

Raport final

Contract de finanțare

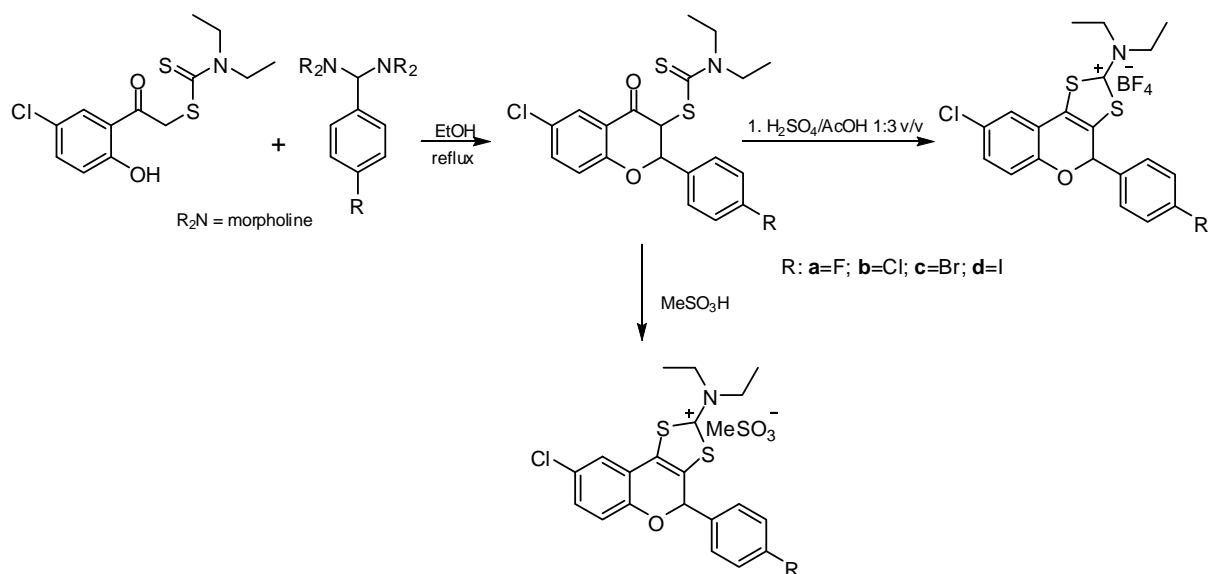
Nr. 152PED/2017

Flavonoide 1,3-Ditiolice cu Proprietati Antimicrobiene

Rezumat: O serie de flavonoide de sinteza au fost preparate si testate împotriva a două tulpini bacteriene (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922). Activitatea antimicrobiană este importantă în cazul ambelor tulpini bacteriene, efectul fiind mult mai însemnat împotriva bacteriei Gram pozitive testate. Toate flavonoidele testate prezinta toxicitate redusa. Avind in vedere cele de mai sus acesti compusi pot fi utilizati cel putin ca agenti dezinfectanti, aplicatie importanta in contextul infectiilor nosocomiale; teste ulterioare specifice vor confirma posibilitatea utilizarii acestora ca medicamente.

Act 1.1 Flavonoide 1,3-ditiolice: Optimizarea sintezei si evaluarea stabilitatii structurale

Heterociclocondensarea ditiocarbamatilor la flavonoidele triciclice a fost optimizata din punctul de vedere al sintezei - temperatura, agentul de ciclizare - pina la o scara de nivelul gramelor, intr-o singura etapa de reactie. Succesul acestei etape il reprezinta sinteza unei noi sari de 1,3-ditioliu, metansulfonatul de 1,3-ditioliu, cu o solubilitate crescuta in apa fata de sarurile anterior studiate.



În ceea ce privește stabilitatea compuşilor țintă s-a demonstrat că există o sensibilitate a acestora în soluții apoase, la păstrare în acest mediu pentru mai mult de o lună de zile. Din acest motiv, toate studiile ulterioare au fost realizate cu soluții proaspăt preparate.

Act 1.2 Membrane polimerice biocompatibile

Incorporarea flavonoidelor triciclice în membrane polimerice s-a realizat într-un substrat poliuretanic biocompatibil și biodegradabil. Studiul eliberării substanței active s-a realizat raportat la o curbă de etalonare determinată pe o soluție de concentrație de 10^{-3} în apă, proaspăt preparată. Determinările spectrale de eliberare a principiului activ indică faptul că membrana folosită poate fi utilizată cu succes ca transportor / eliberator controlat, în special în condițiile în care este biocompatibil și biodegradabil.

Act 1.3 Testarea activității flavonoidelor 1,3-ditiolice asupra unui spectru larg de bacterii.

Determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) și concentrației minime bactericide (CMB)

Valorile CMI și CMB determinate pentru cele patru flavonoide testate împotriva a două tulpini bacteriene (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922) sunt prezentate în Tabelul 1. Deși activitatea antimicrobiană este importantă în cazul

ambelor tulpini bacteriene, trebuie remarcat faptul că efectul este mult mai însemnat împotriva bacteriei Gram pozitive testate. Cele patru flavonoide testate au demonstrat proprietăți antibacteriene mult mai importante comparativ cu alte flavonoide sintetice: 2',4',3-trihydroxychalconă (CMI = 46 mg/l împotriva *E. coli*) [1], derivați ai 3-*O*-alkyl-(+)-catechin (CMI între 0,5-2 și 32-128 mg/l) [2], derivați ai 7-*O*-genistein (CMI între 1,7 și > 50 mg/l împotriva unor bacterii Gram pozitive și > 50 mg/L împotriva unor bacterii Gram negative) [3], etc. Trebuie remarcat și faptul că trei din compuși (ClCl, ClBr, ClI) s-au dovedit mai eficienți comparativ cu panduratin A (CMI = 0.5-1 mg/l împotriva *S. aureus*) [4] și isobavachalcone (CMI între 0,3-0,6 și 0,3 - >39,1 mg/l) [5] - două din cele mai active flavonoide naturale cu proprietăți antibacteriene cunoscute până în prezent [6].

Tabel 1 – Valorile CMI și CMB pentru flavonoidele sintetice investigate

Flavonoida	Tulpină bacteriană			
	CMI (μg/ml)		CMB (μg/ml)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
ClF	1,95	15,62	3,9	15,62
ClCl	0,24	3,9	0,48	3,9
ClBr	0,24	3,9	3,9	1,95
ClI	0,24	1,95	0,48	0,97

CMI = concentrația minimă inhibitorie

CMB = concentrația minimă bactericidă

Evaluarea influenței flavonoidelor sintetice asupra dezvoltării bacteriilor

Cele patru flavonoide testate au inhibat semnificativ dezvoltarea tuturor bacteriilor (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) aflate în faza de creștere exponențială. Prezența flavonoidelor în mediul de cultură a determinat prelungirea fazei de lag cu până la 9 ore pentru *S. aureus* și *B. subtilis* la concentrația de 0,24 μg/ml comparativ cu controlul. Concentrații mai mari (3,9 μg/ml și 15,62 μg/ml) au indus prelungirea fazei de lag cu până la 12 ore pentru *E. coli* și *K. pneumoniae*. Nu s-a evidențiat creștere la concentrații echivalente cu 2 × MIC pe toată durata desfășurării experimentelor.

Studii asupra integrității membranei celulare

Pătrunderea iodurii de propidium și bromurii de etidiu în interiorul celulelor de *S. aureus* și *E. coli* la concentrații de flavonoide echivalente cu $2 \times \text{MIC}$ a fost evidențiată cu ajutorul microscopului Leica Confocal Laser Scanning Microscope (TCS SPE DM 5500Q). Procentele mari de celule fluorescente observate după numai 30 minute de expunere (100% pentru *E. coli*) demonstrează faptul că prezența flavonoidelor testate determină modificări la nivelul membranelor celulare care devin astfel permeabile pentru fluorocromii utilizați.

Evaluarea morfologiei celulei bacteriene prin studii SEM

Analizele de microscopie electronică confirmă mecanismul de acțiune de tip membranar. Imaginile obținute demonstrează existența unor modificări morfologice ireversibile la nivelul celulelor bacteriene expuse la diferite concentrații de flavonoide – Fig. 1.

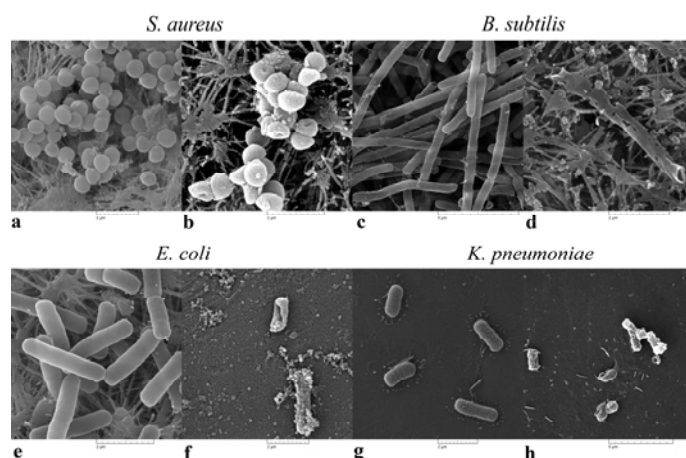


Figura 1 – Imagini electronomicroscopice prezentând efectele flavonoidei C1C1 asupra morfologiei celulelor bacteriene: a, c, e, g - controale; b, d, f, h – celule expuse la C1C1 ($2 \times \text{MIC}$).

Referințe bibliografice Act 1.3

[1] Alvarez MA, Debattista NB, Pappano NB. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. Folia Microbiol. 2008;53:23-8.

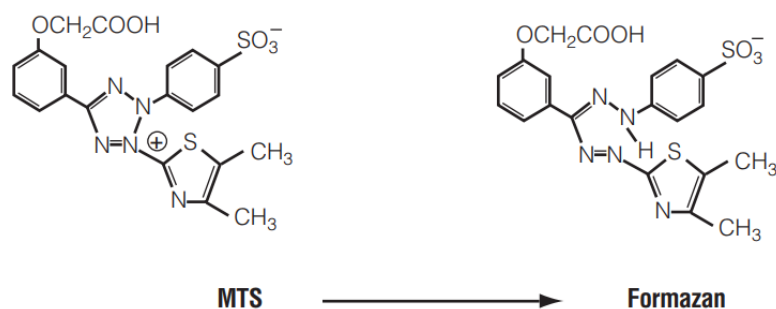
[2] Park KD, Cho SJ. Synthesis and antimicrobial activities of 3-O-alkyl analogues of (+)-catechin: improvement of stability and proposed action mechanism. Eur J Med Chem. 2010;45:1028-33.

- [3] Zhang LN, Cao P, Tan SH, Gu W, Shi L, Zhu HL. Synthesis and antimicrobial activities of 7-O-modified genistein derivatives. *Eur J Med Chem.* 2008;43:1543-51.
- [4] Rukayadi Y, Lee K, Han S, Yong D, Hwang JK. In vitro activities of panduratin A against clinical *Staphylococcus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4529-32.
- [5] Mbaveng AT, Ngameni B, Kuete V, Simo IK, Ambassa P, Roy R, et al. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology.* 2008;116:483-9.
- [6] Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:99-107.

Act 1.4 Studii de citotoxicitate

Materiale si metode

Citotoxicitatea probelor studiate a fost măsurată utilizând testul colorimetric MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega), pentru evaluarea activității metabolice celulare. Agentul CellTiter 96® Aqueous One Solution conține un tetrazoliu [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium, inner salt; MTS] și un agent de cuplare a electronilor, etosulfat de fenazina. În mitocondriile celulelor, acest MTS este transformat enzimatic într-un formazan colorat, care absoarbe lumina la 490 nm, această absorbantă putând fi citită la un cititor de microplăci. Valoarea absorbantei va depinde de cantitatea de formazan produsă, care depinde de numărul mitocondriilor active. Practic, în mod indirect, testul MTS reflectă numărul și starea de sănătate a celulelor testate.



https://www.promega.ro/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582

Celulele – fibroblasti dermici normali umani - NHDF au fost achiziționate de la PromoCell și cultivate în mediu alfa-MEM (Lonza) suplimentat cu 10% ser bovin fetal (FBS, Biochrom GmbH) și 1% amestec de penicilină-streptomicină-amfotericină B (10K / 10K / 25 μg/ 100 mL, Lonza). Pentru cultivare și expansiune s-au utilizat flascuri cu suprafața de 25 și 75 cm² tratate pentru culturi tisulare până la obținerea unui număr suficient de celule. Culturile s-au realizat în incubator la 37°C, 5% CO₂, atmosferă umedă. Pentru desprinderea celulelor aderente în momentul efectuării pasajelor s-a utilizat o soluție de 0.25% tripsina în EDTA (Lonza). O dată cantitatea de celule necesară fiind obținută (în a proximativ 1-2 săptămâni), celulele au fost desprinse cu tripsină, spălate în mediu, centrifugate și numărate, după care s-a trecut la însămânțarea lor în microplăci de 96 godeuri, tratate pentru culturi celulare; concentrația a fost de 5000 celule/godeu.

A doua zi s-a trecut la prepararea compușilor de testat (LB1-5). Deoarece compușii prezintă o solubilitate redusă în apă, ei au fost dizolvați în DMSO. Astfel, plecând de la concentrația de 3200 ug/mL în DMSO, s-au realizat mai multe diluții seriate tot în DMSO, după care toate aceste diluții au fost mai departe diluate de 100 de ori, de această dată în mediu de cultură, în final obținându-se un interval de concentrații 32 – 1.64 ug/mL. Celulele însămânțate cu o zi înainte au fost tratate prin înlocuirea mediului de cultură existent cu câte 100 uL/godeu din aceste concentrații de compus. Godeurile cu celule control au fost tratate cu 100 uL mediu de cultură cu 1% DMSO. O dată tratamentul fiind efectuat, plăcile cu celule au fost returnate în incubator.

După 44 de ore de la tratament, cu micropipeta multicanal s-au administrat câte 20 uL/godeu soluție MTS, iar placile au fost incubate pentru încă 4 ore. În final, a fost citită absorbanta la 490 nm cu ajutorul unui cititor de microplăci (Ensign, PerkinELmer).

Experimentele au fost repetate de 3 ori, iar interpretarea datelor s-a realizat cu programul GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Pentru a calcula concentrația la care viabilitatea celulară scade la 50% (IC₅₀) din program s-a aplicat un model de regresie neliniara cu 4 parametri și s-a construit un grafic de tip logaritm din concentrație contra efect (viabilitate).

Rezultate

Efectul citotoxic al compușilor LB1-5 a fost evaluat prin tratarea celulelor de tip fibroblaști dermici normali umani timp de 48 de ore cu un interval de concentrații ale acestora. Pentru determinarea IC₅₀, s-a construit o curbă de tip logaritm din concentrație (axa OX) și efect (axa OY) din care s-a extrapolat valoarea IC₅₀. Valorile de pe verticală din

grafic au fost deduse pe baza testului MTS, un test colorimetric care estimează indirect gradul de viabilitate celulară.

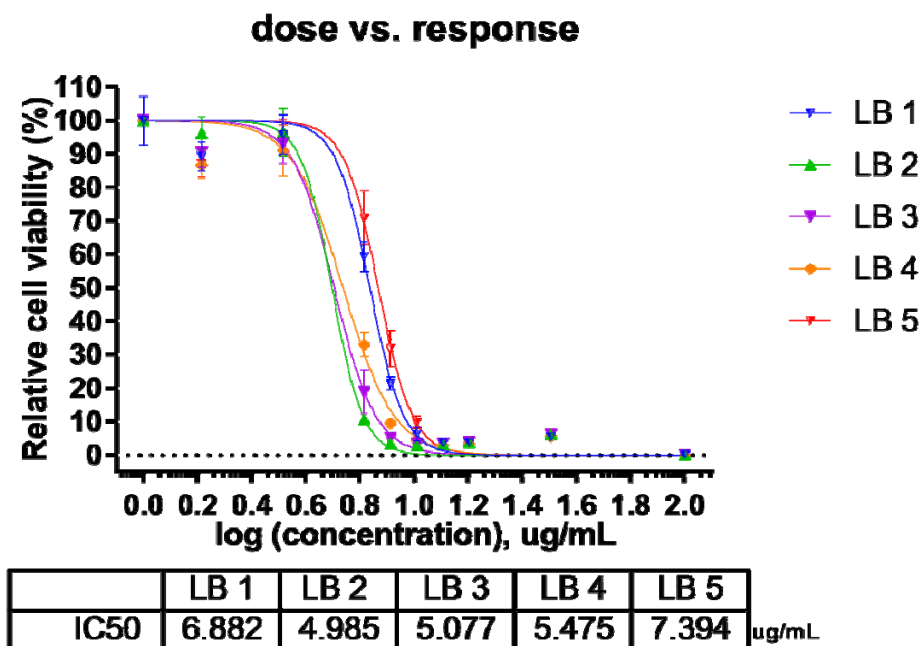


Fig. 1. Determinarea IC₅₀. Celulele NHDF au fost cultivate timp de 48 de ore în prezența de LB1-5.

A) Reprezentarea grafică a logaritmulor din concentrație și efect asupra viabilității, valorile reprezintă medii +/- deviația standard, n=3.

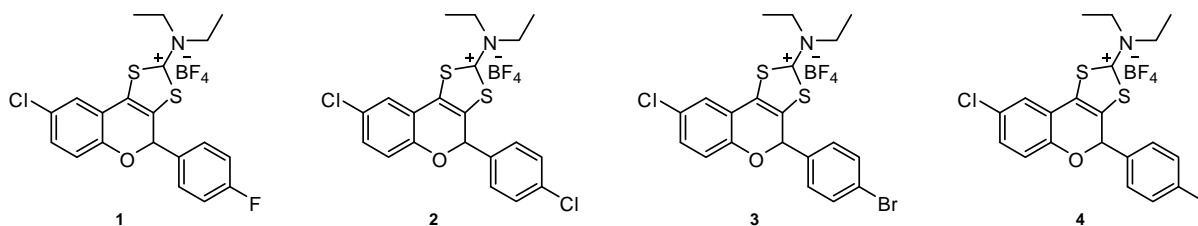
B) valorile IC₅₀ în ug/mL.

Dintre cei 5 compuși testați, LB5 demonstrează cea mai redusă toxicitate, având o valoare IC₅₀ de 7.394 ug/ml (Fig.X). El este urmat îndeaproape de compusul LB1 cu un IC₅₀ de 6,882. În schimb în cazul compușilor LB2, LB3 și LB4, citotoxicitatea este mai crescută, ei afișând o valoare IC₅₀ de 4,985, 5,077, respectiv 5,475 ug/mL.

La valori mai mici de 3.28 ug/mL, niciunul dintre compuși nu prezintă citotoxicitate importantă.

Act 2.1 Analiza comparativa a rezultatelor pentru validarea la nivel de laborator a celui mai bun agent antibacterian

Flavonoidele triciclice sintetizate si analizate comparativ ca agenti antibacterieni sunt prezentate mai jos.



Valorile CMI și CMB determinate pentru cele patru flavonoide testate împotriva a două tulpini bacteriene (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922) sunt prezentate în Tabelul 1. Deși activitatea antimicrobiană este importantă în cazul ambelor tulpini bacteriene, trebuie remarcat faptul că efectul este mult mai însemnat împotriva bacteriei Gram pozitive testate. Se remarcă faptul că trei din compuși (**2**, **3** și **4**) s-au dovedit mai eficienți comparativ cu panduratin A (CMI = 0.5-1 mg/l împotriva *S. aureus*) și isobavachalcone (CMI între 0,3-0,6 și 0,3 - >39,1 mg/l) - două din cele mai active flavonoide naturale cu proprietăți antibacteriene cunoscute până în prezent.

Dintre cei 4 compuși testați, flavonoida tricyclică **4** demonstrează cea mai redusă toxicitate, având o valoare IC_{50} de 7.394 ug/ml. El este urmat îndeaproape de compusul **3** cu un IC_{50} de 5,475 ug/mL. În schimb în cazul compușilor **1** și **2**, citotoxicitatea este mai crescută, ei afișând o valoare IC_{50} de 4,985, respectiv 5,077 ug/mL. La valori mai mici de 3.28 ug/mL, niciunul dintre compuși nu prezintă citotoxicitate importantă.

Toate aceste date conduc la concluzia ca toate cele patru flavonoide tricyclice testate au o activitate antibacteriana semnificativa care poate conduce dupa finalizarea citorva teste specifice domeniului la implimentarea rezultatelor la nivel TRL 4. Dintre acestea se remarca compusul **4**, cu cele mai bune rezultate in ceea ce priveste valoarea CMI, CMB si IC_{50} .

Act 2.2 Diseminarea rezultatelor

Avind in vedere cele de mai sus acesti compusi pot fi utilizati cel putin ca agenti dezinfectanti; teste ulterioare specifice vor confirma posibilitatea utilizarii acestora ca medicamente. Din aceste motive o aplicatie de brevet este in pregatire.

Rezultatele obtinute au fost publicate intr-o revista internationala cotate ISI: Cornelia Babii, Gabriela Mihalache, Lucian Gabriel Bahrin, Anca-Narcisa Neagu, Irina Gostin, Cosmin Teodor Mihai, Laura-Gabriela Sarbu, Lucian Mihail Birsa*, Marius Stefan*, " A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: In vitro activity and proposed mode of action " PLoS ONE 13(4): e0194898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194898>

Alte doua articole au fost acceptate spre publicare intr-o revista cotate ISI (Revista de Chimie-Bucharest).

Act 2.3 Studii pe termen lung al impactului noilor compusi asupra capacitatii de supravietuire a celulelor bacteriene

Cele patru flavonoide testate au prezentat o importantă activitate bactericidă împotriva tuturor tulpinilor bacteriene testate (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883). Această activitate este demonstrată de reducerile semnificative ale capacității de supraviețuire a celulelor bacteriene înregistrate.

O reducere a viabilității celulelor de *S. aureus* mai mare de 3-log₁₀ a fost evidențiată pentru flavonoida **2** după numai 4 ore de expunere la o concentrație de 1,95 μg/mL (Fig. 1-a). La o concentrație echivalentă cu 2 x CMI (0,48 μg/mL), flavonoidele au determinat același efect bactericid împotriva celulelor de *B. subtilis* după numai 3 ore de expunere (Fig 3-b). În cazul bacteriilor Gram negative testate, expunerea celulelor la concentrații echivalente cu 2 x CMI a dus la o reducere a celulelor viabile cu mai mult de 5-log₁₀ în doar 60 de minute (Fig. 3-c, d). De asemenea trebuie să menționăm faptul că nu s-a înregistrat creștere celulară după 24 ore de expunere la flavonoida **2** la concentrații de 0,24 μg/mL (*B. subtilis*) și 7,81 μg/mL (*E. coli*).

Rezultatele obținute demonstrează că celulele bacteriene nu au supraviețuit (nu s-a recuperat nicio celulă viabilă) după 24 de ore în prezența flavonoidelor testate la diferite concentrații: 0.24 μg/mL (*B. subtilis*), 0.97 μg/mL (*S. aureus*), 7.81 μg/mL (*E. coli*) and 15.62 μg/mL (*K. pneumoniae*). La o concentrație echivalentă cu 2 x CMI toate celulele de *E. coli* și *K. pneumoniae* au fost omorâte într-o oră. Comparând rezultatele obținute în studiile noastre cu cele existente în literatura de specialitate putem afirma că flavonoida **2** a prezentat o activitate bactericidă mai mare de până la 100 de ori împotriva bacteriilor Gram pozitive și până la opt ori mai mare împotriva bacteriilor Gram negative față de majoritatea flavonoidelor sintetice prezentate (1, 2, 3).

În concluzie, rezultatele noastre sugerează că flavonoidele sintetice cu sulf pot fi utilizate ca agenți antibacterieni cu importante proprietăți bactericide *in vitro* împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative.

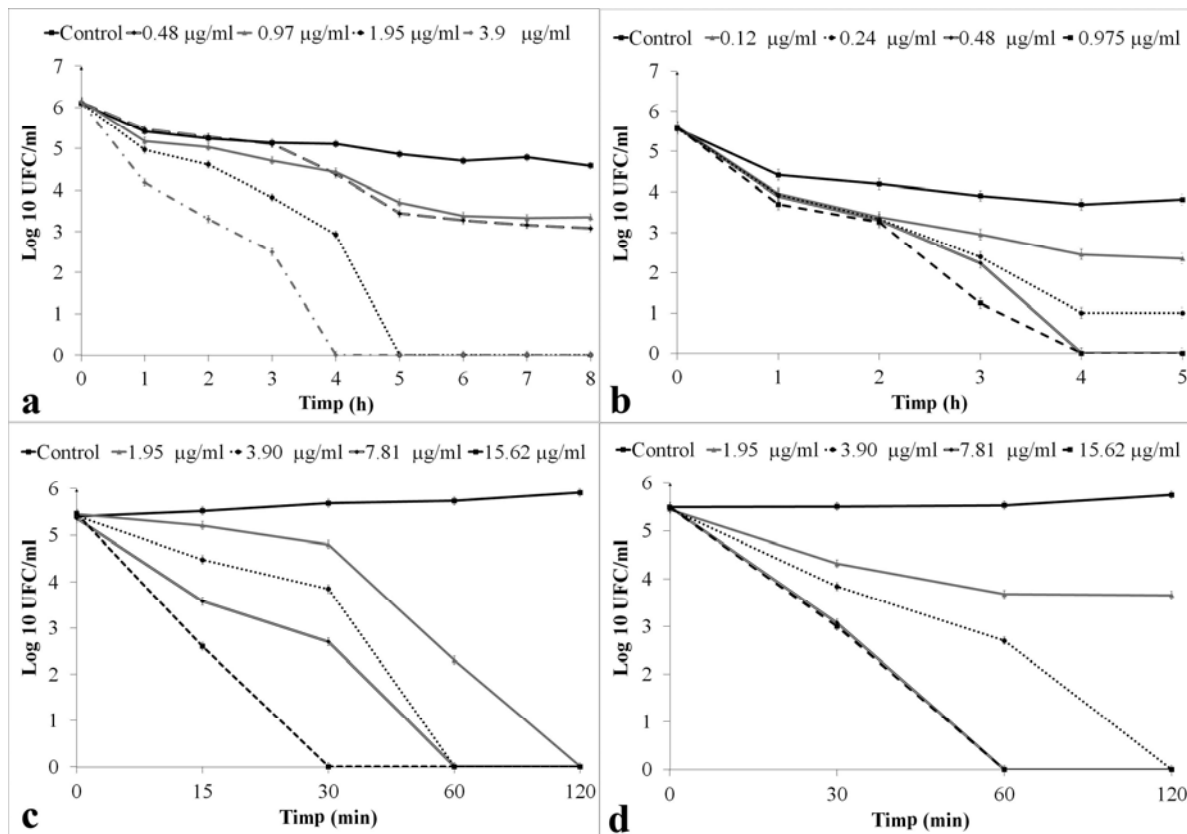


Fig 1. Dinamica viabilității celulare în prezența flavonoidei CI-CI la diferite concentrații. a – *S. aureus*; b – *B. subtilis*; c – *E. coli*; d – *K. pneumoniae*. Fiecare simbol reprezintă media a cel puțin 3 determinări. Barele reprezintă intervalul de confidență ($P < 0.05$).

Bibliografie

1. Lee K, Moon S-H, Lee J-Y, Kim K-T, Park Y-S, Paik H-D. Antibacterial activity of a novel flavonoid, 7-O-butyl naringenin, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Food Sci. Biotechnol. 2013;22(6):1725-8.
2. Siddiqui ZN, Musthafa TN, Ahmad A, Khan AU. Thermal solvent-free synthesis of novel pyrazolyl chalcones and pyrazolines as potential antimicrobial agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011;21(10):2860-5. Epub 2011/04/22.

3. Rusin A, Krawczyk Z, Gryniewicz G, Gogler A, Zawisza-Puchalka J, Szeja W. Synthetic derivatives of genistein, their properties and possible applications. *Acta Biochim. Pol.* 2010;57(1):23-34.