc.* 79 (1962) 73-75; A. P. B. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, second ed. Elsevier Science, New York, 1984; R. P. John, A. Sreekanth, V. Rajakannan, T. A. Ajith, M. R. P. Kurup, *Polyhedron* 23 (2004) 2549-2559]. În spectrul electronic al complexului 2 s-a observat o bandă largă la circa 13000 cm<sup>-1</sup>, datorată tranziției  $d_{xy} \rightarrow d_z^2$ ,  $d_{x^2-y^2}$ , sugerând o geometrie pseudo-tetraedrică în jurul ionului metalic central. Valoarea momentului magnetic (1,90 MB) măsurat la temperatura camerei indică un compus paramagnetic [R. L. Carlin (Ed.), *Transition Metal Chemistry*, second ed. Marcel Decker, New York, 1969]. Spectrul electronic al complexului 3 prezintă benzi d-d la 10900, 12110 și, respectiv, 20300 cm<sup>-1</sup>, care pot fi atribuite tranzițiilor  $d_{x^2-y^2} \rightarrow d_z^2$ ,  $d_{x^2-y^2} \rightarrow d_{xy}$ ,  $d_{x^2-y^2} \rightarrow d_{xz, yz}$ , datorate unei geometrii octaedrice distorsate ( $D_{4h}$ ) [R. L. Former, F. L. Vrbach, *Inorg. Chem.* 13 (1974) 587-591; G. Wilkinson, D. R. Gillard, A. J. McCleverty (Eds.), *Comprehensive Coordination Chemistry*, vol. 5, Pergamon Press, New York, 1987, pp. 533-775; J. R. Zamian, E. R. Dockal, G. Castellano, G. Oliva, *Polyhedron* 14 (1995) 2411-2412; X. R. Bu, E. A. Mintz, Z. Y. Xiao, X. W. Rei, Q. Yue, M. J. Qin, J. L. Yun, D. Van Derveer, *Polyhedron* 15 (1996) 4585-4591]. Valoarea momentului magnetic în jur de 2,00 MB indică un electron impar pentru un ion Cu(II) într-un aranjament octaedric [R. L. Carlin (Ed.), *Transition Metal Chemistry*, second ed. Marcel Decker, New York, 1969].

### 4. Spectrul RPE

Parametrii spectrali RPE ai complexelor Cu(II) 1...3 în stare policristalină la 298 K și în soluție DMSO la 298 K și 77 K sunt prezentați în tabelul 4. Spectrul complexelor 1 și 3 indică un comportament tipic axial, cu diferențe mici ale valorilor lui  $g_{//}$  și  $g_{\perp}$  (fig. 2). Pentru complexul Cu(II) 3, valorile tensorilor  $g_{//} > g_{\perp} > 2,0023$  sunt în concordanță cu starea fundamentală  $d_{x^2-y^2}$ , în timp ce pentru complexul 1 valorile tensorilor  $g_{//} < g_{\perp}$  sugerează o stare fundamentală  $d_z^2$ . Valoarea tensorului  $g_{//} = 2,402$  pentru complexul 2 este în acord cu starea fundamentală  $d_{xy}$  [B. J. Hathaway, D. E. Billing, *Coord. Chem. Rev.* 5 (1970) 143-207;



M. J. Bew, B. J. Hathaway, R. R. Faraday, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1972) 1229-1237; V. Suresh Babu, A. Ramesh, P. Raghuram, R. R. Naidu, Polyhedron 16 (1997) 607-612; S. Djebbar-Sid, O. Benali-Baitich, J. P. Deloume Polyhedron 16 (1997) 2175-2182]. Aceste date sunt în concordanță cu cele obținute din spectrele electronice, și confirmă geometria octaedrică distorsată axial prin comprimare pentru complexul 1, geometria tetraedrică pentru complexul 2, și tetragonală pentru complexul 3.

Tabelul 4

Parametrii spectrali RPE pentru complexii metalici 1...3

|                                | 1     | 2     | 3     |
|--------------------------------|-------|-------|-------|
| Pulbere policristalină (298 K) |       |       |       |
| $g_{//}$                       | 2,060 | 2,402 | 2,278 |
| $g_{\perp}$                    | 2,232 | 2,080 | 2,100 |
| DMSO (77 K)                    |       |       |       |
| $g_{//}$                       | 2,402 | 2,402 | 2,300 |
| $g_{\perp}$                    | 2,180 | 2,080 | 2,080 |
| $A_{//}$                       | 125   | 150   | 188   |
| $\alpha^2$                     | 0,862 | 0,888 | 0,892 |
| $\beta^2$                      | 0,994 | 0,995 | 0,826 |
| $\delta^2$                     | 0,868 | 0,875 | 0,841 |
| $K_{//}$                       | 0,857 | 0,884 | 0,736 |
| $K_{\perp}$                    | 0,749 | 0,777 | 0,750 |

Parametrii RPE  $g_{//}$ ,  $g_{\perp}$ ,  $A_{//}$  și energiile tranzițiilor d-d au fost utilizate pentru evaluarea parametrilor de legătură  $\alpha^2$ ,  $\beta^2$ ,  $\delta^2$  (tabelul 4), care pot fi considerați o măsură a covalenței legăturii  $\sigma$  în plan, legăturii  $\pi$  în plan și în afara planului [A. H. Maki and B. R. McGarvey, J. Chem. Phys. 29 (1958), 31-34].

Factorii de reducere orbitală  $K_{//}$  și  $K_{\perp}$  au fost calculați folosind expresiile descrise anterior [M. Joseph, M. Kuriakose, M.R.P. Kurup, E. Suresh, A. Kishore, S.G. Bhat, Polyhedron 25 (2006) 61-70]. În conformitate cu Hathaway, pentru o legătură  $\sigma$  pură  $K_{//} \approx K_{\perp} \approx 0,77$ ; pentru o legătură  $\pi$  în plan  $K_{//} < K_{\perp}$  și pentru o legătură  $\pi$  în afara planului  $K_{//} > K_{\perp}$  [B. J. Hathaway, Structure and Bonding, Springer Verlag, Heidelberg, 1973, 60; B. N. Figgis, Introduction to Ligands Fields, Interscience, New York, 1966, 295]. Valorile  $K_{//}$ ,  $K_{\perp}$  în complexii 1 și 2 sunt în acord cu relația  $K_{//} > K_{\perp}$ , ceea ce indică prezența unor legături  $\pi$  în afara planului. Pentru complexul 3, valorile  $K_{//}$ ,  $K_{\perp}$  indică prezența unor legături  $\pi$  în plan. Valorile parametrilor  $K_{//}$ ,  $K_{\perp}$  obținute sunt în acord cu parametrii de legătură  $\alpha^2$ ,  $\beta^2$ ,  $\delta^2$ .

#### 5. Spectrul RMN

Spectrul RMN al ligandului liber a fost determinat în DMSO-  $d_6$ . Datele spectrale H-RMN și C-RMN au fost prezentate împreună cu aranjamentele posibile. Toți protonii au fost găsiți în regiunile așteptate [W. W. Simmons, The Sadtler Handbook of Proton NMR Spectra. Sadtler Research Laboratories, Inc, Philadelphia, 1978; D. J. Pasto, Organic Structure Determination. Prentice Hall International, London, 1969]. S-a observat, de asemenea, că DMSO nu are niciun efect de coordonare asupra ligandului.

## 6. Testarea activității biologice

## 6.1. Activitatea antibacteriană și antifungică

Compușii sintetizați au fost testați *in vitro* pentru activitatea antibacteriană împotriva unei diversități de bacterii:

## a) bacterii gram-pozitive:

1. *Staphylococcus aureus* var. Oxford 6538;
2. *Klebsiella pneumoniae* A TCC 100131;
3. *Legionella monocytogenes* A TCC 35182;

## b) bacterii gram-negative:

1. *Escherichia coli* A TCC 10536;
2. *Pseudomonas aeruginosa* A TCC 9027;
3. *Salmonella typhimurium* A TCC 14028.

Pentru testarea activității antifungice au fost utilizate două tulpini: *Candida albicans* și *Aspergillus flavus*.

Metodologia utilizată pentru aceste testări a vizat atât determinarea cantitativă, prin folosirea tehnicii de difuzie în disc pe hârtie [A. Barry, **Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media**, in: Lorian (Ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**, fifth ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1991], cât și determinarea concentrației inhibitorii minime (MIC), prin metoda diluțiilor succesive [Methods for Anti-microbial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline Document M45-A 26(19). National Committee for Clinical Laboratory Standard, NCCLS, Villanova PA USA, 1999]. Pentru control au fost utilizate medicamente standard: streptomicina și fluconazolul.

*Metoda difuziei în disc*

Suspensii celulare în soluție sterilă de peptonă în apă, destinate cultivării microorganismelor pentru 24 h, au fost ajustate la valoarea McFarland standard de 0,5. Aceste suspensii au fost inoculate în vase Petri de 90 mm diametru. Discuri de hârtie de 6 mm diametru, conținând câte 10  $\mu$ l de soluție de compuși de testat (la concentrație de 2048  $\mu$ g/ml în DMSO), au fost așezate circular în fiecare vas inoculat. După 24 h de incubare la 37°C, rezultatele au fost citite prin măsurarea ariilor de inhibare indusă de substanțe.

Determinarea MIC ( $\mu$ g/ml) a fost testată prin realizarea de diluții succesive ale compușilor testați în bulion lichid, în plăci cu 96 de godeuri. Au fost utilizate suspensii de microorganisme aduse la valoarea McFarland standard de 0,5, și diluții de compus testat în bulion Muller-Hinton la concentrațiile 1024; 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2  $\mu$ g/ml. Concentrația inhibitorie minimă a fost stabilită după 18, respectiv, 24 h de incubare la 37°C, ca fiind concentrația cea mai mică la care creșterea microorganismelor a fost inhibată.

Rezultatele (tabelul 5) au indicat faptul că ligandul nu are activitate antimicrobiană, în timp ce complexii sintetizați au activitate antimicrobiană împotriva unor microorganisme în aceleași condiții experimentale testate. Lipofilicitatea mai ridicată a complexilor poate explica aceste rezultate pe baza teoriei chelării [J. W. Searl, R. C. Smith and S. J. Wyard, **Proc. Phys. Soc.** 78 (1961) 1174-1176].

Tabelul 5

Activitatea antibacteriană a ligandului L și complexilor 1...3 ca valori MIC ( $\mu$ g/mL)

| Compus                                    | Bacterii gram-pozitive <sup>a</sup> |    |     | Bacterii gram-negative <sup>b</sup> |    |       | Fungi <sup>c</sup> |      |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|----|-----|-------------------------------------|----|-------|--------------------|------|
|                                           | Sa                                  | Kp | Lm  | Ec                                  | Pa | Salty | Ca                 | Asfl |
| L                                         | 128                                 | 64 | 128 | 64                                  | 64 | 64    | 512                | 256  |
| [Cu(L) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] (1) | 128                                 | 64 | 64  | 32                                  | 64 | 64    | 256                | 256  |

Tabelul 5 (continuare)

| Compus                                                   | Bacterii gram-pozitive <sup>a</sup> |      |    | Bacterii gram-negative <sup>b</sup> |      |       | Fungi <sup>c</sup> |      |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------|------|----|-------------------------------------|------|-------|--------------------|------|
|                                                          | Sa                                  | Kp   | Lm | Ec                                  | Pa   | Salty | Ca                 | Asfl |
| [Cu(L) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2) | 64                                  | 128  | 32 | 64                                  | 32   | 16    | 128                | 128  |
| [Cu(L) <sub>2</sub> (OAc) <sub>2</sub> ] (3)             | 4                                   | 8    | 8  | 16                                  | 16   | 32    | 64                 | 128  |
| CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                    | 1024                                | -    | -  | 1024                                | 512  | 1024  | -                  | 512  |
| Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O    | -                                   | 1024 | -  | 1024                                | 1024 | 1024  | -                  | 1024 |
| Cu(OAc) · H <sub>2</sub> O                               | -                                   | -    | -  | 1024                                | 1024 | 1024  | -                  | 1024 |
| Streptomicină                                            | 4                                   | 8    | 4  | 8                                   | 16   | 16    | -                  | -    |
| Fluconazol                                               | -                                   | -    | -  | -                                   | -    | -     | 2                  | 4    |

<sup>a</sup>Sa (*Staphylococcus aureus* var. Oxford 6538), Kp (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 100131), Lm (*Legionella monocytogenes* ATCC 35182), Ec (*Escherichia coli* ATCC 10536), Pa (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), Salty (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028). <sup>c</sup>Ca (*Candida albicans*) and Asfl (*Aspergillus flavus*)

Complecșii sintetizați au efecte inhibitorii comparabile (cu MIC între 4 și 256 μg/ml). Rezultatele testelor antibacteriene dovedesc că ligandul sub formă de bază Schiff, L, devine mult mai eficient când este coordonat cu ioni metalici. Astfel, complexul 3 a prezentat o activitate antibacteriană ridicată împotriva bacteriilor gram-pozitive *S. aureus* (MIC = 4...8 μg/ml), *K. pneumoniae* (MIC = 8 μg/ml), *L. monocytogenes* (MIC = 4...8 μg/ml), și împotriva bacteriilor gram-negative *E. coli* (MIC = 16 μg/ml), *P. Aeruginosa* (MIC = 16...64 μg/ml), *Sal. Typhimurium* (MIC = 32 μg/ml), în comparație cu baza Schiff însăși.

Structura compușilor testați pare a fi principalul factor care influențează activitatea antimicrobiană. Activitatea bactericidă ridicată a complexului 3 este probabil datorată geometriei plan-pătrate pe care o adoptă în soluție (în DMSO g/l = 2,300, g/l = 2,080). Existența grupărilor anionice din apropierea siturilor de coordonare au și ele efecte asupra activității antimicrobiene, așa cum dovedesc rezultatele. Testarea antimicrobiană a dovedit că baza Schiff și noii compuși sintetizați 1 și 2 prezintă o activitate biologică mai scăzută în comparație cu cea a medicamentelor control.

#### 6.2. Activitatea antiproliferativă asupra celulelor tumorale umane

Pentru determinarea activității antiproliferative a compușilor sintetizați, a fost utilizată monitorizarea mitozelor prin videomicroscopie în timp real [M. Leabu, M. E. Hinescu, S. Uniyal, B. M. C. Chan, J. Cell. Mol. Med. 7 (2003) 192-193; M. Leabu, S. Uniyal, J. Xie, Y. Q. Xu, C. Vladau, V. L. Morris, B. M. Chan, J. Cell. Physiol. 202 (2005) 754-766], utilizându-se echipamentul destinat unor asemenea studii BioStation IM (Nikon Corp., Amsterdam). Au fost utilizate două linii celulare tumorale umane: HeLa (provenite din cancer de col uterin) și MCF7 (linie de carcinom ductal mamar). Celulele au fost însămânțate în vase Petri cu diametrul de 35 mm și baza de sticlă la o densitate de  $1,5 \times 10^4$  celule/cm<sup>2</sup>, în mediu DMEM suplimentat cu 10% ser fetal de vițel. După 4 h de incubare (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pentru aderare și etalare, celulele au fost urmărite în câmpul optic al BioStation IM timp de 18 h înainte, și 30 h după tratamentul cu 10 μM compus de testat. Imaginile destinate cuantificării mitozelor au fost colectate din 5 în 5 min pentru 6 câmpuri microscopice diferite, în fiecare condiție experimentală. Mitozele au fost numărate, și valorile considerate pentru grupe de 6 h experimentale (trei valori înainte și 5 valori după tratament). Experimente identice au fost realizate pentru liganzi, respectiv, compușii complecși.

1 Rezultatele au fost diferențiate atât în privința activității antiproliferative pe cele două  
linii celulare investigate, cât și în privința efectelor diferite ale liganzilor, respectiv, compușilor  
3 complecși sintetizați.

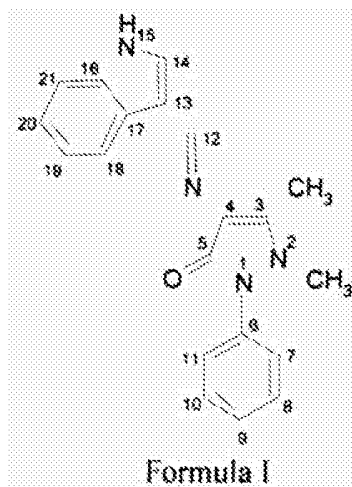
Ligandul L nu a avut niciun efect antiproliferativ asupra ambelor linii celulare (fig. 4,  
5 A). Mai mult, acesta prezintă o stimulare tranzitorie a proliferării ambelor tipuri celulare în  
primele 12 h după tratament. Compușii complecși 1 și 3 au inhibat complet proliferarea  
7 celulelor HeLa după 18 h de tratament. Totuși, compusul 1 are numai un efect parțial asupra  
proliferării celulelor MCF7, în timp ce compusul 3 nu a dovedit niciun efect antiproliferativ  
9 (fig. 4, B, respectiv, D). Pe de altă parte, compusul 2 are un efect slab de stimulare a prolifera-  
rării celulelor HeLa, dar niciun efect asupra proliferării celulelor MCF7 (fig. 4, C).

11 Analizele chimice și fizico-chimice, conform invenției, confirmă compoziția și structura  
noilor combinații complexe obținute. Abilitatea la coordonare a ligandului bază Schiff L a fost  
13 dovedită în reacția de complexare cu ionul de Cu (II). În toți complecșii, ligandul L  
funcționează neutru bidentat. Spectrul RPE al complecșilor 1...3 în soluție DMSO confirmă  
15 noile structuri. Prin urmare, aceste geometrii par a fi principalul factor care influențează  
activitatea antimicrobiană. Complecșii metalici au o activitate mai bună comparativ cu  
17 ligandul liber, iar activitatea antimicrobiană depinde de structura compusului testat.  
Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene a dovedit că atât ligandul, cât și  
19 combinațiile complexe au o activitate antimicrobiană specifică, ce depinde de specia  
microbiană testată.

21 Compușii 1 și 3 inhibă proliferarea celulelor HeLa în diferite moduri, în timp ce  
tratamentul cu ligand nu are niciun efect semnificativ.

## Revendicări

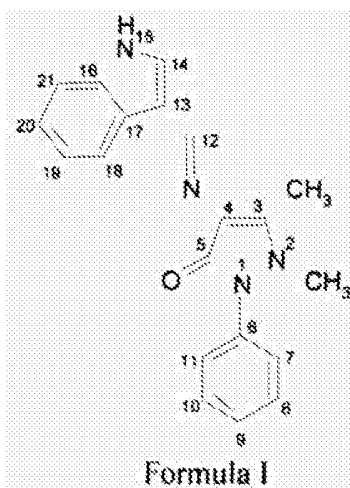
1. Combinație complexă a Cu (II) cu formula generală  $[Cu(L)_2X_2]$ , unde L este 1-fenil-2,3-dimetil-4-(N-indol-3-carboxaldehid)-3-pirazolin-5-onă cu formula I:



și

X este  $Cl^-$  sau  $OAc^-$ ; ( $OAc^- = CH_3COO^-$ ).

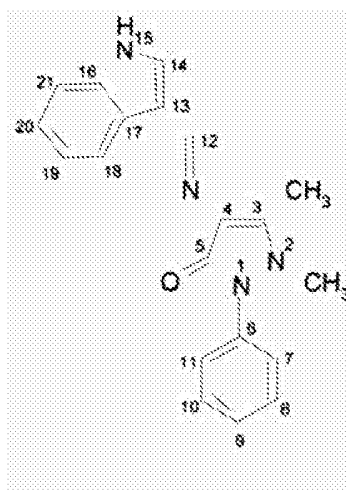
2. Combinație complexă a Cu (II) cu formula generală  $[Cu(L)_2](NO_3)_2$ , unde L este 1-fenil-2,3-dimetil-4-(N-indol-3-carboxaldehid)-3-pirazolin-5-onă cu formula I:



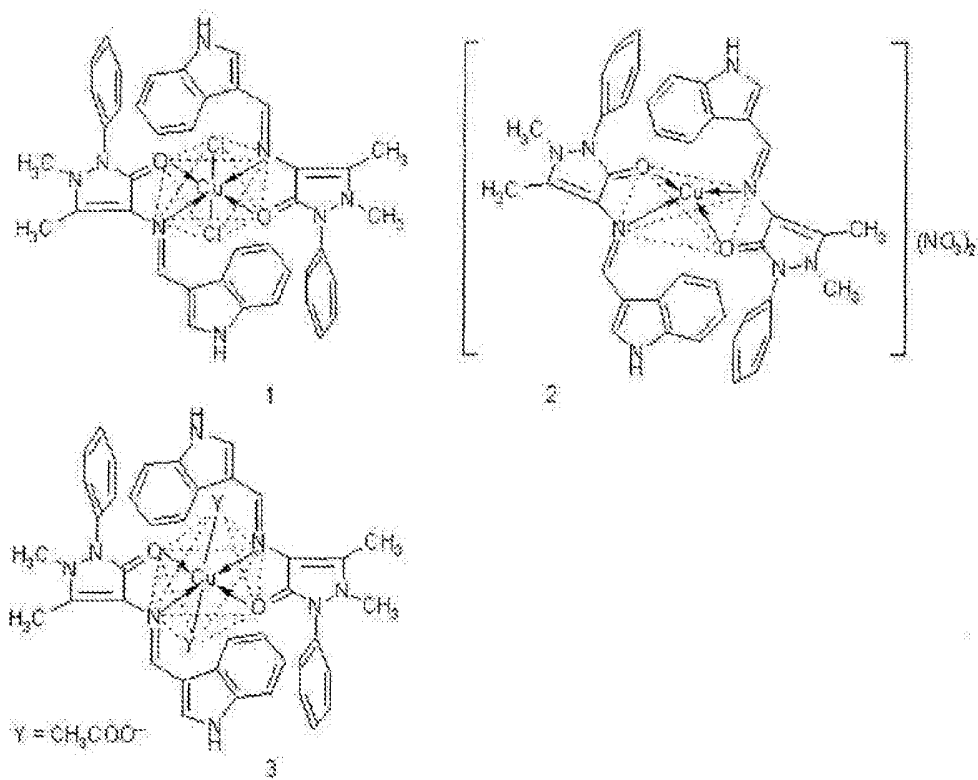
3. Combinație complexă  $[Cu(L)_2(OAc)_2]$ , conform revendicării 1, pentru utilizare ca medicament cu activitate antibacteriană.

4. Combinație complexă, conform revendicării 3, în care activitatea antibacteriană este exercitată împotriva bacteriilor gram-pozitive *S. aureus*, *K. Pneumoniae*, *L. monocytogenes* și împotriva bacteriilor gram-negative *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *Sal. Typhimurium*.

5. Combinație complexă  $[Cu(L)_2X_2]$ , unde X =  $Cl^-$ ,  $OAc^-$ , conform revendicării 1, pentru inhibarea proliferării celulelor tumorale.



Schema 1

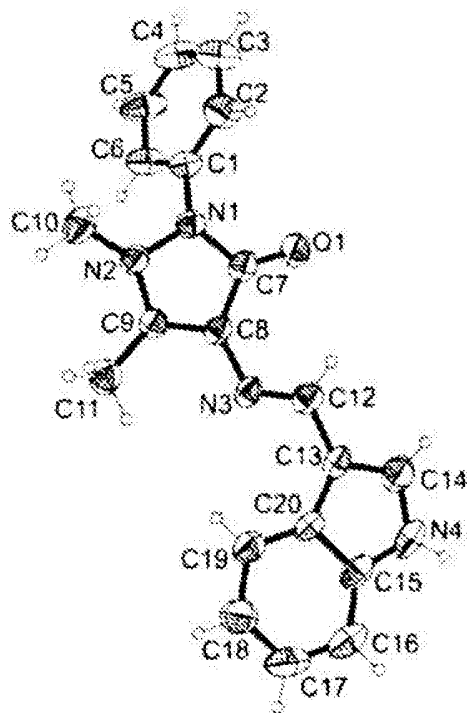


Schema 2

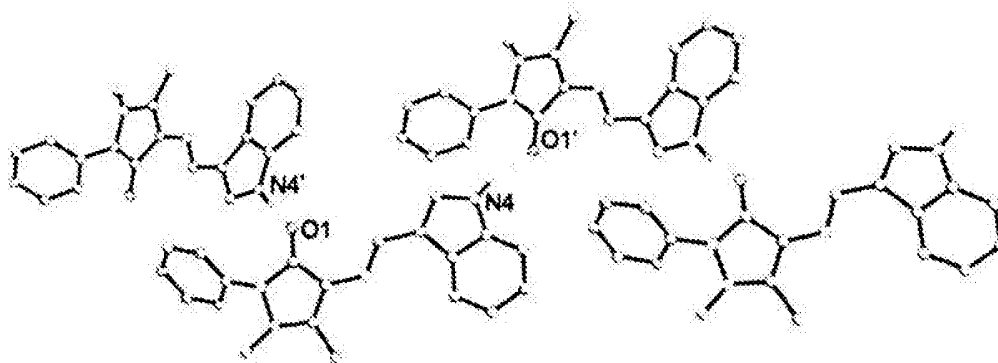
(51) Int.Cl.

**A61K 33/34** (2006.01),

**A61P 31/04** (2006.01)



a



b

Fig. 1

(51) Int.Cl.

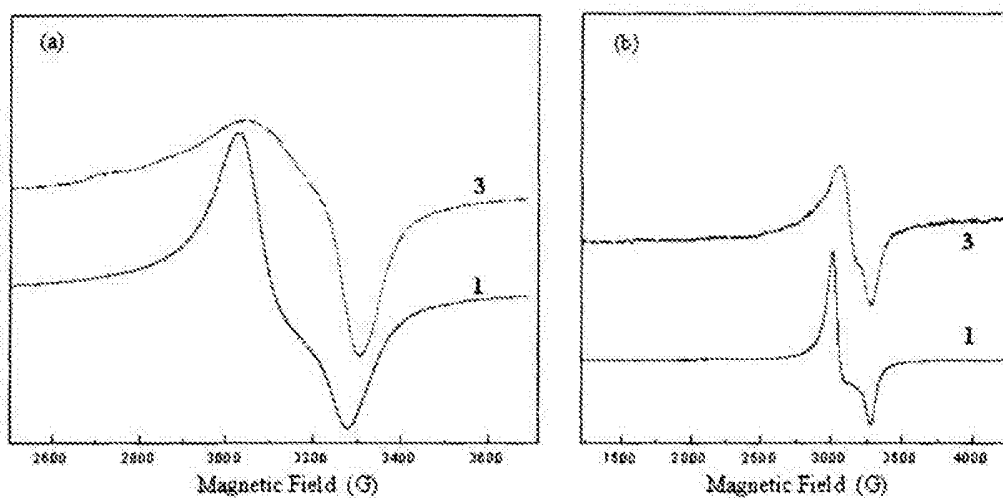
**A61K 33/34** (2006.01),**A61P 31/04** (2006.01)

Fig. 2

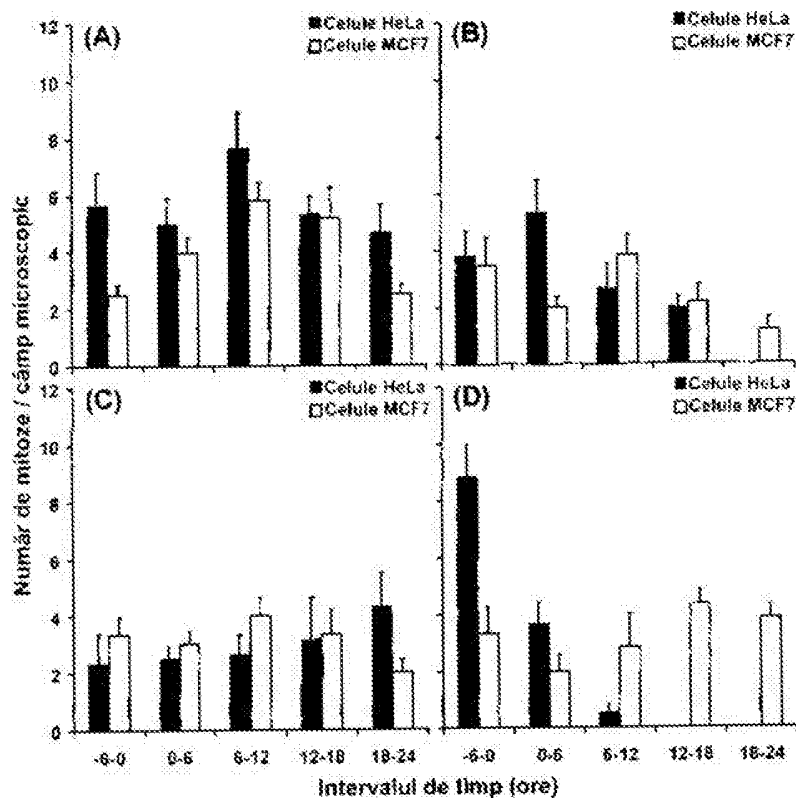


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 570/2017