

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 615.281 : 616.095

LOZAN-TÎRȘU CAROLINA

**EFECTE ANTIMICROBIENE ALE UNOR SUBSTANȚE
CHIMICE DIN PRODUSE AUTOHTONE**

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific: **RUDIC Valeriu**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om Emerit al R. Moldova

Consultant științific: **GULEA Aurelian**, doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar, academician, Om Emerit al R. Moldova

Autor: **Lozan-Tîrșu Carolina**

CHIȘINĂU, 2016

© Lozan-Tîrșu Carolina, 2016

CUPRINS

ADNOTĂRI (în limbile română, rusă și engleză).....	5
LISTA ABREVIERILOR.....	8
INTRODUCERE.....	9
1. COMPUȘI ANTIMICROBIENI.....	17
1.1. Antibioticele clasice: mecanismele de acțiune și rezistență.....	17
1.2. Compuși antimicrobieni naturali.....	24
1.3. Compuși antimicrobieni sintetici.....	38
1.4. Concluzii la capitolul 1.....	46
2. CARACTERISTICA OBIECTELOR DE STUDIU ȘI METODELOR APLICATE ÎN CERCETARE.....	48
2.1. Obiectele de studiu.....	48
2.2. Metode de lucru.....	55
2.3. Concluzii la capitolul 2.....	70
3. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI CHIMICI NOI.....	71
3.1. Premisele științifice ale cercetării.....	71
3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi ai Cu(II) care conțin 4- feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide asupra tulpinilor de referință.....	74
3.3. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi noi ai cuprului(II), care conțin 4- (dimetilfenil)tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei față de tulpinile de referință.....	77
3.4. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi ai cuprului, zincului și cobaltului cu diferiți liganzi asupra tulpinilor de referință.....	80
3.5. Acțiunea antimicrobiană a propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian asupra tulpinilor de referință.....	83
3.6. Activitatea antimicrobiană comparativă a compușilor chimici noi selectați și a antisepticului de referință – furacilina față de tulpinile patogene de referință	85
3.7. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi asupra tulpinilor de <i>Escherichia coli</i> și <i>Staphylococcus aureus</i> izolate	92
3.8. Concluzii la capitolul 3.....	100
4. MODIFICAREA INDICILOR BIOCHIMICI AI CULTURILOR DE MICROORGA- NISME PATOGENE SUB INFLUENȚA COMPUȘILOR CHIMICI NOI CU PROPRI- ETĂȚI ANTIMICROBIENE.....	102

4.1.	Premisele științifice ale cercetării.....	102
4.2	Modificarea capacității antioxidante totale a culturilor de microorganisme patogene sub influența compușilor chimici noi.....	104
4.3.	Modificarea indicatorilor stresului oxidativ în culturile de microorganisme patogene sub influența compușilor chimici noi.....	110
4.4.	Activitatea enzimelor antioxidante în culturile de referință la acțiunea compușilor chimici noi.....	117
4.5.	Concluzii la capitolul 4.....	124
	CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	125
	BIBLIOGRAFIE.....	128
	ANEXE.....	142
	Anexa 1. Brevete de invenție.....	143
	Anexa 2. Act de implementare nr.74 din 28 mai 2015.....	151
	Anexa 3. Diplome la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale	152
	DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	165
	CV-ul AUTORULUI.....	166

ADNOTARE

Lozan-Tîrșu Carolina „Efecte antimicrobiene ale unor substanțe chimice din produse autohtone”. Teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2016.

Teza conține: introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 240 de titluri, 3 anexe, 127 de pagini text de bază, 21 de figuri, 26 de tabele. Rezultatele sunt publicate în 26 de lucrări.

Cuvinte-cheie: activitate antimicrobiană, compuși coordinativi, cupru, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*.

Domeniul de studiu: 313.02 – Microbiologie, virusologie medicală.

Scopul lucrării: evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor chimici noi și elucidarea mecanismelor de acțiune ale acestora.

Obiectivele lucrării: evidențierea acțiunii antimicrobiene a compușilor coordinativi ai cuprului (II) cu diferiți liganzi asupra tulpinilor de referință ale microorganismelor patogene; determinarea acțiunii antimicrobiene a propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian asupra tulpinilor de referință ale microorganismelor patogene; compararea acțiunii compușilor chimici noi cu cea a antisepticului de referință; evaluarea particularităților de acțiune antimicrobiană a compușilor chimici noi asupra tulpinilor izolate din coproculturi; stabilirea mecanismelor de influență a compușilor chimici noi evidențiați asupra microorganismelor patogene.

Noutatea și originalitatea științifică. A fost testată activitatea antimicrobiană a unor noi compuși coordinativi ai cuprului cu diferiți liganzi și comparată cu activitatea antisepticului de referință, ceea ce face posibilă aprecierea activității compușilor testați față de cea a remediilor utilizate. Au fost estimați parametrii statutului antioxidant al culturilor de microorganisme patogene la acțiunea compușilor noi testați, ceea ce permite aprecierea nivelului stresului oxidativ.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în elucidarea efectelor unor noi compuși chimici din produse autohtone asupra tulpinilor de microorganisme patogene, ceea ce a contribuit la evidențierea proprietăților antimicrobiene ale substanțelor noi, fapt ce a permis stabilirea mecanismelor de acțiune a lor.

Semnificația teoretică. Au fost acumulate date noi despre acțiunea unor compuși noi față de tulpinile de referință și tulpinile clinice și despre modificările statutului antioxidant al microorganismelor patogene sub acțiunea compușilor chimici noi. Au fost evidențiate corelări negative stabile dintre capacitatea antioxidantă totală și conținutul dialdehidei malonice, ceea ce permite aplicarea acestor parametri în calitate de indicatori de monitorizare a activității antibacteriene.

Valoarea aplicativă a lucrării. Au fost evidențiați compuși noi cu activitate antimicrobiană înaltă față de *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus* de perspectivă pentru testări *in vivo*. A fost propusă o metodă originală de determinare a biomasei culturilor de microorganisme patogene.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost implementate la Catedra de microbiologie, virusologie și imunologie ca material didactic pentru instruirea universitară. Metoda de determinare a biomasei bacteriene propusă în teză a fost implementată în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme nepatogene a IMB (Act nr.74 din 28 mai 2015).

АННОТАЦИЯ

Лозан-Тыршу Каролина „Антимикробные эффекты некоторых аутохтонных химических веществ”. Диссертация кандидата медицинских наук, Кишинев, 2016.

Диссертация состоит из: введения, четырех глав, заключения и рекомендаций, библиографического списка из 240 наименований, 3 приложения, 127 страниц основного текста, 21 рисунка, 26 таблиц. Результаты исследований опубликованы в 26 работах.

Ключевые слова: антимикробная активность, координационные соединения, медь, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*.

Область исследования: 313.02 – Медицинская микробиология и вирусология.

Цель работы: оценка антимикробных свойств новых химических соединений и выявление механизмов их воздействия на патогенные микроорганизмы.

Задачи работы: выявление противомикробного действия координационных соединений меди (II) с различными лигандами по отношению к эталонным штаммам возбудителей; определение антимикробного действия ароматических пропенонов с тиаомидными группами или изотиоцианатом по отношению к эталонным штаммам и штаммы выделенные из копрокультуры; сравнение активности новых химических соединений, обладающих антимикробным действием, с активностью стандартных антисептиков; выявление механизмов антимикробной активности новых соединений на клинические штаммы; определение путей влияния новых соединений на патогенные микроорганизмы.

Научная новизна и оригинальность. Впервые новые химические вещества различной структуры были протестированы на предмет антимикробной активности; было проведено сравнение их активности с антибактериальной активностью стандартных антисептиков, что дает возможность оценить перспективность испытуемых соединений в сравнении с препаратами, используемыми в мире. Впервые были определены изменения параметров антиоксидантного статуса патогенов под воздействием новых тестируемых соединений, что позволяет оценить степень окислительного стресса в культуре.

Решенная научная проблема: были протестированы новые химические соединения, в результате чего были выявлены их антимикробные свойства, что позволило определить механизмы их воздействия на патогенные микроорганизмы.

Теоретическое значение. Были накоплены научные данные о действии некоторых новых соединений на эталонные штаммы и клинические штаммы; а также данные об изменении параметров антиоксидантного статуса патогенных микроорганизмов под воздействием новых химических соединений. Были обнаружены стабильные корреляции между показателями антиоксидантной активности и уровнем перекисидации липидов, что позволяет использовать данные показатели для мониторинга антибактериальной активности в процессе тестирования новых соединений.

Практическое значение. Были выделены новые химические соединения, обладающие высокой антибактериальной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*, перспективные для продолжения тестирования *in vivo*. Был предложен оригинальный метод определения биомассы патогенных микроорганизмов.

Внедрение результатов. Результаты исследования внедрены на Кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии в качестве дидактического материала. Метод определения биомассы культур бактерий был внедрен в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов (акт о внедрении №74 от 28 мая 2015г.).

ANNOTATION

Lozan-Tirsu Carolina „Antimicrobial effects of some new chemical compounds from local sources" PhD thesis in medical sciences, Chisinau, 2016

The thesis contains an introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 240 references, consisting of 127 pages of the main text, 21 figures, 26 tables and 3 annexes. The results of work were published in 26 scientific papers.

Keywords: Antimicrobial activity, coordinative compounds, copper, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*

Field of study: 313.02 – Medical microbiology and virology.

Aim: Evaluation of antimicrobial properties of new chemical compounds and their mechanisms of action on pathogens.

Objectives: To identify the antimicrobial action of the copper (II) coordination compounds with various ligands on the reference strains of pathogens; to determine the antimicrobial activity of aromatic propenone with thioamide/isothiocyanate on the reference strains of pathogens; to compare the antimicrobial activity of new chemical compounds with standard antiseptic activity; to define the specificity of new compounds antimicrobial activity on coproculture isolates; to establish the mode of action of new compounds on pathogenic microorganisms.

Scientific novelty of research: For the first time new chemical compounds with different structures were tested for antimicrobial activity and was compared their activity with antibacterial activity of standard antiseptics. The influence of new compounds on the antioxidant status of pathogen culture was estimated.

Important scientific problem, solved in this research work, is identification of antimicrobial properties of new local chemical compounds and determination of the peculiarities of their actions.

Theoretical signification: New scientific data regarding the effects of some new compounds on the reference strains and clinical pathogen isolates have been accumulated. New data regarding the changes in the antioxidant status of pathogens under the influence of new chemical compounds have been collected. The stable correlation between the parameters of the antioxidant activity and the level of lipid peroxidation have been found, which proves the feasibility of this parameters as indicators in the process of testing of new compounds.

Practical value: New chemical compounds with antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, have been identified and proposed for continuous testing *in vivo*. The original method to determine the biomass of pathogens has been proposed.

Scientific results implementation. The study results are implemented as didactic material at the Department of Microbiology, Virology and Immunology. The method for bacterial biomass determination was implemented in the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms of IMB (Act no.74, 28 May 2015).

LISTA ABREVIERILOR

ABTS	2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6 a acidului sulfonic
ATCC	American Type Culture Collection
CMI	concentrația minimă de inhibiție
CPHB	clorura de polihexametilen biguanidă
CT	catalaza
CMB	concentrația minimă bactericidă
DAM	dialdehida malonică
ESBL	betalactamaze cu spectru extins de acțiune
MC	membrană citoplasmatică
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistent la meticilină
PAM	peptidele antimicrobiene
SOD	superoxiddismutaza
SRO	specii reactive ale oxigenului
TEAC	echivalentul trolox al activității antiradicalice
US	unități standard
ГИСК	Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor

În prezent antibioticele constituie elementele-cheie ale medicinei moderne, fiind indispensabile în tratamentul maladiilor bacteriene. De la descoperirea penicilinei și introducerea ei în practica medicală, antibioticele sunt indispensabile nu numai în tratamentul maladiilor cauzate de microorganismele patogene, ci și în prevenirea infecțiilor la pacienții supuși intervențiilor chirurgicale, a celor cu statutul imun compromis ori care suferă de cancer. Efectuarea chimioterapiei, transplantului de organe, intervențiilor chirurgicale, tratarea și îngrijirea arșilor și multe altele sunt imposibile fără administrarea adecvată de preparate antimicrobiene. În ultimul timp cererea de antibiotice a crescut esențial. În special sunt necesare măsuri de asigurare cu antibiotice adecvate procesului de tratare a copiilor cu sepsis potențial fatal și pneumonii. Numai în anul 2013, din cauza pneumoniei la nivel mondial, au fost înregistrate 935 mii de decese în rândurile copiilor de până la 5 ani. Majoritatea ar fi supraviețuit în condițiile unui tratament adecvat cu antibiotice [40, 41, 139].

În perioada dintre anii 2000 și 2010 consumul total mondial de antibiotice a crescut cu 30% – de la 50 la 70 bilioane Unități Standard (US). Penicilinele și cefalosporinele au constituit aproximativ 60 la sută din consumul total de antibiotice în 2010. Utilizarea lor s-a majorat cu 41 la sută din anul 2000 până în anul 2010. De asemenea, a fost înregistrată o creștere a utilizării antibioticelor „în ultimă instanță”: cu 40% a crescut consumul carbapenemelor și cu 13% – cel al polimixinelor. Țările cu cel mai mare consum de antibiotice în 2010 au fost: India, cu 13 miliarde US; China, cu 10 miliarde US, și Statele Unite ale Americii, cu 7 miliarde US. Cel mai mare consum de antibiotice pe cap de locuitor a fost înregistrat în SUA – 22 US, urmată de India, cu 11 US, și de China, cu 7 US [223].

O consecință directă a creșterii nivelului de utilizare a antibioticelor este rezistența la antibiotice. Centrul pentru Controlul și Prevenirea maladiilor al Statelor Unite ale Americii estimează cazurile de infecții cu bacterii rezistente la peste 2 milioane, care constituie cu 23.000 de decese în fiecare an, producând un prejudiciu direct de 20 de miliarde \$ și pierderi suplimentare de productivitate de 35 miliarde \$ [42]. În Europa, aproximativ 25.000 de decese sunt atribuite infecțiilor rezistente la antibiotice, iar prejudiciul se estimează la 1,5 miliarde € anual [71]. Printre cele mai periculoase microorganisme pentru om rezistente se numără MRSA – *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină și tulpinile multirezistente de *Escherichia coli*.

În Europa, Statele Unite ale Americii și Canada s-a înregistrat o scădere esențială a incidenței infecțiilor cu MRSA [41, 70, 184] cu 18%, 44% și 16%, respectiv. În același timp, în

alte regiuni, cum sunt Australia, India, America Latină, incidența cu MRSA crește catastrofal – cu 47% în 2014, în India, iar în America Latină – cu 90% în 2013 [40]. *Escherichia coli* și bacteriile înrudite au devenit rezistente la cefalosporinele de generația a treia și sunt înscrise în lista producătorilor de betalactamaze cu spectru extins de acțiune (ESBL). În 2013, în 17 din 22 de țări europene, 85% din izolatele de *E. coli* au fost de tip ESBL – pozitive [70]. În 2009 și 2010, 28 la sută din toate tulpinile *Enterobacteriaceae* izolate de la bolnavii cu infecții ale tractului urinar, în 11 țări din Asia, au fost producătorii de ESBL, iar rezistență față de cefalosporinele de generația a treia și a patra au manifestat 26-50% dintre tulpinile izolate [141]. În America Latină, în 2014, tulpinile rezistente de *Klebsiella pneumoniae* au variat de la 19% în Peru, la 87% în Bolivia. În Africa, prevalența medie a rezistenței la cefalosporine de generația a treia a fost de până la 47% [136].

În pofida numeroaselor strategii și activități aplicate la nivel național și internațional, situația privind răspândirea accelerată a microorganismelor patogene cu rezistență multiplă nu se ameliorează. Ea poate fi redresată cu condiția ca factorii de decizie în domeniul social, științific și politic să acționeze consolidat la nivel regional și mondial.

Rolul primordial în rezolvarea acestor probleme majore aparține sectorului cercetare-dezvoltare. Identificarea ori elaborarea de substanțe antimicrobiene noi este una dintre direcțiile prioritare în acest sens. Începând cu anul 2000 și până la finele anului 2012, Agenția Europeană pentru Medicamente și Administrația Americană pentru Alimente și Medicamente au aprobat mai multe antibiotice noi, dintre care numai patru, și anume linezolidul, daptomicina, retapamulina și fidaxomicina, sunt antibiotice principial noi, eficiente numai împotriva bacteriilor Gram-pozitive. Celelalte substanțe sunt modificări ale compușilor utilizați anterior. Cu excepția carbapenemelor, care au fost lansate în 1985, toate celelalte antibiotice aprobate pentru aplicații clinice, între anii 1960 și 2000, au fost derivați sintetici ai compușilor existenți, elaborați anterior [77]. Patru clase de substanțe – cefalosporinele, penicilinele, chinolonele și macrolidele, au fost folosite ca bază structurală pentru 73% dintre antibioticele aprobate între anii 1981 și 2005. În perioada anilor 1987 și 2011 nu au fost raportate descoperiri de succes ale unor clase noi de antibiotice. În 2010 numai două substanțe principial noi au fost promovate până la testele clinice, dar niciuna nu le-a trecut cu succes [96, 207].

Astfel, elaborarea și testarea compușilor chimici noi cu potențial antimicrobian rămâne o direcție actuală la nivel mondial.

Scopul tezei de doctor a constat în evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor chimici noi și în elucidarea mecanismelor de acțiune a acestora.

Obiectivele lucrării au fost următoarele:

1. Evidențierea acțiunii antimicrobiene a compușilor coordinativi ai cuprului (II) cu diferiți liganzi asupra tulpinilor de referință ale microorganismelor patogene.
2. Determinarea acțiunii antimicrobiene ale propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau cu izotiocian asupra tulpinilor de referință a microorganismelor patogene.
3. Compararea acțiunii compușilor chimici noi cu cea a antisepticului de referință.
4. Evaluarea particularităților de acțiune antimicrobiană a compușilor chimici noi asupra tulpinilor izolate din coproculturi.
5. Stabilirea mecanismelor de influență a compușilor chimici noi evidențiați asupra microorganismelor patogene.

Noutatea și originalitatea științifică. A fost testată activitatea antimicrobiană a unor noi compuși coordinativi ai cuprului cu diferiți liganzi și comparată cu activitatea antisepticului de referință, ceea ce face posibilă aprecierea activității compușilor testați față de cea a remediilor utilizate. Au fost estimați parametrii statutului antioxidant al culturilor de microorganisme patogene la acțiunea compușilor noi testați, ceea ce permite aprecierea nivelului stresului oxidativ.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în elucidarea efectelor unor noi compuși chimici din produse autohtone asupra tulpinilor de microorganisme patogene, ceea ce a contribuit la evidențierea proprietăților antimicrobiene ale substanțelor noi, fapt ce a permis stabilirea mecanismelor de acțiune a lor.

Semnificația teoretică. Au fost acumulate date noi despre acțiunea unor compuși noi față de tulpinile de referință și tulpinile clinice și despre modificările statutului antioxidant al microorganismelor patogene sub acțiunea compușilor chimici noi. Au fost evidențiate corelațiile negative stabile dintre capacitatea antioxidantă totală și conținutul dialdehidei malonice, ceea ce permite aplicarea acestor parametri în calitate de indicatori de monitorizare a activității antibacteriene.

Valoarea aplicativă a lucrării. Au fost evidențiați compuși noi cu activitate antibacteriană înaltă față de *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus* de perspectivă pentru testări *in vivo*. A fost propusă o metodă originală de determinare a biomasei culturilor de microorganism patogene.

Aprobarea rezultatelor științifice. Materialele expuse în teza de doctorat au fost comunicate la: Cea de-a XXXI-a Conferință română de chimie, 2010, Râmnicu Vâlcea, România; Primul colocviu franco-român de chimie medicinală, 2010, Iasi, România; Conferința științifico-practică „Substanțe bioactive: probleme fundamentale și aplicative de obținere și aplicare”, 2011, Novii Svet, Ucraina; Conferința internațională Ciugaev „Metode fizico-chimice în chimia compușilor coordinativi”, 2011, Suzdali, Rusia; Conferința științifică internațională „Biotehnologia microbiologică – domeniu scientintensiv al științei contemporane”, 2011,

Chișinău, Moldova; Cea de-a XVII-a Conferință Internațională „Metode fizice în chimia coordinativă și supramoleculară”, 2012, Chișinău, Moldova; Conferința Internațională dedicată celei de-a 55-a aniversări de la fondarea Institutului de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei, 2014, Chișinău, Moldova; Cea de-a doua Conferință internațională în domeniul Biotehnologiei microbiene 2014, Chișinău, Moldova.

Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate în cadrul ședinței Catedrei de microbiologie, virusologie și imunologie USMF „Nicolae Testemițanu” din 15 iunie, 2016 și Seminarului Științific de profil 313.02 **Microbiologie medicală** din cadrul Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” din 06 iulie 2016.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele științifice expuse în această lucrare au fost reflectate în 26 de publicații științifice: 8 articole în reviste recenzate (3 – în reviste cu factor de impact; 3 – în monoautorat), 14 rezumate ale comunicărilor științifice, 4 brevete de invenție.

Volumul și structura tezei. Teza constă din 4 capitole; are un volum de bază de 127 pagini, conține 26 de tabele și 21 de figuri. Lista surselor bibliografice citate include 240 de titluri.

Cuvinte-cheie: activitate antimicrobiană, compuși coordinativi, cupru, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*.

Sumarul compartimentelor tezei.

Capitolul 1. COMPUȘI ANTIMICROBIENI Capitolul conține o analiză amplă a situației în domeniu în baza unui studiu bibliografic profund al publicațiilor relevante pentru tema dată în întreaga lume. Capitolul este structurat în 3 subcapitole. Primul subcapitol este consacrat elucidării mecanismelor de acțiune a antibioticelor clasice din aspectul nivelului actual al cunoașterii în acest domeniu. Sunt scoase în evidență atât mecanismele particulare ale diferitor tipuri de substanțe cu efect antimicrobian, cât și mecanismele generalizate, care sunt înregistrate în toate tipurile de celule bacteriene indiferent de tipul de compus antimicrobian aplicat. Sunt aduse explicații cu referire la diferite tipuri de clasificare a substanțelor cu efect antimicrobian. Astfel, sunt delimitate noțiunea de compuși bacteriostatici și bactericizi și importanța aplicării acestui tip de clasificare în terapiile combinate cu scopul evitării antagonismelor puternice care pot surveni între agenții terapeutici utilizați. În același timp, se atrage atenția asupra caracterului relativ al acestui mod de clasificare în funcție de natura microorganismului patogen și dozele administrate. Este adus drept exemplu și sistemul de clasificare a antibioticelor în antibiotice cu spectru larg de acțiune și cu spectru îngust de acțiune și explicată necesitatea dezvoltării cercetărilor pentru ambele tipuri. Cea mai mare atenție a fost atrasă asupra sistemului de clasificare a antibioticelor în funcție de mecanismul lor de acțiune. În această parte a capitolului

sunt sistematizate modificările produse de fiecare tip de antibiotic în celulele bacteriene, de asemenea, fiind generalizate datele de ultimă oră de biologie moleculară și genetică microbiană cu referire la complexe de gene, sistemele de operare specifice, care sunt implicate în realizarea fiecărui tip de acțiune, precum și în corelarea acestora cu genele și sistemele de operare responsabile de rezistența microorganismelor la acest tip de influență.

În subcapitolul al doilea sunt analizate principalele grupuri de antibiotice de origine naturală. Este analizată gama bogată de componente cu efect antimicrobian care au fost depistate în celulele microbiene. Se atrage atenția asupra diversității structurale și funcționale a antibioticelor produse de microorganisme și se prezintă listele de specii de microorganisme patogene asupra cărora substanțele efectuate au influență pronunțată. Este subliniată diversitatea enormă a compușilor microbieni de origine vegetală și sunt reflectate rezultatele cercetărilor, care elucidează mecanismele de acțiune antimicrobiană a fenolilor, alcaizilor, compușilor organici sulfurați, terpenoidelor. Se pune accent și pe efectele pe care le au combinațiile de preparate vegetale și antibiotice clasice asupra diferitor culturi de microorganisme patogene. Dintre antibioticele de origine animală sunt descrise și analizate mai detaliat peptidele antimicrobiene.

Cel de-al treilea subcapitol este dedicat compușilor antimicrobieni sintetici. Sunt arătate avantajele și dezavantajele lor comparativ cu antibioticele naturale. În vizorul acestei analize au fost două grupuri principale – polimerii antimicrobieni și compușii coordinativi. Este prezentată o sinteză a multiplelor rezultate obținute la testarea diferitor tipuri de compuși coordinativi noi și o încercare de a prezenta principalele cerințe față de un compus coordinativ nou ca acesta să poată fi considerat de perspectivă pentru utilizare în calitate de produs antimicrobian. Sunt aduse argumente în favoarea selectării cuprului în calitate de metal component al compușilor noi cu efect antibacterian. Capitolul se finalizează cu formularea problemei de cercetare, direcțiilor de rezolvare a ei, scopului și sarcinilor prezentei lucrări.

Capitolul 2. CARACTERISTICA OBIECTELOR DE STUDIU ȘI METODELOR APLICATE ÎN CERCETARE conține descrierea suficient de explicită atât a obiectelor de studiu, cât și a metodelor de cercetare și de calcul a datelor obținute, care au fost utilizate pentru realizarea prezentei lucrări de doctorat. În calitate de obiecte de studiu „*in vitro*” au fost incluse 5 tulpini de referință, care provin din două colecții de culturi recunoscute în calitate de furnizori de material biologic de calitate pentru cercetări de performanță: American Type Culture Collection (ATCC) și Colecția de Stat a Microorganismelor Patogene a Institutului de Stat de cercetări științifice în domeniul standardizării și controlului preparatelor medicale biologice „L.A. Tarasevici” (ГИСК). În calitate de substanțe cu efecte antimicrobiene au fost testați

compușii coordinativi ai Cu (II); Co(II), Zn(II) și propenonele aromatice sintetizați la Catedra de chimie anorganică (Universitatea de Stat din Moldova). Pentru a facilita analiza rezultatelor obținute, compușii chimici noi au fost grupați în 4 clase, pentru fiecare fiind prezentată informația despre compoziția și geometria compușilor respectivi. Deoarece la etapa de planificare a cercetării doctorale miza a fost pusă de particularitățile cuprului ca metal cu proprietăți antibacteriene, pentru compușii ce conțin cupru este prezentată și masa relativă a acestui metal în componența compusului final. Capitolul include, de asemenea, descrierea a două categorii de metode de cercetare: metode clasice ale microbiologiei medicale și metode de determinare a statutului redox al culturii microbiene. La prima categorie se referă determinarea concentrației minime de inhibiție și a concentrației minime bactericide. La cea de-a doua categorie se referă metodele de determinare a capacității antioxidante totale, a activității enzimelor antioxidante, a peroxidului de hidrogen și a nivelului de peroxidare a lipidelor. În acest capitol merită a fi evidențiate două abordări metodologice originale. Astfel, pentru a compara activitatea compușilor noi cu cea a antisepticului de referință a fost utilizată metodologia de determinare a activității antimicrobiene a antibioticelor prin metoda difuziunii în agar în care în calitate de antiseptic standard a fost aplicată furacilina, iar în calitate de antibiotic – compușii chimici noi. De asemenea, a fost implementată o metodă de determinare a biomasei microbiene în baza parametrilor dimensionali ai celulelor. Parametrii biochimici au fost cuantificați prin aplicarea metodelor cunoscute. Calculul statistic a fost realizat prin aplicarea instrumentelor statisticii descriptive și inferențiale, iar în cazul determinării activității antimicrobiene a antibioticelor prin metoda difuziunii în agar a fost aplicat instrumentul de calcul recomandat pentru acest tip de experiențe. Obiectele de studiu și metodologia utilizată au permis de a evidenția corect și la nivel metodologic adecvat activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi.

Capitolul **3. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI CHIMICI NOI** include analiza critică obținută în experiențele orientate spre aprecierea efectelor antimicrobiene ale celor patru grupuri de compuși chimici noi. La prima etapă au fost determinate concentrațiile minim inhibitoare (CMI) și minim bacterică (CMB) ale fiecărui dintre cei 220 de compuși chimici noi. În lucrare sunt incluse rezultatele pentru 37 dintre aceștia, care au manifestat activitate antimicrobiană mai pronunțată sau la nivelul activității furacilinei. Rezultate promițătoare au fost obținute pentru compușii din primele 3 grupuri. Activitate antimicrobiană înaltă au manifestat compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamidele și compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-formilpiridinei. Propenonele aromatice au demonstrat activitate antimicrobiană

redușă comparativ cu furacilina. Pentru fiecare dintre culturile de referință au fost selectați compuși care s-au afirmat ca substanțe cu efect antimicrobian pronunțat. Activitatea antimicrobiană a compușilor selectați a fost determinată prin aplicarea metodei de difuziune în agar în cadrul experienței randomizate în trei concentrații și a celei în cinci concentrații cu calculul ulterior în conformitate cu metodologia recomandată. Tulpinile de referință Gram- pozitive au fost mai vulnerabile față de acțiunea noilor compuși. Astfel, față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 au manifestat activitate antimicrobiană înaltă 12 compuși, care au fost de 3-3500 ori mai activi ca furacilina, iar pentru *Bacillus cereus* ГИСК 8035 au fost identificați 13 compuși chimici noi cu activitate care o depășește pe cea a furacilinei de 5,3-495 ori. Dintre culturile de referință Gram-negative cele mai bune rezultate au fost obținute pentru *Shigella sonnei* ATCC 25931. 11 compuși au manifestat activitate antimicrobiană de 2,5-216 ori mai înaltă ca cea a furacilinei. Față de *Escherichia coli* ATCC 25922 au manifestat activitate antimicrobiană 6 compuși, iar față de *Salmonella enterica* (*Salmonella abony* ГИСК 03/03y) – doar 2 compuși. Față de ambele culturi compușii selectați au avut o activitate antimicrobiană de 2,1-6,1 ori mai mare ca cea a furacilinei în condiții identice. Pentru trei dintre compușii testați au fost realizate teste de determinare a activității antimicrobiene pe tulpinile clinice de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* izolate. A fost stabilit, că tulpinile clinice izolate sunt mai rezistente atât față de antisepticul de referință, cât și față de compușii noi testați. Totodată, toți compușii au fost de 6-18 ori mai activi față de stafilococ și de 2-4 ori mai activi față de *Escherichia coli*, comparativ cu furacilina. Rezultatele descrise în acest capitol au stat la baza elaborării a patru brevete de invenție, care au fost obținute de grupul de cercetare format din chimiști și medici.

Capitolul 4. MODIFICAREA INDICILOR BIOCHIMICI AI CULTURILOR DE MICROORGANISME PATOGENE SUB INFLUENȚA COMPUȘILOR CHIMICI NOI CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE include analiza critică a rezultatelor obținute la cuantificarea parametrilor care exprimă statutul antioxidant al celulelor în culturile de microorganisme patogene expuse acțiunii noilor compuși chimici și în culturile menținute în condiții standard. Pentru determinarea activității antioxidante a fost aplicat testul ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6- a acidului sulfonic). Testul de determinare a capacității antioxidante totale cu utilizarea radicalului cation ABTS^{•+} este indicat în cazul dat, deoarece permite evaluarea extractelor multicomponente, așa cum este de fapt lizatul celular analizat. A fost stabilit, că tratarea tuturor celor cinci culturi bacteriene de referință cu compușii chimici noi selectați conduce la reducerea pronunțată a capacității antioxidante totale cu 25-94% față de capacitatea antioxidantă normală a biomasei netratate. Concomitent, a fost înregistrată o creștere

semnificativă a conținutului de peroxid de hidrogen în lizatul celular și a produsului final al peroxidării lipidice – dialdehidei malonice. Situația dată a fost comună pentru toate culturile de referință tratate cu compușii chimici noi față de care au manifestat sensibilitate. Analiza corelațională efectuată a permis de a stabili o corelare negativă strânsă între capacitatea antioxidantă totală a lizatului celular și conținutul dialdehidei malonice în el. Valoarea coeficientului de determinare a variat între 0,77 și 0,82. Corelarea inversă strânsă cu valori înalte a coeficientului de determinare dintre acești doi parametri confirmă starea de stres oxidativ de intensitate înaltă, cauzat de acțiunea antimicrobiană a compușilor noi testați. A fost determinată și activitatea enzimelor antioxidante primare – superoxidismutaza și catalaza. Pentru toate culturile de referință tratate cu compușii chimici noi, față de care acestea au manifestat sensibilitate, a fost depistată scăderea veridică a activității celor două enzime, comparativ cu activitatea lor în culturile respective netratate. Deoarece enzimele catalaza și superoxidismutaza se implică activ în protecția celulelor de microorganisme patogene contra factorilor biochimici produși de macrofagi *in vivo* pentru a stopa infecția, considerăm, că scăderea semnificativă a nivelului de activitate a acestor doi factori importanți de protecție conduce la mărirea nivelului de vulnerabilitate a culturilor *in vivo*, ceea ce ar constitui un argument pentru realizarea cercetărilor biomedicale în promovarea ulterioară a acestor compuși valoroși.

Elementele principale descrise mai sus stau la baza concluziilor generale și a recomandărilor, care sun expuse în compartimentul corespunzător.

BIBLIOGRAFIA include descrierea celor 240 de surse citate în teză.

Compartimentul **ANEXE** conține actul de implementare a rezultatelor obținute, copiile primei pagini a celor patru brevete și celor 12 diplome de însoțire a medaliilor, obținute la saloanele internaționale de inovații.

1. COMPUȘI ANTIMICROBIENI

Creșterea rezistenței microorganismelor patogene la antibiotice nu numai că afectează comunități întregi, dar și a adus la un punct de criză cercetarea în numeroase centre medicale și științifice din întreaga lume. Științele medicale sunt tot mai preocupate de creșterea exacerbată a numărului de tulpini de microorganisme patogene multirezistente la antibioticele utilizate în prezent în practica clinică. Acest lucru poate fi explicat prin folosirea nediscriminatorie a terapiilor medicamentoase care conduce la o incidență mai mare a eșecurilor de tratament [55, 165]. În plus, la rata ridicată a rezistenței la antibiotice, semnalată în terapia convențională, șansele de abandon al tratamentului sunt extrem de mari, în principal din cauza efectului secundar de reapariție a infecțiilor recurente. Astfel, este necesară o resetare urgentă a arsenalului de agenți antimicrobieni activi [34, 220]. În prezent, atât sinteza chimică, cât și obținerea de substanțe naturale sunt principalele căi de a obține noi compuși cu proprietăți antimicrobiene [49]. Ambele căi au atât aspecte pozitive, cât și dezavantaje esențiale.

1.1. Antibioticele clasice: mecanismele de acțiune și rezistență

De la descoperirea penicilinei, care a fost raportată în 1929, și până în prezent a fost depistată și dezvoltată o gamă largă de antibiotice, caracterizate printr-un nivel maxim de eficiență față de culturile bacteriene patogene. Acest lucru a fost posibil doar datorită elucidării mecanismelor de interacțiune a medicamentelor cu structurile-țintă din componența celulelor bacteriene. Progresele atinse în acest domeniu, precum și în domeniul designului molecular au asigurat medicina clinică contemporană cu un bogat arsenal de preparate. Acțiunea preparatelor antibiotice asupra celulelor bacteriene este complexă și începe de la interacțiunea fizică dintre molecula preparatului cu molecula-țintă, implicând modificări ale celulei bacteriene la nivel biochimic, molecular și ultrastructural. În paralel, se observă și un fenomen opus – cel de dezvoltare a rezistenței bacteriene la acțiunea preparatelor antibiotice. Creșterea prevalenței rezistenței antimicrobiene și diversificarea mijloacelor de dobândire a acestora impune necesitatea esențială de a înțelege mecanismele de acțiune a preparatelor antimicrobiene pentru aplicarea lor eficientă, dar și pentru implementarea terapiilor alternative [124].

Efectul bactericid al antibioticelor este asociat cu formarea rupturilor în ADN-ul dublu catenar în urma tratamentului cu inhibitorii ADN-girazei; cu inhibarea sintezei ARN ADN-dependente (ca rezultat al tratării cu rifamicină, de exemplu); cu deteriorarea învelișurilor celulare și pierderea integrității structurale în urma tratamentului cu inhibitorii ai sintezei componentelor peretelui celular; cu inhibarea ribozomilor și translarea eronată a proteinelor ca rezultat al acțiunii inhibitorilor sintezei proteinelor. Cercetările recente au depistat și unele

mecanisme generalizate, care se dezvoltă practic în toate tipurile de celule bacteriene, indiferent de substanța antibiotică aplicată. Astfel, a fost demonstrat, că aplicarea dozelor letale de antibiotice bactericide conduce la acumularea excesivă a radicalilor hidroxil și la instalarea unei stări de stres oxidativ sever, cu modificarea ireversibilă a metabolismului celular [63, 122, 123].

Nivelul de cunoaștere actuală a modului în care antibioticele induc moartea bacteriilor este centrat pe funcțiile celulare esențiale care sunt blocate ca rezultat al interacțiunii dintre antibiotic și ținta primară din cadrul celulei microbiene. Sistemele tradiționale de clasificare a antibioticelor se bazează pe efectul nociv produs, pe spectrul de activitate ori pe mecanismul de acțiune a lor.

În conformitate cu efectul nociv produs antibioticele se clasifică în *bactericide* și *bacteriostatice*. Bacteriostaticele stopează procesele de creștere și diviziune celulară, ceea ce, într-un final, conduce la eliminarea infecției. De obicei, acest tip de medicamente blochează diferite verigi metabolice implicate în procesul multiplicării bacteriilor. De exemplu, tetraciclina, doxiciclina, cloramfenicolul, eritromicina inhibă activitatea unităților ribozomale 30S și 50S, ceea ce nu omoară celula, dar face imposibilă sinteza noilor unități proteice necesare în calitate de material de construcție pentru creșterea și multiplicarea celulelor microbiene. Antibioticele sulfanilaminice inhibă sinteza metaboliților necesari pentru realizarea sintezei noilor molecule de ADN, ARN și proteine (de exemplu, poate fi blocată sinteza acidului folic) [171]. Antibioticele cu efect bactericid sunt implicate în deteriorarea structurii membranei citoplasmatică, în inhibarea proceselor de biosinteză a elementelor peretelui celular, de transcripție și translație pe genele ce codifică sinteza proteinelor funcționale.

Relevanța clasificării antibioticelor ca bacteriostatice sau bactericide este deosebit de importantă atunci, când se aplică terapiile combinate și se stabilesc dozele active ale acestora [176]. Este cunoscut faptul că antibioticele bactericide acționează deosebit de intens asupra celulelor în proces de diviziune, de aceea antibioticele bacteriostatice sunt antagoniste și pot reduce efectul medicamentelor din prima categorie. Studiul interacțiunii antibioticelor din ambele grupuri pentru majoritatea combinațiilor testate a confirmat ipoteza antagonismului dintre preparatele bacteriostatice și bactericide, și a scos în evidență o multitudine de reacții de răspuns ale celulelor bacteriene la aceste acțiuni [171]. Din punct de vedere practic, cunoașterea detaliată atât a interacțiunii antibioticelor, cât și a răspunsului culturilor bacteriene constituie un suport esențial în elaborarea tacticii de tratament. Cele mai relevante sunt rezultatele care reflectă cazuri de antagonism puternic, care trebuie evitat, și care de fapt compromit efectul pe care îl are preparatul bactericid aplicat independent. Lipsa dinamicii de creștere care este înregistrată în cazul diferitor combinații antagoniste de antibiotice sugerează ideea, că la baza creșterii ratei de

supraviețuire a culturii bacteriene stau diferite mecanisme celulare. Rezultatele cercetărilor de ultimă oră indică asupra unei noi perspective care stabilește când și în ce mod celulele bacteriene pot evita moartea cauzată de influența preparatelor antibiotice. Din acest punct de vedere, studiul creșterii culturii bacteriene urmează a fi divizat în două componente distincte – rata de mărire a dimensiunilor celulare și rata de diviziune celulară. Reducerea similară a ratelor de diviziune la acțiunea diferitor combinații antibiotic bacteriostatic – antibiotic bactericid ar putea constitui baza fenomenului de antagonism. Cu referire la efectele morfologice a fost stabilit, că anumite antibiotice sunt capabile să inducă modificarea formei celulelor bacteriene. De exemplu, antibioticele beta-lactamice induc liza celulară prin intermediul unui proces de scurgere a citozolului prin defectele produse în stratul de peptidoglican [234]. Cercetările de perspectivă în acest domeniu urmează a fi orientate spre stabilirea legăturii cauză - efect între aceste modificări structurale și modularea ratei de diviziune celulară, adică spre stabilirea capacității de a genera starea de antagonism [171, 234]. Deși majoritatea studiilor care includ combinații ale preparatelor bacteriostatice și bactericide evidențiază un antagonism practic omniprezent în ceea ce privește ratele de creștere și moarte celulară, totuși, varietatea răspunsurilor morfologice observate poate conduce la manifestarea efectelor specifice ale combinațiilor de antibiotice, inclusiv de sinergism. În plus, sistemul de clasificare a antibioticelor după criteriul bacteriostatice / bactericide nu este unul generalizat. Efectul bacteriostatic / bactericid este diferit în funcție de organismul patogen asupra căruia se realizează influența sau chiar în funcție de concentrația medicamentului. Evaluarea *in vitro* a interacțiunilor dintre perechile de antibiotice aplicate într-o gamă largă de concentrații servesc ca suport pentru studiile *in vivo*, unde permanent are loc o fluctuație pronunțată a concentrațiilor de medicamente, cauzată de ratele diferite de absorbție și eliminare [50]. În același timp, terapia combinată rămâne o opțiune importantă ca o strategie de tratament ce vizează controlul asupra creșterii nivelului de antibioretistență. Un studiu aprofundat al efectelor antibioticelor asupra proceselor fiziologice bacteriene asigură un suport fundamental în aplicarea combinațiilor de antibiotice în mai multe infecții bacteriene [50, 171, 234].

În funcție de gama de specii de bacterii sensibile la acțiunea preparatelor antibacteriene, acestea sunt clasificate în *antibiotice cu spectru larg de acțiune* și *antibiotice cu spectru îngust de acțiune*. Este important să menționăm, că spectrul de acțiune nu este o mărime constantă și se poate modifica esențial odată cu achiziționarea unor mecanisme de rezistență, inclusiv a genelor de rezistență la antibiotice de către anumite tulpini de microorganisme patogene.

Agenții antibacterieni cu spectru larg de acțiune sunt activi atât împotriva organismelor Gram-pozitive, cât și a celor Gram-negative. Din această categorie fac parte tetraciclinele,

fenicolii, fluorochinolonele, a treia și a patra generație de cefalosporine. Antibacterienele cu spectru îngust de acțiune au activitate limitată și sunt utile numai împotriva anumitor specii de microorganisme. De exemplu, glicopeptidele și bacitracina sunt eficiente numai împotriva bacteriilor Gram-pozitive, în timp ce polimixinele sunt, de obicei, eficiente numai împotriva bacteriilor Gram-negative. Aminoglicozidele și sulfonamidele sunt eficiente numai împotriva organismelor aerobe, în timp ce nitroimidazoli sunt eficienți doar contra anaerobilor.

Clasificarea tradițională a antibioticelor *în funcție de mecanismele de acțiune* presupune existența a 5 clase de preparate antimicrobiene:

- Antibiotice care inhibă sinteza peretelui celular.

În această categorie se înscriu preparate care acționează asupra diferitor site-uri de sinteză a componentelor peretelui celular bacterian. De exemplu, penicilina, cefalosporina, azteonamul, imipenemul inhibă activitatea transpeptidazelor și ca rezultat nu se formează legăturile transversale dintre catenele peptidoglicanice. Vancomicina și teicoplanina leagă regiunile terminale D-alanil-D-alanina și blochează încorporarea acestora în componența peptidoglicanului în formare. Oritavancina, analogii lipofilici ai vancomicinei, ramiplanina inhibă etapa de transglicozilare, iar bacitracina blochează defosforilarea transportorilor de fosfolipide.

Succesul în tratamentul cu inhibitori ai sintezei peretelui celular este asigurat de modificări profunde ale formei și dimensiunilor celulelor, ceea ce induce reacții de stres soldate cu liza acestora [124]. Antibioticele β -lactamice (inclusiv penicilinele și cefalosporinele) conțin în structura lor un inel aminic, care este un analog al dipeptidei terminale D-alanil-D-alanină, și se comportă ca un substrat pentru transpeptidazele cunoscute și ca proteine ce leagă penicilina (penicilin binding proteins PBPs). În acest mod, enzimele sunt inactivate complet, deoarece legăturile formate cu preparatele β -lactamice nu pot fi hidrolizate de aparatul enzimatic celular [75]. Spre deosebire de β -lactame, antibioticele glicopeptidice (de exemplu, vancomicina) inhibă sinteza peptidoglicanului prin legarea lor directă cu unitățile dipeptidice D-alanil-D-alanină și prin blocarea activității transglicozidazice și transpeptidazice. Astfel, glicopeptidele (indiferent dacă sunt libere în periplasmă ca vancomicina sau ancorate ca teicoplanina) acționează ca inhibitori ai procesului de maturare sterică a peptidoglicanului și reduc rezistența mecanică celulară. Este de remarcat faptul că antibioticele β -lactamice pot fi utilizate pentru a trata infecțiile cauzate de bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative, în timp ce glicopeptidele sunt eficiente numai împotriva bacteriilor Gram-pozitive. În calitate de antibiotice, care inhibă sinteza (de exemplu, fosfomicina) și transportul (de exemplu, bacitracina) unităților peptidoglicanice, sunt utilizate lipopeptidele (de exemplu, daptomicina) care afectează integritatea

structurală prin capacitatea lor de a se încorpora în membrana celulară și de a induce depolarizarea acesteia [124].

Studiul mecanismelor de distrugere a celulelor bacteriene prin acțiunea inhibitorilor sintezei peptidoglicanului a demonstrat, că liza celulelor este un proces mult mai complex decât „ruperea” mecanică ca urmare a creșterii presiunii osmotice cauzată de „creșterea dezechilibrată”. A fost demonstrat, că liza celulelor bacteriene sub acțiunea preparatelor β -lactamice este determinată de numeroase procese celulare active. De exemplu, tulpinile de *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*) cu deficit de activitate amidazică nu sunt afectate de acțiunea concentrațiilor critice de preparate β -lactamice – efect cunoscut sub numele de toleranță la antibiotic. Totodată, tulpinile, care se caracterizează prin prezența autolizinelor (enzime asociate membranei care descompun legăturile dintre și în cadrul lanțurilor peptidoglicanice), cum ar fi *Escherichia coli* (*E.coli*), sunt extrem de receptive la acțiunea acestui tip de antibiotice. Astfel, efectul de inhibare a sintezei peptidoglicanului este amplificat de efectul de distrugere a catenelor deja existente, ceea ce grăbește puternic manifestarea efectului litic al preparatelor β -lactamice [75, 124].

Pe lângă cele menționate, tulpinile de *S. pneumoniae* lipsite de activitatea hidrolazelor mureinice pot totuși fi distruse de preparatele β -lactamice, dar într-un ritm mai lent indicând faptul că aceste preparate posedă și un mecanism de acțiune independent de liza celulară. În opinia cercetătorilor unele dintre aceste mecanisme non-litice sunt reglementate prin intermediul sistemelor bicomponente. De exemplu, la *S. pneumoniae* a fost depistat sistemul bicomponent VncSR – LytA, în care gena VnsSR controlează expresia autolizinei LytA și reglementează toleranța la vancomicină și penicilină [124, 167]. La *Staphylococcus aureus*, sistemul bicomponent IrgAB-LytSR poate afecta, de asemenea, liza celulară prin reglarea activității autolizinic. LytR activează expresia operonului IrgAB, care inhibă activitatea autolizinei asigurând toleranța la acțiunea antibioticelor. Sistemul CidAB la *Staphylococcus aureus* activează autolizinele, făcând ca patogenul să devină mai sensibil la acțiunea preparatelor β -lactamice [30, 195].

- Antibiotice care inhibă sinteza proteinelor.

Cele mai cunoscute antibiotice din această categorie sunt macrolidele și tetraciclinele, care, de fapt, au ținte diferite. Astfel, macrolidele, la fel ca cloramfenicolul și clindamicina, leagă subunitatea 50S a ribozomilor bacterieni, în timp ce tetraciclinele, la fel ca și aminoglicozidele, au în calitate de țintă de acțiune subunitatea mică 30S. Ca rezultat al acestor interacțiuni ribozomii nu pot realiza procesul de biosinteză a proteinelor.

Categoria de inhibitori ai subunității 50S acționează prin blocarea fizică a procesului de inițiere a translației proteinei (ca în cazul oxazolidinonei) sau a translocării peptidil-ARNt, care servește pentru a inhiba reacția peptidiltransferazică ce alungește lanțul peptidic [118, 159]. Inhibitorii subunității 30S acționează prin mai multe căi. Astfel, tetraciclinele acționează prin blocarea accesului aminoacil-ARNt la ribozomi. Spectinomycin și antibioticele aminoglicozidice leagă componenta 16S ARNr a subunității mici ribozomale. Spectinomycin interferează cu stabilitatea peptidil-ARNt prin inhibarea factorului de translocare [124].

- Antibiotice care inhibă sinteza acizilor nucleici.

La această categorie se referă inhibitorii sintezei ADN și ARN (rifampina, rifabutina, rifapentina, flucitozina, grizeofulvina) și inhibitorii ADN-girazelor și topoizomerazelor (de exemplu, chinolonele). Pentru realizarea procesului de sinteză normală a ADN și ARNm este necesară modularea supercompactizării cromozomiale prin intermediul activității catalitice a topoizomerazei. Aceste reacții sunt ținta acțiunii chinolonelor sintetice, inclusiv a fluorochinolonelor clinic relevante, care vizează complexe ADN-topoizomeraza. Antibioticele chinolonice interferează cu capacitatea de menținere a topologiei cromozomiale prin captarea ADN-girazei (Topo II) și topoizomerazei IV (Topo IV), față de care acționează ca capcane, blocând astfel procesul de scindare și reconectare a catenelor ADN. Susceptibilitatea Topo II și Topo IV la acțiunea preparatelor antibiotice este determinată în mare măsură de poziția sistematică a microorganismului. Mai multe studii au arătat că Topo IV este ținta principală a chinolonelor la bacteriile Gram-pozitive (de exemplu, *Streptococcus pneumoniae*), în timp ce giraza este ținta primară, iar Topo IV – ținta secundară a acestor medicamente în cazul bacteriilor Gram-negative (de exemplu, *Escherichia coli* și *Neisseria gonorrhoeae*) [124]. Efectul tratamentului cu preparate chinolonice constă în formarea rupturilor în structura ADN dublu catenar, care sunt blocate prin formarea legăturilor covalente cu topoizomerazele, funcțiile cărora sunt compromise. Ca urmare a formării complexului chinolona-topoizomeraza-ADN, mecanismul ce realizează replicarea ADN-ului este blocat pe furcile de replicare, conducând la inhibarea sintezei ADN-ului și se finalizează cu bacteriostaza și cu moartea celulelor [62, 99].

Un alt grup de preparate antimicrobiene, printre care și rifamicina, inhibă transcripția ADN-dependentă, transcripția prin legarea stabilă a subunității ADN (codificate de gena proB) pe care se fixează enzima ARN-polimeraza. Această subunitate este situată în interiorul canalului format de complexul polimerazei cu ADN, din care apare catena sintetizată de novo de ARN. Ca rezultat al acestui blocaj mecanic sinteza ARN-ului nu poate progresa și este stopată la nivel inițial. În același timp, unele substanțe cu efect de inhibare a polimerazei acționează la nivel de

blocare a procesului de elongare a ARN prin inducerea modificărilor alosterice ale enzimei ARN- polimeraza [25, 39, 124].

- Antibiotice care acționează asupra sterolilor (preparate antifungice).

O parte dintre aceste preparate se leagă cu sterolii, provocând rupturi în structurile membranare (polimixinele, amfotericina B, nistatina), iar o altă parte inhibă anumite etape ale procesului de biosinteză a ergosterolului (de exemplu, imidazolul). Antifungalele din prima categorie se leagă cu sterolii din membrana celulei fungice, penetrând astfel membrana în stare mai puțin fluidă, cu proprietăți cristaline mai puternice. Ca urmare, conținutul celulei, inclusiv ionii monovalenți (K^+ , Na^+ , H^+ , și Cl^-) și moleculele organice mici, sunt eliminate din celulă, ceea ce se consideră cauza principală a morții celulare [26]. Preparatele azolice, care fac parte din a doua categorie (cu excepția abafunginei), inhibă enzima lanosterol 14 α -demetilaza – enzimă necesară pentru a converti lanosterolul în ergosterol. Epuizarea ergosterolului în membrana fungică perturbază structura și multe din funcțiile ei, blocând creșterea și multiplicarea fungilor.

- Antibiotice care inhibă verigi unice ale căilor metabolice la microorganisme.

Cele mai cunoscute preparate de acest fel blochează sinteza acidului tetrahidrofolinic (sulfonamidele, trimetrexatul, pirimetamina ș.a.), acidului micolic (izoniazida), ubichinonei, perturbând astfel procesele vitale în celulele bacteriene. În acest grup sunt incluse mai multe substanțe, care se caracterizează printr-un spectru restrâns de activitate, iar fiecare dintre ele se manifestă prin mecanisme distincte.

În pofida diversității enorme a tipurilor și mecanismelor de acțiune a antibioticelor, microorganismele au reușit să dezvolte rezistență pronunțată la majoritatea preparatelor cunoscute. Până în anii '90 ai secolului trecut problema rezistenței antimicrobiene nu era considerată o amenințare în gestionarea bolilor infecțioase. Însă, cu timpul au început să fie înregistrate tot mai multe eșecuri în tratament, microorganismele fiind din ce în ce mai rezistente la acțiunea agenților antimicrobieni. Mecanismele de rezistență depind de verigile metabolice specifice care sunt inhibitate de antibiotice și de căile alternative disponibile în celula bacteriană. Rezistența la antibiotice poate fi asigurată pe două căi: a) calea intrinsecă sau naturală, care se bazează pe faptul că microorganismele nu posedă site-uri-țintă asupra cărora acționează medicamentele sau se caracterizează prin permeabilitate redusă la acești agenți ori b) calea rezistenței dobândite, prin care un microorganism natural sensibil intră în posesia unor mecanisme, ce asigură rezistența antimicrobiană. Cea de-a doua cale poate fi realizată prin mai multe modalități: prezența unei enzime care inactivează agentul antimicrobian; prezența unei enzime alternative pentru enzima care este inhibată de agentul antimicrobian; o mutație în ținta

agentului antimicrobian care reduce afinitatea acesteia față de agentul antimicrobian; modificarea post-transcripțională sau post-translațională a țintei agentului antimicrobian care reduce afinitatea acesteia față de agentul antimicrobian; absorbția redusă a agentului antimicrobian; efluxul activ al agentului antimicrobian; supraproducția de molecule-țintă ale agentului antimicrobian; expresia sau supresia unei gene *in vivo* în contrast cu situația *in vitro* ș.a. [37].

Înțelegerea mecanismelor de acțiune ale antibioticelor și celor de rezistență față de ele este importantă pentru a defini modalități mai bune de a păstra activitatea preparatelor existente și pentru a proiecta agenți antimicrobieni care nu sunt afectați de mecanismele de rezistență cunoscute și care urmează a fi cunoscute pe viitor.

1.2. Compuși antimicrobieni naturali

Utilizarea produselor naturale în managementul terapeutic împotriva bolilor cauzate de microorganisme este mai avantajoasă decât utilizarea medicamentelor derivate din surse sintetice. Acest lucru se datorează efectelor secundare reduse ale acestor medicamente, în timp ce activitatea lor toxicologică și farmacologică este comparabilă cu a celor obținute din surse industriale. În plus la toxicitatea joasă, în diferite ramuri ale medicinei există o cerere și un interes deosebit pentru produsele farmacologice naturale, care au efecte împotriva agenților infecțioși. Cele mai cunoscute surse de substanțe naturale cu efecte curative sunt de origine vegetală. Plantele conțin o gamă largă de fitochimicale, care au fost în mod tradițional utilizate de milenii în medicina populară. Cele mai vechi relatări cu privire la utilizarea plantelor în tratamentul diferitor maladii vin din China (5000 de ani î.Hr.), India (În Rigveda și Atharvaveda, 2000 de ani î.Hr.); Mesopotania (2600 de ani î.Hr.), Egipt (1500 de ani î.Hr.) [56, 87, 166, 180, 190]. Interesul față de medicamentele naturiste a scăzut în cea de-a doua jumătate a secolului al XX-lea, în legătură cu faptul că preparatele sintetice apărute în această perioadă aveau o eficiență mai înaltă, era mai simplu de a studia procesul de metabolizare a lor în organism, precum și mecanismele de acțiune a lor asupra agenților microorganismelor patogene; procesul de brevetare pentru astfel de preparate decurgând mai ușor. Totuși, utilizarea largă a preparatelor sintetice și incidența înaltă a reacțiilor adverse generate de acestea a reactualizat interesul față de preparatele de origine naturală.

1.2.1. Antibiotice de origine microbiană

Biodiversitatea enormă a microorganismelor în ceea ce privește habitatul, metabolismul și toleranța față de condițiile extreme și acțiunea diferitor agenți determină înțâietatea acestora în calitate de surse de substanțe cu efect antibiotic. Din acest punct de vedere, actinomicetele,

fungii miceliali și mixobacteriile sunt lideri după numărul și varietatea produselor farmaceutice care se obțin pe baza lor. Descoperirea penicilinei (din *Penicillium rubens*) urmată de cea a streptomicinei (din *Streptomyces griseus*) a transformat viața a milioane de oameni. În continuare habitatele naturale ale microorganismelor au fost explorate în scopul descoperirii noilor compuși bioactivi capabili de a combate maladiile infecțioase. Indiferent de eforturile depuse, totuși, comunitățile microbiene, care populează regiunile extreme și oceanele, constituie în continuare o sursă neexplorată de noi compuși [144].

Progresul în domeniul implementării noilor tehnici de screening, separare și izolare a compușilor chimici a condus la identificarea a peste un milion de compuși naturali, dintre care 50-60% sunt de origine vegetală și peste 5% – de origine microbiană. Aproximativ 25% dintre acești compuși posedă activitate biologică, din care 10% sunt derivate din surse microbiene. În valori numerice dintre cei peste 22.500 de compuși microbieni biologic activi 45% sunt produși de actinomicete, 38% – de fungi, și 17% – de bacterii [52, 59, 156, 189]. Totuși, numărul mare de produși microbieni cu activitate antibiotică nu înseamnă succes în tratament, deoarece în majoritatea cazurilor intervine procesul de dezvoltare a rezistenței microbiene față de acești agenți și de instalare a efectelor toxice față de macroorganism. Astfel, căutarea de noi substanțe naturale cu efect antibiotic rămâne o prioritate pentru cercetătorii din acest domeniu.

Antibiotice din actinomicete. În prezent actinomicetele sunt clasificate ca *Actinobacteria* și includ bacterii Gram-pozitive, ADN-ul cărora este bogat în guanină și citozină (69-73 mol%), și care formează miceliu ramificat de substrat și aerian. Cea mai notabilă caracteristică a acestor organisme constă în capacitatea lor de a produce metaboliți secundari, majoritatea dintre care posedă activitate antibiotică pronunțată. Printre cei mai cunoscuți compuși antibiotici ai actinomicetelor se numără aminoglicozidele, macrolidele, tetraciclonele și acetamidele, care acționează pe calea inhibiției sintezei proteinelor; tiolactonele, care inhibă sinteza acizilor grași; glicopeptidele, care blochează procesul de sinteză a peretelui celular; lipoproteidele care perturbază funcționalitatea membranelor celulare, hexapeptidele ciclice și aminocumarinele care inhibă procesele de biosinteză a acizilor nucleici [74, 95, 115, 115, 144, 145]. Aceste substanțe sunt utilizate cu succes în tratamentul diferitor infecții.

Streptomicetele produc mai mult de jumătate din produsele naturale antibiotice cunoscute și atribuite actinomicetelor. Pe lângă acțiunea antimicrobiană, substanțele produse din streptomicete sunt utilizate în tratamentul cancerului și maladiilor autoimune. Din diferite specii de streptomicete sunt obținute astfel de produse recunoscute ca rifamicina, streptomicina, streptogramina, lincomicina, neomicina, carbomicina, tertiomicina ș.a. În prezent sunt cunoscuți peste 2400 de metaboliți secundari ai streptomicetelor, iar cercetătorii speră să descopere printre

aceștia substanțe cu efecte terapeutice pronunțate [82, 142]. Producerea maximală a metaboliților secundari la actinomicete are loc la începutul fazei staționare a ciclului vital.

O sursă foarte promițătoare de substanțe cu activitate antibiotică sunt speciile mai puțin cunoscute de actinomicete, în special, cele marine. Cei mai importanți producători de metaboliți secundari bioactivi din această clasă de actinomicete sunt reprezentanții genurilor *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatospora*, *Microbiospora*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Salinispora*, *Streptosporangium* și *Verrucosipora* [116]. Printre actinomicetele terestre sunt considerate surse de perspectivă de metaboliți secundari speciile din genurile *Ktedenobacteria*, *Actinospica* și *Catenulispora*. Dintre reprezentanții genului *Marinospora* (familia *Streptomycetaceae*) a fost izolat un compus cu potențial antibacterian înalt – marinimicina, precum și compuși noi din clasa napiradiomicinei [45, 72].

Compuși antibiotici din mixobacterii. Celulele separate ale mixobacteriilor se pot asocia în conglomerate a peste 10^5 indivizi, proces pe durata căruia sunt necesare sisteme de semnalizare și schimb de informație. Din acest motiv ele elimină diferite peptide și mediatori care asigură semnalizarea intercelulară. Metaboliții lor secundari sunt hibrizi neobișnuiți ai polipeptidelor și polipeptidelor nonribozomale fără a fi glicozidați, de aceea au alte ținte decât metaboliții secundari ai actinomicetelor [61, 193, 219]. Printre compușii cu activitate antibiotică ai mixobacteriilor se numără arcazolidel, hondoclorenul, murenamidele, pedaina, salimabromura ș.a. Producerea maximală a metaboliților secundari la mixobacterii se înregistrează pe durata fazei de creștere exponențială.

Antibiotice produse de eubacterii. În ultimul deceniu mulți reprezentanți ai *Eubacteria* au fost identificați în calitate de surse de compuși bioactivi. De exemplu, bacteriile marine produc substanțe antibacteriene care urmează să asigure stabilitatea microbiocenozei marine, schimbul de informație în ecosistem și inhibarea organismelor rivale și patogene [112]. Chiar dacă în ultimii ani au fost descoperiți și descriși diferiți compuși activi obținuți din eubacterii, foarte puțini dintre ei au mers mai departe de etapa studiului preclinic. În ultimul timp se pune mai mult accent pe modificarea antibioticelor existente produse în mod natural. Această tactică a deschis calea pentru o nouă clasă de antibiotice numite lantibiotice, care reprezintă peptide cu lantionine și / sau cu reziduuri de metilantionine produse de bacteriile Gram-pozitive. Mai recent, aceste substanțe se află în centrul atenției datorită eficienței lor față de bacteriile multirezistente [172].

Antibiotice produse de fungi. Deși identificarea antibioticelor a pornit odată cu descoperirea penicilinei produsă de fungi, acestui grup îi sunt atribuite doar 5% dintre compușii

microbieni bioactivi cu efect antibiotic [144]. Această situație s-a creat mai degrabă din cauza că cercetările în domeniul dat nu s-au soldat cu implementări practice și nicidecum din cauza că fungii nu ar fi surse convenabile de substanțe antibiotice naturale. Din contra, rezultatele screeningurilor desfășurate în diferite centre indică asupra unui potențial enorm al fungilor miceliali care pot fi cercetați cu utilizarea tehnicilor moderne de cultivare și identificare [187]. Aplicarea tehnicilor moderne poate asigura, de asemenea, și producerea industrială a produselor naturale cu efecte antibiotice, atât cunoscute, cât și principial noi, în special atunci când este vorba despre explorarea habitatelor mai puțin studiate ale fungilor, cum ar fi sedimentele marine, apele geotermale, deșerturile reci și regiunile arctice și antarctice. În ultima vreme, fungii endofiti, asociați cu plantele, sunt priviți drept o nouă sursă de antibiotice. Este evident, că în unele cazuri acești fungi sunt asociați cu biosinteza compușilor care au fost izolați anterior din plante, dar în realitate sunt produși de microorganismele respective. Exemple de astfel de compuși sunt taxolul produs de *Taxomyces andreanae*, podofilumul produs de *Phialocephala fortinii*, camptotecina produsă de specia de fungi endofitici *Camptotheca acuminata* și hipericina produsă de *Chaetomium globosum*. Printre compușii bioactivi derivați din fungii miceliali aflați la diferite etape de dezvoltare în ultimul timp sunt ganodermicina, aspergiolidele, bioxantracenele, chetominina, comenezina, dolastatina, gliocladinele, spirolaxina ș. a. [16, 51, 86, 114, 117, 120, 182, 215].

Antibiotice produse de mixomicete. Până în prezent sunt descriși mai puțin de 100 de metaboliți bioactivi produși de mixomicete [32]. Cei mai mulți dintre compușii antimicrobieni bine studiați sunt produși de reprezentanții genurilor *Physarum* și *Labyrinthulomycota*. Printre ei se numără pigmentii naftochinonici, aldehidele lactonice, cicloantranililprolinaglicozide dibenzofuranice, steroli ș.a. [60, 154].

Antibiotice produse de cianobacterii. Cianobacteriile constituie un grup de procariote fotosintetice Gram-negative cu morfologie diversă și distribuție largă. Dotate cu adaptabilitate extraordinară la diferite condiții de mediu, cu mecanisme eficiente de protecție împotriva diverselor tensiuni abiotice și flexibilitate metabolică, acestea sunt prezente în diferite tipuri de habitate terestre și acvatică. Afară de utilizarea pe larg în diverse domenii, cum ar fi agricultura, acvacultura, controlul poluării, bioenergia și fabricarea de nutraceutice, cianobacteriile mai sunt surse importante de compuși bioactivi noi cu valoare chimică și farmacologică, inclusiv compuși antimicrobieni (antibacterieni, antifungici și antivirali) [176]. Printre compușii bioactivi cianobacterieni se numără cei cu activitate antimicrobiană, anticanceroasă / antineoplazică, antimicotică, imunomodulatoare și de inhibare a anumitor enzime [29, 183, 209, 216, 227].

Cianobacteriile de genurile *Scytonema* și *Tolypothrix* produc compuși antifungici puternici și substanțe citotoxice, numite scitoficine, care sunt de aceeași natură chimică ca și macrolidele. Tolitoxina (6-hidroxi-metil-clorhidratul 7-0-scitoficinei b) a fost inițial izolată din cianobacteria *Tolypothrix conglutinata var. colorata* în 1977. Speciile cianobacteriene care sunt cunoscute ca producătoare de scitoficine și tolitoxine sunt: *Scytonema pseudohofmanni*, *S. mirabile*, *S. burmanicum* și *S. ocellatum*. Scitoficinele și tolitoxinele prezintă citotoxicitate puternică față de diferite linii celulare canceroase [176].

Din cianobacterii au mai fost obținute și diverse peptide ciclice și depsipecte cu proprietăți antimicrobiene. Printre acestea se numără teneciclamidele (cu proprietăți antibacteriene și citotoxice) din cianobacteria *Nostoc spongiaeforme var. tenue*, schizotrina A (cu proprietăți antibacteriene și antifungice) din *Schizothrix sp.*, hormofamninele (cu proprietăți antibacteriene și antifungice) din cianobacteria marină *Hormothamnion enteromorphoides*, laxaficinele (agenți antifungici) din *Anabaena laxa*, majusculamida C (agent antifungic) din cianobacteria marină *Lyngbya majuscula*, kawaguchipectina B (agent antibacterian) din *Microcystis aeruginosa*, caloficina (fungicid) din *Calothrix fusca*, tolibissidina (antifungic) din *Tolypothrix byssoidea* ș.a. Cianobacteria *Nostoc commune* produce un compus antibacterian nou, numit noscomin, care este un diterpenoid. De asemenea, din diferite specii de nostoc au fost obținute și carbamidociclofanele A și E (paracyclophanes clorurate), care prezintă activitate antibiotică și citotoxică. Din biomasa cianofitei *Hapalosiphon fontinalis* au fost izolați alcaloizi indolici, numiți hapalindoli, care sunt agenți antibacterieni și antifungici. O altă specie de cianofite – *Fischerella muscicola* – produce un compus antimicrobian numit fischerindol L, care este înrudit chimic cu hapalindolii. *Plectonema radiosum* și *Tolypothrix tenuis* produc nucleozidele tubercidina și toiocamicina cu efect antibacterian și citotoxic. Izonitrilul ambiguina cu activitate antimicrobiană este produs de *Fischerella ambigua*, *Hapalosiphon hibernicus* și *Westiellopsis prolific*. *Fischerella ambigua* mai produce și compuși aromatici clorurați cu activitate antibacteriană și antifungică. Cianobacteria marină *Lyngbya majuscula* produce amide ale acizilor grași care sunt agenți antibacterieni puternici [36, 176].

Proprietăți antimicrobiene manifestă nu numai substanțele pure izolate din biomasa de cianobacterii, ci și extractele de diferite tipuri. Astfel, extractele etanolice, metanolice, acetonică din biomasa de *Oscillatoria latevirns*, *Phormidium corium*, *Lyngbya martensiana*, *Chroococcus minor* și *Microcystis aeruginosa* posedă activitate antimicrobiană față de reprezentanții speciilor *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutants*, *Escherichia coli*, *Micrococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae* și *Candida albicans* [143]. Extractele cloroformice din *Oscillatoria sp.*, *Nostoc sp.*, *Nostoc muscorum*, *Nostoc piscinale*, *Phormidium sp.*, *Anabaena flosaquae* și

Spirulina platensis au demonstrat activitate antimicrobiană față de bacteriile Gram-negative (*Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella enterica* S 1180, *Klebsiella pneumoniae* K 51, *Vibrio cholera* V116 și *Salmonella paratyphi*) și bacteriile Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* S 1426, *Listeria monocytogenes* L 49) [153].

Extractele metanolice din biomasa cianobacteriilor *Spirulina major*, *Oscillatoria salina* și *Plectonema terebrans* au demonstrat activitate antibacteriană performantă contra *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis* [100]. Recent a fost demonstrată activitatea antibacteriană a extractelor lipidice din unele specii de cianobacterii izolate din peșterile din Grecia. Lipidele obținute din *Toxopsis calypsus* și *Phormidium melanochroun* au fost testate contra izolatelor microbiene contagioase obținute din infecțiile intraspitalicești și s-au dovedit a fi active contra enterococilor. Efectul a fost confirmat și pe culturile respective de referință [132].

Extractele hidrice și etanolice din biomasa de *Anabaena circinalis* posedă activitate antibacteriană împotriva *Serratia marcescens* și *Escherichia coli*, iar extractul etanolic mai are activitate și împotriva *Klebsiella pneumoniae* și ciupercii *Aspergillus flavus*. Extractele din *Nostoc commune* prezintă activitate semnificativă împotriva *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* și *Micrococcus luteus*. O altă specie – *Nostoc muscorum* – are activitate antimicrobiană față de o gamă largă de bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* și *Bacillus cereus*) și Gram-negative, bacterii (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* și *Serratia marcescens*), precum și față de ciuperca *Aspergillus flavus*. Extractul apos de *Spirulina platensis* are o activitate antibacteriană împotriva *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae* și *Serratia marcescens*, precum și față de ciuperca *Aspergillus flavus* [206].

Extractele cu solvenți diferiți (N-hexan, cloroform, acetonă, metanol) din biomasa diferitor tulpini de *Spirulina platensis* colectate din diferite habitate au fost testate în calitate de preparate antimicrobiene contra *Microsporum canis* MTCC-3270, *M. fulvum* MTCC-7675, *Candida albicans* MTCC-227, *Salmonella typhimurium* MTCC-TA 98, *Staphylococcus aureus* MTCC-96. Cele mai active s-au dovedit a fi extractele în acetonă și metanol, iar celelalte tipuri de extracte au manifestat diferit grad de inhibiție față de microorganismele patogene testate [130].

Spirulina este una dintre cianobacteriile cele mai cunoscute și mai intens produse în proporții industriale. Inițial interesul față de spirulină a fost axat în principal pe potențialul ei în calitate de sursă de proteine, vitamine (în special vitamina B₁₂ și provitamina A) și acizi grași esențiali, cum ar fi acidul γ - linolenic (GLA). Recent, o atenție deosebită se acordă efectelor sale terapeutice, care includ reducerea colesterolului, reducerea nefrotoxicității induse prin

acțiunea metalelor grele, activitatea anticancer, proprietățile radioprotectoare, efectele imunomodulatoare. Spirulina, de asemenea, este caracterizată și prin alte funcții biologice, cum ar fi activitatea antivirală, antibacteriană, antifungică și antiparazitară. Extractele etanolice din biomasa de *Spirulina platensis* s-au manifestat prin acțiunea față de mai multe virusuri, așa ca adenovirusul tipurile 7 și 40, virusul Cocksackie B4, astrovirusul tip 1, rotavirusul tulpina Wa, ș.a, precum și unele tulpini bacteriene și fungice, așa ca *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* ș.a. [65]. Extractele organice purificate din *S. platensis* au manifestat activitate contra bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, precum și contra fungilor unicelulari *Candida albicans*. Cea mai mare activitate biologică a fost înregistrată față de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* și *Aspergillus niger* [68]. Recent extractele din spirulină au fost testate și pe tulpini patogene cu rezistență multiplă la antibiotice și s-au dovedit a fi foarte eficiente în cazul tulpinilor de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.* și *Embedobacter sp.* izolate din probele clinice [214]. Extractele hexanice din biomasa de *Spirulina platensis* posedă o activitate antibacteriană puternică împotriva *Salmonella senftenberg*. Cercetările biochimice ale extractelor metanolice și hexanice indică asupra prezenței în ele a carbohidraților, compușilor fenolici, flavonoizilor și taninelor, fiecare dintre acestea în anumită măsură determinând activitatea antimicrobiană [101].

Cultura de *Arthrospira (Spirulina) platensis* a demonstrat activitate antibacteriană semnificativă împotriva a 6 tulpini de *Vibrio parahaemolyticus*: *Vibrio*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio alginolyticus* și *Vibrio lentus* [125]. Activitatea antibacteriană a spirulinei împotriva *Streptococcus pyogenes* și / sau *Staphylococcus aureus* s-a dovedit a fi determinată de prezența în componența biomasei a ficobiliproteinelor. Astfel, ficobilinele izolate din biomasa de *Arthrospira fusiformis* au demonstrat capacitate inhibitoare puternică față de tulpinile enumerate mai sus [163]. C-ficocianina izolată din *S. platensis* și purificată a inhibat semnificativ creșterea unor bacterii rezistente la medicamente: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* și *S. aureus* [203].

Aceste experiențe demonstrează atât potențialul extractelor integrale, cât și al compușilor izolați din speciile de spirulină în lupta împotriva rezistenței microorganismelor patogene la medicamente. Ținând cont și de faptul că spirulina este lipsită de toxicitate, ea este recunoscută și aprobată spre consumul uman și animal în multe țări, iar producerea ei industrială este pusă la punct și destul de simplu de controlat, devine evidentă perspectiva utilizării acestei specii cianobacteriene în calitate de sursă de materie primă farmaceutică pentru producerea noilor preparate antimicrobiene cu efecte adverse minime ori lipsite totalmente de acestea.

Numeroase centre științifice și companii farmaceutice din întreaga lume sunt implicate în căutarea și implementarea noilor medicamente cu efect antibiotic. Ultimul deceniu este remarcabil în primul rând prin studiul aprofundat al unor specii de microorganisme, care au fost anterior mai puțin accesibile. Este vorba în primul rând despre microorganismele acvaticе, care sunt surse de compuși unici, ceea ce duce la o creștere a numărului de preparate medicinale [229]. Deși în ultimul timp companiile farmaceutice au redus esențial programele destinate descoperirii noilor compuși, în prezent există numeroși candidați promițători la rolul de medicamente cu efect antibiotic, dintre care un număr impunător sunt de origine microbiană. Acest lucru este determinat în primul rând de faptul că deficiențele privind cercetările fundamentale și aplicațiile practice în acest domeniu sunt minime, iar faptul că aceste substanțe sunt tipice unor microbiocenoze naturale și nu au fost utilizate în terapie anterior poate prezenta o soluție pentru problema antibioretistenței. În opinia specialiștilor în domeniul biotehnologiilor microbiene, în cel mai apropiat timp vom fi martorii unei noi epoci de aur a compușilor activi microbieni [144].

1.2.2. Antibiotice de origine vegetală

Plantele produc o mare diversitate de compuși chimici cu structură și proprietăți determinate. În prezent sunt descrise structurile a peste 50.000 de compuși și în fiecare an acest număr crește cu câteva mii [180, 181]. Un număr mic dintre aceste substanțe sunt tipice tuturor organismelor, fiind părți componente ale căilor metabolice primare. Majoritatea însă sunt metaboliți secundari sau fitochimicale, biosinteza cărora este limitată la anumite grupuri de plante. Produsele bioactive din plante pot fi împărțite în mai multe clase majore în funcție de structura chimică, poziția sistematică a organismelor din care provin, căile de biosinteză sau proprietățile biologice. Cea mai cunoscută și utilizată schemă de clasificare este bazată anume pe structura chimică, iar principalele grupuri sunt compuse din fenoli, alcaloizi, saponine, terpenoide, limonoide, poliacetilene și secoiridoide, etc. În ultimii ani fitochimicalele au trecut numeroase teste *in vitro* și *in vivo* pentru a fi stabilită eficacitatea lor în calitate de agenți antimicrobieni contra bacteriilor patogene, fungilor și virusurilor, dar și acțiunea lor asupra microflorei benefice, în special a celei intestinale. De asemenea, multiple studii sunt orientate spre stabilirea mecanismelor de acțiune a substanțelor bioactive provenite din surse vegetale. Cercetările intense în acest domeniu sunt o garanție a elaborării de noi preparate cu efect antimicrobian extrase din biomasa vegetală, caracterizate prin nivelul înalt al eficienței terapeutice și prin efecte adverse minime asupra organismului.

Compușii fenolici obținuți din plante se caracterizează prin prezența în structura lor a unui inel benzenic aromatic cu cel puțin un substituent hidroxil [197, 225]. Compușii fenolici sunt tipici pentru întreg regnul vegetal, funcția lor biologică constând în protejarea plantelor de infecțiile microbiene, de radiații ultraviolete și de acțiunea factorilor chimici. Pe lângă faptul că toți fenolii sunt antioxidanți recunoscuți, mulți dintre aceștia manifestă și efect antimicrobian pronunțat.

A fost demonstrat, că un număr mare de acizi fenolici posedă activitate antibiotică contra unui număr mare de microorganisme, iar efectul este determinat, în primul rând, de concentrația aplicată. Acidul galic și p-hidroxibenzoic reduc viabilitatea *Campylobacter jejuni* la concentrații mici de 1 mg/l. Acizii sinaptic, vanilic și cafeic manifestă efect antimicrobian la concentrații începând de la 10 mg/l. Acidul ferulic și acidul cumaric sunt activi la o concentrație de 100 mg/l [80]. Recent a fost stabilit, că unii acizi fenolici, cum ar fi acizii galic, cafeic, clorogenic, chinic posedă acțiune antivirală, antibacteriană, precum și antifungică. Toți acizii fenolici menționați au demonstrat *in vitro* o acțiune inhibitoare asupra virusului *Herpes simplex 1* (HSV-1), iar acidul galic, acidul clorogenic și acidul chinic demonstrează un efect puternic antiviral împotriva virusului *Parainfluenza tip 3* la intervalul terapeutic de 0,8-0,05 mg/l [173]. În linii generale, activitatea antibacteriană a acizilor fenolici este mai pronunțată contra bacteriilor Gram-pozitive, dar unele specii de bacterii Gram-negative, de exemplu diferite tulpini de *Escherichia coli*, sunt și ele sensibile la acțiunea acizilor fenolici [53, 152]. Efectul antimicrobian al derivaților acizilor fenolici crește odată cu lungimea lanțului alchil [152].

Cumarinele, un alt grup de fenoli, se găsesc în multe familii de plante (*Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabiaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae* și *Solanaceae*) și posedă un spectru larg de activitate antimicrobiană, care este determinat de structura lor chimică. A fost stabilit, că prezența substituenților oxigenați în formele eterice sau esterice ale cumarinelor amplifică activitatea antibacteriană datorită capacității sporite de penetrare prin peretele celular, în timp ce prezența grupării hidroxil libere – o reduc, datorită reducerii capacității de traversare a învelișurilor celulare [149, 210].

Flavonoidele formează unul dintre cele mai mari grupuri de metaboliți secundari fenolici, prezente în diverse specii de plante. Ele posedă proprietăți antioxidante semnificative și sunt benefice pentru sănătate. Numeroși derivați flavonoidici prezintă activitate antivirală împotriva unei game largi de virusuri precum HSV, virusul Coxsackie B, coronavirusul, citomegalovirusul, virusul poliomielitei, rinovirusul, rotavirusul, virusul polio și virusul rabiei [58, 73, 168, 173]. De asemenea, diferite flavonoide au demonstrat acțiune antimicrobiană contra diferitor tulpini de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, dar și diferite specii folositoare de lactobacili [180].

Cercetările demonstrează, că acizii fenolici au o activitate antimicrobiană pronunțată [53, 80]. Unii acizi fenolici (de ex. acizii elagic și galic) sau flavonoizi (de ex. flavan-3-ol, flavan-3-4 diol sau flavan-4-ol) se găsesc în plante în stare esterificată sau polimerizată în dimeri, oligomeri sau compuși polimerici – constituind polifenolii. Acești compuși sunt caracterizați prin activitate antibacteriană și antifungică extinsă asupra unui mare număr de specii patogene. Elagitanina inhibă activitatea unei serii de microorganisme patogene, inclusiv *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* și *Campylobacter spp.* [186]. Extractele din fructe de pădure, ce conțin polifenoli, prezintă proprietăți inhibitoare selective asupra bacteriilor intestinale, cum ar fi *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria* și tulpini de *Lactobacillus*. Astfel, speciile patogene de *Staphylococcus* și *Salmonella* sunt sensibile la acțiunea diferitor extracte din fructe de pădure cu conținut de polifenoli și la acțiunea elagitaninei, în timp ce microorganisme patogene din genul *Listeria* și speciile benefice de *Lactobacillus* nu sunt afectate [185]. Extractele polifenolice din fructele de zmeur și mur pitic manifestă activitate antimicrobiană față de *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* [27]. Printre mecanismele de acțiune a polifenolilor se numără afinitatea lor față de fier și inactivarea proteinelor membranare, inhibarea enzimelor implicate în separarea celulelor după diviziune [69]. În linii generale compușii fenolici cu masa moleculară mică au o activitate antibacteriană mai mare față de compușii polifenolici, dar aceștia din urmă sunt scindați de enzimele bacteriene, formând acizii fenolici, care influențează populațiile microbiene [33, 164].

Naftochinonele – un alt grup de fenoli – sunt larg distribuite în biomasa plantelor, fungilor și unor animale. Lapacolul, plumbagona, juglona și lavsona sunt cele mai cunoscute naftochinone de origine vegetală, care au efecte antimicrobiene față de diverse bacterii patogene și fungi. Diospirina și isodiospirina (două naftochinone dimerice), izolate din rădăcini de *Diospyros piscatoria*, prezintă un spectru larg de activitate antibacteriană împotriva *Streptococcus pyogenes* și *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis* serotipul *typhi* (*S. typhi*) și *Mycobacterium chelonae*. Alte două naftochinone – lapacolul și b-lapacona, obținute din biomasa speciilor de *Tabebuia*, manifestă efecte relevante împotriva *Candida tropicalis*, *Candida albicans* și *Cryptococcus neoformans*, fiind mai active decât standardul de referință – ketoconazolul. Extractul metanolic din scoarța de *Tabebuia impetiginosa* cu conținut de lapacol și antrachinonă prezintă activitate antibacteriană puternică împotriva *Helicobacter pylori* [178, 180].

Alcaloizii au fost definiți ca substanțe organice heterociclice cu conținut de azot, de origine vegetală, cu activitate biologică, în special, toxică asupra altor organisme. Aceste substanțe manifestă activitate antimicrobiană semnificativă atât împotriva fungilor, cât și a

bacteriilor. În lista microorganismelor patogene, creșterea cărora este puternic inhibată de alcaloizi, sunt *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* ș.a. Alcaloizii sunt activi, de asemenea, și contra virusurilor. Astfel, yohimbina, vincamina, scopolamina, atropina, colchicina, alantoina, trigonelina, octopamina, sinefrina, și capsaicina manifestă proprietăți antivirale împotriva ADN-ului virusului *Herpes simplex tip 1* (HSV 1) și ARN-ului virusului *Parainfluenza tip 3* (PI-3).[173].

Compușii organici sulfurați prezenți în special în *Alliaceae* și *Brassicaceae* sunt cunoscuți ca produși antimicrobieni de performanță contra bacteriilor Gram-pozitive, Gram-negative și contra fungilor. Principalii compuși antimicrobieni în *Allium* și *Brassica* sunt, respectiv, alicina (S -alil-L-propen-tiosulfinatul) și metilmetanetiosulfinatul. Există numeroase rapoarte care arată eficiența mai înaltă a acestor substanțe ca agenți antimicrobieni, în comparație cu antibioticele tipice, dar și capacitatea lor de a manifesta sinergism când sunt aplicate împreună cu acestea din urmă. Plus la cele menționate mai sus, tiosulfinații și derivații acestora prezintă activitate promițătoare împotriva bacteriilor rezistente la antibiotice. Principalul mecanism de acțiune a derivaților tiosulfinați constă în reacția acestora cu grupurile tiol ale diferitor enzime și, deci, proprietățile antimicrobiene ale lor pot fi anihilate prin acțiunea cisteinei, coenzimei A și a glutationului [22, 38, 78].

Glucozinolații – un alt grup de metaboliți care conțin sulf – au fost depistați în 16 familii de angiosperme dicotiledonate, dintre care majoritatea sunt grupate în familiile *Brassicaceae* și *Capparaceae*. A fost demonstrat, că nu atât glucozinolații intacti, cât produsele hidrolizei lor prezintă acțiune antimicrobiană. Printre cei mai activi hidrolizați, capabili să inhibe eficient bacteriile patogene, se numără izotiocianatele; sulforafanul și benzil izotiocianatul [19]. Asupra unor anumite grupuri de microorganisme patogene (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* și *Staphylococcus aureus*) izotiocianatele au o acțiune antimicrobiană mult mai pronunțată comparativ cu compușii fenolici [202].

Un alt grup de compuși chimici de origine vegetală cu activitate antimicrobiană remarcabilă sunt *saponinele*. Diferiți compuși din acest grup, ca de exemplu acidul oleanolic, b-sitosterol 3-O-b-d-glucopiranozida, tigogenina posedă activitate antibacteriană atât asupra bacteriilor Gram-pozitive, cât și asupra celor Gram-negative. Este remarcabilă și activitatea lor antifungică contra candidelor, drojdiilor ce formează pelicule (*Debaryomyces hansenii*, *Pichia nakazawae*, *Zygosaccharomyces rouxii*), drojdiilor dermatofite (*Candida famata*, *Hansenula anomala*, *Pichia carsonii*) [180].

Terpenoidele / uleiuri esențiale din diferite surse vegetale, de asemenea, posedă activitate antimicrobiană înaltă împotriva multor bacterii și ciuperci patogene și nepatogene. De exemplu, curcumina și derivații săi, precum și fenilpropanoizii (din *Curcuma longa*), prezintă proprietăți antibacteriene împotriva *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Salmonella Typhimurium* [155, 180]. Cineolul, citralul, geraniolul și mentolul posedă activitate antimicrobiană atât contra bacteriilor, cât și a fungilor microorganisme patogene [238].

Din analiza expusă mai sus putem concluziona, că substanțele chimice de origine vegetală au un mare potențial în calitate de agenți antimicrobieni utili, care ar putea fi utilizați atât în scopuri profilactice, cât și în scopuri terapeutice în tratamentul maladiilor fungice, bacteriene și virale. Totodată, trebuie de menționat, că până în prezent au fost efectuate numeroase studii *in vitro* și *in vivo*, care confirmă efectele antimicrobiene asupra microflorei patogene și efectul neutru asupra microflorei benefice, îndeosebi asupra celei intestinale, dar sunt necesare cercetări suplimentare, care să confirme siguranța și eficacitatea fitochimicalelor în calitate de remedii terapeutice în terapiile convenționale. Un alt domeniu de interes major este cel al aplicării concomitente a preparatelor antimicrobiene uzuale și a compușilor cu efect antimicrobian de origine vegetală. În ultimii ani a fost demonstrată posibilitatea obținerii efectelor sinergice ale acestor două tipuri de preparate, care asigură succesul tratamentului maladiilor provocate de agenți microorganisme patogene. De exemplu, acidul 3,4-dihidroxifenilacetic și acidul 3-hidroxifenilacetic sporește susceptibilitatea *Salmonella enterica* față de novobiocină. Acidul malic, acidul sorbic și acidul benzoic măresc esențial permeabilitatea peretelui celular la speciile de salmonelă prin deteriorarea lipopolizaharidelor. Activitatea antibacteriană a cefiximei, cefotaximei, vancomicinei și tetracilinei crește simțitor în prezența curcuminei [131, 202, 204]. Datorită faptului că în ultimul timp preparatele fitoterapeutice cu diferite efecte, inclusiv antibacteriene, sunt utilizate tot mai intens, necesitând cercetări orientate spre elucidarea mecanismelor de interacțiune între acestea și medicamentele tradiționale. Astfel, cercetările orientate spre elaborarea noilor preparate de origine vegetală cu efecte antibacteriene trebuie să fie axate pe două direcții: depistarea substanțelor noi și studiul mecanismelor de acțiune și de interacțiune cu alte componente celulare și medicamente.

1.2.3. Compuși antimicrobieni de origine animală

Deși organismele pluricelulare au structuri și funcții diverse, ele se caracterizează prin trăsături comune în sistemele lor de apărare și de supraveghere împotriva microorganismelor patogene. Anterior se considera, că plantele posedă sisteme nonspecifice, iar animalele – sisteme

specifice de protecție contra microorganismelor patogene. Odată cu acumularea masivă de date noi, această concepție a fost revizuită, deoarece la plante au fost descoperite sisteme specifice de protecție, iar la animale imunitatea nonadaptivă (înnăscută) este dependentă de inductori nespecifici. Genele care codifică peptidele antimicrobiene (PAM) au fost stabilite în calitate de factori-cheie în sistemele de protecție atât la plante, cât și la animale. În ultimele decenii a fost descoperit un număr considerabil de peptide, fie inductibile, fie constitutive cu activitate împotriva diferitor tipuri de microorganisme, caracteristice practic pentru toate grupurile sistematice de animale. Aceste descoperiri au fost precedate de stabilirea rolului tioninelor la plante în calitate de exemplu de peptide antimicrobiene care asigură protecția gazdei de agenții microorganisme patogene [23, 239].

În prezent sunt cunoscute mii de structuri peptidice, care posedă un anumit tip de activitate antimicrobiană. În funcție de structura chimică peptidele antimicrobiene de origine animală sunt catalogate în două grupuri mari: *peptide cu structura liniară* și *peptide cu structura ciclică*. Peptidele liniare formează la rândul lor două subgrupuri distincte: (a) peptide liniare cu tendința de a adopta o conformație amfipatică α -elicoidală; (b) peptide liniare cu compoziție neobișnuită, bogate în aminoacizi precum Pro, Arg sau (ocasional) Trp. Al doilea grup, care cuprinde peptidele ce conțin cisteină, poate fi, de asemenea, împărțit în două subgrupuri: (a) cu o singură structură disulfidică și (b) cu multiple structuri disulfidice [23].

În prezent există o varietate de abordări de clasificare a peptidelor antimicrobiene. Sunt 7 criterii principale în baza cărora se realizează clasificarea acestor compuși valoroși: echipamentul biosintetic utilizat la sinteza lor, sursa biologică, funcțiile biologice, proprietățile fizico-chimice, paternul de legătură covalentă, structura 3D, țintele moleculare [134, 230, 231]. Sistemele de clasificare în baza acestor criterii sunt expuse pe o pagină specială a bazei de date a peptidelor antimicrobiene (aps.unmc.edu/AP/class.php). Această bază de date include 2610 peptide antimicrobiene (la data de 10.11.2015), dintre care cea mai mare parte – 1972 – sunt de origine animală [103-108].

Mecanismul clasic de acțiune al PAM implică capacitatea lor de a provoca deteriorarea membranei citoplasmatică, interacționând cu microorganismele prin intermediul forțelor electrostatice dintre reziduurile lor pozitive de aminoacizi și sarcinile negative expuse pe suprafețele celulelor bacteriene. A fost demonstrat, că compoziția suprafeței celulare generează specificitatea PAM [44, 88, 89].

Interacțiunea PAM cu celulele-țintă ale acestora depinde în mare măsură de componența aminoacidică, cel mai des fiind întâlnită conservarea conținutului sporit de aminoacizi cu sarcina pozitivă. În plus, structura secundară a PAM este esențială, deoarece în funcție de aceasta ele se

pot orienta perpendicular, permițând introducerea lor în bistratul lipidic și formarea de pori transmembranari ori inserarea în membrană formând un pachet din straturi, inducând pliarea multiplă a bistratului lipidic al membranei microbiene [88, 151]. Conform altor cercetări, PAM pot forma legături multiple cu componentele membranei celulare, acoperind-o asemenea unui covor. Atunci când masa PAM conectate la membrană atinge un prag critic are loc liza membranei și moartea celulei bacteriene [140, 201].

În același timp, interacțiunea PAM cu membrana celulară ori cu peretele celular nu este unicul mecanism de acțiune antimicrobiană a lor. Printre principalele obiective intracelulare de acțiune ale PAM sunt sistemele biosintetice. Pornind de la faptul că peretele celular bacterian conține elemente structurale netipice pentru celulele eucariote, procesul de inhibare a sintezei acestora devine un scop al designului PAM la etapa contemporană. Inhibarea procesului de biosinteză a peretelui celular bacterian poate fi obținut prin interacțiunea PAM cu precursorii sintezei peptidoglicanului (lipidul II, de exemplu). În baza acestui principiu acționează mai multe lantibiotice [237]. În paralel cu reorientarea precursorilor peptidoglicanului, lantibioticele pot forma pori transmembranari prin care are loc efluxul moleculelor și / sau ionilor - ATP, K⁺, și PO₄³⁻ [113]. Nisina, o peptidă antimicrobiană utilizată pe scară largă, formează legături cu lipidul II și apoi acționează prin formarea porilor prin care are loc pierderea consecutivă a aminoacizilor, K⁺ și ATP de către celulă [160, 237]. Un mecanism asemănător de acțiune are și o altă PAM bine studiată – mercacidina, care manifestă activitate antimicrobiană pronunțată contra *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA) [113].

Un alt grup de lantibiotice este format din familii a câte două peptide transcrise în mod independent, care acționează sinergic pentru a avea o activitate antimicrobiană optimă. Una dintre peptide se leagă cu lipidul II, iar alta formează porii transmembranari. Dintre acestea fac parte lacticina 3147, plantaricina W [88].

Unele PAM pot traversa membrana externă și cea citoplasmatică a bacteriilor și ataca acizii nucleici și proteinele. Buforina II, o peptidă cationică liniară compusă din 21 de aminoacizi, este un exemplu de PAM capabilă să traverseze membrana celulelor fără permeabilizarea acesteia, care se acumulează ulterior în citoplasmă. În procesul de pătrundere a PAM în citoplasmă este implicat în primul rând reziduul prolinic, iar odată pătrunsă în celulă, buforina se cuplează cu ADN și ARN [46, 233]. Buforina II mai are și o activitate antiendotoxinică, ceea ce asigură succesul în aplicarea acesteia. Capacitatea de a neutraliza efectele toxice ale endotoxinelor, prevenind șocul septic, a fost descrisă nu numai pentru buforină, ci și pentru astfel de PAM ca temporinele și catelicidinele [146, 158]. Capacitate de a inhiba sinteza ADN-ului posedă astfel de PAM ca indolicidina, care provoacă depolarizarea

membranei și blocarea sintezei acizilor nucleici, puroindolina interacționează cu acizii nucleici prin legarea grupărilor fosfatice ale lor, conducând la perturbarea proceselor de transcripție și translare [98, 222].

Un alt mecanism al acțiunii antimicrobiene a PAM este cel de inducere a apoptozei. Atunci când concentrația intracelulară de potasiu (K^+) este normală, are loc suprimarea cascadei caspazelor și inhibarea activității nucleazelor apoptotice. Efluxul de K^+ , creșterea concentrației de Ca^{2+} și acumularea de specii reactive de oxigen (ROS) activează cascada caspazelor. PAM ca magainina, tachiplesina, gomesina, protegrina și polifemusina II induc apoptoza celulelor canceroase [177, 211]. Acest efect este observat la concentrații scăzute ale peptidelor menționate. La concentrații ridicate, aceste peptide interacționează cu membrana și formează pori, conducând la moartea neprogramată a celulelor canceroase și bacteriene.

Defensinele sunt active față de *Candida albicans*. Acestea provoacă moartea celulelor fungice prin permeabilizarea membranei și inducerea de leziuni oxidative, cu producerea de specii reactive ale oxigenului și azotului. De asemenea, defensinele induc mai multe semnale pro-apoptotice, cum ar fi acumularea de SRO, externalizarea fosfatidilserinei și fragmentarea ADN-ului, care, în final, provoacă moartea celulelor [18, 150, 224].

Anumite PAM de origine animală prezintă activitate antimicrobiană considerabil mai mică și spectru antimicrobian incomplet, comparativ cu antibioticele, dar sunt tolerate mult mai bine decât acestea. Cercetările anterioare au arătat că, chiar dacă PAM nu pot fi utilizate independent, din cauza activității antimicrobiene scăzute, acestea pot fi administrate în sinergie cu antibioticele uzuale, ameliorând efectele tratamentului. În același timp, experiențele demonstrează natura extrem de activă a multor PAM *in vitro*, ceea ce sugerează că acestea ar putea fi eficiente în tratarea infecțiilor bacteriene *in vivo*, dar multe dintre ele urmează a fi tratate cu atenție, în special din cauza efectelor toxice pe care le prezintă [97].

1.3. Compuși antimicrobieni sintetici

Compușii sintetici cu efect antimicrobian sunt foarte des preferați de către cercetători datorită comodității în lucru cu aceștia. Printre principalele avantaje se numără omogenitatea și stabilitatea compușilor utilizați, posibilitatea dozării exacte, facilitatea în aprecierea proceselor de metabolizare, posibilitatea de obținere a cantităților necesare prin respectarea strictă a unor operațiuni tehnologice stabilite. O prioritate a compușilor sintetici mai constă și în posibilitatea dirijării structurii acestora, deci a proprietăților pe care aceste substanțe le manifestă și a efectelor biologice scontate. Cele menționate asigură un interes permanent față de acest domeniu, care există în paralel cu interesul față de produșii antimicrobieni naturali.

1.3.1. Polimeri sintetici cu acțiune antimicrobiană

Începând cu anii '80 ai secolului trecut, dezvoltarea chimiei compușilor macromoleculari a creat o bază pentru sinteza diferitor structuri polimerice și a identificat o diferență fundamentală între proprietățile lor și cele ale compușilor cu greutate moleculară mică, care să permită utilizarea eficientă a polimerilor în diverse domenii, inclusiv în crearea unor produși macromoleculari cu activitate antimicrobiană. Aplicarea metodelor contemporane de investigare a macromoleculilor, cum ar fi difuzia dinamică a luminii, microscopia atomică de forță, microscopia electronică de transmisie, microscopia de fluorescență etc., a contribuit la elucidarea mecanismelor de acțiune a polimerilor antimicrobieni și de interacțiune a lor cu celulele bacteriene și membranele fosfolipidice-model [221].

Principala strategie în proiectarea polimerilor sintetici antimicrobieni este determinată de caracteristicile structurale ale învelișurilor externe ale diferitor celule bacteriene. Caracteristica principală a suprafeței exterioare a învelișurilor bacteriene este sarcina negativă netă (adesea stabilizată prin prezența cationilor bivalenți, cum ar fi Mg^{2+} și Ca^{2+}). La baza designului majorității polimerilor antimicrobieni stă raportul caracteristicilor peretelui celular, membranei externe și membranei citoplasmatică, iar polimerii sunt concepuți ca sisteme cationice macromoleculare hidrofил- hidrofobe. Printre structurile polimerice elaborate se numără polimeri care conțin un bloc funcțional polar hidrofил având sarcină pozitivă și un bloc hidrofob nepolar, precum copolimeri aleatorii formați dintr-un monomer hidrofob și un comonomer hidrofил cu o grupare funcțională. O astfel de structură polimer / copolimerică asigură proprietăți tensioactive și capacitate de adsorbție / absorbție și afinitate mare față de celulele bacteriene, amplificate de gradul înalt de lipofilie, ceea ce asigură activitatea antimicrobiană ce se manifestă prin perturbarea integrității învelișurilor celulare [79, 221].

Sarea polielectrolitică cationică clorura de polihexametilen biguanidă (CPHB) a fost primul polimer antimicrobian pentru care a fost stabilit mecanismul de interacțiune cu *Escherichia coli* și membranele fosfolipidice (experiențe de modelare a membranelor bistratificate). A fost demonstrat că acest polimer provoacă formarea domeniilor din fosfolipide acide ale MC în vecinătatea sitului de adsorbție a polimerului, ceea ce afectează integritatea membranei citoplasmatică și a membranei externe la bacteriile Gram-negative. Gradul de dezintegrare a membranei crește proporțional cu creșterea lungimii polimerului. Interacțiunea polimerului cu membranele bacteriene decurge în mai multe etape: (1) atracția rapidă a CPHB spre suprafața celulei bacteriene încărcată negativ, cu adsorbția puternică și specifică a compușilor fosfatici; (2) integritatea membranei exterioare este afectată, iar CPHB este atrasă de membrana internă; (3) formarea legăturii dintre CPHB și fosfolipide, urmată de o creștere a

permeabilității membranei interioare, în special pentru ionii K^+ , care trec în exterior, și instalarea fenomenului de bacteriostazie; (4) pierderea completă a funcției membranei urmată de precipitarea constituenților intracelulari, ceea ce se manifestă ca un efect bactericid [84].

În anii '80 au fost sintetizați polielectroliți noi cationici, polimetacriilați, conținând grupuri biguanidice și clorură de amoniu polivinilbenzil, care posedă activitate antimicrobiană împotriva *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. Experiențele care au implicat atât cercetări pe culturile bacteriene, cât și pe sisteme de liposomi au arătat, că polimerii antimicrobieni care poartă sarcină pozitivă pe grupurile cuaternare de amoniu / fosfoniu deteriorează membrana externă / peretele celular și membrana citoplasmatică [119, 191, 232].

Există o clasă mare de polimeri și copolimeri cu proprietăți biocide – compuși ciclici-N-halaminici, în care unul sau mai mulți atomi de halogen sunt legați covalent cu atomii de azot ai compușilor care furnizează stabilitate și eliberează lent specii active de halogen în mediu. Principalul impact biocid al N-halaminelor se referă la o acțiune specifică a halogenilor oxidați (Cl^+ sau Br^+) asupra unor receptori biologici (grupările tiol sau amino în proteine) [119, 121, 126].

Una dintre căile de sporire a eficienței sistemelor polimerice antimicrobiene și de reducere a toxicității lor este atașarea substraturilor bioactive la molecula biopolimerului. De exemplu, poliacrilamida modificată prin introducerea unei grupări amino în catena laterală a polimerului este funcționalizată cu aldehide aromatice conținând grupe active, sau derivați ai esterilor fenolici [119]. Numeroase studii asupra mecanismelor de interacțiune între polielectroliții cationici liniari și membrane arată că are loc formarea complexilor de interfață între membrană și policationi, care sunt stabiliți prin contacte ionice multiple ale grupurilor de amoniu cu grupări ce posedă sarcină negativă de pe moleculele de lipide și proteine membranare, translocarea moleculelor lipidice cu sarcină negativă din interior spre exteriorul membranei (efectul „flip-flop”) și segregarea laterală a lipidelor cu sarcină [221].

În ultimul timp crește tot mai mult interesul față de imitațiile sintetice ale peptidelor antimicrobiene [218]. O strategie în dezvoltarea imitațiilor sintetice PAM cu proprietăți selective este de a proiecta polimeri și oligomeri care au conformație amfifilică, în care catenele cationice hidrofile și hidrofobe segregă în regiuni distincte opuse sau pe suprafețe diferite, ceea ce este important pentru pătrunderea compușilor sintetizați în membrana citoplasmatică și dezorganizarea ei [79]. Activitatea antimicrobiană și selectivitatea PAM sintetice este influențată de densitatea sarcinilor în molecule și poate fi modificată prin adăugarea mai multor grupări cationice la molecula monomerului [137].

Polimerii sintetici cu acțiune antimicrobiană au găsit o largă utilizare în diferite domenii. Unul dintre cele mai importante domenii este controlul infecției în clinici, spitale, industria alimentară ș.a. Polimerii hidrosolubili cationici cu amoniu, guanidinele polimerice și biguanidele se utilizează ca dezinfectanți. În comparație cu dezinfectanții cu greutate moleculară mică, formele sintetice ale PAM sunt caracterizate de o eficacitate mai mare și toxicitate redusă. Multe dintre ele nu produc iritări cutanate, nu au potențial mutagen și cancerigen [84]. Totodată, acestea se caracterizează și prin anumite dezavantaje, cum sunt eficacitatea limitată împotriva bacteriilor Gram-negative și drojdiilor, și absența activității față de spori, precum și scăderea accentuată a eficacității în prezența materialelor organice, în special, a sângelui, și incompatibilitatea cu săpunul din cauza alcalinității, care limitează serios utilizarea lor. De aceea, mai frecvent PAM sintetice sunt folosite pentru dezinfectarea suprafețelor non-critice, cum ar fi pardoselile, pereții și suprafețele echipamentelor în spitale, locuri publice, de regulă, în combinație cu detergenți compatibili. Profilul excelent al toxicității biguanidelor și guanidinelor polimerice, lipsa efectului de iritare a pielii și toleranța față de ele la administrarea orală permit utilizarea lor pe scară largă, în special în aplicații clinice, cum ar fi tratamentul în caz de infecții cu *Acanthamoeba keratitis* [221].

Polimerii care conțin grupările funcționale N-halaminice, inclusiv derivați N-halaminici heterociclici ca oxazolidinonele, imidazolidinonele, hidantoina și aminele spirociclice, au demonstrat pe termen lung stabilitate și spectru larg al activității antimicrobiene, inclusiv față de ciști și spori [119]. Acești compuși se aplică la sterilizarea suprafețelor medicale, dentare și industriale, precum și a materialelor textile, hârtiei, filtrelor de apă, silicagelului ș.a. Polimerii hidrosolubili antimicrobieni cu grupări funcționale active sunt de perspectivă pentru tratarea apei reziduale, astfel fiind posibilă excluderea clorului și reducerea esențială a toxicității deversărilor. Un alt domeniu de utilizare este acoperirea suprafețelor dispozitivelor medicale care eliberează agenți antimicrobieni, cum ar fi antibioticele, ionii de argint, anticorpii și oxidul de azot [126]. În calitate de materiale de acoperire polimerii antibacterieni sunt deosebit de importanți din cauza riscului ridicat de infecții legate în special de catetere urinare, dispozitive cardiovasculare și endoproteze [76].

În prezent există cerere pentru noi materiale dezinfectante macromoleculare non-toxice cu spectru larg de activitate antimicrobiană, inclusiv împotriva *Mycobacterium tuberculosis*, care ar putea preveni contaminarea microbiană în spitale și în locurile publice. În ultimii ani au fost create noi structuri polimerice moderat hidrofobe ce conțin grupări protonate aminice primare sau secundare / terțiare, care au prezentat activitate antimicrobiană destul de înaltă. Odată cu schimbarea echilibrului hidrofil hidrofoab în linia de compuși hidrofilii se reduce semnificativ

toxicitatea polimerilor non-cuaternari, în timp ce crește selectivitatea lor. Astfel, datorită progresului în domeniul tehnicilor biofizice moderne vor fi obținute cunoștințe noi de perspectivă pentru înțelegerea perfectă a mecanismelor de acțiune antimicrobiană a compușilor polimerici sintetici. Activitatea de cercetare este concentrată, de asemenea, asupra studiilor de citotoxicitate asupra celulelor umane pentru a atinge un nivel acceptabil de selectivitate și biocompatibilitate a polimerilor sintetici, care trebuie să fie siguri pentru mediu și sănătatea umană.

1.3.2. Compușii coordinativi ai metalelor în calitate de agenți antimicrobieni

Domeniul chimiei bioinorganice, care se ocupă de studiul rolului complexilor metalici în sisteme biologice, a deschis un nou orizont de cercetare științifică în domeniul compușilor coordinativi. Un număr mare de compuși au o importanță majoră din punct de vedere biologic. Unele metale sunt esențiale pentru funcțiile biologice și sunt parte componentă a enzimelor și cofactorilor necesari pentru realizarea diverselor procese. De exemplu, hemoglobina în eritrocite conține fier în structura complexului porfirinic, care este folosit pentru transportul și depozitarea oxigenului în organism. Clorofila în plantele verzi, care este responsabilă pentru procesul de fotosinteză, conține în componența complexului porfirinic magneziu. Cobaltul se găsește în componența cianocobalaminei, care este esențială pentru transferul de grupe alchil de la o moleculă la alta în sistemele biologice. Metalele cupru, zinc, fier și mangan sunt încorporate în proteine catalitice (metaloenzime), care facilitează o multitudine de reacții chimice esențiale pentru viață. Ionii metalici joacă un rol-cheie în organizarea structurală și activarea anumitor enzime, care sunt implicate în transferul de informație genetică. Complecșii metalelor de tranziție atrag atenția datorită posibilității extinderii aplicării lor în domeniul materialelor și științelor biologice. Mulți dintre aceștia manifestă activitate biologică pronunțată. Astfel, sunt cunoscuți compuși, care influențează pozitiv procesul de acumulare a biomasei microbiene, precum și de sinteză a unor componente valoroase ale biomasei, așa cum ar fi proteinele, glucidele, pigmentii, lipidele esențiale ș.a. [7, 13-15]. În același timp, sunt grupuri mari de compuși coordinativi cu potențial toxic, printre care se numără și substanțe cu efect antimicrobian.

Activitatea farmacologică a compușilor metalici depinde de ionul de metal, liganzii săi și structura integrală a compușilor. Factorii numiți sunt responsabili pentru aceea, ca, complecșii metalici să ajungă la site-ul-țintă corespunzător în organism. Este cunoscut faptul că anumiți ioni metalici pătrund în celulele bacteriene și inactivează enzimele lor. Unii ioni metalici pot genera formarea peroxizilor și provoca moartea bacteriilor. Complecșii metalici relevanți din punctul de

vedere al activității biologice trebuie să fie sintetizați în conformitate cu anumite cerințe față de designul lor. Astfel, complexul metalic biologic activ trebuie să posede stabilitate termodinamică înaltă pentru a asigura atingerea site-ului activ. Legătura dintre ligand și metal trebuie să fie hidrolitic stabilă. Cinetica reacțiilor de formare și rupere a legăturii dintre metal și ligand, precum și greutatea moleculară a complexului metalic sunt, de asemenea, foarte importante. Compușii cu greutate moleculară mică, cu sarcina neutră și solubili în apă pot penetra practic orice mediu și sunt achiziționați de celule prin mecanismul difuziunii pasive [196].

În ceea ce privește strategia elaborării noilor preparate antimicrobiene, combinarea preparatelor antibiotice tradiționale cu preparate de alt gen, inclusiv compuși coordinativi este considerată o cale, care poate asigura rezultate valoroase. Succesul în acest domeniu este asigurat de creșterea activității și lărgirea spectrului de acțiune prin utilizarea în comun a compușilor cu activitate sinergică sau cumulativă; de contracararea rezistenței la anumite medicamente; de scăderea dozelor necesare pentru tratament, reducând atât costurile, cât și efectele secundare toxice.

A fost demonstrat, că eficacitatea diversilor agenți terapeutici poate fi îmbunătățită la coordonarea lor cu ioni metalici adecvați. Activitatea farmacologică a complexilor metalici este dependentă de natura ionilor metalici și a liganzilor, deoarece diferite metale și liganzi prezintă diferite proprietăți biologice. De asemenea, a fost demonstrat, că acțiunea antimicrobiană a complexilor metalici depinde mai mult de centrul metalic decât pe geometria din jurul lui. La moment există o cerere reală pentru noi compuși cu activitate antimicrobiană, pentru că aceștia ar putea fi mai eficienți, acționând printr-un mecanism diferit de cele cunoscute, pentru care mulți agenți microorganisme patogene clinic relevanți au dezvoltat rezistență.

Studiul compușilor coordinativi este în centrul atenției cercetătorilor, în special în ultimele două decenii. Majoritatea comunicărilor din literatura de specialitate se referă la sinteza, studiul structurii chimice și comportamentul acestor compuși în sistemele biologice. Diverse cercetări realizate *in vivo* au arătat că compuși biologic activi cu proprietăți bacteriostatice și carcinostatice își potențează evident acțiunea în cazul chelării lor [20, 64, 91, 92]. De exemplu, în cazul compușilor coordinativi ai Mn(II), Co(II), Ni(II) și Cu(II) cu glicina și fenilalanina a fost demonstrat, că acțiunea lor antibacteriană față de bacteriile Gram-negative *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* și Gram-pozitive *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, MRSA și fungii *Candida albicans* crește odată cu mărirea numărului de inele de chelare, iar autorii explică acest fapt prin amplificarea proprietăților lipofilice ale compușilor [20, 92]. Compușii coordinativi ai Co(II) și Cu(II) cu aminoacizii (valina, lizina, fenilalanina, leucina, metionina) posedă activitate antimicrobiană diferită împotriva a trei tulpini de bacterii (*Escherichia coli*,

Bacillus cereus, *Micrococcus luteus*). Toți compușii posedă activitate pronunțată contra *Micrococcus luteus*, iar contra *Escherichia coli*, care este cunoscută ca specie multirezistentă la medicamente, acțiune a manifestat doar compusul coordinativ al Cu(II) cu fenilalanina. Complexele cu leucină și histidină sunt mai active decât liganzii liberi. Activitatea medie a fost înregistrată în cazul complexelor cu metionină și fenilalanină. Rezultatele cercetătorilor români susțin afirmația că cobaltul și cuprul în complexe cu aminoacizii au o activitate antibacteriană pronunțată și sugerează aplicarea lor potențială ca agenți antibacterieni [91, 92, 213].

Compușii Zn (II), Ni(II) și Cu(II) cu ftaloilglicina și ftaloiltirozina (derivați ai glicinei și tirozinei) manifestă activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*. Nivelul de activitate în cazul compușilor coordinativi este mult mai înalt decât cel al liganzilor numiți care sunt în prezent utilizați ca agenți antimicrobieni [92, 217].

Aroil hidrazonele și compușii lor coordinativi sunt cunoscuți pentru proprietățile lor biologice bazate în special pe capacitatea de a inhiba multe reacții enzimatice în celulă. Compușii coordinativi ce conțin radicali ai hidrazonei și bazelor Schiff sunt cunoscuți prin activitate fungică, antibacteriană, antimicobacteriană, antitumorală, antiinflamatoare, anti-HIV, leishmanicidală, tripanocidală, de inhibare a factorului letal al antraxului, antimalariaică ș.a. [127, 128, 235]. Compușii coordinativi ai zincului (II) cu bazele Schiff s-au manifestat ca agenți antimicrobieni activi contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*, iar intensitatea efectului acestor compuși este mult mai înaltă decât în cazul liganzilor utilizați [157].

Compușii noi ai N(4)-alil-3-tiosemicarbazonei 5-nitrofuran-2-carbaldehidei (HL) cu cuprul (II) și nichelul (II) posedă activitate antimicrobiană și antifungică, iar compușii HL și $\text{Cu(HL)}_2(\text{NO}_3)_2$ inhibă creșterea și multiplicarea celulelor leucemiei mieloide umane HL-60. S-a stabilit că compușii coordinativi manifestă o activitate antimicrobiană mai bună decât ligandul față de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (GISK 8035), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella abony* (GISK 03/03) și *Candida albicans* [85].

Compușii cuprului (II), nichelului (II) și cobaltului (II) cu ligandul monodentat 2-(fenil substituit)-1H-benzo[d]imidazol *in vitro* au manifestat activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* și tulpinile fungice *Candida albicans*, *Aspergillus niger* și *Aspergillus clavatus*. Rezultatele au arătat că proprietățile antimicrobiene ale complexelor benzimidazolice cu metalele au fost mai pronunțate decât cele ale liganzilor corespunzători [147]. O serie de compuși coordinativi noi ai Cu (II), Ni (II), Co (II) și Cd (II) cu 3-benzil-1H-4 - [(2- methoxybenzylidene) amino] -1, 2,4-

triazol-5-tiona (TMB) și cu 3-benzil-1H-4 - [(4-chlorobenzylidene) amino] -1,2,4-triazol-5-tiona (CBT); 3-benzil-1H-4-[(4-nitrobenzylidene)amino]-1,2,4-triazol-5-tiona (NBT) au arătat activitate antibacteriană împotriva *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* și *Serratia marcescens* și activitate antifungică față de *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium oxysporum*, *Scopulariopsis brevicaulis* și *Aspergillus flavus* [66].

Un alt domeniu de cercetare este formularea compușilor coordinativi ai metalelor cu antibioticele clasice. Un studiu recent a arătat, că complexii Co(II) și Zn(II) cu formulele respective $\text{Co}(\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2\text{MoO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Zn}(\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ cu ampicilină au demonstrat activitatea lor contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Chrysosporium pannicale*, *Alternaria solani*, *Candida albicans* [93]. Același tip de analiză a fost realizat și pentru compușii complecși ai Co (II) și Cu (II) cu formulele respective $\text{Co}(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Cu}(\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8)\text{MoO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ cu antibioticul tetraciclină. Și în acest caz compușii obținuți prin complexarea tetraciclinei s-au dovedit a fi mai activi ca substanța antibiotică originală [94].

Recent, o atenție deosebită se acordă sintezei complexilor metalici de tranziție cu baze Schiff datorită proprietăților biologice pe care le prezintă. Mulți compuși derivați din baze Schiff posedă acțiune antibacteriană, antifungică, antitumorală și antivirală, inclusiv anti-HIV. Totodată datorită capacității înalte de chelare și potențialului redox Cu^{2+} pozitiv, ionul de cupru este biologic activ și participă în multe procese din organism. Complecșii de cupru sunt printre cele mai puternice substanțe antimicrobiene, antivirale, antitumorale și cu efect antiinflamator. Pornind de la cele menționate mai sus, există numeroase relatări despre activitatea biologică înaltă a noilor compuși complecși, sintetizați cu utilizarea cuprului ca atom central și a diferitor tipuri de baze Schiff în calitate de liganzi. Pentru un număr mare de astfel de compuși a fost înregistrată o activitate antimicrobiană mai înaltă, comparativ cu cea a ligandului separat. Majoritatea testelor menționate au fost realizate *in vitro* cu utilizarea tulpinilor standard, ca de exemplu *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Candida albicans* [1-6, 91, 92, 174, 199, 200]. Compușii cuprului cu tiosemicarbazonele au demonstrat o activitate antimicrobiană înaltă față de un număr impunător de culturi-test bacteriene, printre care se numără și *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus faecalis*, dar și tulpinile menționate anterior [8–10, 90]. Printre compușii coordinativi ai cuprului cu tiosemicarbazonele au fost depistați reprezentanți foarte activi față de anumite microorganisme deosebit de relevante

clinic. Astfel, compusul di(m-s)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazono(1-)]cupru} se manifestă ca inhibitor pentru *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 în concentrație extrem de mică – 0,56 ng/ml, și ca bactericid față de același tulpină în concentrație de 0,18 ng/ml [10].

1.4. Concluzii la capitolul 1

Din cele expuse mai sus a fost dedusă **problema de cercetare** înaintată spre rezolvare în cadrul acestui studiu de doctorat, și anume: evidențierea noilor compuși chimici din produse autohtone cu proprietăți antimicrobiene și stabilirea domeniilor lor de acțiune.

Direcțiile de rezolvare a problemei de cercetare au constat în: testarea unor serii de compuși chimici cu diferită structură și selectarea compușilor cu efect maximal antimicrobian; compararea activității compușilor selectați cu activitatea antibioticelor de referință; studierea modificărilor induse de compuşii selectați în celulele microorganismelor patogene.

Scopul lucrării: evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor chimici noi și elucidarea mecanismelor de acțiune ale acestora.

Obiectivele lucrării: evidențierea acțiunii antimicrobiene a compușilor coordonativi ai cuprului (II) cu diferiți liganzi asupra tulpinilor de referință ale microorganismelor patogene; determinarea acțiunii antimicrobiene a propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian asupra tulpinilor de referință ale microorganismelor patogene; compararea acțiunii compușilor chimici noi cu cea a antisepticului de referință; evaluarea particularităților de acțiune antimicrobiană a compușilor chimici noi asupra tulpinilor izolate din coproculturi; stabilirea mecanismelor de influență a compușilor chimici noi evidențiați asupra microorganismelor patogene.

În urma studiului bibliografic realizat au fost trase următoarele concluzii:

1. Creșterea exacerbată a numărului de tulpini de microorganisme patogene multirezistente la antibioticele utilizate în prezent în practica clinică, determinată de folosirea nediscriminatorie a terapiilor medicamentoase și de abandonul tratamentului în principal din cauza efectelor secundare ale acestuia, dictează necesitatea unei resetări urgente a arsenalului de agenți antimicrobieni activi.
2. Utilizarea medicamentelor derivate din surse sintetice cu efecte antimicrobiene are loc în paralel cu utilizarea produselor naturale în managementul terapeutic împotriva bolilor cauzate de microorganisme. Produsele sintetice apărute recent au o eficiență mai înaltă, pot fi studiate prin metode și scheme simple, procesul de metabolizare a lor în organism și

mecanismele de acțiune a acestora asupra agenților microorganisme patogene poate fi urmărit cu exactitate.

3. Compușii chimici cu efecte antimicrobiene se caracterizează prin structură și proprietăți diverse, iar prezența metalelor cu valență variabilă în componența lor este una dintre condițiile realizării efectului antimicrobial *in vitro* și *in vivo*.
4. Datorită capacității înalte de chelare și potențialului redox pozitiv, ionul de cupru (Cu^{2+}) este biologic activ și participă în multe procese din organism. Complecșii de cupru sunt printre cele mai puternice substanțe antimicrobiene, antivirale, antitumorale și cu efect antiinflamator.

2. CARACTERISTICA OBIECTELOR DE STUDIU ȘI METODELOR APLICATE ÎN CERCETARE

Studiile rezumate în prezenta lucrare au fost realizate pe parcursul anilor 2009-2015 la Catedra de microbiologie, virusologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și în laboratorul microbiologic al Centrului de Epidemiologie a Bolilor Extrem de Contagioase și Securitate Biologică a Centrului Național de Sănătate Publică.

2.1. Obiectele de studiu

În calitate de obiect de studiu „*in vitro*” au fost incluse tulpinile de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™), *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* (Levine) Weldin (ATCC® 25931™) și *Salmonella enterica subsp. enterica serovar abony* (denumirea anterioară *Salmonella Abony* ГИСК 03/03y); de asemenea, au fost utilizate și tulpini izolate din coprocultură care se referă la speciile *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*.

În calitate de substanțe cu efecte antimicrobiene au fost testați compușii coordinați ai Cu (II); Co(II), Zn(II) și propenone aromatice sintetizați la Catedra de chimie anorganică (Universitatea de Stat din Moldova). În calitate de precursori de sinteză, care au fost testați pentru stabilirea proprietăților antimicrobiene, au fost utilizați reactivii de puritate înaltă Sigma-Aldrich.

2.1.1. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™)

În conformitate cu pașaportul tulpina de referință este destinată pentru numeroase aplicații, printre care se numără testul CAMP, evaluarea agarului Mueller-Hinton, testarea produselor lactate, testarea mediilor nutritive, în calitate de material de referință, testarea sensibilității la antibiotice și alte substanțe, controlul produselor Abbott, API și Autobac ș.a.

Cultura de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™) este prezentată prin coci Gram-pozitivi cu diametrul de 0,5-1,5μm, dispuși în conglomerate iregulate, imobili, aerobi, facultativi anaerobi, catalazo-pozitivi, nesporulați, de regulă necapsulați, mezofili (se dezvoltă între 10-42°C), cu dezvoltare optimă la 37°C. Acești coci cresc pe medii uzuale pe care formează colonii rotunde, convexe, pigmentate galben auriu, care pe geloză sânge produc o hemoliză completă. De asemenea, cocii sunt capabili să crească pe medii suplimentate cu 10% NaCl.

Tulpina de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* elaborează coagulaza liberă (marker de virulență), care în urma reacției cu factorul globulinic din plasmă formează stafilotrombina și

care la rândul ei catalizează conversia fibrinogenului în fibrină insolubilă. De asemenea produce fibrinolizina care este un factor de difuziune a infecției în țesuturi. Este dezoxiribonucleazopozitivă. Enzima respectivă hidrolizează ADN-ul și este un factor de difuziune. Are, de asemenea, valoare de diagnostic. Tulpina este catalazo-pozitivă, produce lipaze cu rol în hidroliza lipidelor, fapt esențial în supraviețuirea stafilococului la nivelul glandelor sebacee. Este beta-hemolitică, fiind toxică pentru eritrocite și alte tipuri de celule, și capabilă de a induce degradarea sfingomielinei.

2.1.2. *Bacillus cereus* ГИСК 8035

Tulpina *Bacillus cereus* 8035 provine din Colecția de Stat a Microorganismelor Patogene a Institutului de Stat de cercetări științifice în domeniul standardizării și controlului preparatelor medicale biologice „L.A. Tarasevici”. În conformitate cu pașaportul tulpinii, aceasta este destinată pentru testarea mediilor nutritive, în calitate de material de referință, testarea sensibilității la antibiotice și alte substanțe ș.a.

Tulpina *Bacillus cereus* 8035 este prezentată prin bastonașe Gram-pozitive, în formă de tijă, ce formează endospori, facultativ aerobi. Dimensiunile celulelor sunt de 1 x 3-4 micrometri. *Bacillus cereus* 8035 este o bacterie mezofilă, ce crește la temperatura optimă cuprinsă între 20°C și 40°C, fiind capabilă de a se adapta la o gamă largă de condiții ale mediului. Pe medii nutritive la 24 de ore după inoculare și menținere a temperaturii de 37°C formează colonii tip R, rigide, opace, cu diametrul de 0,3 cm. Testul catalazei și lecitinazei are valoare pozitivă. Crește pe mediu cu 6,5% NaCl.

2.1.3. *Escherichia coli* ATCC 25922

În conformitate cu pașaportul tulpinii, aceasta este destinată pentru numeroase aplicații, printre care se numără testul CAMP, evaluarea agarului Mueller-Hinton, testarea mediilor nutritive, în calitate de material de referință, testarea sensibilității la antibiotice și alte substanțe, controlul produselor Abbott, API, Autobac, BBL, bioMerieux Vitek, Biosynth, Difco, IDS, Micro-Media, MicroScan[®], Roche Diagnostics.

Cultura este prezentată de bastonașe Gram-negative, drepte sau ușor încurbate cu dimensiuni cuprinse între 1-3μm lungime, cu capetele rotunjite, nesporulate, necapsulate. Sunt germeni facultativ anaerobi, nepretențioși nutritivi. Se dezvoltă atât pe mediile uzuale, cât și pe mediile selective lactozate pe care formează colonii lactozo-pozitive. Coloniile sunt de tip S, pe mediul de cultură Endo formează colonii S-formă, lactozo-pozitive, roșii cu luciu metalic, umede, cremoase, bombate, cu diametrul de 0,2 cm peste 24 de ore de la inoculare și la

menținere în termostat la 37°C. Fermentează lactoza (colonii colorate pe medii DD de izolare), glucoza cu formare de acid și gaz, produce indol, nu lichefiază gelatina, nu produce H₂S, nu folosește citratul ca unică sursă de carbon, dar folosește acetatul.

2.1.4. *Shigella sonnei* (Levine) Weldin (ATCC®25931™)

În conformitate cu pașaportul tulpinii, aceasta este destinată pentru testarea mediilor, controlul calității tulpinilor, controlul de calitate pentru produsele bioMérieux Vitek și Difco, studiul infecțiilor emergente, controlul calității produselor alimentare. Se caracterizează prin reacții biochimice β-D-galactozidaza pozitive și prezența ornitin-decarboxilazei.

Cultura este prezentată prin bastonașe Gram-negative, imobile, nesporulate oxidazo-negative, catalazo-pozitive, manito-pozitive, fermentează glucoza fără producere de gaz, poate fermenta tardiv lactoza, indol-pozitive. Nu fermentează salicina, adonita și inozita. Nu pot utiliza citratul și malonatul ca unica sursă de carbon. Nu scindează ureea, nu lichefiază gelatina, nu produc hidrogen sulfurat, lizindecarbozilazo-negative, nu produc acetilmetilcarbinol. Sunt aerobi cu capacitate de a se dezvolta în condiții facultativ anaerobe, se dezvoltă pe medii slab selective și moderat selective. Pe medii simple produc colonii de tip S, rotunde, bombate, transparente, umede și lactozo-negative, cu diametrul de 0,2 cm la 24 de ore după inoculare și menținere în termostat la 37°C.

2.1.5. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony (denumirea anterioară *Salmonella abony* ГИСК 03/03y)

Tulpina provine din Colecția de Stat a Microorganismelor Patogene a Institutului de Stat de cercetări științifice în domeniul standardizării și controlului preparatelor medicale biologice „L.A. Tarasevici”. Este o cultură de referință în controlul microbiologic al produselor non-sterile, în studiul infecțiilor emergente intestinale.

Cultura este prezentată prin bastonașe Gram-negative, flagelate, aerobe. Pe SS-agar formează colonii S cu centru negru, margini transparente, umede, cremoase, cu diametrul de 0,2 cm, care se formează peste 24 de ore de la inoculare la menținerea culturii în condiții de termostat la 37°C.

2.1.6. Tulpini izolate din coprocultură

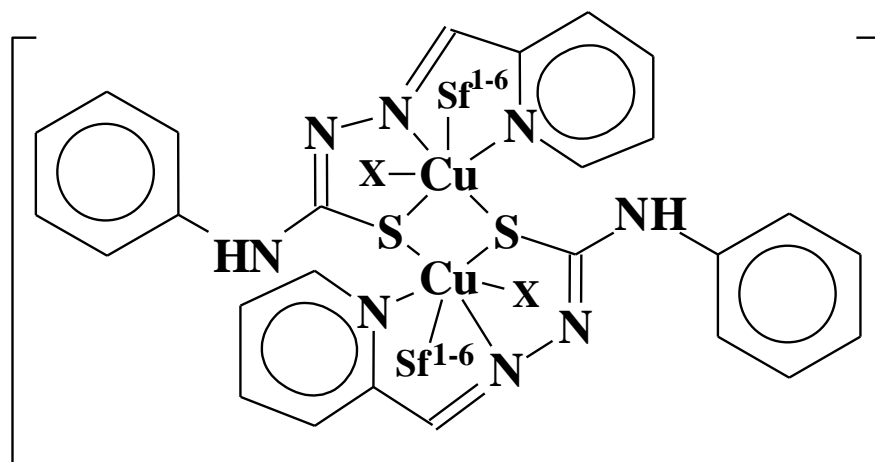
În această lucrare sunt prezentate rezultatele obținute pentru două culturi izolate din masele fecale ale bolnavilor – *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. Pentru fiecare specie patogenă au fost luate în lucru câte 30 de tulpini izolate clinic. Testările efectuate au avut drept scop de a

verificarea activității biologice a unor noi compuși chimici, care s-au manifestat pozitiv pe tulpinile respective de referință.

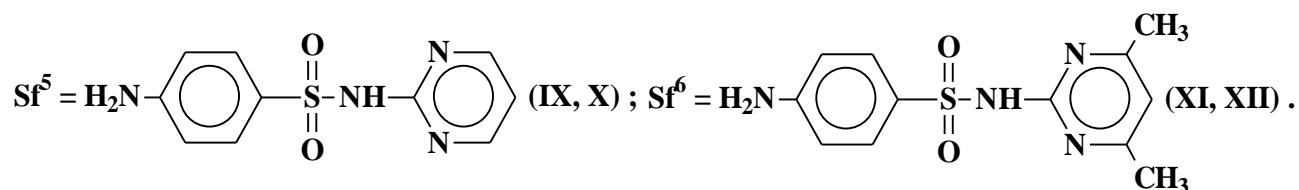
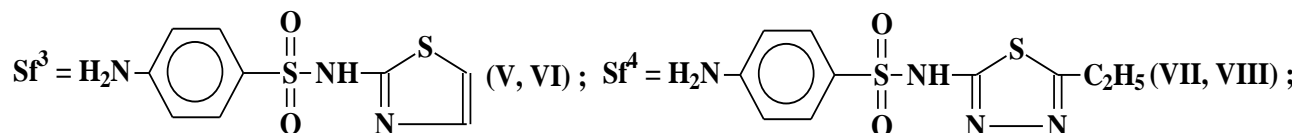
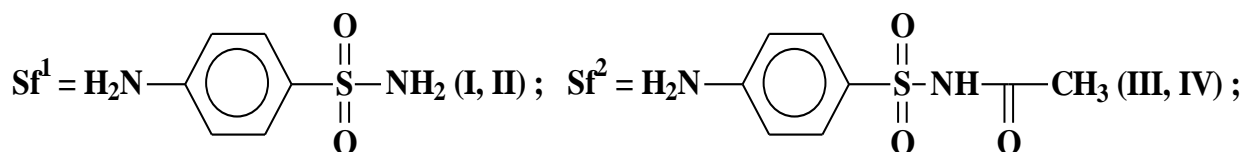
2.1.7. Compuși coordinativi

Compușii chimici utilizați pentru realizarea acestei lucrări au fost sintetizați la Catedra de chimie anorganică, Universitatea de Stat din Moldova. În total au fost testați 220 de compuși coordinativi ai cuprului (II), cobaltului (II), zincului (II), nichelului (II) și propenone aromatice. Din numărul total de compuși testați în lucrare au fost trecuți doar 37, care au manifestat activitate biologică pronunțată. În funcție de compoziție, compușii au fost repartizați în patru grupuri, pentru a facilita analiza rezultatelor obținute.

Din primul grup fac parte noii compuși coordinativi ai cuprului(II) care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide cu formula generală:



unde : X = Cl (I, III, V, VII, IX, XI), NO₃ (II, IV, VI, VIII, X, XII);

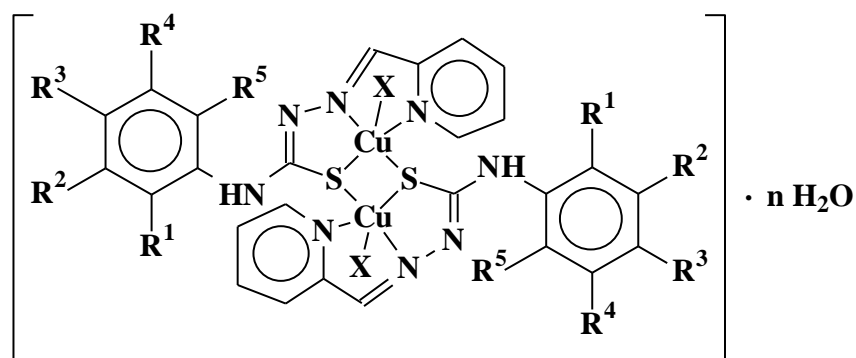


Denumirile, formulele și conținutul de Cu(II) pentru acești compuși sunt prezentate în Tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Denumirea, formula și conținutul de Cu(II) în compușii cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide [5, 12]

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută	Conținutul de Cu, %
1	Di(μ -S)-bis{(4-aminobenzen-sulfamid)-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru }	$C_{38}H_{38}Cl_2Cu_2N_{12}O_4S_4$	12,16
2	Di(μ -S)-bis{(4-aminobenzen-sulfamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru }	$C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$	11,57
3	Di(μ -S)-bis{(4-aminobenzen-sulfacetamid)-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru }	$C_{42}H_{42}Cl_2Cu_2N_{12}O_6S_4$	11,26
4	Di(μ -S)-bis{(4-aminobenzen-sulfacetamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru }	$C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$	10,76
5	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)tiazol]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1)]cupru }	$C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$	10,50
6	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)tiazol]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1)]cupru }	$C_{44}H_{40}Cu_2N_{16}O_{10}S_6$	10,06
7	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-5-etil-1,3,4-tiazol]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru }	$C_{46}H_{46}Cl_2Cu_2N_{16}O_4S_6$	10,02
8	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-5-etil-1,3,4-tiazol]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru }	$C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$	9,62
9	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru }	$C_{46}H_{42}Cl_2Cu_2N_{16}O_4S_4$	10,59
10	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)] cupru }	$C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$	10,14
11	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)- 4,6-dimetilpirimidin]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru }	$C_{50}H_{50}Cl_2Cu_2N_{16}O_4S_4$	10,12
12	Di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)- 4,6-dimetilpirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru }	$C_{50}H_{50}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$	9,71

Din cel de-al doilea grup fac parte compușii coordinativi ai cuprului cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazone 2-formilpiridinei cu formula:



I : $R^1 = R^5 = \text{CH}_3$; $R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$; $X = \text{Cl}$; $n = 4$.

II : $R^1 = R^5 = \text{CH}_3$; $R^2 = R^3 = R^4 = \text{H}$; $X = \text{NO}_3$; $n = 4$.

III : $R^1 = R^4 = \text{CH}_3$; $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$; $X = \text{Cl}$; $n = 2$.

IV : $R^1 = R^4 = \text{CH}_3$; $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$; $X = \text{NO}_3$; $n = 4$.

V : $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$; $R^1 = R^4 = R^5 = \text{H}$; $X = \text{NO}_3$; $n = 4$.

VI : $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$; $R^2 = R^4 = R^5 = \text{H}$; $X = \text{NO}_3$; $n = 4$.

Denumirea, formula și conținutul de Cu(II) al acestor compuși sunt prezentate în Tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Denumirea, formula și conținutul de Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazone 2-formilpiridinei [4, 8, 93]

Compu-sul	Denumirea chimică	Formula brută	Conținutul de Cu, %
13	Di(μ -S)-bis{ cloro-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru } tetrahidrat	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{ClCuN}_4\text{O}_2\text{S}$	15,29
14	Di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru } tetrahidrat	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	14,38
15	Di(μ -S)-bis{ cloro-[2-picoliden-4-(2,5-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru } dihidrat	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClCuN}_4\text{OS}$	15,98
16	Di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(2,5-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru } tetrahidrat	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	14,38
17	Di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru } tetrahidrat	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	14,38
18	Di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru } tetrahidrat	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	14,38

Au mai fost utilizați compuși coordinativi ai cuprului, zincului și cobaltului cu n-piridin-2-iltiosemicarbazona 2 piridincarboxialdehidă și derivații ei, care nu formează un grup structural separat, dar care au dat rezultate pozitive în calitate de inhibitori de creștere ai microorganismelor patogene. Acești compuși au format cel de-al treilea grup și sunt trecuți în Tabelul 2.3.

Tabelul 2.3. Denumirea, formula și conținutul de metal în componența compușilor coordinativi ai cuprului, zincului și cobaltului cu n-piridin-2-iltiosemicarbazona 2 piridincarboxialdehidă și derivații ei [2, 3, 9]

Compu-sul	Denumirea chimică	Formula brută	Conținutul de metal, %
19	Di(μ -S)-bis{ cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru }	$C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$	20,75
20	Cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotioamido]cupru	$C_9H_{11}ClCuN_4S$	20,61
21	[(2-Carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru	$C_{10}H_{13}CuN_5O_4S_2$	16,09
22	Nitrato-[N-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-ilmetilen)tiohidrazincarbotioamido]cupru	$C_{12}H_{10}CuN_6O_3S$	16,18
23	Nitrato-[N-(piridin-2-il)-2-(1-(piridin-2-il)etilidenlen)tiohidrazincarbotioamido]cupru	$C_{13}H_{12}CuN_6O_3S$	15,80
24	Nitrato-[2-(fenil(piridin-2-il)metilen-N-(piridin-2-il)hidrazincarbotioamido]cupru	$C_{18}H_{14}N_6CuO_3S$	13,70
25	Clorură de bis-[N-(piridin-2-il)-2-(1-(piridin-2-il)etilidenlen)tiohidrazincarbo-tioamido]] cobalt(III)	$C_{36}H_{28}N_{10}CoClS_2$	15,80
26	Cloro-[N-(piridin-2-il)-2-(1-(piridin-2-il)etilidenlen)tiohidrazincarbotioamido]zinc	$C_{13}H_{12}ClN_5SZn$	17,28

Ultimul grup de substanțe incluse în prezenta teză de doctor este constituit din propenone aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian. Denumirea și formulele acestora sunt prezentate în Tabelul 2.4 [28].

Tabelul 2.4. Denumirile și formulele propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian

[28]

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută
27	3-(4-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acryloyl)phenyl)-1,1-dimethylthiourea	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ OS
28	3-(4-(3-(Furan-2-yl)acryloyl)phenyl)-1,1-dimethylthiourea	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ S
29	3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-(4-isothiocyanatophenyl)prop-2-en-1-one	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ OS
30	3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(4-isothiocyanatophenyl)prop-2-en-1-one	C ₁₇ H ₁₃ NO ₃ S
31	3-(Furan-2-yl)-1-(4-isothiocyanatophenyl)prop-2-en-1-one	C ₁₄ H ₉ NO ₂ S
32	1-(4-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acryloyl)phenyl)-3-(2-hydroxyethyl)thiourea	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ S
33	1-(4-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acryloyl)phenyl)-3-(3-hydroxyphenyl)thiourea	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₂ S
34	1-(4-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acryloyl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)thiourea	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₂ S
35	1-(4-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acryloyl)phenyl)-3-(3-methoxyphenyl)thiourea	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₂ S
36	1-(4-(3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)thiourea (9c)	C ₂₄ H ₂₂ N ₂ O ₄ S
37	1-(4-(3-(Furan-2-yl)acryloyl)phenyl)-3-(2-hydroxyethyl)thiourea	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₃ S

În calitate de substanță de referință în cercetare a fost utilizată furacilina (semicarbazona-5nitrofurfurol [(E)-[(5nitrofuran-2-yl)metilidena]amino]urea), care a fost selectată deoarece este un analog structural al substanțelor incluse în studiu. Astfel, această substanță include segmentul semicarbazonic, care este și parte componentă a compușilor noi testați. Astfel, utilizarea furacilinei în calitate de martor pozitiv permite de a aprecia nu numai activitatea antibacteriană a compușilor coordonativi, dar și direcția în care trebuie să se orienteze specialiștii în sinteză pentru a obține noi substanțe cu efect antibacterian.

2.2. Metode de studiu

Metodele de studiu utilizate la elaborarea acestei lucrări pot fi grupate în două categorii: metode clasice ale microbiologiei medicale și metode de determinare a statutului redox al culturii microbiene. La prima categorie se referă determinarea concentrației minime de inhibiție și concentrației minim bactericide. La cea de-a doua categorie se referă metodele de determinare a capacității antioxidante totale, a activității enzimelor antioxidante, a peroxidului de hidrogen și a nivelului de peroxidare a lipidelor.

2.2.1. Metoda de determinare a sensibilității microorganismelor la acțiunea compușilor antimicrobieni prin diluții de serie

Dintre metodele standardizate moderne de determinare a sensibilității microorganismelor la acțiunea compușilor antimicrobieni în această lucrare au fost aplicate metoda diluțiilor de serie și metoda de difuziune.

Metoda diluțiilor de serie este bazată pe determinarea directă a principalului indicator cantitativ, care caracterizează activitatea microbiologică a preparatelor antimicrobiene – concentrația minimă de inhibiție (CMI), adică valoarea cantitativă minimă care suprim creșterea microorganismelor pe medii lichide ori solide.

Pentru a determina concentrația minimă de inhibiție anumite cantități de preparat antimicrobian se adaugă la mediul de cultură, care este apoi inoculat cu cultura microorganismului testat. După incubare este evaluată prezența sau absența unei creșteri vizibile.

Evaluarea sensibilității la antibiotice implică executarea secvențială a mai multor etape: prepararea mediilor nutritive; prepararea inoculumului microorganismului testat; inocularea; incubarea; examinarea și interpretarea rezultatelor, formularea concluziilor în funcție de scopul cercetării.

Metodele de difuziune includ etapa de aplicare a discurilor pe mediul de creștere solid.

- Prepararea mediilor de cultură

În lucrarea de față a fost utilizat mediul standard pentru tulpinile date – bulion peptonat, 2% cu pH ajustat la 7,0. Mediul de cultură se prepară în conformitate cu instrucțiunea producătorului. După autoclavizare mediul nutritiv imediat se distribuie în eprubete sterile.

- Prepararea inoculumului microorganismelor testate

Cerința generală și de o importanță fundamentală pentru toate metodele de testare este standardizarea inoculumului microorganismului testat, concentrația căruia trebuie ajustată la $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, conform standardului de turbiditate de 0,5 după McFarland. Suspensia bacteriană poate fi preparată din cultură din bulion sau de pe agar.

Prepararea inoculumului din cultură de pe agar

Pentru a pregăti inoculumul este utilizată cultura pură de 24 de 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) sau cu bulion peptonat, astfel ca acesta să corespundă exact standardului de turbiditate de 0,5 după McFarland. Inoculumul urmează a fi utilizat în decurs de 15 minute după preparare.

Prepararea inoculumului din cultură obținută pe bulion peptonat

Se aplică în special speciilor cu creștere rapidă. Se utilizează cultură pe agar de 5-6 ore. Se selectează colonii izolate de același tip, cu ansa se colectează o cantitate mică de material, care se transferă într-o eprubetă cu 4,0-5,0 ml de mediu nutritiv lichid neselectiv. Se incubează la 35°C. După 5-6 ore de incubare, densitatea suspensiei microbiene corespunde aproximativ necesarului și este ajustată cu precizie la standardul de turbiditate de 0,5 după McFarland prin adăugarea de soluție salină sterilă sau bulion. Standardul McFarland poate fi procurat ori poate fi preparat în laborator.

Prepararea standardului de turbiditate de 0,5 după McFarland

La 0,5 ml de soluție BaCl_2 cu o concentrație de 0,048 M (soluție de 1,175% de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se adaugă lent, cu agitare puternică, 99,5 ml soluție H_2SO_4 la o concentrație de 0,18 M (1%) până la obținerea unei suspensii omogene. Corectitudinea preparării suspensiei se verifică la un spectrofotometru. Absorbția la lungimea de undă de 625 nm, folosind o cuvă de 1 cm, trebuie să indice valori de 0,08-0,10. Câte 4-6 ml suspensie rezultată se toarnă în tuburi cu capace ajustate. Tuburile trebuie să aibă același diametru ca cele folosite pentru prepararea suspensiilor bacteriene. Tuburile cu suspensie se păstrează la întuneric la temperatura camerei. Înainte de utilizare, tuburile trebuie să fie agitate intens și apreciată omogenitatea lor. Se utilizează doar tuburile cu conținut omogen. Standardele de turbiditate se verifică spectrofotometric cel puțin o dată în lună.

Diluțiile de serie în bulion

În lucrarea de față a fost aplicată macrometoda de diluții de serie (în eprubete). Mediul nutritiv se toarnă în cantitate de 0,5 ml în fiecare tub. Numărul de tuburi este determinat de numărul dorit de diluții cu luarea în calcul și a martorului negativ.

Soluția de lucru a preparatelor cu acțiune antibacteriană se prepară din soluția standard cu utilizarea mediului nutritiv lichid. Concentrația soluțiilor de lucru este calculată pe baza concentrației maxime necesare într-o serie de diluții de serie, luându-se în calcul și diluția preparatului care reiese din adăugarea lui ulterioară în mediul nutritiv. Soluția de lucru într-o cantitate de 0,5 ml se introduce în primul tub care conține 0,5 ml de bulion conductiv, folosind o pipetă cu un vârf steril. După o agitare activă, aplicând un nou vârf, se colectează 0,5 ml de bulion, care se transferă într-un al doilea tub ce conținea inițial 0,5 ml bulion. Această procedură se repetă până când se prepară numărul necesar de diluții. Din ultimul tub se îndepărtează 0,5 ml de bulion. Astfel, în lucru vor fi luate o serie de eprubete cu soluții ale preparatului cu proprietăți antibacteriene, concentrațiile cărora diferă în tuburi adiacente de 2 ori.

Pentru inoculare se utilizează suspensia bacteriană care conține $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, ce corespunde standardului de turbiditate de 0,5 după McFarland. Această suspensie este diluată de 100 de ori cu bulion peptonat și ca rezultat va conține $1,5 \times 10^6$ UFC/ml. În fiecare tub conținând 0,5 ml a diluției corespunzătoare a preparatului antibacterian testat se introduc câte 0,5 ml inoculum. Aceeași cantitate de inoculum se introduce în eprubeta cu martorul negativ. Concentrația finală a microorganismului în fiecare tub ajunge la nivelul necesar de aproximativ 5×10^5 UFC/ml. Inoculumul trebuie introdus în tuburi cu diluții ale preparatului antibacterian pe durata a 15-30 de minute de la preparare.

Tuburile sunt închise cu dopuri sterile din bumbac și tifon sau cu capace metalice, fiind apoi incubate la o temperatură de 35°C timp de 16-20 sau 20-24 de ore (în funcție de tipul de microorganism). Tubul cu un martor negativ este plasat în frigider la 4°C și păstrat 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. În primele tuburi, cu concentrații mari ale substanței testate, creșterea culturii nu este vizibilă, microorganismele fiind omorâte sau inhibitate în prezența antibioticului. Concentrația substanței corespunzătoare tubului cu cea mai mică concentrație, care inhibă creșterea vizibilă a culturii microbiene, reprezintă valoarea CMI pentru substanța respectivă. Determinarea CMI se utilizează pentru stabilirea dozei terapeutice și a căii de administrare în cazul infecțiilor severe, supravegherea evoluției rezistenței bacteriilor la substanțele cu efect antibiotic, cuantificarea activității bactericide a substanțelor antimicrobiene.

De asemenea, această metodă permite și aflarea valorii CMB (concentrația minimă bactericid) pentru antibioticul testat. Pentru aceasta, se prelevează 0,01 ml sau 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 este dată de cea mai mică concentrație de antibiotic care reduce numărul coloniilor cu până la 99,9%.

2.2.2. Metoda de determinare a sensibilității microorganismelor la acțiunea compușilor antimicrobieni – difuziune în agar

a) metoda discurilor

Metoda de difuziune în agar pentru stabilirea gradului de susceptibilitate a microorganismelor față de substanțele cu efecte antimicrobiene este bazată pe capacitatea acestor

substanțe de a difuziona în mediul solid, inhibând dezvoltarea microorganismelor însămânțate pe suprafața agarului.

Pentru a determina sensibilitatea prin metoda de difuziune în agar se folosesc aceleași medii ca și pentru metoda diluției în mediu lichid cu adaos de agar. Mediul agarizat este pregătit în conformitate cu instrucțiunile producătorului. Grosimea stratului de agar într-o cutie Petri trebuie să reprezinte $4,0 \pm 0,5$ mm, care se realizează prin introducerea într-o cutie Petri de 90 mm în diametru strict 20 ml de agar, într-o cutie cu 100 mm în diametru – 25 ml de agar și într-o cutie cu un diametru de 150 mm – 60 ml de agar. După turnarea mediului agarizat în cutii, acestea se lasă la temperatura camerei pentru solidificare. Ulterior ele pot fi păstrate la 4-8°C, timp de 7-10 zile. Cutiile care au fost păstrate în frigider înainte de utilizare se încubează cu capacul întredeschis la temperatura de 35°C timp de 10-20 de minute.

Substanțele testate sunt impregnate pe discuri de hârtie de filtru de tip Munktell, grad 005 cu grosimea de 0,03 mm și diametrul de 6 mm. Din diluțiile cu concentrația necesară se ia un volum de 4 μ l. Recoltarea se face cu o micropipetă cu vârf steril, acesta fiind schimbat pentru fiecare procedură.

Se prepară inoculumul microorganismului testat, concentrația căruia se ajustează la $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, ceea ce corespunde standardului de turbiditate de 0,5 după McFarland. Inoculumul se utilizează timp de maxim 30 min. din momentul pregătirii.

Inoculumul standard se pipetează pe suprafața cutiei Petri cu mediu nutritiv într-un volum de 1-2 ml, se distribuie uniform pe suprafața mediului prin balansare, apoi se îndepărtează excesul de inoculum cu ajutorul pipetei. Cutiile întredeschise se lasă la temperatura camerei pentru uscare timp de 10-15 minute.

Discurile se aplică peste 15 minute după inoculare pe suprafața mediului cu ajutorul dozatorului ori pensetei sterile. Distanța de la discuri până la marginea cutiei, precum și între discuri este de 15-20 mm. Astfel, pe o cutie Petri cu un diametru de 100 mm se plasează cel mult 6 discuri. Discurile sunt apăsate ușor ca să formeze un contact uniform cu suprafața agarului.

Imediat după plasarea discurilor cutiile Petri se pun pentru incubare la 35°C, timp de 18-24 de ore (în funcție de specia microorganismului testat). Creșterea intervalului de timp între aplicarea discurilor pe suprafața mediului și începutul perioadei de incubare (respectiv – începutul creșterii culturii de microorganisme) conduce la „predifuziunea” preparatului cu efect antibacterian în agar și la o creștere a diametrului zonei de inhibiție.

După incubare cutiile Petri sunt plasate pe hârtie mată de culoare închisă, astfel încât lumina să cadă sub un unghi de 45°. Diametrul zonelor de inhibiție a creșterii se măsoară cu o precizie de până la 1 mm, de preferință cu ajutorul unui șubler.

b) metoda cilindrelor ori godeurilor

În cutii Petri 20x100 mm sau 20x90 mm, puse pe o masă cu suprafața strict orizontală, se toarnă lichidul cultural într-un strat ori în două straturi. Pentru stratul inferior se utilizează medii nepopulate, iar pentru stratul superior ori la aplicarea unui singur strat se folosește mediu agarizat populat cu test-microorganismul respectiv. Cultura se introduce în mediu când acesta atinge temperatura de 49 ± 1 °C, dacă se utilizează celule vegetative, ori 65-70 °C în cazul utilizării suspensiei de spori. La mediu se adaugă o asemenea cantitate de suspensie microbiană, care asigură creșterea optimă a test-microorganismului și claritatea zonelor de inhibare constituind aproximativ 40 mln celule/ml ori 20 mln spori la 1 ml. Doza optimă de inoculum trebuie să asigure valoarea diametrului zonei de inhibare a celei mai mici concentrații de cel puțin 14 mm.

În cazul metodei cilindrelor pe fiecare cutie Petri se aplică 6 cilindre sterile din inox ori aluminiu cu înălțimea de $10,0 \pm 0,1$ mm și diametrul interior de $6,0 \pm 0,1$ mm, astfel ca distanțele dintre cilindrele învecinate și până la marginea cutiei să fie egale. În cazul metodei godeurilor, acestea se sfredolesc în agar cu sfredelul ori alt dispozitiv special steril. Diametrul godeurilor trebuie să fie de la 6 la 8 mm.

În cilindre ori godeuri se introduc volume egale ale soluțiilor standard și ale soluțiilor testate – în cazul nostru acestea sunt soluțiile compușilor coordinațivi ori ale propenonelor aromatice. Soluțiile stoc se prepară în solvenții respectivi sterili în concentrație de 1 mg/ml. În continuare, în funcție de metoda aplicată (de 3 doze, ori de construire a curbei standard) se prepară soluții de lucru de una sau trei concentrații ale soluției de test și soluții de trei ori cinci concentrații ale probei standard. Pentru a diminua diferențele cauzate de intervalele de timp la care se fac introducerile de soluții, cutiile Petri sunt lăsate la temperatura camerei timp de 1-2 ore, apoi sunt incubate la 36 ± 1 °C timp de 16-18 ore. Diametrul zonelor de inhibare a creșterii test-microorganismelor se măsoară cu ajutorul șublerului cu exactitate de 0,1 mm.

Determinarea activității antimicrobiene prin aplicarea variantei de trei doze a difuziunii în agar [240]. Pentru a efectua testarea se prepară trei soluții ale probei standard (S_1 , S_2 , S_3) și trei soluții din proba testată (U_1 , U_2 , U_3). Concentrațiile soluțiilor care conțin doza minimă, medie, maximă trebuie să se deosebească în raport multiplu. În caz de necesitate, acest raport poate fi schimbat. Concentrația soluției S_2 trebuie să fie apropiată de concentrația martor a soluției standard recomandată. Toate soluțiile standard și probe se introduc în cilindre ori godeuri astfel, ca soluțiile cu concentrații mari să fie îndepărtate unele de altele. Noi am utilizat

variantele $S_1U_3S_2U_1S_3U_2$. Numărul minim de cutii în experiență este de 6, astfel ca să fie asigurată veridicitatea statistică.

Consecutivitatea adăugării soluțiilor standard și a probelor este următoarea: mai întâi se adaugă soluția standard cu cea mai mică concentrație (S_1), apoi soluția testată cu cea mai mică concentrație (U_1). După aceasta se adaugă soluțiile cu concentrația medie (S_2 și U_2), ultimele fiind introduse soluțiile cu cea mai mare concentrație (S_3 și U_3).

Calculul activității și analiza dispersională au fost efectuate în corespundere cu recomandările Farmacopeii Europene (experiență randomizată în trei doze) și sunt expuse detaliat în compartimentul 2.2.11. În baza rezultatelor obținute se calculează următorii parametri (Tabelul 2.5):

Tabelul 2.5. Sumele valorilor și contrastele

	Proba standard \underline{S}	Proba testată \underline{U}	Suma
Doza mică (suma a 6 valori)	$S_1 =$	$U_1 =$	
Doza medie (suma a 6 valori)	$S_2 =$	$U_2 =$	
Doza mare (suma a 6 valori)	$S_3 =$	$U_3 =$	
Suma (suma a 18 valori și totală)	$S =$	$U =$	$\sum y =$
Contrastul liniar L	$L_S = S_3 - S_1 =$	$L_U = U_3 - U_1 =$	$\sum L =$
Contrastul pătratic Q	$Q_S = S_1 - 2S_2 + S_3 =$	$Q_U = U_1 - 2U_2 + U_3 =$	$\sum Q =$

Pentru a verifica corectitudinea realizării procedurii de testare și de a calcula dispersia acesteia se efectuează analiza dispersională a rezultatelor obținute. Pentru aceasta se calculează valorile dispersiei pentru 8 surse de dispersie (Tabelul 2.6), utilizând datele primare (diametrele zonelor de inhibare măsurate) și valorile din Tabelul 2.5. Inițial se calculează coeficientul de corecție (K), apoi suma pătratelor surselor de dispersie.

$$\text{Coeficientul de corecție } K = \frac{(\sum y)^2}{N} \quad (2.1)$$

$$\text{Preparatele} = \frac{S^2 + U^2}{3n} - K; \quad (2.2)$$

$$\text{Regresia} = \frac{(L_S + L_U)^2}{4n} = E; \quad (2.3)$$

$$\text{Paralelismul} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E; \quad (2.4)$$

$$\text{Pătratul} = \frac{(Q_S + Q_U)^2}{12n} \quad (2.5)$$

$$\text{Diferența pătratului} = \frac{Q_S^2 + Q_U^2}{6n} - \text{pătratul} \quad (2.6)$$

$$\text{Corecții} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{n} - K \quad (2.7)$$

$$Total = \sum (y^2) - K; \quad (2.8)$$

$$Devia\c{t}ia = Total - Corec\c{t}ii \quad (2.9)$$

Tabelul 2.6. Tabelul de sinteză al analizei dispersive (test randomizat în trei concentrații)

Sursa se dispersie	Grade de libertate (f)	Suma pătratelor	Pătratul mediu ($\frac{\text{suma pătratelor}}{f}$)	F _{obs.}	F _{tab.}
Preparate	1				
Regresia	1				>7,13 (P=99 %)
Paralelism	1				<4,02 (P=95 %)
Pătratul	1				<4,02 (P=95 %)
Diferența pătratului	1				<4,02 (P=95 %)
Corecții	k - 1 = f1				
Deviația	N - 1 - f1 - m				
Total	N - 1 - m				

n = numărul de date în grup;

N = numărul total de date în experiență;

m = numărul de date pierdute și substituite;

k = numărul de preparate;

x = numărul de concentrații testate.

Semnificația deviației variantelor se verifică aplicând criteriul Fisher. Este necesară respectarea cerințelor față de parametrii Regresia, Paralelism, Pătratul și Diferența pătratului. Pentru Regresie valoarea criteriului Fisher determinată este mai mare ca valoarea critică (P = 99%), iar pentru ceilalți parametri – mai mică ca cea critică (P = 95%).

Pentru a găsi valoarea F_{det.} pătratele medii ale parametrilor se împart la pătratul mediu al parametrului Deviație.

La respectarea condițiilor expuse, se poate trece la calculul activității biologice și limitelor ei de fiducitate.

$$b = \frac{L_s + L_U}{I \times 4n}; \bar{y}_s = \frac{S}{3n}; \bar{y}_U = \frac{U}{3n}; \text{ unde} \quad (2.10)$$

I - logaritmul zecimal al rației progresiei geometrice a diluțiilor;

b - coeficientul unghiular;

L, S și n - vezi Tabelele 2.3 și 2.4.

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_s}{b}; M_U = M'_U + \lg A_U = 3,075; C = E / (E - s^2 t^2), \text{ unde} \quad (2.11)$$

M_U - logaritmul zecimal al activității biologice a preparatului testat

A_U - activitatea biologică așteptată

M'_U - diferența dintre logaritmi activității biologice și ai activității biologice așteptate.

Intervalele logaritmice de fiducitate se calculează conform relației:

$$CM'_U \pm \sqrt{(C-1)(CM'_U{}^2 + 8/3 \times I^2)} \quad (2.12)$$

Limitele intervalor de încredere reale sunt egale cu $10^{\lg A_U \pm CM'_U}$

Condițiile obținerii rezultatelor veridice cu aplicarea variantei metodei de difuziune în agar cu 3 doze sunt următoarele: raportul dintre două doze consecutive trebuie să fie constant, numărul de diluții de lucru trebuie să fie același, relația dintre logaritmul dozelor și diametrul zonelor de inhibare a creșterii trebuie să fie reprezentată prin linie dreaptă pe diapazonul dozelor testate, dreapta pentru proba testată și cea pentru proba standard trebuie să fie paralele.

Determinarea activității antimicrobiene cu aplicarea curbei standard [240]. Din soluția stoc a standardului se prepară cinci soluții de lucru S_1, S_2, S_3, S_4, S_5 cu concentrații, care se măresc în progresie geometrică (Z), în raport multiplu. Concentrația medie (S_3) este o concentrație standard (martor), concentrația S_1 este cea mai mică, S_5 – cea mai mare. Pentru studiul fiecărei dintre concentrații (afară de martor) se utilizează câte trei cutii Petri. Soluția cu concentrația martor S_3 se adaugă în trei cilindre ori godeuri de pe fiecare cutie. În celelalte trei cilindre ori godeuri se adaugă soluția uneia dintre concentrațiile probei standard în alternare cu soluția de concentrație-martor. Astfel, pentru a obține curba standard avem nevoie de 12 cutii Petri.

După incubare în termostat se măsoară zonele de inhibare a creșterii microorganismelor-test. În continuare se calculează media diametrelor zonelor de inhibare a soluției de concentrație-martor a probei standard în fiecare grup din trei cutii Petri, apoi media diametrelor zonelor de inhibare a soluției de concentrație-martor a probei standard în 12 cutii Petri (adică media dintre 36 de zone de inhibare). Aplicând valoarea diferenței dintre media diametrelor zonelor de inhibare a soluției de concentrație-martor a probei standard în 12 cutii Petri și media diametrelor zonelor de inhibare a soluției de concentrație-martor a probei standard în fiecare grup din trei cutii cu o anumită concentrație, se calculează valoarea corecției pentru diametrul zonei de inhibare a acestei concentrații. Valoarea corecției în funcție de semn se adaugă ori se scade din valoarea medie a diametrelor zonelor de inhibare a concentrației date. Valorile obținute pentru cele patru concentrații (afară de martor) se notează d_1, d_2, d_4, d_5 .

Pentru analiza probelor de testat se efectuează câteva determinări, folosind pentru fiecare câte 3 cutii Petri, în care se adaugă soluția standard în concentrația-martor și soluția probei de testat cu concentrație apropiată de cea a concentrației-martor a standardului. După incubare se măsoară zonele de inhibare a creșterii microorganismului-test care sunt generate de prezența

concentrației-martor a soluției standard și a soluției de testat. Se calculează valoarea medie pentru valorile zonelor din trei cutii.

Calculul activității antimicrobiene a probelor de testat se efectuează în două moduri diferite: grafic și prin calcul matematic.

Calculul activității soluției testate cu aplicarea metodei grafice. Aplicând metoda celor mai mici pătrate, se calculează valorile zonelor de inhibare D_{\min} și D_{\max} pentru cea mai mică și cea mai mare concentrație a soluției probei standard:

$$D_{\min.} = (3d_1 + 2d_2 + d_3 - d_5) : 5; \quad (2.13)$$

$$D_{\max.} = (3d_5 + 2d_4 + d_3 - d_1) : 5. \quad (2.14)$$

în conformitate cu care în continuare se construiește curba standard. Pe axa absciselor se depune valoarea diametrului zonelor calculate, iar pe axa ordonatelor se depune valoarea concentrațiilor corespunzătoare ale probei standard. Diferența dintre valorile medii ale diametrului zonei de inhibare a creșterii test-microorganismelor provocate de soluția probei de testat și diametrul zonei de inhibare provocat de soluția standard cu concentrația-martor se adaugă la valoarea diametrului zonei de inhibare, care corespunde concentrației-martor de pe curbă (D_3). După aceea, pe grafic se determină concentrația, care corespunde diametrului stabilit al zonei de inhibare a creșterii. Concentrația găsită este înmulțită cu valoarea diluției și se calculează activitatea în 1 ml de soluție stoc ori în 1 mg de substanță a probei de testat.

Determinarea activității soluției testate prin aplicarea calculului. Curba care reflectă dependența dintre activitatea antimicrobiană a substanței testate și dimensiunea zonei de inhibare a creșterii microorganismului, după substituirea unităților de pe axa ordonatelor cu logaritmul concentrației ($\lg C$), se transformă într-o dreaptă descrisă prin formula:

$$D = a + b \times \lg C, \text{ unde} \quad (2.15)$$

a – factor liber;

b – coeficient unghiular.

După valorile corectate ale diametrelor zonelor d_1, d_2, d_4, d_5 pentru soluțiile probei standard cu concentrațiile C_1, C_2, C_4, C_5 și valoarea medie totală a diametrului zonei d_3 , care corespunde concentrației martor C_3 , se calculează valorile a și b cu ajutorul metodei pătratelor minime. Deoarece concentrațiile C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 constituie o progresie geometrică, formulele care se aplică pentru calcul sunt următoarele:

$$\bar{b} = (-2d_1 - d_2 + d_4 + 2d_5)/10 \times \lg Z; \quad (2.16)$$

$$a = \bar{d} - \bar{b} \lg C_3, \text{ unde} \quad (2.17)$$

Z – rația progresiei de diluții; $\bar{d} = (d_1 + d_2 + d_3 + d_4 + d_5)/5$.

Dacă în experiența cu o curbă standard au fost efectuate n testări ale probei, logaritmul valorii medii a concentrației soluției testate se calculează conform formulei:

$$\lg C_U = \lg C_3 + (\bar{d}_u - \bar{d}_s) : b, \text{ unde} \quad (2.18)$$

C_U – valoarea medie a concentrației de lucru a probei testate, obținută după rezultatul a n testări;

\bar{d}_u – valoarea medie a diametrului zonei de inhibare a creșterii, obținută în rezultatul a n testări paralele ale probei ($3n$ cutii);

\bar{d}_s – valoarea medie a diametrului zonei de inhibare pentru concentrația standard obținută în rezultatul acestor testări (câte $3n$ cutii).

Mărimea concentrației C_U se calculează ca antilogarithm:

$$C_U = \text{antilg} (\lg C_U). \quad (2.19)$$

Pentru a obține valoarea activității probei testate (A_u), valoarea C_U se înmulțește cu valoarea diluției din experiență – γ_u .

2.2.3. Metoda de determinare a biomasei microorganismelor

Pentru a evita necesitatea separării, uscării și cântăririi culturilor patogene, masa microorganismelor a fost calculată indirect, prin aplicarea procedurii de calculare a volumului mediu al celulei și aplicarea valorii de densitate $\rho=1$. Dimensiunile, volumele și masele medii ale celulelor culturilor utilizate în studiu sunt trecute în Tabelul 2.7. De asemenea, în tabel este trecută și masa celulară conținută într-un ml standard McFarland pentru fiecare cultură.

Tabelul 2.7. Parametrii de calcul al biomasei culturilor microbiene

Cultura	Parametrii celulelor				Masa unei celule, mg	Masa (mg) culturii per ml standard 0,5McF
	r, μm	h, μm	V, μm^3	V, mm^3		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,64±0,038	0	0,6200	6,2*10 ⁻¹⁰	6,2*10 ⁻¹⁰	0,093
<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	0,54±0,061	3,5±0,2	2,7475	2,7*10 ⁻⁹	2,7*10 ⁻⁹	0,405
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,55±0,036	2,7±0,3	2,1195	2,12*10 ⁻⁹	2,12*10 ⁻⁹	0,318
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0,37±0,020	2,6±0,1	0,73476	7,3*10 ⁻¹⁰	7,3*10 ⁻¹⁰	0,1095
<i>Salmonella enterica</i> (<i>S.abony</i> ГИСК03/03)	0,54±	3,9±0,1	3,0301	3,03*10 ⁻⁹	3,03*10 ⁻⁹	0,4545

2.2.4. Obținerea extractelor celulare

Cantitatea necesară de biomasă se determină cu aplicarea metodei descrise în compartimentul 2.2.3. Extractele celulare se obțin din biomasă după spălarea celulelor cu soluție tampon fosfat (pH 7,0). După aceasta biomasa (cantitatea de 100 mg) se resuspendează în tampon fosfat pentru distrugerea peretelui celular și a membranei citoplasmatică. În acest scop se aplică perlele de sticlă cu dimensiunea 150-212 μm (Sigma) în cantitate de 0,1 g. Perlele se amestecă cu suspensia celulară și se amestecă pe vortex timp de un minut cu intervalul de 5 min. cu răcire cu gheață. Lizatul se centrifughează la 8000 rpm, la temperatura de 4°C timp de 10 min., iar supernatantul se depozitează în frigider la 4°C până la utilizare [205].

2.2.5. Determinarea capacității antioxidante totale cu utilizarea radicalului cation ABTS^{•+}.

Metoda de determinare a capacității antioxidante totale cu aplicarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6- a acidului sulfonic) [192] este utilizată în ultimii ani tot mai activ pentru stabilirea activității antioxidante a substanțelor de diferită natură. A fost selectată această metodă, deoarece, în conformitate cu datele din literatură, ea se aplică cu succes la analiza complexelor de substanțe și nu numai a substanțelor pure.

Radicalul ABTS este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6- a acidului sulfonic). Reducerea radicalului format are loc prin mecanismul de adiționare de electroni. În calitate de echivalent pentru calculul cantitativ în această metodă se utilizează troloxul, compus hidrosolubil cu activitate antiradicalică similară tocoferolului. Rezultatele testului pot fi exprimate în % inhibiție (pentru compararea rezultatelor în interiorul testului) și TEAC (*trolox equivalent antioxidant activity*) pentru compararea cu antioxidanții de altă natură.

Oxidarea ABTS în scopul formării radicalului cation ABTS^{•+} se realizează cu utilizarea persulfatului de potasiu. Pentru aceasta se prepară soluția stoc a reagentului ABTS de 7 mM în apă deionizată, la care se adaugă persulfatul de potasiu în concentrație de 2,45 mM în raport de 1:1. Reacția de formare a radicalului ABTS decurge la întuneric, la temperatura camerei, timp de 16 ore. Soluția de lucru se prepară din soluția stoc de ABTS, care se dizolvă în etanol sau apă distilată până la stabilizarea valorii absorbantei la $0,700 \pm 0,020$ unități la lungimea de undă de 734 nm.

Pentru analiză se utilizează 0,3 ml extract bacterian și 2,7 ml soluție ABTS. Reacția de reducere decurge la temperatura camerei timp de 6 min., iar procentul de inhibiție se calculează conform ecuației:

$$\% \text{ inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=6 \text{ min.}}) / \text{Abs}_{t=0} * 100, \quad (2.20)$$

unde $Abs_{t=0 \text{ min.}}$ este valoarea absorbanței de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm a soluției ABTS^{•+}, iar $Abs_{t=6 \text{ min.}}$ este valoarea absorbanței după incubare.

Valoarea indicelui TEAC este exprimată în μM Trolox/mg biomasă și se calculează utilizând curba de calibrare pentru Trolox.

2.2.6. Metoda de determinare a activității catalazei

Pentru determinarea catalazei a fost aplicată metoda spectrofotometrică propusă de Aeby în 1984 [17]. Principiul metodei constă în determinarea vitezei de descompunere a peroxidului de hidrogen de către catalaza conținută în probă, în urma acestei reacții se formează apă și oxigen.

Proba în cantitate de 100 mg se mojarază la rece cu tampon extractiv (2 ml tampon K, Na-fosfat, 50 mM, pH 7,8 + 20 μl soluție de felilmetilsulfonilfluorură de 100 mM). Omogenizatul se trece în tub Ependorf și se centrifughează timp de 5 min. la 12 000 g. Amestecul reactant se prepară prin adăugarea la probă (30 μl) a 2,95 ml tampon K, Na-fosfat, 50 mM, pH 7,0 și 20 μl peroxid de hidrogen de 0,6M. Proba de control se pregătește analog, dar nu conține peroxid de hidrogen. Se efectuează spectrofotometria probei în ultraviolet la 240 nm cu un interval de 100 s.

Calculul activității catalazei pe gram de substanță uscată se face conform formulei [148]:

$$A = (2,3t \cdot \lg(E1/E2) \cdot X) / m, \quad (2.21)$$

unde: A – activitatea catalazei în unități convenționale pe g de substanță uscată; E1 și E2 – valoarea densității optice inițial și peste 100 s, X – diluția probei; t – timpul de reacție; m – masa probei.

2.2.7. Metoda de determinare a activității superoxidismutazei

Determinarea activității superoxidismutazei (SOD) a fost realizată în baza principiului bazat pe capacitatea enzimei de a inhiba reacțiile fotochimice de reducere a tetrazoliului nitroalbastru în conformitate cu metoda propusă de Giannopolitis și Ries în 1977 [83], cu modificările ulterioare.

Proba în cantitate de 100 mg se mojarază la rece cu tampon extractiv (2 ml tampon K, Na-fosfat, 50 mM, pH 7,8 + 20 μl soluție de felilmetilsulfonilfluorură de 100 mM). Omogenizatul se trece în tub Ependorf și se centrifughează timp de 5 min. la 12 000 g. Amestecul reactant se pregătește cu utilizarea a 100 μl extract bacterian la care se adaugă 0,5 ml soluție de 0,05% tetrazoliu nitroalbastru, 0,9 ml tampon K, Na-fosfat, 50 mM, pH 7,8 și 20 μl soluție de 0,24% EDTA. Pentru fiecare probă se prepară două eprubete de lucru identice după cum este descris mai sus. Una dintre eprubete se plasează la întuneric și servește în calitate de martor de întuneric.

Cea de-a doua eprubetă se expune la lumină. Afară de aceasta sunt preparate și probele martor, din care lipsește extractul bacterian care sunt destinate pentru a efectua calculul cantității maxime de formazan format. Eprubetele cu martorul conțin în loc de extractul bacterian, 100 μl tampom K, Na-fosfat de 50 mM cu pH 7,8.

Reacția este inițiată prin adăugarea a 20 μl de soluție de 0,025% riboflavină (se adaugă în toate eprubetele incluse în studiu). Eprubetele cu controlul de întuneric și cele cu martorul experienței se plasează în loc ferit de razele de lumină. Celelalte eprubete se plasează sub 2 lămpi luminescente cu puterea de 18W pentru 15 min. Reacția este oprită prin deconectarea luminii. Densitatea optică se citește la lungimea de undă de 560 nm, imediat după deconectarea luminii, iar în caz că între deconectare și măsurări există un interval de timp, probele se plasează la întuneric.

Drept unitate de activitate SOD este considerată cantitatea de enzimă, care poate inhiba reacția de reducere a tetrazoliului nitroalbastru la nivel de 50%. Pentru a calcula valoarea densității optice corespunzătoare unei unități de activitate SOD valoarea E care corespunde nivelului maximal de formare a formazanului se împarte la 2 și se consideră a fi egală cu 50% inhibiție.

Calculul activității SOD la unitate de masă se efectuează conform formulei:

$$A=(a \cdot V \cdot X)/m, \text{ unde} \quad (2.22)$$

$$a = 1 - (E_{\text{probă}} \cdot 0,5)/(E_{\text{formazan}}/2), \quad (2.23)$$

A – activitatea enzimei SOD; V – volumul extractului; X – diluția extractului; $E_{\text{probă}}$ – densitatea optică măsurată pentru probă; E_{formazan} – densitatea optică a probei cu formarea maximală de formazan.

De asemenea, calculul poate fi efectuat în valori de activitate a SOD după indicele cantitativ de formare a formazanului. Pentru aceasta se aplică următoarea formulă de calcul:

$$F=(\Delta E \cdot X)/7,2 \cdot m, \text{ unde} \quad (2.24)$$

F – cantitatea de formazan formată la unitate de masă; ΔE – diferența dintre densitatea optică a probei cu formarea maximală a formazanului și cea a probei de cercetat; X – diluția extractului bacterian; 7,2 – valoarea coeficientului de extincție al formazanului la lungimea de undă de 560 nm, în $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; m – masa absolut uscată a probei.

2.2.8. Determinarea conținutului de peroxid de hidrogen

Testul de determinare a peroxidului de hidrogen se referă la domeniul de monitorizare a nivelului stresului oxidativ. Conținutul de peroxid de hidrogen se determină în corespundere cu metoda elaborată de Bellincampi și coautorii în anul 2000 [31]. Metoda este bazată pe oxidarea

ionilor Fe^{2+} cu peroxid de hidrogen cu formarea ionilor Fe^{3+} . Aceștia din urmă formează compuși colorați cu oranjul de xilen.

100 mg biomasă se mojarază cu 1 ml de acetonă ultrarece (-18°C). Omogenizatul se centrifugează timp de 10 min. la 12 000 g, la 0,25 ml supernatant se adaugă 0,25 ml oranj de xilen (Mod de preparare: 260 μl acid sulfuric concentrat se diluează cu un volum mic de apă distilată, se adaugă 9,5 mg de sare Mohr ($\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Într-un alt volum de apă se dizolvă 7,6 mg oranj de xilen. Ambele soluții se amestecă. Se adaugă 1,822 g sorbitol, iar volumul se ajustează la 50 ml. Proba martor conține 0,25 ml acetonă și 0,25 ml oranj de xilen.

Probele se mențin timp de 45 min. la temperatura camerei. Amestecul reactant se centrifughează timp de 5 min. la 10 000 g, după care se măsoară densitatea optică la lungimea de undă de 560 nm. Calculele se realizează cu utilizarea curbei de calibrare obținută pentru domeniul de concentrații de la 200 la 1500 ng peroxid de hidrogen pe ml [188]. Pentru obținerea valorii peroxidului de hidrogen în $\mu\text{M/g}$ substanță uscată se aplică formula:

$$C = ((K \cdot V \cdot X) / m) / 880, \text{ unde} \quad (2.25)$$

C – concentrația de H_2O_2 în $\mu\text{M/g}$ substanță; K – concentrația de H_2O_2 determinată conform curbei de calibrare în ng/ml; V – volumul extractului; X – diluția extractului; m – masa uscată a probei; 880 – coeficientul de transferare a ng de peroxid de hidrogen în μM .

2.2.9. Determinarea nivelului de peroxidare a lipidelor

Nivelul de peroxidare a lipidelor este determinat indirect, prin monitorizarea produsului peroxidării – dialdehidei malonice (DAM). Cantitatea de DAM este determinată în baza acumulării produsului de reacție al acesteia cu acidul tiobarbituric [129].

La 100 mg biomasă se adaugă 1 ml acid tricloracetic de 20% și se mojarază la rece. Omogenatul se centrifughează timp de 5 min. la 12 000 g. Câte 0,4 ml supernatant se transferă în 2 eprubete cu dop. În prima eprubetă se adaugă 0,4 ml acid tricloracetic de 20% – această eprubetă servește în calitate de martor. În cealaltă eprubetă se adaugă 0,4 ml acid tiobarbituric de 0,5%. Probele se supun incubării pe baia de apă la temperatura de 100°C timp de 30 min., după care se răcesc la temperatura camerei. Măsurările se efectuează la spectrofotometru la lungimea de undă de 532 nm și la 600 nm pentru corectarea absorbantei nespecifice [102].

Pentru efectuarea calculelor cantității de DAM se aplică coeficientul de extincție $e = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Formula de calcul este următoarea:

$$C = (\Delta E / 155) \cdot X \cdot V / m, \text{ unde} \quad (2.26)$$

C – concentrația de DAM în mM/g substanță uscată; ΔE – diferența de densitate optică la 532 și 600 nm; 155 – coeficientul de extincție (vezi mai sus); X – diluția probei; V – volumul de extract, masa uscată.

2.2.10. Analiza statistică a datelor

Toate rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive (calculul mediilor aritmetice, abaterii standarde, coeficientului de variație și limitelor fiduciale), statisticii inferențiale (testele de valabilitate și testele de semnificație) și analizei dispersionale (monofactorial). Calculul indicatorilor statistici a fost efectuat utilizând posibilitățile MS Excel. În calitate de test de semnificație a fost aplicat testul Student și testul Fisher [11].

Pentru metodele de determinare a activității biologice antimicrobiene a preparatelor au fost aplicate metode de analiză statistică standard recomandate de monografiile farmaceutice pentru astfel de teste, care sunt descrise în compartimentul 2.2.2 [240].

2.3. Concluzii la capitolul 2

1. Pentru realizarea tezei de doctor în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate 5 tulpini de referință de microorganisme patogene (două Gram-pozitive și trei Gram-negative), și tulpini izolate clinic, care au permis de a evidenția corect și la nivel metodologic adecvat activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi.
2. În calitate de inhibitori ai creșterii și dezvoltării microorganismelor patogene au fost testați numeroși compuși chimici, care au fost clasificați în patru grupuri: 1) compuși coordinați ai cuprului(II) care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide; 2) compuși coordinați ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-formilpiridinei; 3) compuși coordinați ai Cu(II), Co(II), Zn(II) cu diferiți liganzi; 4) propenone aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian.
3. Metodele microbiologice și protocoalele de calcul aplicate în cercetare sunt orientate spre stabilirea parametrilor calitativi și cantitativi ai acțiunii antimicrobiene a compușilor testați.
4. Pentru realizarea calculului corect al parametrilor biochimici raportați la masa microbiană este propusă metoda indirectă de determinare a biomasei microbiene cu utilizarea metodei bazate pe măsurări dimensionale.
5. Metodele biochimice utilizate în cercetare sunt orientate spre elucidarea mecanismelor de acțiune antimicrobiană a compușilor testați în această lucrare.

3. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI CHIMICI NOI

Progresul științei în ceea ce privește studiul biologiei microorganismelor patogene, acumularea de noi date despre genomul integru al acestora, particularitățile de expresie a genelor de interes, mecanismele de protecție și rezistență la preparatele antimicrobiene a condus la descoperirea unor noi antibiotice, care ar putea oferi posibilități noi în tratamentul maladiilor grave cauzate de microorganisme rezistente la medicamente [226]. O direcție de interes deosebit în cercetarea modernă, de asemenea, în descoperirea de noi ținte, netradiționale, pe care pot acționa preparatele sintetice și naturale, capabile de a manifesta efecte bacteriostatice și bactericide. În această ordine de idei putem menționa Lipidul II, un precursor esențial pentru biosinteza peretelui celular, ancorat de membrană, care poate fi țintă pentru vancomicină, la antibiotice, manopeptimicine și ramoplanine. În asemenea condiții acest compus ar putea fi utilizat pentru tratamente antimicrobiene principal noi [35]. Astfel, studiile contemporane pun în evidență o gamă variată de compuși-țintă pentru acțiunea antibioticelor, dar și de enzime și molecule cu efecte inhibitoare, care urmează a fi testate în calitate de remedii terapeutice principal noi. În pofida faptului că companiile sunt reticente în a investi în crearea și lansarea de noi antibiotice, proces care ocupă în medie 5-8 ani, cu riscuri majore de eșec la fiecare etapă de cercetare și aprobare, cercetătorii din domeniul biotehnologiei, microbiologiei, biologiei moleculare, medicinei trebuie să continue investigațiile în acest domeniu, ținând cont atât de tradițiile vechi, cât și de cele principal noi.

În această ordine de idei se evidențiază o direcție importantă de cercetare – proiectarea de noi medicamente și obținerea lor prin procedee de sinteză chimică [43]. În calitate de modele de cercetare în această lucrare au fost utilizați compuși chimici noi.

3.1. Premisele științifice ale cercetării

Actualmente se observă creșterea interesului pentru compușii chimici sintetici, printre care se evidențiază mai multe categorii de perspectivă. Pe primul loc sunt compușii cu conținut de metale. Aceștia sunt cunoscuți în calitate de substanțe cu efect antimicrobian: metalele distrug filmele bacteriene rezistente la acțiunea antibioticelor, exercită activitate bactericidă sinergică cu alte biocide, inhibă selectiv căile metabolice bacteriene și distrug tulpinile multirezistente de microorganisme patogene, dar mecanismele lor de acțiune au fost un timp îndelungat absolut neclare. Studii recente indică asupra faptului că diferite metale provoacă numeroase dezordini în celulele microbiene. De cele mai multe ori cauza dezordinilor este stresul oxidativ, disfuncțiile proteice și deteriorarea membranelor celulare – efecte generate de acțiunea ionilor metalici [135].

Stresul oxidativ provocat de metalele cu valență variabilă este determinat de implicarea acestora în reacțiile de formare a radicalilor liberi și speciilor reactive ale oxigenului în cadrul reacțiilor Fenton și Haber-Weiss. Diferite aspecte ale stresului oxidativ provocat de metale sunt elucidate în capitolul următor. Dezordinile la nivelul proteinelor microbiene sub influența metalelor de cele mai multe ori sunt produse în imediata apropiere de site-urile de legare a metalelor. În reacție este implicat unul sau câteva reziduuri aminoacidice. Cei mai receptivi aminoacizi sunt histidina, arginina, lizina și prolina, iar în urma oxidării catalizate de prezența ionilor metalici, din aceștia se formează derivații carbonilici. Oxidarea aminoacizilor din componența lanțurilor proteice conduce la pierderea proprietăților catalitice ale acestora ori la declanșarea unui proces activ de degradare a proteinei [212]. Astfel, metalele pot determina deteriorarea site-specifică a moleculelor proteice, iar aceste deteriorări, la rândul lor, pot fi cauza toxicității metalelor față de celulele microbiene [135].

Dezorganizarea membranelor bacteriene sub influența acțiunii metalelor este produsă pe mai multe căi. Una dintre ele este analoagă cu mecanismul descris anterior. În cazul când procesului de oxidare sunt supuse nu enzimele, ci proteinele structurale ale membranei citoplasmatică, degradarea acestora conduce la apariția breșelor mecanice care perturbază mecanismele de transport celular și permeabilitatea selectivă. Drept urmare, celulele pot fi distruse ca rezultat al unui proces eronat de comunicare cu mediul extracelular.

O altă cale de distrugere a membranelor celulare sub acțiunea metalelor este procesul de peroxidare a lipidelor, care constituie baza structurală și funcțională a membranelor. Radicalii liberi formați ca rezultat al reacțiilor Fenton și Haber-Weiss, în special radicalul hidroxil, atacă activ catenele acizilor grași din componența fosfolipidelor membranare, ceea ce conduce la acumularea activă în mediul celular a produselor de reacție ale acidului tiobarbituric. Unii autori însă, pun sub semnul întrebării acest mecanism la procariote, deoarece membranele acestora conțin preferențial acizi grași mononesaturați, care sunt supuși peroxidării induse într-o măsură redusă [110, 135].

Genotoxicitatea este un alt mecanism, care determină toxicitatea metalelor față de celulele bacteriene. Moleculele de ADN sunt atacate activ de radicalii liberi formați în urma implicării metalelor cu valență variabilă în reacția Fenton. Apariția dezordinilor în structura acestor biopolimeri este un factor determinant în moartea celulară [138].

Printre metalele de tranziție cu efecte biologice pronunțate se regăsește și cuprul. Activitatea lui biologică este confirmată prin posibilitatea ionului de cupru de a se lega cu biomoleculele, prioritar cu proteinele și acizii nucleici cu care formează diverși complecși [91, 92].

Interesul față de complexii de Cu este generat de utilizarea lor potențială ca agenți antimicrobieni, antivirali, antiinflamatori, antitumorali, inhibitori ai diferitor enzime [109]. Este cunoscut faptul că complexii de Cu (II) ai preparatelor antiinflamatoare nesteroidice nu numai că prezintă activitate antiinflamatoare performantă, dar se caracterizează și prin toxicitate redusă față de țesuturile sănătoase. Deși compușii cuprului sunt de perspectivă în calitate de preparate cu efect antiinflamator, cercetările de ultimă oră sunt concentrate asupra potențialelor proprietăți chimioterapeutice ale compușilor pe bază de cupru. Activitatea antivirală și antibacteriană a Cu (II) este incontestabilă. Studiul în domeniul elaborării teoretice, sintezei și testării complexelor de cupru se consideră de perspectivă pentru obținerea preparatelor antivirale și antimicrobiene, active inclusiv față de HIV, H1N1 și bacteriile ce manifestă rezistență multiplă [133, 169].

Complexii de cupru prezintă o activitate biologică diversă *in vitro*, pornind de la efectele lor antimicrobiene și antiinflamatoare, până la cele citostatice și de inhibare a activității unor enzime de interes. La nivel molecular compușii cuprului (prin ionul de cupru) interacționează direct cu proteinele și ADN, ceea ce conduce la denaturarea structurii acestora. Un mod indirect de acțiune a compușilor de cupru constă în manifestarea acelorași efecte asupra biopolimerilor, ca și în cazul cuplării directe, dar generate de prezența speciilor reactive ale oxigenului, formate cu participarea ionilor de Cu(II) [109].

Compușii heterociclici cu conținut de azot devin tot mai populari datorită varietății efectelor biologice, pe care aceștia le manifestă, inclusiv datorită proprietăților antibacteriene [111]. Aceste proprietăți sunt atribuite prezenței funcției reactive keto α , β -nesaturate, care poate fi alterată în funcție de tipul și poziția substituenților în inelul aromatic. Compușii din această categorie de diferită componentă și geometrie au demonstrat activitate antimicrobiană față de microorganismele Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* MTCC 96 și alte tulpini, *Streptococcus pyogenes* MTCC 443 și bacteriile Gram-negative: *Escherichia coli* MTCC 442 și alte tulpini, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2488, precum și față de fungii *Candida albicans* MTCC 227, *Aspergillus niger* MTCC 282 și *Aspergillus clavatus* MTCC 1323 [91, 92, 179]. Varietatea grupurilor distinctive de microorganisme asupra cărora compușii heterociclici cu conținut de azot au efecte antibiotice trezește interesul față de cercetările ulterioare în acest domeniu.

Cele expuse mai sus argumentează selectarea obiectului de studiu, și anume compușii coordinativi ai cuprului (II) cu diferiți liganzi și propenonele aromatice în calitate de substanțe cu posibile efecte antimicrobiene asupra tulpinilor de referință și tulpinilor izolate clinic ale microorganismelor patogene. Patru grupuri de compuși au fost testate ca posibili agenți antimicrobieni, iar rezultatele obținute sunt expuse în compartimentele ce urmează.

3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi ai Cu(II) care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide asupra tulpinilor de referință

Compușii testați în calitate de substanțe cu efect bacteriostatic și bactericid, examinați în acest compartiment al lucrării, au fost sintetizați ca rezultat al interacțiunii soluțiilor etanolice fierbinți (50-55°C) ale hidraților clorurii sau nitratului de cupru (2⁺) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și una din sulfanilamidele: streptocid, sulfacil, norsulfazol, etazol, sulfazină și sulfadimezină luate în raportul molar 1:1:1. Reacția decurge în 50-60 min. Mecanismul reacției date constă în deprotonizarea grupei tiolice a 4-feniltiosemicarbazonei 2-formilpiridinei în prezența azotului piridinic al azometinei și coordinarea anionului format la ionul de cupru(2⁺) ca ligand N,N,S-tridentat monodeprotonizat. Formula generală și cele particulare ale compușilor sunt prezentate în capitolul 2, compartimentul 2.1.7. Conținutul de cupru constituie de la 9,62 până la 12,16% din compusul integru.

Aprecierea activității antimicrobiene a noilor compuși chimici a fost realizată cu aplicarea metodei diluțiilor succesive. Pentru a demonstra performanța acestora am inclus în experiență compușii inițiali, care au fost supuși reacției, și antisepticul de referință furacilina. Rezultatele obținute, de asemenea, au fost comparate cu rezultatele activității antimicrobiene caracteristice complexului cuprului cu tiosemicarbazona 2-formilpiridinei – un compus cunoscut, care manifestă cea mai înaltă activitate față de bacteriile din specia *Bacillus cereus* dintre substanțele din șirul tiosemicarbazonic, cunoscute în literatură la momentul realizării cercetărilor [Ello 2007]. Rezultatele obținute la testarea celor 12 compuși noi ai cuprului (II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide cu utilizarea a două tulpini de referință de bacterii Gram-pozitive – *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus* sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Concentrațiile minime inhibitorii față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 s-au încadrat între 0,018 și 18,75 μg/ml. Trei dintre compușii testați au demonstrat față de această tulpină activitate mai joasă, comparativ cu antisepticul de referință – furacilina, pentru care concentrația minimă de inhibiție a culturii de referință de stafilococ a fost de 2,34 μg/ml. Cea mai performantă activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 a fost înregistrată pentru compusul di(μ-S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}, CMI fiind de 18 ng/ml, iar CMB – de 70 ng/ml.

Rezultatele prezentate în Tabelul 3.1 demonstrează o activitate antimicrobiană foarte înaltă a compușilor testați față de complexul cuprului cu tiosemicarbazona 2-formilpiridinei, care la momentul cercetării era considerat unul dintre compușii de acest tip cu cea mai înaltă activitate față de specia *Bacillus cereus*. Compușii inițiali, din care s-a realizat sinteza compușilor coordinativi noi (clorura și azotatul de cupru (II); 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei;

streptocidul; sulfacilul; norsulfazolul; etazolul; sulfazina și sulfadimezina), au manifestat nivel diferit de activitate antibacteriană, dar care pentru toate variantele a fost mai mare de 300 μg/ml. Din această cauză ele au fost trecute în tabel ca o singură poziție, care demonstrează, că proprietățile compușilor chimici noi testați se datorează structurii lor întregi, și nu acțiunii anumitor precursori de sinteză din care aceștia provin.

Tabelul 3.1. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi ai Cu(II) cu 4-feniltiosemi-carbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide față de microorganismele Gram-pozitive (μg/ml)

Compusul	Microorganismele Gram-pozitive			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	
	CMI	CBM	CMI	CBM
$C_{38}H_{38}Cl_2Cu_2N_{12}O_4S_4$	9,37	75,0	4,69	9,37
$C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$	0,29	2,34	0,009	0,009
$C_{42}H_{42}Cl_2Cu_2N_{12}O_6S_4$	1,17	4,69	4,69	18,75
$C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$	0,07	0,58	0,29	2,34
$C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$	18,75	> 300	0,07	0,58
$C_{44}H_{40}Cu_2N_{16}O_{10}S_6$	9,37	75,0	> 300	> 300
$C_{46}H_{46}Cl_2Cu_2N_{16}O_4S_6$	2,34	9,37	2,34	4,69
$C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$	0,14	0,29	0,58	0,58
$C_{46}H_{42}Cl_2Cu_2N_{16}O_4S_4$	1,17	1,17	2,34	3,34
$C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$	0,018	0,07	0,009	0,009
$C_{50}H_{50}Cl_2Cu_2N_{16}O_4S_4$	2,34	2,34	2,34	9,37
$C_{50}H_{50}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$	0,58	4,69	18,75	> 300
Compușii inițiali ^{a)}	> 300	> 300	> 300	> 300
Furacilina	2,34	9,37	4,68	4,68
Compus cunoscut[67]	1250	40000	5000	40000

Notă: a)Compușii inițiali – $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$; 4-feniltiosemicarbazona 2- formil-piridinei; streptocidul; sulfacilul; norsulfazolul; etazolul; sulfazina; sulfadimezina; compusul cunoscut – complexul cuprului cu tiosemicarbazona 2- formilpiridinei [Ello 2007].

O situație similară a fost depistată și în cazul aprecierii efectului antimicrobian al celor 12 compuși noi asupra tulpinii de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035. Valoarea CMI pentru acești compuși a fost între 0,009 și 18,75 μg/ml, doar doi dintre ei fiind mai puțin activi față de antisepticul de referință furacilina, pentru care CMI față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 a fost de 4,69 μg/ml. Doi dintre compușii noi testați, și anume di(μ-S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru} și di(μ-S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru} au demonstrat o

activitate foarte înaltă față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035, CMI și CMB fiind de 9 ng/ml. Ambii compuși s-au manifestat ca fiind foarte activi și față de cultura de stafilococ. Compușii inițiali utilizați pentru sinteză, precum și compusul cunoscut au demonstrat capacități antimicrobiene modeste față de tulpina de referință analizată. Generalizând cele expuse mai sus, menționăm, că față de tulpinile de referință ale bacteriilor Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592 și *Bacillus cereus* ГИСК 8035) evidențiem doi compuși cu activitate foarte înaltă – di(μ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru} și di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido(1)] cupru}, ambii fiind sintetizați cu utilizarea precursorului $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. În calitate de sulfanilamidă primul compus conține streptocid, iar cel de-al doilea – sulfazină.

Rezultatele obținute la testarea efectului antimicrobian al compușilor noi asupra bacteriilor Gram-negative sunt prezentate în Tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinați ai Cu(II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide față de microorganismele Gram-negative ($\mu\text{g/ml}$)

Compusul	Microorganismele Gram-negative					
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931		<i>Salmonella enterica</i> (<i>S. abony</i> ГИСК 03/03y)	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
$\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{12}\text{O}_4\text{S}_4$	9,37	75,0	9,37	18,75	18,75	75,0
$\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{10}\text{S}_4$	1,17	1,17	0,58	1,17	1,17	2,34
$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{12}\text{O}_6\text{S}_4$	4,69	9,37	1,17	4,69	2,34	2,34
$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{S}_4$	37,5	> 300	0,29	2,34	2,34	37,5
$\text{C}_{44}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_4\text{S}_6$	0,29	4,69	0,29	0,58	0,58	1,17
$\text{C}_{44}\text{H}_{40}\text{Cu}_2\text{N}_{16}\text{O}_{10}\text{S}_6$	> 300	> 300	9,37	75,0	9,37	75,0
$\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{16}\text{O}_4\text{S}_6$	4,69	9,37	4,69	18,75	4,69	9,37
$\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{Cu}_2\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_6$	0,58	0,58	1,17	2,34	2,34	4,69
$\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{16}\text{O}_4\text{S}_4$	2,34	9,37	2,34	9,37	1,17	2,34
$\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_4$	0,58	4,69	1,17	9,37	1,17	4,69
$\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{16}\text{O}_4\text{S}_4$	4,69	9,37	1,17	1,17	2,34	2,34
$\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{Cu}_2\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_4$	18,75	> 300	18,75	> 300	9,37	150,0
Compușii inițiali ^{a)}	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
Furacilina	2,34	9,37	2,34	4,68	4,68	4,68
Compus cunoscut [67]	1250	40000	n/t	n/t	n/t	n/t

Notă: a) Compușii inițiali – $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei; streptocidul; sulfacilul; norsulfazolul; etazolul; sulfazina; sulfadimezina; compusul cunoscut – complexul cuprului cu tiosemicarbazona 2-formilpiridinei [Ello 2007]; n/t nu a fost testat.

Din cei 12 compuși noi testați, 4 au manifestat activitate antibacteriană mai înaltă, comparativ cu antisepticul de referință – furacilina, față de tulpina de referință *Escherichia coli* ATCC 25922. Aceștia au fost di(μ -S)-bis{(4-aminobenzen-sulfamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru}; di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}; di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)tiazol]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru} și di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzen-sulfamido)-5-etil-1,3,4-tiadiazol]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru}. CMI înregistrată pentru acești 4 compuși a constituit 0,29-1,17 μ g/ml față de 2,34 μ g/ml la furacilină.

Activitatea antimicrobiană a compușilor din acest grup față de *Shigella sonnei* ATCC 25931 a fost, de asemenea, înaltă. Valorile CMI se înscriu între 0,58 și 18,75 μ g/ml. Opt dintre ei au fost mai activi, comparativ cu furacilina, CMI constituind 2,34 μ g/ml..

Aceleași intervale pentru CMI au fost înregistrate și pentru tulpina de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03y). Trebuie să menționăm, că această cultură este mai rezistentă față de furacilină, CMI fiind de 4,68 μ g/ml. Din numărul total de compuși ai Cu(II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide, doar doi au demonstrat activitate puțin mai joasă ca furacilina, restul fiind la nivelul acesteia sau depășind activitatea ei antimicrobiană. Compușii inițiali utilizați la sinteză și compusul cunoscut cu structură asemănătoare au demonstrat activitate antibacteriană redusă față de bacteriile Gram-negative testate. Din lista compușilor cu activitate față de microorganismele Gram-negative menționăm cei doi compuși, care au fost foarte activi și față de bacteriile Gram-pozitive. Suplimentar se evidențiază compusul di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)tiazol]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}, la sinteza căruia a fost utilizată clorura de cupru, iar în calitate de sulfanilamidă a fost luat norsulfarolul.

3.3. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi noi ai cuprului (II) care conțin 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei față de tulpinile de referință

Compușii din acest grup au fost obținuți la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50-55°C) a hidraților clorurii sau nitratului de cupru (2^+) cu 4-(2,6-dimetilfenil) sau 4-(2,5-dimetilfenil) ori 4-(3,4-dimetilfenil) sau 4-(2,4-dimetilfenil) tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei luate în raport molar de 1:1. Reacția decurge în 50-60 min. La răcire, din amestecul reactant se depun cristale mărunte, care se filtrează printr-un filtru din sticlă, se spală cu etanol, eter și se usucă în aer. Cuprul constituie 14,3-16,1 % din masa totală a compușilor. În total, în cercetare au fost incluși 6 compuși de această categorie. Descrierea lor este prezentată în capitolul 2, compartimentul 2.1.7.

Activitatea antimicrobiană a compușilor noi ai cuprului(II), care conțin 4-(dimetil)feniltiosemicarbazonele 2-formilpiridinei, s-a realizat prin metoda diluțiilor succesive, care a permis stabilirea concentrațiilor minime inhibitoare și bactericide. Activitatea noilor compuși a fost comparată cu activitatea furacilinei, precursorilor de sinteză și a compusului di(μ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazidocupru), care se caracterizează prin activitatea antimicrobiană înaltă față de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* [1].

Rezultatele obținute la testarea acțiunii compușilor asupra bacteriilor Gram-pozitive sunt expuse în Tabelul 3.3.

Tabelul. 3.3. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazone 2-formilpiridinei față de microorganismele Gram-pozitive ($\mu\text{g/ml}$)

Compusul	Microorganismele Gram-pozitive			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	
	CMI	CBM	CMI	CBM
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{ClCuN}_4\text{O}_2\text{S}$	0,009	0,018	0,009	0,018
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,58	2,34	0,58	1,17
$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClCuN}_4\text{OS}$	0,018	0,018	0,009	0,03
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,018	0,018	0,03	0,03
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,009	0,03	0,009	0,018
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,009	0,009	0,018	0,018
Furacilina	2,34	9,37	4,68	4,68
HL ^{1-4*}	>300	>300	>300	>300
di(μ -O)-bis(3,5- dibromosalicilidentiosemicarbazidocupru)	0,145	0,145	n/t	n/t

Notă: * HL¹ - 4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei, HL² - 4-(2,5-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei, HL³ - 4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei; HL⁴ - 4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei; n/t nu a fost testat.

Rezultatele obținute arată, că toți compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei incluși în studiu se caracterizează prin activitate antimicrobiană foarte înaltă față de bacteriile Gram-pozitive. Un singur compus a înregistrat față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 valoarea CMI de 0,58 $\mu\text{g/ml}$, ceea ce constituie un rezultat bun – de 4 ori mai activ ca furacilina, dar cel puțin de 38 ori mai mic față de rezultatele înregistrate de ceilalți cinci compuși din acest grup. Activitatea antimicrobiană față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 a compușilor noi ai cuprului se înscrie în aceleași limite valorice ca și la stafilococ. Astfel, cu excepția compusului di(μ -S)-bis{nitrato-[2-picoliden-4-(2,6-

dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat, compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tio semicarbazonele 2-formilpiridinei testați au CMI față de bacteriile Gram-pozitive de 9-18 ng/ml, iar CMB – de 18-30 ng/ml. Astfel, acești compuși s-au recomandat în calitate de substanțe cu efect antibacterian pronunțat față de bacteriile Gram-pozitive. În același timp, activitatea antibacteriană a precursorilor de sinteză, care constituie diferite forme ale 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazonei, este la un nivel ce cedează cu mult compușilor coordinativi, CMI și CMB fiind mai mare de 300 μg/ml.

Rezultatele obținute la testarea activității antimicrobiene a compușilor coordinativi ai Cu (II), clasificați în acest grup, față de microorganismele Gram-negative sunt prezentate în Tabelul 3.4.

Tabelul. 3.4. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil) tiosemicarbazone 2-formilpiridinei față de microorganismele Gram-negative (μg/ml)

Compusul	Microorganismele Gram-negative					
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931		<i>Salmonella enterica (S. abony</i> ГИСК 03/03 y)	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
C ₁₅ H ₁₉ ClCuN ₄ O ₂ S	9,37	37,5	0,07	0,07	9,37	9,37
C ₁₅ H ₁₉ CuN ₅ O ₅ S	37,5	75	0,58	0,58	37,5	75
C ₁₅ H ₁₇ ClCuN ₄ OS	9,37	18,75	0,018	0,018	9,37	9,37
C ₁₅ H ₁₉ CuN ₅ O ₅ S	37,5	75	0,07	0,029	37,5	75
C ₁₅ H ₁₉ CuN ₅ O ₅ S	37,5	75	0,009	0,009	9,35	18,75
C ₁₅ H ₁₉ CuN ₅ O ₅ S	9,37	37,5	0,009	0,009	9,37	9,37
Furacilina	2,34	9,37	2,34	4,68	4,68	4,68
HL ¹⁻⁴ *	>300	>300	>300	>300	>300	>300
di(μ-O)-bis(3,5- dibromosalicilidentiosemicarbazidocupru)	18,7	37,5	n/t	n/t	n/t	n/t

Notă: * HL¹ - 4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei; HL² - 4-(2,5-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei; HL³ - 4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei; HL⁴ - 4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazonă 2-formilpiridinei; n/t nu a fost testat.

În cazul culturilor de referință a bacteriilor Gram-negative precursore de sinteză au manifestat activitate antimicrobiană la nivel de concentrații mai mari ca 300 μg/ml. CMI și BMB față de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Salmonella enterica (S. abony* ГИСК 03/03 y) au fost

mult mai joase față de cele înregistrate pentru precursorii de sinteză (între 9,37 și 37,5 μg/ml), dar mai înalte ca valorile acestor parametri determinați pentru furacilină.

Tulpina de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931, spre deosebire de celelalte două culturi Gram-negative, s-a dovedit a fi foarte sensibilă față de acțiunea compușilor coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei. Ca și în cazul bacteriilor Gram-pozitive, compusul di(μ-S)-bis{nitrat-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru}tetrahidrat a fost cel mai puțin activ, concentrațiile minime inhibitorii și minime bactericide fiind de 0,58 μg/ml. Ceilalți cinci compuși testați au avut CMI în limitele de 9-18 ng/ml, iar CMB – în limitele de 9-29 ng/ml.

Din cele expuse mai sus, putem concluziona, că compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tio semicarbazonele 2-formilpiridinei posedă activitate antimicrobiană foarte înaltă față de tulpinile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035 și *Shigella sonnei* ATCC 25931.

3.4. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi ai cuprului, zincului și cobaltului cu diferiți liganzi asupra tulpinilor de referință

În acest grup au fost incluși mai mulți compuși diferiți, care au fost testați cu privire la activitatea lor antimicrobiană. Compusul di(μ-S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} se caracterizează prin numărul mărit de coordinare al atomului central prin introducerea în sfera internă a complexului unui ion de clor prin înlocuirea fragmentului 3,5-dibromosalicilidenic al tiosemicarbazonei cu 2-acetilpiridinic, iar atomul de hidrogen al grupei NH₂- marginale a azometinei este înlocuit cu grupa metilică [Brevet 2942]. Datorită acestor particularități în structura compusului se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute, care îi atribuie proprietăți diferite de cele ale analogului de structură [Brevet 4127].

Compusul [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid) cupru se obține la interacțiunea soluției etanolice fierbinți (50-55°C) a acetatului de cupru(II) monohidrat cu tiosemicarbazona acidului piruvic și 4-aminobenzensulfamida (streptocid), luate în raportul molar 1:1:1. Reacția decurge în 50-60 min. Mecanismul reacției constă în deprotonizarea grupelor carboxilice și tiolice ale tiosemicarbazonei în prezența acetat-ionilor sării inițiale, care joacă rolul de acceptor de protoni. Astfel obținut, anionul (2-carbamotioilhidrazon)-propionat(2-) coordonează la ionul de cupru(2⁺) ca un ligand O,N,S-tridentat dublu deprotonizat. Al patrulea loc în sfera internă a atomului central îl ocupă atomul de azot al moleculei de streptocid. O astfel de combinație nouă oferă proprietăți noi compusului analizat [Brevet 4133].

Următorii compuși testați sunt compuși coordinativi ai cuprului (II), nichelului (II), cobaltului (II) și zincului (II) cu N-piridin-2-iltiosemicarbazona-2-piridincarboxialdehidei (HL¹), N-piridintiosemicarbazona 2-acetilpiridinei (HL²) și N-piridin-2-iltiosemicarbazona 2-benzoilpiridinei (HL³) [Lozan-Tîrșu 2012]. Pentru obținerea acestor compuși mai întâi au fost sintetizați liganzii: la suspensia alcoolică care conține 0,03 moli de tiosemicarbazidă s-au adăugat 20-25 ml alcool etilic, încălzit la 80-90°C pe baia de apă, după care s-a adăugat o cantitate echimolară de aldehydă sau cetonă. Balonul, în care s-a efectuat sinteza, a fost ajustat cu un refrigerent ascendent. Astfel de condiții s-au menținut timp de 1-2 ore, apoi substanța solidă obținută a fost filtrată și spălată cu o cantitate minimă de etanol. Compușii coordinativi CuL¹⁻³ NO₃, CuL²⁻³ Cl, CoL²⁻³ Cl₂ și ZnL²⁻³ Cl au fost sintetizați în modul următor: la suspensia care conține 2 mmol de sare de metal în 20 ml etanol s-au adăugat 2 mmol de ligand. Amestecul reactant a fost agitat continuu, cu ajutorul unui agitator magnetic, la temperatura de 50-60°C, timp de 30 min. După răcire precipitatul format a fost filtrat pe filtru de sticlă, spălat cu o cantitate minimă de etanol și uscat la aer. Pentru compușii cobaltului raportul molar de combinare a fost de 2:1 [Lozan-Tîrșu 2012].

Activitatea antimicrobiană a compușilor descriși a fost comparată cu activitatea antisepticului de referință furacilina. Rezultatele obținute în cazul tulpinilor de referință de bacterii Gram-pozitive sunt prezentate în Tabelul 3.5.

Tabelul 3.5. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi ai Cu(II), Zn(II) și Co(II) cu diferiți liganzi față de microorganismele Gram-pozitive (μg/ml)

Compusul	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	
	CMI	CBM	CMI	CBM
C ₁₈ H ₂₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₈ S ₂	0,00056	0,0018	0,14	0,14
C ₉ H ₁₁ ClCuN ₄ S	0,03	0,07	0,14	0,58
C ₁₀ H ₁₃ CuN ₅ O ₄ S ₂	37,5	75	0,03	0,14
C ₁₂ H ₁₀ CuN ₆ O ₃ S	60,0	250,0	8,00	60,0
C ₁₃ H ₁₂ CuN ₆ O ₃ S	60,0	250,0	30,0	30,0
C ₁₈ H ₁₄ N ₆ CuO ₃ S	500	-	250	500
C ₃₆ H ₂₈ N ₁₀ CoClS ₂	-	-	250	-
C ₁₃ H ₁₂ ClN ₅ SZn	250	-	250	-
Furacilina	2,34	9,37	4,68	4,68

Compuși coordinativi ai cuprului (II), nichelului (II), cobaltului (II) și zincului (II) cu N-piridin-2-iltiosemicarbazona-2-piridincarboxialdehidei (HL¹), N-piridintiosemicarbazona 2-acetilpiridinei (HL²) și N-piridin-2-iltiosemicarbazona 2-benzoilpiridinei (HL³) nu au arătat

rezultatele aşteptate, CMI și CMB fiind mult mai ridicate comparativ cu substanța de referință. Ceilalți trei compuși s-au dovedit a fi foarte activi față de cultura de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035. Astfel, CMI față de această cultură variază între 0,03 și 0,14 µg/ml față de CMI a furacilinei de 4,68 µg/ml, iar CMB – între 0,14-0,58 µg/ml față de CMB a furacilinei de 4,68 µg/ml.

Compusul [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru a manifestat o acțiune antibacteriană mai slabă față de cultura de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparativ cu furacilina (CMI 37,5 µg/ml față de 2,34 µg/ml la furacilină și CMB 75 µg/ml față de 9,37 µg/ml la furacilină).

Compușii di(µ-S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} și cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru au înregistrat o activitate antimicrobiană foarte înaltă față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, remarcându-se primul din ei, pentru care CMI este de 0,56 ng/ml, iar CMB – 1,8 ng/ml.

Rezultatele obținute în cazul tulpinilor de referință de microorganisme Gram-negative sunt prezentate în Tabelul 3.6.

Tabelul 3.6. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi ai Cu(II), Zn(II) și Co(II) cu diferiți liganzi față de microorganismele Gram-negative (µg/ml)

Compusul	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931		<i>Salmonella enterica</i> (<i>S. abony</i> ГИСК 03/03 y)	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
C ₁₈ H ₂₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₈ S ₂	0,58	0,58	0,58	2,34	9,37	75
C ₉ H ₁₁ ClCuN ₄ S	1,17	4,69	1,17	2,34	2,34	9,37
C ₁₀ H ₁₃ CuN ₅ O ₄ S ₂	>300	>300	>300	>300	150	300
C ₁₂ H ₁₀ CuN ₆ O ₃ S	30,0	120	10,0	60,0	50,0	120,0
C ₁₃ H ₁₂ CuN ₆ O ₃ S	4,0	60,0	500	500	30,0	60,0
C ₁₈ H ₁₄ N ₆ CuO ₃ S	250	500	500	-	500	500
C ₃₆ H ₂₈ N ₁₀ CoClS ₂	-	-	120	-	-	-
C ₁₃ H ₁₂ ClN ₅ SZn	120	-	250	-	250	-
Furacilina	2,34	9,37	2,34	4,68	4,68	4,68

Ca și în cazul bacteriilor Gram-pozitive compușii coordinativi ai Cu(II), Zn(II) și Co(II) cu n-piridin-2-iltiosemicarbazona 2 piridincarboxi-aldehidei și derivații ei s-au dovedit a fi compuși antimicrobieni cu activitate joasă (CMI între 4 și 500 µg/ml față de 2,34-4,68 µg/ml la furacilină și CMB între 50 și 500 µg/ml față de 4,68-9,37 µg/ml la furacilină). La fel de joase performanțe a demonstrat compusul [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid) cupru, pentru care CMI și CMB au fost mai mari ca 300 µg/ml.

Compușii di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} și Cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru au înregistrat o activitate antibacteriană față de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Shigella sonnei* ATCC 25931 apropiată de cea a furacilinei sau mai înaltă.

Astfel, din totalitatea compușilor grupați în această categorie di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} se caracterizează prin activitate antibacteriană foarte înaltă față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și prin activitate antibacteriană înaltă față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Shigella sonnei* ATCC 25931, iar compusul Cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru – prin activitatea antibacteriană înaltă față de toate culturile de referință cu excepția salmonelei.

3.5. Acțiunea antimicrobiană a propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian asupra tulpinilor de referință

Prin condensarea în cataliză acidă sau bazică a 4-(dimetilamino)benzalhidei 4-Hidroxi-3-metoxibenzalhidei și furan-2-carbalhidei cu 3-(4-acetilfenil)-1,1-dimetiltiourea au fost obținute propenone aromatice cu grupări $\text{-NHCSN(CH}_3)_2$, care la tratare termică sau în prezența agenților cu caracter acid (HCl, H_2SO_4 , $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_3COCl) elimină dimetilamină, transformându-se în izotiocianatopropenon cu randamentul de 54-92%. La tratarea izotiocianatopropenonelor cu amine primare au fost obținuți derivați cu grupări tioamidice - NHCSNH . Activitatea antibacteriană a acestor compuși a fost comparată cu activitatea furacilinei. Rezultatele înregistrate față de tulpinile de referință de bacterii Gram-pozitive sunt prezentate în Tabelul 3.7.

Concentrația minimă de inhibiție a compușilor din acest grup față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 s-a înscris între valorile de 9,37-75,0 $\mu\text{g/ml}$, iar valorile CMB au fost mai mari de 300 $\mu\text{g/ml}$. Față de cultura *Bacillus cereus* ГИСК 8035 CMI a fost de 9,37-18,75 $\mu\text{g/ml}$, iar CMB - >300 $\mu\text{g/ml}$. Pentru un compus ($\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) au fost stabilite valori CMB de 37,5 $\mu\text{g/ml}$ față de ambele culturi Gram-pozitive.

Rezultatele obținute în cazul tulpinilor de referință din categoria bacteriilor Gram-negative sunt prezentate în Tabelul 3.8. Doi dintre compușii aromatici testați au avut CMI mai mare de 300 $\mu\text{g/ml}$ față de toate cele trei tulpini de referință Gram-negative. Cu excepția acestora, CMI a propenonelor aromatice față de tulpina de referință *Escherichia coli* ATCC 25922 a avut valori care se încadrează între 4,69 și 37,5 $\mu\text{g/ml}$ față de 2,34 $\mu\text{g/ml}$ la furacilină. CMB a compușilor aromatici testați față de *Escherichia coli* a fost mai mare ca 300 $\mu\text{g/ml}$ și doar un singur compus

a manifestat efect bactericid la concentrația de 37,5 μg/ml. Acest compus este 1-(4-(3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)acryloyl) phenyl)3-(4-hydroxyphenyl) tiouree.

Tabelul 3.7. Activitatea antimicrobiană a propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian față de microorganismele Gram-pozitive (μg/ml)

Compusul	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	
	CMI	CBM	CMI	CBM
C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	18,75	>300	37,5	>300
C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	75,0	>300	37,5	>300
C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	9,37	>300	18,75	>300
C ₁₇ H ₁₃ NO ₃ S	9,37	>300	9,37	>300
C ₁₄ H ₉ NO ₂ S	37,5	>300	>300	>300
C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	37,5	>300	18,75	>300
C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	37,5	>300	18,75	>300
C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	37,5	>300	>300	>300
C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	9,37	>300	18,75	>300
C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	9,37	37,5	9,37	37,5
C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	18,75	>300	>300	>300
Furacilina	2,34	9,37	4,68	4,68

Tabelul 3.8. Activitatea antimicrobiană a propenonelor aromatice cu grupe tioamidice sau izotiocian față de microorganismele Gram-negative (μg/ml)

Compusul	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931		<i>Salmonella enterica</i> (S. abony ГИСК 03/03 y)	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	18,75	>300	37,5	>300	37,5	>300
C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	37,5	>300	>300	>300	18,75	>300
C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	4,69	>300	18,75	300,0	9,37	>300
C ₁₇ H ₁₃ NO ₃ S	>300	>300	>300	>300	>300	>300
C ₁₄ H ₉ NO ₂ S	37,5	>300	37,5	>300	37,5	>300
C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	37,5	>300	37,5	>300	75,0	300,0
C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	18,75	>300	18,75	>300	18,75	>300
C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	18,75	>300	9,37	>300	9,37	>300
C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	37,5	>300	>300	>300	9,37	>300
C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	9,37	37,5	>300	>300	>300	>300
C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	>300	>300	>300	>300	>300	>300
Furacilina	2,34	9,37	2,34	4,68	4,68	4,68

Cinci dintre compușii aromatici testați au marcat o concentrație minimă inhibitorie față de tulpina de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931 mai mare decât 300 μg/ml, iar pentru ceilalți compuși CMI a avut valori între 9,37 și 37,5 μg/ml, ceea ce este de minim 4 ori mai mult față de CMI pentru furacilină față de această cultură. Activitate antibacteriană maximă în această serie de substanțe față de *Shigella sonnei* a avut compusul 1-(4-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acryloyl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)thiourea.

Față de tulpina de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y) trei dintre compușii cu propenone aromate au avut valori CMI mai mari ca 300 μg/ml. Doi compuși - 1-(4-(3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acryloyl)phenyl)-3-(3-methoxyphenyl)tiouree și 3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-(4-isothiocyanatophenyl)prop-2-en-1-one au avut CMI egală cu 9,37 3 μg/ml. Pentru ceilalți compuși din acest grup CMI a fost între 18,75 și 75,0 μg/ml.

Deși unii dintre acești compuși au înregistrat acțiune antiproliferativă apropiată de cea a doxorubilinei față de linia celulară de leucemie umană HL-60 [Barbă 2014], rezultatele obținute la testarea grupului de propenone aromatice nu au permis de a evidenția compuși cu proprietăți antibacteriene suficient de pronunțate. Totodată compusul 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(4-isothiocyanatophenyl)prop-2-en-1-one a avut cea mai joasă activitate din grup față de tulpinile bacteriilor Gram-negative și cea mai înaltă activitate față de tulpinile bacteriilor Gram-pozitive luate în cercetare, ceea ce ar fi un indiciu în depistarea diferențelor de mecanisme de acțiune pe cele două tipuri de bacterii și o posibilă direcție de elaborare a preparatelor antimicrobiene cu specificitate înaltă. Pentru aceasta sunt necesare investigații suplimentare atât în domeniul sintezei noilor compuși, cât și al depistării efectelor lor biologice.

3.6. Activitatea antimicrobiană comparativă a compușilor chimici noi selectați și a antisepticului de referință – furacilina față de tulpinile de referință

În toate experiențele expuse anterior, rezultatele au fost obținute în cadrul aplicării metodei diluțiilor succesive. În cadrul acestei metode se operează cu o singură variabilă – concentrația compusului testat. Rezultatul obținut este înscris în două variante – prezența sau lipsa creșterii. Ca rezultat, varianta metodei aplicată de noi permite de a exprima activitatea antibacteriană a compușilor testați printr-o singură valoare a CMI și o singură valoare a CMB. Este evident, însă, că efectele observate se realizează nu la o anumită valoare a variabilei, ci într-un anumit interval de concentrații. Scopul cercetărilor, care sunt descrise în acest compartiment al lucrării este de a realiza experiențele corespunzătoare, care permit aplicarea unui instrument de calcul, orientat spre aprecierea corectitudinii cercetării și calculării intervalelor de concentrații, în limitele cărora se observă efectul bacteriostatic. Pentru realizarea scopului pus am aplicat metoda difuziunii în

agar de determinare a activității antimicrobiene în două variante – experiența randomizată în 3 concentrații și experiența în 5 concentrații. Atât metodele de cercetare aplicate, cât și metodele de calcul sunt aplicate pentru determinarea activității antibacteriene a antibioticelor utilizând substanța de referință standard [240]. Modul de lucru și procedura de calcul sunt descrise detaliat în capitolul 2, compartimentul 2.2.2.

Pentru fiecare dintre tulpinile de referință au fost selectați cei mai eficienți compuși din grupurile testate. În continuare, CMI, observată pentru fiecare dintre ei, a fost considerată drept concentrația 2 pentru probă în experiența randomizată cu 3 concentrații, sau concentrația 3 la experiența cu calcul conform curbei standard. În rest, toate investigațiile și calculele au fost efectuate conform metodologiei descrise în capitolul 2.

Activitate antibacteriană pronunțată față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 au manifestat patru compuși din primul grup, toți compușii din grupul al doilea și doi compuși din cel de-al treilea grup. Din categoria propenonelor aromate nu am inclus în studiu niciun compus, deoarece valorile observate ale activității biologice au fost mult mai înalte ca cele înregistrate pentru compușii selectați din primele 3 grupuri. Rezultatele obținute sunt trecute în Tabelul 3.9.

Rezultatele obținute în experiențele cu aplicarea metodei de difuziune în agar au confirmat eficacitatea compușilor selectați în calitate de agenți antimicrobieni față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Cea mai înaltă activitate față de stafilococ a fost determinată în cazul compusului di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru}. Activitatea biologică a concentrației de 1 μ g/ml a acestui compus este echivalentă cu activitatea biologică a unei concentrații de 3,5-4,8 mg/ml de furacilină, adică de cel puțin 3500 ori mai înaltă.

Un compus coordinativ al cuprului cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide (di(μ -S)-bis{[2-(4-aminoben-zensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-fenil-tiosemicarbazido-(1-)]cupru}) și compușii cuprului cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei (cu excepția compusului di(μ -S)-bis{nitrato-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat) au demonstrat activitate biologică față de stafilococ de 93-302 ori mai mare decât față de furacilină. Activitatea concentrației de 1 μ g/ml a celorlalți compuși selectați cu activitate antibacteriană față de stafilococ a fost echivalentă cu activitatea a 3-95 μ g/ml de furacilină. Rezultatele expuse permit să concluzionăm despre activitatea foarte înaltă a compușilor coordinativi ai cuprului (II) cu liganzii descriși față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabelul 3.9. Activitatea biologică (CMI) a compușilor chimici noi selectați față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 calculată în baza rezultatelor obținute la aplicarea metodei de difuziune în agar*

Compusul	Activitatea biologică observată, CMI, $\mu\text{g/ml}$	Echivalent de furacilină egal cu activitatea 1 μg compus/ml	
		Experiență randomizată	Conform curbei standard
$\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{10}\text{S}_4$	0,29	6,24-9,13	7,55-8,9
$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{S}_4$	0,07	28,15-42,46	30,57-36,29
$\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{Cu}_2\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_6$	0,14	10,02-19,21	15,50-17,93
$\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_4$	0,018	92,58-152,80	133,33-146,67
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{ClCuN}_4\text{O}_2\text{S}$	0,009	220,45-283,30	250,12-270,34
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,58	3,03-5,12	3,86-4,21
$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClCuN}_4\text{OS}$	0,018	118,40-141,12	122,22-137,78
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,018	124,20-152,34	120,55-139,44
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,009	235,35-290,67	241,11-278,89
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,009	226,56-302,34	239,48-286,64
$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_8\text{S}_2$	0,00056	3502,20-4836,52	3803,45-4553,57
$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{S}$	0,03	62,47-94,85	75,00-81,00

*Notă: În cazul calculului efectuat pentru experiența randomizată în tabel au fost trecute rezultatele, pentru care deviația a fost apreciată ca semnificativă (respectarea condițiilor: valoarea F_{calculat} pentru regresie $>7,13$ (F_{crit} la $P=99\%$); valorile F_{calculat} pentru paralelism, caracter pătratic și diferența pătraticității $<4,02$ (F_{crit} la $P=95\%$).

Activitate antimicrobiană pronunțată față de tulpina de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035 au manifestat patru compuși din primul grup, toți compușii din grupul al doilea și trei compuși din cel de-al treilea grup. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 3.10. Dintre compușii selectați, doi compuși coordinați ai Cu(II) cu 4-fenil tiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide și cei cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-formilpiridinei (cu excepția compusului di(μ -S)-bis{nitrato-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil) tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat) au demonstrat activitate biologică față de tulpina de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035, care este de 112-686 de ori mai mare ca activitatea furacilinei față de acest agent patogen.

Tabelul 3.10. Activitatea biologică a compușilor chimici noi selectați față de tulpina de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035 calculată în baza rezultatelor obținute la aplicarea metodei de difuziune în agar*

Compusul	Activitatea biologică observată, CMI, $\mu\text{g/ml}$	Echivalent de furacilină egal cu activitatea 1 μg compus/ml	
		Experiență randomizată	Conform curbei standard
$\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{10}\text{S}_4$	0,009	395,5-602,15	467,78-572,22
$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{S}_4$	0,29	11,76-19,24	14,38-17,90
$\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{Cu}_2\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_6$	0,58	5,58-10,05	7,43-8,31
$\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_4$	0,009	480,33-539,47	478,89-561,11
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{ClCuN}_4\text{O}_2\text{S}$	0,009	495,48-526,39	440,00-600,00
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,58	5,33-9,48	6,82-9,31
$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClCuN}_4\text{OS}$	0,009	420,59-649,30	479,77-590,22
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,03	112,47-185,32	138,00-174,00
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,009	398,15-686,12	430,00-610,00
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,018	220,40-305,82	235,00-285,00
$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_8\text{S}_2$	0,14	21,45-44,24	29,28-37,57
$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{S}$	0,14	22,30-41,52	28,43-38,43
$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{CuN}_5\text{O}_4\text{S}_2$	0,03	120,58-201,43	138,33-173,67

*Notă: În cazul calculului efectuat pentru experiența randomizată în tabel au fost trecute rezultatele, pentru care deviația a fost apreciată ca semnificativă (respectarea condițiilor: valoarea F_{calculat} pentru regresie $>7,13$ (F_{crit} la $P=99\%$); valorile F_{calculat} pentru paralelism, caracter pătratic și diferența pătraticității $<4,02$ (F_{crit} la $P=95\%$).

Compusul [(2-Carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid) cupru, de asemenea, s-a manifestat ca substanță antimicrobiană, activitatea concentrației de $1\mu\text{g/ml}$ care este echivalentă cu activitatea concentrației de $120\text{-}201\mu\text{g/ml}$. Aplicarea metodei de difuziune în agar cu aplicarea ulterioară a sistemelor de calcul matematic recomandate a confirmat activitatea compușilor selectați în calitate de produse cu efect antibacterian față de tulpina de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035. Compușii recomandați ca antimicrobieni specifici față de bacilul cereus sunt: di($\mu\text{-S}$)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-nitrato-[2-picoli-den-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru}, di($\mu\text{-S}$)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}, [(2-Carbamotioilhidrazon) propionato (2-)]-(4-aminobenzensulfamid) cupru și compușii Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tio semicarbazonele 2-formilpiridinei.

Dintre compușii celor patru grupuri testate au fost selectați șase compuși cu activitate antimicrobiană care o depășește pe cea a furacilinei față de tulpina de referință *Escherichia coli* ATCC 25922. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 3.11.

Tabelul 3.11. Activitatea biologică a compușilor chimici noi selectați față de tulpina de referință *Escherichia coli* ATCC 25922 calculată în baza rezultatelor obținute la aplicarea metodei de difuziune în agar*

Compusul	Activitatea biologică observată, CMI, μg/ml	Echivalent de furacilină egal cu activitatea 1 μg compus/ml	
		Experiență randomizată	Conform curbei standard
C ₃₈ H ₃₈ Cu ₂ N ₁₄ O ₁₀ S ₄	1,17	1,91- 2,10	2,05- 2,38
C ₄₄ H ₄₀ Cl ₂ Cu ₂ N ₁₄ O ₄ S ₆	0,29	6,05-12,10	7,10-9,03
C ₄₆ H ₄₆ Cu ₂ N ₁₈ O ₁₀ S ₆	0,58	2,99-6,44	3,72-4,21
C ₄₆ H ₄₂ Cu ₂ N ₁₈ O ₁₀ S ₄	0,58	2,64-6,34	3,61-4,19
C ₁₈ H ₂₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₈ S ₂	0,58	3,01-6,58	3,64-4,43
C ₉ H ₁₁ ClCuN ₄ S	1,17	1,84-2,26	2,10-2,42

*Notă: În cazul calculului efectuat pentru experiența randomizată în tabel au fost trecute rezultatele, pentru care deviația a fost apreciată ca semnificativă (respectarea condițiilor: valoarea F_{calculat} pentru regresie > 7,13 (F_{crit} la P=99 %); valorile F_{calculat} pentru paralelism, caracter pătratic și diferența pătraticității < 4,02 (F_{crit} la P=95%).

Patru dintre acești compuși fac parte din grupul compușilor coordinați ai Cu(II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide, iar activitatea lor la concentrația de 1 μg/ml este echivalentă cu activitatea concentrației de 1,9-6,1 μg/ml furacilină. Compusul di(μ-S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} are o activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* ATCC 25922 care o depășește de minimum 3 ori pe cea a furacilinei. Cu toate că printre compușii noi incluși în studiu au fost depistați câțiva cu efect antibacterian asupra tulpinii date, performanțele lor sunt incomparabile cu efectele înregistrate anterior față de tulpinile de referință de stafilococ și bacilus. Dacă în cazul culturii de referință de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 avem compuși ce depășesc după activitatea antibacteriană furacilina de sute de ori, iar în cazul culturii de referință de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – chiar de mii de ori, *Escherichia coli* s-a dovedit a fi mai rezistentă. Totodată, nivelul de activitate al compușilor selectați este acceptabil și la nivelul cerințelor față de substanțele antiseptice.

Față de tulpina de referință Gram-negativă *Shigella sonnei* ATCC 25931 au fost identificați 11 compuși, activitatea antibacteriană a cărora o depășește pe cea a furacilinei, aceștia

reprezentând primele trei grupuri de compuși testați. Printre propenonele aromatice nu au fost depistați compuși cu activitate antibacteriană față de această cultură. Rezultatele obținute la determinarea intervalelor de activitate a compușilor selectați față de cultura *Shigella sonnei* ATCC 25931 sunt prezentate în Tabelul 3.12.

Tabelul 3.12. Activitatea biologică a compușilor chimici noi selectați față de tulpina de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931 calculată în baza rezultatelor obținute la aplicarea metodei de difuziune în agar*

Compusul	Activitatea biologică observată, CMI, $\mu\text{g/ml}$	Echivalent de furacilină cu activitate egală cu activitatea 1 μg compus/ml	
		Experiență randomizată	Conform curbei standard
$\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{10}\text{S}_4$	0,58	2,45-5,11	3,86-4,21
$\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{S}_4$	0,29	5,87-11,35	7,59-8,55
$\text{C}_{44}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_4\text{S}_6$	0,29	6,22-9,76	7,66-8,38
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{ClCuN}_4\text{O}_2\text{S}$	0,07	24,43-41,38	30,57-36,29
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,58	2,44-6,02	3,81-4,26
$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClCuN}_4\text{OS}$	0,018	101,20-155,32	117,78-142,22
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,07	24,16-38,19	29,40-35,12
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,009	216,76-304,87	235,56-284,44
$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{CuN}_5\text{O}_5\text{S}$	0,009	205,65-290,56	241,11-278,89
$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_8\text{S}_2$	0,58	1,94-5,78	3,76-4,04
$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{S}$	1,17	1,22-4,18	1,97-2,07

*Notă: În cazul calculului efectuat pentru experiența randomizată în tabel au fost trecute rezultatele, pentru care deviația a fost apreciată ca semnificativă (respectarea condițiilor: valoarea F_{calculat} pentru regresie $>7,13$ (F_{crit} la $P=99\%$); valorile F_{calculat} pentru paralelism, caracter pătratic și diferența pătraticității $<4,02$ (F_{crit} la $P=95\%$).

Trei compuși coordinați ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei au activitate antimicrobiană față de *Shigella sonnei* ATCC 25931, care o depășește de sute de ori pe cea a furacilinei. Concentrația de 1 $\mu\text{g/ml}$ a compusului di($\mu\text{-S}$)-bis{cloro-[2-picoliden-4-(2,5-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} dihidrat are activitate echivalentă cu cea a concentrației de 101,2-155,32 $\mu\text{g/ml}$ furacilină. O activitate antibacteriană și mai înaltă a fost înregistrată pentru alți doi compuși din același grup – di($\mu\text{-S}$)-bis{nitrato-[2-picoliden-4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat și di($\mu\text{-S}$)-bis{nitrato-[2-picoliden-4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat, care au o activitate ce o depășește de 205-

304 ori pe cea a furacilinei. Alți doi compuși din acest grup – di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat și di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(2,5-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat au manifestat activitate de 22-41 de ori mai mare ca cea a furacilinei față de cultura de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931. Ceilalți compuși au manifestat activitate antimicrobiană față de cultura dată de 1,9-11,3 ori mai pronunțată ca cea a furacilinei.

Pentru tulpina de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y) au fost depistate cele mai puține variante de compuși cu activitate antibacteriană mai înaltă ca activitatea furacilinei – antisepticul utilizat în calitate de martor în aceste experiențe. Doar doi compuși coordinativi ai Cu(II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide, și anume: di(μ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]- cupru} și di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)tiazol]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemi-carbazido-(1-)]cupru}. Rezultatele obținute la testarea acestora sunt prezentate în Tabelul 3.13.

Tabelul 3. 13 Activitatea biologică a compușilor chimici noi selectați față de tulpina de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y) calculată în baza rezultatelor obținute la aplicarea metodei de difuziune în agar

Compusul	Activitatea biologică observată, CMI, $\mu\text{g/ml}$	Echivalent de furacilină cu activitate egală cu activitatea 1 μg compus/ml	
		Experiență randomizată	Conform curbei standard
$\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_{10}\text{S}_4$	1, 17	2,22-6,05	3,72-4,27
$\text{C}_{44}\text{H}_{40}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_4\text{S}_6$	0,58	4,24-12,34	6,95-9,19

Ca și în cazul culturii de *Escherichia coli* rezultatele obținute pentru *Salmonella enterica* sunt destul de modeste, dar acceptabile, deoarece nivelul de activitate al compușilor selectați este de 2,2-12,3 ori mai mare ca activitatea furacilinei.

Generalizând asupra celor expuse, putem menționa, că compușii testați au manifestat activitate antibacteriană înaltă, în special față de tulpinile de referință ale bacteriilor Gram- pozitive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Bacillus cereus* ГИСК 8035. De asemenea, au fost evidențiați compușii cu activitatea antibacteriană înaltă față de tulpina de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931, care au activitate de până la 304 ori mai mare ca cea a furacilinei. Tulpinile de referință *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y) au manifestat un grad mai înalt de rezistență față de acțiunea compușilor noi testați în cadrul acestei lucrări. Din totalitatea compușilor testați putem evidenția compusul di(μ -S)-bis{(4-aminobenzen-

sulfamid)-nitrato-[2-picoli-den-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru}, care are acțiune antibacteriană universală față de tulpinile de referință testate, precum și compușii care s-au recomandat prin acțiune antibacteriană specifică față de anumite tulpini de referință, în special asupra celor Gram-pozitive. Astfel, cel mai indicat pentru inhibarea și eliminarea *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 este compusul di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato (1-)]cupru}, iar pentru tulpinile *Bacillus cereus* ГИСК 8035 și *Shigella sonnei* ATCC 25931 – compușii Cu (II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazonatele 2-formilpiridinei.

3.7. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi asupra tulpinilor izolate de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus este inclus în lista speciilor de microorganisme patogene, rezistența cărora față de antibiotice este supravegheată la nivel european. Această specie de patogen, cu apariția oricărui agenți antimicrobieni noi dezvoltă rezistență la acesta, fie prin mutația propriilor gene, fie prin achiziționarea genelor străine. În prezent numeroase tulpini de *S. aureus* prezintă rezistență la antibioticele β -lactamice, iar multe dintre ele se caracterizează prin rezistență multiplă (MDR). Situația se agravează și prin faptul că toate tulpinile de *S. aureus* au un imens arsenal de factori de virulență. Astfel, industria farmaceutică pare a nu fi în stare să țină pasul cu ritmul dezvoltării mecanismelor de rezistență a tulpinilor de stafilococ auriu la antibiotice. Există o serie de medicamente noi eficiente împotriva tulpinilor de *S. aureus* (ceftarolină, ceftobiprol, dalbavancin, iclaprim, tigeciclină), dar cercetătorii exprimă convingerea că în scurt timp vor apărea forme rezistente la acțiunea preparatelor numite [194].

În continuarea cercetărilor descrise în compartimentele anterioare, au fost testați trei dintre compușii selectați la primele etape, activi față de tulpinile de referință, pe tulpinile de *Staphylococcus aureus* izolate din coprocultură. În lucru au fost luate 30 de tulpini izolate, iar pentru fiecare dintre ele au fost determinate CMI și CMB pentru compusul cercetat și pentru furacilită. În Figura 3.1 este reprezentată repartizarea tulpinilor izolate pe grupuri în funcție de valoarea CMI a fiecărui compus în parte. Grupul 1 include tulpinile izolate, pentru care CMI este până la 1,17 μ g/ml, cel de-al doilea grup – între 2,34 -4,69 μ g/ml, iar cel de-al treilea grup – CMI mai mare sau egală cu 9,37 μ g/ml.

Față de 80-93% dintre tulpinile de stafilococ izolate clinic toți trei compuși testați au demonstrat un nivel al CMI de până la 1,17 μ g/ml și față de 7-17% dintre tulpinile izolate – CMI între 2,34-4,69 μ g/ml. Compusul di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4- metiltiosemi-carbazonato (1-)]cupru} nu a înregistrat valori ale CMI mai mari sau egale cu 9,37 μ g/ml, iar

ceilalți doi compuși au manifestat astfel de activitate antibacteriană față de 3% dintre tulpinile de stafilococ izolate clinic.

Rezultatele generalizate și analizate statistic, obținute la testarea celor trei compuși, sunt prezentate în Tabelele 3.14 - 3.16.

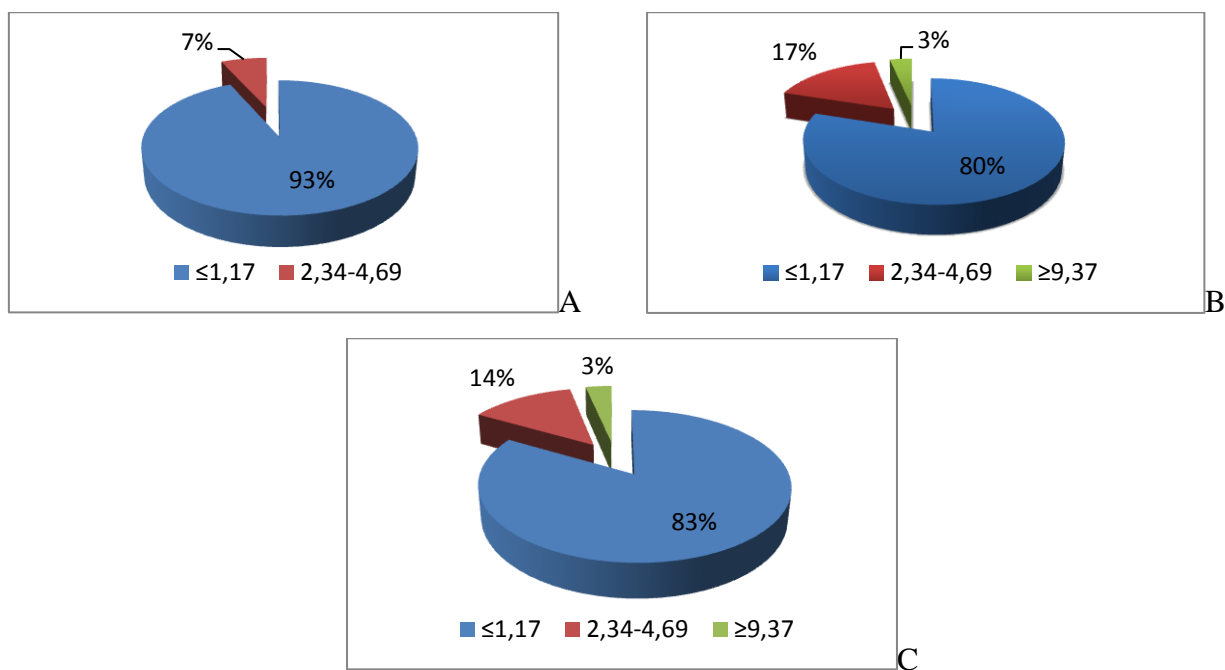


Fig.3.1. Repartizarea tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate în grupuri în funcție de valorile CMI ($\mu\text{g/ml}$) a compușilor testați:

A – di($\mu\text{-S}$)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il) etanon- 4- metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru};

B – cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen) hidrazincarbotoioamido] cupru;

C – di ($\mu\text{-S}$)- bis {[2 - (4- aminobenzensulfamido) - pirimidin]- nitrato - [2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}.

Din Tabelul 3.14 se vede că, comparativ cu rezultatele obținute pe tulpina de referință pentru compusul di($\mu\text{-S}$)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)] cupru}, cele înregistrate pe tulpinile izolate clinic sunt mai joase.

Activitatea antimicrobiană a compusului testat, dar și cea a furacilinei au fost mai joase ca în cazul tulpinii de referință de stafilococ. În același timp, atât pentru CMI, cât și pentru CMB ale compusului și ale furacilinei sunt diferențe esențiale, statistic veridice.

Tabelul 3.14. Activitatea antimicrobiană a compusului di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} asupra tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate clinic (analiza statistică descriptivă și dispersională a rezultatelor) ($C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$)

Parametrul	$C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ (C)		Furacilina (F)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Numărul de măsurări, <i>n</i>	30	30	30	30
Media, <i>M</i>	0,699	1,500667	12,65233	28,76167
Mediana	0,58	1,17	9,37	18,75
Dispersia, <i>S</i> ²	0,366285172	1,08882	68,45703	362,8183
Abaterea standard, <i>S</i>	0,60521498	1,043465	8,273876	19,04779
Valoarea max	2,34	4,69	37,5	75
Valoarea min	0,07	0,29	4,68	9,37
<i>P</i> _{(C,F(CMI))}	9,31432E-09		<0,001	
<i>P</i> _{(C,F(CMB))}	1,3735E-08		<0,001	

Prin urmare, putem afirma, că compusul di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)] cupru} posedă activitate biologică înaltă atât față de cultura de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cât și față de tulpinile de *Staphylococcus aureus* izolate clinic. CMI manifestată de compus este de 18 ori mai joasă, iar CMB – de 19,2 ori mai joasă decât parametrii respectivi obținuți pentru furacilină. Aceste rezultate permit recomandarea compusului dat pentru testarea ulterioară în calitate de preparat antimicrobian activ față de *Staphylococcus aureus*.

Rezultatele generalizate pentru testele efectuate cu utilizarea compusului Cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru (Tabelul 3.15) demonstrează aceleași tendințe ca și primul compus.

CMI manifestată de compus este 6,88 ori mai joasă, iar CMB – de 4,2 ori mai joasă decât parametrii respectivi obținuți pentru furacilină. Diferențele înregistrate între rezultatele pentru compus și pentru furacilină sunt statistic semnificative. Aceste rezultate permit recomandarea compusului dat pentru testarea ulterioară în calitate de preparat antimicrobian activ față de *Staphylococcus aureus*.

Tabelul 3.15. Activitatea antimicrobiană a compusului cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen) hidrazincarbotoamido]cupru asupra tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate clinic (analiza statistică descriptivă și dispersională a rezultatelor) (C₉H₁₁ClCuN₄S)

Parametrul	C ₉ H ₁₁ ClCuN ₄ S (C)		Furacilina (F)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Numărul de măsurări, <i>n</i>	30	30	30	30
Media, <i>M</i>	1,836667	6,895	12,65233	28,76167
Mediana	1,17	4,69	9,37	18,75
Dispersia, <i>S</i> ²	11,41744	179,7907	68,45703	362,8183
Abaterea standard, <i>S</i>	3,37897	13,40861	8,273876	19,04779
Valoarea max	18,75	75	37,5	75
Valoarea min	0,03	0,07	4,68	9,37
P _{(C,F(CMI))}	3,4026E-07		<0,001	
P _{(C,F(CMB))}	6,50696E-06		<0,001	

Compusul di(μ-S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru} (Tabelul 3.16) a demonstrat niveluri ale CMI mai joase comparativ cu cele obținute la aplicarea furacilinei.

Tabelul 3.16. Activitatea antimicrobiană a compusului di(μ-S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru} asupra tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate clinic (analiza statistică descriptivă și dispersională a rezultatelor) (C₄₆H₄₂Cu₂N₁₈O₁₀S₄)

Tulpina izolată	C ₄₆ H ₄₂ Cu ₂ N ₁₈ O ₁₀ S ₄ (C)		Furacilina (F)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Numărul de măsurări, <i>n</i>	30	30	30	30
Media, <i>M</i>	1,433767	4,085	12,65233	28,76167
Mediana	1,17	2,34	9,37	18,75
Dispersia, <i>S</i> ²	3,603888	51,85776	68,45703	362,8183
Abaterea standard, <i>S</i>	1,898391	7,201233	8,273876	19,04779
Valoarea max	9,37	37,5	37,5	75
Valoarea min	0,015	0,03	4,68	9,37
P _{(C,F(CMI))}	1,36736E-09		<0,001	
P _{(C,F(CMB))}	1,34849E-09		<0,001	

Valoarea P pentru CMB și CMI obținută la compararea datelor obținute la aplicarea compusului testat și a furacilinei arată o diferență statistic veridică, efectele compusului fiind de 8,8 mai pronunțate în cazul aprecierii CMI și de 7,0 ori mai pronunțate în cazul CMB. Astfel, și

acest compus poate fi recomandat pentru testări suplimentare în calitate de produs cu efecte antimicrobiene față de tulpinile de *Staphylococcus aureus* izolate clinic.

Pentru a compara activitatea antibacteriană a celor trei preparate, între ele a fost efectuată analiza dispersională monofactorială cu aplicarea testului t (cazul a două șiruri independente). La compararea efectelor compusului $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ cu cele ale compusului $C_9H_{11}ClCuN_4S$ valoarea $P=0,077542839$, ceea ce indică un nivel scăzut de semnificație. Valoarea P la compararea efectelor compusului $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ cu efectele compusului $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$ este de $P=0,048083896$ ($P<0,05$), deci între activitatea biologică a acestor doi compuși există o diferență statistic veridică, compusul $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ fiind mai activ. Totodată, între activitatea compusului $C_9H_{11}ClCuN_4S$ și compusul $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$ valoarea $P=0,591670406$, ceea ce denotă lipsa diferențelor semnificative. Astfel, nu putem evidenția cert careva dintre cei trei compuși testați, toți trei fiind indicați pentru realizarea testelor suplimentare pentru aplicarea lor ulterioară în calitate de produse cu efect antibacterian.

Pentru oamenii de știință *Escherichia coli* este un obiect de importanță incontestabilă. În prezent există numeroase biotehnologii bazate pe aplicarea acestui microorganism în calitate de gazdă a proceselor de interes, iar în domeniul tehnologiei ADN-ului recombinat *E.coli* este cel mai utilizat microorganism [236]. Aceasta se datorează ușurinței de manipulare în condiții de laborator și de producere, disponibilității genomului complet, capacității de a se dezvolta atât în condiții aerobe, cât și anaerobe. În același timp, acest microorganism este cauza unor infecții bacteriene la om, așa ca enteritele, infecțiile tractului urinar, septicemia și alte infecții clinice, cum ar fi meningita nou-născuților.

Tratamentul terapeutic al infecțiilor cu *E. coli* este adesea compromis de apariția rezistenței la antibiotice. Prevalența tulpinilor multirezistente de *E. coli* este în creștere la nivel mondial, în principal din cauza răspândirii elementelor genetice mobile. Această specie, în special tulpinile multirezistente care se răspândesc vertiginos, este cauza infecțiilor nosocomiale și comunitare. Prin urmare, răspândirea rezistenței *E. coli* este o preocupare tot mai importantă în domeniul sănătății publice a țărilor europene [21].

Ca și în cazul tulpinilor de stafilococ izolate, în continuare au fost testați aceiași trei compuși, activi față de tulpinile de referință, pe tulpinile de *Escherichia coli* izolate clinic din coprocultură. În lucru au fost luate 30 de tulpini izolate, iar pentru fiecare dintre ele au fost determinate CMI și CMB pentru compusul cercetat și pentru furacilită. În Figura 3.2. este reprezentată repartizarea tulpinilor izolate pe grupuri în funcție de valoarea CMI a fiecărui compus în parte. Grupul 1 include tulpinile izolate, pentru care CMI este până la 4,69 $\mu\text{g/ml}$, cel

de-al doilea grup – între 9,37-37,5 $\mu\text{g/ml}$, iar cel de-al treilea grup – CMI mai mare sau egal cu 75 $\mu\text{g/ml}$.

Compusul di($\mu\text{-S}$)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il) etanon-4-metiltiosemicarbazonato (1-)]cupru} a manifestat o activitate antimicrobiană exprimată în valori – CMI între 9,37-37,5 $\mu\text{g/ml}$. Astfel, eșantionul de date obținute pe cele 30 de tulpini izolate clinic studiate a fost omogen. Față de compusul cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru la 90% dintre tulpinile izolate clinic au fost înregistrate valori similare cu cele ale compusului precedent. Astfel, pentru 27 de tulpini izolate CMI a acestui compus a fost de 9,37-37,5 $\mu\text{g/ml}$ și doar pentru 3 tulpini izolate CMI a compusului a fost $\leq 4,69$ $\mu\text{g/ml}$. În cazul compusului di ($\mu\text{-S}$)-bis{[2-(4- aminobenzensulfamido) - pirimidin]- nitrato - [2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru} printre tulpinile izolate clinic au fost depistate toate cele trei grupuri delimitate inițial. Astfel, față de 17% dintre tulpinile izolate CMI a compusului a fost $\leq 4,69$ $\mu\text{g/ml}$, față de 27% dintre tulpinile izolate CMI a compusului a avut valori între 9,37-37,5 $\mu\text{g/ml}$, iar față de 56% dintre tulpinile izolate CMI a compusului a fost mai mare de 75 $\mu\text{g/ml}$.

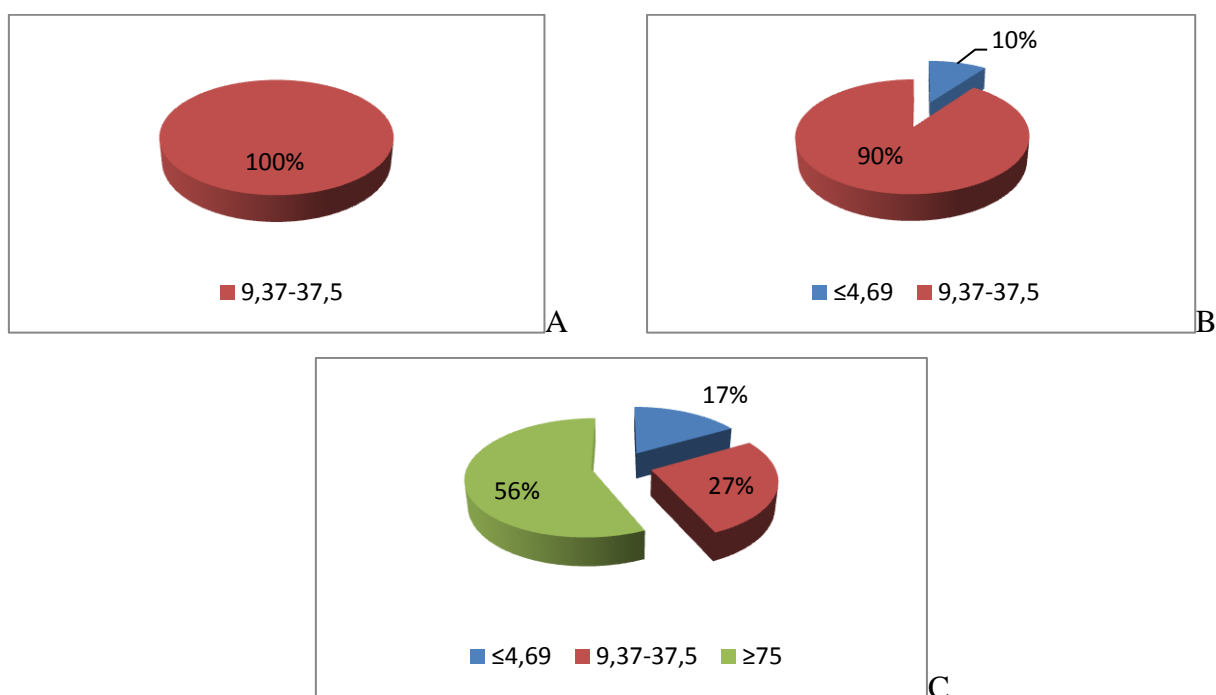


Fig.3.2. Repartizarea tulpinilor de *Escherichia coli* izolate în grupuri în funcție de valorile CMI ($\mu\text{g/ml}$) a compușilor testați:

A – di($\mu\text{-S}$)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il) etanon- 4- metiltiosemicarbazonato (1-)]cupru};

B – cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru;

C – di ($\mu\text{-S}$)- bis {[2 - (4- aminobenzensulfamido) - pirimidin]- nitrato - [2-picoliden-4-fenil-tiosemicarbazido-(1-)]cupru}.

Rezultatele generalizate și analizate statistic obținute la testarea celor trei compuși față de tulpinile de *Escherichia coli* izolate clinic sunt prezentate în Tabelele 3.17-3.19.

Din analiza comparată a datelor expuse în Tabelele 3.6 și 3.11 constatăm, că, comparativ cu rezultatele obținute pe tulpina de referință de *Escherichia coli* ATCC 25922 pentru compusul di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il) etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru}, cele înregistrate pe tulpinile izolate clinic sunt mai joase. Activitatea antimicrobiană a compusului testat, dar și a furacilinei au fost mai joase ca în cazul tulpinii de referință. În același timp, atât pentru CMI, cât și pentru CMB ale compusului și ale furacilinei sunt diferențe esențiale, statistic veridice ($P < 0,001$). Astfel, compusul di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il) etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} posedă activitate biologică înaltă atât față de cultura de referință *Escherichia coli* ATCC 25922, cât și față de tulpinile de *Escherichia coli* izolate clinic. CMI manifestată de compus este 4 ori mai joasă, iar CMB – de 2,6 ori mai joasă decât parametrii respectivi obținuți pentru furacilină. Aceste rezultate permit recomandarea compusului dat pentru testarea ulterioară în calitate de preparat antimicrobian activ față de *Escherichia coli*.

Tabelul 3.17. Activitatea antimicrobiană a compusului di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il) etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} asupra tulpinilor de *Escherichia coli* izolate clinic (analiza statistică descriptivă și dispersională a rezultatelor) ($C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$)

Parametrul	$C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ (C)		Furacilina (F)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Numărul de măsurări, <i>n</i>	30	30	30	30
Media, <i>M</i>	28,749	80,9373	116,25	211,25
Mediana	28,125	75	75	150
Dispersia, <i>S</i> ²	290,584	2451,77	5658,94	7805,5
Abaterea standard, <i>S</i>	17,0465	49,5153	75,226	88,3487
Valoarea max	9,37	9,37	37,5	37,5
Valoarea min	75	150	300	300
$P_{(C,F(CMI))}$	4,31145E-08		p<0,001	
$P_{(C,F(CMB))}$	5,31054E-12		p<0,001	

Rezultatele generalizate pentru testele efectuate cu utilizarea compusului cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru asupra tulpinilor izolate clinic (Tabelul 3.18) demonstrează aceleași tendințe ca și primul compus.

Pentru tulpinile izolate clinic valorile medii calculate din 30 de experiențe ale CMI și CMB ale compusului cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru sunt semnificativ mai înalte decât față de cultura de referință *Escherichia coli* ATCC 25922. Menționăm

aceeași creștere și pentru CMI și CMB ale furacilinei față de tulpinile respective izolate. Rezultatele analizei dispersionale monofactoriale ne-au permis să constatăm diferențe statistic veridice dintre rezultatele obținute la testarea compusului respectiv și a furacilinei a 30 de tulpini de *Escherichia coli* izolate clinic. Astfel, valoarea medie a CMI a compusului este de 4,35 ori mai joasă față de CMI a furacilinei, iar CMB – respectiv de 2,99 ori.

Tabelul 3.18. Activitatea antimicrobiană a compusului cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen) hidrazincarbotoamido]cupru asupra tulpinilor de *Escherichia coli* izolate clinic (analiza statistică descriptivă și dispersională a rezultatelor) ($C_9H_{11}ClCuN_4S$)

Parametrul	$C_9H_{11}ClCuN_4S$ (C)		Furacilina (F)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Numărul de măsurări, <i>n</i>	30	30	30	20
Media, <i>M</i>	26,718	70,9373	116,25	211,25
Mediana	18,75	75	75	150
Dispersia, <i>S</i> ²	325,586	2542,01	5658,94	7805,5
Abaterea standard, <i>S</i>	18,044	50,4183	75,226	88,3487
Valoarea max	1,17	2,34	37,5	37,5
Valoarea min	75	150	300	300
$P_{(C,F(CMI))}$	3,03282E-07		p<0,001	
$P_{(C,F(CMB))}$	1,03172E-08		p<0,001	

Rezultatele generalizate pentru testele efectuate cu utilizarea compusului di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)- pirimidin]- nitrato-[2- picoliden-4-feniltiosemicarbazido- (1-)] cupru } sunt prezentate în Tabelul 3.19.

Tabelul 3.19. Activitatea antimicrobiană a compusului di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru } asupra tulpinilor de *Escherichia coli* izolate clinic (analiza statistică descriptivă și dispersională a rezultatelor) ($C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$)

Parametrul	$C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$ (C)		Furacilina (F)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Numărul de măsurări, <i>n</i>	30	30	30	30
Media, <i>M</i>	58,0127	169,463	116,25	211,25
Mediana	75	150	75	150
Dispersia, <i>S</i> ²	1369,94	10091,6	5658,94	7805,5
Abaterea standard, <i>S</i>	37,0127	100,457	75,226	88,3487
Valoarea max	0,14	0,29	37,5	37,5
Valoarea min	150	300	300	300
$P_{(C,F(CMI))}$	0,000502191		p<0,001	
$P_{(C,F(CMB))}$	0,081760899		p<0,1	

Din analiza comparată a datelor prezentate în Tabelele 3.2 și 3.11 cu cele din Tabelul 3.19, putem menționa, că activitatea compusului examinat față de tulpinile de *Escherichia coli* izolate clinic este redusă considerabil față de activitatea lui față de cultura de referință. Aici se respectă aceeași tendință ca și în cazul primilor doi compuși examinați în acest compartiment. Valoarea medie a CMI pentru compus față de tulpinile izolate clinic este de 2,0 ori mai joasă comparativ cu CMI a furacilinei, această diferență fiind susținută prin veridicitate statistică ($p < 0,001$). Valoarea medie a CMB pentru compus nu se deosebește veridic din punct de vedere statistic de CMB pentru furacilină ($p > 0,05$). Deci, acest compus nu poate fi recomandat pentru testări ulterioare în calitate de compus cu activitate biologică față de *Escherichia coli*.

În continuare a fost comparată activitatea antibacteriană (CMI) a celor trei preparate între ele față de tulpinile de *Escherichia coli* izolate clinic în baza rezultatelor analizei dispersionale monofactoriale cu aplicarea testului t (cazul a două șiruri independente). La compararea efectelor compusului $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ cu cele ale compusului $C_9H_{11}ClCuN_4S$ valoarea $P=0,649777659$, ceea ce indică lipsa diferențelor veridice din punct de vedere statistic între valorile CMI pentru acești doi compuși față de 30 de tulpini de *Escherichia coli* izolate clinic. Valoarea P la compararea efectelor compusului $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ cu efectele compusului $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$ este de $P=0,000357898$ ($P < 0,001$), deci între activitatea biologică a acestor doi compuși există o diferență statistic veridică, compusul $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$ fiind veridic mai activ. În același timp, între activitatea compusului $C_9H_{11}ClCuN_4S$ și compusului $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$ valoarea $P=2,41927E-05$ ($P < 0,001$), ceea ce denotă, de asemenea, o diferență veridică între nivelul activității antibacteriene a acestor doi compuși. Astfel, calculul dispersional indică asupra eliminării compusului di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru} din lista compușilor cu activitate înaltă față de tulpinile de *Escherichia coli* izolate clinic.

3.8. Concluzii la capitolul 3

1. Compușii di(μ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru}; di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}, care au în calitate de precursor de sinteză azotatul de cupru (II), posedă activitate antimicrobiană înaltă față de toate tulpinile de referință testate.
2. Compusul di(μ -S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)tiazol]-cloro-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}, la sinteza căruia a fost utilizată clorura de cupru, posedă activitate antimicrobiană înaltă față de microorganismele Gram-negative și față de *Bacillus cereus*.

3. Compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tio semicarbazonele 2-formilpiridinei posedă activitate antimicrobiană foarte înaltă față de tulpinile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035 și *Shigella sonnei* ATCC 25931.
4. Compusul di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} se caracterizează prin activitate antibacteriană foarte înaltă față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și prin activitate antimicrobiană înaltă față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Shigella sonnei* ATCC 25931, iar compusul cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru – prin activitatea antibacteriană înaltă față de toate culturile de referință cu excepția salmonellei.
5. Compusul 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(4-isothiocyanatophenyl)prop-2-en-1-one din grupul protenonelor aromatice a avut cea mai joasă activitate din grup față de tulpinile bacteriilor Gram-negative și cea mai înaltă activitate față de tulpinile bacteriilor Gram-pozitive luate în cercetare, ceea ce ar fi un indiciu în depistarea diferențelor de mecanisme de acțiune pe cele două tipuri de bacterii și o posibilă direcție de elaborare a preparatelor antimicrobiene cu specificitate înaltă.
6. Compușii testați au manifestat activitate antimicrobiană înaltă, în special față de tulpinile de referință ale bacteriilor Gram-pozitive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Bacillus cereus* ГИСК 8035. De asemenea, au fost evidențiați compuși cu activitate antimicrobiană înaltă față de tulpina de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931, aceasta fiind de până la 304 ori mai mare ca cea a furacilinei. Tulpinile de referință *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03y) au manifestat un grad mai înalt de rezistență față de acțiunea compușilor chimici noi.
7. Compușii di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il) etanon-4-metiltiosemicarbazonato (1-)]cupru} și di(μ -S)-bis{cloro-[1-piridin -2-il-4- etiltiosemicarbazono-(1-)] cupru} au fost recomandați în calitate de preparate cu efecte antimicrobiene performante față de tulpinile de *Staphylococcus aureus* izolate clinic în calitate de preparate cu activitate antimicrobiană înaltă față de tulpinile de *Escherichia coli* izolate.

4. MODIFICAREA INDICILOR BIOCHIMICI AI CULTURILOR DE MICROORGANISME PATOGENE SUB INFLUENȚA COMPUȘILOR CHIMICI NOI CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE

Stabilirea particularităților de acțiune a compușilor antimicrobieni noi este un imperativ atât din punctul de vedere al aprecierii efectelor curative, cât și din cel al promovării produsului farmaceutic de la idee la medicament implementat în practica terapeutică. Există numeroase publicații, care descriu variate modificări ale conținutului biochimic al celulelor de microorganisme patogene supuse acțiunii toxice a preparatelor antimicrobiene. Studiul bibliografic realizat pe durata elaborării prezentei teze de doctorat demonstrează, că unul dintre mecanismele generale și comune practic pentru toate preparatele antimicrobiene este inducerea stresului oxidativ în celulele patogenului, exprimat în supraacumularea radicalilor liberi. Aceștia, la rândul lor, mediază întreaga gamă de mecanisme clasice ale acțiunii antimicrobiene, observate de cercetători.

Astfel, a devenit oportună realizarea unui studiu, care ar elucida unele modificări biochimice, ce reflectă statutul antioxidant al culturilor de microorganisme patogene sub influența compușilor chimici noi selectați în calitate de substanțe cu potențial antibacterian înalt.

4.1. Premisele științifice ale cercetării

Succesul microorganismelor patogene în generarea infecțiilor în organismul-gazdă este direct proporțional cu capacitatea acestora de a contracara efectele stresului oxidativ exogen, care este determinat de includerea mecanismelor de protecție imună a macroorganismului afectat. Celulele sistemului imun al gazdei (în special macrofagii) se caracterizează prin activitatea înaltă a enzimei specifice NADH-oxigenaza, care în urma activității sale catalitice de transfer al electronilor de pe NADH pe oxigen produce radicalul superoxid. Reacția de dismutație a radicalului superoxid, catalizată de superoxid-dismutază, se finalizează cu formarea peroxidului de hidrogen. Moleculele de H_2O_2 reacționează intens cu proteinele care conțin Fe(II), provocând modificări ireversibile ale acestora – carbonilarea și formarea agregatelor proteice [57, 81].

Aminoacizii cisteina, metionina, triptofanul sunt deosebit de vulnerabili în fața acțiunii oxidative a peroxidului de hidrogen, care poate conduce atât la modificări reversibile, exprimate prin formarea acidului sulfenic și prin tiolare, cât și la modificări ireversibile, care intervin la formarea acizilor sulfinic și sulfonic [47].

Astfel, ca răspuns la acțiunea diferitor specii reactive ale oxigenului (SRO) în celulele bacteriene are loc modificarea radicală a proteomului, care poate fi nu neapărat malefică pentru bacterii. Modificarea posttranslațională conduce la includerea mecanismelor de protecție celulară prin activarea anumitor căi specifice ale transducției de semnal [24].

Stresul oxidativ în culturile bacteriene poate fi cauzat de interacțiunea celulelor cu soluții, care conțin ioni metalici. De exemplu, în cultura bacteriană de *Staphylococcus aureus* ionii de argint (I) induc stresul oxidativ care este exprimat prin scăderea capacității de reducere a radicalilor în biomasă. Intensitatea stresului oxidativ crește proporțional cu creșterea concentrației de ioni în mediu [48]. Sub acțiunea glabridinei în culturile de *Staphylococcus aureus* cu rezistență multiplă la antibiotice se observă creșterea esențială a conținutului de peroxid de hidrogen și radicali ai oxidului nitric. Cantitatea acestor specii reactive crește odată cu creșterea dozei de glabridină, iar în continuare, ele pot afecta macromoleculele de ADN, lipide și proteine [208].

Stresul oxidativ exogen în culturile bacteriene survine odată cu creșterea activă a cantității de SRO. La prima etapă are loc supraacumularea de superoxid radical, care în continuare, prin intermediul reacțiilor enzimatică, este transformat în peroxid de hidrogen și cel mai periculos radical liber – hidroxil-radicalul. Pentru a supraviețui, bacteriile activează mecanismele de detoxicare, mediate de enzimele antioxidante, cele mai importante fiind superoxid-dismutaza, catalaza și peroxidaza. Superoxid-dismutaza este inclusă foarte activ în reacțiile de protecție a ADN-ului bacterian [161, 162, 170]. De exemplu, *Escherichia coli* produce variantele citoplasmatică ale superoxid-dismutazei Mn-SOD (sodA) și Fe-SOD (sodB), care protejează ADN-ul și proteinele de procesul de oxidare, precum și varianta periplasmatică Cu/Zn-SOD (sodC), care protejează componentele peretelui celular și membrana citoplasmatică de deteriorarea oxidativă. Producerea activă a factorilor reglatori în biomasa microorganismelor patogene în condiții de stres oxidativ a fost înregistrată pentru majoritatea culturilor. Astfel, la speciile din genul *Salmonella* are loc inducerea regulonului *soxRS*, la speciile de *Pseudomonas* este inițiată formarea compușilor redox-cycling, codificați de gena *pqrCBAR*, la speciile de *Bacillus* a fost depistată inducerea *perR* și *Ohr* ca răspuns la stresul oxidativ [170].

Expunerea culturii de stafilococ la vancomicină sau ciprofloxacina este asociată cu formarea de radicali hidroxil în cantități veridic superioare în comparație cu nivelul observat în celule bacteriene netratate. În aceste condiții se înregistrează o corelare strânsă între creșterea conținutului de radicali hidroxil și expresia redusă a *kata*, precum și cu activitatea scăzută a catalazei. Cercetătorii exprimă părerea, că acționând asupra culturii de *S. aureus*, antibioticele

bactericide modulează expresia catalazei, care la rândul său influențează formarea de radicali liberi [228].

Astfel, substanțele cu efect antibacterian, acționând asupra culturilor de microorganisme patogene, produc în acestea o stare de stres oxidativ asociat cu acumularea de radicali liberi, scăderea capacității antioxidante totale, reducerea expresiei și activității enzimelor antioxidante de protecție. Monitorizarea acestor procese în biomasa de bacterii poate furniza informație utilă atât despre eficiența substanțelor testate, cât și despre posibilele mecanisme de acțiune ale acestora asupra microorganismelor patogene.

Reieșind din cele expuse, considerăm utilă cuantificarea parametrilor care exprimă statutul antioxidant al celulelor în culturile de microorganisme patogene expuse acțiunii noilor compuși chimici și în cele care nu au fost tratate. Estimarea modificărilor produse poate servi în calitate de instrument de apreciere a eficienței noilor substanțe în calitate de produși antimicrobieni.

4.2. Modificarea capacității antioxidante totale a culturilor de microorganisme patogene sub influența compușilor chimici noi

Capacitatea antioxidantă totală a celulelor vii este determinată de totalitatea compușilor micro- și macromoleculari, care posedă proprietăți antioxidante. În acest compartiment al lucrării vor fi luate în considerare componentele care previn formarea radicalilor liberi și înlătură radicalii deja formați, fiind omisă componenta antioxidantă ce asigură repararea sistemelor biologice deteriorate de stresul oxidativ.

Componentele celulare cu efect antioxidant includ antioxidanții enzimatici, care se clasifică în antioxidanți de protecție primară și secundară. Protecția primară este asigurată de un grup din trei enzime cu formele lor specifice – catalaza, peroxidaza și superoxid-dismutaza, care neutralizează direct radicalii liberi. Protecția secundară este asigurată de reductaze și dehidrogenaze, care participă la reactivarea enzimelor din prima categorie.

Antioxidanții nonenzimatici includ proteinele de chelare a metalelor, pigmentii (de exemplu, carotenoizii la *Staphylococcus*), compușii fenolici, aminoacizii și peptidele antioxidante (de exemplu, glutationul), vitaminele (cum sunt vitaminele A, E, C), cofactorii enzimelor (de exemplu, cunoscutul Q₁₀), minerale (în principal, zincul și seleniul) ș.a.

În acest compartiment, pentru determinarea activității antioxidante a fost aplicat testul ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6- a acidului sulfonic). Testul de determinare a capacității antioxidante totale cu utilizarea radicalului cation ABTS^{•+} este indicat în cazul dat, deoarece permite evaluarea extractelor multicomponente, așa cum este de fapt lizatul celular analizat de noi.

Culturile bacteriene care corespund standardului de turbiditate de 0,5 după McFarland sunt supuse acțiunii compușilor chimici noi selectați în concentrație egală cu CMI pentru fiecare compus și cultură de referință. Timpul de contact al culturii cu compușii a fost de 2 ore, după care se ajustează concentrația celulelor conform standardului de turbiditate. Biomasa se colectează și se prelucrează conform metodelor descrise în capitolul 2. În lucru au fost luați compușii care au arătat cele mai bune rezultate, descrise în capitolul precedent. Valorile testului ABTS au fost exprimate în procente de inhibiție a radicalului cation ABTS^{•+}.

Rezultatele obținute la testarea compușilor chimici noi cu acțiune antimicrobiană față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sunt prezentate în Figura 4.1.

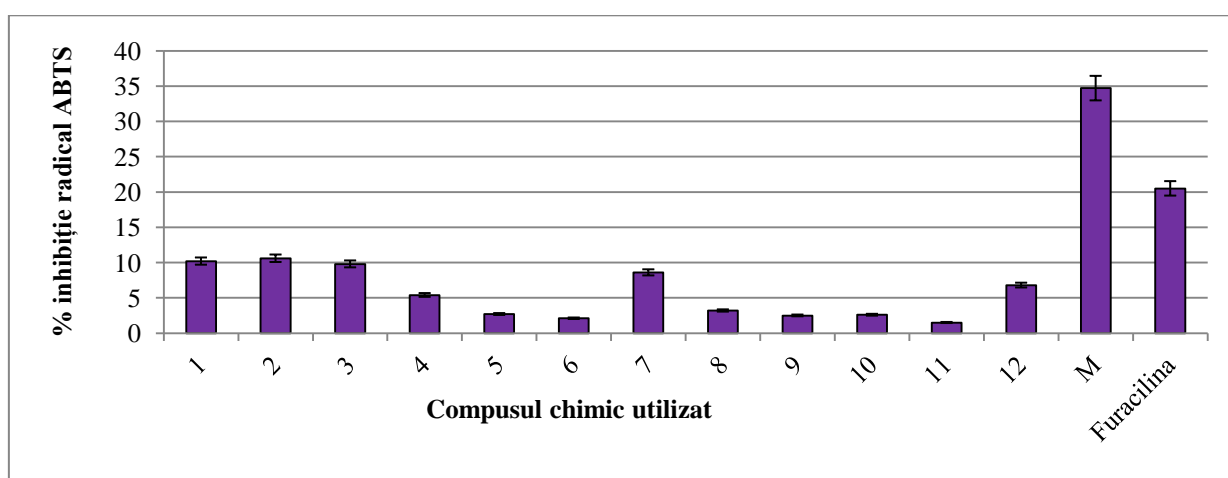


Fig. 4.1. Modificarea capacității antioxidante totale în tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$; 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 6 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 7 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$; 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (2,5); 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (3,4); 10 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (2,4); 11 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 12 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M- cultura netratată.

Este evidentă diminuarea semnificativă a capacității antioxidante totale la stafilococ, atât la tratarea celulelor cu furacilină, cât și la tratarea acestora cu compușii chimici noi selectați. În cazul furacilinei procente de inhibiție a radicalului cation ABTS constituie 59,1% din capacitatea extractului celular de stafilococ neprelucrat cu substanțe antibacteriene. Activitatea antioxidantă totală a extractelor celulare obținute din biomasa de stafilococ tratată cu cei 12 compuși chimici noi selectați a constituit de la 6,1 la 30,5% din capacitatea antioxidantă a matorului. Majoritatea compușilor cu efect maximal în diminuarea capacității antioxidante la stafilococ fac parte din grupul compușilor coordinați de Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tio semicarbazone 2-formilpiridinei (compușii 5, 6, 8-10). De asemenea, a produs o diminuare importantă a capacității antioxidante compusul di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru}.

Având în vedere că acești compuși au demonstrat un nivel înalt de activitate antibacteriană față de cultura de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, valorile CMI și CMB fiind destul de scăzute, această diminuare semnificativă a capacității antioxidante este firească. Am menționat în compartimentul anterior, că acțiunea compușilor cu efect antimicrobian este asociată cu generarea SRO. Diminuarea activității antioxidante totale a culturii sub acțiunea compușilor testați lipsește, de fapt, celulele de posibilitatea de a se proteja de acțiunea deteriorantă a radicalilor liberi. Acest lucru este evident și în cazul furacilinei, deși diminuarea capacității antioxidante totale la acțiunea furacilinei este mai puțin pronunțată.

Pentru cultura de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035 au fost selectați 13 compuși chimici noi cu efect antibacterian înalt. Rezultatele obținute pentru capacitatea antioxidantă totală a lizatelor celulare sunt prezentate în Figura 4.2.

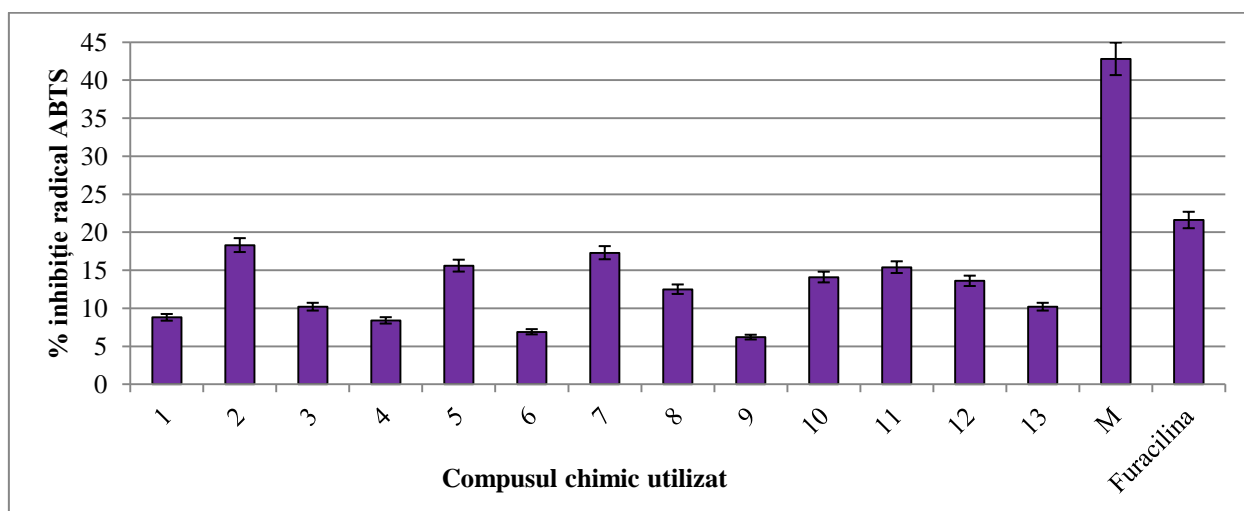


Fig. 4.2. Modificarea capacității antioxidante totale în cultura standard *Bacillus cereus* s ГИСК 8035 sub influența compușilor chimici noi selectați:

1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$; 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 6 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 7 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$; 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (2,5); 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (3,4); 10 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (2,4); 11 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 12 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; 13 - $C_{10}H_{13}CuN_5O_4S_2$; M – martor.

Capacitatea antioxidantă totală în lizatul celular din cultura de *Bacillus cereus* netratată este de 43,8% inhibiție radical cation ABTS. Acest indicator este destul de înalt chiar și pentru extractele din plante, care se consideră cele mai active. Tratarea culturii de *Bacillus cereus* cu furacilina provoacă o diminuare de două ori a capacității antioxidante totale a extractului celular. Și mai puternic scade capacitatea antioxidantă sub influența compușilor chimici noi. Astfel, în funcție de compusul aplicat, capacitatea antioxidantă a lizatelor constituie 14,5-40,4% din capacitatea totală a probei martor. Cel mai pronunțat efect de diminuare a capacității antioxidante a tulpinii de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035 au avut compușii di(μ -S)-

bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat și di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat.

Ambii fac parte din grupul compușilor coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazone 2-formilpiridinei. În cazul tulpinii de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035 se observă o scădere importantă a capacității de înlăturare a radicalilor formați în sistemul biologic, ceea ce denotă incapacitatea culturii de a se proteja eficient în condițiile stresului oxidativ determinat de acțiunea deteriorantă a compușilor chimici noi.

Rezultatele obținute la testarea capacității antioxidante totale a lizatelor din *Shigella sonnei* ATCC 25931 supuse tratării cu dozele egale valorilor CMI a compușilor chimici noi sunt prezentate în Figura 4.3.

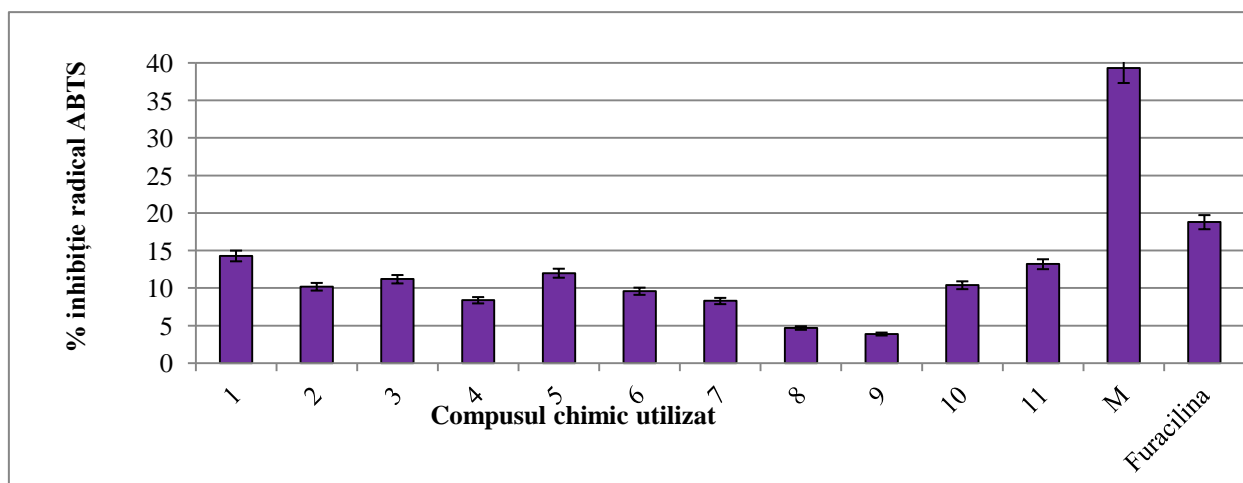


Fig.4.3. Capacitatea antioxidantă totală în cultura standard *Shigella sonnei* ATCC 25931 sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; 4 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 5 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 6 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$; 7 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,5)$; 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(3,4)$; 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,4)$; 10 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 11 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M- cultură netratată.

Și în culturile bacteriene Gram-negative compușii testați au provocat aceleași efecte de scădere a capacității antioxidante totale. Astfel, tulpina de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931 în condiții normale posedă o capacitate de reducere a radicalului cation ABTS de circa 40%, fiind un indicator foarte bun. Nivelul de activitate antioxidantă în biomasa tratată cu furacilina este de peste două ori mai mic și constituie 47,8% din nivelul matorului. Pentru biomasa tratată cu dozele CMI ale compușilor chimici noi valorile obținute variază între 3,9 și 14,3% inhibiție, ceea ce constituie 9,9-36,4% din valorile caracteristice probei mator. Printre cei mai activi compuși cu activitate antibacteriană față de tulpina de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931 se numără di(μ -S)-bis{ nitrato-[2-picoliden-4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru}

tetrahidrat și di(μ -S)-bis{nitrat-[2-picoliden-4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat, ambii reprezentanți ai grupului de compuși ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazone 2-formilpiridinei. Valorile testului ABTS pentru acești doi compuși constituie 4,7 și 3,9% inhibiție radical cation ABTS respectiv. În cazul lor reducerea capacității antioxidante totale a culturii este de 88-90%, ceea ce înseamnă practic blocarea tuturor reacțiilor de protecție celulară și deteriorarea structurală a componentelor micromoleculare cu proprietăți antioxidante. Este clar, că în asemenea condiții stresul oxidativ în cultura analizată este maxim și incompatibil cu realizarea proceselor de asigurare a vitalității celulelor de patogen.

Rezultatele obținute la testarea acțiunii compușilor selectați asupra activității antioxidante a culturii de referință *Escherichia coli* ATCC 25922 sunt prezentate în Figura 4.4.

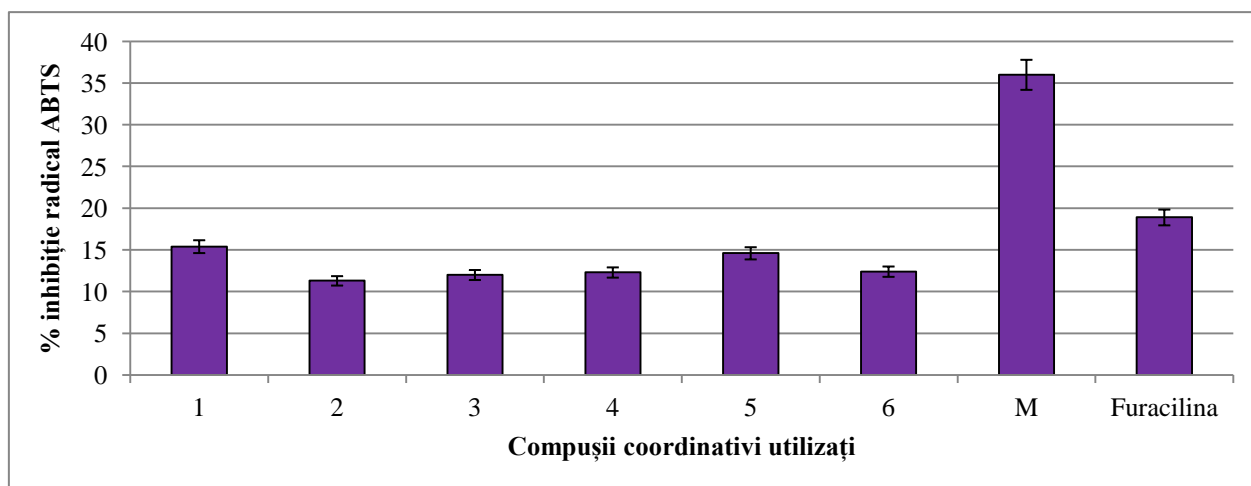


Fig.4.4. Capacitatea antioxidantă totală în cultura standard *Escherichia coli* ATCC 25922 sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$; 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 6 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M-cultura netratată.

Capacitatea de reducere a radicalului cation ABTS de către cultura de *Escherichia coli* în condiții normale constituie 36% inhibiție. În cultura tratată cu furacilină se înregistrează o scădere practic dublă a capacității antioxidante totale, valoarea procentului de inhibiție constituind 18,9 în valori absolute și 52,5%, comparativ cu activitatea probei martor. La tratarea culturii de referință *Escherichia coli* ATCC 25922 cu compușii chimici selectați, de asemenea, avem o scădere veridică a activității antioxidante, dar nu atât de spectaculoasă ca în cazul culturii de *Shigella sonnei*. Așadar, capacitatea de reducere a radicalului cation ABTS în lizatul bacterian obținut din culturile tratate cu compuși chimici noi scade cu 57,6-68,6% față de capacitatea lizatului obținut din biomasa martor. Această reducere este tipică pentru compușii activi față de cultura de *Escherichia coli*. Este necesar de a menționa, că majoritatea lor fac parte

din categoria compușilor Cu(II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide. Și în cadrul testărilor cu alte tulpini de referință valorile testului ABTS au fost la nivele comparabile. Astfel, la cultura de referință *Shigella sonnei* ATCC reducerea capacității antioxidante totale indusă de acești compuși a constituit 28,4-36,4% față de martor.

Cultura de referință *Escherichia coli* păstrează parțial capacitatea de protecție antioxidantă, ceea ce se confirmă și prin experiențele anterioare, în care valorile CMI și CBI ale compușilor activi față de această cultură au fost mai înalte comparativ cu alte culturi luate în studiu. Cu toate acestea, reducerea cu cel puțin 57,3% a capacității antioxidante totale a lizatului bacterian obținut după tratarea culturii cu compuși noi antibacterieni denotă stres oxidativ profund, care afectează serios vitalitatea culturii.

Rezultatele obținute la tratarea culturii de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* FIICK 03/03 y) cu dozele respective ale celor doi compuși activi față de cultura dată sunt prezentate în Figura 4.5.

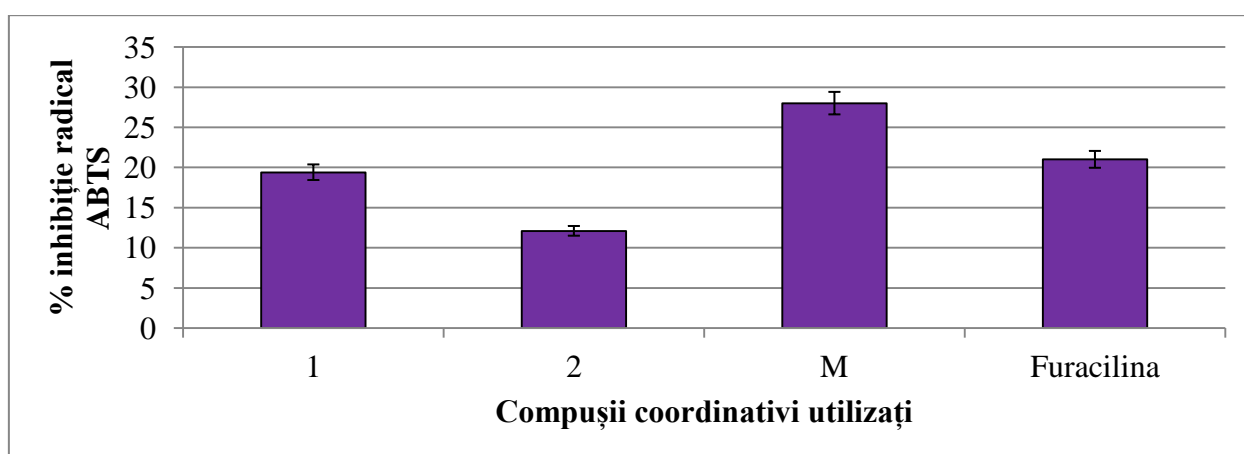


Fig.4.5. Capacitatea antioxidantă totală în cultura standard *Salmonella enterica* (*S. abony* FIICK 03/03 y) sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$;

2 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; M – cultură netratată.

Activitatea antioxidantă totală a culturii de salmonelă în condiții normale constituie 28% inhibiție radical cation ABTS, ceea ce este inferior culturilor analizate anterior. Acțiunea furacilinei asupra culturii conduce la reducerea capacității antiradicalice cu 25% față de martor. Compușii selectați au o influență mai pronunțată, provocând o reducere a capacității antioxidante cu 30,7-56,8% față de proba martor. Din rezultatele obținute putem presupune, că cultura de salmonelă este capabilă de a asigura homeostazia statutului antioxidant, ceea ce o face mai puțin vulnerabilă la acțiunea compușilor, care față de alte tulpini de referință se manifestă ca substanțe antibacteriene performante.

Din analiza rezultatelor prezentate mai sus putem menționa, că compușii selectați produc o reducere substanțială a capacității antioxidante totale în culturile de referință luate în studiu. Cele mai vulnerabile din punctul de vedere al instalării stresului oxidativ de înaltă intensitate sunt culturile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 și *Bacillus cereus* ГИСК 8035, cea mai rezistentă fiind cultura de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y).

4.3. Modificarea indicatorilor stresului oxidativ în culturile de microorganisme patogene sub influența compușilor chimici noi

La instalarea condițiilor de stres oxidativ de intensitate înaltă în sistemele vii încep numeroase procese de denaturare a biopolimerilor, multe dintre ele fiind ireversibile. Astfel, procesul de peroxidare a lipidelor, care decurge după modelul reacțiilor în lanț, este una dintre reacțiile, care conduc la moartea culturii celulare. Lipidele constituie baza structurală și funcțională a membranelor biologice, iar oxidarea lor conduce la deteriorarea mecanică a barierelor biologice și membranelor funcționale, ceea ce afectează procesul de comunicare a celulei cu mediul înconjurător, dar și reacțiile metabolice normale. Acumularea în mediul de reacție a produselor finale ale degradării lipidelor denotă despre modificări ireversibile în starea celulelor, foarte des incompatibile cu viața acestora. Dialdehida malonică este unul dintre produsele finale ale procesului de oxidare în lanț a lipidelor, iar nivelul ei este un marker al stării de stres oxidativ suportat de celulă. În cercetările noastre acesta este, de asemenea, un indicator foarte important, care în corelare cu diminuarea capacității antioxidante totale indică asupra intensității stresului oxidativ.

De asemenea, a fost monitorizat și nivelul peroxidului de hidrogen format sub influența compușilor testați. Am menționat în compartimentul 4.1, că formarea excesivă a peroxidului de hidrogen este primul pas în generarea stresului oxidativ sub influența compușilor cu efecte antibacteriene. Testul respectiv este destul de dificil din punct de vedere tehnic, pornind de la reactivitatea înaltă a produsului format și de la durata scurtă de viață. Obținerea unor rezultate veridice necesită omogenizarea și sincronizarea perfectă a tuturor etapelor de analiză. În lucrare sunt prezentate datele obținute cu referire la nivelul de peroxid de hidrogen în culturile afectate de acțiunea compușilor chimici selectați, dar și în culturile menținute în condiții normale.

Rezultatele care reflectă nivelul DAM și H₂O₂ în cultura de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sunt prezentate în Figura 4.6.

Nivelul peroxidului de hidrogen în cultura tratată cu furacilină a crescut cu 17,2% față de nivelul respectiv în proba martor, în timp ce creșterea cantitativă a dialdehidei malonice a fost de 44,3%. Diferențele față de martor sunt statistic veridice, ceea ce confirmă acțiunea antibacteriană

a antisepticului de referință. În variantele experimentale obținute la tratarea culturii de stafilococ cu compușii chimici noi selectați a fost obținut un nivel al peroxidului de hidrogen care îl depășește pe cel din proba martor cu până la 37,7%. Pentru doi dintre compușii testați (compusul 8 și 9) diferența față de proba martor nu este veridică din punct de vedere statistic.

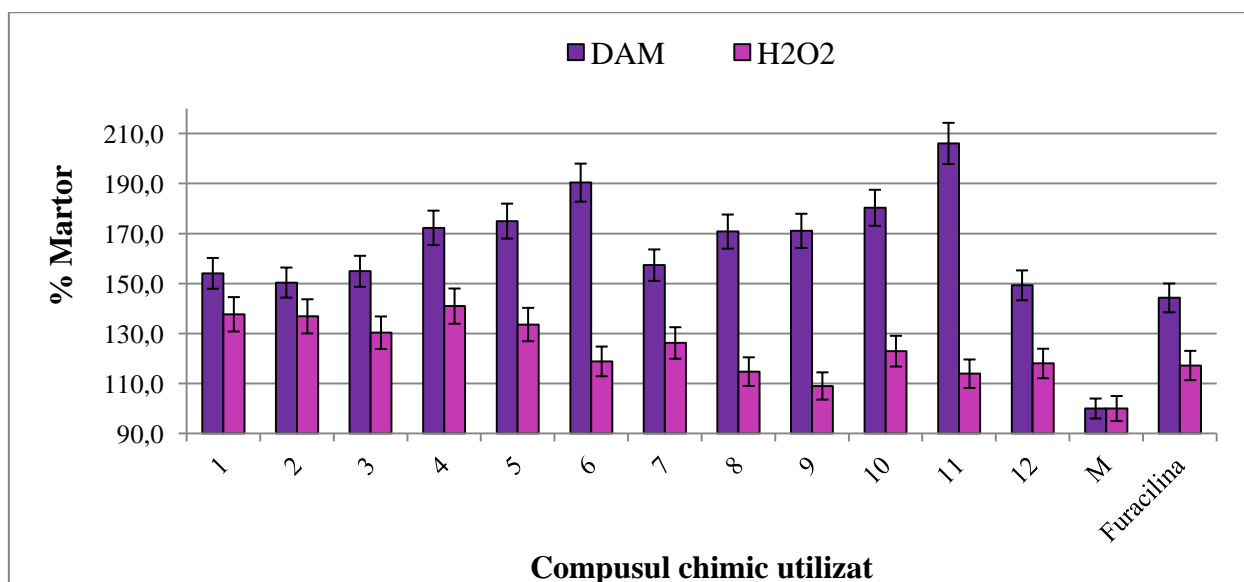


Fig.4.6. Cantitatea dialdehidei malonice și a peroxidului de hidrogen în cultura standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sub influența compușilor chimici noi selectați:
 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$; 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$;
 5 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$ (2,5); 6 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (3,4); 7 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$ (2,4);
 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 10 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 11 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$;
 12 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$.

Nivelul dialdehidei malonice la tratarea cu furacilină în cultura de stafilococ a crescut cu 44,3% față de martor, iar în culturile tratate cu dozele respective de compuși chimici noi – cu 50,4-106,1% față de martor. Toate probele experimentale se deosebesc veridic de proba martor la nivelul intervalului de încredere de 99%. Astfel, rezultatele testului de determinare a DAM confirmă instalarea unei stări de stres oxidativ pronunțat în cultura de stafilococ sub influența compușilor chimici noi cu efect antibacterian.

Rezultatele testelor H_2O_2 și DAM obținute în experiențele asupra culturii de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035 sunt prezentate în Figura 4.7.

Spre deosebire de cultura de stafilococ, la *Bacillus cereus* pentru toți compușii luați în studiu se înregistrează o creștere statistic veridică față de proba martor a conținutului de peroxid de hidrogen în lizatul celular. În cazul furacilinei creșterea constituie 21,4%, iar în cazul compușilor noi testați valorile ce depășesc martorul constituie 26,8-58,3%. Și conținutul dialdehidei malonice crește veridic comparativ cu martorul. În cazul furacilinei cantitatea de

DAM crește cu 52,4%, iar în cazul compușilor noi testați peroxidarea lipidelor a fost cu 45,0-95,5% mai intensă decât în cazul matorului.

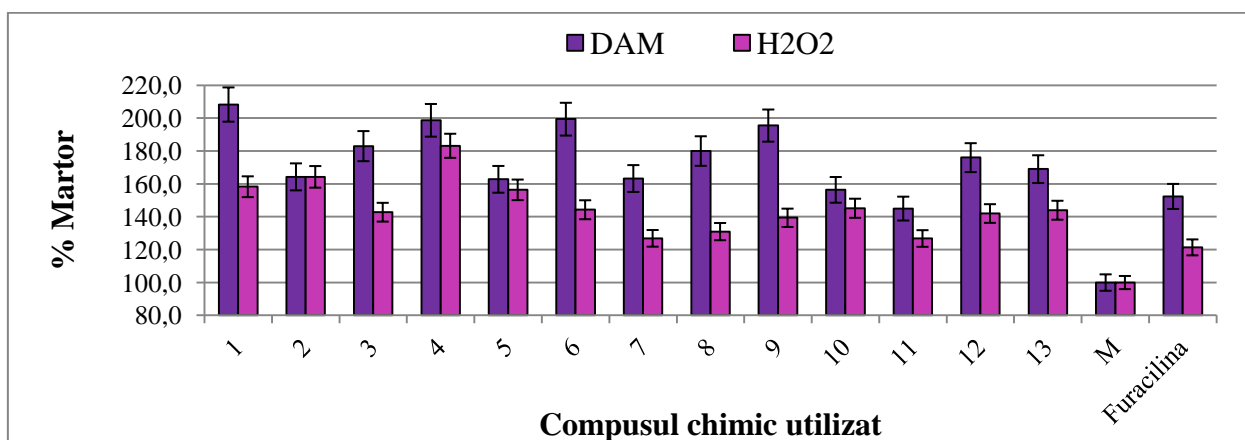


Fig.4.7. Cantitatea dialdehidei malonice și a peroxidului de hidrogen în cultura standard *Bacillus cereus* ГИСК 8035 sub influența compușilor chimici noi selectați:

- 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$;
 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 6 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 7 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$;
 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,5)$; 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(3,4)$; 10 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,4)$;
 11 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 12 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; 13 - $C_{10}H_{13}CuN_5O_4S_2$; M- cultura netratată.

Cultura de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931 s-a manifestat asemănător celei de *Bacillus cereus*. Rezultatele sunt prezentate în Figura 4.8.

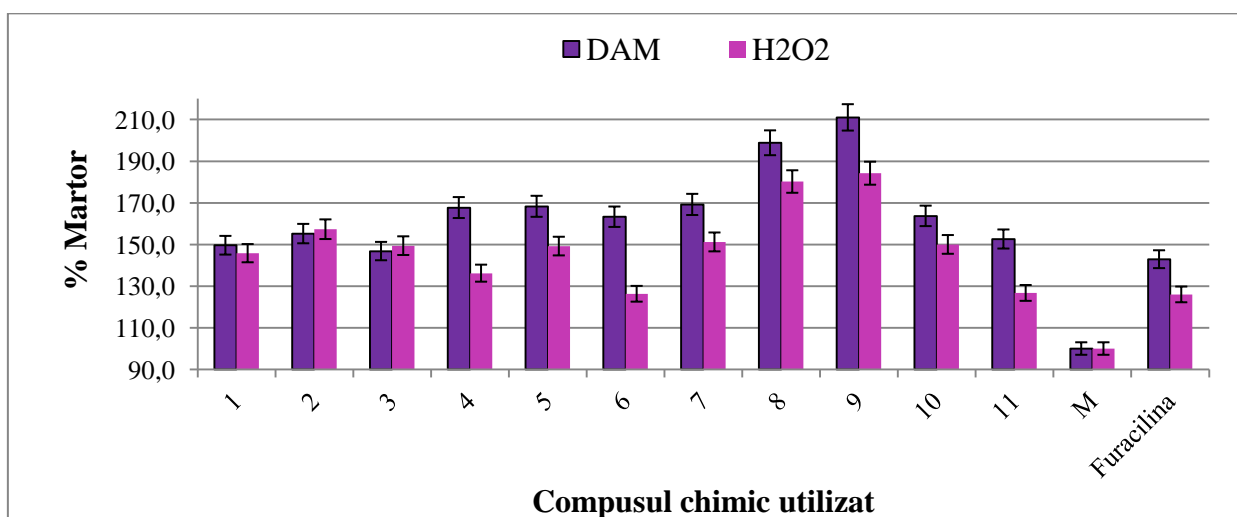


Fig.4.8. Cantitatea dialdehidei malonice și a peroxidului de hidrogen în cultura standard *Shigella sonnei* ATCC 25931 sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$;
 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; 4 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 5 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$;
 6 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$; 7 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,5)$; 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(3,4)$;
 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,4)$; 10 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 11 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M- cultura netratată.

Nivelul peroxidului de hidrogen în biomasă de *Shigella sonnei* ATCC 25931 crește la acțiunea furacilinei cu 26%, iar la acțiunea compușilor chimici noi testați – cu 26,3-57,3%. Diferența dintre valorile probelor experimentale și proba martor pentru peroxidul de hidrogen sunt veridice la nivelul intervalului de încredere de 99% (compușii 7-9) și 95% pentru ceilalți. Nivelul dialdehidei malonice în biomasa de *Shigella sonnei* la tratarea cu furacilină crește cu 42,9% ,comparativ cu martorul, iar în cazul compușilor chimici noi testați – cu 49,6-211,0%.

Compușii cu activitate maximală fac parte din grupul compușilor de Cu (II) cu 4-(dimetilfenil)tio semicarbazona 2-formilpiridinei. În cazul lor procesul de peroxidare a lipidelor și acumularea produselor finale practic se dublează. Aceasta indică asupra unei stări de stres oxidativ pronunțat, fapt confirmat atât de testele de stabilire a activității antimicrobiene, cât și de testul ABTS, care arată o diminuare drastică a capacității antioxidante a culturii.

Din șirul compușilor chimici noi testați au manifestat activitate antibacteriană la un nivel suficient de înalt față de cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922 șase compuși noi. Rezultatele ce reflectă acumularea produselor de peroxidare lipidică și a peroxidului de hidrogen în cultura respectivă sub acțiunea agenților antibacterieni sunt prezentate în Figura 4.9.

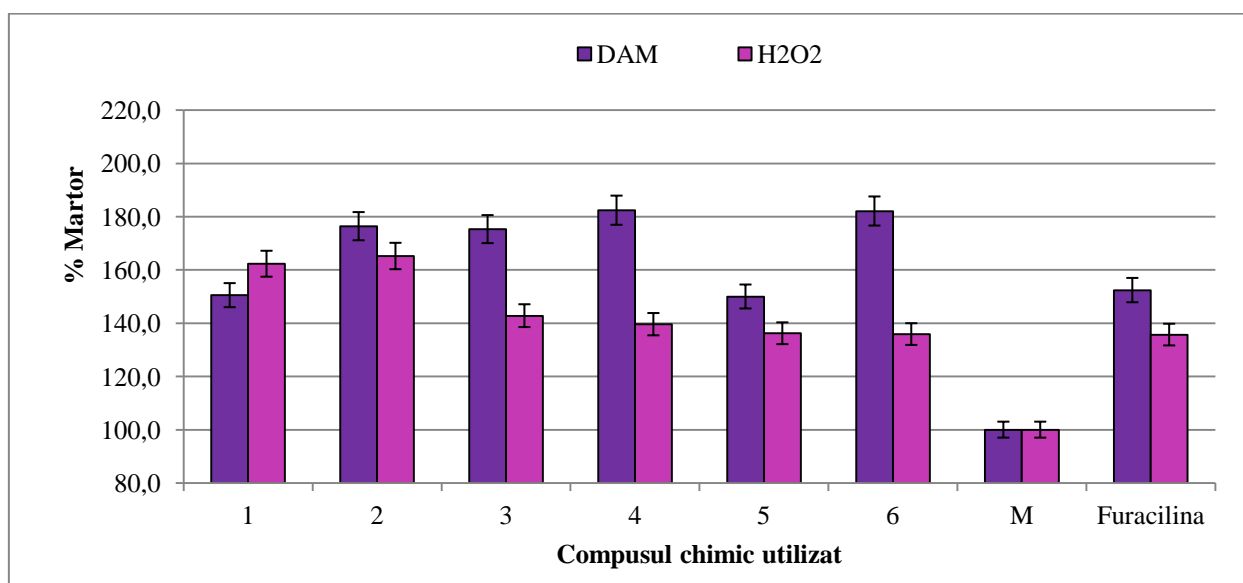


Fig.4.9. Cantitatea dialdehidei malonice și a peroxidului de hidrogen în cultura standard *Escherichia coli* ATCC 25922 sub influența compușilor chimici noi selectați:

1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$;
 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 6 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M - cultura netratată.

Sub acțiunea furacilinei nivelul peroxidului de hidrogen crește cu 39%, iar cel al dialdehidei malonice – cu 52% față de proba martor. Și în variantele cu adaos ale compușilor chimici noi selectați în toate variantele se înregistrează o creștere substanțială a nivelului de

peroxid de hidrogen (cu până la 62%) și de dialdehidă malonică (cu până la 81%). Diferențele înregistrate între fiecare dintre probele experimentale și proba martor sunt veridice din punct de vedere statistic la nivelul intervalului de încredere de 95%.

În Figura 4.10 sunt prezentate rezultatele ce reflectă modificarea nivelului DAM și H₂O₂ în cultura de *Salmonella enterica* la acțiunea compușilor noi antibacterieni.

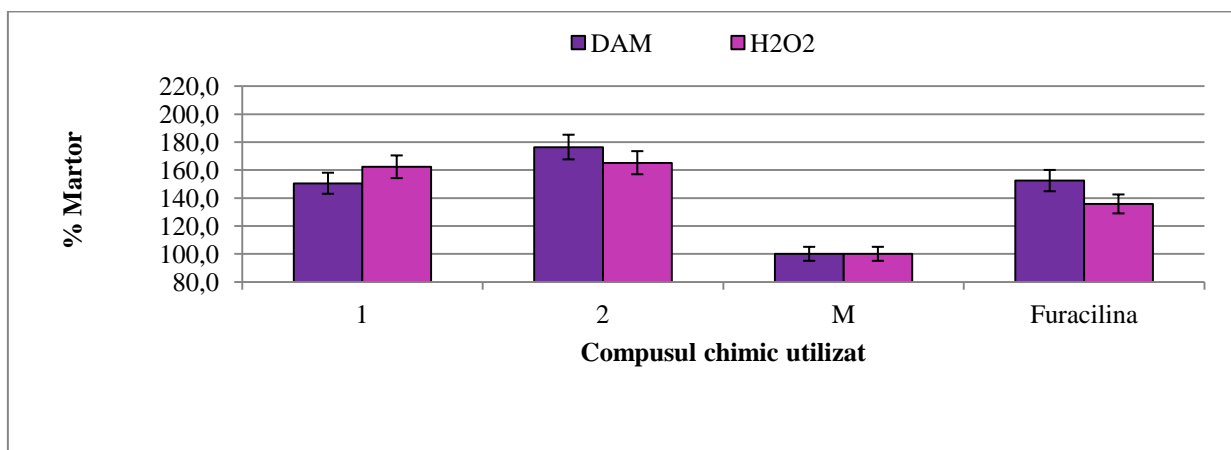


Fig.4.10. Cantitatea dialdehidei malonice și a peroxidului de hidrogen în cultura standard *Salmonella enterica* (*S. abony* FIICK 03/03 y) sub influența compușilor chimici noi selectați:

1 - C₃₈H₃₈Cu₂N₁₄O₁₀S₄; 2 - C₄₄H₄₀Cl₂Cu₂N₁₄O₄S₆; M - cultura netratată.

Sub acțiunea furacilinei are loc o creștere a nivelului de peroxid de hidrogen cu 35,7% față de martor, iar a DAM – cu 52,4%. Sub influența compușilor testați conținutul peroxidului de hidrogen este cu 62,3 și 65,2% mai mult, iar conținutul DAM – cu 50,5 și 76,4% mai mult decât în cultura martor.

Astfel, în cazul tuturor celor cinci culturi de referință incluse în studiu a fost constatată creșterea semnificativă a produselor peroxidării lipidice, ceea ce semnaleză condiții de stres oxidativ intens. Pentru a confirma acest lucru a fost realizată analiza corelațională dintre rezultatele testului ABTS și testului DAM. Corelarea negativă înaltă dintre acești doi parametri ar confirma cu certitudine prezența stresului oxidativ generat de prezența compușilor chimici noi testați în culturile de referință studiate. Analiza corelațională nu a fost realizată pentru cultura de salmonelă din cauza numărului mic de variante de compuși incluse în studiu.

Rezultatele analizei corelaționale dintre valorile testului de reducere a radicalului cation ABTS și valorile testului DAM pentru cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sunt prezentate în Figura 4.11.

Din figură se vede că între acești doi parametri există o corelare negativă strânsă. Ecuația de regresie obținută și valoarea coeficientului de determinare $R^2 = 0,8198$ ce provine din coeficientul de corelare $r=0,9054$ denotă modificarea în tandem a celor doi indicatori.

Astfel, putem afirma cu siguranță, că în prezența compușilor chimici noi testați în cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se atestă o stare de stres oxidativ pronunțat. Stresul oxidativ generat de prezența compușilor cu efecte antibacteriene cauzează deteriorări majore ale integrității celulare, atât la nivel de defecte mecanice, cât și la nivel metabolic. Ca urmare cultura de stafiloc pierde capacitatea de a contracara procesul de acumulare exacerbată a radicalilor liberi, iar deteriorarea ireversibilă a structurilor membranare ia amploare și generează distrugerea culturii de patogen.

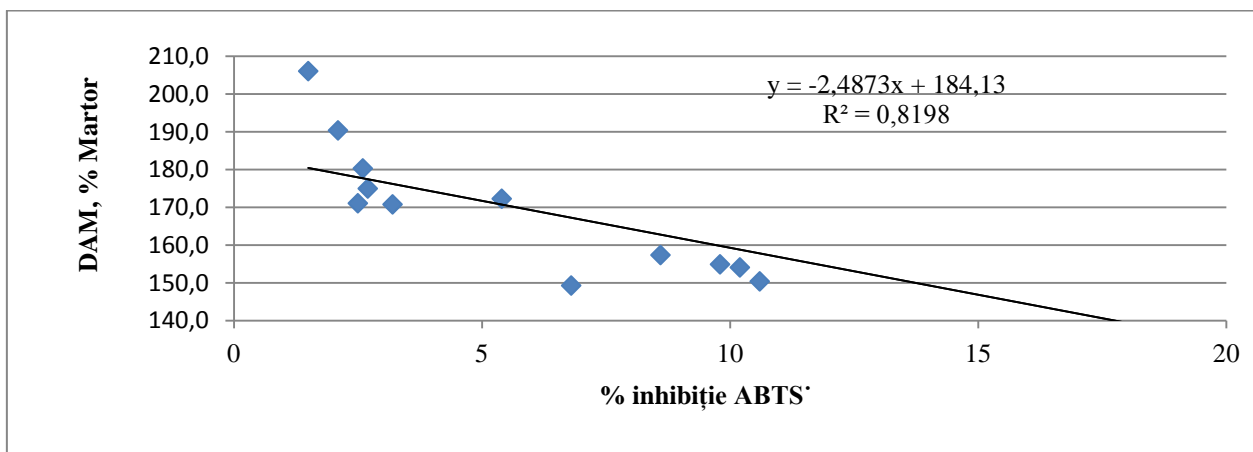


Fig. 4.11. Corelarea dintre valoarea capacității antioxidante totale și nivelul dialdehidei malonice în cultură la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Rezultatele analizei corelaționale dintre valorile testului de reducere a radicalului cation ABTS și valorile testului DAM pentru cultura de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 sunt prezentate în Figura 4.12. Din figură se vede că între acești doi parametri există o corelare negativă strânsă. Ecuația de regresie obținută și valoarea coeficientului de determinare $R^2 = 0,7714$ ce provine din coeficientul de corelare $r=0,8782$ denotă modificarea în tandem a celor doi indicatori.

Astfel, putem afirma cu siguranță, că în prezența compușilor chimici noi testați în cultura de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 se atestă o stare de stres oxidativ pronunțat.

Rezultatele analizei corelaționale dintre valorile testului de reducere a radicalului cation ABTS și valorile testului DAM pentru cultura de *Shigella sonnei* ATCC 25931 sunt prezentate în Figura 4.13. Din figură se vede că între acești doi parametri există o corelare negativă strânsă. Ecuația de regresie obținută și valoarea coeficientului de determinare $R^2 = 0,7935$ ce provine din coeficientul de corelare $r=0,8908$ denotă modificarea în tandem a celor doi indicatori.

Astfel, putem afirma cu siguranță, că în prezența compușilor chimici noi testați în cultura de *Shigella sonnei* ATCC 25931 se atestă o stare de stres oxidativ pronunțat.

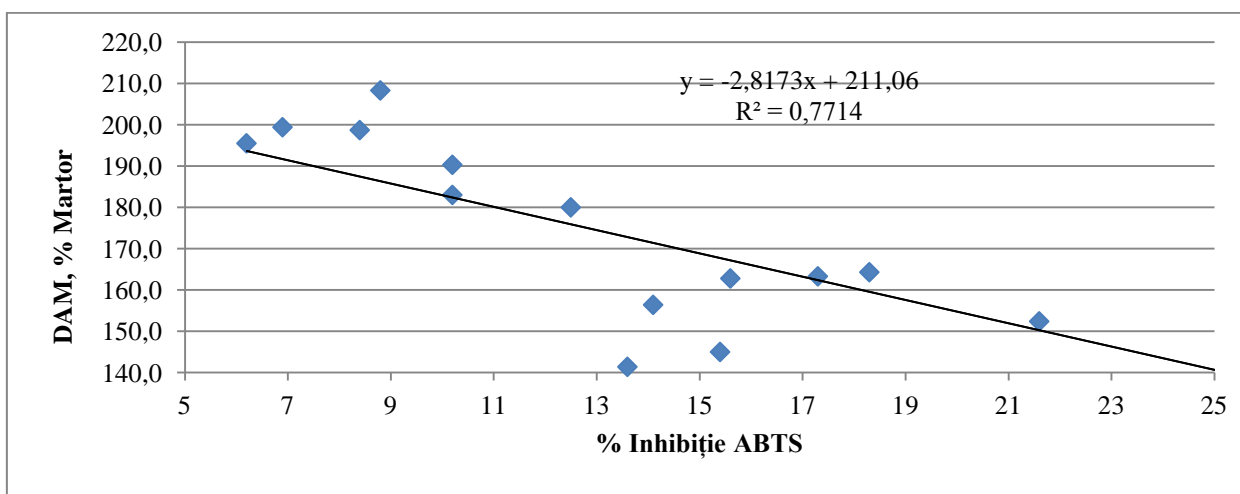


Fig. 4.12. Corelarea dintre valoarea capacității antioxidante totale și nivelul dialdehidei malonice în cultură la *Bacillus cereus* ГИСК 8035.

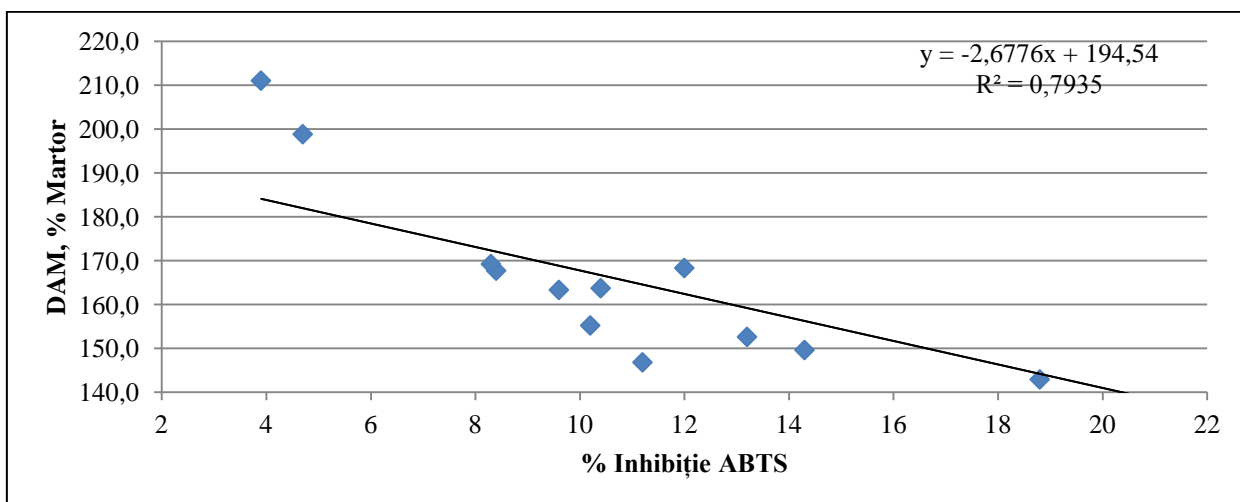


Fig. 4.13. Corelarea dintre valoarea capacității antioxidante totale și nivelul dialdehidei malonice în cultură la *Shigella sonnei* ATCC 25931.

Rezultatele analizei corelaționale dintre valorile testului de reducere a radicalului cation ABTS și valorile testului DAM pentru cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922 sunt prezentate în Figura 4.14.

Din figură se vede că între acești doi parametri există o corelare negativă strânsă. Ecuația de regresie obținută și valoarea coeficientului de determinare $R^2 = 0,8209$ ce provine din coeficientul de corelare $r=0,9060$ denotă modificarea în tandem a celor doi indicatori. Astfel, putem afirma cu siguranță, că în prezența compușilor chimici noi testați în cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922 se atestă o stare de stres oxidativ pronunțat.

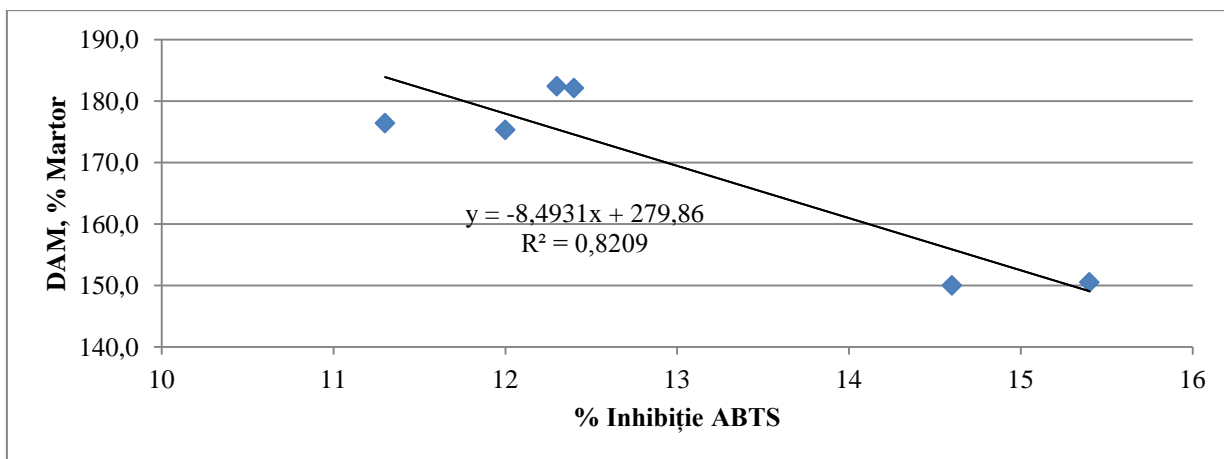


Fig. 4.14. Corelarea dintre valoarea capacității antioxidante totale și nivelul dialdehidei malonice în cultură la *Escherichia coli* ATCC 25922.

La finele analizei prezentate mai sus menționăm, că sub acțiunea compușilor chimici noi testați în toate culturile de referință se atestă o diminuare pronunțată a capacității antioxidante totale și o creștere semnificativă a nivelului de acumulare a produselor peroxidării lipidice. Corelarea inversă strânsă cu valori înalte a coeficientului de determinare dintre acești doi parametri confirmă starea de stres oxidativ de intensitate înaltă, cauzat de acțiunea antibacteriană a compușilor noi testați.

4.4. Activitatea enzimelor antioxidante în culturile de referință la acțiunea compușilor chimici noi

Enzimele antioxidante primare – superoxidismutaza (SOD), catalaza (CT) sunt compuși proteici care se implică direct în procesul de înlăturare a radicalilor liberi formați în celule.

SOD are drept funcție neutralizarea radicalului superoxid. Rolul protector al SOD la culturile de microorganisme patogene este demonstrat atât în procesul de protecție a celulelor pe durata realizării proceselor aerobe, cât și pe durata infestării macroorganismelor. Sinteza activă a SOD și creșterea activității asigură supraviețuirea organismului în condiții de stres oxidativ. Conținutul înalt al SOD în biomasă este un marker biologic al unei stări de stres oxidativ moderat, iar reducerea nivelului enzimei sub cel normal este un indicator al unui stres oxidativ profund. Activitatea catalazei asigură eliminarea peroxidului de hidrogen format atât ca urmare a proceselor normale, cât și ca rezultat al influenței factorilor nocivi. Catalaza este una dintre enzimele pentru care concentrația substratului nu este un factor limitativ pentru activitatea CT. Chiar și în condiții de supraacumulare a peroxidului CT continuă să fie activă. În condițiile stresului oxidativ moderat în celule se înregistrează o creștere semnificativă a acțiunii CT și

doar în condiții de stres oxidativ foarte intens, de degradare a moleculelor proteice are loc o scădere a nivelului de activitate a CT.

Pentru a aprecia modificările statutului antioxidant al culturilor de microorganisme patogene sub influența compușilor noi testați a fost determinată activitatea enzimelor SOD și CT. Rezultatele pentru *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sunt prezentate în Figura 4.15.

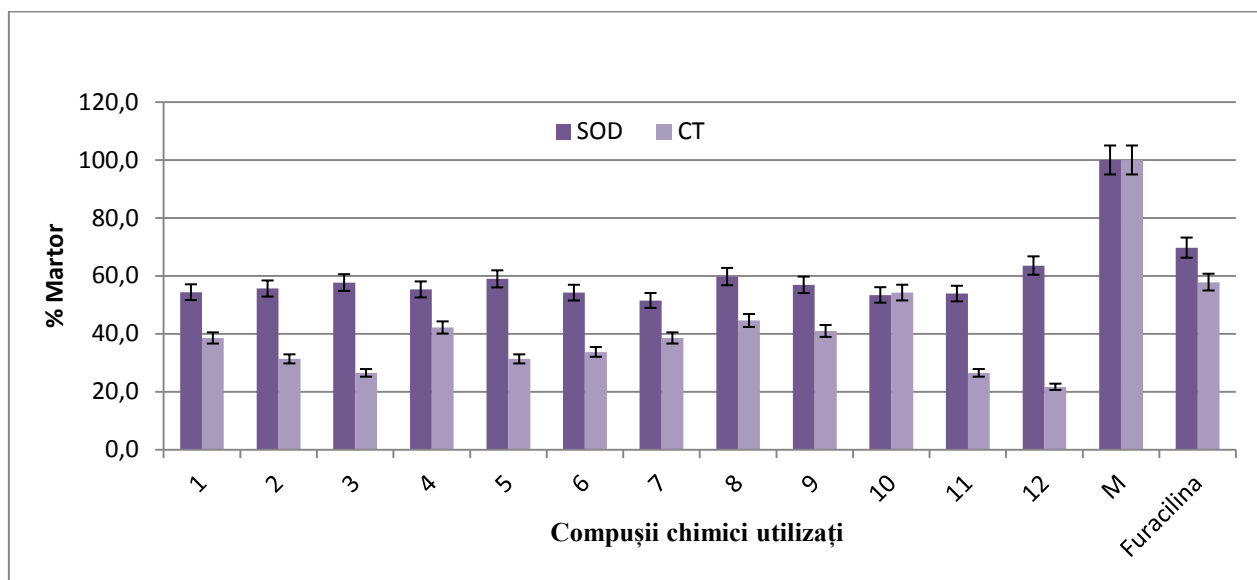


Fig. 4.15. Modificarea activității enzimelor antioxidante în tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$; 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 6 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 7 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$; 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,5)$; 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(3,4)$; 10 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,4)$; 11 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 12 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M - cultura netratată.

Sub acțiunea furacilinei are loc o reducere cu 42,2% a activității catalazei și cu 30,3% a superoxidismutazei comparativ cu biomasa de stafilococ obținută în condiții normale. Nivelul de activitate a SOD în cultură la acțiunea compușilor chimici noi constituie 51,5-63,5% din activitatea normală caracteristică stafilococului. Diferența dintre valoarea activității SOD în cultura martor și cultura tratată cu concentrațiile minime inhibitorii ale compușilor testați (în cazul tuturor celor 12 compuși testați) este veridică din punct de vedere statistic la nivelul de semnificație de 99%, la fel se deosebește de martor și cultura tratată cu furacilină. În același timp, între activitatea SOD în cultura tratată cu furacilină și cele tratate cu compuși chimici noi nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic.

Nivelul de activitate al catalazei în culturile tratate cu compuși chimici noi este și mai jos decât cel al superoxidismutazei și constituie 21,7-44,6% din nivelul tipic de activitate în cultura intactă. Diferențele dintre activitatea catalazei la cultura martor și la culturile tratate (cu

furacilină și compuși) este statistic veridică la nivelul de semnificație 95-99% în funcție de caz. În cazul compușilor di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru}, cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoamido]cupru asupra și di(μ -S)-bis{cloro-[2-picoliden-4-(2,6-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru}tetrahidrat există diferență statistic veridică (95%) între activitatea catalazei în lizatul celular al culturii tratate cu furacilină și lizatul celular al culturilor tratate cu CMI a compușilor respectivi. Fluctuațiile valorice ale activității superoxidismutazei și catalazei sunt o confirmare a unui stres oxidativ de intensitate înaltă pentru cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 în condițiile influenței compușilor chimici noi cu activitate antibacteriană.

Rezultatele care reflectă nivelul de activitatea a enzimelor antioxidante SOD și CT la acțiunea compușilor chimici noi asupra culturii de referință *Bacillus cereus* ГИСК 8035 sunt prezentate în Figura 4.16.

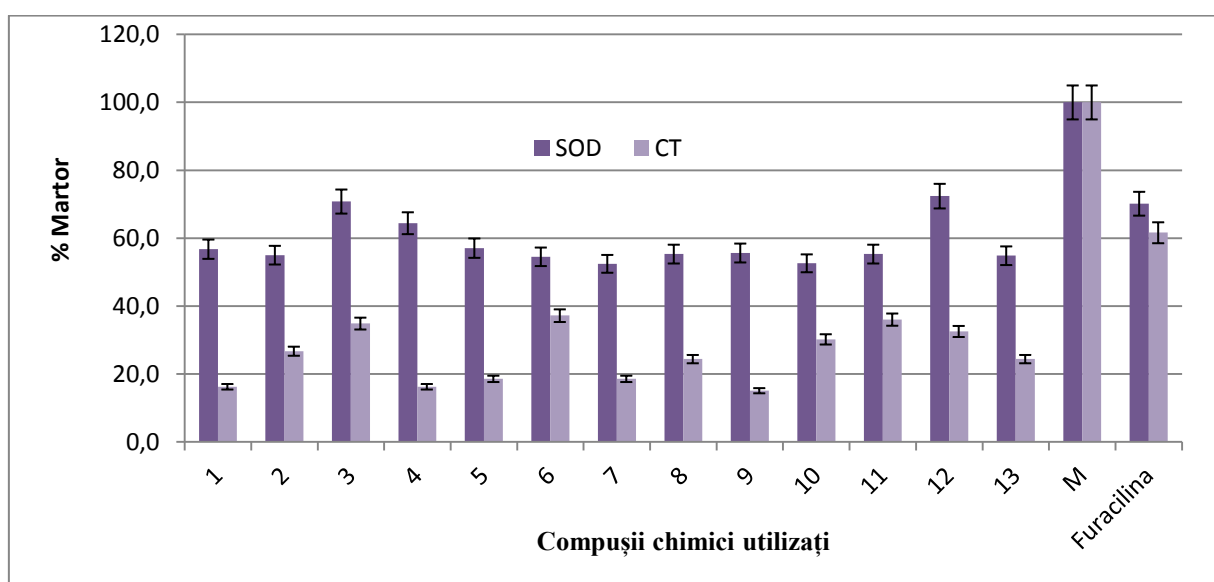


Fig.4.16. Modificarea activității enzimelor antioxidante în cultura standard *Bacillus cereus* s ГИСК 8035 sub influența compușilor chimici noi selectați:

- 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$;
 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 6 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 7 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$;
 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (2,5); 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (3,4); 10 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$ (2,4);
 11 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 12 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; 13 - $C_{10}H_{13}CuN_5O_4S_2$. M- cultura netratată.

Sub acțiunea furacilinei are loc o reducere cu 38,4% a activității catalazei și cu 29,8% a superoxidismutazei, comparativ cu biomasa de stafilococ obținută în condiții normale. Nivelul de activitate a SOD în cultură la acțiunea compușilor chimici noi constituie 52,6-72,4% din activitatea normală caracteristică culturii de *Bacillus*. Diferențele înregistrate între activitatea

SOD la martor și la variantele tratate cu compușii selectați cu activitate antibacteriană față de cultura de bacili sunt semnificative din punct de vedere statistic, la fel și față de activitatea SOD în cultura tratată cu furacilină.

Nivelul de activitate al catalazei în biomasa patogenului tratat cu concentrațiile MI ale celor 13 compuși selectați constituie 16,3-37,2% din nivelul tipic de activitate în cultura intactă. Diferența dintre activitatea CT în biomasa martor și cea tratată este semnificativă statistic la nivelul de semnificație 99%. Aceste fluctuații sunt o confirmare a unui stres oxidativ de intensitate înaltă pentru cultura de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 în condițiile influenței compușilor chimici noi cu activitate antibacteriană.

Rezultatele care reflectă nivelul de activitate a enzimelor antioxidante SOD și CT la acțiunea compușilor chimici noi asupra culturii de referință *Shigella sonnei* ATCC 25931 sunt prezentate în Figura 4.17.

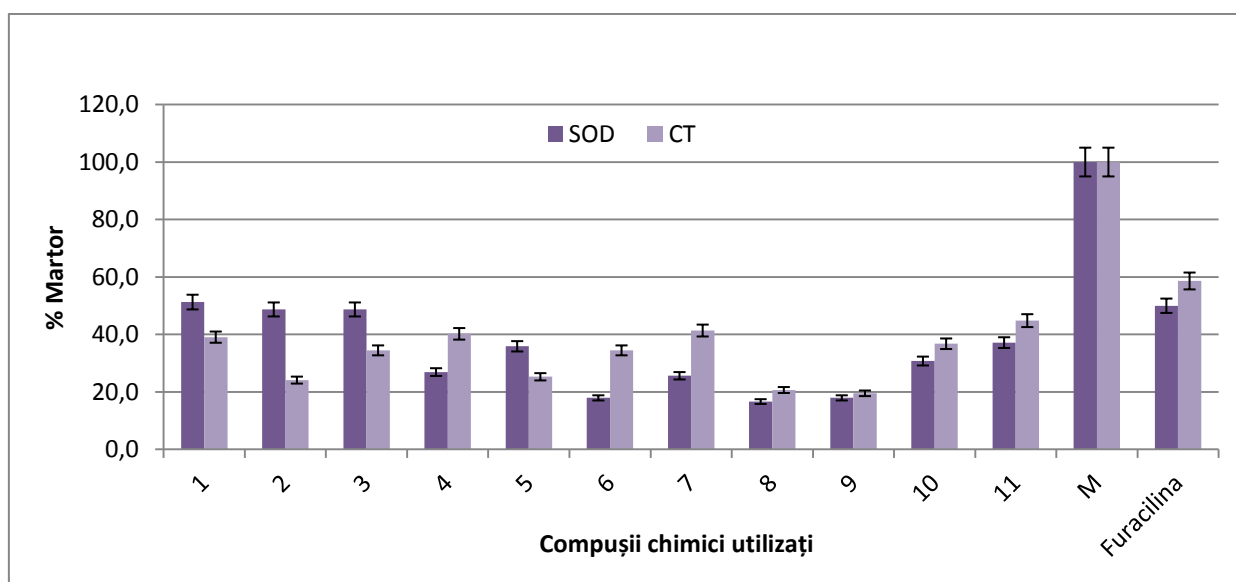


Fig.4.17. Modificarea activității enzimelor antioxidante în cultura standard *Shigella sonnei* ATCC 25931 sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{42}H_{42}Cu_2N_{14}O_{12}S_4$; 3 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; 4 - $C_{15}H_{19}ClCuN_4O_2S$; 5 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S$; 6 - $C_{15}H_{17}ClCuN_4OS$; 7 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,5)$; 8 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(3,4)$; 9 - $C_{15}H_{19}CuN_5O_5S(2,4)$; 10 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 11 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M - cultura netratată.

Sub acțiunea furacilinei are loc o reducere cu 41,4% a activității catalazei și cu 50,0% a superoxidismutazei, comparativ cu biomasa de *Shigella sonnei* obținută în condiții normale. Nivelul de activitate a SOD în cultură la acțiunea compușilor chimici noi constituie 17,9-48,7% din activitatea normală caracteristică patogenului. Nivelul de activitate a catalazei constituie 19,5-44,8% din nivelul tipic de activitate în cultura intactă. Valorile activității enzimelor

antioxidante primare în lizatul celular obținut din cultura tratată cu furacilină și cu CMI ale compușilor chimici noi selectați sunt o confirmare a unui stres oxidativ de intensitate înaltă pentru cultura de *Shigella sonnei* ATCC 25931 în condițiile influenței compușilor chimici noi cu activitate antibacteriană. În special se evidențiază doi compuși, și anume di(μ -S)-bis{nitrato-[2-picoliden-4-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat și di(μ -S)-bis{nitrato-[2-picoliden-4-(2,4-dimetilfenil)tiosemicarbazido-(1-)]cupru} tetrahidrat, la acțiunea cărora are loc cea mai semnificativă reducere atât a activității SOD, cât și a activității CT. Valorile obținute la tratarea culturii de patogen cu acești doi compuși sunt de 5 ori mai joase decât activitatea enzimelor antioxidante în lizatul culturii martor.

Rezultatele care reflectă nivelul de activitate a enzimelor antioxidante SOD și CT la acțiunea compușilor chimici noi asupra culturii de referință *Escherichia coli* ATCC 25922 sunt prezentate în Figura 4.18.

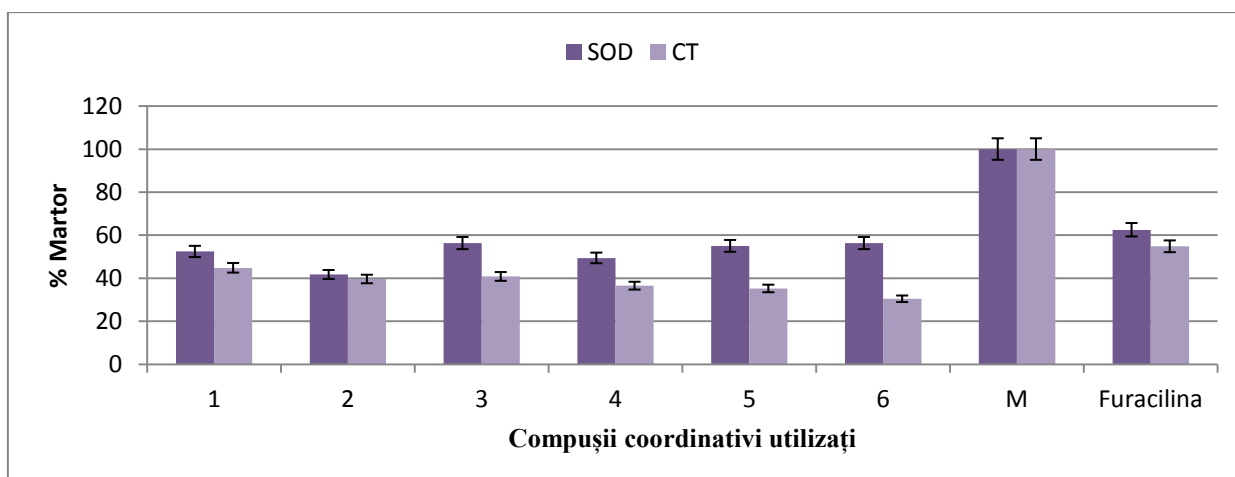


Fig.4.18. Modificarea activității enzimelor antioxidante în cultura standard *Escherichia coli* ATCC 25922 sub influența compușilor chimici noi selectați: 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; 3 - $C_{46}H_{46}Cu_2N_{18}O_{10}S_6$; 4 - $C_{46}H_{42}Cu_2N_{18}O_{10}S_4$; 5 - $C_{18}H_{22}Cl_2Cu_2N_8S_2$; 6 - $C_9H_{11}ClCuN_4S$; M- cultura netratată.

Sub acțiunea furacilinei are loc o reducere cu 45,2% a activității catalazei și cu 37,5% a superoxidismutazei, comparativ cu biomasa de *Escherichia coli* obținută în condiții normale. Nivelul de activitate a SOD în cultură la acțiunea compușilor chimici noi constituie 41,7-56,3% din activitatea normală caracteristică pentru *E.coli*, diferență veridică din punct de vedere statistic ($p < 0,01$). Nivelul de activitate a catalazei este și mai jos și constituie 30,4-44,8% din nivelul tipic de activitate în cultura intactă. Ca și în cazul SOD diferențele dintre activitatea enzimei în biomasa martor și biomasa tratată cu furacilină ori compușii selectați este veridică la același nivel al semnificației. Rezultatele obținute sunt o confirmare a unui stres oxidativ de

intensitate înaltă pentru cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922 în condițiile influenței compușilor chimici noi cu activitate antibacteriană. În cazul acestei culturi de referință nu putem evidenția careva dintre cei 6 compuși selectați, deoarece influența lor asupra activității enzimelor antioxidante este foarte apropiată de la caz la caz.

Rezultatele care reflectă nivelul de activitate a enzimelor antioxidante SOD și CT la acțiunea compușilor chimici noi asupra culturii de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* *FIICK* 03/03 y) sunt prezentate în Figura 4.19.

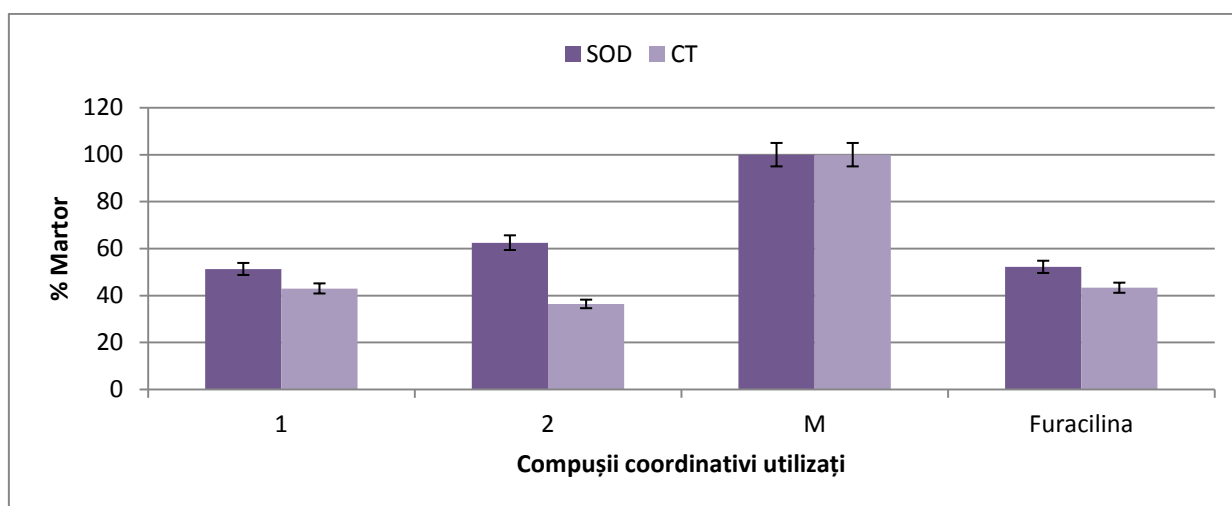


Fig.4.19. Modificarea activității enzimelor antioxidante în cultura standard *Salmonella enterica* (*S. abony* *FIICK* 03/03 y) sub influența compușilor chimici noi selectați:
 1 - $C_{38}H_{38}Cu_2N_{14}O_{10}S_4$; 2 - $C_{44}H_{40}Cl_2Cu_2N_{14}O_4S_6$; M- cultura netratată.

Sub acțiunea furacilinei are loc o reducere cu 56,7% a activității catalazei și cu 47,8% a superoxididismutazei, comparativ cu biomasa de salmonelă obținută în condiții normale. Nivelul de activitate a SOD în cultură la acțiunea compușilor chimici noi constituie 51,3 și 62,5% din activitatea normală caracteristică stafilococului. Nivelul de activitate a catalazei este și mai jos și constituie 43,0 și 36,4% din nivelul tipic de activitate în cultura intactă. Aceste fluctuații sunt o confirmare a unui stres oxidativ de intensitate înaltă pentru cultura de *Salmonella enterica* (*S. abony* *FIICK* 03/03 y) în condițiile influenței compușilor chimici noi cu activitate antibacteriană.

Este cunoscut faptul că enzimele catalaza și superoxididismutaza se implică activ în protecția celulelor de microorganisme patogene contra factorilor biochimici produși de macrofagi *in vivo* pentru a stopa infecția. Astfel, producând o cantitate mărită de catalază și superoxididismutază, microorganismele patogene neutralizează peroxidul de hidrogen și superoxid radicalul eliminați de celule imune, evitând astfel scenariul letal [54].

Scăderea semnificativă a nivelului de activitate a acestor doi factori importanți de protecție conduce la mărirea nivelului de vulnerabilitate a culturilor *in vivo*, ceea ce ar fi un argument pentru realizarea cercetărilor biomedicale în promovarea ulterioară a acestor compuși valoroși.

Rezultatele obținute sugerează și ideea unui posibil mecanism particular de acțiune a compușilor chimici noi selectați. Este cunoscut faptul că, spre deosebire de alte enzime antioxidante, care sunt active doar la concentrații limitate ale substratului specific, catalaza este activă și la concentrații sporite de peroxid de hidrogen, deci reglarea activității acesteia nu are loc prin mecanismul feedbackului negativ. Estimările teoretice demonstrează, că o moleculă de catalază poate să scindeze 44.000 de molecule de peroxid de hidrogen pe secundă. Pentru realizarea reacției catalitice cu participarea CT este necesară existența a două molecule de H_2O_2 , dintre care una acționează ca donor, iar alta ca acceptor de electroni. Viteza de acțiune a CT este limitată doar de viteza de difuziune a substratului spre centrul activ al enzimei. A fost stabilit, că în cazul stresului oxidativ în diferite tipuri de celule se înregistrează o creștere semnificativă, de zeci de ori, a acțiunii catalazei [198].

În experiențele efectuate a fost observată o creștere semnificativă a nivelului de peroxid de hidrogen în cultură, dar nu am înregistrat o creștere a activității catalazice, ci din contra o diminuare semnificativă a acesteia în comparație cu martorul netratat. Același lucru a fost observat și în cazul tratării microorganismelor patogene cu furacilină. Despre această substanță se cunoaște cert, că mecanismul ei de acțiune antibacteriană constă în formarea derivatelor aminice ca rezultat al reducerii 5-nitrogrupului nitrofuralului sub influența activității flavonoizilor bacterieni. Derivatele aminice modifică conformația spațială a proteinelor și conduce în cele din urmă la moartea celulelor. Deoarece are loc scăderea activității atât a catalazei, cât și a superoxid-dismutazei, putem presupune modificarea conformației specifice a proteinelor, inclusiv a enzimelor menționate. Pentru a confirma acest lucru sunt necesare, însă, cercetări suplimentare.

4.5. Concluzii la capitolul 4

1. La acțiunea compușilor chimici noi cu proprietăți antimicrobiene asupra culturilor de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* ATCC 25931 și *Salmonella enterica* (*Salmonella abony* ГИСК 03/03) în culturi se creează o stare de stres oxidativ, confirmat prin acumularea peroxidului de hidrogen și a produselor peroxidării lipidelor, scăderea capacității antioxidante totale și reducerea activității enzimelor antioxidante primare.

2. Compușii selectați produc o reducere substanțială a capacității antioxidante totale în culturile de referință luate în studiu. Cele mai vulnerabile din punctul de vedere al instalării stresului oxidativ de înaltă intensitate sunt culturile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 și *Bacillus cereus* ГИСК 8035, iar cea mai rezistentă fiind cultura de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y).
3. Sub acțiunea compușilor chimici noi testați în toate culturile de referință se atestă o creștere semnificativă a nivelului de acumulare a produselor peroxidării lipidelor, ceea ce indică asupra modificărilor oxidative ireversibile și confirmă starea de stres oxidativ profund în culturile de referință.
4. Corelarea negativă strânsă cu valori înalte ale coeficientului de determinare dintre capacitatea antioxidantă totală și conținutul dialdehidei malonice în celule confirmă starea de stres oxidativ de intensitate înaltă, cauzat de acțiunea antimicrobiană a compușilor noi testați.
5. Sub influența compușilor chimici noi în toate culturile de referință testate are loc o reducere semnificativă a nivelului de activitate a enzimelor antioxidante superoxid-dismutaza și catalaza, ceea ce indică asupra unui stres oxidativ intens generat de compușii testați.
6. Acțiunea specifică a compușilor chimici noi asupra enzimelor antioxidante primare, care constituie unul dintre factorii de patogenitate a agenților infecțioși, permite presupunerea unui efect benefic *in vivo* al noilor substanțe autohtone și recomandarea compușilor selectați pentru teste biomedicale.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Aspectele elucidate pe parcursul realizării tezei de doctorat „**Efecte antimicrobiene ale unor substanțe chimice din produse autohtone**” pot fi exprimate prin următoarele concluzii:

1. Compușii coordinativi ai Cu(II) care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide manifestă activitate antibacteriană competitivă față de tulpinile de referință testate. Concentrațiile minime inhibitorii față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 s-au încadrat între 0,018 și 18,75 μg/ml (7 compuși fiind mai activi ca furacilina; $p < 0,001$); față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 – între 0,009 și 18,75 μg/ml (8 compuși mai activi ca furacilina); față de tulpina *Escherichia coli* ATCC 25922 – între 0,58 și 38,5 μg/ml (4 compuși mai activi ca furacilina; $p < 0,001$); față de *Shigella sonnei* ATCC 25931 și *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y) – între 0,58 și 18,75 μg/ml (8 compuși mai activi față de antisepticul de referință; $p < 0,001$) [4, 23]. Doi dintre cei mai activi compuși cu activitate foarte înaltă față de toate tulpinile de referință luate în studiu – di(μ-S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]-cupru} și di(μ-S)-bis{[2-(4-aminobenzensulfamido)-pirimidin]-nitrato-[2-picoliden-4-feniltiosemicarbazido-(1-)]cupru}, au fost sintetizați cu utilizarea precursorului $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

2. Compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-formilpiridinei au demonstrat activitate antibacteriană înaltă față de *trei dintre tulpinile de referință*. Astfel, concentrațiile minime inhibitorii față de tulpinile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035 și *Shigella sonnei* ATCC 25931 s-au încadrat între 0,009 și 0,58 μg/ml, comparativ cu valorile de 2,34 și 4,68 μg/ml înregistrate pentru antisepticul de referință ($p < 0,001$) [3, 8, 16, 17].

3. Compușii coordinativi ai Cu(II) cu n-piridin-2-iltiosemicarbazona 2 piridincarboxialdehidă și derivații se caracterizează prin acțiune antibacteriană performantă față de tulpinile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Bacillus cereus* ГИСК 8035. Față de tulpina de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 s-au manifestat compușii di(μ-S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} și cloro-[N-etil-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazincarbotoioamido] cupru cu CMI de 0,56 ng/ml, iar CMB – de 1,8 ng/ml (comparativ cu valoarea de 2,34 înregistrată pentru furacilină; $p < 0,005$). Aceiași compuși au înregistrat valoarea CMI de 0,14 μg/ml față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 (față de 4,68 în cazul antisepticului de referință; $p < 0,001$) [1, 2, 15].

4. Compușii chimici noi selectați au manifestat activitate antimicrobiană față de tulpinile de referință care depășește de 2-3500 de ori activitatea furacilinei [1-4, 8, 15, 16, 23]; iar față de tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* izolate au avut o activitate ce o depășește pe cea a furacilinei de 1,5-240 de ori.

5. Compușii cu activitatea antibacteriană înaltă cauzează în celulele microorganismelor patogene un stres oxidativ pronunțat, exprimat prin scăderea semnificativă a capacității antioxidante totale și prin mărirea esențială a conținutului produsului peroxidării lipidelor – dialdehidei malonice. Prezența stresului oxidativ este confirmată prin gradul înalt de corelare negativă dintre acești doi parametri (coeficientul de determinare variază în funcție de tulpină între 0,77 și 0,82). Cele mai vulnerabile din punctul de vedere al instalării stresului oxidativ de înaltă intensitate sunt culturile de referință *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 și *Bacillus cereus* ГИСК 8035, iar cea mai rezistentă fiind cultura de referință *Salmonella enterica* (*S. abony* ГИСК 03/03 y).

6. Unul dintre mecanismele de acțiune a compușilor noi testați se bazează pe scăderea semnificativă a activității enzimelor antioxidante de primă linie – superoxid-dismutaza și catalaza. Astfel, sub acțiunea compușilor chimici noi activitatea acestor două enzime scade până la nivelul de mai jos de 20% din activitatea lor în biomasa netratată. Acest lucru permite să presupunem păstrarea efectului antibacterian observat *in vivo*, enzimele menționate fiind elementele-cheie în protecția microorganismelor patogene față de activitatea sistemului imun al gazdei.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în elucidarea efectelor unor noi compuși chimici din produse autohtone asupra tulpinilor de microorganisme patogene, ceea ce a contribuit la evidențierea proprietăților antimicrobiene ale substanțelor noi, fapt ce a permis stabilirea mecanismelor de acțiune a lor.

Aportul personal: În materialele care reflectă conținutul brevetelor de invenție autoarei îi revine cota-parte în corespundere cu lista autorilor. Toate celelalte rezultate obținute, analiza lor, generalizările și concluziile aparțin autoarei.

Recomandări practice

1. Se recomandă compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide în calitate de substanțe cu activitate antibacteriană față de microorganismele Gram-pozitive *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus*.
2. Se recomandă compușii coordinativi ai Cu(II) cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-formilpiridinei în calitate de substanțe cu efecte antibacteriene față de microorganismele

Gram-pozitive *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus* și față de microorganismul Gram-negativ *Shigella sonnei*.

3. Se recomandă compușii di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} și di(μ -S)-bis{cloro-[1-piridin-2-il-4-etiltiosemicarbazono - (1-)] cupru} în calitate de substanțe cu efecte antibacteriene pronunțate față de tulpinile de *Staphylococcus aureus* izolate și substanțe cu activitate antibacteriană înaltă față de tulpinile de *Escherichia coli* izolate.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Sunt necesare testări biomedicale ale substanțelor chimice noi selectate pentru a verifica eficiența lor *in vivo*.
2. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru confirmarea mecanismului de acțiune a compușilor chimici noi, care posedă activitate antibacteriană pronunțată.

BIBLIOGRAFIE

1. Brevet de invenție 2942 B2. Prisacari V., Țapcov V., Buraciova S., Bârcă M., Gulea A. / Di(μ -O)-bis(3,5-dibromsalicilidentiosemicarbazonatocupru). Data publicării: 2005.12.31, BOPI nr. 12/2005.
2. Brevet de invenție 4127 C1. Utilizare a di(μ -S)-bis {cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru } în calitate de substanță cu activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus*/ Gulea Aurelian, **Lozan-Tîrșu Carolina**, Țapcov Victor. Data publicării 2011.09.30, BOPI nr. 9/2011.
3. Brevet de invenție 4133 C1. [(2-Carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzen-sulfamid)cupru, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din genul *Bacillus cereus* / Gulea A., Țapcov V., **Lozan-Tîrșu C.**, Rudic V. Data publicării 2011.10.31, BOPI nr. 10/2011.
4. Brevet de invenție MD 4112 Compuși coordinativi ai cuprului cu 4-(dimetilfenil)-tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei/**Lozan-Tîrșu Carolina**; Gulea Aurelian, Țapcov Victor, Rudic Valeriu, Data publicării 31.05.2011, BOPI nr.5/2011.
5. Brevet de invenție MD 4179 C1. Compuși coordinativi ai cuprului(II), care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din specia *Bacillus cereus* / Gulea Aurelian, **Lozan-Tîrșu Carolina**, Țapcov Victor, Cotovaia Aliona, Ghicavii Victor. Data publicării 2012.07.31, BOPI nr. 7/2012.
6. Brevet de invenție MD 4194 B1 Compus coordinativ trinuclear al cuprului: tris{ μ -[3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden-4'-(piridin-2-il)-tiosemicarbazido(2-)]cupru}hidrat, care manifestă activitate antimicrobică față de *Candida albicans* / Gulea A., Căpățînă T., Ciuracov Iu., **Lozan-Tîrșu C.**, Petrenko P., Codiță Gh., Țapcov V., Rudic V. Data publicării 2013.01.31, BOPI nr. 1/2013.
7. Iațco Iu. Tehnologii de obținere a preparatelor lipidice din biomasa algei verzi *Dunaliella salina*: Autoref. tezei de dr. șt. biologice. Chișinău, 2012, 29 p.
8. **Lozan-Tîrșu C.** Utilizarea di(μ -s)-bis{cloro-[1-piridin-2-iletanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} în calitate de substanță cu activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus*. În: Curierul Medical. 2014, v. 57(3), p. 9-11.
9. **Lozan-Tîrșu C.** Efectul antimicrobian al compușilor coordinativi ai cuprului, zincului, cobaltului și nichelului cu n-piridin-2-iltiosemicarbazona 2 piridincarboxi-aldehidă și derivații ei. În: Curierul Medical. 2012, v.3(327), p. 409-410.
10. **Lozan-Tîrșu C.** Efectul antimicrobian al compușilor coordinativi ai cuprului cu 4-(dimetilfenil)-tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei. În: Curierul Medical. 2014, v.57(4), p. 14-17.
11. Marușteri Ș.M. Noțiuni fundamentale de biostatistică: note de curs. Târgu Mureș: University Press. 2006, 220 p.
12. Rudic V., **Lozan-Tîrșu C.**, Zariciuc E., Gulea A., Țapcov V. Inhibitorii proliferării bacteriei *Bacillus cereus* în baza compușilor coordinativi ai cuprului (II) care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, seria Științele Vieții. 2014, v.1(322), p.139-146.

13. Sadovnic D. Tehnologii de obținere a preparatelor antioxidante și antiradicalice din biomasa algei roșii *Porphyridium cruentum*. Teză de dr. în biologie. Chișinău, 2014, 159 p.
14. Valuța A. et al. Impact of iron (III) Schiff base complexes on phycobiliprotein accumulation in cyanobacterium *Nostoc linckia*. In: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd ed.). Chișinău, Moldova, October 9-10, 2014, p. 90-92.
15. Valuta A. et al. Phycobiliprotein accumulation in cyanobacterium *Nostoc linckia* and modification of antioxidant activity. In: The Annals of Oradea University, Biology Fascicle. 2015, v.XXII(1), p. 13-19.
16. Abdessamad D. et al. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. Microb Biotechnol. 2010, v. 3(5). p.544-563.
17. Abey H. Catalase in vitro. Methods Enzimol. 1984, v.105, p.121-126.
18. Aerts A. M. The antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. In: Front. Microbiol. 2011, v.2, p.47-52.
19. Aires A. et al. Initial *in vitro* evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. In: J Appl Microbiol, 2009, v. 106, p.2096-2105.
20. Aiyelabola T., Ojo I., Akinkunmi O. Structural and Antimicrobial Studies of Coordination Compounds of Phenylalanine and Glycine. In: Int J Chem. 2012, v.4(2), p.49-51.
21. Allocati N et al. Escherichia coli in Europe: An Overview. In: Int. J. Environ. Res. Public Health. 2013, v.10, p.6235-6254.
22. An M.M. et al. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. In: Int J Antimicrob Agents. 2009, v. 33, p.258-263.
23. Andreu D., Rivas L. Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. In: Biopolimers (Peptide Sciences), 1998, v. 47, p.415-433.
24. Antelmann H. Oxidative Stress Responses and Redox Signalling Mechanisms in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. In: Molecular Medical Microbiology. 2015, Elsevier Ltd p.249-255. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00013-5.
25. Artsimovitch I. et al. A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. In: Science. 2003, v.302, p.650-654.
26. Baginski M., Czub B. Amphotericin B and its new derivatives. In: Current Drug Metabolism. 2009, v.10(5), p.459-69.
27. Bansa A., Adeyemo S.O. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. In: Afr J Biotechnol. 2007, v. 6, 1785-1787.
28. Barba N., Gulea A., Popușoi A., **Lozan-Tîrșu C.**, Poirier D. Aromatic isothiocyanatopenones and thiourea derivatives. Synthesis and biological properties. In: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, seria Științele Vieții. 2014, v.1(322), p.146-160.
29. Barrios Llerena M. E., Burja, A.M., Wright, P.C. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. In: J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2007, v.3. p. 443-456.
30. Bayles K.W. The biological role of death and lysis in biofilm development. In: Nat Rev Microbiol. 2007, v.5, p.721-726.

31. Bellincampi D. et al. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the Auxin-Regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. In: Plant physiology. 2000, v.122, p. 1379-1385.
32. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. In: J Antibiot. 2005, v. 58(1), p.26-37.
33. Bock C., Ternes W. The phenolic acids from bacterial degradation of the mangiferin aglycone are quantified in the feces of pigs after oral ingestion of an extract of *Cyclopia genistoides* (honeybush tea). In: Nutr , 2010, v.30, p.348-357.
34. Bonifácio B. et al. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. In: Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014, v.13(1), p.1-10. doi:10.1186/s12941-014-0054-0.
35. Breukink E., de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. In: Nat Rev Drug Discovery, 2006, v.5, p.321-332.
36. Bui, T.N. et al. Carbamidocyclophanes A E, chlorinated paracyclophanes with cytotoxic and antibiotic activity from the Vietnamese cyanobacterium, *Nostoc* sp. In: J. Nat. Prod. 2007, v. 70, p. 499-503.
37. Byarugaba D.K. Mechanisms of Antimicrobial Resistance. In: Antimicrobial Resistance in Developing Countries, ed. By Sosa J. et al. Springer, London, 2010, p.15-27.
38. Cai Y. et al. Antibacterial activity of allicin alone and in combination with beta-lactams against *S taphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. In: J Antibiot (Tokyo), 2007, v. 60, p.335-338.
39. Campbell E.A., et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. In: Cell. 2001, v.104, p.901-12.
40. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP). 2015. ResistanceMap. 2015. www.cddep.org/projects/ resistance-map. Accesat la 25 noiembrie 2015.
41. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. 2015a. State of the World's Antibiotics, 2015. CDDEP: Washington, D.C., 84 p.
42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta.
43. Chalker A.F., Lunsford R.D. Rational identification of new antibacterial drug targets that are essential for viability using a genomics-based approach. In: Pharmacol Ther. 2002, v. 95, p.1-20
44. Chen L. et al. Effect of Antimicrobial Peptide Revealed by Simulation: Translocation, Pore formation, Membrane Corrugation and Euler Buckling. In: Int.J.Mol.Sci. 2013, 14, p.7932-58.
45. Cheng Y.B., Jensen P.R., Fenical W. Cytotoxic and antimicrobial napyradiomycins from two marine-derived streptomyces strains. In: Eur J Org Chem. 2013, v. 18, p.3751-3757.
46. Cho J. H., Sung B. H., Kim, S. C. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. In: Biochim. Biophys. Acta. 2009, v.1788, p.1564-1569.
47. Chouchani E.T. et al. Proteomic approaches to the characterization of proteint hiol modification. In: Curr. Opin.Chem.Biol. 2011, v.15, p.120-128.

48. Chudobova D. Oxidative Stress in *Staphylococcus aureus* Treated with Silver(I) Ions Revealed by Spectrometric and Voltammetric Assays. In: Int. J. Electrochem. Sci., 2013, v.8, p.4422-4440.
49. Cogo L.L. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. In: Braz J Microbiol, 2010, v.41, p.304-309.
50. Cottarel G, Wierzbowski J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. In: Trends Biotechnol. 2007, v. 25, p.547-555.
51. Cotter P.D., Hill C, Ross R.P. Bacterial lantibiotics: strategies to improve the therapeutic potential. In: Curr Protein Pept Sci. 2005, v. 6(1), p.61-75.
52. Cragg G.M., Newman D.J. Natural products: a continuous source of novel drug leads. In: Biochem Biophys Acta 2013, v.1830(6), p.3670-3695
53. Cueva C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. In: Res Microbiol. 2010, v. 161, p.372-382.
54. Das D., Saha S.S., Bishavi B. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines. In: Inflamm. Res. 2008;57(7), p.340-349.
55. Das K., Tiwari R.K.S, Shrivastava D.K: Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. In: J Med Plants Res. 2010, v.4, p.104-111.
56. Davidson P.M., Naidu A.S. Phyto-phenols. In: Naidu AS (ed) Natural food antimicrobial systems. 2000. CRC Press, Boca Raton, p.265-294.
57. Davies M.J. The oxidative environment and protein damage. In: Biochim.Biophys.Acta. 2005, v. 1703, p.93-109.
58. De Bruyne T. et al. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. In: J Nat Prod. 1999, v. 62, p.954-958.
59. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. In: J Antibiot 2009, v.62, p.5-16.
60. Dembitsky V.M. et al. Secondary metabolites of slime molds (myxomycetes). In: Phytochemistry. 2005, v. 66(7), p.747-769.
61. Diez J. et al. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. In: Microb Cell Fact. 2012, v. 11, p.52-59.
62. Drlica K. et al. Quinolone-mediated bacterial death. In: Antimicrob Agents Chemother. 2008, v.52, p.385-92.
63. Dwyer D.J. et al. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. In: Mol Syst Biol. 2007, v.3, p.91-98.
64. El Husseiny A. F., Aazam E. S., Al Shebary J. Synthesis, characterization and antibacterial activity of Schiff-base ligand incorporating coumarin moiety and its metal complexes. In: Inorganic chemistry an Indian journal, 2008, v.3(1), p.64-68.
65. El-Baz, F.K. et al. *In vitro* antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. In: J Appl Pharmac Sci. 2013, v. 3 (12), p.52-56.

66. El-Gahami M. A., Abdel Salam A. H., Albishri H. M. Synthesis, magnetic, spectral and antimicrobial activity of new Schiff bases complexes derived from 1,2,4-triazole-5-thione. In: J. Mater. Environ. Sci. 2015, v. 6 (10), p.2886-2894.
67. Ello H. Antimicrobial activity of two antitumour agents and ribonucleotide reductase inhibitors, pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and the acetate form of its copper(II) chelate. In: Z. Naturforsch, 2007, v. 67(7-8), p.498-506.
68. El-Sheekh M.M. et al. Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. In: Iran J Microbiol. 2014, v. 6(2), p.112-119.
69. Engels C. et al. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. In: J Agric Food Chem. 2009, v. 57, p.7712-7718.
70. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2014. EARS-Net Report, Quarters 1-4. Dublin.
71. European Medicines Agency (EMA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The Bacterial Challenge: Time to React a Call to Narrow the Gap Between Multidrug-Resistant Bacteria in the EU and Development of New Antibacterial Agents. Stockholm. 2009.
72. Evans P.A et al. Total synthesis of marinomycin A using salicylate as a molecular switch to mediate dimerization. In: Nat Chem. 2012, v. 4, p.680-684.
73. Evers D.L. Human cytomegalovirusinhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. Antiviral Res. 2005, v. 68, p.124-134
74. Farver D.K., Hedge D.D., Lee S.C. Ramoplanin: a lipoglycopeptide antibiotic. In: Ann Pharmacother. 2005, v.39(5), p.863-868.
75. Fernandes R., Amador P., Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. In: Reviews in Medical Microbiology: 2013, v.24(1), p.7-17.
76. Ferreira L., Zumbuehl A. Non-leaching surfaces capable of killing microorganisms on contact. In: J Mater Chem. 2009, v. 19, p.7796-7806.
77. Fischbach M.A., Walsh C.T: Antibiotics for emerging pathogens. In: Science. 2009, v.325, p.1089-1093.
78. Fujisawa H. et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. In: Biosci Biotechnol Biochem. 2009, v. 73, p.1948-1955.
79. Gabriel G.J. et al. Comparison of facially amphiphilic versus segregated monomers in the design of antibacterial copolymers. In: Chem Eur J. 2009, v. 15(2), p.433-439.
80. Ganan M. et al. Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. In: Food Control. 2009, v. 20, p.739-742.
81. Gaupp R., Ledala N., Semerville G.A. Staphylococcal response to oxidative stress. In: Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2012, v.2, doi: 10.3389/fcimb.2012.00033.
82. Genilloud O. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. In: J Ind Microbiol Biotechnol. 2011, v.38(3), p.375-389.
83. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. In: Plant Physiol. 1972, v.59, p.309-314.
84. Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. In: J Appl Microbiol. 2005, v. 99, p.703-715.

85. Graur V. et al. Synthesis and biological activity of nickel and copper coordination compounds of 5-nitrofur-2-carbaldehyde N(4)-allyl-3-thiosemicarbazone. In: *Studia Universitatis Moldaviae, Seria științe reale și ale naturii*, 2014, v.6(76), p.119-123.
86. Gray A.I., Igoli J.O., Edradabel R. Natural products isolation in modern drug discovery programs. In: Sarkar S.D., Nahar L. (eds) *Natural product isolation*, 2012, pp. 515-534.
87. Greathead H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. In: *Proc Nutr Soc* 2003, v.62, p.279-290.
88. Guilhelmelli F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. In: *Front. Microbiol.*, 2013, v. 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00353.
89. Guilhelmelli, F et al. Scorpion-venom derived antimicrobial peptides with antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. In: *Mycoses*, 2014; 57, 46-52.
90. Gulya A. et al. In vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: Chemical synthesis and structure – activityrelationships. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2008, v.23(6), p. 806-818.
91. Gulya A. P., Chumakov Yu. M., Tsapkov V. I., Graur V.O., **Lozan-Tyrshu K.S.**, Janno E., Antosyak B. Ya., Rudik V. F. Synthesis, Structure, and properties of coordination compounds of copper (II) acetate with substituted 2-{{2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino}methyl}phenol. In: *Russian Journal of General Chemistry*. 2011, v.81(9), p.1859-1866.
92. Gulya A. P., **Lozan-Tyrshu K.S.**, Tsapkov V. I., Chumakov Yu. M., Zhanno E., Rudik V. F. Synthesis, structure, and microbial activity of copper(II) chelates containing imidazole and condensation products of α - amino acids with salicylaldehyde and its derivatives. In: *Russian Journal of General Chemistry*. 2013, v.83(3), p.530-537.
93. Gulya A. P., **Lozan-Tyrshu K.S.**, Korzha I. D., Rudik V. F. Coordination compounds of Copper with 2-Formylpyridine 4 - (Dymethylphenyl) thiosemicarbazones. In: *Russian Journal of General Chemistry*. 2012, vol. 82, no.11, p.1869-1872.
94. Guru P. Microbial Analysis on Some Coordination Compound of Metals with Ampicillin. *Journal of Chemistry and Materials Research*. 2014, v.1(2), p. 40-44.
95. Hafizur R. et al. Novel anti-infective compounds from marine bacteria. In: *Mar Drugs*. 2010, v.8(3), p.498-518.
96. Hamad B. The antibiotics market. In: *Nature Rev Drug Discov*. 2010, v.9, p.675-676.
97. Han F.F. et al. Antimicrobial peptides derived from different animals: comparative studies of antimicrobial properties, cytotoxicity and mechanism of action. In: *World J Microbiol Biotechnol*. 2011. v. 27, p.1847-1857.
98. Haney E. F. et al. Mechanism of action of puroidoline derived tryptophanrich antimicrobial peptides. In: *Biochim. Biophys. Acta*. 2013, v. 1828, p.1802-1813.
99. Heddle J., Maxwell A. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. In: *Antimicrob Agents Chemother*. 2002. v.46. p.1805-1815.
100. Helen Diana Y., Reginald A., Parthipana B. Antibiotic activity of Cyanobacteria isolated from salt pans of Kanyakumari District (South India) against human pathogenic bacteria. In: *Int J Curr Sci*. 2014, v.11, p.E 32-39.

101. Hetta H. et al. Antiviral and antimicrobial activities of spirulina platensis. In: World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences. 2014, v.3(6), p.31-39.
102. Hodges W.H. et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. In: Planta. 1999. v.207, p.604-611.
103. <http://aps.unmc.edu/AP/class.php> (vizitat la 10.10.2015).
104. <http://www.aic.cuhk.edu.hk/web8/glycopeptides.htm>. Accessed 12 October 2015.
105. <http://www.merck.com/mmpe/lexicomp/clindamycin.html>. Accessed 12 October 2015.
106. <http://www.merck.com/mmpe/print/sec14/ch170/ch170g.html>. Accessed 12 October 2015.
107. <http://www.rxlist.com/erythromycin-ethylsuccinate-drug.htm>. Accessed 12 October 2015.
108. <http://www.steadyhealth.com/encyclopedia/Carbomycin>. Accessed 12 October 2015.
109. Iacovidis I., Delimaris I., Piperakis M. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. In: Molecular Biology International. 2011, doi:10.4061/2011/594529.
110. Imlay J.A. Pathways of oxidative damage. In: Annu.Rev.Microbiol. 2003, v.57, p.395-418.
111. Ionuț I. et al. Synthesis and antimicrobial activity evaluation of some N1 -Arylidene-Thiosemicarbazone and 1,3,4-Thiadiazoline derivatives. In: Clujul Medical. 2013. v. 86-Supplement(1), p.S27-S33.
112. Irma E.S.M. et al. Bioactive compounds from bacteria associated to marine algae. In: Sammour R (ed) Biotechnology – molecular studies and novel applications for improved quality of human life, 2012, pp. 25-44.
113. Islam M. R. et al. Antimicrobial mechanism of lantibiotics. In: Biochem. Soc. Trans. 2012, v.40, p.1528-1533.
114. Jiao R.H. et al. Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium sp* IFB E015. In: Org Lett. 2006, v.8(25), p. 5709-5712.
115. Jonker H.R.A. et al. NMR Structures of thiostrepton derivatives for characterization of the ribosomal binding site. In: Angew Chem Int Ed. 2011, v.50, p.3308-3312.
116. Jose P.A., Jebakumar S.R.D. () Non-streptomycete actinomycetes nourish the current antimicrobial discovery. In: Front Microbiol. 2013. v. 4(240), p.1-3.
117. Jung M. et al. Ganodermycin, a novel inhibitor of CXCL 10 expression from Ganoderma applanatum. In: J Antibiot (Tokyo). 2011. v. 64(10), p.683-686.
118. Katz L., Ashley G.W. Translation and protein synthesis: macrolides. In: Chem Rev. 2005. v.105, p.499-528.
119. Kenawy E-R., Worley S.D., Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. In: Biomacromolecules, 2007,v. 8(5), p.1359-1384.
120. Kerzaon I. et al. Structural investigation and elucidation of new communesins from a marine derived Penicillium expansum link by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectroscopy. In: Rapid Commun Mass Spectr. 2009, v.3(24), p.3928-3938.
121. Kocer H.B. et al. Effect of alkyl derivatization on several properties of Nhalamine antimicrobial siloxane coatings. In: Ind Eng Chem Res, 2008, v. 47, p.7558-7563.
122. Kohanski M.A. et al. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. In: Cell. 2008. v.135, p.679-690.

123. Kohanski M.A. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. In: *Cell*. 2007, v.130, p.797-810.
124. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. In: *Nat Rev Microbiol*. 2010, v.8(6), p. 423-435.
125. Kokou F. et al. Antibacterial activity in microalgae cultures. In: *Aquaculture Research*, 2012, v. 43(10), p. 1520-1527.
126. Kou L. et al. Synthesis of a water-soluble siloxane copolymer and its application for antimicrobial coatings. In: *Ind Eng Chem Res*. 2009, v. 48, p.6521-6526.
127. Kumar D. et al. Benzylidene/2-chlorobenzylidene hydrazides: synthesis, antimicrobial activity, QSAR studies and antiviral evaluation. In: *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, v.45, p.2806-2816.
128. Kumar D. et al. Syntheses, Spectral Characterization, and Antimicrobial Studies on the Coordination Compounds of Metal Ions with Schiff Base Containing Both Aliphatic and Aromatic Hydrazide Moieties. *Bioinorg Chem Appl*. 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/981764>
129. Kumar G.N.M., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. In: *Plant Physiol*. 1993, v.102, p.115-124.
130. Kumar V., Bhatnagar A. K., Srivastava J. N. Comparative study of different strains of *Spirulina platensis* (Geitler) against some human pathogens. In: *J. Algal Biomass Utln*. 2012, v.3 (3), p.39-45.
131. Kyaw B.M., Arora S., Lim S.S. Bactericidal antibiotic-phytochemical combinations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Microbiol*, 2012, v. 43, n. 3, p. 938-945.
132. Lamprinou V. et al. Cave Cyanobacteria showing antibacterial activity. In: *International Journal of Speleology*. 2015, v.44 (3), p.231-238.
133. Lebon F. et al. Metal-organic compounds: a new approach for drug discovery: N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II) complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease. In: *Biochem Pharmacol*, 2002. V.63(10), p. 1863-73.
134. Lee H-T. et al. A Large-Scale Structural Classification of Antimicrobial Peptides. *BioMed Research International*. Volume 2015 (2015), <http://dx.doi.org/10.1155/2015/475062>.
135. Lemire J.A., Harrison J.J., Turner R.J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and application. *Nature Reviews.Microbiology*. 2013, v.13, p.371-384
136. Leopold S. J. et al. Antimicrobial Drug Resistance Among Clinically Relevant Bacterial Isolates in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. In: *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014. v.69(9), p.2337-2353.
137. Lienkamp K. et al. Antimicrobial polymers prepared by ring-opening metathesis polymerization: manipulating antimicrobial properties by organic counterion and charge density variation. In: *Chem Eur J*. 2009, v.15, p.11715-11722.
138. Linley E. et al. Use of hydrogen peroxide as a biocide new consideration of its mechanisms of biocidal action. In: *J.Antimicrob. Chemother.*, 2012, v.67, p.1589-1596.
139. Liu L. et al. Global, Regional, and National Causes of Child Mortality in 2000-13, with Projections to Inform Post- 2015 Priorities: An Updated Systematic Analysis. In: *The Lancet*. 2015, v.385(9966), p.430-440.

140. Lohner K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. In: Gen. Physiol. Biophys. 2009, v. 28, p.105-116.
141. Lu, P. L. et.al. Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Gram-Negative Bacteria Causing Urinary Tract Infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). In: International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, v.40 (Suppl), p.S37-43.
142. Lucas X. et al. Streptomed B: a resource for natural compounds isolated from Streptomyces species. In: Nucl Acids Res. 2013, v. 41(Database Issue), p.D1130-D1136.
143. Madhumathi V. et al. Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake. In: International Journal of Microbiological Research, 2011, v. 2 (3), p.213-216.
144. Mahajan G., Balachandran L. Biodiversity in Production of Antibiotics and Other Bioactive Compound. In: Adv Biochem Eng Biotechnol. 2015, v. 147, p.37-58.
145. Mahajan G.B., Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes – a review. Front Biosci (Elite Ed). 2012, v.4, p.240-253.
146. Mangoni M. L., Shai Y. Temporins and their synergism against Gram(-)negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. In: Biochim. Biophys. Acta. 2009. v.1788, p.1610-1619.
147. Maru M.S., Shah M.K. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of Transition Metal Complexes of Monodentate 2-(Substituted Phenyl)-1*H*-benzo[d]imidazoles. In: Chiang Mai J. Sci. 2015, v.42(1), p.216-227.
148. Mehl K.A. et al. Myofiber degeneration / regeneration is induced in the cachectic Aps^{min/+} mouse. In: J.Appl.Physiol. 2005, v.99, p.2379-2387.
149. Melliou E. et al. Natural and synthetic 2,2-dimethylpyranocoumarins with antibacterial activity. In: J Nat Prod. 2005, v. 68, p.78-82.
150. Mello E. O. et al. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. In: Curr. Microbiol. 2011, v.62, p.1209-1217.
151. Melo M. N., Castanho, M. A. The mechanism of action of antimicrobial peptides: lipid vesicles vs. Bacteria. In: Front. Immunol. 2012, v.3, p.236-242.
152. Merkl R. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. In: Czech J Food Sci. 2010, v. 28, p.275-279.
153. Mervat A. M. Abo-State et al. Screening of Antimicrobial Activity of Selected Egyptian Cyanobacterial Species. In: J. Eco. Heal. Env. 2015, v.3(1), p.7-13.
154. Mitsunori T., Harold W.K. Aquatic myxomycetes. In: Fungi. 2013, v. 6(3), p.18-25.
155. Moghadamtousi S.Z. et al. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. In: BioMed Research International, vol. 2014, doi:10.1155/2014/186864.
156. Molinari G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. In: Adv Exp Med Biol. 2009, v. 655, p.13-27.
157. Montazerzohori M. et al. Some new nano-structure zinc(II) coordination compounds of an imidazolidine Schiff base: Spectral, thermal, antimicrobial properties and DNA interaction. In: Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectr. 2014, v.129, p.382-391.

158. Mookherjee N., Rehaume L. M., Hancock R. E. Cathelicidins and functional analogues as antiseptics molecules. In: *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2011, v.11, p.993-1004.
159. Mukhtar T.A., Wright G.D. Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. In: *Chem Rev*. 2005, v.105, p.529-542.
160. Muller A. et al. Interaction of type A lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors. In: *Microb. Drug Resist*. 2012, v.18, p.261-270.
161. Munna M.S. et al. Influence of exogenous oxidative stress on *Escherichia coli* cell growth, viability and morphology. In: *Am J Bioscience*. 2013., v. 1, p.59-62.
162. Nagamitsu H. et al. Crucial roles of MicA and RybB as vital factors for σ E dependent cell lysis in *Escherichia coli* long-term stationary phase. In: *J Mol Microb Biotechnol*. 2013. v.23, p. 227-232.
163. Najdenski H.M. et al. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. In: *Int J Food Sci Techn*, 2013, v.48(7), p.1533-1540.
164. Nazaruk J. et al. Polyphenolic compounds and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. In: *Nat Prod Res*. 2008, v. 22, p.1583-1588.
165. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. In: *J Nat Prod*. 2007, v.70, p.461-477.
166. Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. The influence of natural products upon drug discovery. In: *Nat Prod Rep*. 2008, v. 17, p. 215-234.
167. Novak R. et al. Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. In: *Mol Cell*. 2000, v.5, p.49-57.
168. Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. In: *Eur J Med Chem*. 2007, v. 42, p.125-137.
169. Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W. Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. In: *Appl Envir Microbiology*, 2007. v.73(8), p. 2748-2750.
170. Nur I., Munna M.S., Noor R. Study of exogenous oxidative stress response in *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, and *Salmonella spp.* In: *Turk J Biol*. 2014, v. 38, p.502-9.
171. Ocampo P.S. et al. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014, v.58(8), p.4573-4582.
172. Ojika M. et al. Miuraenamides: antimicrobial cyclic depsipeptides isolated from a rare and slightly halophilic myxobacterium. In: *Chem Asian J*. 2008, v. 3(1), p.126-133.
173. Özçelik B., Kartal M., Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. In: *Pharmaceut Biol*. 2011, v. 49, p.396-402.
174. Pahonçu E. et al. Characterization, Crystal Structure and Antimicrobial Activity of Copper(II) Complexes with the Schiff Base Derived from 2-Hydroxy-4-Methoxybenzaldehyde. In: *Molecules*. 2015, v.20(4), p.5771-5792.
175. Pandey V.D. Cyanobacterial natural products as antimicrobial agents. In: *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2015, v. 4(1), p.310-317.
176. Pankey G, Sabath L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram(-)positive bacterial infections. In: *Clin. Infect. Dis*. 2004, v.38, p.864-870.

177. Paredes-Gamero E. J. et al. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. In: *Biochim. Biophys. Acta.* 2012, v. 1820, p.1062-1072.
178. Park B.S. et al. Antibacterial activity of *Tabebeuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. In: *J Ethnopharmacol.*, 2006, v. 105, p.255-262.
179. Patel N.B., Patel H.R. Synthesis and Antibacterial and Antifungal Studies of Novel Nitrogen Containing Heterocycles from 5-Ethylpyridin-2-ethanol Indian. In: *J Pharm Sci.* 2010, v. 72(5), p.613-620.
180. Patra A.K. An Overview of Antimicrobial Properties of Different Classes of Phytochemicals. In: A.K. Patra (ed.), In: *Dietary Phytochemicals and Microbes*, 2012. Springer Science+Business Media Dordrecht.
181. Pichersky E., Gang D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. In: *Trends Plant Sci.* 2000, v. 5, p.439-445.
182. Piplani H. et al. Dolastatin, along with Celecoxib, stimulates apoptosis by a mechanism involving oxidative stress, membrane potential change and P13 K/AKT pathway down regulation. In: *Biochim Biophys Acta.* 2013, v. 11, p.5142-5156.
183. Prasanna R. et al. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (Review). In: *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, v.46(2), p.119-134.
184. Public Health Agency of Canada.. Antimicrobial Resistance to *Neisseria gonorrhoeae* in Canada: 2009- 2013. In: *Canada Communicable Disease Report*, 2015, v.41(2), p.35-41.
185. Puupponen-Pimia R. et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. In: *J Appl Microbiol.* 2005, v. 98, p.991-1000.
186. Puupponen-Pimia R. et al. Development of functional ingredients for gut health. In: *Trends Food Sci Technol.* 2002, v. 13, p.3-11.
187. Qadri M. et al. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus* 2013, 2:8 doi:10.1186/2193-1801-2-8.
188. Queval G. et al. Why are literature data for H₂O₂ so variable? A discussion of difficulties in the quantitative assay of leaf extract. In: *J Exper Botany.* 2008, v.59., p.135-146.
189. Raijmakers J.M., Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. In: *Annu Rev Phytopathol.* 2012, v.50, p.403-424.
190. Ramawat K.G., Dass S., Meeta Mathur M. The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In: Ramawat KG (ed) *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine.* 2008, Springer, Berlin, pp.7-32.
191. Rawlinson L-A.B. et al. Antibacterial effects of poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against selected Gram(-)positive and Gram(-)negative bacteria. In: *Biomacromolecules*, 2010, v. 11, p.443-453.
192. Re R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radical Biology and Medicine.* 1999, v.10, p. 1231-1237.
193. Reichenbach H. et al. Myxobacteria: a source of new antibiotics. In: *Trends Biotechnol.* 1988, v. 6(6), p.115-121.

194. Reygaert W.C. Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.). FORMATEX. 2013, p.297-305.
195. Rice K.C., et al. The *Staphylococcus aureus cid AB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. In: J Bacteriol 2003, v.185. p.2635-2643.
196. Rizzotto M. Metal Complexes as Antimicrobial Agents. In: A search for antibacterial agents. Ed. Varaprasad Bobbarala, 355 pages, 2012, Publisher: In Tech, p.73-88.
197. Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. In: J Agric Food Chem. 2003, v. 51, p.2866-2887.
198. Romero D. M., Rios de Molina M.C., Juarez A.B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. In: Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, vol. 74, p.741-747.
199. Rosu T. et al. Some new Cu(II) complexes containing an ON donor Schiff base: Synthesis, characterization and antibacterial activity. In: Polyhedron. 2011, v.30, p.154-162.
200. Rosu, T. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new complexes of Cu(II), Ni(II), VO(II), Mn(II) with Schiff base derived from 4-amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one. In: Polyhedron. 2010, v.29, p.757-766.
201. Rotem, S., Mor, A. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. In: Biochim. Biophys. Acta. 2009, v.1788, p.1582-1592.
202. Saavedra M.J. et al. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. In: Med Chem. 2010, v. 6, p.174-183.
203. Sarada C., Kumar S., Rengasamy R. Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. In: World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, v. 27(4), p. 779-783.
204. Sasidharan N. K. et al. Effect of Curcumin in Combination with Third Generation Cephalosporins against Bacteria Associated with Infectious Diarrhea, BioMed Research International, 2014, doi:10.1155/2014/561456.
205. Saxena S., Gomber Ch. Superoxide dismutase, protease and lipase expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a tool for antimicrobial drug discovery. In: Mol Cell Biochem. 2010. v. 341, p.217-223.
206. Shaieb F.A., Issa A.A., Meragaa A. Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*. Arch Biomed Sci. 2014; v.2 (2), p. 34-41.
207. Silver L.L. Challenges of Antibacterial Discovery. In: Clinical Microbiology Reviews. 2011, v. 24(1), p.71-109.
208. Singh V., Pal A., Dorokar M.P. A polyphenolic flavonoid glabridin: Oxidative stress response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. In: Free Radical Biology and Medicine. 2015, v.87, p.48-57.
209. Singh R.K. et al. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. In: J. Antibiotics, 2011, v.64, p. 401-412.

210. Smyth T., Ramachandran V.N., Smyth W.F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. In: *Int J Antimicrob Agents*. 2009, v. 33, p.421-426.
211. Soletti R. C. et al. Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. In: *Chem. Biol. Interact.* 2010, v.186, p.135-143.
212. Stadtman E.R., Levin R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins. In: *Amino Acids*, 2003, v.25, p. 207-218.
213. Stanila A. et al. Antibacterial Activity of Copper and Cobalt Amino Acids Complexes. In: *Not Bot Horti Agrobo*, 2011, v.39(2), p.124-129.
214. Sudha S.S. et al. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* and *Aphanothece sp.* on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. In: *South As. J. Biol. Sci.* 2011, v.1(2), p.87-98.
215. Sun X. et al. Significant stimulation of o-phthalic acid in biosynthesis of Aspergiolide A by a marine fungus *Aspergillus glaucus*. In: *Bioresour Technol.* 2010, v. 101(10). p.3609-16.
216. Tan, L.T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. In: *Phytochemistry*, 2007. v.68, p. 954-979.
217. Tella A. et al. Coordination compounds of n-phthaloylglycine and n-phthaloyltyrosine and their antimicrobial activities. In: *Elixir Appl. Chem.* 2012, v.45, p.7620-7623.
218. Tew G.N. et al. De novo design of antimicrobial foldamers and small molecules: from discovery to practical application. In: *Acc Chem Res.* 2010, v. 43, p.30-39.
219. Thorsten B. et al. Biogeography and phylogenetic diversity of a cluster of exclusively marine myxobacteria. In: *ISME J.* 2012, v. 6, p.1260-1272.
220. Tim Cushnie T.P, Lamb A.J: Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. In: *Int J Antimicrob Ag.* 2011, v.38, p.99-107.
221. Timofeeva L., Kleshcheva N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and application. In: *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, v. 89, p. 475-492.
222. Uytterhoeven E. T. et al. Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II. In: *FEBS Lett.* 2008, v.582, p.1715-1718.
223. Van Boeckel T. P. et al. Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. In: *The Lancet Infectious Diseases*, 2014. v.3099 (14), p.1-9.
224. Van der Weerden N. L., Bleackley M. R., Anderson M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 2013., v.70, p.3545-3570.
225. Vermerris W., Nicholson R.L. Phenolic compound biochemistry. 2006 Springer, Dordrecht
226. Villa T. G. ,Veiga-Crespo P.(eds.), *Antimicrobial Compounds*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014, DOI: 10.1007/978-3-642-40444-3_1,_ ; 325 p. (p.IX-XVI).
227. Volk R.B., Fulkert F. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced by cyanobacteria during growth. In: *Microbiol. Res.* 2006, v.161, p. 180-186.
228. Wang G. Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. In: *Methods Mol Biol.* 2015, v. 1268, p.43-66.

229. Wang W.L. et al. Three novel, structurally unique spirocyclic alkaloids from the halotolerant B 17 fungal strain of *Aspergillus varicolor*. In: *Chem Biodivers*, 2007, v. 4(12), p.2913-2919.
230. Wang Y et al. Catalase Expression Is Modulated by Vancomycin and Ciprofloxacin and Influences the Formation of Free Radicals in *Staphylococcus aureus* Cultures. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, v.81(18), p.6393-6398.
231. Wang, G (ed.) Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategy. CABI, England, 2010. 248 p.
232. Waschinski C.J. et al. Insights in the antibacterial action of poly(methyloxazoline)s with a biocidal end group and varying satellite groups. In: *Biomacromolecules*, 2008, v.9, p.1764-1771.
233. Xie Y. et al. Effect of proline position on the antimicrobial mechanism of buforin II. In: *Peptides*. 2011, v.32, p.677-682.
234. Yao Z., Kahne D., Kishony R. Distinct single-cell morphological dynamics under β -lactam antibiotics. In: *Mol. Cell*. 2012, v.48, p.705-712.
235. Yaul G.A.R. et al. Synthesis, structural studies and biological activity of dioxomolybdenum(VI), dioxotungsten(VI), thorium(IV) and dioxouranium(VI) complexes with 2-hydroxy-5-methyl and 2-hydroxy-5-chloroacetophenone benzoylhydrazone. In: *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2011, v.56(4), p.549-554.
236. Yoo, S.H. et al. Genomics, Biological Features, and Biotechnological Applications of *Escherichia coli* B: Is B for better; Springer: Berlin, Germany, 2009.
237. Yount N. Y., Yeaman M. R.. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013, v.1277, p.127-138.
238. Zanetti M. et al. Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram(-)Positive and GramNegative Bacteria. In: *J Microb Biochem Technol.* 2015, v.7(4), p.186-193.
239. Zhang Y., Lewis K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. In: *RFEMS Microbiology Letters*, 1997, 149, p.59-64.
240. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание, Том 1. Москва, 2015, с.992-1049.

ANEXE





MD 4133 C1 2012.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4133** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 59/19 (2006.01)
C07C 311/39 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/63 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

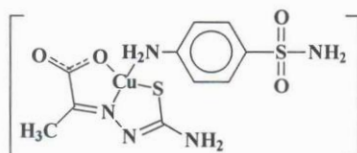
(21) Nr. depozit: a 2010 0083 (22) Data depozit: 2010.07.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.10.31, BOPI nr. 10/2011
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; LOZAN-TÎRȘU Carolina, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) [(2-Carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenzensulfamid)cupru,
care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din genul
Bacillus cereus

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ al cuprului biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților.

Esența invenției constă în sinteza unui nou compus al cuprului cu doi liganzi biologic activi [(2-carbamotioilhidrazon)propionato(2-)]-(4-aminobenbensensulfamid)cupru cu formula:



Compusul manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de bacteriile din genul *Bacillus cereus*. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și medicina veterinară în calitate de preparat antimicrobian.

Rezultatul constă în aceea că noul compus manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din genul *Bacillus cereus* de 33...156 ori mai înaltă decât furacilina și aproximativ de 1·10⁵ ori mai înaltă decât analogul structural - complexul cuprului cu tiosemicarbazona 2-formilpiridinei.

Revendicări: 2

MD 4133 C1 2012.05.31



REPUBLICA MOLDOVA

AGEPI

AGENȚIA DE STAT
PENTRU
PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ

BREVET DE INVENȚIE

Nr. 4179

ÎN TEMEIUL LEGII PRIVIND PROTECȚIA INVENȚIILOR, AGENȚIA DE STAT PENTRU
PROPRIETATEA INTELECTUALĂ ELIBEREAZĂ PREZENTUL BREVET DE INVENȚIE

Compuși coordinativi ai cuprului(II), care conțin 4-
feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide,
care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile
din specia *Bacillus cereus*

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA,
MD

Data depozit: 2011.05.23

DESCRIEREA INVENȚIEI, REVENDICĂRILE ȘI DESENELE CONSTITUIE PARTE
INTEGRANTĂ A PREZENTULUI BREVET DE INVENȚIE

CONFIRM PRIN SEMNARE ȘI APLICAREA SIGILIULUI

DIRECTOR GENERAL



CHIȘINĂU



MD 4179 C1 2013.02.28

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4179 (13) C1

(51) Int.Cl.: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)
C07C 311/38 (2006.01)
C07C 311/39 (2006.01)
C07C 311/43 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/63 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

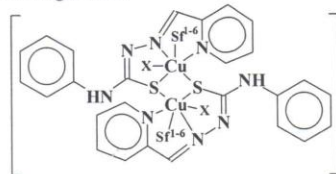
(21) Nr. depozit: a 2011 0051 (22) Data depozit: 2011.05.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2012.07.31, BOPI nr. 7/2012
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; LOZAN-TÎRȘU Carolina, MD; ȚAPCOV Victor, MD; COTOVAIA Aliona, MD; GHICAVII Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Compuși coordinativi ai cuprului(II), care conțin 4-feniltiosemicarbazona
2-formilpiridinei și sulfanilamide, care manifestă activitate antimicrobiană
față de bacteriile din specia *Bacillus cereus*

(57) Rezumat:

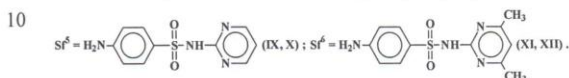
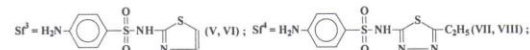
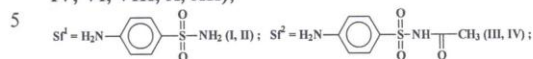
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la compușii coordinativi ai cuprului(II), care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide, care pot fi utilizați în calitate de preparate antimicrobiene în medicină și medicina veterinară.

Compușii, conform invenției, corespund formulei generale:



I-XII

unde: X = Cl (I, III, V, VII, IX, XI), NO₃ (II, IV, VI, VIII, X, XII);



15 Compușii menționați manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din specia *Bacillus cereus*.

Revendicări: 2

MD 4179 C1 2013.02.28



REPUBLICA MOLDOVA

AGPI AGENȚIA DE STAT
PENTRU
PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ

BREVET DE INVENȚIE

Nr. 4127

ÎN TEMEIUL LEGII PRIVIND PROTECȚIA INVENȚILOR, AGENȚIA DE STAT PENTRU
PROPRIETATEA INTELECTUALĂ ELIBEREAZĂ PREZENTUL BREVET DE INVENȚIE

Utilizare a di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-
metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} în calitate de
substanță cu activitate antimicrobiană față de
Staphylococcus aureus

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA,
MD

Data depozit: 2010.10.06

DESCRIEREA INVENȚIEI, REVENDICĂRILE ȘI DESENELE CONSTITUIE PARTE
INTEGRANTĂ A PREZENTULUI BREVET DE INVENȚIE

CONFIRM PRIN SEMNARE ȘI APLICAREA SIGILIULUI



DIRECTOR GENERAL

L. Boboc

CHIȘINĂU



MD 4127 C1 2012.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4127** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07D 213/50* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) **REJET DE INVENȚIE**

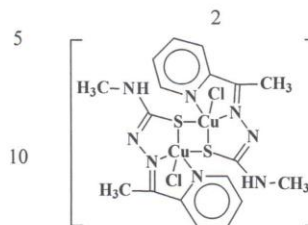
<p>(21) Nr. depozit: a 2010 0109 (22) Data depozit: 2010.10.06</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.09.30, BOPi nr. 9/2011</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; LOZAN-TÎRȘU Carolina, MD; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(54) Utilizare a di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru} în calitate de substanță cu activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ al cuprului biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care poate fi utilizat în calitate de substanță cu activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus*.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de substanță cu activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus* a di(μ -S)-bis{cloro-[1-(piridin-2-il)etanon-4-metiltiosemicarbazonato(1-)]cupru}cu formula:



15 Revendicări: 1

MD 4127 C1 2012.04.30



REPUBLICA MOLDOVA

AGEPI AGENȚIA DE STAT
PENTRU
PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ

BREVET DE INVENȚIE

Nr. 4112

ÎN TEMEIUL LEGII PRIVIND PROTECȚIA INVENȚIILOR, AGENȚIA DE STAT PENTRU
PROPRIETATEA INTELECTUALĂ ELIBEREAZĂ PREZENTUL BREVET DE INVENȚIE

**Compuși coordinativi ai cuprului cu 4-(dimetilfenil)-
tiosemicarbazonele 2-formilpiridinci**

Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA,
MD

Data depozit: 2010.05.17

DESCRIEREA INVENȚIEI, REVENDICĂRILE ȘI DESENELE CONSTITUIE PARTE
INTEGRANTĂ A PREZENTULUI BREVET DE INVENȚIE

CONFIRM PRIN SEMNARE ȘI APLICAREA SIGILIULUI

DIRECTOR GENERAL



CHIȘINĂU



MD 4112 C1 2011.12.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) 4112 (13) C1
(51) Int.Cl: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

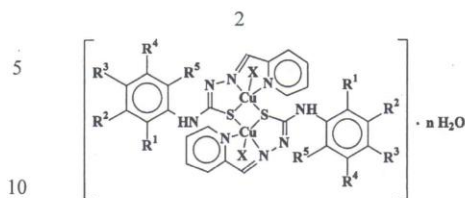
(21) Nr. depozit: a 2010 0067 (22) Data depozit: 2010.05.17	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.05.31, BOPI nr. 5/2011
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: LOZAN-TÎRȘU Carolina, MD; GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Compuși coordinațivi ai cuprului cu 4-(dimetilfenil)-tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie, și anume la compușii coordinațivi ai cuprului biologic activi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care pot fi utilizați în calitate de preparate antimicrobiene în medicină și veterinarie.

Compușii, conform invenției, se referă la compușii coordinațivi ai cuprului cu 4-(dimetilfenil)-tiosemicarbazonele 2-formilpiridinei cu formula generală:



I - VI

- I : R¹ = R⁵ = CH₃; R² = R³ = R⁴ = H; X = Cl; n = 4.
 II : R¹ = R⁵ = CH₃; R² = R³ = R⁴ = H; X = NO₂; n = 4.
 III : R¹ = R⁴ = CH₃; R² = R³ = R⁵ = H; X = Cl; n = 2.
 IV : R¹ = R⁴ = CH₃; R² = R³ = R⁵ = H; X = NO₂; n = 4.
 V : R² = R³ = CH₃; R¹ = R⁴ = R⁵ = H; X = NO₂; n = 4.
 VI : R¹ = R³ = CH₃; R² = R⁴ = R⁵ = H; X = NO₂; n = 4.

care manifestă activitate antimicrobiană.

Revendicări: 2

MD 4112 C1 2011.12.31



INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

IDNO 1006600031731

MD-2028 Republica Moldova, Chișinău, str. Academiei 1. Tel: (373 22)72 55 24, fax: (373 22)72 57 54,
e-mail: microbiotech@imb.asm.md

nr. 74
28 mai 2015

ACT DE IMPLEMENTARE

Denumirea propunerii pentru implementare:

Metodă de determinare a biomasei microbiene în baza standardului de turbiditate.

Autor:

Lozan-Tîrșu Carolina

Locul și perioada desfășurării lucrărilor de implementare

Institutul de microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene,
Perioada 16-28 martie 2015.

Obiectul lucrărilor de implementare:

Implementarea metodei de determinare a cantității de biomasă a bacteriilor în baza standardului de turbiditate și dimensiunile celulelor cu aplicare la tulpinile de colecție

Conținutul lucrărilor de implementare și rezultatele obținute:

Metoda propusă a fost testată pentru 16 culturi de bacterii, caracterizate prin diferită formă și dimensiuni ale celulelor. În calitate de test de control a fost aplicată metoda gravimetrică, realizată după procesul de uscare până la masă constantă a biomasei bacteriene.

Concluzie:

Metoda de elaborată este reproductibilă și oferă informații veridice referitor cantitatea de biomasă prezentă în suspensia bacteriană.

Șeful Colecției Naționale de Microorganisme Neapatogene,
Doctor în științe biologice, Chiselița Oleg

Confirm semnătura dlui Chiselița Oleg
Secretar științific al IMB, dr., conf.cercet.

Chiselița

Miscu Vera



Miscu Vera

Diplome la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale



Medalia de bronz

se acordă

**UNIVERSITĂȚII DE STAT DIN MOLDOVA
- REPUBLICA MOLDOVA -**

**INHIBITORII ANTIBACTERIENI
ȘI ANTIFUNGICI**

Autori: Lozan C., Tapcov V., Gulea A.

cu ocazia
celeia de a 14-a ediții a

**Expoziției internaționale de invenții,
cercetare științifică și tehnologii noi**

- INVENTIKA -

6 - 9 Octombrie 2010

București • România

DORU SIMOVICI

Director General
ROMEXPO S.A.



ANCS

CENTRUL EXPOZITIONAL ROMEXPO BUCUREȘTI

STOWARZYSZENIE POLSKICH WYNALEZCÓW I RACJONALIZATORÓW
ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS



DIPLOMA



of

INTERNATIONAL WARSAW INVENTION SHOW

IWIS 2009

MEDAL

for

LOZAN Carolina, Tsapkov Victor, GULEA Anvelian


from

MOLDOVA

for the invention

Antibacterial and antifungal inhibitors

The President of SPWiR


Adam Rylski Ph. D.

KIWIE, Seoul 2010

DIPLÔME

Ginventions
Geneva

SALON INTERNATIONAL DES INVENTIONS GENÈVE

Après examen, le Jury International a décidé


de remettre à: A. GULEA, V. GROPPA, C. LOZAN, V. TAPCOV, T. CAPATINA, A.
JALBA, A. PAHOLNITCHI, V. VIERU, N. BARBA

pour l'invention: Composés avec de grands spectres d'activité biologique



MÉDAILLE D'OR
GOLD MEDAL
GOLDMEDAILLE

Genève, le 8 avril 2011


Le Président du Jury: David Tajj


Le Président du Salon: Jean-Luc Vincent



NATIONAL INSTITUTE OF
INVENTICS, JASSY, ROMANIA

Diploma

Gold Medal

"HENRI COANDA"

Offered Mr / Ms

GULEA A., GROPPA V., LOZAN C., TAPCOV V.,
CAPATINA T., JALBAA., PAHOLNITCHI A., VIERU V.

COMPOUNDS WITH LARGE SPECTRA
OF BIOLOGICAL ACTIVITY
PATENTS MD Nr. 2786, 2851, 3098

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE
"N. TESTEMETEANU" REPUBLICA MOLDOVA

THE XV-TH INTERNATIONAL EXHIBITION
OF RESEARCH, INNOVATION AND
TECHNOLOGICAL TRANSFER

"INVENTICA 2011"

IASI, ROMANIA
8-10 JUNE 2011

General Manager
Prof. Boris Plahteanu Ph.D





NATIONAL INSTITUTE OF
INVENTICS, JASSY, ROMANIA

Diploma

Offered Mr / Ms

LOZAN-TIRSU C., PAHOLNITCAIA A.,
TSAPKOV V., CAPATINA T., GULEA A., RUDIC V.
ANTIMICROBIAL EFFECT OF COPPER COORDINATION
COMPOUNDS WITH 4-PHENYLTHIOSEMICARBAZONE
PYRIDINE-2-CARBOXYALDEHYDE DERIVATIVES

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE
"N.TESTEMETEANU" REPUBLICA MOLDOVA

THE XV-TH INTERNATIONAL EXHIBITION
OF RESEARCH, INNOVATION AND
TECHNOLOGICAL TRANSFER

"INVENTICA 2011"

IASI, ROMANIA
8-10 JUNE 2011

General Manager
Prof. Boris Plahteanu Ph.D





台灣發明創意產業學會

Taiwan Invention & Innovation Industry Association

TIIA AWARD

On the occasion of the 3CIIs, 2011



Kaohsiung, August 24-27, 2011

*Organized by the International Federation of Inventors' Associations & I-Shou University
The TIIA Award for the best Invention is hereby awarded to*

For the invention of:

Gulea A, Groppa V, Lozan C, Tapcov V, Capatina T, Jalba A, Paholnitchi A.
Compounds with Large Spectra of Biological Activity

Taiwan Invention & Innovation Industry Association

James Su, President

Diploma

se acordă firmei

**MEDALIA
DE
AUR**

**UNIVERSITATEA DE STAT
DIN REPUBLICA MOLDOVA**

**NOI TEHNOLOGII DE OBTINERE A PREPARATELOR
ANTIMICROBIENE DIN BIOMASA DE SPIRULINĂ**

Autori: Rudic Valeriu, Bafir Ludmila, Bulimaga Valentina, Gulea
Aurelian, Tapcov Victor, Lozan-Tirşu Carolina

cu ocazia
celeia de a 15-a ediţii a

**Expoziţiei internaţionale de invenţii,
cercetare ştiinţifică şi tehnologii noi**

- INVENTIKA -
5 - 8 Octombrie 2011
Bucureşti • Romania

DRAGOŞ MIHAEL CIUPARU
Preşedinte
AUTORITATEA NAŢIONALĂ
PENTRU CERCETARE ŞTIINŢIFICĂ


MARIANA SUCIU
Director General
ROMEXPO S.A.

Agencia de Stat pentru Proprietatea Intelectuală a Republicii Moldova
Expoziția Internațională Specializată

INFOINVENT



2011

DIPLOMĂ

se acordă

*Lozan-Tîrșu Carolina, Gulea Aurelian,
Țapcov Victor, Rudic Valeriu, Barba Nicanor, Corja Ion*

pentru

*COMPUȘI COORDINATIVI AI CUPRULUI
CARE MANIFESTĂ PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE*

MEDALIA DE AUR

PREȘEDINTELE JURIULUI

22-25 noiembrie, Chișinău, Republica Moldova

Agencia de Stat pentru Proprietatea Intelectuală a Republicii Moldova
Expoziția Internațională Specializată

INFOINVENT



2011

DIPLOMĂ

se acordă

*Rudic Valeriu, Batîr Ludmila, Bulimaga Valentina,
Gulea Aurelian, Lozan-Tîrșu Carolina*

pentru

*NOI TEHNOLOGII DE OBTINERE A PREPARATELOR
ANTIMICROBIENE DIN BIOMASA DE SPIRULINĂ*

MEDALIA DE AUR

PREȘEDINTELE JURIULUI

22-25 noiembrie, Chișinău, Republica Moldova

Agenția de Stat pentru Proprietate Intelectuală a Republicii Moldova



Expoziția Internațională Specializată

INFOINVENT

DIPLOMĂ

se acordă

Gulea Aurelian, Graur Vasilii, Lozan-Tîrșu Carolina, Pahonțu Elena, Japcov Victor,
Cotovaia Aliona, Rudic Valeriu, Ghicavii Victor

pentru

NOI INHIBITORI ANTIMICROBIENI

MEDALIE DE BRONZ

PREȘEDINTELE JURIULUI INTERNAȚIONAL

19-22 noiembrie, Chișinău, Republica Moldova

10. IZLOŽBA INOVACIJA, PROTOTIPOVA I STUDENTSKIH POSLOVNIH PLANOVA
I
39. HRVATSKI SAJAM INOVACIJA S MEĐUNARODNIM DJELOVANJEM



10.
podjzor

DODJELJUJE SE

DIPLOMA

IME I PREZIME
GULEA AURELIAN, GRAUR VASILE, LOZANTIESU CAROLINA,
PAHONTU ELENA, RUDIC VALERIU, GHICAVI VICTOR, TAPCOV VICTOR

INOVACIJA
NOVI ANTIFUNGALNI, ANTIBAKTERIJSKI INHIBITORI

ZA USPIJEŠAN NASTUP I OSVOJENU **SREBRNU MEDALJU** NA

10. IZLOŽBI INOVACIJA, PROTOTIPOVA I STUDENTSKIH POSLOVNIH PLANOVA
I

39. HRVATSKOM SAJMU INOVACIJA S MEĐUNARODNIM DJELOVANJEM

F. Kragić

Tera Tehnopolis d.o.o. Hrvatska udruga inovatora podzjetnika

J. Tešić

Hrvatski savez inovatora

ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS



DIPLOMA



IV INTERNATIONAL WARSAW INVENTION SHOW

IWIS 2010

GOLD with MENTION

for

LOZAN Carolina, TAPKOV Victor, GULEA Aurelian

Moldova

for the invention

Antibacterial Inhibitors

The President of Jury

Prof. Kazimierz Fabisiak

The President of APIR

Adam Rylski, PhD

Warsaw, 22nd of October 2010

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Lozan-Tîrșu Carolina

Data

CURRICULUM VITAE

CAROLINA LOZAN-TÎRȘU



Născută:	9 noiembrie, 1975, Florești, Republica Moldova
Cetățenia:	Republica Moldova, România
Educație:	1982- Școala Medie, or. Serghievca, r-l Belgorod-Dnestrovsc, reg. Odesa, Republica 1992 Ucraina.
Studii:	1992- Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T.Popa” Iași. 1997 Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din 1997- Moldova, Facultatea de Medicină Generală, specialitatea Medic Generalist. 2000 2000- Masteratul în Microbiologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie 2002 „Nicolae Testemițanu” din Moldova. Stagiul la Centre regional de lupte contre le cancer a Angers, 2005 Franța. Rezidențiat, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae 2006- Testemițanu” din Moldova, Facultatea de Medicină Generală, specialitatea Medic 2008 Microbiolog. 2009- Doctorat, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” 2014 din Moldova, Catedra de microbiologie, virusologie și imunologie specialitatea Microbiologie. Proiectul „Învățământul la distanță în domeniul HIV/SIDA”, tutore modul 2010- comunicarea și dezvoltarea personală, proiect al ȘMSP în parteneriat cu 2015 Asociația obștească a Masterilor în Sănătatea Publică din Republica Moldova, finanțat de Fondul Global pentru combaterea TB, HIV și Malariei. Participări în proiecte științifice naționale și internaționale: Domeniul de activitate științifică: Studiul activității antimicrobiene ale unor compuși chimici autohtoni. Date profesionale: 2001- Laborant superior, Catedra de microbiologie, virusologie și imunologie, 2002 Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Moldova. Asistent universitar, Catedra de microbiologie, virusologie și imunologie, 2002- Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din prezent Moldova. Cursuri de perfecționare: 2004 Cursuri de perfecționare strategii L.S.D.G.C. oferite de către centrul educațional „PRO-DIDACTICA”. 2005 Seminarul de pedagogie medicală, condus de către prof. O. Armstrong CIDMEF, Nantes, Franța. 2007 Programul de dezvoltare metode de instruire a adulților și abilități de comunicare, condus de către V. Popa, director adjunct AXA Management Consulting, în cadrul proiectului USAID PHH, Chișinău, Moldova. 2007 Training in elaboration of BCC curriculum condus de către B. Crook, Consultant International Public Health, în cadrul Proiectului USAID PHH, Chișinău, Moldova. 2008 Cursuri de perfecționare Microbiologia clinică asistată de calculator, Chișinău, Moldova. 2009 Training „Abilități de instruire a adulților” condus de către V.

- Popa, director adjunct AXA Management Consulting, în cadrul, Proiectului UNICEF, Chișinău, Moldova.
- 2009 Training „Comunicarea pentru schimbarea comportamentului”, organizat în cadrul proiectului UNICEF „Dezvoltarea capacităților de comunicare în promovarea sănătății în instituțiile de risc, a medicilor de familie, și a persoanelor cu funcții de decizii în instituțiile cheie”, condus de Oliver Wates, Anatolii Verbin, Media Train Ltd, Chișinău, Moldova
- 2009 Training „comunicarea în situații de criză” organizat în cadrul proiectului UNICEF „Dezvoltarea capacităților de comunicare în promovarea sănătății în instituțiile de risc, a medicilor de familie, și a persoanelor cu funcții de decizii în instituțiile cheie”, condus de către Oliver Wates, Anatolii Verbin, Media Train Ltd, Chișinău, Moldova.
- 2010 Cursuri de perfecționare „Microbiologia infecțiilor sexual transmisibile”, Chișinău, Moldova.
- 2016 Cursuri de perfecționare „Psihopedagogia învățământului superior”, Chișinău, Moldova.
- Lucrări științifice și științifico-metodice:** 2 monografii coautor, 24 de lucrări științifice, inclusiv 8 articole, dintre care 3 în monoautorat, 15 teze, 5 brevete de invenție.
- Premii, mențiuni, distincții:** Gold Prize. Seoul, Korea International Women’s invention exposition. „Antibacterial inhibitors” – 6-9 mai 2010.
- Diploma International Warsaw invention show IWIS 2009 GOLD with Mention. For the invention Antibacterial and antifungal inhibitors. KIWIE, Seoul 2010.
- Diploma IV International Warsaw invention show IWIS 2010 GOLD with Mention. For the invention Antibacterial Inhibitors. Warsaw, 22 of october 2010.
- Medalia de bronz „Inhibitorii antibacterieni și antifungici”. Inventica 6-9 octombrie 2010 București, Romania.
- Diploma Compounds with Large Spectra of Biological Activity. Taiwan Invention & Innovation Industry Association. Kaosuin, August 24-27, 2010.
- Diploma Gold Medal „Henri Coanda” Compounds with large spectra of biological activity patents MD Nr. 2786,2851, 3098. „Inventica 2011” Iași Romania 8-10 june 2011.
- Diploma for Lozan-Tîrșu C., Antimicrobial effect of copper coordination compounds with 4-phenylthiosemicarbazone pyrididine-2-carboxaldehyde derivates. „Inventica 2011” Iași Romania 8-10 june 2011.
- Diplome salon international des inventions Geneva. Composes avec de grands spectres d’activitè biologique. Geneve, le 8 avril 2011.
- Medalie de aur Compușii coordinativi ai cuprului care manifestă proprietăți antimicrobiene. „Infoinvent ” Chișinău 22-25 noembrie 2011.
- Medalie de aur Noi tehnologii de obținere a preparatelor antimicrobiene din biomasa de spirulină „Infoinvent ” Chișinău 22-25 noembrie 2011.
- Medalie de aur „Inventica 2011” Iași România 5-8 octombrie 2011.
- Medalie de bronz „Infoinvent ” 19-22 noembrie 2013.
- Apartenența la societăți:** Membru al Societății Microbiologilor din Moldova.
- Cunoașterea limbilor:** Rusa, Engleza, Franceza (fluent).
- Adresa:** *Serviciu:* str. Testemițanu 26/2, Chișinău, Republica Moldova
Tel: 373(22) 20 21 87, e-mail: karo_lina_ro@yahoo.com.
Domiciliu: str. M. Spătaru 23, MD 2024, Chișinău, Moldova. Tel:373(22)488400.