

ACȚIUNEA ANTIMICROBIANĂ A PREPARATULUI AUTOHTON ENOXIL

Lucian LUPAȘCU¹, Valeriu RUDIC¹, Viorica COTOS²,
Ștefan PLUGARU³, Alexandru CALANCEA³

¹ Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM;

² Spitalul de boli infecțioase T. Ciorbă;

³ Universitatea de Stat de Medicină și
Farmacie N. Testemițanu;

Summary

The antimicrobial activity of the autochthonous compounds „ENOXIL”

The study presents data about the antimicrobial activity of the autochthonous compound of tannic source enoxil. We established the minimal inhibitory and bactericidal/fungicidal concentrations for certain skin types and wound infectious agents. Based on *Pseudomonas* bacteria model, it was established that the enoxil compound suppresses the activity of some important enzymes – a phenomenon that leads to the increase of bacterial sensibility to many tested antibiotics.

Key words: skin infection, infected plague, traditional treatment methods, antibiotics, tannin, antimicrobial activity, ferments, bacteria.

Резюме

Антимикробная активность отечественного препарата „ЭНОКСИЛ”

В статье приводятся данные относительно антимикробной активности отечественного препарата танниного происхождения Эноксил. Были установлены минимальная ингибиторная и минимальная бактерицидная/фунгицидная активность для некоторых возбудителей кожных заболеваний и ожоговых инфекций. Использованием *Pseudomonas* в качестве модельного объекта выявлено ингибирующее действие Эноксила на некоторые ключевые ферменты, что приводит к повышению чувствительности бактерии к большинству тестируемых антибиотиков.

Ключевые слова: раневая инфекция, кожная инфекция, традиционные методы лечения, антибиотики, таннин, антимикробная активность, ферменты, бактерии.

Introducere

Infecțiile de piele și de plagă, deși se întâlnesc cu preponderență în țările cu nivel economic precar și standarde joase de igienă [6], în ultimele decenii au devenit o preocupare serioasă și pentru țările cu dezvoltare socioeconomică înaltă [4, 5, 12, 14]. O mare îngrijorare prezintă și infecțiile intraspitaliceși de plagă, întrucât complică însănătoșirea, produc anxietate, măresc disconfortul pacientului și pot conduce la deces, fiind, totodată, un pericol serios și pentru lucrătorul medical [14, 19]. Sunt apreciable și aspectele economice ale infecțiilor [15].

Printre cele mai frecvente microorganisme în dermul sau plaga purulentă se constată bacteriile grampozitivă *Staphylococcus aureus* și gramnegative *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* [16]. Atenție deosebită se acordă infecțiilor pseudomonadice ca niște complicații ale combustii, traumelor, procedurilor de tatuaj, celulitelor, ulcerelor cronice decubitale, foliculitelor [7, 8, 23].

Una dintre metodele tradiționale de combatere a infecțiilor este utilizarea antibioticelor. În ultimul timp, însă, se constată un fenomen îngrijorător în întreaga lume, inclusiv în Republica Moldova, și anume rezistența microorganismelor la aceste preparate [21, 22]. Tratamentul permanent și, adesea, abuziv cu antibiotice a condus la selectarea noilor virulențe, agresive și severe, cu potențial genetic înalt de rezistență. Această situație orientează specialiștii în domeniu spre elaborarea preparatelor antimicrobiene bazate pe mecanisme de acțiune principial noi [18]. Deși utilizarea extraselor taninice din plante pentru tratarea diferitelor infecții ale dermului și plăgilor este cunoscută de multă vreme, totuși, acestea nu prezintă efectul scontat pentru multe microorganisme [2, 17, 20]. La moment, gama de preparate medicinale eficiente, elaborate în baza compușilor taninici, este restrânsă, în mare parte datorită insolubilității multora din ele în soluții apoase sau alcoolice. Capacitatea extraselor fenolice (taninice) de a dezinfecta și a trata rapid rănille se bazează pe două fenomene de bază – activitatea antimicrobiană și cea antioxidativă, determinate de un șir de mecanisme: captarea ionilor de fier din substrat și, deci, deprivarea microorganismelor de compușii necesari pentru activitatea fiziologică; joncțiunea acestora cu proteinele microbiene și formarea complexșilor; captarea radicalilor liberi; absorbția radicalilor de oxigen; inhibiția oxidării lipoproteinelor de densitate joasă [3].

Este cunoscut faptul că semințele de struguri sunt o sursă bogată de enotaninuri – taninuri condensate care reprezintă o gamă vastă de substanțe naturale cu structură polifenolică, remarcate prin conținut înalt de proantocianidine [9]. În Republica Moldova există enotaninuri în cantități industriale. Luând în considerație faptul că multe taninuri cu proprietăți antimicrobiene sunt insolubile în apă și, totodată, apariția rezistenței microbiene la taninurile vegetale, de mare perspectivă sunt cercetările cu privire la posibilitatea de modificare structurală a enotaninurilor, la mărirea gradului de oxidare în scopul sporirii efi-

cienței și aplicării acestora la tratarea infecțiilor de piele și de plagă.

Scopul prezentelor cercetări a constat în elucidarea activității antimicrobiene a preparatului autohton *enoxil* de origine taninică.

Material și metode

Cercetările au fost efectuate la Catedra *Microbiologie, Imunologie și Virusologie* a Universității de Stat de Medicină și Farmacie *N. Testemițanu*.

În calitate de compus antimicrobian a servit preparatul autohton *enoxil*, obținut prin hidrosolubilizarea enotaninurilor pe cale chimică și fizico-chimică [10], iar drept culturi microbiene – unii patogeni cu implicare severă în multe boli infecțioase – bacteriile *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris* și fungul *Candida albicans*.

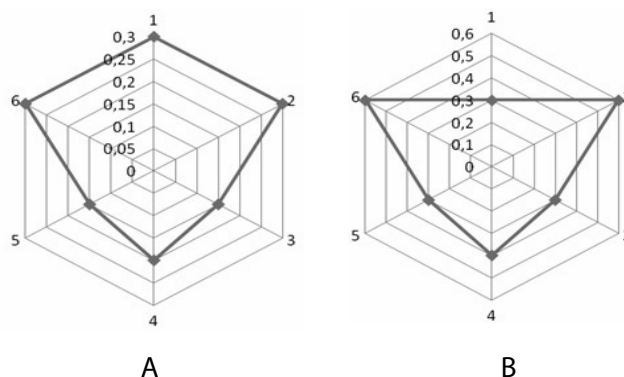
Pentru stabilirea gradului de activitate a preparatului testat au fost utilizate valorile concentrației minime inhibitoare (CMI) și ale concentrației minime bactericide/fungicide [1]. În calitate de indici-test ai acțiunii *enoxilului* asupra bacteriei *P. aeruginosa* au servit un șir de parametri biochimici importanți – indicatori ai viabilității și patogenității bacteriene: sinteza citocromoxidazei, citratreductazei, hemolizinelor, piocianinei, prezența mirosului, iar în calitate de indice al sensibilității la antibiotice – zona de inhibiție (mm) a culturii, specifică fiecărui antibiotic. Sensibilitatea bacteriei *P. aeruginosa* a fost determinată prin metoda difuziei antibioticelor în geloză din runde [13], care au conținut următoarele antibiotice omologate în Republica Moldova: cloramfenicol (30 mkg), pefloxacină (5 mkg), eritromicină (15 mkg), cefuroxim (30 mkg), cefoxitin (30 mkg), cefalotină (30 mkg), piperacilină (30 mkg), imipenem (10 mkg), ciprofloxacina (5 mkg), tobramicină (10 mkg), gentamicină (10 mkg), tetraciclină (30 mkg). Pentru testare a fost utilizat mediul nutritiv standardizat *Miuller-Hinton*. Cutiile cu bacterie și antibiotice au fost menținute la temperatura de 37°C, timp de 24 de ore, după care s-a stabilit rezultatul antibioticogramei. Datele au fost prelucrate statistic în pachetul de soft *STATISTICA 7*.

Rezultate și discuții

Prin cercetarea acțiunii preparatului *enoxil* asupra bacteriilor *E. coli*, *S. abony*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* și fungului *C. albicans* au fost puse în evidență CMI (figura 1 A) și concentrația minimă bactericidă/fungicidă (CMB/CMF) (figura 1 B). Astfel, *enoxilul* prezintă proprietăți atât antibacteriene, cât și antifungice la concentrații relativ joase. Concentrația minimă de inhibiție a *enoxilului* pentru bacteriile testate se manifestă în limitele 0,15-0,3%, iar cea

bactericidă – în limitele 0,3-0,6%. Pentru fungul *C. albicans* concentrația minimă de inhibiție este de 0,3%, iar cea fungicidă – de 0,6%.

Valorile CMI și CMB/CMF pentru microorganismele aflate în studiu au prezentat diferențe de un ordin, cu excepția bacteriei *E. coli*, pentru care acești indici au coincis. Prin analiză corelațională am constatat că gradul de dependență (r) între CMI și CMB/CMF este semnificativ și pozitiv, egal fiind cu 0,66. Analiza regresională care are valoare predictivă și prezintă relația matematică a dependenței a demonstrat că ecuația acesteia este: $y=0,0923+0,3385 x$ ($p \leq 0,05$).



Pe perimetrul hexagonal: 1 – *E.coli*, 2 – *S.abony*, 3 – *S.aureus*, 4 – *P.vulgaris*, 5 – *P.aeruginosa*, 6 – *C.albicans*. Pe verticală – concentrații, %.

Fig. 1. Concentrația minimă de inhibiție (A) și cea bactericidă/fungicidă (B) a *Enoxilului* pentru unele microorganisme.

După cum se vede din datele prezentate în tabelul 1, sub acțiunea *enoxilului* în concentrația statică stabilită (0,15%) s-a produs reprimarea activității oxidazelor, citratreductazelor și hemolizinei. Totodată, cultura de bacterie nu a produs piocianină și indol și nu a emanat miros specific. În aceste condiții, menținerea mobilității este o dovadă a viabilității bacteriei, ceea ce relevă corectitudinea testării. Deci, concentrația statică de *enoxil* produce mari perturbări la nivel biochimic în celula bacteriană, ceea ce, probabil, diminuează considerabil capacitatea de descompunere a substraturilor, precum și potențialul patogen al acesteia.

Tabelul 1

Influența concentrației statice de *enoxil* asupra unor indici biochimici și funcționali ai bacteriei *P. aeruginosa*

Indicator	Martor (+/-)	<i>Enoxil</i> (+/-)
Oxidaze	+	-
Citratreductaze	+	-
Hemolizine	+	-
Indol	-	-
Piocianină	+	-
Miros	+	-
Mobilitate	+	+

Tratarea culturii bacteriene cu *enoxil* a sporit sensibilitatea (S) la majoritatea antibioticelor aflate în studiu, rezistența (R) fiind manifestată doar pentru eritromicină și cefalotină (tabelul 2).

Pentru tetraciclină s-a constatat o reacție de sensibilitate medie (RS). Dacă în varianta-martor cultura a manifestat sensibilitate doar pentru pefloxacină și imipenem, atunci în varianta cu *enoxil* sensibilitatea s-a manifestat pentru majoritatea antibioticelor, excepție fiind doar eritromicina și cefalotina. De menționat că *enoxilul* a indus sensibilitate bacteriei pentru unele antibiotice considerate inactive pentru *P. aeruginosa*, de exemplu, cefoxitin.

Tabelul 2

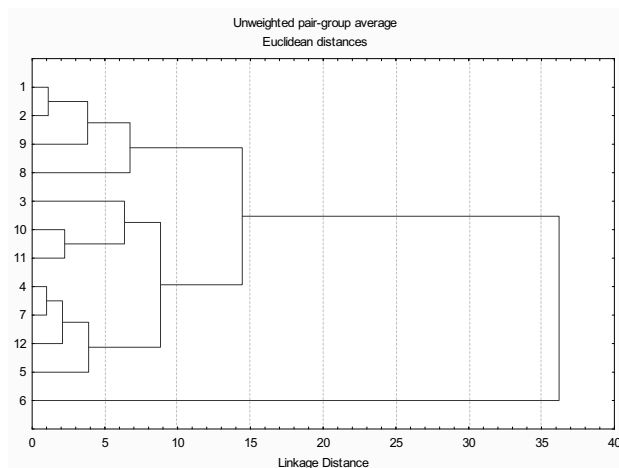
Influența concentrației statice de *enoxil* asupra sensibilității culturii de *P. aeruginosa* la unele antibiotice

Nr.	Antibiotic	Cultură netratată (martor)		Cultură tratată	
		Zonă de inhibiție, mm	Reacție	Zonă de inhibiție, mm	Reacție
1	Cloramfenicol	0,0	R	26,0±0,6*	S
2	Pefloxacină	14,0±0,6	R	26,3±0,3*	S
3	Eritromicină	0,0	R	13,0±0,6*	R
4	Cefuroxim	0,0	R	20,0±1,2*	S
5	Cefoxitin	0,0	R	22,0±0,6*	S
6	Cefalotină	0,0	R	0,0	R
7	Piperacilină	0,0	R	20,0±1,2*	S
8	Imipenem	30,0±1,2	S	29,3±1,5	S
9	Ciprofloxacin	0,0	R	24,0±0,6*	S
10	Tobramicină	0,0	R	17,0±1,2*	S
11	Gentamicină	0,0	R	16,0±0,6*	S
12	Tetraciclină	0,0	R	19,0±0,7*	R-S

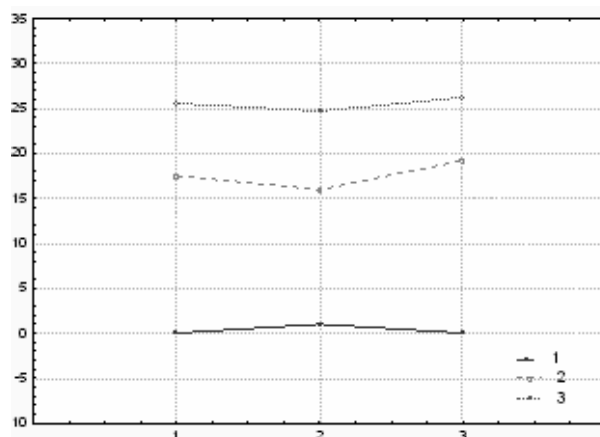
Notă: * – deosebire de martor cu suport statistic la nivelul $p < 0,05$.

Analiza gradului de similitudine a preparatelor prin metoda clusteriană de construire a dendrogramelor a demonstrat că antibioticele testate s-au repartizat în clusteruri mari (figura 2 A), destul de deosebite, ceea ce relevă că tulpina de bacterie tratată cu *enoxil* are reacție diferită la antibiotice. Un cluster puternic deosebit a fost prezentat de preparatul 6 – cefalotina (unul dintre cele mai eficiente antibiotice în infecțiile pseudomonadice), pentru care tulpina a manifestat cea mai mare rezistență (zona de inhibiție: 0,0 mm). Cu cât nivelul de agregare al clusterelor este mai mic, cu atât similitudinea antibioticelor, în baza zonei de inhibiție, este mai mare (de exemplu, cloramfenicolul – 1; pefloxacilină – 2). Spre deosebire de metoda construirii dendrogramelor, care este una aglomerativ-iterațională și efectuează clasificarea obiectelor (antibioticelor) în baza diferitelor nivele de agregare, metoda *k*-medii de analiză clusteriană, neiterațională clasifică obiectele în clusteruri, stabilite

de experimentator, în baza posibilelor efecte: mic, mediu, mare ș.a. și prezintă oportunități de înaltă precizie [24].



A



B

Legendă: A: 1 – cloramfenicol, 2 – pefloxacină, 3 – eritromicină, 4 – cefuroxim, 5 – cefoxitin, 6 – cefalotină, 7 – piperacilină, 8 – imipenem, 9 – ciprofloxacin, 10 – tobramicină, 11 – gentamicină, 12 – tetraciclină; B: 1, 2, 3 – clusteruri

Fig. 2. Analiza clusteriană (A – construirea dendrogramelor; B – metoda *k*-medii) a antibioticelor în baza capacității de reprimare a culturii de *P. aeruginosa* tratată cu *enoxil* (0,2%).

Modul de clasificare (repartiție) a antibioticelor în baza acțiunii asupra tulpinii de *P. aeruginosa* tratate cu *enoxil* a pus în evidență existența clusterelor cu deosebiri pronunțate (figura 2 B). Prin examinarea membrilor (antibioticelor) celor 3 clusteruri, s-a constatat că clusterul 1 a fost format doar de cefalotină, pentru care *P. aeruginosa* a manifestat cea mai înaltă rezistență, fapt confirmat și de analiza dendrogramelor de repartiție. Clusterul 2 în care s-au repartizat antibioticele eritromicina, cefuroxim, piperacilina, tobramicina, gentamicina, tetraciclina se caracterizează prin capacitatea acestora de producere a reacției de sensibilitate medie, iar clusterul 3 – antibioticele cloramfenicol, pefloxacină, cefoxitin,

imipenem, ciprofloxacina – a reacției de sensibilitate puternică.

Deci, dacă facem abstracție de antibioticul imipenem, pentru care tulpina a prezentat sensibilitate și în varianta-martor, se poate observa că *enoxilul* a indus o reacție de sensibilitate puternică pentru majoritatea antibioticelor, dintre care 3 – cloramfenicolul, pefloxacina și cefalotina – nu se aplică la tratarea infecțiilor pseudomonadice [11], adică sunt nespecifice.

Concluzii

Valorile CMI și CMB/CMF ale *enoxilului* pentru microorganismele aflate în studiu au prezentat diferențe de un ordin, cu excepția bacteriei *E. coli*, pentru care acești indici au coincis. A fost stabilită existența unei corelații înalte și pozitive pentru CMI/CMB la tratarea cu *enoxil*, ceea ce face predictivă comportarea microorganismelor.

Pe modelul bacteriei *P. aeruginosa* s-a constatat că unele dintre mecanismele biochimice de reprimare a creșterii și dezvoltării acesteia de preparatul *enoxil* constau în inhibiția sintezei unor asemenea enzime importante pentru viabilitatea organismului bacterian, cum ar fi oxidazele, citratoreductazele, hemolizinele, precum și a piocianinei. Acest fenomen s-a reflectat în cel mai direct mod asupra sensibilității bacteriei la un șir de antibiotice utilizate în medicina contemporană. Preparatul *enoxil* în concentrații bactericide (CMB – 0,3%) poate fi considerat unul de perspectivă în tratamentul infecțiilor pseudomonadice.

Bibliografie

1. Andrews J.M., *Determination of minimum inhibitory concentrations*, în *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, nr. 48, p. 5-16.
2. Asres K., Mazumder A., Bucar F., *Antibacterial and antifungal activities of extracts of combretum molle*, în *Ethiop Med J.*, 2006, nr. 44(3), p. 269-277.
3. Chung K., Lu Z., Chou M., *Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria*, în *Food and Chem. Toxic.*, 1998, nr. 36, p. 1053-1060.
4. Collier M., *Wound-bed management: key principles for practice*, în *Prof. Nurse*, 2002, nr. 18(4), p. 221-225.
5. Cooper R. *Wound microbiology: past, present, and future*, în *British J. of Nursing*, 2002, nr. 11(22), p. 4-6.
6. Dogra S., Kumar B., *Epidemiology of Skin Diseases in School Children: A Study from Northern India*, în *Pediatr. Dermatol.*, 2003, nr. 20(6), p. 470-73.
7. Gang R.K., Bang R.L., Sanyal S.C. et al., *Pseudomonas aeruginosa septicaemia in burns*, în *Burns*, 1999, nr. 25, p. 611.

8. Kehheth T., *Pseudomonas aeruginosa*. <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> (2008).
9. Kulcički V., Vlad P., Duca Gh. et al., *Investigation of grape seed proanthocyanidins*, în *Chem. J. of Moldova*, 2007, nr. 2 (1), p. 36-50.
10. Lupașcu T., Lupașcu L., *Procedeu de obținere a enotaninurilor hidrosolubile*. Brevet de invenție 3125 MD din 2006.08.31, BOPI, 2006: 8.
11. Matcovschi C., Procopișin V., Parii B., *Ghid farmaceutic*, Chișinău, 2006, 1424 p.
12. Miller M., *Wound infection unraveled*, în *J. of Comm. Nurs.*, 2001, nr. 15(3), p. 31-33.
13. National committee for clinical laboratory standards (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Twelfth Informational Supplement M100-S12 NCCLS. Wayne, 2002
14. Nosocomial Infection National Surveillance Service. *Surveillance of Surgical Site Infection in English Hospitals: a national surveillance and quality improvement programme*, în *Public Health Laboratory Service*, 2002.
15. Prisacari V., Paraschiv A., *Contribuții în optimizarea sistemului de supraveghere epidemiologică în infecțiile septico-purulente nosocomiale, de profil chirurgical*, în *Epidemiologia și microbiologia*. Mat. Congr. VI al igienișt., epid. și microb. din Republica Moldova, 23-24 oct., 2008, vol. II, Chișinău, 2008, p. 22-25.
16. Rodgers G., Mortensen J., Fisher M. et al., *Predictors of infectious complications after burn injuries in children*, în *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2000, nr. 19 (10), p. 990-995.
17. Santos S.C., Mello J.C.P., *Taninos*, în *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5. ed., Porto Alegre/ Flor., Edit. da UFRGS/UFSC, 2004, p. 615-656.
18. Schwaber M.J., Cosgrove S.E., Gold H.S. et al., *Fluoroquinolones Protective Against Cephalosporin Resistance in Gram-Negative Nosocomial Pathogens*. Posted 02/03/2004 /www.medscape.com/viewarticle/466484
19. Singh N.P., Goyal R., Manchanda V. et al., *Changing Trends in bacteriology of burns in the burns units*, în *Burns*, 2003, nr. 29, p. 129-132.
20. Timbola A.K., Szpoganicz B., Branco A. et al., *A new flavonol from leaves of Eugenia jambolana*, în *Fitoterapia*, 2002, nr. 73, p. 174-176.
21. Valencia I., Kirsner R., Kerdel F., *Microbiologic evaluation of skin wounds: alarming trend toward antibiotic resistance in an inpatient dermatology service during a 10-year period*, în *J. Am. Acad. Derm.*, 2004, nr. 50, p. 845-849.
22. Vișnevschi L., Bradu V., *Modificarea rezistenței microorganismelor la antibiotice, testate în laboratorul microbiologic al CMPR Ungheni*, în *Epidemiologia și microbiologia*. Mat. Congr. VI al igienișt., epidem. și microbiol. din Republica Moldova, 23-24 octombrie 2008, Chișinău, 2008, p. 264-265.
23. Рожавин М.А., *Некоторые биологические свойства меланина P. aeruginosa*, în *Журн. микробиол.*, 1983, nr. 1, p. 45-47.
24. Халафян А.А., *Современные статистические методы медицинских исследований*, 2008, С.-П., Изд-во ЛКИ, 320 с.

Prezentat la 28.12.2009