



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 01220**

(22) Data de depozit: **29.11.2010**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA "OVIDIUS"
CONSTANȚA, BD. MAMAIA NR.124,
CONSTANȚA, CT, RO;
- UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ
BUCUREȘTI, STR. POLIZU NR. 1-7,
BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,
BD. M. KOGĂLNICEANU NR. 36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE
BIOLOGICE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- PRODIAGNOSTIC S.R.L., STR. FARULUI
NR.30, CONSTANȚA, CT, RO

(72) Inventatori:

- NEGREANU-PÎRJOL TICUȚA,
ALEEA UNIVERSITĂȚII NR. 1, CAMPUS,
CORP B, CONSTANȚA, CT, RO;
- NEGREANU-PÎRJOL BOGDAN ȘTEFAN,
ALEEA UNIVERSITĂȚII NR.1, CAMPUS,
CORP B, CONSTANȚA, CT, RO;
- GURAN CORNELIA, STR. POLIZU NR.1-7,
BUCUREȘTI, B, RO;
- CĂLINESCU MIRELA,
STR. M. KOGĂLNICEANU NR.36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;

- OANCEA ANCA,
BD. SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- GORUN ELENA, STR. FARULUI NR. 30,
CONSTANȚA, CT, RO;
- DUMITRU FLORINA, STR. POLIZU
NR.1-7, BUCUREȘTI, B, RO;
- MEGHEA AURELIA, STR. POLIZU NR.1-7,
BUCUREȘTI, B, RO;
- BADEA NICOLETA, STR. POLIZU NR.1-7,
BUCUREȘTI, B, RO;
- BRATU MIHAELA MIRELA,
ALEEA UNIVERSITĂȚII NR.1, CAMPUS,
CORP B, CONSTANȚA, CT, RO;
- BUCUR LAURA ADRIANA,
ALEEA UNIVERSITĂȚII NR.1, CAMPUS,
CORP B, CONSTANȚA, CT, RO;
- MOLDOVAN LUCIA,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- COROIU VIORICA,
BD. SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- CĂLINESCU OCTAVIAN,
STR. M. KOGĂLNICEANU NR.36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- STOICESCU MIHAELA RAMONA,
STR. FARULUI NR. 30, BUCUREȘTI, B, RO;
- NITU BOGDAN FLORENTIN,
STR. FARULUI NR.30, CONSTANȚA, CT, RO

(54) **COMPLECȘI METALICI AI CLORHEXIDINEI ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la compuși complecși metalici ai clorhexidinei, cu acțiune dezinfectantă, și la un procedeu de obținere a acestora. Compușii sunt complecșii metalici ai clorhexidinei sau ai sărurilor sale cu Cu(II) sau Zn(II) și/sau Ag(I), sub formă de pulberi microcristaline stabile, intens colorate, cu puncte de topire cuprinse între 100 și 230°C (descompunere). Procedeu de obținere a compușilor complecși metalici constă din următoarele etape: solubilizarea în alcool etilic a clorhexidinei, respectiv, a sărurilor acesteia, ajustarea

pH-ului la 6,5 și aducerea în soluție a sărurilor metalice, în raport molar de amestec metal:clorhexidină de 2:1 și 1:1, iar în cazul complecșilor cu ioni metalici, în rapoarte molare metal 1:metal 2:clorhexidină de 1:1:1, amestecarea soluțiilor de reactanți cu agitare la 40...50°C, concentrarea soluției, filtrarea și spălarea precipitatului cu alcool etilic, și uscarea compusului.

Revendicări: 3
Figuri: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
 Cerere de brevet de invenție
 Nr. 2012 01220
 Data depozit 26-11-2010

DESCRIEREA INVENȚIEI

Din cercetarile de dată recentă se semnalează pe lista agenților antimicrobieni frecvent comercializați ca principali ingredientii activi, alături de alcoolii, iod, iodoform, hexaclorofen și clorhexidina (notație CHX).

CHX este activă împotriva bacteriilor Gram pozitive și mai puțin activă împotriva bacteriilor Gram negative, fungi și specii de *Proteus*; are activitate numai împotriva unor tipuri de virusuri (hepatită, herpes simplex, HIV, citomegalovirus și virus respirator).

CHX manifestă activitate redusă împotriva micobacteriilor și nulă pentru endospori și chisturi ale protozoarelor.

CHX acționează asupra membranei celulare provocând distrugerea acesteia și pierderea materialului intracelular și produce inhibiția respiratorie și coagularea citoplasmatică.

Clorhexidina este o baza tare cu solubilitate redusă în apă. Sărurile acesteia, în special cele cu acidul gluconic și cu acetul acetic sunt solubile în apă (CHX-digluconat 20g/100 mL, CHX-acetat 1.9 g/100 mL) [US 2006/0051385 A1].

În ceea ce privește natura ionilor metalici utilizați drept centre de coordonare, un număr important de studii vizează complecși ai metalelor cu relevanță biologică semnificativă, cum sunt zincul, cuprul și argintul. Dintre acțiunile biologice specifice acestor ioni metalici, interesul maxim a fost suscitată de activitatea antimicrobiană și cicatrizantă a acestora [Bryan Greener, *Antimicrobial biguanide metal complexes*, *J. Pharmaceutical Sciences*, 69(2), 215-217, 2006], [Farrington, K. L., Morrow, L.E., *Antimicrobial Metals: A Nonantibiotic Approach to Nosocomial Infections – Silver and copper may prove key in preventing a problem that kills nearly 88.000 per year*, 2005, www.rxmed.com/monographs]. Este cunoscută combinația complexă a Ag(I) cu sulfodiazina, polimer de coordonare în care ionul Ag⁺ este pentacoordinat, un agent antibacterian mult mai eficient comparativ cu ligandul liber, împotriva unor tulpini bacteriene cum ar fi *Pseudomonas aeruginosa* și *Staphylococcus aureus* [US 20030035848 A1/2003], [US 2002/0072480 A1].

Capacitatea antibacteriană a ionilor de argint este corelată cu starea de oxidare și este dovedit faptul că ionii de argint în stări de oxidare II și III au o acțiune antibacteriană mai puternică decât Ag(I). Totuși, AgNO₃ și complecși cum ar fi Ag(I)-sulfadiazina sunt agenți antibacterieni eficienți, deși conțin Ag(I). Un complex Ag(III)-CHX sub formă nanocristalină, sintetizat prin tehnica microemulsiei inverse a prezentat activitate antibacteriană puternică pe bacterii Gram-pozitive (*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919)) și Gram-negative (*Acinetobacter calcoaceticus* (ATCC 23055), *Citrobacter freundii* (ATCC 6750), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 10031) și *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)) și pe tulpini rezistente la meticilină de *Staphylococcus aureus*. Concentrațiile inhibitorii minime (MIC) ale complexului Ag(III)-CHX au fost însă mult mai mici decât cele ale ligandului liber, CHX bază, AgNO₃ și Ag(I)-sulfadiazina [Synthesis of Highly Antibacterial Nanocrystalline Trivalent Silver Polydiguanide, Sukdeb Pal, Eun Jeong Yoon, Yu Kyung Tak, Eung Chil Choi, and Joon Myong Song, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 16147–16155].

Complecși ai clorhexidinei cu Ag(III) au fost obținuți sub formă de compozitii aplicabile la temperatura ambiantă, compatibile cu materialele utilizate ca substrat în dispozitivele medicale.

[Handwritten signature]



[Handwritten signature]



[Handwritten signature]



fost utilizate in tratamentul sau profilaxia infectiilor microbiene (bacteriene) [US WO 2007/000590 A1], [US 2006/0051385 A1].

Actiunea antimicrobiană a unor astfel de complecși CHX-Ag(III) este superioară celei a ligandului liber sau a ionului Ag(I) in compușii AgNO₃ sau Ag(I)-sulfadiazina, utilizați de ja in tratamentul clinic al infectiilor bacteriene. Articole destinate uzului medical (instrumentar cu pelicula antiseptică, e.g. sonde de intubare – evitarea infectiilor nosocomiale, pansamente antimicrobiene bioadezive) produse prin impregnarea cu CHX-Ag(III) (prin imersare in solutia de complex) sau prin acoperirea cu CHX-Ag(III) pulbere pot fi păstrate perioade indelungate (câțiva ani) la presiunea și temperatura ambiantă in ambalaje sterile tradiționale. CHX-Ag(III) dispersat prin amestecare mecanică in IntraSite Gel (Smith&Nephew Medical Ltd.) conduce la obținerea unui hidrogel stabil chimic cu acțiune antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* (zona de inhibiție = 6.4 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (zona de inhibiție = 5.4 mm) [US 2002/0072480 A1], [US WO 2007/000590 A1].

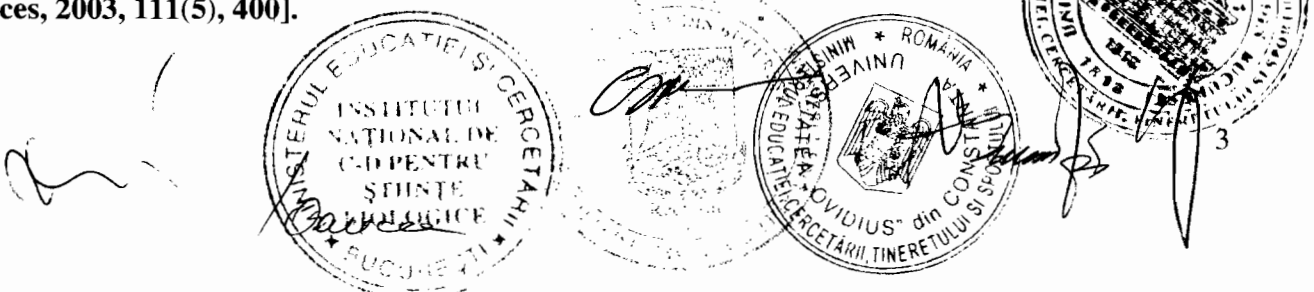
Complecși ai CHX cu Ag(I) și Ag(II): [Ag(CHX)]⁺ și [Ag(CHX)]²⁺ au prezentat activitate antibacteriană superioară și viteze letale mai mari in comparație cu CHX si AgNO₃ și pot reprezenta o noua generație/clasă de agenți antibacterieni in tratamentul rănilor. Acești complecși [Ag(CHX)](NO₃) și [Ag(CHX)](NO₃)₂ au fost sintetizați prin precipitare din solutii apoase neutre sau slab acide (H₂SO₄, 2N) de CHX si AgNO₃. Complexul [Ag(CHX)](NO₃)₂ cu Ag(II) a fost obținut prin oxidarea Ag(I) din soluția CHX:AgNO₃ cu peroxodisulfat de sodiu (Na₂S₂O₈) [Metallopharmaceuticals based on silver(I) and silver(II) polydiguamide complexes: activity against burn wound pathogens, Pal S, Yoon EJ, Park SH, Choi EC, Song JM, J Antimicrob Chemother. 2010;65(10):2134-40]. Activitatea antibacteriana a acestor complecși a fost stabilită prin determinarea concentratiilor MIC si MBC pe 4 bacterii Gram-pozitive si pe 4 bacterii Gram-negative: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Concentratiile MIC pentru complecșii [Ag(CHX)]⁺ și [Ag(CHX)]²⁺ au fost mult mai scăzute decat cele ale clorhexidinei, AgNO₃ și complexului Ag-sulfadiazina. Vitezele biocide ale complecșilor [Ag(CHX)]⁺ si [Ag(CHX)]²⁺ pe bacteriile testate au fost de 2-8 ori mai mari decat cele corespunzatoare clorhexidinei sau AgNO₃ la concentrații egale cu MIC sau de 4 ori mai mari decat aceasta.

In studiile clinice, produsele de ingrijire orală (pasta de dinți, ape de gură) ce contin amestecuri CHX: Zn(II) s-au dovedit mult mai eficiente in controlul formării plăcii dentare, gingivitei și a compusilor cu sulf volatili din cavitatea bucala, decat produsele care au in componență doar CHX.

Ionii de zinc și CHX prezintă un efect inhibitoriu sinergic asupra creșterii *in vitro* a *S. sobrinus* și *S. sanguis*. Efectele asupra plăcii bacteriene au fost determinate pentru 8.0 mM, 0.44 mM CHX și a combinării celor două, mai eficientă fiind combinația [E. Gierstein, A. A. Scheie, G. Rolla, Scandinavian Journal of Dental Research, 1988, 96(6), 541-550].

Ionii de zinc, CHX si clorura de cetilpiridiniu sunt compusi cunoscuti pentru inhibarea compusilor volatili pe baza de sulf (VCS). Ionii de zinc la concentratia de 1% au un gust neplacut si din acest motiv este de dorit sa fie eficienti la concentratii mai mici.

CHX are gust neplacut la 0.2%. Zincul are cel mai bun efect anti-VCS in concentratia de 1% in 1h, CHX are acelasi efect la 0.2%, in 3h [A. Young, G. Jonski, G. Rolla, European Journal of Oral Sciences, 2003, 111(5), 400].



Cuprul este un metal de interes clinic, metal esențial în nutriția umană și are toxicitate redusă.

CHX și Cu^{2+} , soluții de 1.1 mM au fost folosite în experimente vizând reducerea plăcii bacteriene. CHX, în concentrația 1.1 mM, este mai eficientă decât Cu^{2+} [S. M. Waler, G. Rolla, **Scandinavian Journal of Dental Research**, 1982, 90(2), 131-133].

Complecși pe bază de CHX-I, se regăsesc în următoarele formulări: [GB1128833/1966] și [PEP1340490B1/2003], colutoriu pe baza de clorhexidină, sub formă de soluție pentru igiena orală bazată pe CHX și acid ascorbic, care nu are ca efect secundar pigmentarea dinților. La soluția de CHX și acid ascorbic (cu rol de reducere a Fe^{3+} la Fe^{2+} , împiedicarea reacțiilor Maillard) se adaugă metabisulfid de sodiu care are rolul de a stabiliza acidul ascorbic (împiedicarea oxidării acestuia) în soluție apoasă. Cu citrat de sodiu pH-ul colutorului este păstrat la valori: 5.7-6.3, domeniu în care activitatea clorhexidinei este maximă.

Dezavantajele sau limitele clorhexidinei prezente ca principiu activ:

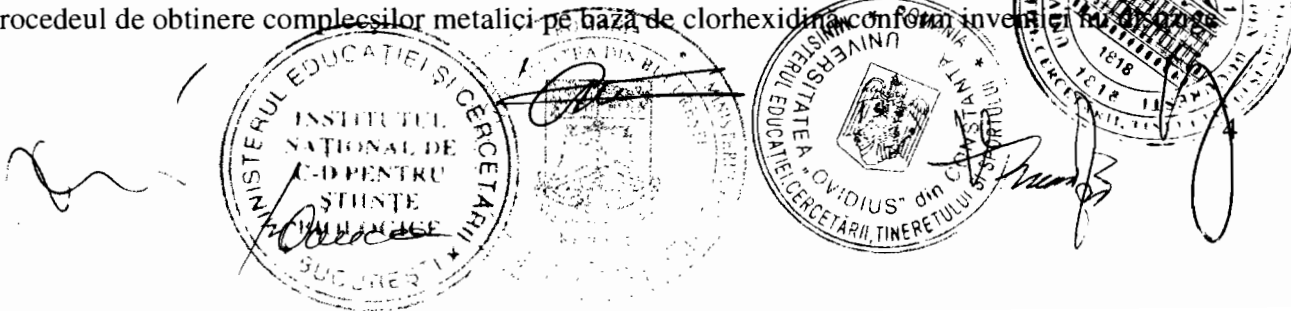
- Transformarea ligandului într-o formă hidrosolubilă. CHX (baza liberă) este insolubilă în apă și există doar la $\text{pH} > 8$. CHX este folosită sub formă de săruri ale unor acizi organici: CHX diacetat, CHX diclorhidrat, CHX digluconat. Totuși, posibilitatea unor interacții nedorite ale anionului cu alte specii, organice sau anorganice, sau coprecipitarea face din aceste specii surse nu foarte potrivite de ligand CHX. Întrucât valorile pKa pentru CHX (2.2 și 10.3) arată că aceasta este diprotonată pe întreg domeniul de valori corespunzătoare pH-ului fiziologic, solubilizarea acesteia se poate ușor realiza prin tratarea cu H_2SO_4 diluat și transformarea în $\text{CHX}^{2+} \cdot 2(\text{HSO}_4^-)$.
- Limitările clorhexidinei prezente ca principiu activ în actualele forme farmaceutice constau în obținerea de forme farmaceutice lichide (ape de gură) care permit o scădere a concentrației clorhexidinei la nivelul cavității orale prin diluare rapidă cu saliva, reacții adverse, limitarea activității antimicrobiene ca și durata efectului terapeutic.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția și ce dezavantaje înlătură invenția:

Prin asocierea clorhexidinei și a sărurilor acesteia cu ioni metalici cu activitate farmacologică proprie (antibacteriană, antifungică, cicatrizantă, antiinflamatoare) în compuși cu proprietăți antiseptice, dezinfectante și antiparazitare se pot elimina problemele generate de utilizarea CHX libere.

Invenția rezolvă următoarele probleme biofarmaceutice și anume:

- creșterea contactului preparatului cu mucoasa bucală, respectiv cale topică, respectiv prelungirea acțiunii terapeutice, precum și posibilitatea folosirii de noi compuși neutilizați în terapeutică, activi *in vitro* la concentrații mai mici comparativ cu sărurile de clorhexidină folosite.
- eliminarea reacțiilor adverse (dermatite iritante de contact – CHX liberă) și minimalizarea efectelor secundare (gingivite descumative, decolorarea dinților și a limbii, alterarea gustului, alergii care pot conduce la șoc anafilactic).
- găsirea unei formulări/compoziții farmaceutice care să aibă o solubilitate în medii apoase superioară concentrației minime inhibitorii (MIC) a organismului tratat.
- preparate farmaceutice stabile chimic în domeniul de $\text{pH} = 6.5-8$, domeniul de eficacitate maximă al CHX.
- evitarea contaminării produsului în procesul de sinteză – pentru păstrarea activității biologice nealterate.
- Procedeele de obținere a complexilor metalici pe bază de clorhexidină conform invenției în domeniul



proprietățile principiilor active ale acestora. Prin obținerea complexelor clorhexidinei cu ioni metalici ca Zn(II), Cu(II) și Ag(I) s-a urmărit creșterea capacității de inhibiție a activității streptococice și stafilococice comparativ cu cea a ligandului clorhexidină, precum și a acțiunii antiseptice a clorhexidinei, prevenind aderența tulpinilor de *Candida albicans* la suprafețele nonbiologice.

- prin noile structuri chimice se reduce inactivarea clorhexidinei și a sărurilor sale (prin expunere la unii surfactanți neionici, a unor ioni comuni prezenți în apă sau prin includerea sa în unele produse de igienă oro-dentară (geluri, ape de gură) prin selectarea unui pH compatibil, a unor solvenți și baze de hidrogeluri compatibile).

Avantajele obținerii complexelor metalici pe bază de clorhexidină, conform invenției:

-Asocierea clorhexidinei și a sărurilor acesteia cu ioni metalici cu activitate biologică proprie (antibacteriană, antifungică, cicatrizantă, antioxidantă).

-Inlocuirea clorhexidinei și a sărurilor acesteia ca principii active în preparatele farmaceutice cu combinații complexe ale acestora cu ioni de Cu(II), Zn(II) și Ag(I). Se elimină astfel prezența clorhexidinei libere în preparatele farmaceutice și implicit, se diminuează efectele adverse cauzate de aceasta.

- Combinațiile complexe obținute prezintă activitate biologică comparabilă sau chiar mărită comparativ cu cea a clorhexidinei, dar la o concentrație mai mică a acesteia în preparatul farmaceutic.

- Asocierea în compoziția combinației complexe a doi ioni metalici diferiți (cupru cu zinc sau cupru cu argint) s-a dovedit a contribui la potențarea activității antimicrobiene și la reducerea efectelor secundare ale clorhexidinei.

-La obținerea noilor complecși au fost utilizați ca liganzi CHX bază, diclorhidratul și diacetatul de clorhexidină față de tradiționalul digluconat de clorhexidină, în scopul valorificării tuturor compuşilor derivați de clorhexidină, a obținerii de complecși la valori de pH care vor permite stabilitate, compatibilitate cu substanțele auxiliare asociate în formule și cu căile de administrare (mucoasa bucală, calea topică), cu o bună solubilitate în solvenți polari și utilizarea lor în terapeutică în forme farmaceutice nepropuse pentru acești compuşii.

Procedul de obținere a complexelor metalici pe bază de clorhexidină conform invenției, constă în schema tehnologică prezentată în Figura nr.1.

Este indicat mai jos, un exemplu de obținere a complexului metalic al clorhexidinei, tetracloroclorhexidin cupru(II) zinc(II), (3).

[CuZn(CHX)Cl₄], tetracloroclorhexidin cupru(II) zinc(II), complex (3).

Complexul a fost obținut utilizând diacetat de clorhexidina și un amestec de săruri metalice conținând clorura de cupru dihidratată și clorura de zinc anhidra, în raport masic diacetat de clorhexidina: CuCl₂·2H₂O: ZnCl₂ = 4.7: 1.25: 1. Diacetatul de clorhexidina se dizolvă în etanol sub agitare; la aceasta soluție s-a adăugat o soluție etanolică ce conține sărurile de cupru și zinc iar amestecul de reacție a fost agitat la 40-50 °C timp de 2 ore. Se formează un precipitat roz-violet. Amestecul se concentrează prin evaporarea parțială a solventului, apoi precipitatul se separă prin filtrare la vid, se spală cu alcool etilic și se usucă în exsicator pe pentaoxid de difosfor. Produsul obținut prezintă sub formă de pulbere microcristalină, culoare violet intens, P.t. > 100 °C (decompunere), solubil în dimetilsulfoxid, dimetilformamidă, acetonitril, parțial solubil în acetonă, alcool etilic, metilic și insolubil în apă, eter etilic, cloroform, benzen, stabil la temperatură ambiantă și lumină.

Se dau 6 exemple de realizare a complecșilor metalici ai clorhexidinei conform invenției, în legătură cu Tabelul nr. 1 și cu Figura nr. 1, care reprezintă schema tehnologică de obținere a complecșilor metalici ai clorhexidinei, conform invenției.

Tabel nr. 1 Exemple de obținere a complecșilor metalici ai clorhexidinei

Reactanți	Complex metalic (1)	Complex metalic (2)	Complex metalic (3)	Complex metalic (4)	Complex metalic (5)	Complex metalic (6)
	Părți în greutate					
Clorhexidina bază	-	3.71	-	-	-	-
Diacetat de clorhexidina	1.33	-	4.7	-	-	3.78
Diclorhidrat de clorhexidina	-	-	-	4.25	2.89	-
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1	1.77	-	-	-	-
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	1.25	1.25	-	1
$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	1	-
ZnCl_2	-	1	1	1	-	-
AgNO_3	-	-	-	-	-	1

Formule atribuite, date analitice și spectrale (IR, UV-VIS, RPE) pentru complecșii metalici ai clorhexidinei, conform invenției:

$[\text{Cu}_2(\text{CHX})(\text{CH}_3\text{COO})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, diazotat de diacetatoclorhexidin bis cupru(II) dialcoolat, complex (1).

Solid, pulbere microcristalină, de culoare roz-violetă, P.t. > 100 °C (descompunere); parțial solubil în etanol și acetona, solubil în DMSO la rece, parțial solubil în DMF, și insolubil în apa, eter etilic, cloroform, CCl_4 , stabil la temperatura ambiantă și lumină.

Date analitice: exp. %: C: 37.02; N: 17.48; Cu: 13.23; calc. %: C: 37.22; N: 17.37; Cu: 13.26.

Benzi caracteristice în IR (ν_{max} , cm^{-1}): $\nu(\text{O-H})$, 3320 m; $\nu(=\text{NH})$, 3305 m; $\nu(\text{C=N})$, 1659 i; $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$, 1591m, 1337 m; $\nu(\text{C}_{\text{alif-N}})$, 1241 m; $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$, 1570 i; $\nu_{\text{sim}}(\text{C=O})$, 1390 i; $\nu(\text{NO}_3 \text{ ionic})$, 1384 fi, 800 m.

UV-VIS: 41666 ($\sigma - \sigma^*$); 33557 cm^{-1} ($\pi - \pi^*$); 30303 cm^{-1} ($n-\pi^*$); 18880 cm^{-1} (${}^2\text{B}_1 \rightarrow {}^2\text{E}$), simetrie tetraedrică distorsionată.

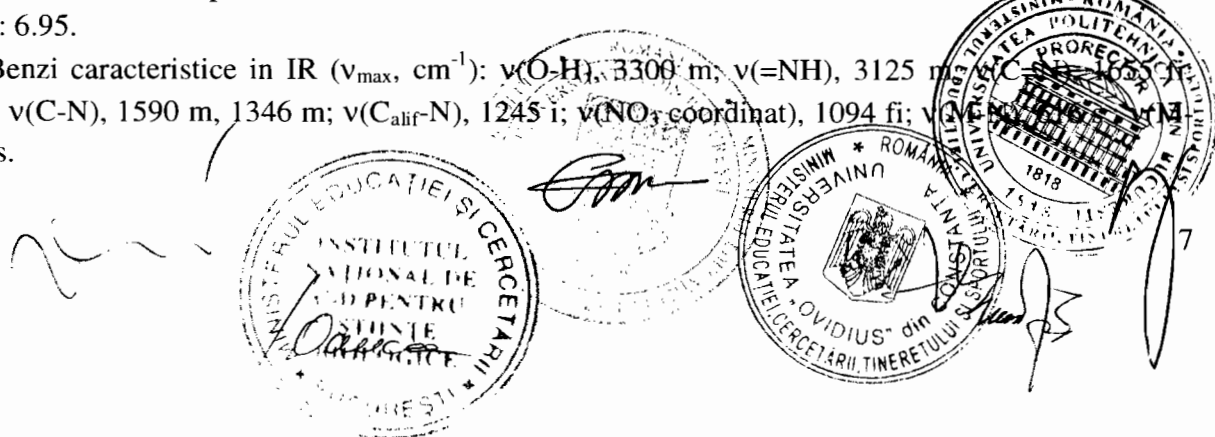
EPR: $g_{\perp} = 2.058$.

$[\text{CuZn}(\text{CHX})(\text{NO}_3)_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, diclorodinitroclorhexidin cupru(II) zinc(II) dialcoolat, complex (2).

Solid, pulbere microcristalină, de culoare roz-violetă, P.t. > 120 °C (descompunere); Solubil în dimetilsulfoxid, dimetilformamidă, acetonitril, acetonă, parțial solubil în alcool etilic și alcool metilic și insolubil în apa, eter etilic, cloroform, CCl_4 , stabil la temperatura ambiantă și lumină.

Date analitice: exp. %: C: 33.72; N: 18.35; Cu: 7.02; Zn: 7.01; calc. %: C: 33.87; N: 18.24; Cu: 6.94; Zn: 6.95.

Benzi caracteristice în IR (ν_{max} , cm^{-1}): $\nu(\text{O-H})$, 3300 m; $\nu(=\text{NH})$, 3125 m; $\nu(\text{C=N})$, 1625 i; $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$, 1590 m, 1346 m; $\nu(\text{C}_{\text{alif-N}})$, 1245 i; $\nu(\text{NO}_3 \text{ coordonat})$, 1094 fi; $\nu(\text{NO}_3 \text{ liber})$, 1384 fi, 800 m; $\nu(\text{O})$, 511 s.



UV-VIS : 45270 cm^{-1} ($\sigma - \sigma^*$); 31810 cm^{-1} ($\pi - \pi^*$); 26590 cm^{-1} ($n - \pi^*$); 19280 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2A_{1g}$); 15630 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g$); 12880 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2B_{2g}$), simetrie D_{4h} pentru ionul Cu^{2+} .

EPR: $g_{\parallel} = 2.20$; $g_{\perp} = 2.064$.

[CuZn(CHX)Cl₄], tetracloroclorhexidin cupru(II) zinc(II), complex (3).

Solid, pulbere microcristalină, de culoare roz-violeta, P.t. > 180 °C (descompunere); solubil in dimetilsulfoxid, dimetilformamidă, acetonitril, partial solubil in acetona, alcool etilic si alcool metilic și insolubil în apa, eter etilic, cloroform, benzen, stabil la temperatura ambiantă și lumină.

Date analitice: exp.‰: C: 33.90; N: 18.12; Cu: 8.15; Zn: 8.10; calc.‰: C: 34.02; N: 18.04; Cu: 8.24; Zn: 8.25.

Benzi caracteristice in IR (ν_{max} , cm^{-1}): $\nu(=NH)$, 3290 m; $\nu(C=N)$, 1654 i; $\delta(NH) + \nu(C-N)$, 1590 m, 1374 i; $\nu(C_{\text{alif}}-N)$, 1238 i; $\nu(M-N)$, 607 s, 568 s.

UV-VIS: 46900 cm^{-1} ($\sigma - \sigma^*$); 38230 cm^{-1} ($\pi - \pi^*$); 26250 cm^{-1} ($n - \pi^*$); 18500 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2A_{1g}$, ${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g$); 13950 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2B_{2g}$), simetrie D_{4h} pentru ionul Cu^{2+} .

EPR: $g_{\parallel} = 2.20$; $g_{\perp} = 2.065$.

[CuZn(CHXH₂)Cl₄]Cl₂, diclorura de tetracloro clorhexidinato cupru(II) zinc(II), complex (4).

Solid, pulbere microcristalină, de culoare albastra, P.t. > 230 °C (descompunere). Este partial solubil in etanol si acetona, usor solubil in DMF si DMSO și insolubil în apa, eter etilic, cloroform, benzen, stabil la temperatura ambiantă și lumină.

Date analitice: exp.‰: C: 30.92; N: 16.64; Cu: 7.32; Zn: 7.45; calc.‰: C: 31.09; N: 16.48; Cu: 7.53; Zn: 7.65.

Benzi caracteristice in IR (ν_{max} , cm^{-1}): $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2^+)$, $\nu_{\text{sim}}(\text{NH}_2^+)$, 3313; $\nu(=NH)$, 3201 m; $\delta(\text{NH}_2^+)$, 1633 i; $\nu(C=N)$, 1650 i; $\delta(NH) + \nu(C-N)$, 1597 m, 1346 m; $\nu(C_{\text{alif}}-N)$, 1234 m; $\nu(M-N)$, 621 s.

UV-VIS: 48000 cm^{-1} ($\sigma - \sigma^*$); 38400 cm^{-1} ($\pi - \pi^*$); 30300 cm^{-1} ($n - \pi^*$); 185200 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2A_{1g}$, 15380 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g$); 12050 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2B_{2g}$), simetrie D_{4h} pentru ionul Cu^{2+} .

EPR: $g_{\parallel} = 2.207$; $g_{\perp} = 2.049$.

[Cu(CHXH₂)Cl₂]Cl₂, diclorura de dicloroclorhexidinato cupru(II), complex (5).

Solid, pulbere microcristalină, colorat in violet-intens, p.t. > 140 °C (descompunere); partial solubil in acetona, dimetilformamida, insolubil in eter etilic, cloroform, benzen, stabil la temperatura ambiantă și lumină.

Date analitice: exp.‰: C: 36.92; N: 19.74; Cu: 9.05; calc.‰: C: 37.02; N: 19.63; Cu: 8.97.

Benzi caracteristice in IR (ν_{max} , cm^{-1}): $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2^+)$, $\nu_{\text{sim}}(\text{NH}_2^+)$, 3308; $\nu(=NH)$, 3201 m; $\delta(\text{NH}_2^+)$, 1633 i; $\nu(C=N)$, 1639 m; $\delta(NH) + \nu(C-N)$, 1580 m, 1379 m; $\nu(C_{\text{alif}}-N)$, 1239 m; $\nu(\text{Cu}-N)$, 667 s.

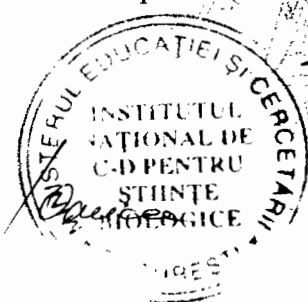
UV-VIS: 43470 cm^{-1} ($\sigma - \sigma^*$); 32250 cm^{-1} ($\pi - \pi^*$); 26300 cm^{-1} ($n - \pi^*$); 18860 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2A_{1g}$); 14280 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g$); 11800 cm^{-1} (${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2B_{2g}$) simetrie octaedrica deformata tetragonal.

EPR: $g_{\parallel} = 2.19$; $g_{\perp} = 2.083$.

[CuAg(CHX)Cl₂]NO₃, azotat de dicloroclorhexidin cupru(II) argint(I), complex (6).

Solid, pulbere microcristalină, de culoare mov-intens, p.t. > 185 °C (descompunere); este partial solubil la rece in alcool etilic si acetona, usor solubil in DMF si DMSO și insolubil în apa, eter etilic, cloroform, benzen, stabil la temperatura ambiantă și lumină.

[Handwritten signature]



Date analitice: exp.%: C: 32.28; N: 19.24; Cu: 7.88; Ag: 13.02; calc.%: C: 32.59; N: 19.01; Cu: 7.90; Ag: 13.32.

Benzi caracteristice in IR (ν_{\max} , cm^{-1}): $\nu(\text{=NH})$, 3250 m; $\nu(\text{C=N})$, 1660 fi; $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$, 1588 m, 1345 m; $\nu(\text{C}_{\text{alif-N}})$, 1243 m; $\nu(\text{NO}_3 \text{ ionic})$, 1383 fi, 800 m; $\nu(\text{M-N})$, 651 s.

UV-VIS: 40000 cm^{-1} ($\sigma - \sigma^*$); 33300 cm^{-1} ($\pi - \pi^*$); 27020 cm^{-1} ($n - \pi^*$); 21740 cm^{-1} (${}^2\text{B}_{1g} \rightarrow {}^2\text{A}_{1g}$); 19230 cm^{-1} (${}^2\text{B}_{1g} \rightarrow {}^2\text{E}_g$); 12540 cm^{-1} (${}^2\text{B}_{1g} \rightarrow {}^2\text{B}_{2g}$) in simetrie D_{4h} , pentru ionul Cu^{2+} .

EPR: $g_{\parallel} = 2.19$; $g_{\perp} = 2.066$.

Modul de coordonare al clorhexidinei la ionii metalici a fost argumentat pe baza studiului comparativ al spectrelor in infrarosu ale liganzilor si complexilor sintetizati.

Diacetat de clorhexidina. Benzi caracteristice in IR (ν_{\max} , cm^{-1}): $\nu(\text{OH})$, 3326 m; $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2^+)$, $\nu_{\text{sim}}(\text{NH}_2^+)$, 3140 m; $\nu(\text{=NH})$, 3180 m; $\delta(\text{NH}_2^+)$, 1613 m; $\nu(\text{C=N})$, 1644 i; $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$, 1574 m, 1337 m; $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$, 1536 m; $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$, 1417 i; $\nu(\text{C}_{\text{alif-N}})$, 1249 m.

In spectrele combinatiilor complexe sintetizate cu diacetatul de clorhexidina (complexii **1**, **3** si **6**) se observa deplasarea spre numere de unda mai mari a benzii datorate vibratiei de valenta a gruparii iminice, $\nu(\text{C=N})$, in acord cu coordonarea ligandului la ionii metalici prin perechea de electroni neparticipanti ai azotului iminic. Coordonarea prin atomii de azot iminici este confirmata si de deplasarea usoara, spre numere de unda mai mari, a benzii de la 1574 cm^{-1} $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$ si deplasarea spre numere de unda mai mici a benzii de la 1249 cm^{-1} datorate vibratiei de valenta $\text{C}_{\text{alif-N}}$. Disparitia benzilor caracteristice gruparilor NH_2^+ indica faptul ca la formarea combinatiilor complexe are loc deprotonarea ligandului. De altfel, deplasarea spre numere de unda mai mari a vibratiei de valenta a gruparii azometinice, prin complexare, este un indiciu al participarii ligandului in forma deprotonata (prin deprotonare creste densitatea electronica pe legaturile C=N).

Clorhexidina bază. Benzi caracteristice in IR (ν_{\max} , cm^{-1}): $\nu(\text{=NH})$, 3054 m; $\nu(\text{C=N})$, 1667 i; $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$, 1598 m, 1373 m; $\nu(\text{C}_{\text{alif-N}})$, 1247 m.

Datorita absentei protonarii, spectrul in infrarosu al clorhexidinei in forma "baza" prezinta cateva diferente importante fata de cel al diacetatului de CHX. Astfel, nu se observa nici o banda datorata unei posibile grupari aminice protonate. Banda de valenta caracteristica gruparii azometinice apare la 1667 cm^{-1} , in timp ce vibratiile cuplate $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$ dau benzi caracteristice la 1598 si 1373 cm^{-1} .

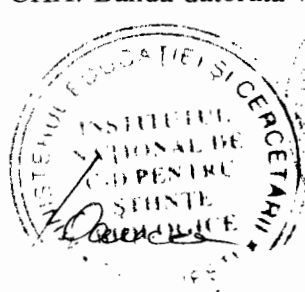
In spectrul combinatiei complexe sintetizate cu clorhexidina "baza", complex (**2**), deplasarea vibratiei de valenta a gruparii C=N are loc spre numere de unda mai mici fata de ligand, in acord cu scaderea densitatii electronice pe aceste legaturi, prin complexare.

Coordonarea afecteaza, de asemenea, pozitiile benzilor datorate vibratiilor cuplate $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$, acestea suferind deplasari usoare, in general, spre numere de unda mai mari.

Diclorhidrat de clorhexidina. Benzi caracteristice in IR (ν_{\max} , cm^{-1}): $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2^+)$, $\nu_{\text{sim}}(\text{NH}_2^+)$, 3120 m; $\nu(\text{=NH})$, 3195 m; $\delta(\text{NH}_2^+)$, ~ 1600 m; $\nu(\text{C=N})$, 1651 i; $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$, 1581 m, 1356 m; $\nu(\text{C}_{\text{alif-N}})$, 1239 m.

Spectrul in IR al diclorhidratului de CHX este asemanator, in regiunea numerelor de unda mici, cu cel al diacetatului de CHX. Banda datorata vibratiei de deformare in plan a gruparii NH_2^+ apare la $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$.

[Handwritten signature]



[Handwritten signature]

Deplasările care apar în spectrele IR ale complexelor față de ligandul liber sunt însă diferite față de cazul complexelor cu diacetatul de CHX. Astfel, în cazul combinațiilor complexe **4** și **5** se mențin, în spectrele în infraroșu, benzile caracteristice grupării aminice protonate, cu deplasări ușoare în regiunea numerelor de undă mari și cu deplasare puternică a vibrației de deformare în plan, de la 1600 la 1633 cm⁻¹. Aceste observații indică faptul că în acești complecși ligandul a rămas în forma protonată. Coordinarea s-a realizat tot prin atomii de azot iminici, fiind confirmată de deplasările benzii caracteristice vibrației de valență a grupării C=N.

Solubilitate

Majoritatea complexelor sunt solubile în DMF și DMSO, dar dizolvarea este însoțită, în unele cazuri, de schimbarea culorii. Aceasta dovedește că la dizolvare au loc modificări în sfera de coordonare a ionului metalic, de obicei ca urmare a aditiei de molecule de solvent. Complexul (**5**) este cel mai sensibil la acțiunea solventilor cu constantă dielectrică mare.

Prezintă, de asemenea, modificări de culoare în solvenți complexul (**2**), ce conține azotat în sfera de coordonare și care, realizând legături slabe cu ionul metalic, poate fi substituit ușor.

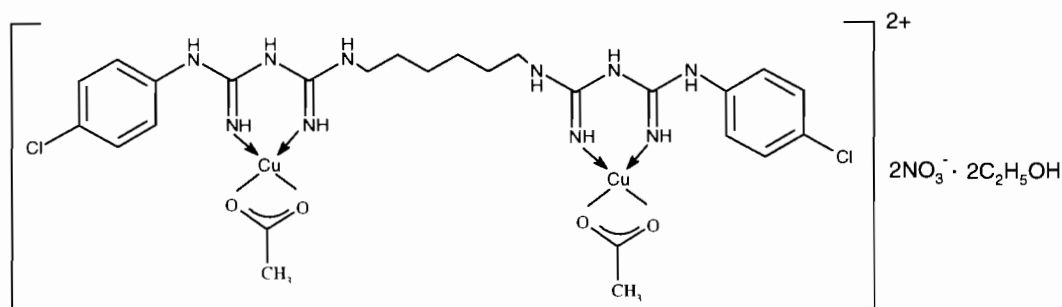
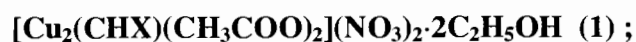
În solvenți ca etanolul sau acetona, complexii sunt greu solubili la rece.

Încalzirea complexelor în orice solvent, la temperaturi mai mari de 30°C, conduce la aglomerări sub formă de cleiuri. Aceasta se explică prin existența grupărilor NH necoordinate de pe CHX, care pot forma legături de hidrogen intermoleculare.

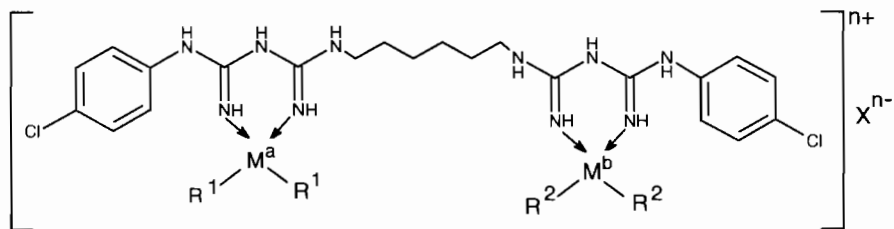
Date spectrale în UV-VIS și magnetice

Maximele tranzițiilor în vizibil, datorate numai ionului Cu²⁺, ca și valorile factorului g calculate din spectrele RPE sunt în acord cu o simetrie axială în jurul acestuia în complexii (**2**)-(**6**) și o simetrie tetraedrică deformată în complexul (**1**).

Structurile propuse pentru complexii metalici ai clorhexidinei (**1** - **6**) conform invenției, sunt următoarele:



[CuZn(CHX)(NO₃)₂Cl₂]-2C₂H₅OH (2); [CuZn(CHX)Cl₄] (3); [CuAg(CHX)Cl₂]NO₃ (6);

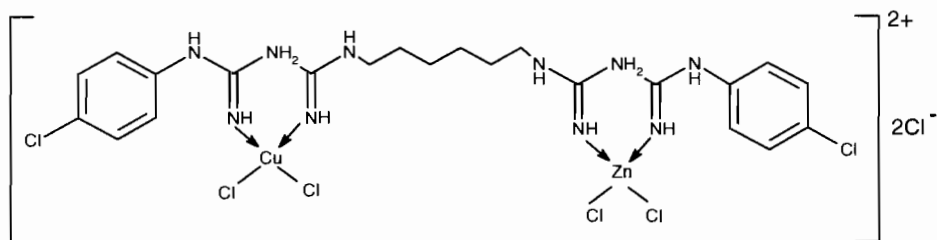


Complex (2) M^a = Cu; M^b = Zn; R¹ = ONO₂; R² = Cl; n = 0; Xⁿ⁻ = 2C₂H₅OH

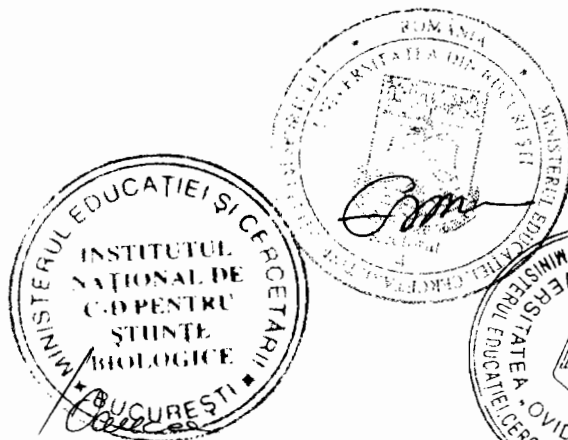
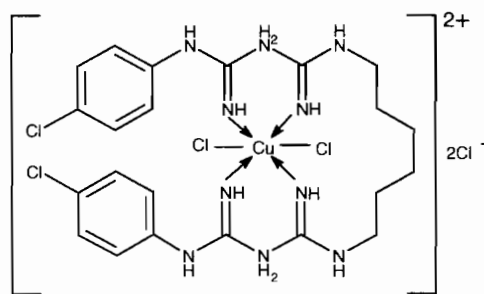
Complex (3) M^a = Cu; M^b = Zn; R¹, R² = Cl; n = 0; Xⁿ⁻ = absent

Complex (6): M^a = Cu; M^b = Ag; R¹ = Cl; R² = absent; n = 1; Xⁿ⁻ = NO₃⁻

[CuZn(CHXH₂)Cl₄]Cl₂ (4);



[Cu(CHXH₂)Cl₂]Cl₂ (5);

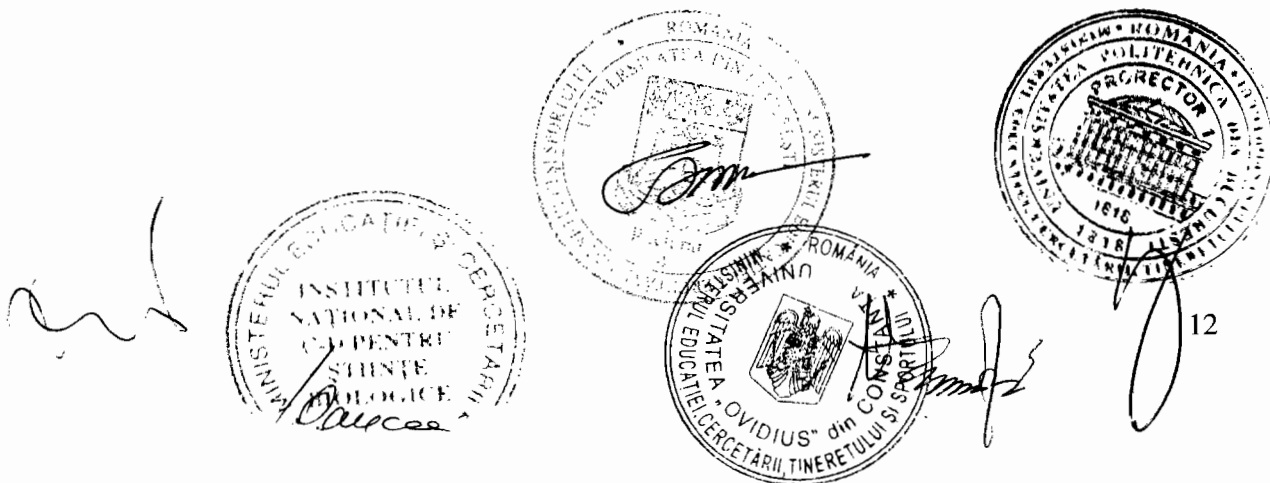


Complecșii metalici ai clorhexidinei conform invenției, prezintă activitate antimicrobiană față de tulpinile microbiene *Staphylococcus aureus* (diametrul de inhibiție 1 - 14 mm), *Escherichia coli* (diametrul de inhibiție 1 - 8 mm) și *Candida albicans* (diametrul de inhibiție 1 - 7 mm), mai ridicată comparativ cu liganzii și sărurile metalice din care au fost obținuți.

Testarea fitotoxicității citologice pe meristemul radicelelor de *Allium cepa* a complecșilor metalici pe baza de clorhexidină vine în completarea testelor anterioare efectuate pe tulpini Gram pozitive și Gram negative. Bulbii cu diametrul de 2 cm utilizați în experiment, au format radicele de 5-10 mm, apoi au fost introduși în soluții ale complecșilor nou sintetizați. Complecși conform invenției, au fost dizolvați în alcool etilic de concentrație 90%, soluția rezultată având o concentrație de 10^{-3} M. Radicelele au fost măsurate și apoi recoltate meristemele la 24h și respectiv 96h. Preparatele au fost apoi observate microscopic cu diferite obiective. Rezultatele testelor de fitotoxicitate au scos în evidență faptul că toți compuşii prezintă un efect citostatic la concentrația de 10^{-3} M, dar nu manifestă genotoxicitate.

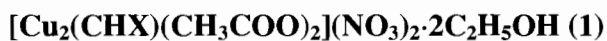
Complecșii metalici pe bază de clorhexidină, conform invenției, au fost testați *in vitro* în culturi de fibroblaste. Pentru testarea efectului compuşilor studiați asupra celulelor s-au analizat viabilitatea celulară (prin metoda cu MTT) și morfologia celulară. Citotoxicitatea a fost testată prin metoda extractului, toți complecșii fiind în stare solidă de pulbere, luând în lucru mai multe concentrații ale complecșilor solubilizați în alcool etilic de concentrație 90%, și mai multe grade de diluție ale soluțiilor respective. Rezultatele obținute au demonstrat un pronunțat efect citotoxic al complecșilor în forma în care au fost obținuți, comparativ cu proba martor (cultura de celule). La concentrații mai mici de $100\mu\text{g/mL}$ din fiecare complex și la diluții mai mici de 1:4 a complecșilor aduși în soluție, nu s-au mai observat efecte de modificare a morfologiei fibroblastelor, acestea având o viabilitate de peste 95% după 24 ore de cultivare în prezența respectivelor soluții cu complecșii conform invenției.

Testarea activității antioxidante a complecșilor metalici ai clorhexidinei conform invenției, prin metoda chemiluminiscenței, a evidențiat că aceștia prezintă valori ale activității antioxidante în domeniul 45-83%, ceea ce îi indică drept agenți antioxidanți eficienți.



REVENDICĂRI

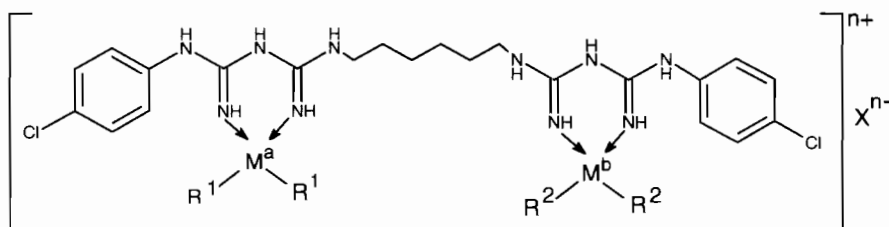
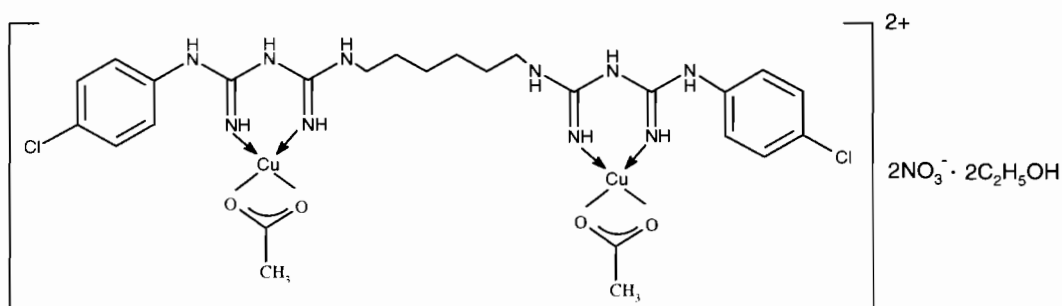
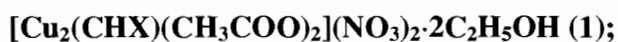
1. Complecși metalici ai clorhexidinei cu structura corespunzătoare formulelor generale (1), (2), (3), (4), (5) și (6):



$[\text{M}^a\text{M}^b(\text{CHX})(\text{R}^1)_2(\text{R}^2)_2]^{n+} \cdot \text{X}^-$, $\text{M}^a = \text{Cu}$, $\text{M}^b = \text{Zn}$, $\text{R}^1 = \text{ONO}_2$, $\text{R}^2 = \text{Cl}$, $n = 0$, $\text{X} = 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$;
(2), $\text{M}^a = \text{Cu}$, $\text{M}^b = \text{Zn}$, $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{Cl}$, $n = 0$, X absent (3), $\text{M}^a = \text{Cu}$, $\text{M}^b = \text{Ag}$, $\text{R}^1 = \text{Cl}$, R^2 absent,
 $n = 1$, $\text{X}^{n-} = \text{NO}_3^-$ (6),



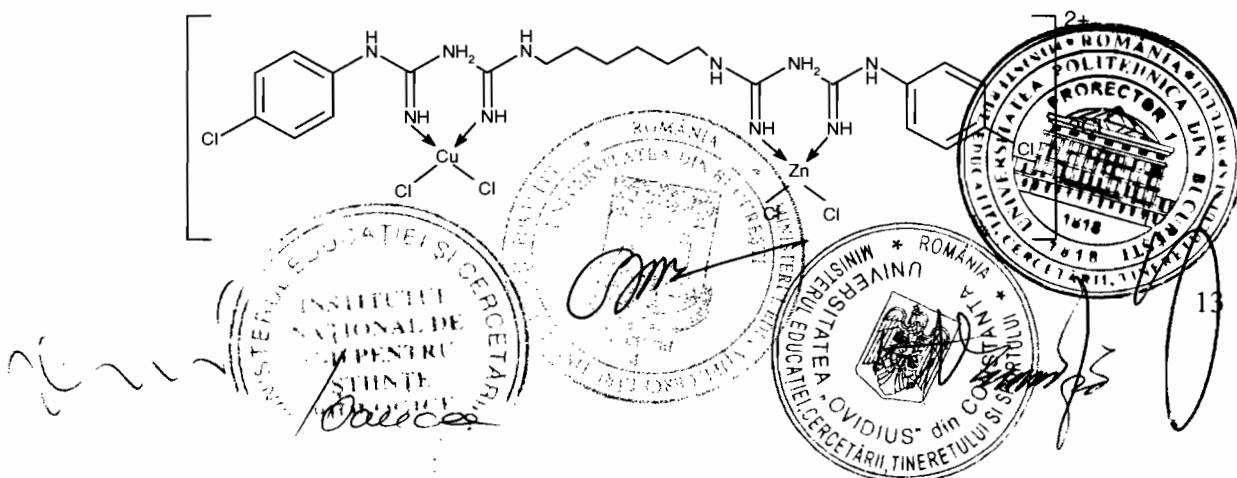
$[\text{Cu}(\text{CHXH}_2)\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$ (5) și cu structurile chimice următoare:



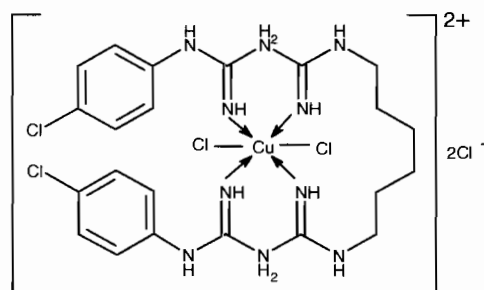
Complex (2) $\text{M}^a = \text{Cu}$; $\text{M}^b = \text{Zn}$; $\text{R}^1 = \text{ONO}_2$; $\text{R}^2 = \text{Cl}$; $n = 0$; $\text{X}^{n-} = 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

Complex (3) $\text{M}^a = \text{Cu}$; $\text{M}^b = \text{Zn}$; $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{Cl}$; $n = 0$; $\text{X}^{n-} = \text{absent}$

Complex (6): $\text{M}^a = \text{Cu}$; $\text{M}^b = \text{Ag}$; $\text{R}^1 = \text{Cl}$; $\text{R}^2 = \text{absent}$; $n = 1$; $\text{X}^{n-} = \text{NO}_3^-$



[Cu(CHXH₂)Cl₂]₂Cl₂ (5);



2. Procedeu de obținere a unor complecși metalici pe bază de clorhexidină cu structura corespunzătoare formulelor prezentate ca la Revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** se utilizează ca reactanți: diacetatul de clorhexidina și azotatul de cupru(II) – complex 1; clorhexidina baza, azotat de Cu(II) și clorura de zinc – complex 2; diacetatul de clorhexidina, clorura de cupru(II) și clorura de zinc – complex 3; diclorhidratul de clorhexidina, clorura de cupru(II) și clorura de zinc – complex 4; diclorhidratul de clorhexidina și acetat de cupru(II) – complex 5; diacetatul de clorhexidina, clorura de cupru(II) și azotat de argint – complex 6, în rapoarte molare de amestec metal : clorhexidina 2:1 și 1:1, iar în cazul complecșilor cu ioni metalici diferiți în raport molar metal(1): metal(2): clorhexidina = 1:1:1, care cuprinde următoarele etape de obținere: solubilizarea în alcool etilic a clorhexidinei, respectiv a sărurilor sale și ajustarea pH-ului la 6,5, aducerea în soluție etanolică a sărurilor metalice, amestecarea soluțiilor reactanților și agitarea la cald (40-50°C) a amestecului de reacție, concentrarea soluției, filtrarea precipitatului și spălarea acestuia cu alcool etilic, uscarea compusului solid pe pentaoxid de difosfor. Se obțin produși sub formă de pulberi microcristaline, intens colorați: 1, 2 și 3 – roz-violet; 4 – albastru; 5 și 6 – violet intens, cu puncte de topire cuprinse în intervalul 100°C – 230°C (descompunere), stabili la temperatura ambiantă și lumină.
3. Complecși metalici pe bază de clorhexidină cu structura corespunzătoare formulelor prezentate la Revendicarea 1, **caracterizați prin aceea că** prezintă activitate antimicrobiană și se utilizează ca principii active în diverse preparate farmaceutice topice de uz extern, pentru proprietățile lor de agenți antibacterieni, antimicotici, dezinfectanți, cicatrizanți, antioxidanți.

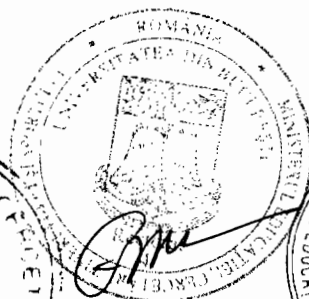
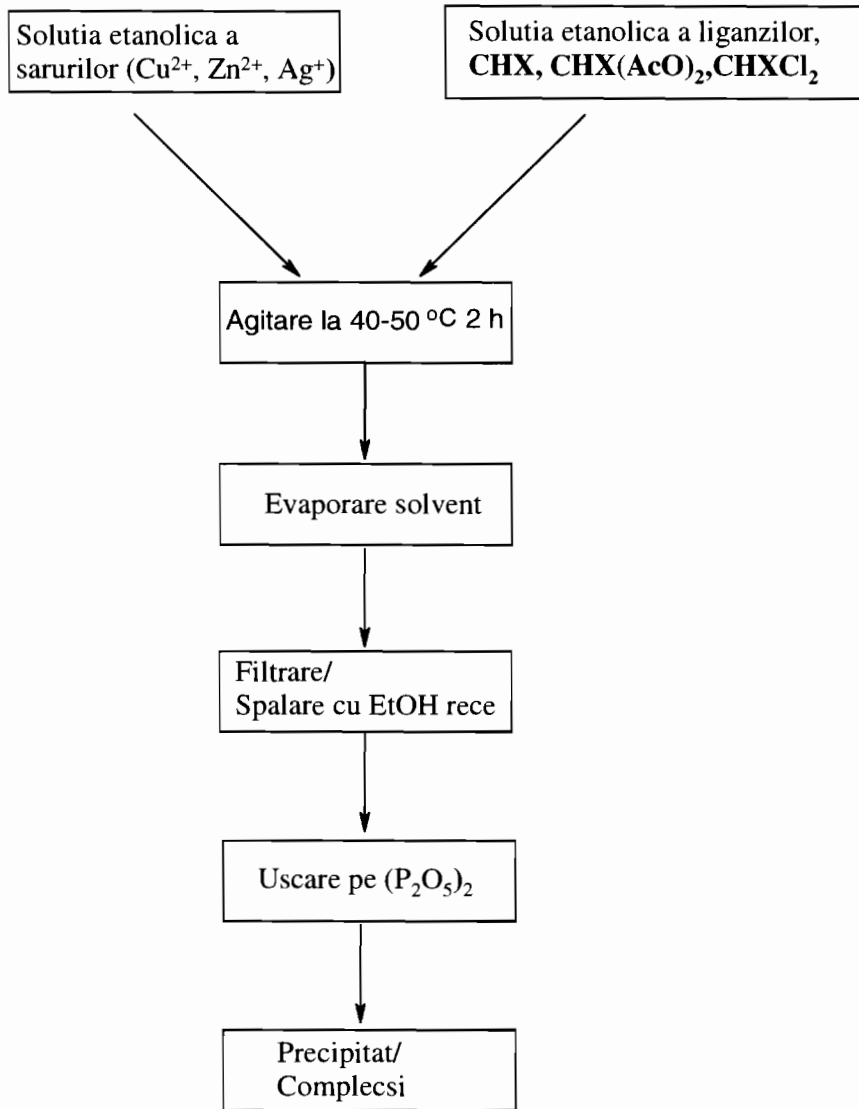


Figura nr. 1. Schema tehnologică de obținere a complecșilor metalici ai clorhexidinei, conform invenției



[Handwritten signature]

