

CZU: 615.281.9:547.655.6

## STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTITUBERCULOASE A PARTICULELOR DE CICLODEXTRINE ÎNCĂRCATE CU JUGLONĂ

## STUDY OF ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF THE CYCLODEXTRINS PARTICLES LOADED WITH JUGLONE

Natalia Sucman<sup>1,2</sup>, Livia Uncu<sup>2</sup>, Valeriu Crudu<sup>3</sup>, Nelly Ciobanu<sup>3</sup>,  
Alexandru Codreanu<sup>3</sup> Vladimir Valica<sup>2</sup>, Fliur Macaev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorul Sinteză Organică, Institutul de Chimie, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Centrul Științific al Medicamentului,

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova;

<sup>3</sup>Laboratorul Microbiologia și Morfologia tuberculozei,

IMSP Institutul de Ftiziopneumopogie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, Republica Moldova

**Autor corespondent:** [livia.uncu@usmf.md](mailto:livia.uncu@usmf.md)

**Rezumat.** Această lucrare este dedicată obținerii particulelor de ciclodextrine încărcate cu Juglonă în calitate de compus antimicobacterian. Au fost descrise metoda de preparare și morfologia particulelor obținute. Sunt prezentate datele privind activitatea antimicobacteriană a sistemelor obținute. S-a detectat, că sistemele de particule de ciclodextrine încărcate cu Juglonă sunt la fel de eficiente ca Juglona pură aplicată în doze mai mari.

**Cuvinte cheie:** Juglone;  $\beta$ -ciclodextrină; (2-Hidroxiopropil)  $-\beta$ -ciclodextrină; Sare de sodiu sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrină

**Abstract.** This paper is dedicated to obtaining of cyclodextrins particles loaded with Juglone as antimycobacterial compound. Method of preparation and morphology of the obtained particles have been described. The antimycobacterial activity data of the obtained systems is presented. It has been detected that cyclodextrins particulate systems loaded with Juglone are as effective as pure Juglone applied in higher dosages.

**Keywords:** Juglone;  $\beta$ -cyclodextrin; (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin; Sulfobutyl-beta-Cyclodextrin sodium salt.

## INTRODUCERE

Tratamentul antituberculos, considerat ca una din metodele principale de prevenire a răspândirii infecției, tot mai des în ultima perioadă nu se soldează cu rezultate așteptate și unul din motivele de bază a ineficienței terapeutice este rezistența *M.tuberculosis* față de preparatele antituberculoase. Extinderea nivelului rezistenței primare și acumularea unui număr tot mai mare de tulpini de *M.tuberculosis* rezistente la preparatele antituberculoase a devenit o problemă majoră în controlul acestei infecții la etapa actuală. Urmare a acestui fenomen este creșterea numărului de eșecuri terapeutice și a numărului de bolnavi cronici. Este o problemă destul de alarmantă, deoarece în viitor pot apărea tot mai frecvent forme de tuberculoză incurabilă, ori, alte preparate antituberculoase noi nu se elaborează prea des [9].

Rezistența *M.tuberculosis* față de preparatele antituberculoase strategice, utilizate pe larg la etapa actuală în tratamentul acestei infecții a atins cifre extrem de periculoase. După datele studiului național de supraveghere

a rezistenței medicamentoase (2020), realizat de către Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei al Institutului de Ftiziopneumologie “Chiril Draganiuc”, demonstrează un nivel extrem de mare a tuberculozei multirezistente (TBMDR) la preparatele strategice utilizate în tratamentul tuberculozei (Izoniazidă și Rifampicină). TB MDR a fost determinată la 24.9% din pacienții cu tuberculoză pulmonară caz nou examinați, iar printre cazurile cu re-tratamente – 54,3%. Un nivel înalt al rezistenței micobacteriilor tuberculozei față de remediile specifice se observă nu numai în regiunile cu incidență sporită a acestei infecții, dar și în țările, unde incidența tuberculozei este joasă. Organizația Mondială a Sănătății a declarat tuberculoza o urgență globală, iar fenomenul în cauză de o importanță primordială și recomandă ca cercetările efectuate în domeniul elaborării unor remedii noi, mai efective în tratamentul cazurilor de tuberculoză cu rezistență multiplă la medicamente, să fie apreciate ca direcție de studiu prioritar.

Tratamentul diferitor forme de tuberculoză este unul complex, cu utilizarea preparatelor din diverse grupe

farmacoterapeutice. Studiarea unor substanțe noi cu activitate antituberculoasă și elaborarea unor noi remedii, care ar putea largi arsenalul preparatelor antituberculoase și influența esențial la eficacitatea tratamentului cazurilor de tuberculoză multirezistentă, este de o importanță majoră, atât din punct de vedere științific, cât și pentru domeniul sănătății publice.

Studiarea activității antituberculoase a unor substanțe noi sintetizate – particule de ciclodextrină încărcate cu juglonă – cu perspectiva elaborării unor noi remedii, este o direcție de cercetare promițătoare, care ar aduce contribuții noi la eficientizarea tratamentului cazurilor de tuberculoză multirezistentă.

Juglona (5-hidroxi-1,4-naftochinona) **1** este o substanță organică naturală din clasa naftochinonei, care se prezintă sub formă de glucozid 1,4,5-trihidroxinaftalinului în frunze, rădăcini, coji, fructe (pericarp) și scoarță de plante din familia *Juglandaceae*. Juglona are acțiune antimicrobiană, antifungică, antimicobacteriană, antihelmintică, antiproliferativă. Această substanță este și un agent nespecific pentru tratamentul bolilor de piele provocate de infecții stafilococice și streptococice, a bolii parodontale și a tuberculozei cutanate [1-6].

Ciclodextrinele sunt o clasă de oligozaharide ciclice, compuse din resturi de D-glucopiranoză legate prin legături  $\alpha$ -1,4-glicozidice. Forma moleculei de ciclodextrină seamănă cu un con trunchiat gol, unde cavitatea interioară este hidrofobă, iar suprafața exterioară este hidrofilă. Datorită acestui fapt, ciclodextrinele sunt capabile să formeze clatrați (complexe de incluziune) cu diverse substanțe biologice active. Astfel de clatrați se caracterizează prin solubilitate ridicată, stabilitate și toxicitate scăzută.

**Scopul acestei lucrări** este de a obține complexe de juglonă cu  $\beta$ -ciclodextrină, cu hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrină, cu sare de sodiu a sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrinei și de a studia activitatea lor anti-tuberculoasă.

## MATERIALE ȘI METODELE DE CERCETARE

Juglona **1** a fost obținută din materie primă autohtonă, și anume din frunze de nuc (*Juglans regia* L.), prin extracție cu cloroform, cu separarea ulterioară de alte componente ale extractului prin cromatografie pe coloană. În calitate de al doilea component pentru studiu s-a utilizat  $\beta$ -ciclodextrină sau derivații ei: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrină (producător - CycloLab R&D Ltd., Ungaria) și sarea de sodiu al sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrinei (producător - Cy-Dex Inc., SUA).

Complexele de incluziune au fost obținute prin metoda de macinare, cu adaos de apă și prin metoda coevaporării conform metodei descrise în literatură [7].

Raportul molar al componentelor din sistemele juglonă -  $\beta$ -ciclodextrină **2**, juglonă - hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrină **3**, juglonă - sare de sodiu a sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrinei **4** a

fost 1: 1, în timp ce în sistemele juglonă -  $\beta$ -ciclodextrină **5**, juglonă - hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrină **6**, juglonă - sare de sodiu a sulfobutil- $\beta$ -ciclodextrinei **7** a fost 1: 2.

La utilizarea metodei de măcinare, s-au adăugat la mojar porțiuni cântărite de ciclodextrină și juglonă (0,03 mmol de fiecare substanță), apoi s-a adăugat apă distilată, într-o cantitate suficientă pentru a forma o pastă. Amestecul rezultat a fost măcinat într-un mojar cu pistil timp de 90 de minute: primele 60 de minute cu adăugarea periodică de apă distilată (pentru a asigura consistența unei paste), ultimele 30 de minute amestecul a fost triturat până la uscare pentru a forma o pulbere fină. Sistemele rezultate au fost depozitate în flacoane închise ermetic pentru a preveni absorbția umezelii atmosferice.

Substanțele incluse în studiu au fost testate prin metoda fenotipică de testare a sensibilității la *M. tuberculosis* pe medii nutritive solide și lichide. A fost utilizată metoda concentrațiilor absolute pe mediile de cultură Lowenstein-Jensen (LJ) și metoda proporțiilor (mediul Middlebrook 7H9). Activitatea bactericidă și bacteriostatică a fost determinată utilizând tulpina de referință H<sub>37</sub>Rv, precum și tulpini de *M. tuberculosis* „sălbatică”, izolate de la bolnavi de tuberculoză pulmonară aflați la tratament în clinica Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”. Investigațiile în cauză au fost realizate în Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei. S-a determinat concentrația minimă de inhibiție (CMI) „in vitro” a substanțelor sintetizate către *M. tuberculosis*.

### Pregătirea suspensiei de *M. tuberculosis* complex.

Au fost utilizate tulpinile de referință H<sub>37</sub>Rw, precum și tulpini de *M. tuberculosis* „sălbatică”, izolate de la pacienți cu tuberculoză pulmonară cu termenul de izolare până la 2 săptămâni. Suspensia micobacteriană a fost pregătită pe apă distilată sterilă după standardul de turbiditate de 5.0 UFC.

### Studiarea activității antituberculoase bactericide a substanțelor sintetizate.

Pentru studiarea activității antituberculoase bactericide, substanțele sintetizate în acest studiu au fost dizolvate inițial în dimetilsulfoxid (DMSO). Diluțiile ulterioare au fost efectuate pe apă distilată sterilă. Au fost pregătite soluțiile preparatelor studiate cu următoarele concentrații: 500  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml și 50  $\mu$ g/ml. Au fost utilizate 3 expoziții – 60 minute, 240 minute și 24 ore. Suspensia de *M. tuberculosis* complex (0.2 ml) a fost inoculată cu 2.0 ml soluția de substanțe studiate la diferite concentrații și pentru diferite expoziții. După fiecare expoziție se centrifuga 10 min. la 3000 rotații, după care se vărsa supernatantul și la sediment se adăuga 1.0 ml apă distilată sterilă. Concentrațiile și expozițiile utilizate pentru studiarea activității antituberculoase bactericide a substanțelor sintetizate sunt redată în tabelul 1.

Tabelul 1. Studiarea activității antituberculoase bactericide a substanțelor sintetizate

| Tulpină <i>M.tuberculosis</i> | $H_{37}Rv^*$ |            |        | <i>M.tuberculosis**</i> |            |        |
|-------------------------------|--------------|------------|--------|-------------------------|------------|--------|
| Concentrație substanță        | Expoziție    |            |        | Expoziție               |            |        |
| 500 $\mu g/ml$                | 60 minute    | 240 minute | 24 ore | 60 minute               | 240 minute | 24 ore |
| 100 $\mu g/ml$                | 60 minute    | 240 minute | 24 ore | 60 minute               | 240 minute | 24 ore |
| 50 $\mu g/ml$                 | 60 minute    | 240 minute | 24 ore | 60 minute               | 240 minute | 24 ore |

Control 1- Suspensie *M.tuberculosis complex* 0.2 ml+2.0ml apă sterilă;

\*Tulpină de referință -  $H_{37}Rv$ ;

\*\*Tulpină sălbatică *M.tuberculosis*, izolată de la pacienți TB.

Pentru determinarea activității bactericide, substanțele au fost inoculate pe medii lichide în condițiile expuse în tabel și incubate în sistemul BACTEC MGIT 960 și pe medii solide Lowenstein-Jensen.

#### Studiarea activității antituberculoase bacteriostatice a substanțelor sintetizate

Pentru studierea activității bacteriostatice față de *M. tuberculosis* inițial au fost pregătite mediile nutritive lichide și solide cu 3 concentrații de substanțe sintetizate: 200  $\mu g/ml$ , 100  $\mu g/ml$  și 50  $\mu g/ml$ .

#### Inocularea.

Pentru însămânțare sa-a fost utilizat câte 0,2 ml suspensie  $H_{37}Rv$  și suspensie tulpină sălbatică cu turbiditate 5 UFC la fiecare concentrație a substanței studiate (200  $\mu g/ml$ , 100  $\mu g/ml$  și 50  $\mu g/ml$ ). În calitate de control a fost utilizat: tubul cu mediu de cultură fără substanță (placebo), tubul cu mediu LJ cu o concentrație de 40  $\mu g/ml$  Rifampicină și mediu lichid Middlebrook 7H9 cu concentrație de 1,0  $\mu g/ml$  Rifampicină.

#### Citirea rezultatelor.

Controlul tuburilor inoculate s-a efectuat în sistemul automat BACTEC MGIT 960 la fiecare 60 minute de incubare și pe mediile solide la fiecare a 7a zi de incubare la termostat.

#### Controlul eficacității testării.

În calitate de control a fost utilizat tubul placebo și tubul cu concentrații de Rifampicina de 40  $\mu g/ml$  pentru mediile solide și de 1.0  $\mu g/ml$  pentru mediile lichide.

## REZULTATE

#### Analiza fizico-chimică

Pentru studierea activității bactericide au fost efectuate mai multe experiențe la date diferite în dinamică. Astfel, au fost montate 11 testări, utilizând la fiecare testare tulpina de referință  $H_{37}Rv$  și de la 2 până la 5 tulpini sălbatice la fiecare concentrație. Fiecare substanță a fost testată la trei concentrații și trei expoziții diferite. Astfel,

au fost efectuate 384 testări la diferite concentrații și expoziții pe medii lichide (BACTEC MGIT) și medii solide (LJ). Rezultatele testărilor au demonstrat, ca substanțele cercetate nu posedă **activitate bacterică** în concentrații de la 50  $\mu g/ml$  până 500  $\mu g/ml$  și expoziție de la 1 oră până la 24 ore.

Totodată, testarea activității bacteriostatice a demonstrat alte rezultate. La analiza creșterii pe medii lichide (BACTEC MGIT), utilizând programa BD EpiCenter™ TB-eXIST, s-a constatat, că o parte din substanțe au demonstrat **activitate bacteriostatică** inhibitorie la toate concentrațiile și expozițiile utilizate a substanțelor testate. Această activitate se exprimă prin stoparea creșterii coloniilor de microorganisme în cazul acestor substanțe, față de testele control.

Studiarea activității bacteriostatice „*in vitro*” a noilor agenți antimicrobieni din Juglone 1 pe medii solide LJ s-a efectuat prin metoda concentrațiilor absolute. Astfel, au fost testate 7 substanțe a câte trei concentrații fiecare (50  $\mu g/ml$ , 100  $\mu g/ml$  și 200  $\mu g/ml$ ). Rezultatele testării au fost evaluate după 2 luni de incubare la 37°C. Toate substanțele cercetate au demonstrat acțiune bacteriostatică în concentrație de 200  $\mu g/ml$  pe mediu solid LJ față de tulpina de referință  $H_{37}Rv$  și tulpinile sălbatice de *M.tuberculosis* luate în studiu.

Rezultatele studierii activității antituberculoase bacteriostatice a substanțelor sintetizate 2-7 sunt demonstrate în tabelul 2.

În tabel sunt date abreviațiile substanțelor studiate și concentrația minimă inhibitorie (CMI) la care sa constatat activitate bacteriostatică ( $\mu m/ml$ ).

## DISCUȚII

Rezultatele obținute în acest studiu argumentează necesitatea cercetării permanente a componentelor produselor medicamentoase mai efective, care să posedă o activitate biologică înaltă, au o arie largă de utilizare și toxicitate joasă.

Studiarea activității bactericide „*in vitro*” a noilor agenți antimicrobieni din Juglone 1 pe medii solide și li-

chide în majoritatea cazurilor nu au demonstrat careva acțiune bactericidă față de tulpina de referință H<sub>37</sub>Rv sau față de tulpinile sălbatice de *M.tuberculosis*.

În același timp, toate aceste substanțe sintetizate 1-7

au demonstrat *activitate bacteriostatică inhibitorie* în concentrații de 200 μg/ml față de tulpina de referință și tulpini sălbatice de micobacterii, pe medii de cultură lichide și solide.

**Tabelul 2. Rezultatele studierii activității antituberculoase bacteriostatice a substanțelor sintetizate din Juglone 1**

| Substanța | Raportul componentelor  | Conținutul juglonei în probă de 200 μg | CMI μm/mL |
|-----------|---|--|-----------|
| 1         | Juglone   | 200                                    | 1.15      |
| 2         | Juglone- hidroxipropil-β-ciclodextrină (1:1)                  | 20.3                                   | 0.117     |
| 3         | Juglone - β- ciclodextrină (1:1)                              | 26.8                                   | 0.153     |
| 4         | Juglone - sare de sodiu a sulifobutil -β-ciclodextrinei (1:1) | 15.5                                   | 0.089     |
| 5         | Juglone- hidroxipropil-β-ciclodextrină (1:2)                  | 15.3                                   | 0.088     |
| 6         | Juglone - β-- ciclodextrină (1:2)                             | 10.69                                  | 0.061     |
| 7         | Juglone - sare de sodiu a sulifobutil -β-ciclodextrinei (1:2) | 7.47                                   | 0.043     |

Astfel, sunt necesare cercetări ulterioare pentru determina concentrațiile inhibitorii mai joase a noilor agenți antimicrobieni 6 și 7. De asemenea este necesar de studiat și toxicitatea substanțelor voi, studiate în acest studiu.

### CONCLUZII

Majoritatea compușilor din Juglone manifesta activitate bacteriostatică față de *M.tuberculosis* în concentrație de 0.089-0.043 μm/ml.

Datele experimentale obținute indica la perspectiva studierii în continuare a substanțelor cu activitate antituberculoasa din Juglone 1 pentru elaborarea unor noi remedii medicamentoase împotriva tuberculozei.

Lucrarea a fost realizată în cadrul proiectelor cu cifru 20.80009.5007.17 și 20.80009.8007.14 ale Agenției Naționale pentru Cercetare și Dezvoltare din Moldova (ANCD).

### BIBLIOGRAFIE

- Jунгиету Г.И., Влад Л.А. Юглон и родственные 1,4-нафтохиноны. Кишинев: Штиинца, 1978.
- Jiayi Wang, Yuhuan Cheng, Rina Wu, Donghua Jiang, Bing Bai, Dehong Tan, Tingcai Yan, Xiyun Sun, Qi Zhang, Zhaoxia Wu Antibacterial Activity of Juglone against *Staphylococcus aureus*: From Apparent to Proteomic. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 965-977.
- Bhasin D., Chettiar S.N., Etter J. P., Mok M., Li P.K. Anti-cancer activity and SAR studies of substituted 1,4-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 4662-4669.
- Clark A.M., Jurgens T.A., Hufford C.D. Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, 1990, 4(1), 1-14.
- Zmantar T., Miladi H., Kouidhi B., Chaabouni Y., Slama R.B, Bakhrouf A., Mahdouani K., Chaieb K. Use of juglone as antibacterial and potential efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 101, 44-49
- Tran T., Saheba E., Arcerio A. V., Chavez V., Li Q.-Y., Martinez L. E., Primm T. P. Quinones as antimycobacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12,4809.
- Ivancic, A.; Macaev, F.; Aksakal, F.; Boldescu, V.; Pogrebnoi, S.; Duca, Gh. Preparation of alginate-chitosan-cyclodextrin micro- and nanoparticles loaded with anti-tuberculosis compounds. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016, 7, 1208-1218.
- Uncu A. Evaluation of the latest achievements in the discovery of new molecules and drugs regimens for the treatment of tuberculosis. In: Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції "ЛІКИ – ЛЮДИНІ. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ФАРМАКОТЕРАПІЇ І ПРИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ". Харків, НФаУ, 2020, Том 1, с. 27-35. ISSN 2412-0456.