

## Usage of di( $\mu$ -s)-bis{chloro-[1-pyridine-2-ylethanone-4-methylthiosemicarbazonato(1-)]copper}, as substance with antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*

C. Lozan-Tirsu

Department of Microbiology, Virusology and Immunology  
Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, the Republic of Moldova  
Corresponding author: karo\_lina\_ro@yahoo.com. Manuscript received March 19, 2014; accepted May 15, 2014

### Abstract

**Background:** This work relates to chemistry and medicine, namely to a biologically active coordination compound of copper from the class of thiosemicarbazonates of transition metals, which can be used as substance with antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*.

**Material and methods:** The antimicrobial activity has been studied in vitro in liquid nutritive media [peptone broth, 2%, pH 7.0] by means of using the method of successive dilutions. The substances were dissolved in DMSO at a concentration of 10 ml, the subsequent dilutions were prepared in peptone broth. The reference strains *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella abony*, *Shigella sonnei* were used as reference culture. Appreciation of the lowest inhibitory concentration and minimal bactericidal concentrations were performed by the standard method described in the literature.

**Results:** The obtained experimental data show, that this di( $\mu$ -S)-bis{chloro-[1-pyridine-2-ylethanone-4-methylthiosemicarbazonato(1-)]copper exhibits high antimicrobial activity against selective bacteria of the *Staphylococcus aureus*, that exceed 80-259 times the same characteristics of structural analogue.

**Conclusions:** The new synthesized coordinative compounds of copper demonstrate high bacteriostatic and bactericide activity against a wide spectrum of both gram-positive as well as gram-negative microorganisms. The experimentally obtained data demonstrate that (di( $\mu$ -S)-bis{chloro-[1-pyridine-2-ylethanone-4-methylthiosemicarbazonato(1-)]copper), show high selective antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, which exceeds the analogous features of structural analogue by 80-259 times. Di( $\mu$ -S)-bis{chloro-[1-pyridine-2-ylethanone-4-methylthiosemicarbazonato(1-)]copper) compounds have bacteriostatic and bactericide activity against gram-positive bacteria between the concentrations of 0.00056-0.14mg/ml and gram-negative bacteria between 0.58-75 mg/ml.

The identified properties of nominated compounds present interest because of expanding arsenal of antimicrobial remedies and can be used for combating the strains of microorganisms which are resistant to traditional drugs.

**Key words:** gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, antibacterial activity.

## Utilizarea a di( $\mu$ -s)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metilthiosemicarbazono(1-)]cupru}, în calitate de substanță cu activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus*

### Introducere

Rezistența antimicrobiană este rezultatul inevitabil al evoluției darwiniste – naturală de selecție și de supraviețuire a celui mai adaptat. Actualmente, tot mai multe bacterii achiziționează rezistență la anumite antibiotice. Conform prognozelor diferitor centre microbiologice și medicale, deja peste 10-20 ani, toate microorganismele vor acapara rezistență la antibiotice [1, 2]. Lupta cu “nevăzută” lume a microorganismelor este inegală și, din păcate, nu întotdeauna în favoarea omului. Multă vreme considerată o teorie conspirativă, rezistența la antibiotice a devenit o problemă cât se poate de reală, o preocupare cotidiană pentru medici. Apariția rezistenței a fost accelerată prin utilizarea excesivă a antibioticelor în asocieri cu plasticitatea remarcabilă a geneticii microorganismelor. Infecțiile produse de microorganismele rezistente reprezintă o problemă de urgență pentru sănătatea publică, determinând un nivel înalt de morbiditate și mortalitate, eșecuri terapeutice și costuri tot mai ridicate pentru îngrijirile medicale.

Întrebunțarea pe scară largă a preparatelor antimicrobiene a dus la apariția tulpinilor multirezistente la antibiotice, creșterea incidenței maladiilor infecțioase și agravarea evoluției tabloului clinic.

Emergența rezistenței și multirezistenței la antibiotice a intensificat preocupările pentru descoperirea prepara-

lor antimicrobiene pentru tratamentul bolilor infecțioase. A împiedica creșterea rezistenței antimicrobiene în vederea asigurării unui act medical eficace și a păstrării sănătății publice reprezintă un motiv serios în vederea continuării eforturilor de a reduce consumul nejustificat de antibiotice, dar și de utilizare corectă a acestora [1, 2, 8].

O problemă actuală a celor care lucrează în programele antimicrobiene pentru blocarea rezistenței microbiene, transmiterii infecțiilor, constă în elaborarea remediilor antibacteriene cu activitate mai înaltă și toxicitate mai joasă decât preparatele antimicrobiene existente, utilizate în practica medicală.

Prin urmare, rămân a fi prioritare în continuare, studiile de evaluare și elaborare a preparatelor noi antimicrobiene eficiente în combaterea tulpinilor rezistente de bacterii.

Astfel, **scopul** prezentei lucrări constă în studierea proprietăților antimicrobiene ale compușilor coordinativi ai di( $\mu$ -s)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metilthiosemicarbazono(1-)]cupru}.

### Material și metode

Baza de studiu o constituie Catedra Microbiologie, Virusologie și Imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemitsanu”, laboratorul microbiologic al Centrului de Epidemiologie a Bolilor Extrem Contagioase și Securitate Biologică a Centrului Național de Sănătate Publică.

În calitate de obiect de studiu, au fost incluse tulpinile de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* "S-form" și *Salmonella abony* ГИСК 03/03y. Compușii coordinativi ai di( $\mu$ -s)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemi-carbazono(1-)]cupru} au fost sintetizați la Catedra Chimie anorganică, Universitatea de Stat din Moldova.

Determinarea activității antimicrobiene a compușilor a fost efectuată în mediu nutritiv lichid prin metoda diluțiilor succesive. Substanțele au fost dizolvate în dimetilformamidă, cultivarea microorganismelor, obținerea suspensiei, determinarea concentrației minime de inhibiție (CMI) și concentrației minime bactericide (CMB) au fost efectuate după metoda standard descrisă [3, 4, 7].

### Rezultate și discuții

De regulă, rezistența *Staphylococcus aureus* este determinată de producerea  $\beta$ -lactamazei și existența proteinei suplimentare legate de penicilina 25 (PLP2a). În cazul când tulpinilor de *Staphylococcus aureus* le lipsesc mecanismele de rezistență menționate, ele sunt sensibile la toate preparatele  $\beta$ -lactame. *Staphylococcus aureus* care posedă  $\beta$ -lactamaze (penicilinaze) poate hidroliza penicilinele naturale și semisintetice, cu excepția oxacilinei și meticilinei. Celelalte preparate antimicrobiene  $\beta$ -lactame (penicilinele, cefalosporinele generațiilor I, II, IV și carbopenemele) își păstrează activitatea față de tulpinile producătoare de  $\beta$ -lactamaze.

Marcherul exprimării mecanismului PLP2a este rezistența la oxacilină și meticilină. Astfel de tulpini au primit denumirea de stafilococi meticilinorezistenți [1, 2, 8].

Screening-ul compușilor noi sintetizați, de origine chimică, a permis selecția noilor compuși chimici și obținerea dozelor optime de acțiune și, ca urmare, s-a demonstrat că manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de un spectru larg de microorganisme atât gram pozitive, cât și gram negative.

Unul din acești compuși este un complex de cupru biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, și anume di( $\mu$ -s)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru} (fig. 2), care manifestă activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus*.

Din compușii coordinativi, care inhibă creșterea și multiplicarea *Staphylococcus aureus*, cel mai înalt efect antimicrobian a fost obținut în cazul di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazidocupru) (fig. 1) [11] (analogul structural) cu formula:

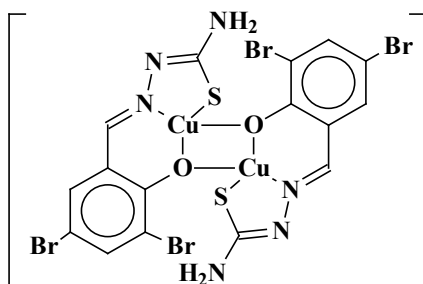


Fig. 1. Complexul di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazidocupru).

Dezavantajele complexului dat constau în faptul că el inhibă creșterea și multiplicarea bacteriilor din genul *Staphylococcus* în limitele concentrațiilor 0,072-600  $\mu$ g/ml, însă nu realizează activitate antimicrobiană înaltă față de microorganismele gram negative.

Complexul di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru}: cu formula (fig. 2) posedă activitate antimicrobiană față de specia *Staphylococcus aureus*, care depășește de 80-259 ori caracteristicile analoage ale di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosaliciliden-tiosemicarbazidocupru) [11] (analogul structural).

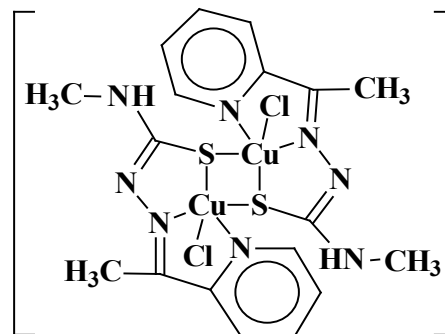


Fig. 2. Complexul di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru}.

Analiza comparativă a di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru} [5, 6, 9, 10] cu di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazidocupru) [11] demonstrează că ei se deosebesc prin aceea, că în analogul structural este mărit numărul de coordinare al atomului central prin introducerea în sfera internă a complexului unui ion de clor și înlocuirea fragmentului 3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazonei cu 2-acetilpiridinic. În afară de aceasta, în compusul revendicat atomul de hidrogen al grupei  $\text{NH}_2$ -marginale a azometinei este înlocuit cu grupul metilic. Datorită acestor particularități în structura di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru} se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

În studiu, pentru prima dată în calitate de inhibitori de creștere și multiplicare a microorganismelor gram pozitive și gram negative se propun compușii di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru}.

Rezultatele studiului activității antimicrobiene a di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru} sunt prezentate în tabelul 1, din care se vede că 4-metiltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei și dihidratul clorurii de cupru (II) inițiale nu manifestă activitate antimicrobiană față de microorganismele testate, iar compusul sus numit posedă activitate bacteriostatică și bactericidă în limitele concentrațiilor 0,00056-0,14  $\mu$ g/ml față de bacteriile gram pozitive și 0,58-75,0  $\mu$ g/ml față de microorganismele gram negative. Pentru comparație, în același tabel sunt prezentate rezultatele activității antimicrobiene caracteristice ale di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosaliciliden-tiosemicarbazidocupru) – analogul structural al compusului studiat [11], care manifestă cea mai înaltă activitate dintre substanțele șirului tiosemicarbazonic, descris în literatura de specialitate.

Tabelul 1

Concentrația minimă de inhibiție (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CBM) a compusului coordinativ revendicat față de microorganismele gram pozitive și gram negative ( $\mu\text{g/ml}$ )

Compusul	Microorganisme gram pozitive				Microorganisme gram negative					
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035		<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		<i>Shigella sonnei</i> "S-form"		<i>Salmonella abony</i> ГИСК 03/03	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
Compușii inițiali <sup>a)</sup>	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
Di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentio-semicarbazidocupru) (analog structural)	0,145	0,145	b	b	18,7	37,5	b	b	b	b
Di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono-(1-)]-cupru}	0,00056	0,0018	0,14	0,14	0,58	0,58	0,58	2,34	9,37	75

Datele experimentale obținute demonstrează, că di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono-(1-)]-cupru} manifestă activitate selectivă antimicrobiană înaltă față de *Staphylococcus aureus*, care depășește de 80-259 ori caracteristicile analogice ale di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentio-semicarbazidocupru) [11] (analogul structural).

### Concluzii

1. Compușii coordinativi ai cuprului nou sintetizați manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de un spectru larg de microorganisme atât gram pozitive cât și gram negative.

2. Datele experimentale obținute demonstrează, că di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono-(1-)]-cupru} manifestă activitate selectivă antimicrobiană înaltă față de *Staphylococcus aureus*, care depășește de 80-259 de ori caracteristicile analogice ale di( $\mu$ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentio-semicarbazidocupru) (analogul structural).

3. Compușii di( $\mu$ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono-(1-)]-cupru} posedă activitate bacteriostatică și bactericidă în limitele concentrațiilor 0,00056-0,14  $\mu\text{g/ml}$  față de bacteriile gram pozitive și 0,58-75,0  $\mu\text{g/ml}$  față de microorganismele gram negative.

4. Proprietățile depistate ale compușilor nominalizați prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antimicrobiene și pot fi utilizate pentru combaterea tulpinilor de microorganisme rezistente la medicamentele tradiționale.

### References

1. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010. Surveillance report. Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC, 2010. www.ecdc.europa.eu.
2. Bronzwaer S, Lonnroth A, Haigh R. The European Community strategy against antimicrobial resistance. *Euro Surveill*. 2004;9:30-34.
3. Buiuc D. Microbiologie clinică [Clinic microbiology]. București, 1998;435-448.
4. Buiuc D, Neagu M. Tratat de microbiologie clinică. [The treatise of clinic microbiology]. București, 1999.
5. Chumakov Iu, Tsapkov VI, Gulya AP. *Coordinatsionnaya khimia [Coordination chemistry]*. 2006;32(10):77.
6. Chumakov IuM, Tsapkov VI, Jeanneau E, et al. Crystal structures of copper(II) chloride, copper(II) bromide and copper(II) nitrat complexes with piridin-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. *Cryst. Report*. 2008;53(5):786-792.
7. Galețchi P, Buiuc D, Plugaru Ș. Ghid practic de microbiologie medicală [Practical guide to medical microbiology]. Chișinău: Știința, 1997;86-101.
8. Jehl F, Chomorat M, Weber M, et al. De la antibiogramă la prescripție [From the prescription antibiotic]. Ed. a III. București, 2010.
9. Mashkovskii MD. *Lekarstvennye sredstva [Drugs]*. Moskva: Novaya volna, 2008;1206.
10. Nakomoto K. Infrakrasnye spektry i spektry koordinatsionnorasseyenye neorganicheskikh i koordinatsionnykh soedineniy [Infrared spectra and spectra of anorganic coordination dispersed compounds]. Moskva, 1991;257.
11. Prisacari V, Țapcov V, Buraciova S, et al. Di(m-O)-bis(3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazonatocupru) // Brevet de invenție MD nr.2942. 2005. *BOPI*. 2005;12:42.
12. Wengel A, Kolind-Andersen H, Jacobsen N, et al. A biocidal, particularly fungicidal and/or bactericidal composition and thiosemicarbazones and metal complexes thereof for use the composition // PCT/DK84/00073. International Publication Number WO 85/00955, 1985.