



MD 4133 B1 2011.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4133** ⁽¹³⁾ **B1**

(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 59/19 (2006.01)
C07C 311/39 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/63 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

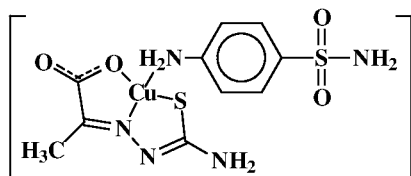
Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2010 0083 (22) Data depozit: 2010.07.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.10.31, BOPI nr. 10/2011
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; LOZAN-TÎRȘU Carolina, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) [(2-Carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru,
care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din genul
Bacillus cereus

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ al cuprului biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților.

Esența invenției constă în sinteza unui nou compus al cuprului cu doi liganzi biologic activi [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru cu formula:



Compusul manifestă activitate bacterio-
statică și bactericidă înaltă față de bacteriile din
genul *Bacillus cereus*. Datorită acestor pro-
prietăți el poate găsi aplicare în medicină și
medicina veterinară în calitate de preparat anti-
microbian.

Rezultatul constă în aceea că noul compus
manifestă activitate antimicrobiană față de
bacteriile din genul *Bacillus cereus* de 33...156
ori mai înaltă decât furacilina și aproximativ de
1·10⁵ ori mai înaltă decât analogul structural -
complexul cuprului cu tiosemicarbazona 2-for-
milpiridinei.

Revendicări: 2

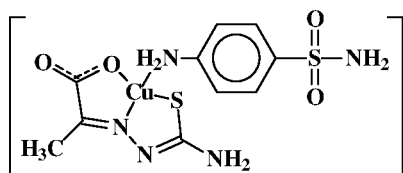
MD 4133 B1 2011.10.31

(54) [(2-Carbamotioylhydrazone)propionato(2-)]-(4-aminobenzenesulfonylamide)copper, manifesting antimicrobial activity against bacteria of the genus *Bacillus cereus*

(57) Abstract:

1 The invention relates to chemistry and medicine, namely to a coordinative compound of biologically active copper from the class of thiosemicarbazones.

Summary of the invention consists in the synthesis of a new compound of copper with two biologically active ligands [(2-carbamotioylhydrazone)propionato(2-)]-(4-aminobenzenesulfonylamide)copper of formula:



2 The compound manifests high bacteriostatic and bactericidal activity against bacteria of the genus *Bacillus cereus*. Due to these properties it can be used in medicine and veterinary medicine as an antimicrobial drug.

The result consists in that the new compound manifests antimicrobial activity against bacteria of the genus *Bacillus cereus* 33...156 times higher than furacin and approximately $1 \cdot 10^5$ times higher than the structural analogue – the copper complex with 2-formylpyridine thiosemicarbazone.

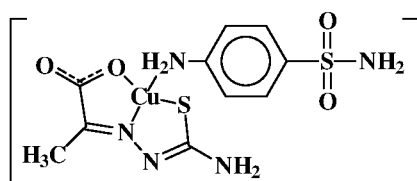
Claims: 2

(54) [(2-Карбамотионилгидразон)пропионато(2-)]-(4-аминобензолсульфамид)медь, проявляющая противомикробную активность по отношению к бактериям вида *Bacillus cereus*

(57) Реферат:

1 Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активному координационному соединению меди класса тиосемикарбазонатов.

Сущность изобретения заключается в синтезе нового соединения меди с двумя биологически активными лигандами [(2-карбамотионилгидразон)пропионато(2-)]-(4-аминобензолсульфамид)меди формулы:



2 Соединение проявляет высокую бактериостатическую и бактерицидную активность по отношению к бактериям вида *Bacillus cereus*. Благодаря этим свойствам оно может найти применение в медицине и ветеринарии в качестве противомикробного препарата.

Результат заключается в том, что новое соединение проявляет противомикробную активность по отношению к бактериям вида *Bacillus cereus* в 33...156 раза более высокую, чем фурацилин и примерно на 5 порядков выше, чем структурный аналог - комплекс меди с тиосемикарбазоном 2-формилпиридина.

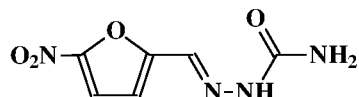
П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ al cuprului biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților.

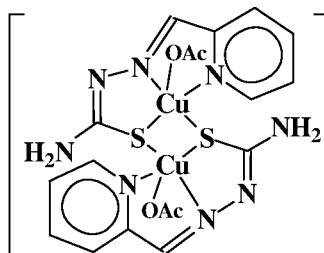
- 5 Acest compus coordinativ manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de bacteriile din genul *Bacillus cereus*. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și medicina veterinară în calitate de preparat antimicrobian.

10 *Bacillus cereus* reprezintă o bacterie levurică de sol, gram-pozitivă. Ea provoacă toxicoinfecții la om (inclusiv sindromul vomitiv și diareic), produce enterotoxine. În practica medicală pentru tratarea și profilaxia proceselor provocate de bacteria dată se utilizează compusul organic furacilină - semicarbazona aldehidei 5-nitro-2-furane, care are următoarea formulă :



Acest compus inhibă creșterea și multiplicarea bacteriilor din genul *Bacillus cereus* la concentrația 4,68 μg/mL, însă nu poate fi utilizat în cazurile, când este necesară o activitate antimicrobiană mai înaltă a preparatului față de bacteria sus-numită [1].

- 15 Se cunosc compuși coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazone care manifestă proprietăți antimicrobiene. De exemplu, chelatul cupru-tiosemicarbazona piridin-2-carboxaldehidei [2] cu formula:

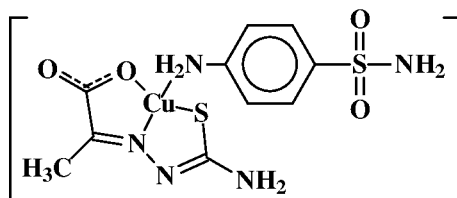


20

Dezavantajele complexului dat constau în faptul că el inhibă creșterea și multiplicarea bacteriilor din genul *Bacillus cereus* în limitele concentrațiilor 5...40 mg/mL, însă nu a putut găsi aplicare în practica medicală din cauza activității scăzute față de microorganismele gram-pozitive și gram-negative.

- 25 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui compus coordinativ nou, care posedă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de bacteriile din genul *Bacillus cereus*.

Esența invenției constă în sinteza unui nou compus al cuprului cu doi liganzi biologic activi [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru cu formula:



30

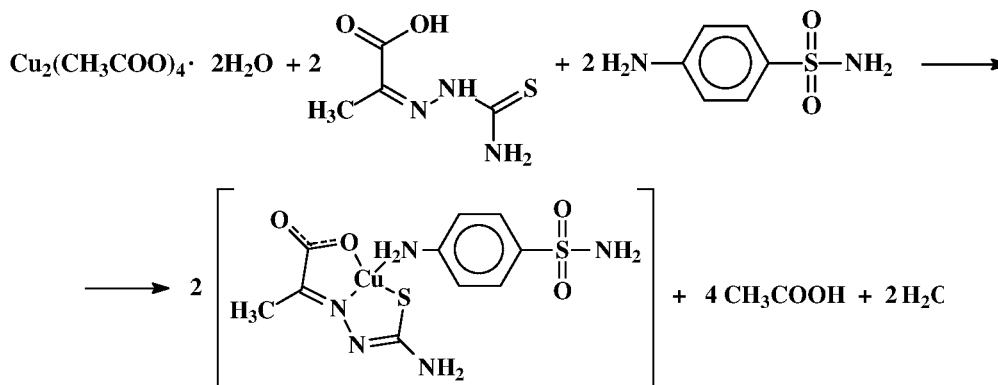
Rezultatul invenției constă în aceea că noul compus manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din genul *Bacillus cereus* de 33...156 ori mai înaltă decât furacilina și aproximativ de 1·10⁵ ori mai înaltă decât analogul structural – complexul cuprului cu tiosemicarbazona 2-formilpiridinei.

- 35 Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitor de creștere și multiplicare a bacteriilor din genul *Bacillus cereus* se propune un compus coordinativ al cuprului cu streptocidul și tiosemicarbazona acidului piruvic, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Complexul dat, proprietățile lui și metoda de sinteză nu sunt descrise în literatură.

Compusul revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50...55°C) ale acetatului de cupru(II) monohidrat cu tiosemicarbazona acidului piruvic și 4-aminobenzensulfamida (streptocid), luate în raportul molar 1:1:1. Reacția decurge în 50...60 min conform următoarei scheme:

5



Mecanismul reacției constă în deprotonizarea grupelor carboxilice și tiolice ale tiosemicarbazonei în prezența acetat-ionilor sării inițiale, care joacă rolul de acceptor de protoni. Astfel obținut, anionul (2-carbamotioilhidrazon)-propionat(2-) coordonează la ionul de cupru(2+) ca un ligand O,N,S-tridentat dublu deprotonizat. Al patrulea loc în sfera internă a atomului central îl ocupă atomul de azot al moleculei de streptocid.

Procedeeul de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 77% față de cel teoretic calculat. Tiosemicarbazona acidului piruvic se obține ușor după metoda descrisă (Китаев Ю. П., Бузыкин Б. И. Гидразоны. Москва, Наука, 1974, с. 225-226). Complexul sintetizat are culoarea verde întunecată, este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

Exemplu de obținere a [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru.

La suspensia etanolică, care conține 10 mmol de acetat de cupru(II) monohidrat în 50 mL etanol, încălzită (50...55°C) și amestecată în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic, se adaugă soluție de 10 mmol de tiosemicarbazona acidului piruvic și 10 mmol de streptocid (4-aminobenzensulfamidă) în 100 mL de alcool etilic. După aceasta, amestecul reactant se refluxează în decurs de 50...60 min. La răcire din amestecul reactant se depun cristale mărunte de culoare verde întunecată, care se filtrează prin filtru din sticlă, se spală cu C₂H₅OH, eter și se usucă în aer.

S-a determinat, % : C – 30,30, H – 3,55, Cu – 15,91; N – 17,77, S – 16,48.

Pentru C₁₀H₁₃CuN₅O₄S₂ s-a calculat, % : C – 30,41; H – 3,32; Cu – 16,09; N – 17,73; S – 16,24.

Cercetarea vizuală sub microscop a compusului coordinativ sintetizat demonstrează că el posedă omogenitate fazică. Din cauza dimensiunilor mici și absenței monocristalelor acestui complex, pentru determinarea individualității componenței lui și structurii probabile au fost utilizate metodele de analiză a elementelor, spectroscopia IR, magnetochimia și termogravimetria.

Determinarea conductibilității electrice molare în dimetilformamidă a [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru revendicat a demonstrat că el este un neelectrolit [$\Lambda^0 = 4 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 20°C, C_M=0,001 mol/L].

Cercetarea magnetochimică la temperatura camerei (294K) a complexului revendicat a demonstrat că valoarea obținută a momentului lui magnetic efectiv este apropiată de valoarea de spin pentru un electron necuplat [$\mu_{\text{ef}} = 1,87 \text{ m. B.}$]. Faptul acesta ne permite să presupunem că substanța cercetată are structură monomerică.

În scopul determinării modului de coordonare a liganzilor la ionul de cupru a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compusului revendicat, tiosemicarbazonei acidului piruvic și streptocidului. S-a stabilit că tiosemicarbazona în complex se comportă ca un ligand tridentat dublu deprotonizat, coordonându-se la ionul central prin intermediul atomului de oxigen carboxilic, atomului de azot al grupei C=N și al sulfului, cu formarea a două metalocicluri din cinci atomi. În favoarea acestui fapt indică dispariția în spectrul IR al substanței revendicate a benzilor de absorbție $\nu(\text{NH})$ și $\nu(\text{C}=\text{S})$, care în tiosemicarbazona liberă se observă corespunzător în domeniile 3450...3150

și 1125...1115 cm^{-1} . În afară de aceasta, în spectru se observă banda de absorbție $\nu(\text{C-S})$ la 785 cm^{-1} , iar benzile $\nu_s(\text{COO}^-)$, $\nu_a(\text{COO}^-)$ și $\nu(\text{C=N})$ se deplasează cu 15...30 cm^{-1} spre frecvența mai mică [în tiosemicarbazona inițială ele se observă în domeniile 1605, 1375 și 1630 cm^{-1} corespunzător]. În domeniul 1570...1560 cm^{-1} al spectrului complexului se observă banda de absorbție, care este condiționată de oscilațiile de valență $>\text{C=N-N=C}<$. Acest caracter al spectrelor IR demonstrează enolizarea tiosemicarbazonei în procesul de formare a complexului revendicat. În afară de aceasta, în spectrul IR al complexului revendicat, în domeniul 530...400 cm^{-1} apar patru benzi noi de absorbție, care conform datelor din literatură, se detectează ca $\nu(\text{Cu-N})$, $\nu(\text{Cu-O})$ și $\nu(\text{Cu-S})$. Prezența în complexul revendicat a 4-aminobenzensulfamidei (streptocidului) se confirmă prin existența în spectrul lui a benzilor de absorbție caracteristice [$\nu(\text{NH}) = 3420, 3340, 3190, 3175, 1520$, $\delta(\text{C-N}) = 1335, 1118$, $\nu_s(\text{SO}_2) = 1322$, $\nu_{as}(\text{SO}_2) = 1145$, $\nu(\text{C-N}) = 987, 938$, $\nu(\text{S-N}) = 855$, $\delta(\text{SO}_2) = 564 \text{ cm}^{-1}$].

Analiza termică a demonstrat că pe derivatograma [(2-carbamotioilhidrazon)-propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru se observă un singur efect exotermic la 460°C, care corespunde procesului de destrucție termooxidativă a liganzilor organici din complex.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și cercetărilor fizico-chimice a fost stabilită compoziția și structura probabilă a compusului revendicat.

Determinarea activității antimicrobiene a [(2-carbamotioilhidrazon)-propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru a fost efectuată în mediu nutritiv lichid [bulion peptonat din carne de 2%, pH 7,0] prin metoda diluțiilor succesive. În calitate de cultură de referință în experimentul *in vitro* au fost folosite tulpinile standard de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ГИСК 8035), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella sonnei* și *Salmonella abony* (ГИСК 03/03). Dizolvarea substanțelor studiate în dimetilformamidă, cultivarea microorganismelor, obținerea suspensiei, determinarea concentrației minime de inhibare (CMI) și concentrației minime bactericide (CMB) au fost efectuate după metoda standard descrisă în literatură.

Rezultatele studiului activității antimicrobiene a [(2-carbamotioilhidrazon)-propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru sunt prezentate în tabel, din care se vede că compușii inițiali nu manifestă activitate antimicrobiană față de microorganismele sus-numite, iar complexul revendicat posedă activitate bacteriostatică și bactericidă în limitele concentrațiilor 0,03...75,0 $\mu\text{g/mL}$ față de bacteriile gram-pozitive și 150,0...300,0 $\mu\text{g/mL}$ față de microorganismele gram-negative. Pentru comparație în același tabel sunt prezentate rezultatele activității antimicrobiene caracteristice furacilinei [1] și analogului proxim [2]. Datele experimentale obținute demonstrează că compusul revendicat manifestă o activitate antimicrobiană față de bacteriile de genul *Bacillus cereus*, care depășește de 33...156 ori caracteristicile analoge ale furacilinei [1] și de 1,7...2,9 $\cdot 10^5$ ori caracteristicile analogului structural [2].

Proprietățile depistate ale compusului nominalizat prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antimicrobiene și poate fi utilizat în cazul rezistenței bacteriilor din genul *Bacillus cereus* față de medicamentele tradiționale.

Concentrația minimă de inhibare (CMI) și concentrația bactericidă minimă (CBM) a compusului coordonativ revendicat față de microorganismele gram-pozitive și gram-negative (μg/mL)

5

Compusul	Microorganismele gram-pozitive				Microorganismele gram-negative					
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035		<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Salmonella abony</i> , ГИСК 03/03	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
Compușii inițiali ^{a)}	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
[(2-carbamotioilhidrazon)-propionato(2-)]-(4-amino-benzensulfamid)cupru	37,5	75	0,03	0,14	> 300	> 300	> 300	> 300	150	300
Furacilina	2,34	9,37	4,68	4,68	2,34	9,37	2,34	4,68	4,68	4,68
Analogul structural	1250	40000	5000	40000	1250	40000	b	b	b	b

Notă: a) Compușii inițiali – $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tiosemicarbazona acidului piruvic, 4-amino-benzensulfamida (streptocidul), b) activitatea antimicrobiană a analogului structural față de aceste tulpini în [2] nu a fost studiată.

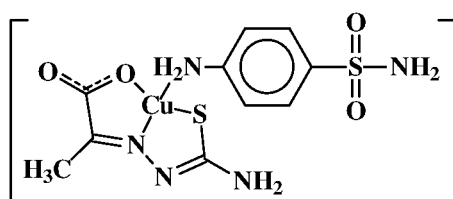
10

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства, 2008, Москва, Новая волна, 1206 с.
2. Elo H. Antimicrobial activity of two antitumour agents and ribonucleotide reductase inhibitors, pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and the acetate form of its copper chelate. Z. Naturforsch. 2007, Jul-Aug, 67(7-8), p. 498-506 (regăsit în Internet la 2011.08.01, url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913063>)

(57) Revendicări:

1. [(2-Carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru, cu formula:



2. Compus conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că manifestă activitate anti-microbiană față de bacteriile din genul *Bacillus cereus*.

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

JOVMIR Tudor

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: a 2010 0083 (32) Data de prioritate recunoscută: n/a (22) Data depozit: 2010.07.19 Raport de documentare internațională: n/a (54) Titlul: [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile de genul <i>Bacillus cereus</i> (71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (51) (Int.Cl): Int. Cl.: <i>C07F 1/08 (2006.01) A61K 31/175 (2006.01)</i> <i>C07C 337/08 (2006.01) A61K 31/63 (2006.01)</i> <i>C07C 59/19 (2006.01) A61K 31/30 (2006.01)</i> <i>C07C 311/39 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)</i>		
II. Condiții de unitate a invenției: X satisface ☐ nu satisface Note:		
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere X satisface ☐ nu satisface Note:		
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare) MD Internă «Documentare Invenții» (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): Cereus ; cupru ; Cu(II) ; antimicrobia ; antibacteria ; microorganism "Worldwide" (Espacenet) : copper ; «Cu II» ; Bacillus cereus ; chelate* coordinați* ; compound* ; antimicrobia* ; «anti microbial» ; antibacteria* ; «anti-bacterial» ; bactericid* ; microorganism* ; (Bacillus cereus) (full-text /WO) AND copper(Title/ABS) ; EA, CIS (Eapatis) : медь; меди; Cereus; тиосемикарбазон*; хелат*; координационн*; комплексн*; антибактери*; антимикробн*; бактерицид*; микроорганизм*; SU (nonpublic) : n/a Alte BD –		
V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate Google, Scirus copper; cereus; antimicrobial*; antibacteria*; thiosemicarbazone*;		
VI. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D,C	Elo H. Antimicrobial activity of two antitumour agents and ribonucleotide reductase inhibitors, pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and the acetate form of its copper chelate. Z. Naturforsch. 2007, Jul-Aug, 67(7-8),	1,2

	p. 498-506 (regăsit în Internet la 2011.08.01, url: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913063)	
A	Podunavac-Kuzmanovic S. and Cvetkovic, D. Antimicrobila Investigations of Copper(II) Complexes with some 1-benzylideneimidazole derivatives. Rev.Roum.Chim. 2010, 55(7), p.363-367 (regăsit în Internet la 2011.06.29 url: http://revroum.getion.ro/wp-content/uploads/2010/RRCh_7_2010/Art%2002.pdf	2
A	West, Douglas X. et al. Thiosemicarbazone Complexes of Copper(II): Structural and Bilological Studies. Coord.Chem. Revs, 123 (1-2), p.49. Feb. 1993 (doi:10.1016/0010-8545(93)85052-6)	1,2
A	Diaz A. et al. Characterization and Bilogical Properties of a Copper(II) Complex with Piruvic Acid Thiosemicarbazone. Monatschefte fur Chemie, 125, 823-825 (1994) (regăsit în Internet la 28-06.2011, fulltext preview url: http://www.springerlink.com/content/j85jku0112j87317/)	1,2
A	WO 2006/0268815 A1 (16.03.2006); Descrierea, pag.5	1,2
A	MD 2003 B1 (30.09.2002)	1,2
A	MD 3032 F1 (2006.04.30)	1,2
A	MD 3124 B1 (2006.08.31)	1,2

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2011.08.22

Examinator JOVMIR Tudor