

ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ *IN VITRO* A UNOR COMPUȘI AUTOHTONI NOI

Zariciuc Elena

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "N. Testemițanu"

Rezumat

În articol sunt prezentate rezultatele testării *in vitro* a proprietăților antibacteriene și antifungice a unor compuși noi. În calitate de tulpini de referință au fost luate 2 tulpini Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ și *Bacillus cereus* ГИСК 8035; 4 tulpini de bacterii Gram-negative: *Proteus vulgaris* HX 19222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™, *Escherichia coli* ATCC®25923™, *Klebsiella pneumoniae*; o tulpină de fungi levuriformi: *Candida albicans* ATCC®10231™. În calitate de compuși noi cu proprietăți antimicrobiene au fost testate 5 substanțe – enotaninul hidrosolubil din semințe

de struguri și 4 derivați ai tiosemicarbazonei, sintetizați în cadrul Departamentului de Chimie al USM sub conducerea academicianului A.Gulea. Pentru fiecare dintre aceste substanțe au fost evidențiate microorganismele sensibile și stabilite valorile CMI și CMB/CMF.

Cuvinte cheie: activitate antimicrobiană, enotanin hidrosolubil, derivați ai tiosemicarbazonelor.

Depus la redacție 09 august 2017

Adresa pentru corespondență: Zariciuc Elena, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "N.Testemițanu", str. N.Testemițanu 26/2, Bloc didactic nr.6, Chișinău, Republica Moldova; e-mail: erusnac@yahoo.com

Introducere

Utilizarea pe scară largă a terapiilor medicamentoase, în special folosirea nediscriminatorie a antibioticelor, inclusiv a celor de ultimă generație, a dus la o creștere alarmantă a nivelului de rezistență a microorganismelor patogene. Acest fenomen afectează umanitatea, creează o situație de criză în cercetare și devine o problemă politică. Din ce în ce mai mult guvernele din întreaga lume consideră că această problemă este atât de gravă, încât amenință realizările medicinei moderne. O epocă post-antibiotică - în care infecțiile comune și leziunile minore pot ucide - nu mai poate fi luată drept fantezie apocaliptică, fiind de fapt o posibilitate foarte reală a secolului XXI [1, 4, 9, 10].

Centrele Internaționale și Naționale pentru Controlul și Prevenirea Maladiilor, precum și alte organizații și experți recomandă aplicarea diferitor măsuri, care pot reduce amploarea fenomenului de antibioticorezistență. Implementarea măsurilor recomandate, cum ar fi adoptarea programelor de administrare a antibioticelor; îmbunătățirea practicilor de diagnostic, supraveghere și prescriere; optimizarea regimurilor terapeutice; profilaxia infecțiilor, ar trebui să fie eficiente în gestionarea acestei crize [6-8]. Alături de cele menționate este clar, că una dintre cele mai importante măsuri în acest sens este elaborarea de noi preparate antibiotice. Eforturile firmelor farmaceutice sunt concentrate pe câteva tipuri de antibiotice noi, care se referă la aminoglicozide, inhibitori ai beta-lactamazei, quinolone, ketolide, tetraciline și oxazolidinone. Puține dintre medicamentele elaborate trec cu succes toate filierele de control pentru a trece la etapa de teste clinice, dar și aici rata de promovare este destul de mică - cel mult un preparat din 5 testate [10]. Timp de 10 ani între 2000 și 2010 au fost înregistrate doar patru antibiotice noi aprobate pentru utilizare clinică (Tigeciclina, Doripenem, Ceftarolina și Telavancina). Anul 2014 a fost unul de succes pentru acest domeniu, fiind înregistrate alte 4 antibiotice noi (Tedizolidul, Dalbavancina, Oritavancina, Ceftolozana/tazobactamul). În 2016 au fost aprobate două substanțe noi - Zinplava - pentru tratamentul formelor recurente de infecții provocate de *Clostridium sp.* și Anthim - pentru tratamentul antraxului inhalat. În acest an a fost deja aprobat un nou antibiotic - Baxdela - destinat tratamentului infecțiilor cutanate [5].

Cu toate succesele înregistrate, problema antibioticorezistenței rămâne la fel de acută și la momentul actual. Astfel, completarea arsenalului de agenți antimicrobieni activi rămâne în centru atenției cercetătorilor. Există două surse principale pentru atingerea acestui scop - selectarea compușilor naturali cu efecte antimicrobiene pronunțate și

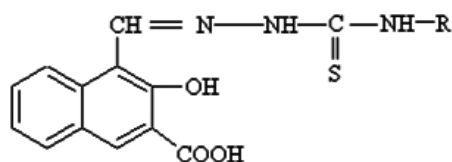
sinteza dirijată de laborator a compușilor cu proprietăți prestabilite. Scopul acestui articol constă în evidențierea proprietăților antimicrobiene a unor compuși autohtoni noi și stabilirea unor posibile domenii de aplicare a lor.

Material și metode

Pentru cercetare au fost incluse 5 substanțe cu proprietăți antimicrobiene:

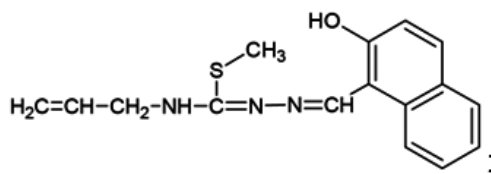
1. Enotaninul hidrosolubil, obținut prin oxidarea enotaninului insolubil în apă, extras din semințele de struguri;

2, 3. Doi derivați noi ai acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu formula:

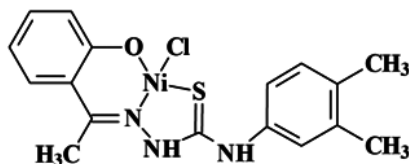


unde R=H sau R=C₆H₅;

4. Metil-N'-[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioatul cu formula:



5. Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxi-fenil) etiliden] - hidrazincarbotoio amido(1-)} nichel cu formula:



În calitate de microorganisme de referință pentru determinarea activității antimicrobiene a compușilor menționați mai sus au fost utilizate următoarele tulpini:

Bacterii Gram-pozitive:

Staphylococcus aureus ATCC®25922™

Bacillus cereus ГИСК 8035

Bacterii Gram-negative:

Proteus vulgaris HX 19222

Pseudomonas aeruginosa ATCC®27853™

Escherichia coli ATCC®25923™

Klebsiella pneumoniae

Fungi levuriformi:

Candida albicans ATCC®10231™

Determinarea concentrației minime de inhibiție (CMI) și concentrației minime bactericide sau fungicide (CMB sau CMF) a fost realizată cu aplicarea metodei diluțiilor de serie pe medii lichide. Metoda implică executarea secvențială a mai multor etape: prepararea mediilor nutritive; prepararea inoculului microorganismului testat; inocularea; incubarea; examinarea și interpretarea rezultatelor.

Prepararea mediilor de cultură. Pentru culturile bacteriene a fost utilizat mediul standard - bulion peptonat, 2% cu pH ajustat la 7,0. Pentru cultura de fungi a fost utilizat mediul Sabouraud. Mediile de cultură se prepară în conformitate cu instrucțiunea producătorului.

Prepararea inoculului microorganismelor testate. Pentru a pregăti inoculul este utilizată cultura pură de 24 ore de microorganisme crescute pe medii nutritive solide. Sunt selectate mai multe colonii similare bine izolate cultivate pe medii de cultură solide neselective. Cu ajutorul ansei se colectează cantități mici din vârful coloniei și se transferă într-un tub cu o soluție izotonică sterilă de clorură de sodiu (soluție salină), astfel ca acesta să corespundă exact standardului de turbiditate de 0,5 după McFarland. Inoculul urmează a fi utilizat în decurs de 15 minute după preparare.

Diluțiile de serie în mediu nutritiv lichid. Mediul nutritiv se toarnă în cantitate de 0,5 ml în fiecare tub. Soluția de lucru a preparatelor cu acțiune antibacteriană se obține din soluția standard cu utilizarea mediului nutritiv lichid respectiv. Soluția de lucru într-o cantitate de 0,5 ml se introduce în primul tub care conține 0,5 ml de mediu. După o agitare activă se colectează 0,5 ml de bulion, care se transferă într-un al doilea tub ce conținea inițial 0,5 ml mediu. Această procedură se repetă până când se prepară numărul necesar de diluții. Din ultimul tub se îndepărtează 0,5 ml de mediu. În fiecare tub conținând 0,5 ml a diluției corespunzătoare a preparatului antibacterian testat se introduc câte 0,5 ml inocul. Aceeași cantitate de inocul se introduce în eprubeta cu martorul negativ.

Tuburile sunt incubate la o temperatură de 35°C timp de 16-20 sau 20-24 ore (în funcție de tipul de microorganism). Tuburile cu un martor negativ sunt plasate în frigider la 4°C și păstrate până la citirea rezultatelor testului.

Pentru a determina prezența creșterii tubul cu cultura testată și cel cu martorul negativ se examinează în flux emergent de lumină. Concentrația substanței corespunzătoare tubului cu cea mai mică concentrație, care inhibă creșterea vizibilă a culturii microbiene, reprezintă valoarea CMI pentru substanța respectivă.

Pentru determinarea CMB și CMF, se prelevează 0,1 ml din tuburile utilizate pentru tehnica diluțiilor în mediu lichid (din tubul la care s-a stabilit valoarea CMI și din tuburile anterioare care prezintă concentrații superioare de antibiotic) și se însămânțează pe suprafața unor plăci cu mediu solid nesuplimentat cu antibioticul testat. După incubare, se va observa dezvoltarea microorganismelor la diluția corespunzătoare CMI. Valoarea CMB și CMF este data de cea mai mică concentrație de antibiotic care reduce numărul coloniilor cu până la 99,9%.

Rezultate și discuții

Taninele se utilizează în practica medicală ca substanță cu acțiune astringentă, antibacteriană și antiinflamatoare locală. Acțiunea astringentă este legată de capacitatea lor de a se precipita cu formarea tanatului de proteină. Aplicat pe țesutul lezat taninul formează o peliculă de albuminat, care acționează ca un protector mecanic.

Soluțiile apoase de tanin formează cu alcaloizii și glicozizii complexe insolubile cu mulți ioni de metale grele. De aceea, taninul posedă o anumită valoare ca antidot chimic în intoxicații. De obicei, taninul utilizat în medicină este obținut din *Gallae turcicae*, *Rhus coriara*, *Cotinus coggygria* și *Rhus cotinus*, specii de plante, care practic nu se întâlnesc în Republica Moldova. Din acest motiv sursa sigură pentru obținerea aminelor în Republica Moldova sunt semințe de struguri. Enotaninul hidrosolubil se obține printr-un procedeu de solubilizare oxidativă a enotaninului, inițial insolubil în apă, care, la rândul său, se obține din materie primă naturală – semințe de struguri, care reprezintă produse secundare ale industriei vinicole.

Acțiunea antimicrobiană a enotaninului hidrosolubil a fost verificată prin aplicarea metodei diluțiilor în serie și comparată cu acțiunea taninului medicinal. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Acțiunea antimicrobiană a enotaninului hidrosolubil

Tulpini microbiene	Enotanin hidrosolubil, mg/ml		Tanin, mg/ml	
	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
Gram+				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25922™	3	6	6	12
<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	0,7	3	6	12
Gram-				
<i>Proteus vulgaris</i> HX 19222	3	12	12	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®27853™	3	6	3	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	25	25	50
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25923™	3	6	12	12
Fungi				
<i>Candida albicans</i> ATCC®10231™	1,5	6	6	12

Este evident că compusul dat manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă în intervalul de concentrații 3...25 mg/ml față de bacteriile gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC®25922™, *Bacillus cereus* ГИСК 8035) și gram-negative (*Proteus vulgaris* HX 19222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™, *Escherichia coli* ATCC®25923™, *Klebsiella pneumoniae*). Cele mai mici valori ale CMI și CMB au fost obținute pentru tulpina *Bacillus cereus* ГИСК 8035. De asemenea, compusul are și acțiune antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC®10231™, care comparativ cu taninul medicinal este de 4 ori mai activă. Proprietățile depistate prezintă interes din punct de vedere al completării listei de preparate antibacteriene cu spectru larg de acțiune.

Un alt grup de substanțe cu acțiune antimicrobiană pronunțată sunt compușii, care conțin segmentul tiosemicarbazonic. Tiosemicarbazonelile ce fac parte din clasa bazelor Schiff atrag atenția cercetătorilor atât prin varietatea lor structurală, cât și prin activitatea biologică, inclusiv antibacteriană și antifungică. Gama largă de proprietăți biologice este determinată de diversitatea tiosemicarbazonelilor, care pot fi obținute prin reacția Schiff, variind aldehida sau cetona inițială sau substituenții în fragmentul

tiosemicarbazonic. Variația proprietăților biologice la schimbările neesențiale în compoziția și structura substanțelor (și lipsa unor date concrete privind mecanismul de acțiune biologică) determină sinteza unor compuși noi de acest tip.

Influența substituenților și poziției lor în fragmentul tiosemicarbazidic asupra proprietăților biologice nu poate fi pronosticată exact (deși s-au evidențiat unele legități mai generale), fiind determinată de un șir de factori care pot fi elucidați numai la testarea influenței compușilor asupra organismelor vii, printre care sunt interacțiunea cu receptorii și capacitatea de a pătrunde prin membrană. În această lucrare au fost testate 4 substanțe noi, care includ în structură segmentul respectiv. Două dintre ele prezintă derivați noi ai acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic. Activitatea antibacteriană a acestor compuși a fost testată față de două tulpini: *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ și *Escherichia coli* ATCC®25923™. Activitatea lor a fost comparată cu activitatea cloramfenicolului. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2. Din datele prezentate urmează că compușii $C_{13}H_{11}N_3SO_3 \cdot CH_3OH$ și $C_{19}H_{15}N_3O_3S$ manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă față de ambele tulpini bacteriene testate. O activitate mai pronunțată manifestă cel de-al doilea compus, care la concentrații de 0,6 mg/ml inhibă dezvoltarea *S. aureus* ATCC®25922™. Primul compus este mai activ față de *E. coli* ATCC®25923™ prin inhibarea și distrugerea microorganismului la concentrații de 2 ori mai mici în comparație cu compusul doi.

Tabelul 2. Acțiunea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonici

Tulpini microbiene	Compusul nou		Substanța de referință	
	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
	$C_{13}H_{11}N_3SO_3 \cdot CH_3OH$, mg/ml		Cloramfenicol, mg/ml	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25922™	2,5	5	0,7	1,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25923™	1,2	2,5	3,0	6,0
	$C_{19}H_{15}N_3O_3S$, mg/ml		Cloramfenicol, mg/ml	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25922™	0,6	1,2	0,7	1,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25923™	2,5	5,0	3,0	6,0
	$C_{16}H_{17}N_3OS$, μg/ml		$C_{20}H_{17}ClCuN_4OS$, μg/ml	
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25923™	500	500	1000	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	500	500	>2000	>2000
<i>Candida albicans</i> ATCC®10231™	0,7	0,7	0,59	1,17
	$C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$, μg/ml		$C_8H_5Br_2CuN_3OS$, μg/ml	
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25923™	1,5	1,5	18,7	37,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®27853™	0,7	1,5	600	600
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,7	1,5	18,7	18,7
<i>Candida albicans</i> ATCC®10231™	3,0	3,0	300	300

Un alt compus nou din categoria derivatelor tiosemicarbazonei este și compusul metil-N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidra-zonotioat (C₁₆H₁₇N₃OS), caracterizat prin structură practic planară și cu activitate biologică înaltă. Rezultatele testării proprietăților antimicrobiene ale acestui compus în comparație cu un alt derivat tiosemicarbazonic brevetat [3] sunt prezentate în tabelul 2. Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților antimicotice ale compusului menționat sunt prezentate în tabelul 2 și demonstrează că acesta manifestă activitate fungistatică față de *Candida albicans* ATCC®10231™ la nivelul substanței de referință, iar după activitatea fungică depășește caracteristicile ei de 1,7 ori, manifestând în același timp o activitate antimicrobiană de 2...4 ori mai înaltă față de tulpinile bacteriene testate.

Ultima dintre substanțele testate este un tiosemicarbazonat de nichel - cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotioamido(1-)} nichel (C₁₇H₁₈ClN₃NiOS). Activitatea antimicrobiană a acestui compus a fost comparată cu cea a unui tiosemicarbazonat de cupru, care a fost brevetat anterior - di(μ-O)-bis(3,5-dibromosaliciliden-tiosemicarbazidocupru) [2]. Rezultatele studiului activității antimicrobiene pentru acest compus nou sunt prezentate în tabelul 2, din care se vede că acesta posedă o activitate bacteriostatică și bactericidă față de microorganismele testate în limitele concentrațiilor 0,7...3,0 μg/ml. Substanța de referință manifestă cea mai înaltă activitate bacteriostatică și bactericidă față de *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*. Datele experimentale obținute demonstrează că compusul nou manifestă activitate antimicrobiană, care depășește de 12,5...1200 ori activitatea bacteriostatică și bactericidă a martorului față de *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™ și de 12,5...100 ori este mai activ față de *Escherichia coli* ATCC®25923™ și *Candida albicans* ATCC®10231™.

Concluzii

Enotininul solubil obținut prin oxidarea enotininului insolubil din semințe de struguri posedă acțiune antibacteriană și antifungică mai pronunțată decât taninul, este ieftin în obținere și poate fi utilizat pe larg în medicina practică.

Derivații noi ai acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic prezintă activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* ATCC®25923™ și *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ și sunt de perspectivă pentru utilizarea în diferite domenii ale medicinei, medicinei veterinare și agriculturii, unde este necesară prelucrarea antiseptică a materialelor.

Compusul metil-N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidra-zonotioat este de perspectivă pentru completarea listei preparatelor eficiente contra candidozelor.

Compusul cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotioamido(1-)} nichel posedă activitate antimicrobiană înaltă față de *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853™, dar poate fi considerat și un compus cu proprietăți antifungice pronunțate, activ față de *Candida albicans* ATCC®10231™.

Bibliografie

1. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. World Health Organization 2014, ISBN 978 92 4 156474 8, 256 p.

2. Brevet de invenție 2942 B2. Di(μ -O)-bis(3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazonatocupru)/ Prisacari V.; Țapcov V.; Buraciova S.; Bârcă M.; Gulea A.(2005.12.31), BOPI nr. 12/2005
3. Brevet de invenție 4258 B1. Utilizarea compușilor coordinați ai cuprului(II) cu 4-(metoxifenil)tiosemicarbazonele 2-benzoilpiridinei în calitate de inhibitori ai *Candida albicans*/ Gulea A.; Jalbă A.; Țapcov V.; Buzatubalachin E.; Cotovaia A.; Rudic V. (2013.11.30), BOPI nr. 11/2013
4. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. 2015. State of the World's Antibiotics, 2015. CDDEP: Washington, D.C, 84 p.
5. Center watch. FDA approved drugs for infections and infectious disease. Available at: <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/therapeutic-area/25/infections-andinfectious-diseases>. Accessed April 27, 2017.
6. Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. April 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>. Accessed April 20, 2017.
7. Luyt C.E., Brechot N., Trouillet J.L., Chastre J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit Care* 2014;18(5): 480.
8. Rossolini G.M., Arena F., Pecile P., Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Clin Opin Pharmacol*, 2014;18C: 58–60
9. Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P & T: A peer-reviewed journal for formulary management* (2015) 40(4): 277–83.
10. Ventola, C.L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 2: Management Strategies and New Agents. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* , 2015, 40(5):344–52.