

**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.: 579.6 : 616-095

**ACȚIUNEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI
COORDINATIVI AI ELEMENTELOR 3D ȘI A
PREPARATELOR POLIFUNCȚIONALE NOI**

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:



ZARICIUC Elena

© Zariciuc Elena, 2023

CUPRINS

ADNOTĂRI (în limbile română, rusă și engleză).....	5
LISTA TABELELOR.....	8
LISTA FIGURILOR.....	10
LISTA ABREVIERILOR.....	13
INTRODUCERE.....	14
1. REZISTENȚA MICROORGANISMELOR PATOGENE LA ANTIBIOTICE ȘI ELABORAREA NOILOR REMEDII EFICIENTE	
1.1. Originea și mecanismele rezistenței la antibiotice.....	23
1.2. Căi de soluționare a problemei antibioticorezistenței: adjuvanții și formule hibride sinergice.....	29
1.3. Compuși chimici noi și compuși naturali cu proprietăți antimicrobiene – potențiale soluții pentru problema antibioticorezistenței.....	39
1.4. Concluzii la capitolul 1.....	51
2. MATERIALE ȘI METODELE DE CERCETARE	
2.1. Obiectele de studiu.....	53
2.2. Metode de cercetare.....	62
2.2.1. Metode microbiologice.....	62
2.2.2. Metode biochimice.....	66
2.3. Concluzii la capitolul 2.....	71
3. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI NOI	
3.1. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi tiosemicarbazonaților Cu(II), Co(II) și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxi benziliden)-hidrazincarbonotioamidă.....	72
3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi noi tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1- il)hidrazincarbonotioamidă.....	75
3.3. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonații Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-il carba mohidrazonotioat.....	78
3.4. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonații Cu(II) și Co (III) care conțin hidrazincarbonotioamidă.....	81
3.5. Activitatea antimicrobiană a compușilor hidrazonici ai Cu(II) ce conțin S- metil-β-N-(2-hidroxil-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat.....	84

3.6.	Acțiunea antimicrobiană a compușilor de origine naturală și combinațiilor lor cu compușii coordinativi ai metalelor de tranziție.....	86
3.7.	Concluzii la capitolul 3.....	95
4. MECANISMELE POSIBILE DE ACȚIUNE A NOILOR COMPUȘI ASUPRA MICROORGANISMELOR PATOGENE		
4.1	Efectele compușilor cu acțiune antimicrobiană asupra permeabilității învelișurilor celulare ale microorganismelor patogene.....	97
4.2.	Formarea speciilor reactive ale oxigenului în celulele microbiene sub influența compușilor noi antimicrobieni.....	105
4.3.	Influența compușilor antimicrobieni noi asupra unor procese enzimactice la <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923 și <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922.....	117
4.4.	Concluzii la capitolul 4.....	126
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI.....		128
BIBLIOGRAFIE.....		131
ANEXE.....		159
Anexa 1. Brevete de invenție.....		160
Anexa 2. Diplome la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale.....		166
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....		175
CV-ul AUTORULUI.....		176

ADNOTARE

Zariciuc Elena, „Acțiunea antimicrobiană a unor compuși coordinativi ai elementelor 3d și a preparatelor polifuncționale noi”, teză de doctor în științe medicale, specialitatea 313.02 – Microbiologie, virusologie medicală, Chișinău, 2023

Structura tezei: Teza conține introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 225 titluri, 2 anexe, 130 pagini text de bază, 24 figuri, 18 tabele. Rezultatele sunt reflectate în 38 publicații științifice: 1 capitol în monografie colectivă, 10 articole în reviste științifice, din ele 2 în monoautorat; 23 rezumate și 6 brevete de invenție.

Cuvintele cheie: compuși coordinativi, 3d elemente, extracte din spirulină, enotantină, activitate antimicrobiană, concentrație minimă de inhibiție, concentrație minimă bactericidă /fungicidă, activitate enzimatică, permeabilitate membranară, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*.

Scopul lucrării: evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor chimici noi ai 3d elementelor și a posibilității de amplificarea a efectelor biologice prin obținerea de combinații polifuncționale cu compușii de origine naturală.

Obiectivele lucrării: identificarea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană înaltă; evaluarea acțiunii antimicrobiene a compușilor de origine naturală și combinațiilor lor cu compușii chimici noi ai metalelor de tranziție; stabilirea unor ținte specifice de acțiune antimicrobiană a compușilor chimici noi și a combinațiilor lor cu compușii naturali.

Noutatea și originalitatea științifică: A fost realizat screeningul și evidențiați noi compuși chimici tiosemicarbazonici cu 3d elementele cu activitate antimicrobiană pronunțată. A fost demonstrată posibilitatea măririi nivelului de manifestare a efectelor biologice ale compușilor testați în combinație cu extractele din spirulină și enotantina solubilă. A fost demonstrat caracterul polifuncțional al combinațiilor obținute prin evidențierea mai multor ținte de acțiune a acestora asupra tulpinilor microbiene testate.

Rezultatele obținute, care contribuie la soluționarea problemei științifice importante: evidențierea de noi substanțe chimice, compuși naturali noi și combinații dintre acestea care prezintă efecte antimicrobiene pronunțate; identificarea posibilelor ținte de acțiune a acestora.

Semnificația teoretică: Au fost acumulate cunoștințe noi despre activitatea antimicrobiană a unor compuși ai 3d elementelor, și combinațiilor acestora cu extracte din spirulina și enotantină hidrosolubilă și demonstrat caracterul polifuncțional al acestor combinații prin evidențierea mai multor ținte de acțiune.

Valoarea aplicativă a lucrării: Au fost evidențiați compuși chimici noi ai 3d elementelor și a combinațiile acestora cu extracte naturale, care posedă activitate antimicrobiană înaltă față de tulpinile de referință de microorganisme patogene, de perspectivă pentru continuarea cercetărilor biomedicale în vederea evidențierii efectelor *in vivo*.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului au fost implementate la catedra de Microbiologie și Imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" ca material didactic pentru instruirea universitară.

АННОТАЦИЯ

Заричук Елена “Антимикробное действие некоторых координационных соединений 3d-элементов и новых полифункциональных препаратов”. Диссертация кандидата медицинских наук, специальность 313.02 – Медицинская микробиология, вирусология, Кишинёв, 2023

Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и рекомендаций, библиографического списка из 225 наименований, 2 приложений, 130 страниц основного текста, содержит 24 рисунков и 18 таблиц. Результаты исследований опубликованы в 38 научных работах: 1 глава в коллективной монографии, 10 статей в научных журналах, из них 2 без соавторов; 23 тезиса и 6 патента.

Ключевые слова: координационные соединения, 3d элементы, экстракты спирулины, энтаннин, антимикробная активность, минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная/фунгицидная концентрация, энзиматическая активность, проницаемость мембран, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*.

Цель работы: оценка антимикробных свойств новых химических соединений 3d-элементов и возможности усиления их биологического действия за счет получения полифункциональных комбинаций с соединениями природного происхождения.

Задачи исследований: выявление новых химических соединений с высокой антимикробной активностью; оценка антимикробного действия соединений природного происхождения и их сочетаний с новыми химическими соединениями переходных металлов; установление специфических мишеней антимикробного действия новых химических соединений и их сочетаний с природными соединениями.

Научная новизна и оригинальность. Проведен скрининг и выявлены новые химические соединения тиосемикарбазона с элементами 3d, обладающие выраженной антимикробной активностью. Показана возможность повышения уровня проявления биологических эффектов испытуемых соединений в сочетании с экстрактами спирулины и растворимым энтаннином. Полифункциональный характер полученных комбинаций был продемонстрирован выделением нескольких мишеней их действия на исследуемые микробные штаммы.

Результаты, способствующие решению важной научной проблем: сводятся к выявлению новых химических веществ, новых природных соединений и их сочетаний, обладающих выраженным антимикробным действием, и выявлению возможных мишеней действия соединений и их сочетаний.

Теоретическое значение работы. Были накоплены новые знания об антимикробной активности некоторых соединений 3d-элементов и их комбинаций с экстрактами спирулины и водорастворимым энтаннином; полифункциональный характер этих сочетаний доказан установлением нескольких специфических мишеней, на которые действуют соединения.

Практическое значение. Выделены новые химические соединения 3d-элементов и их сочетания с природными экстрактами, обладающие высокой антимикробной активностью в отношении референтных штаммов патогенных микроорганизмов, перспективные для продолжения медико-биологических исследований с целью выявления эффектов *in vivo*.

Внедрение результатов. Результаты исследования внедрены на Кафедре Микробиологии и иммунологии Молдавского Государственного Университета Медицины и Фармации им. “Николае Тестемицану” в качестве дидактического материала.

ANNOTATION

Zariciuc Elena, „*The antimicrobial effect of some coordination compounds of 3d elements and new polyfunctional drugs*”. PhD thesis in medical sciences, speciality 313.02 – Medical microbiology, virology, Chisinau, 2023

Thesis structure: The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 225 references. It comprises 130 pages of main content, 24 figures, 18 tables and 2 annexes. The results were published in 38 scientific papers: 1 chapter in collective monograph, 10 articles in scientific journals; 23 abstracts and 6 patents.

Keywords: coordinating compounds, 3d elements, spirulina extracts, enotannin, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal/fungicidal concentration, enzymatic activity, membrane permeability, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans*.

Research goal: evaluation of the antimicrobial properties of new chemical compounds of the 3d elements and the possibility of amplifying their biological effects by obtaining polyfunctional combinations with natural compounds.

Objectives: identification of new chemical compounds with high antimicrobial activity; evaluation of the antimicrobial action of natural compounds and their combinations with new chemical compounds of transition metals; establishing specific targets of antimicrobial action of new chemical compounds and their combinations with natural compounds.

Scientific novelty and originality: Screening was performed and new thiosemicarbazone chemical compounds with 3d elements with pronounced antimicrobial activity were identified. The possibility of increasing the level of manifestation of the biological effects of the tested compounds in combination with spirulina extracts and soluble enotannin was demonstrated. The polyfunctional character of the obtained combinations was demonstrated by highlighting several targets of their action on the tested microbial strains.

The results obtained that contribute to solving an important scientific problem: identification of new chemicals, new natural compounds and combinations thereof that exhibit pronounced antimicrobial effects; identification of their possible targets of action.

Theoretical value: New knowledge was accumulated about the antimicrobial activity of some compounds of the 3d elements, and their combinations with spirulina extracts and water-soluble enotannin, and the polyfunctional nature of these combinations was demonstrated by highlighting several action targets.

Practical value: New chemical compounds of the 3d elements and their combinations with natural extracts, with high antimicrobial activity against the reference strains of pathogenic microorganisms, promising for the continuation of biomedical research in order to highlight the *in vivo* effects were highlighted.

Implementation of scientific results. Results of the study have been implemented at the Department of Microbiology and immunology of the State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemitanu" as teaching material for university training.

LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1	Denumirile și formulele compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(II) și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazin carbotioamidă.....	57
Tabelul 2.2	Denumirile și formulele compușilor tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotioamidă.....	58
Tabelul 2.3	Denumirile și formulele compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazo-notioat.....	59
Tabelul 2.4	Denumirile și formulele compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin 2-(2-hidroxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotioamidă; 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotioamidă; 2-(3,5-dibromo-2-hidroxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotioamidă și 2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotioamidă.....	60
Tabelul 2.5	Denumirile și formulele compușilor hidrazonici ai Cu(II) cu S-metil-β-N-(2-hidroxil-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat.....	60
Tabelul 3.1	Activitatea antimicrobiană a tiosemicarbazonaților Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin N-dimetilfenil hidrazin carbotioamidă față de <i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923 și <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (mg/mL).....	73
Tabelul 3.2	Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonaților Cu(II), Co(II) și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazin carbotioamidă față de microorganismele Gram(-) (mg/mL).....	74
Tabelul 3.3	Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotioamidă față de <i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923 și <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (mg/mL).....	76
Tabelul 3.4	Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotioamidă față de microorganismele Gram(-) (mg/mL).....	77

Tabelul 3.5	Activitatea antimicrobiană a compușilor Tiosemicarbazonații Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat față de <i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923 și <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (mg/mL).....	78
Tabelul 3.6	Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat față de microorganismele Gram(-) (mg/mL).....	80
Tabelul 3.7	Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonații Cu(II) și Co(III) care conțin hidrazincarbonotioamidă față de <i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923, <i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035 și <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (mg/mL).....	82
Tabelul 3.8	Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II) și Co(III) care conțin hidrazincarbonotioamidă față de microorganismele Gram(-) (mg/mL).....	83
Tabelul 3.9	Activitatea antimicrobiană a compușilor hidrazonici ai Cu(II) ce conțin S-metil-β-N-(2-hidroxil-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat față de <i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923 și <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (mg/mL).....	85
Tabelul 3.10	Activitatea antimicrobiană a compușilor hidrazonici ai Cu(II) ce conțin S-metil-β-N-(2-hidroxil-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat față de microorganismele Gram(-) (mg/mL).....	85
Tabelul 3.11	Activitatea antimicrobiană a față de microorganismele de referință (mg/mL).....	87
Tabelul 4.1	Efectul compușilor de origine naturală asupra activității enzimelor antioxidante la <i>Staphylococcus aureus</i> și <i>Escherichia coli coli</i>	118
Tabelul 4.2	Activitatea enzimatică la <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 și <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923 la interacțiunea culturii cu concentrații subinhibitorii ale C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ NiOS și enotaninei hidrosolubile.....	125

LISTA FIGURILOR

Figura 3.1	Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală.....	88
Figura 3.2.	Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina <i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035 în combinație cu compușii de origine naturală.....	89
Figura 3.3	Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina <i>Escherichia coli</i> ATCC 259223 în combinație cu compușii de origine naturală.....	90
Figura 3.4	Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina <i>Salmonella enterica</i> ГИСК 03/03y în combinație cu compușii de origine naturală.....	92
Figura 3.5	Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 în combinație cu compușii de origine naturală.....	93
Figura 4.1	Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală.....	99
Figura 4.2	Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035 în combinație cu compușii de origine naturală.....	100
Figura 4.3	Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Escherichia coli</i> ATCC 259223 în combinație cu compușii de origine naturală.....	102
Figura 4.4	Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Salmonella enterica</i> ГИСК 03/03y în combinație cu compușii de origine naturală.....	103
Figura 4.5	Eliberarea lactatdehidrogenazei (LDH). Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 în combinație cu compușii de origine naturală.....	104
Figura 4.6	Eliberarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală.....	107
Figura 4.7	Eliberarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035 în combinație cu compușii de origine naturală.....	108

Figura 4.8	Eliberarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Escherichia coli</i> ATCC 259223 în combinaire cu compușii de origine naturală.....	109
Figura 4.9	Eliberarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Salmonella enterica</i> ГИСК 03/03y în combinaire cu compușii de origine naturală.....	111
Figura 4.10	Eliberarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 în combinaire cu compușii de origine naturală.....	112
Figura 4.11	Corelarea dintre nivelul speciilor reactive ale oxigenului și cel de eliberare a acizilor nucleici/lactatdehidrogenazei intracelulare la tulpinile microbiene sub influența compușilor chimici noi și a combinațiilor cu combinațiilor lor cu compușii de origine naturală.....	114
Figura 4.12	Corelarea dintre nivelul speciilor reactive ale oxigenului și cel de eliberare a lactatdehidrogenazei intracelulare la <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 sub acțiunea compușilor chimici aplicați individual versus aplicați în combinație cu compușii de origine naturală.....	115
Figura 4.13	Corelarea dintre nivelul speciilor reactive ale oxigenului și cel de eliberare a acizilor nucleici/lactatdehidrogenazei intracelulare la tulpinile microbiene sub influența compușilor chimici noi.....	116
Figura 4.14	Activitatea supeoxiddismutazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală.....	119
Figura 4.15	Activitatea catalazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală.....	120
Figura 4.16	Activitatea supeoxiddismutazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Escherichia coli</i> ATCC 259223 în combinaire cu compușii de origine naturală.....	121
Figura 4.17	Activitatea catalazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii <i>Escherichia coli</i> ATCC 259223 în combinaire cu compușii de origine naturală.....	121

Figura 4.18	Modificarea activității exoenzimelor la <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25922™ și <i>Escherichia coli</i> ATCC®25923™ la interacțiunea culturilor cu enotantinula hidrosolubilă.....	123
Figura 4.19	Modificarea activității endoenzimelor antioxidante la <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25922™ și <i>Escherichia coli</i> ATCC®25923™ la interacțiunea culturilor cu enotantină hidrosolubilă.....	123

LISTA ABREVIERILOR

AN	Acizi nucleici
ATCC	eng. American Type Culture Collection
CMB	Concentrația minimă bactericidă
CMF	Concentrația minimă fungicidă
CMI	Concentrația minimă de inhibiție
CT	Catalaza
DMSO	Dimetilsulfoxid
EUCAST	eng. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
LDH	Lactat dehidrogenaza
MDR	eng. Multidrug rezistance
SDA	eng. Sabouraud dextrose agar
SOD	Superoxiddismutaza
SRO	Specii reactive ale oxigenului
TNB	Tetrazolium nitrbblue
UFC	Unități formatoare de colonii
XDR	eng. Extensively drug rezistance

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor. Apariția rezistenței multiple la medicamente la multe dintre microorganismele patogene devine o problemă din ce în ce mai proeminentă, care compromite în mod serios terapiile bazate pe antibiotice. Rezistența la antibiotice are ca rezultat reducerea gradului de eficacitate a medicamentelor antibacteriene și antifungice, ceea ce face ca tratamentul maladiilor infecțioase să fie complicat, costisitor sau în anumite cazuri, chiar imposibil. Criza rezistenței la antimicrobiene a fost atribuită utilizării greșite și în exces a acestor agenți [27, 168]. Aplicarea antibioticelor în diferite tratamente constituie principala abordare a medicinei moderne în cazul infecțiilor. Din păcate, această abordare este compromisă deoarece cercetătorii nu au reușit să mențină ritmul descoperirii antibioticelor în fața apariției rapide a agenților patogeni rezistenți emergenți. Datorită utilizării aberante a antibioticelor, numeroși agenți patogeni au căpătat rezistență multiplă la aceste medicamente. Cel mai elocvent exemplu în acest sens sunt tulpinile de *Mycobacterium tuberculosis* cu rezistență multiplă. Infecții bacteriene severe sunt de asemenea provocate de reprezentanții genurilor *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*., *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* [27, 58].

O epocă post-antibiotică, în care infecțiile comune și leziunile minore pot ucide nu mai poate fi luată drept fantezie apocaliptică, fiind de fapt o posibilitate foarte reală a secolului XXI [49, 204, 205, 217].

Centrele internaționale și naționale pentru controlul și prevenirea maladiilor, precum și alte organizații și experți recomandă aplicarea diferitor măsuri, care pot reduce amploarea fenomenului de antibioticorezistență. Implementarea măsurilor recomandate, cum ar fi: adoptarea programelor de administrare a antibioticelor; îmbunătățirea practicilor de diagnostic, supraveghere și prescriere; optimizarea regimurilor terapeutice; profilaxia infecțiilor, ar trebui să fie eficiente în gestionarea acestei crize [135, 186]. Alături de cele menționate este clar, că una dintre cele mai importante măsuri în acest sens este elaborarea și producerea de noi preparate antibiotice, principiul de acțiune a cărora să minimizeze ori chiar să excludă posibilitatea de dezvoltare a rezistenței la antimicrobiene.

Comunitatea științifică s-a dedicat în mod exhaustiv descoperirii de medicamente noi, mai sigure și eficiente, fie prin sinteza chimică dirijată a noilor compuși, fie prin exploatarea resurselor naturale. Majoritatea agenților chimici noi care trec cu succes cel puțin primele faze ale studiului clinic în ultimii ani sunt elaborați direcționat și acționează pe un spectru restrâns de agenți patogeni, cum ar fi pseudomonadele, stafilococii sau micobacteriile. Succesul acestor substanțe chimice noi se bazează pe faptul, că acestea au ținte noi, asupra cărora nu acționează antibioticele

aprobate existente. Descoperirea de noi clase de substanțe chimice care sunt eficiente față de țintele moleculare noi prezintă o oportunitate pentru o dezvoltare extinsă viitoare de agenți antimicrobieni cu spectru larg de acțiune. Efectele produselor naturale sunt determinate de diferite principii active, metaboliți secundari sau fitochimicale precum alcaloizii, taninurile, terpenoidlee, uleiurile esențiale, flavonoidele, lectinele, celulele fagocitare și mulți alți constituenți organici. Activitatea antimicrobiană a complexelor naturale rezultă frecvent din activitatea câtorva componente individuale, care acționează în energie cooperantă, iar impactul clinic este asigurat de efectele directe asupra microorganismelor patogene [182].

Pentru a asigura progrese semnificative în domeniul elaborării substanțelor cu efecte antimicrobiene în condițiile unei rezistențe sporite a patogenilor la antibiotice, este necesar de a realiza cercetări în domeniul sintezei direcționate de noi substanțe chimice, în direcția descoperirii de noi produse naturale cu efecte antimicrobine, dar și în elaborarea de combinații polifuncționale, componentele cărora sunt orientate spre mai multe ținte concomitent, asigurând astfel succesul în combaterea microorganismelor multirezistente.

Scopul lucrării: evaluarea proprietăților antimicrobiene ale compușilor chimici noi ai 3d elementelor și a posibilității de amplificarea a efectelor biologice prin obținerea de combinații multifuncționale cu compușii de origine naturală.

Obiectivele lucrării:

1. Identificarea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană înaltă.
2. Studiul calitativ și cantitativ al activității antimicrobiene a compușilor chimici noi ai elementelor 3d și compușilor naturali față de tulpinile microbiene de referință.
3. Stabilirea unor ținte specifice de acțiune antimicrobiană a compușilor chimici noi și a combinațiilor lor cu compușii naturali.
4. Evaluarea modificărilor unor parametri biochimici ai tulpinilor bacteriene de referință sub influența compușilor monocomponenți și în combinație cu compușii de origine naturală.
5. Influența compușilor antimicrobieni noi asupra unor procese enzimatic.

Ipoteza de cercetare. Compușii chimici noi ai elementelor 3d cu activitate antimicrobiană și compușii de origine naturală, așa ca enotanina și extractele din spirulină pot forma combinații sinergice multifuncționale, componentele cărora sunt orientate spre mai multe ținte concomitent, asigurând astfel amplificarea efectului biologic.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese. Pentru realizarea tezei de doctor în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate 5 tulpini de referință de

microorganisme patogene (două Gram-, 2 Gram+ și una fungică), ceea ce a permis evidențierea particularităților de acțiune a compușilor chimici noi și a celor de origine naturală. În calitate de substanțe cu efecte antibacteriene și antifungice au fost utilizați compuși noi cu segmentul tiosemicarbazonic, coordonat cu metale de tranziție - cobalt, nichel și cupru; preparatul BioR, extractul din spirulină și enotanina hidrosolubilă.

În cercetare au fost aplicate metode microbiologice standard, care au permis stabilirea parametrilor calitativi și cantitativi ai acțiunii antibacteriene/antifungice a compușilor chimici, naturali și a combinațiilor acestora. De asemenea, au fost aplicate metode biochimice de evidențiere a unor modificări ale permeabilității membranelor celulare, de apreciere a nivelului de stres oxidativ și de activitate enzimatică la microorganismele patogene sub influența compușilor chimici și naturali. Dintre metodele standard au fost aplicate tehnicile de determinare a concentrației minime de inhibiție și concentrației minime bactericide/fungicide ale compușilor și combinațiilor lor. Aprecierea integrității membranelor celulelor bacteriene s-a realizat prin cuantificarea cantității de acizi nucleici eliberați. Determinarea nivelului de stres oxidativ s-a făcut prin cuantificarea speciilor reactive ale oxigenului în celulele bacteriene. De asemenea, au fost utilizate metode de determinare a activității enzimelor antioxidante (catalaza și superoxiddismutaza), și a lactatdehidrogenazei eliberate de celulele levuriene. Rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive și analizei corelaționale. Valorile parametrilor evaluați sunt date în teză ca media $\pm$ deviația standard. În calitate de test de semnificație a fost aplicat testul Student.

Obiectele de studiu și metodologia aplicată au fost selectate în vederea realizării scopului și sarcinilor trasate și au permis identificarea compușilor și combinațiilor active și de a evidenția unele ținte de acțiune a compușilor noi.

Noutatea și originalitatea științifică: A fost realizat screeningul și evidențiați noi compuși chimici tiosemicarbazonici cu 3d elemente cu activitate antimicrobiană pronunțată. A fost demonstrată posibilitatea măririi nivelului de manifestare a efectelor biologice ale compușilor testați în combinație cu extractele din spirulină și enotanina solubilă. A fost demonstrat caracterul polifuncțional al combinațiilor obținute prin evidențierea mai multor ținte de acțiune a acestora asupra tulpinilor microbiene testate.

Rezultatele obținute, care contribuie la soluționarea problemei științifice importante: evidențierea de noi substanțe chimice, compuși naturali noi și combinații dintre acestea care prezintă efecte antimicrobiene pronunțate; identificarea posibilelor ținte de acțiune a acestora.

Semnificația teoretică: Au fost acumulate cunoștințe noi despre activitatea antimicrobiană a unor compuși ai 3d elementelor, și combinațiilor acestora cu extracte din spirulina și enotanina

hidrosolubilă și demonstrat caracterul polifuncțional al acestor combinații prin evidențierea mai multor ținte de acțiune.

Valoarea aplicativă a lucrării: Au fost evidențiați compuși chimici noi ai 3d elementelor și a combinațiile acestora cu extracte naturale, care posedă activitate antimicrobiană înaltă față de tulpinile de referință de microorganisme patogene, de perspectivă pentru continuarea cercetărilor biomedicale în vederea evidențierii efectelor *in vivo*.

Principalele rezultate științifice înaintate spre susținere

1. Compușii tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile Gram (+), Gram (-) și *Candida albicans*.
2. Compusul metil *N'*-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidra-zono-toat are un efect antifungic performant față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 cu valori ale CMI și CMF la 0,7μg/mL.
3. Enotanina are un efect sinergic față de compușii chimici în ceea ce privește producerea de SRO în combinație cu majoritatea compușilor testați și la toate tulpinile microbiene cercetate, cu o amplitudine mult mai înaltă în cazul bacteriilor Gram (-) și a tulpinii fungice *Candida albicans*.
4. Concentrațiile minime de inhibiție ale compușilor chimici noi au efecte inhibitorii pronunțate asupra activității enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923.

Aprobarea rezultatelor științifice

Rezultatele obținute pe durata realizării tezei au fost prezentate și aprobate la 9 conferințe internaționale în țară și peste hotare. Medalie de aur Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia” Timișoara , ediția a VI -a, perioada 13-15 octombrie 2020 în Timișoara, din partea USMF „Nicolae Testemitanu”, Medalie de argint Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia” Timișoara , ediția a VI -a, perioada 13-15 octombrie 2020 în Timișoara, din partea USMF „Nicolae Testemitanu”, Medalie de aur, Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Invenției PRO INVENT, ediția a XVII-a, 20-22 martie 2019, Sala Polivalentă, CLUJ-NAPOCA, Al 4-lea colocviu Franco-Român de chimie medicală. Iași, România. 2017 05-07 octombrie, poster Conferința științifică anuală în cadrul Zilelor USMF ”Nicolae Testemitanu”. Chișinău, 15- 18 octombrie 2019.

Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate în cadrul ședinței Disciplinei de microbiologie și imunologie al USMF „Nicolae Testemitanu” din 31 martie 2023 și a al ședinței Seminarului științific de profil 313. Imunologie, microbiologie, virusologie, specialitățile 321.09. Boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, 313.02. Microbiologie, virusologie medicală din **30.05.2023**.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele obținute pe durata elaborării acestei teze sunt reflectate în 38 publicații științifice: 1 capitol în monografie colectivă, 10 articole în reviste științifice, din ele 2 în monoautorat; 23 rezumate și 6 brevete de invenție.

Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate la ședința Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă, USMF „Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr.03 din 31.03.2023) și la ședința Seminarului Științific de profil Medicină generală, specialitățile 313.02. Microbiologie, virusologie medicală, 321.09. Boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală (proces verbal nr.2 din 30.05.2023)

Volumul și structura tezei. Teza constă din introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 225 titluri, 2 anexe, 130 pagini text de bază, 24 figuri, 18 tabele.

Sumarul compartimentelor tezei

Capitolul 1. REZISTENȚA MICROORGANISMELOR PATOGENE LA ANTIBIOTICE ȘI ELABORAREA NOILOR REMEDII EFICIENTE include analiza situației create ca rezultat al răspândirii largi a fenomenului de antibioticorezistență și trece în revistă principalele rezultate obținute în domeniul elaborării de noi preparate cu efecte antimicrobiene performante și cu principii de acțiune originale. Capitolul a fost perfectat în baza analizei a 224 surse bibliografice cu grad înalt de actualitate, publicate în mare măsură în ultimii 10 ani, preponderent, în ultimii 5 ani. În partea introductivă a acestui capitol este descrisă situația cu referire la antibioticorezistență pe plan mondial și succesele modeste în domeniul înregistrării de noi preparate antimicrobiene. În primul subcapitol sunt analizate cauzele și mecanismele apariției și dezvoltării rezistenței la antibiotice la diferite grupuri sistematice de microorganisme patogene. Cel de-al doilea subcapitol este dedicat identificării soluțiilor, pe care le propune știința modernă în vederea soluționării problemei antibioticorezistenței. Sunt discutate mai multe strategii, cum ar fi sinteza direcționată de noi compuși cu proprietăți predeterminate, screening-ul compușilor naturali, utilizarea medicamentelor deja cunoscute în formule hibride ș.a. Cel de-al treilea subcapitol reflectă stadiul actual al cunoașterii cu referire la domeniile de interes direct a prezentei teze de doctorat, și anume: utilizarea de noi compuși coordinativi ce conțin segmentul tiosemicarbazonic și metale de tranziție, utilizarea taninurilor și a extractelor naturale, în special, din cianobacteria *Arthrospira platensis*. Capitolul include, de asemenea concluzii, care reflectă nivelul actual atins de cercetători în domeniul prezentei lucrări, după care este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia. În finalul capitolului sunt formulate scopul și sarcinile prezentei lucrări.

Capitolul 2. OBIECTELE ȘI METODELE DE STUDIU conține argumentarea și descrierea obiectelor de studiu (tulpinile de microorganisme, compuși chimici și extractele

naturale) și a metodelor de cercetare. În calitate de obiecte de studiu „*in vitro*” au fost incluse 7 tulpini de referință, care sunt destinate pentru testarea sensibilității la antibiotice și alte substanțe de sinteză chimică ori naturale: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.

Sunt descrise substanțele chimice cu efecte antimicrobiene, care au fost utilizate - 47 compuși coordinativi (selectați dintr-un număr de 385 compuși incluși în screening) ai Cu (II); Co(III) și Ni (II) sintetizați și caracterizați la catedra Chimie anorganică (Universitatea de Stat din Moldova), Institutul de Chimie și Institutul de Fizică aplicată, și 3 compuși de origine naturală: enotanina hidrosolubilă, extractul hidroetanolic din spirulină și preparatul BioR, de asemenea obținut din spirulină.

Capitolul include de asemenea, descrierea metodelor microbiologice standard aplicate în vederea evaluării eficienței compușilor chimici și naturali și a combinațiilor acestora în raport cu tulpinile de microorganisme patogene: metoda difuziei în geloză, metoda diluțiilor succesive, metoda standardizată EUCAST 7.1. Pentru a identifica țintele de acțiune a compușilor testați și a combinațiilor sinergice ale acestora au fost aplicate un șir de metode de determinare a activității enzimelor (lactatdehidrogenazei eliberate, superoxid dismutazei, catalazei și proteazelor extracelulare). De asemenea este descrisă metoda de aprecierea integrității membranelor celulelor bacteriene în baza cantității de acizi nucleici eliberați. Nivelul stresului oxidativ a fost măsurat aplicând cuantificarea speciilor reactive ale oxigenului în celulele bacteriene. Rezultatele obținute sunt prelucrate statistic aplicând statistica descriptivă și analiza corelațională. Metodele de cercetare au fost selectate astfel, ca să asigure realizarea scopului și obiectivelor de cercetare.

Capitolul 3. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A COMPUȘILOR NOI reflectă rezultatele screening-ului compușilor chimici noi, a compușilor naturali și a combinațiilor acestora și evidențierea variantelor cu efecte pronunțate asupra tulpinilor de microorganisme luate în studiu. Capitolul debutează cu descrierea premiselor acestei cercetări, rezultate deja cunoscute care permit de a presupune activitate antimicrobiană înaltă pentru compușii coordinativi ai metalelor de tranziție cu segment tiosemicarbazonic. Pentru fiecare dintre cei 47 compuși au fost determinate concentrațiile minime de inhibiție și concentrațiile minime bactericide/fungicide. Aceiași parametri au fost determinați și în cazul enotaninei hidrosolubile, a extractului din spirulină și a preparatului BioR. Din totalitatea compușilor testați au fost selectați câte 5 compuși cu activitate specifică pentru fiecare dintre tulpinile de microorganisme testate. De asemenea, în acest capitol sunt prezentate rezultatele obținute la combinarea compușilor chimici selectați cu cei trei compuși de origine naturală. În acest caz s-a urmărit posibilitatea amplificării efectului antimicrobian al

compușilor coordinativi. Activitatea compușilor chimici, a compușilor naturali și a combinațiilor dintre aceste a fost comparată în cazul tulpinilor bacteriene cu activitatea ampicilinei, iar în cazul tulpinii levuriene - cu cea a nistatinei. Este demonstrat, că fiecare combinație particulară are efecte antibacteriene. Cercetările descrise în acest capitol au condus la evidențierea a 2 compuși chimici cu activitate înaltă față de *Candida albicans* ATCC 10231 și doi compuși cu activitate antimicrobiană universală. Capitolul finalizează cu concluzii ce reflectă principalele realizări la această etapă a cercetării.

Capitolul 4. MECANISMELE POSIBILE DE ACȚIUNE A NOILOR COMPUȘI ASUPRA MICROORGANISMELOR PATOGENE reflectă rezultatele investigațiilor, care au avut drept scop evidențierea unor efecte specifice exercitate de compușii chimici noi, compușii naturali și combinațiile acestora asupra tulpinilor microbiene de referință. În primul subcapitol sunt elucidate premisele teoretice ale cercetării. Se analizează efectele cunoscute și țintele identificate pe care acționează compușii coordinativi ai metalelor și unii liganzi de interes pentru această teză. De asemenea, se atrage atenția asupra faptului, că este demonstrată posibilitatea de a obține combinații polifuncționale – care acționează asupra mai multor ținte concomitent - în cazul unor combinații sinergice dintre mai multe componente cu activitate antimicrobiană. La prima etapă de studiu a fost cercetat procesul de eliberare a acizilor nucleici de către culturile bacteriene și de eliberare a lactatdehidrogenazei de către celulele fungice sub acțiunea compușilor chimici noi aplicați individual, dar și în combinație cu substanțele de origine naturală (extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă). A fost demonstrat, că acțiunea compușilor și a combinațiilor a fost comparată cu acțiunea ampicilinei în cazul bacteriilor și a nistatinei în cazul fungilor levuriformi. Compușii chimici selectați au provocat eliberarea masivă a substanțelor de interes, ceea ce vorbește despre o modificare importantă a permeabilității celulare. Compușii naturali nu au efect deterioarant foarte pronunțat asupra membranelor, în schimb aceștia pot genera un efect sinergic pronunțat fiind aplicați împreună cu compușii chimici. Au fost evidențiate anumite particularități de acțiune a combinațiilor sinergice asupra microorganismelor în dependență de poziția lor sistematică. Astfel, în cazul bacteriilor Gram- și al tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 cel mai pronunțat efect sinergic se observă în cazul combinării compușilor chimici cu enotanina hidrosolubilă, iar în cazul bacteriilor Gram+ în calitate de potențatori ai efectului de permeabilizare a membranelor pot fi considerate preparatele pe bază de spirulină.

Următoarea etapă de cercetare a constat în monitorizarea eliminării SRO de către culturile microbiene sub influența compușilor chimici aplicați individual și în combinație cu compușii de origine naturală. Rezultatele prezentate demonstrează, că efectul antimicrobian al compușilor chimici noi este asociat cu generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, care provoacă

starea de stres oxidativ. În toate variantele experimentale nivelul SRO depășește semnificativ nivelul lor în cultura netratată, fiind comparabil sau chiar mai mare față de nivelul de SRO indus de substanțele antimicrobiene de referință. Nivelul de SRO este mult mai înalt la tulpinile de bacterii Gram - și la *Candida albicans* comparativ cu bacteriile Gram +. Pentru a evidenția rolul degradărilor oxidative în pierderea conținutului celular a fost realizată analiza corelațională a rezultatelor celor 2 teste descrise mai sus. Se aduc argumente în confirmarea faptului, că la 4 dintre cele 5 tulpini bacteriene, pierderea conținutului intracelular sub acțiunea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană, este asociată cu producerea în exces a speciilor reactive ale oxigenului. În cazul combinațiilor dintre compușii chimici și cei naturali stresul oxidativ nu este unicul mecanism prin care are loc eliberarea conținutului celular în mediul extracelular. În cadrul acestui capitol sunt de asemenea, aduse și analizate rezultatele cu referire la acțiunea compușilor chimici și naturali asupra activității enzimelor antioxidante de prima linie – catalaza și supeoxidismutaza. Este demonstrat efectul de inhibiție a compușilor chimici noi asupra activității enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923. De asemenea, efecte pronunțate asupra activității enzimactice o are enotanina hidrosolubilă, care poate fi considerată un compus sinergist eficient, care potențează efectul antibacterian al compușilor chimici. Efectul extractelor din spirulină diferă în dependență de tulpină și poate atât să sporească, cât și să diminueze efectul antibacterian al compușilor chimici. Capitolul finalizează cu concluzii, care reflectă esența rezultatelor obținute.

Compartimentul **CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI** include prezentarea structurată a tuturor rezultatelor obținute, care demonstrează atingerea scopului și obiectivelor tezei; reflectă contribuțiile personale, conține chintesența lucrării, exprimată concis în concluziile generale; exprimă valoarea aplicativă a rezultatelor obținute prin recomandările formulate și schițează direcții de cercetare, care pot fi considerate o continuare a cercetărilor, rezultatele cărora au fost prezentate și analizate în prezenta teză de doctor.

BIBLIOGRAFIA include descrierea bibliografică a celor 224 surse (articole, capitole în monografii, teze la foruri științifice, brevete de invenție) citate în teză.

Compartimentul **ANEXE** conține copii ale brevetelor de invenție și a diplomelor de însoțire a medaliilor, obținute la saloanele internaționale de inovații.

1. REZISTENȚA MICROORGANISMELOR PATOGENE LA ANTIBIOTICE ȘI ELABORAREA NOILOR REMEDII EFICIENTE

Utilizarea pe scară largă a terapiilor medicamentoase, în special folosirea nediscriminatorie a antibioticelor, inclusiv a celor de ultimă generație, a dus la o creștere alarmantă a nivelului de rezistență a microorganismelor patogene la tratamentele medicamentoase. Cererea colosală de antibiotice a avut un impact semnificativ asupra mediului. În cei peste 80 de ani de la introducerea lor în uzul medical, milioane de tone de antibiotice au fost produse și utilizate în diferite scopuri. Realizările tehnologiilor contemporane au permis obținerea compușilor mai puțin costisitori, ceea ce a încurajat utilizarea lor tot mai largă. Ca rezultat biosfera este saturată cu acești agenți toxici, care contribuie în mod semnificativ la selecția neîncetată și răspândirea largă a tulpinilor de microorganisme rezistente [58]. Eficiența măsurilor de prevenire și control al dezvoltării rezistenței este redusă semnificativ pe de o parte de complexitatea proceselor care contribuie la apariția și diseminarea rezistenței, iar pe de altă parte, de insuficiența de cunoștințe de bază cu privire la aceste subiecte. Majoritatea agențiilor de sănătate publică internaționale, naționale și locale recunosc această problemă serioasă. Cu toate că au fost propuse numeroase rezoluții și recomandări și au fost scrise numeroase rapoarte, dezvoltarea rezistenței la antibiotice este un proces continuu. Acest fenomen afectează umanitatea, creează o situație de criză în cercetare și devine o problemă politică. Rezistența la antibiotice are ca rezultat reducerea gradului de eficacitate a medicamentelor antibacteriene și antifungice, ceea ce face ca tratamentul pacienților să fie complicat, costisitor sau în anumite cazuri, chiar imposibil. Impactul fenomenului se resimte cel mai evident asupra pacienților deosebit de vulnerabili, la care rezultă în maladii de durată și mortalitate crescută. În prezent încă nu au fost pe deplin estimate și conștientizate dimensiunile problemei la nivel mondial, impactul acesteia asupra sectorului sănătății publice și impactul social general asupra omenirii. Cu toate acestea, tot mai multe guverne din întreaga lume consideră că această problemă este atât de gravă, încât amenință realizările medicinei moderne, iar consecințele ignorării ei pot fi fatale pentru umanitate. O epocă post-antibiotică - în care infecțiile comune și leziunile minore pot ucide – nu mai poate fi luată drept fantezie apocaliptică, fiind de fapt o posibilitate foarte reală a secolului XXI [49, 204, 205, 216].

Centrele Internaționale și Naționale pentru Controlul și Prevenirea Maladiilor, precum și alte organizații și experți recomandă aplicarea diferitor măsuri, care pot reduce amploarea fenomenului de antibioticorezistență. Implementarea măsurilor recomandate, cum ar fi: adoptarea programelor de administrare a antibioticelor; îmbunătățirea practicilor de diagnostic, supraveghere și prescriere; optimizarea regimurilor terapeutice; profilaxia infecțiilor, ar trebui să fie eficiente în gestionarea acestei crize [25, 135, 186]. Alături de cele menționate este clar, că una dintre cele mai

importante măsuri în acest sens este elaborarea și producerea de noi preparate antibiotice, principiul de acțiune a cărora să minimizeze ori chiar să excludă posibilitatea de dezvoltare a rezistenței microbiene.

Eforturile firmelor farmaceutice sunt concentrate pe câteva tipuri de antibiotice noi, care se referă la aminoglicozide, inhibitori ai beta-lactamazei, quinolone, ketolide, tetraciline și oxazolidinone. Puține dintre medicamentele elaborate trec cu succes toate filierele de control spre a fi incluse pentru aplicarea la etapa de teste clinice, dar și aici rata de promovare este destul de mică – cel mult un preparat din 5 testate [205]. Timp de 10 ani între 2000 și 2010 de către Food and Drug Administration (FDA) în SUA, care este un lider în cercetările farmaceutice în domeniul antibioticelor, au fost înregistrate doar patru antibiotice noi aprobate pentru utilizare clinică (tigeciclina, doripenema, ceftarolina și telavancina). Anul 2014 a fost unul de succes pentru acest domeniu, fiind înregistrate alte 4 antibiotice noi (tedizolidul, dalbavancina, oritavancina, ceftolozana/tazobactamul). În 2016 au fost aprobate două substanțe noi – zinplava – pentru tratamentul formelor recurente de infecții provocate de *Clostridium sp.* și Anthim – pentru tratamentul antraxului inhalat. În anul 2017 a fost aprobat un nou antibiotic – baxdela - destinat tratamentului infecțiilor cutanate [69]. Noi agenți antibacterieni au fost aprobați de FDA din SUA și în ani 2018-2019. În anul 2018 au fost aprobate 4 medicamente noi: plazomicina (pentru tratamentul infecțiilor provocate de Enterobacteriaceae), eravaciclina (pentru infecții intraabdominale complicate), sareciclina (pentru tratamentul acneei non-nodulare moderate și severe), omadaciclina (pentru infecții bacteriene acute ale pielii și pneumonie bacteriană comunitară), iar rifamicina, care este cunoscută ca supresor al sintezei de ARN a fost aprobată pentru tratarea diareei călătorului provocată de tulpini noninvazive de *Escherichia coli*. În anul 2019 FDA a aprobat două combinații medicamentoase: (1) imipenem, cilastatin și relebactam – pentru tratamentul infecțiilor complicate intraabdominale și ale tractului urinar; și (2) pretomanid în combinație cu bedaquilină și linezolid pentru tratarea tuberculozei. De asemenea au fost aprobate și preparatele lefamulin și cefiderocol, primul pentru tratamentul pneumoniilor comunitare, iar cel de-al doilea – al infecțiilor urinare complicate [23]: În 2020 - martie 2022 a fost aprobat un singur antibiotic – flexinidazol, care este destinat tratamentului tripanosomiazei.

Din cele relatate mai sus, este evident, că procesul de elaborare și implementare a noilor medicamente cu efecte antibiotice este în plină desfășurare, dar, cu toate succesele înregistrate, problema antibioticorezistenței și eficienței preparatelor medicamentoase din această categorie, rămâne la fel de acută și la momentul actual. Mai mult ca atât, se înregistrează un deficit de soluții principial noi, care ar permite realizarea unui salt calitativ în domeniul elaborării de noi remedii medicamentoase destinate combaterii infecțiilor provocate de microorganisme cu un grad înalt de rezistență la chimioterapii tradiționale. În lipsa acestora, calea screeningului substanțelor chimice

noi, care teoretic ar putea avea efecte antibiotice, dar și a compușilor naturali cu asemenea proprietăți rămâne una dintre cele mai accesibile, dar și mai laborioase căi de a pune la dispoziția medicinei moderne noi compuși cu activitate antimicrobiană pronunțată. Astfel, completarea arsenalului de agenți antimicrobiene activi rămâne în centru atenției cercetătorilor din diferite domenii – de la chimie la farmaceutică.

1.1. Originea și mecanismele rezistenței la antibiotice

Dezvoltarea rapidă a mecanismelor de rezistență la antibiotice de către microorganismele patogene a fost și rămâne fatală pentru milioane de oameni din întreaga lume, transformându-se într-o problemă de sănătate publică. Cauza majoră a mecanismelor de rezistență este utilizarea excesivă a preparatelor cu efecte antimicrobiene. Țările dezvoltate încearcă să implementeze mecanisme de depășire a rezistenței microorganismelor prin utilizarea rațională a acestor remedii terapeutice [55].

Acțiunile întreprinse în acest sens s-au dovedit insuficiente pentru a stopa sau cel puțin a încetini răspândirea fenomenului de rezistență. Metodele tradiționale de depistare a sensibilității la antibiotice în scopul identificării terapiei potrivite permit evidențierea exclusiv a rezistenței genetice la anumite substanțe. Microorganismele patogene, însă, pot aplica și alte strategii particulare non-genetice de toleranță la acțiunea substanțelor cu efect antibacterian. Toleranța la antibiotice, care apare fie la nivelul întregii populații, fie într-o subpopulație de celule, permite bacteriilor să supraviețuiască tratamentelor cu antibiotice. Aceasta duce la prelungirea tratamentului și apariția infecțiilor recidivante, dar cel mai grav lucru este că toleranța accelerează dezvoltarea rezistenței microorganismelor la antibiotice [217].

Dobândirea mecanismelor de rezistență a bacteriilor patogene la acțiunea antibioticelor poate avea loc fie prin mutație *de novo*, fie prin transfer orizontal de gene. Prin aceste două strategii bacteriile devin capabile de degradarea sau de inactivarea antibioticului sau achiziționează mecanisme care realizează efluxul de antibiotic din celulă ori modifică ținta moleculară a acestuia. Odată cu dobândirea acestor abilități microorganismele patogene capătă proprietatea de a se dezvolta în condițiile unei concentrații înalte de antibiotice [217]. Această toleranță la acțiunea agenților antimicrobieni generează ulterior fenomenul de antibioticorezistență. Ignorat inițial datorită descoperirilor frecvente de noi antibiotice eficiente care se înregistrau cu regularitate în anii de aur ai domeniului de cercetare în farmaceutica antibioticelor (1940-1960), această problemă revine stringent în atenția societății din cauza încetinirii, dacă nu chiar stopării ofertei de compuși noi. Paralel are loc și o creștere masivă a consumului de antibiotice, inclusiv utilizarea neterapeutică pentru promovarea creșterii în agricultură și acvacultură, a condus la criza rezistenței la antibiotice cu care ne confruntăm astăzi [139].

După natura sa rezistența la antibiotice poate fi *naturală și dobândită*. Rezistența naturală, este o proprietate înăscută specifică bacteriei ca urmare a caracteristicilor structurale și funcționale intrinseci, iar rezistența dobândită rezultă fie printr-o mutație în genomul bacterian, fie prin achiziție a genelor de rezistență străine sau printr-o combinație a acestor două mecanisme [64, 184].

Rezistența naturală poate fi intrinsecă (exprimată întotdeauna în specie) sau indusă (genele de rezistență sunt prezente permanent, dar sunt exprimate doar după expunerea la acțiunea unui anumit antibiotic). Rezistența intrinsecă poate fi definită ca o trăsătură universală a unei specii bacteriene, independentă de expunerea anterioară la antibiotice și care nu este legată de transferul orizontal al genelor [56, 184]. Rezistența intrinsecă este asigurată prin două mecanisme de bază, dintre care unul este specific bacteriilor Gram - și se referă la permeabilitatea redusă a membranei exterioare. Cel de-al doilea mecanism este unul universal pentru toate tipurile de microorganisme și se bazează pe existența și funcționarea eficientă a pompelor de eflux. Genele care asigură acest tip de rezistență sunt extrem de variate, fapt ce poate fi explicat prin aceea, că antibioticele pot afecta mai multe ținte celulare, iar pentru a asigura rezistența, microorganismul trebuie să asigure expresia concomitentă a mai multor gene de rezistență [64].

Rezistența la antibiotice poate fi dobândită de bacterii pe durata vieții și poate fi asigurată prin mutații și prin transfer de gene. Rezistența prin mutații rezultă din erori în replicarea ADN-ului, care apar continuu și independent de prezența sau absența unui agent antimicrobian. În mod accidental, în cazul acțiunii inhibitoare a antibioticului, bacteriile care poartă aceste mutații rezistă acțiunii distructive și devin tipul dominant de celule, în timp ce bacteriile sensibile nu reușesc să supraviețuiască. Rezistență transferabilă este asigurată de elementele genetice accesorii precum transpozonii și plasmidele, care joacă un rol important în asigurarea supraviețuirii bacteriilor. Capacitatea de a împărtăși genele de rezistență dobândite prin transfer de gene atât pe verticală, cât și pe orizontală se realizează prin trei mecanisme: *conjugare*, prin care se face transferul de plasmide, gene de rezistență și transpozoni; *transducție*, care constă în încorporarea accidentală a ADN-ului bacterian într-un bacteriofag sau un virus și transferul lui spre o altă celulă bacteriană; prin *transformare*, care implică absorbția ADN-ului liber generat prin descompunerea celulelor bacteriene .

În 2017, Organizația Mondială a Sănătății a publicat o listă cu agenți patogeni prioritari rezistenți la antibiotice, care reprezintă o mare amenințare pentru omenire. Pentru combaterea acestora este o necesitate urgentă de noi antibiotice. Printre microorganismele patogene de prioritate critică în acest sens sunt doar microorganisme Gram -, iar în listele de prioritate înaltă și medie sunt doar trei microorganisme patogene Gram +, restul fiind Gram -. Datorită structurii lor distincte, bacteriile Gram - sunt mult mai rezistente și provoacă morbiditate și mortalitate

semnificativă la nivel mondial [44]. Cu toate acestea, antibioticele cunoscute la moment acționează prin câteva mecanisme generale, contra cărora și sunt orientate reacțiile de răspuns ale bacteriilor rezistente. Mecanismele de rezistență a microorganismelor la acțiunea antibioticelor, de asemenea sunt de câteva tipuri și au un caracter general atât din punct de vedere al poziției sistematice a microorganismului la care apar, cât și din punct de vedere al antibioticului, asupra căruia acționează. Printre aceste mecanisme menționăm *modificarea țintei* antibioticului, *funcționarea pompelor de eflux* ale antibioticului și *inactivarea antibioticului* prin diferite reacții realizate de sistemele enzimatică ale celulelor microbiene. Este de menționat, că aceste mecanisme sunt o parte indispensabilă a metabolismului normal al microorganismelor producătoare de antibiotice, astfel fiind asigurată autoprotecția lor de produsele proprii sinteze [168]. În același timp există și diferențe esențiale între rezistența organismelor producătoare de antibiotice și cele ale microorganismelor patogene. De exemplu, elementele de rezistență găsite în organisme producătoare sunt încorporate în grupurile de gene implicate în procesele de biosinteză, în timp ce în cazul microorganismelor patogene rezistente acestea sunt cel mai frecvent localizate pe plasmide și transpozoni [151].

Modificarea țintei asupra căreia acționează antibioticul, constituie unul dintre cele mai importante mecanisme de rezistență dezvoltate de bacterii. Aceasta are loc în urma unei mutații punctuale în genele care pot asigura o rezistență rapidă, deoarece afectează direct structura țintei moleculare. Ca rezultat, antibioticul nu mai găsește substratul cu care poate interacționa, și ca urmare, nu își poate realiza efectul. Rezultatul unor asemenea modificări reduce susceptibilitatea microorganismelor la efectul de inhibiție caracteristic antibioticului. Este important, însă, într-un asemenea tip de mutație, ca funcția moleculei țintă să fie păstrată pentru celula de origine, pentru că în caz contrar, de asemenea ar surveni moartea celulelor, chiar dacă aceasta nu ar fi cauzată de acțiunea antibioticului, ci de ruperea căilor metabolice specifice [64]. De asemenea, este de remarcat faptul că modificarea țintei se poate produce nu numai printr-o mutație de situs, ci și printr-o reacție enzimatică eficientă. Modificarea țintei poate fi realizată prin metilarea ARNr 23S sau ARNr 16S, modificări ale precursorilor de peptidoglican (de exemplu, a glicopeptidelor) sau sinteza țințelor alternative cu afinitate sporită care reduc sau blochează complet antibioticul prin asocierea lor cu ținta [168].

Practic toate componentele celulare, care pot fi ținta agenților antimicrobieni; pot fi modificate de bacterii pentru a asigura rezistența față de agenții respectivi. Un mecanism de rezistență la medicamentele β -lactamice utilizate aproape exclusiv pentru combaterea bacteriilor Gram+ constă în modificarea structurii și/sau numărului de proteine de legare a penicilinei. Acestea sunt transpeptidaze implicate în sinteza peptidoglicanului. O modificare a numărului de proteine de legare a penicilinei modifică și cantitatea de antibiotic care se poate lega de acea țintă,

iar o modificare a structurii acestor proteine poate reduce sau bloca complet capacitatea antibioticului de a se fixa pe celula bacteriană [114, 184].

În cazul antibioticelor care vizează sinteza acizilor nucleici (cum sunt de exemplu fluorochinolonele), rezistența poate fi atinsă prin modificări ale ADN-girazei la bacteriile Gram - sau a topoizomerazei IV la bacteriile Gram +. Aceste mutații provoacă modificări ale structurii girazei și topoizomerazei care scad sau blochează complet capacitatea antibioticului de a se lega de ele [184, 193].

Rezistența la antibioticele care inhibă anumite căi metabolice se obține prin mutații ale enzimelor implicate în reacțiile, care formează calea metabolică respectivă. De exemplu în calea de biosinteză a folatilor aceasta se obține prin antibiotice sulfonamidice și trimetoprim care se leagă de enzimele specifice datorită faptului că sunt analogi structurali ai substraturilor naturale. Acțiunea acestor medicamente constă în inhibarea competitivă prin legarea la locul activ al enzimelor. Mutațiile genelor ce codifică aceste enzime sunt cel mai adesea localizate în zona de codificare a centrului activ sau în apropierea lui, iar modificările structurale rezultate ale enzimei nu permit legarea cu antibioticul, permițând totuși legarea substratului natural [184].

Pompele de eflux. Un alt mecanism de rezistență este expulzarea activă a antibioticelor din interiorul celulei. Această rezistență este realizată de proteinele de transport specifice numite pompe de eflux, care sunt implicate în eliminarea substanțelor toxice, inclusiv a antibioticelor. Printre antibioticele, acțiunea cărora poate fi anihilată prin mecanismul de funcționare a pompelor de eflux sunt macrolidele, tetraciclinele și fluorochinolonele, care își exercită acțiunea în interiorul celulei prin mecanismul de inhibare a biosintezei proteinelor și/sau acizilor nucleici. Pompele de eflux de antibiotice îndepărtează antibioticul din celulă folosind energia din hidroliza ATP în pompele din familia proteică ABC (printre care DrrAB, OtrC, TlrC și MLbYZ) sau gradientii de protoni în pompele familiilor proteice MFS, MATE, SMR și RND [56, 64, 168]. Pompele de eflux diferă prin specificitate. Unele, cu spectru îngust de specificitate, exportă în mod specific doar o moleculă, în timp ce altele, care sunt cu spectru larg de specificitate, sunt capabile să expulzeze molecule din diferite clase chimice. Pompele cu specificitate largă față de antibiotice asigură rezistența multiplă la antibiotice – fenomen extrem de grav în medicină.

Inactivarea antibioticului. Una dintre cele mai eficiente căi pentru a diminua efectul antibioticelor constă în implicarea enzimelor capabile să modifice sau să degradeze elementele structurale cheie ale antibioticului prin reacții de diferite tipuri, printre care cele mai frecvente sunt reacțiile de hidroliză și transfer de grup, precum și reacțiile de oxido-reducere. Strategia prin reacții de hidroliză a antibioticelor este facilitată de structuri specifice în molecula medicamentului. Printre acestea se numără legăturile chimice sensibile la hidroliză (de exemplu, legături esterice). Legăturile respective sunt ținta enzimelor specifice, cum ar fi esterazele în cazul relatat mai sus.

Aceste enzime pot scinda grupul funcțional sensibil din structura antibioticului, ducând la inactivarea lui. Modificarea antibioticelor poate fi realizată și prin adăugarea de grupări acetyl, fosfat sau adenil la aminoglicozide de către enzimele transferaze, de exemplu N-acetil transferaza (AAC), O-fosfotransferaza (APH) și O-adeniltransferaza (ANT) specifice pentru cele trei grupări menționate [168].

Printre enzimele capabile să modifice sau să distrugă antibioticele, β -lactamazele reprezintă cele mai semnificative și mai răspândite enzime care asigură rezistența clinică a microorganismelor patogene. Există sute de β -lactamaze, toate având aceeași funcție generală iar deosebirile dintre ele se referă la secvențele de aminoacizi care influențează afinitatea lor pentru diferitele substraturi sau în cerințele diferite de cofactori. Aceste enzime hidrolizează practic toate substanțele β -lactamice, inclusiv cefalosporinele, carbapenemele și monobactamele. Acțiunea β -lactamazelor generează produși de hidroliză care sunt microbiologic inactivi [145]. Genele care codifică aceste enzime sunt larg răspândite în regnul Bacteria și sunt localizate în cromozomi sau plasmide. Produsul expresiei acestor gene este eliminat la bacteriile Gram - în spațiul periplasmatic, iar la cele Gram + - în mediul extracelular.

Microorganismele se caracterizează prin versatilitate și adaptivitate înaltă. Atât microorganismele ce populează liber mediul ambiant, cât și cele care provoacă maladii ale omului și animalelor pentru a supraviețui, trebuie să fie capabile să contracareze efectele substanțelor toxice. Astfel, devine absolut previzibil că microorganismele patogene sunt capabile să se apere împotriva agenților antimicrobieni. Odată cu creșterea alarmantă a rezistenței antimicrobiene, devine imperativă necesitatea de a identifica modalități de a combate acești agenți patogeni. Cercetările arată că această cale nu este nici scurtă, nici simplă, nici ieftină. În aceste condiții este necesară o abordare netradițională a procesului de proiectare a noilor substanțe antimicrobiene. De asemenea, e necesar de a regândi principiile și criteriile de identificare a substanțelor naturale cu proprietăți antimicrobiene, care ar putea fi utile în combaterea fenomenului de rezistență la acțiunea antibioticelor.

1.2. Căi de soluționare a problemei antibioticorezistenței: adjuvanții și formule hibride sinergice

Dezvoltarea de noi medicamente antimicrobiene este considerată drept o prioritate primordială, dar și o necesitate stringentă. Evoluțiile recente se concentrează pe două direcții de bază: sinteza chimică a substanțelor cu proprietăți predeterminate și screening-ul produselor naturale pentru a descoperi noi agenți terapeutici pentru a lupta împotriva agenților patogeni rezistenți [44]. Există și strategii, care implică aplicarea antibioticelor deja cunoscute în formule hibride, fie cu un adjuvant, fie cu o moleculă chimică cu proprietăți diferite de cele ale

antibioticului, fie cu alt antibiotic natural sau sintetic. În acest caz accent se pune pe efectul sinergic a unor substanțe binecunoscute sau noi, care fiind aplicate în tandem exercită efecte mai pronunțate ca efectele individuale ale acestora, superioare unei simple sume ale efectelor substanțelor din componența formulei hibride [64, 129, 215].

1.2.1. Adjuvanții antibioticelor

Adjuvanții antibioticelor sunt supranumiți „spărgători de rezistență” sau „potențatori de antibiotice”. În marea lor majoritate aceste substanțe nu se caracterizează prin activitate antibiotică, cu toate că unele astfel de substanțe în anumite condiții exprimă un nivel redus al activității antimicrobiene individuale. Atunci când sunt substanțele ajuvante sunt administrate cu antibiotice ca terapie medicamentoasă combinată, acestea sporesc activitatea medicamentului sau blochează rezistența bacteriilor față de acel medicament [64]. Datorită adjuvanților antibioticelor a fost reactualizată utilizarea unor antibiotice cunoscute împotriva agenților patogeni rezistenți sau multirezistenți, reducând nevoia de a dezvolta noi antibiotice cu proprietăți și specific nou, ceea ce este o misiune foarte costisitoare și care rar se soldează cu un succes real.

Până în prezent, au fost dezvoltați (sau sunt în curs de dezvoltare) trei tipuri de adjuvanți antibiotici: inhibitorii de β -lactamaze, inhibitorii pompei de eflux și permeabilizatorii învelișurilor exterioare. Acești adjuvanți ajută antibioticele să depășească rezistența bacteriană, care este determinată de unul dintre cele patru mecanisme de rezistență: inactivarea enzimatică a medicamentului; efluxul medicamentului, realizat de către pompele de eflux; scăderea absorbției ca urmare a modificării permeabilității membranei; și modificările țintei medicamentului [44, 64]. Fiind administrați concomitent cu un antibiotic, adjuvantul poate suprima dezvoltarea rezistenței la acest antibiotic sau/și poate amplifica efectul inhibitor al antibioticului. Adjuvanții antibioticelor pot fi clasificați în funcție de mecanismul de rezistență pe care îl compromit. De exemplu, se pot distinge inhibitorii ai β -lactamazelor - molecule care previn degradarea antibioticelor β -lactamice înainte ca acestea să-și atingă țintele; inhibitorii pompelor de eflux împiedică eliminarea antibioticelor din celulele microbiene în exterior, iar permeabilizatorii membranei exterioare la bacteriile Gram - și a peretelui celular la bacteriile Gram + facilitează pătrunderea antibioticului în celule prin barierele selective, mărind astfel numărul de molecule care luptă cu bacteriile.

În baza unei clasificări propuse de către Douafer și coautorii, adjuvanții se clasifică în funcție de tipul de acțiune și de ținta specifică în 4 grupuri distincte [64]: adjuvanți cu activitate antibacteriană intrinsecă foarte scăzută exercitată direct asupra celulei bacteriene care îmbunătățesc acțiunea antibioticelor; adjuvanți - compuși auxiliari, care modifică permeabilitatea învelișurilor celulare ale agentului patogen bacterian; adjuvanți, care își exercită acțiunea direct asupra țintei (blocarea căilor metabolice și perturbarea fiziologiei bacteriene etc.); adjuvanți care

potențează activitatea antibioticelor prin afectarea proprietăților organismului gazdei. Primele trei grupuri sunt utilizați deja în clinică, în timp ce cei din grupul 4 sunt în cel mai bun caz la etapa de studii preclinice [64, 219].

Cei mai bine poziționați adjuvanți ai antibioticelor sunt *inhibitorii de β -lactamaze*. Producerea de către microorganismele patogene a enzimelor ce hidrolizează β -lactamazele. Aceste enzime bacteriene distrug β -lactamele, și fac imposibilă aplicarea terapeutică pe termen lung a antibioticelor care conțin această grupă funcțională. Inhibitorii de β -lactamaze readuc în circuit aceste antibiotice, reducând necesitatea de a aplica chimioterapii dure cu antibiotice de ultima linie. Trei dintre cei mai cunoscuți adjuvanți, inhibitori ai β -lactamazelor sunt: acidul clavulanic, tazobactamul și sulbactamul. Acidul clavulanic este administrat în principal în combinație cu antibioticul amoxicilină, și se comercializează ca augmentin®. Deși această combinație de medicamente antimicrobiene este pe piață din 1981 și a fost utilizată pe scară largă, apariția rezistenței la augmentin în izolatele clinice rămâne foarte scăzută la augmentin, este utilizat în tratamentul unei game largi de afecțiuni, de la bronșită la boala Lyme. Acidul clavulanic acționează sinergic cu amoxicilina pentru a preveni hidroliza acesteia prin formarea unei legături ireversibile cu un reziduu de serină în situsul funcțional cheie al β -lactamazei. Puțin activ împotriva agenților patogeni, clavulanatul de potasiu inhibă eficient mai multe enzime, capabile să hidrolizeze penicilinele, monobactamele și cefalosporinele. Tot acid clavulanic se mai folosește și în combinație cu ticarcilina, formând un medicament comercializat cu numele comercial de timentin. Acesta se aplică pentru combaterea infecțiilor comune și celor rezistente la diverse categorii de vârstă, inclusiv noul-născuți prematuri [214].

Un alt adjuvant recunoscut este și sulbactamul, care este asociat cu ampicilina. Preparatul medicamentos format se comercializează sub denumirea de unasyn și este recunoscut ca fiind la fel de eficient ca și augmentin în cazul infecțiilor căilor respiratorii la adulți [72]. De asemenea o combinație reușită între adjuvantul tazobactam și antibioticul piperacilină este și preparatul denumit zosyn, care se utilizează cu succes pentru tratarea infecțiilor grave intraspitalicești la copii, inclusiv noul-născuți [200, 211]. Cu toate că s-au părut un mecanism simplu și ușor de implementat, este de remarcat faptul că doar acești trei inhibitori sunt disponibili în prezent pe piață ca combinații cu antibioticele.

Ținta inhibitorilor pot fi și alte enzime, decât β -lactamazele. Strategia de asociere a unui inhibitor al enzimelor de degradare a antibioticelor cu antibioticul a fost aplicată și împotriva dehidropeptidazei, o enzimă care degradează antibioticul β -lactamic imipenem. Adjuvantul cilastatină inhibă acțiunea acestei enzime și protejează imipenemul de degradare, prelungind efectul său antibacterian atunci când este administrat în combinația respectivă [38]. Toate exemplele prezentate mai sus se referă la inhibitori ireversibili, care produc scindarea enzimelor

de rezistență în anumite site-uri specifice. Astfel rupte, legăturile peptidice nu mai pot fi restabilite, iar activitatea β -lactamazică este compromisă complet.

Sunt cunoscuți, de asemenea, inhibitori reversibili ai β -lactamazelor. Inhibitorii reversibili formează cu enzima legături temporare, fiind posibilă restabilirea activității enzimei la detașarea inhibitorului de pe site-ul de conectare. Acești agenți sunt implicați într-un echilibru dinamic, iar o reducere a efectului lor inhibitor este posibilă printr-o simplă diluare a inhibitorului.

Un exemplu de astfel de inhibitor al β -lactamazei de tip D este avibactamul, care din punct de vedere structural este un diazabiciclooctan, care prin legarea cu două proteine membranare BlaR1 și MecR1 modifică expresia genelor de rezistență la antibiotice blaZ și pbp2a [16]. Un alt inhibitor reversibil de β -lactamaze este vaborbactamul. Combinația Meropenem/vaborbactam intravenos, comercializată cu numele de vabomere™ este prima combinație de carbapenem/inhibitor de β -lactamaze aprobată în SUA pentru utilizare la pacienții cu infecții complicate ale tractului urinar, inclusiv a celor cu pielonefrită. Vaborbactam este un inhibitor al β -lactamazelor de tip A, care, atunci când este combinat cu antibioticul meropenemul, asigură eficiența acestui din urmă împotriva bacteriilor din familia Enterobacteriaceae, inclusiv *Klebsiella pneumoniae*, care produce carbapenemază. Combinația meropenem - vaborbactam a demonstrat activitate excelentă *in vitro* împotriva izolatelor clinice Gram -, inclusiv contra reprezentanților familiei Enterobacteriaceae producătoare de β -lactamaze cu spectru extins de acțiune [63].

Un alt grup de adjuvanți este constituit din *inhibitorii pompelor de eflux*. Mecanismele de eflux a antibioticelor și a altor medicamente contribuie la fortificarea rezistenței bacteriilor la acțiunea chimioterapeutică. Efluxul de antibiotice și alte substanțe rezultă din activitatea transportorilor membranari implicați într-o varietate de procese fiziologice. Acești transportori, care expulzează din celulă molecule cu potențial toxic, și care prin natura lor sunt xenobiotice, aplică un mecanism de transport activ, cu consum de energie, sunt numiți „pompe de eflux” [126, 196].

Aceste pompe au un rol protector față de celulele bacteriilor patogene prin expulzarea antibioticului în exteriorul celulei. Unele dintre ele sunt selective și elimină doar un anumit substrat, în timp ce altele sunt neselective și efectuează eliminarea unei game largi de compuși structural diverși - coloranți organici, solvenți, detergenți, precum și diferite clase de antibiotice. Mecanismele de eflux codificate de gene cromozomiale bacteriene sunt omniprezente în special la bacteriile Gram-, și contribuie în mare măsură la rezistența la antibiotice. Pompele multiple nespecifice, nu numai că mediază rezistența multiplă intrinsecă și dobândită, dar se și implică în alte funcții, cum ar fi răspunsul la stres și patogenitatea bacteriilor, în special a celor de importanță clinică. În plus, pompele de eflux interacționează sinergic cu alte mecanisme de rezistență (de exemplu, cu bariera de permeabilitate a membranei exterioare) pentru a crește nivelurile de

rezistență. Cu toate că pompele de eflux au fost descoperite demult, sunt bine studiate, se cunosc particularitățile de funcționare a lor la diferite microorganisme de interes clinic, dezvoltarea de inhibitori ai pompelor de eflux continuă să fie o provocare. Genele pompelor de eflux sunt localizate și în plasmide ceea asigură transmiterea lor orizontală și răspândirea largă în populațiile de bacterii rezistente [126] .

Pompele nespecifice prezintă un interes clinic major deoarece pot face o infecție bacteriană netratabilă prin antibioticele disponibile, conferind fenotipul de rezistență multiplă, definită prin rezistența la cel puțin trei clase diferite de antibiotice. Astfel, proiectarea moleculelor, care inhibă acțiunea acestor pompe prin mărirea concentrației antibioticului și prevenirea expulzării acestuia în afara celulei bacteriene constituie o abordare interesantă care deschide posibilitatea restabilirii susceptibilității bacteriene. Datorită importanței rezistenței la mai multe medicamente determinată de efluxul acestora, dezvoltarea de noi abordări terapeutice care vizează inhibarea pompelor bacteriene de eflux este o modalitate promițătoare de a combate rezistența multiplă a bacteriilor, care au sisteme de eflux supra-exprimate. Inhibitorii pompelor de eflux au capacitatea de a face bacteriile mai sensibile la unul sau mai multe antibiotice, sau chiar de a inversa fenotipul rezistent în unul sensibil la chimioterapia antibacterială. În ultimii ani au fost dezvoltați numeroși inhibitori ai pompelor de eflux, dar aplicarea lor clinică este blocată din cauza toxicității lor *in vivo* și a efectelor secundare foarte severe [196].

Inhibarea pompei de eflux permite restabilirea sensibilității tulpinilor bacteriene rezistente la antibiotice și limitează apariția de noi mutanți rezistenți. Mecanismele de inhibiție a pompelor de eflux pot afecta diferite niveluri de manifestare – la nivel de expresie a genelor, de asamblare a componentelor pompei și montarea lor în membrană, asigurării căii de acces a substanței supuse efluxului, asigurării cu energie a componentelor pompelor de eflux. De asemenea, există posibilitatea de intervenție a inhibitorilor pompelor de eflux prin blocarea etapelor de fosforilare care induc sau sporesc activitatea proteinelor reglatoare sau proteinelor pompei de eflux; aplicarea de anticorpi împotriva proteinelor pompei sau a altor componente proteice ale pompelor de eflux; aplicarea moleculelor mimetice care sunt recunoscute și supuse efluxului în schimbul antibioticului; utilizarea moleculelor care blochează în mod competitiv site-ul steric de conectare a antibioticului la pompa de eflux care exercită o piedică sterică a accesului substratului la locul de legare, precum și aplicarea de molecule care inhibă necompetitiv modificările conformaționale esențiale ale pompelor de eflux în timpul procesului de eflux [42, 210]. De asemenea, activitatea inhibitorilor pompelor de eflux este determinată atât de natura substanței expuse efluxului, cât și de tipul de bacterie care realizează acest proces. Ca un inhibitor al activității pompelor de eflux să fie de perspectivă pentru aplicare în terapie, acesta ar trebui să satisfacă mai multor condiții, principalele dintre care sunt: specificitate înaltă față de țintă și efect minim față de celulele

eucariote; să nu posedă activitate antibacteriană individuală, pentru a evita dezvoltarea rezistenței; să dezvolte parametri farmacocinetici acceptabili; să nu prezinte toxicitate față de organismul uman [42, 196, 210].

În același timp pompele de eflux realizează multiple funcții, asigurând detoxifierea celulelor, de exemplu de metalele grele, iar blocarea lor poate duce la efecte neașteptate și nedorite, cum ar fi diferite tipuri de stări toxice. Prin urmare, inhibitorii pompelor de eflux ar trebui să acționeze în mod specific doar pe pompele celulelor procariote. Astfel, una dintre cele mai complicate sarcini în procesul de elaborare a inhibitorilor specifici de pompe de eflux constă în identificarea particularităților, care ar ajuta cercetătorilor să identifice ori să proiecteze substanțe cu astfel de selectivitate. Este de remarcat faptul că până în prezent nu au fost înregistrați inhibitori ai pompei de eflux pentru tratamentul infecțiilor bacteriene în clinicile umane sau veterinare și singurul inhibitor documentat este în prezent MP-601 care se administrează în formă de aerosol [24].

Printre compuși capabili să concureze cu antibioticele pentru extrudarea lor prin pompele de eflux este fenilalanină-arginina- β -naftilamidă (Pa β N), care inhibă unele pompele de eflux, îmbunătățind sau restabilind activitatea 4-fluorochinolonei, macrolidelor și cloramfenicolului la mai multe specii de bacterii patogene. Cu toate că această elaborare arată a fi foarte promițătoare, cercetările ulterioare au demonstrat, că toxicitatea acestei molecule este extrem de mare, ceea ce face imposibilă utilizarea ei în terapie [24, 112]. Au fost identificați în calitate de inhibitori ai pompelor de eflux derivații fenotiazinei, care măresc eficiența eritromicinei, levofloxacinei și azitromicinei. Mecanismul de acțiune al acestei clase de inhibitori ai pompelor de eflux constă în dereglarea gradientului de protoni în membrana citoplasmatică a bacteriilor [112]. Chinolinele și derivații lor cresc eficacitatea activitatea tetraciclinei, norfloxacinei și cloramfenicolului prin inactivarea transportatorilor de eflux AcrAB-ToIC în cazul izolatelor de *Klebsiella pneumoniae* și *Enterobacter aerogenes* [24, 176].

Un alt compus cu activitate de inhibare a pompelor de eflux este 1-(1-Naftilmetil)-piperazina (NMP), care face parte din grupul de compuși N-heterociclici, derivați ai arilpiperazinei, care are efecte asupra pompelor de eflux AcrAB și AcrEF la *Escherichia coli*. Aplicarea acestui compus a făcut tulpinile microbiene studiate susceptibile la fluorochinolone. Cu toate acestea, și acest compus are limitări serioase, fiind foarte similar antagoniștilor serotoninei [24, 222].

Se cunoaște, că *Mycobacterium tuberculosis*, posedă unul dintre cele mai relevante mecanisme de rezistență la antibiotice, care este asociat cu capacitatea agenților patogeni de a dezvolta mai multe sisteme de eflux dotate cu capacitatea de a extruda diferite clase de antibiotice. Derivații tioridazinei (TZ) mai puțin toxici pentru macrofagele umane, dar și pentru sistemul

nervos central, au o activitate sinergică ridicată atunci când sunt administrați în combinație cu medicamentele de primă linie (izoniazidă, rifampicină) utilizați în prezent pentru tratamentul tuberculozei. Acești derivați se manifestă ca inhibitori ai pompelor de eflux, atât *in vitro*, cât și *in vivo* [124, 171].

Derivații de chinolină, în special cei ce conțin lanțul lateral ramificat piperidiniletil cu compusul 7-nitro-8-metil-4-(2'-piperidiniletil)-aminochinolină se manifestă ca inhibitori ai pompelor de eflux în tulpinile clinice de *Enterobacter aerogenes* care exprimă pompele de eflux AcrAB, provocând o acumulare intracelulară crescută de cloramfenicol. Se presupune că mecanismul prin care lucrează acești inhibitori este concurența sterică a lor cu canalele pompelor de eflux [64].

Unii compuși naturali de asemenea, au fost identificați în calitate de inhibitori ai pompelor de eflux. Astfel, din planta *Holarrhena* a fost extras un alcaloid, numit conessine, care se manifestă în calitate de inhibitor al pompelor de eflux MexAB-OprM și MexB supraexprimate la tulpinile clinice de *Pseudomonas aeruginosa*. Acest compus a furnizat o reducere de cel puțin 8 ori a concentrațiilor minime inhibitorii (MIC) determinate pentru cefotaximă, eritromicină, levofloxacină, novobiocină, rifampicină și tetraciclină [195]. Un alt compus natural, care se manifestă ca inhibitor pentru pompele de eflux la *Pseudomonas aeruginosa*, de natură polifenolică a, epigallocatechin-3-galat, a fost extras din ceai. S-a demonstrat că acest polifenol crește sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor clinice de *P. aeruginosa* cu rezistență multiplă la antibiotice [112].

Flavonoidele din plante, de asemenea, s-au manifestat ca inhibitori ai pompelor de eflux bacterian. Compușii activi din subclasele de chalcone, flavan-3-oli, flavanone, flavone, flavonoli, flavonolignani și izoflavone, precum și unele glicozide cum ar fi glicozidele de kaempferol cu acilare p-cumaroil au arătat rezultate remarcabile. Pompele de eflux NorA specifice pentru *Staphylococcus aureus* au fost sensibile acțiunii acestor substanțe. Doar în cazul lor până în prezent a fost înregistrată legarea directă a flavonoidelor la substructurile specifice ale acestei pompe de eflux [210].

Al treilea mecanism prin care adjuvanții de antibiotice asigură depășirea fenomenului de rezistență este *modificarea barierelor de permeabilitate a învelișurilor bacteriene*. De cele mai multe ori la acest grup sunt atribuite substanțele care intervin în structura și funcțiile membranei externe la bacteriile Gram -. Permeabilitatea selectivă a membranelor față de agenții antimicrobieni constituie un mecanism de protecție timpurie a bacteriilor. Prin acest mecanism are loc reglarea eficientă a concentrației intracelulare a diferitelor molecule [42]. În prezent, majoritatea antibioticelor disponibile își exercită acțiunea la nivel intracelular, ceea ce necesită pătrunderea lor în interiorul celulei bacteriene prin membrana celulară. În cazul bacteriilor Gram+

substanțele antimicrobiene traversează o astfel de barieră, în timp ce bacteriile Gram - au un strat suplimentar de protecție reprezentat de membrana externă. În dependență de natura substanțelor, acestea pot intra în celule pe două căi diferite: prin stratul dublu lipidic al membranelor trec substanțele hidrofobe, așa macrolidele și rifampicina; în timp ce substanțele hidrofile, așa ca β -lactamele, fluorochinolonele și antibioticele fenicol difuzează prin porinele bacteriei [64, 221].

Principalele componente ale membranei celulare care ar putea fi ținta acțiunii unor substanțe – adjuvanți ai antibioticelor – sunt porinele bacteriene și lipidele. Modificarea acestora poate influența semnificativ susceptibilitatea bacteriilor față de antibiotice. Cercetările demonstrează, că de cele mai multe ori, tulpinile bacteriilor patogene sensibile la acțiunea antibioticelor, se caracterizează prin modificări structurale ale lipidelor sau proteinelor membranelor [61].

Printre strategiile în baza cărora se formulează combinațiile de adjuvanți și antibiotice este utilizarea substanțelor, care provoacă degradarea proteinelor porinice. Din acest grup de substanțe fac parte diferiți detergenți, agenți tensioactivi, polimixine, peptide antimicrobiene, lipopeptide ciclice, metale grele [61, 209]. Recent au fost obținuți noi conjugați ai polizaharidelor cationice, unul dintre care, dextran - poli(5-(1,2-ditiolan-3-il)-N-(2-guanidino etil)pentanamidă) (Dex-g-PSSn), care modifică permeabilitatea membranei citoplasmatică dar și lucrul pompelor de eflux la o concentrație sub-inhibitoare de Dex-g-PSS30. Acest adjuvant facilitează acumularea de rifampicină în interiorul celulelor bacteriene și le face pe acestea sensibile la antibiotic, chiar dacă tulpinile respective prezentau rezistență multiplă. Combinația Dex-g-PSS30 și rifampicina previne rezistența bacteriană la bacteriile cultivate pe durata a 30 de generații, ceea ce este un rezultat extraordinar și de perspectivă pentru studii mai aprofundate, inclusiv clinice [149].

Peptidele cationice dereglează activitatea canalelor ionice, ceea ce duce la dezechilibrul potențialului membranal și la modificarea permeabilității membranei bacteriene. De exemplu peptida bazică GBP produce deteriorări microscopice ale învelișurilor celulare la *Escherichia coli*, prin blocarea canalelor ionice, ceea ce provoacă scurgerea ionilor Ca^{2+} , K^{+} și Mg^{2+} . De asemenea această peptidă produce efecte adjuvante în raport cu antibiotice în baza modificării tensiunii superficiale a membranelor. Rezultatele obținute au demonstrat, că peptida cationică GBP crește semnificativ sensibilitatea bacteriilor eritromicină și rifampicina. Aceste antibiotice de regulă nu pot traversa membrana exterioară intactă a bacteriilor Gram -, dar sunt capabile să treacă prin membranele deteriorate de policaioni [127]. Peptidele antimicrobiene endogene (AMP) secretate de celulele epiteliale, neutrofile și glandele exocrine de asemenea manifestă activitate împotriva agenților patogeni invazivi prin destabilizează membranei lor exterioare [87]. Cu toate că efectele peptidelor cationice în destabilizarea membranelor bacteriene sunt bine conturate și evidente, utilizarea lor chiar la nivel de cercetare, este destul de redusă din cauza costurilor foarte înalte de

obținere a acestora. Din acest motiv, acest grup de substanțe adjuvante se consideră important din punct de vedere teoretic, dar cu perspective aplicative limitate, cel puțin la etapa actuală de dezvoltare a științei și tehnologiilor.

O altă soartă o are un alt grup de compuși cationici antibiotice cationice steroidiene numite *ceragenine*, care combină eficiența peptidelor antimicrobiene, dar au alte avantaje suplimentare. Aceste substanțe sunt rezistente la acțiunea proteazelor deoarece sunt de origine lipidică, și nu proteică. Afară de aceasta ele pot produse în cantități mari cu aplicarea unor procedee simple. Venind în contact cu membranele bacteriene, aceste substanțe formează complecși stabili cu fosfolipidele, ancorându-se strâns în structura membranei. Sarcina pozitivă a acestor lipide antimicrobiene cationice le asigură atracția electrostatică către membranele bacteriene cu sarcină negativă. Ca rezultat se produce o depolarizare rapidă a membranei celulare la bacteriile Gram + a membranei externe la bacteriile Gram -, ceea ce ridică semnificativ sensibilitatea acestora la acțiunea antibioticelor de natură hidrofobă. De exemplu, CMI a eritromicinei față de *Klebsiella pneumoniae* poate fi redusă de ceragenine de 70 de ori. De asemenea, cerageninele asigură sensibilitatea tulpinilor de *Staphylococcus aureus* multirezistente la gentamicină [64].

Efecte de mărire a permeabilității membranelor bacteriene o au și unele vitamine/provitamine sau extracte din plante. De exemplu a fost demonstrat, că menadiona în combinație cu antibiotice din familia aminoglicozidelor a asigurat o reducere a concentrației inhibitoare a acestor antibiotice și a sugerat o acțiune sinergică față de tulpinile rezistente de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli* [22].

Extractului etanolic din *Holarrhena antidysenterica*, combinat cu novobiocina, asigură sensibilizarea microorganismelor Gram + și Gram - la acest antibiotic datorată acțiunii de permeabilizare a extractului asupra membranei exterioare la bacteriile Gram - și asupra membranei citoplasmatică la cele Gram + [54, 64]. Un alt compus natural de origine vegetală cu efect de permeabilizare a membranelor bacteriene este squalamina, care a demonstrat efect foarte bun în cazul bacteriilor Gram negative. Acest compus provoacă deteriorarea fizică a membranelor și epuizarea practic completă a ATP intracelular. Squalamina a exercitat un efect sinergic asupra cloramfenicolului, tetraciclinei și ciprofloxacinei [190].

1.2.2. Formule antibiotice hibride

Formulele antibiotice hibride sunt utilizate pentru a contracara antibioticorezistența și pentru a crește numărul de antibiotice eficiente disponibile pentru utilizare. Formulele antibiotice hibride se deosebesc de adjuvanți, prin faptul, că sunt construite sintetice din două molecule legate covalent. Legătura covalentă poate fi clivabilă sau neclivabilă. În cazul legăturii clivabile, hibridul antibiotic este biotransformat enzimatic la locul de acțiune, fiind îndeplinită condiția de pro-

medicament. Legătura neclivabilă rămâne neafectată în organism pe durata de acțiune a formulei. Pro-medicamentul hibrid antibiotic este scindat în două molecule funcționale, fiecare având propriul metabolism și eliminare a medicamentului, în timp ce hibridul antibiotic cu legătura covalentă nescindabilă se comportă ca o singură moleculă în ceea ce privește metabolismul și excreția în timpul prezenței sale în organism. Formula antibiotică hibridă poate fi constituită din două antibiotice sau un antibiotic cu un adjuvant (inhibitor al pompei de eflux, ori substanță care mărește permeabilitatea membranelor, de exemplu). În componența formulei hibride unul dintre cei doi agenți terapeutici hibridizați într-o singură moleculă poate transmite beneficii suplimentare care lipsesc în cazul moleculelor individuale. Constructul hibrid mărește accesul antibioticelor la țintă. Cu toate că posibilități teoretice de constituire a formulelor antibiotice hibride sunt foarte multe, majoritatea constructelor reale sunt constituite din fluorochinolone și aminoglicozide. În același timp, atitudinea față de formulele antibiotice hibride este ca față de un ”glonț de argint”, în special în cazul bacteriilor Gram -, și se consideră că vor permite de a depăși rezistența bacteriană, și de a extinde spectrul antibioticelor existente [103].

Cele mai cunoscute formule antibiotice hibride conțin antibiotice din clasa *fluorochinolonei*, legate de un alt agent antibacterian. Fluorochinolonele vizează două enzime bacteriene - topoisomeraza IV și ADN giraza. Prin acțiunea lor aceste antibiotice inhibă replicarea și transcripția ADN-ului. Prin urmare, dacă există vreo interferență sterică impusă de un linker sau o altă moleculă care duce la perturbarea legării unei ținte, aceasta poate fi compensată prin ținerea celeilalte enzime/molecule fără o reducere substanțială a potențialului antibacterian. Fluorochinolonele au în structura sa o componentă aminică bazică din fragmentul piperidino-C-7, care poate fi privit ca punct potrivit pentru atașarea diferiților substituenți voluminoși. Datorită stabilității lor în diferite condiții fluorochinolonele se potrivesc pentru elaborarea de molecule hibride antibiotice [103, 119]. În același timp, față de fluorochinolone rezistența se dezvoltă foarte rapid, în primul rând datorită ratei înalte de mutație în genele enzimelor vizate de aceste substanțe, dar și datorită valorilor mici ale CMI ale antibioticelor față de marea majoritate a organismelor patogene.

Un exemplu de moleculă antibiotică hibridă cu fluorochinolone, este constructul dintre neomicina B și ciprofloxacină, care are o activitate înaltă împotriva bacteriilor Gram+ și Gram- și, care împiedică ori amână dezvoltarea rezistenței la medicamente. Acest hibrid este activ împotriva *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină, tulpinilor de *Escherichia coli* cu rezistență multiplă și *Bacillus subtilis* [174]. În același timp, hibridul are o masă moleculară mare, ceea ce îi limitează capacitatea de a atinge un nivel intracelular optim în comparație cu ciprofloxacina care intră în celule prin porine. Se consideră, că în hibridul neomicină-ciprofloxacină, principala activitate

antibacteriană este mediată de ciprofloxacină, iar întârzierea apariției rezistenței la antibiotice - se datorează neomicinei B [103].

Un alt exemplu de formulă antibiotică hibridă din această categorie este cadazolidul - un hibrid care conține o moleculă de chinolonă cu o oxazolidinonă. Cadazolidul este puțin solubil în apă datorită naturii sale acide și lipofile. Absorbția sa din intestin este nesemnificativă după administrarea orală, astfel încât biodisponibilitatea sa sistemică este neglijabilă, prin urmare, este utilizat în studii preclinice și clinice pentru tratarea infecției cu *Clostridioides difficile*. Acest hibrid acționează pe două direcții distincte: inhibă puternic sinteza proteinelor pe de o parte și pe de altă parte inhibă într-o măsură mai mică sinteza ADN-ului bacterian. Această sinergie s-ar putea datora proprietăților fizico-chimice favorabile ale porțiunii de fluorochinolonă, care duce la o penetrare ușoară a celulelor bacteriene [131].

Mai sunt și alte exemple de formule hibride cu fluorochinolone. De exemplu MCB-3681 este un antibiotic hibrid care combină farmacofori de oxazolidinonă și fluorochinolone. CBR-2092 este un compus multivalent este un hibrid al farmacoforului rifampicinei cu subseria 4H-4-oxochinolizină de antibiotice fluorochinolone, iar un alt antibiotic hibrid care combină ciprofloxacină cu pirazinamidă este caracterizat prin activitate antibacteriană cu spectru larg împotriva *Mycobacterium tuberculosis* [70, 155, 173].

Un alt grup de formule hibrid sunt cele care sunt constituite pe bază de tobramicină ca adjuvant. Hibrizii pe bază de tobramicină sunt eficienți datorită faptului, că tobramicina intră în citosol prin absorbție auto-promovată, ceea ce poate contribui la transportul celui de-al doilea antibiotic hibridizat care are în mod normal o șansă mai joasă de a nimeri în celulă. De asemenea aminoglicozidele, aplicate în concentrații mici, inhibă procesul de translație prin interacțiunea la nivel de ARNr, iar fiind aplicate în concentrații mari, perturbă structura membranei bacteriene. Efectele acestui grup de hibridi sunt foarte pronunțate în cazul *Pseudomonas aeruginosa*, caracterizată prin rezistență timpurie și înaltă față de antibiotice [80]. O formulă foarte eficientă din acest grup este hibridul tobramicină-moxifloxacină. Acesta se caracterizează prin dimensiuni mari, care reduc semnificativ posibilitatea de a fi eliminat prin eflux. Acest hibrid a demonstrat activitate puternică împotriva tulpinilor multirezistente (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa*, și a tulpinilor extrem de rezistente la medicamente (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*. De asemenea, această formulă a redus drastic probabilitatea de dezvoltare a rezistenței. Mecanismul de acțiune al structurii de bază hibrid tobramicină-moxifloxacină a constat în reducerea efluxului prin disiparea forței motrice a protonilor a membranei citoplasmatică la *Pseudomonas aeruginosa* [79, 80].

Față de izolatele menționate multirezistente și extrem de rezistente de *Pseudomonas aeruginosa* este activă încă o formulă hibridă cu tobramicină, care conține conjugați de lizină, care conțin un linker tobramicină-C12 amfifil. Acest hibrid păstrează sensibilitatea înăscută a

bacteriilor Gram- la antibiotice. Similar cu alți hibrizi de tobramicină, acest hibrid îmbunătățește penetrarea membranei externe de către diferite molecule și disipează forța motrice a protonilor, a cărei funcție este de a energiza pompele de eflux. Acești conjugați asigură sensibilitatea la rifampicină și minociclină a izolatelor multirezistente și extrem de rezistente de *Pseudomonas aeruginosa* [137].

O altă abordare aplicată pentru elaborarea formulelor hibride de antibiotice constă în combinarea unui antibiotic cu o componentă care este lipsită de proprietăți antibacteriene directe. Acestea pot fi inhibitorii pompelor de eflux și sideroforii. În calitate de exemplu a hibridului dintre antibiotic și inhibitorii de pompe de eflux poate servi compusul format prin legarea covalentă a ciprofloxacinei cu un flavonoid fenolic, naringenina, care este un inhibitor eficient al pompelor nespecifice de eflux. Hibridul ciprofloxacina cu naringenina inhibă ADN giraza mai de 23 de ori mai puternic decât ciprofloxacina în monoterapie. Acest hibrid are activitate semnificativă împotriva *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină, izolatele multirezistente de *Escherichia coli* și *Candida albicans* rezistentă la amfotericină [223].

Atașarea unui siderofor de o moleculă de antibiotic produc o captare eronată a acestor hibrizi de către transportorii membranari. Sideroforii sunt caracterizați prin afinitate înaltă față de fier, care este deficitar în majoritatea mediilor, iar celulele îi recunosc greșit ca pe chelatori de fier, îi atașează de membrane, facilitând pătrunderea antibioticului în celule. Prin etichetarea unui antibiotic la un siderofor de chelare a fierului, acesta este transportat activ în celulă în locul fierului [148]. Un exemplu de astfel de hibrid este cefiderocolul format din acidul catecol 2-clor-3,4-dihidroxibenzoic legat covalent printr-un linker neclivabil la ceftazidimă. Prezintă activitate puternică și eficiență împotriva agenților patogeni Gram -. Activitatea antibacteriană superioară a ceftazidimei este atribuită farmacoforului catecol atașat covalent. Este investigat pentru tratamentul infecțiilor bacteriene Gram - rezistente la carbapenem și infecțiilor complicate ale tractului urinar și pneumoniei nosocomiale [115].

1.3. Compuși chimici noi și compuși naturali cu proprietăți antimicrobiene – potențiale soluții pentru problema antibioticorezistenței

Odată cu creșterea rezistenței microorganismelor patogene la antibiotice și realul pericol al unei perioade în care medicina nu va putea beneficia, ori va beneficia în proporție foarte redusă de eficiența antibioticelor, tema elaborării de noi preparate active contra microorganismelor patogene, în special contra celor multirezistente este nu numai actuală, dar și de importanță vitală. Cercetările în acest domeniu se lovesc, însă de mai multe obstacole. Unele dintre acestea sunt de natură regulatorie, cum ar fi controlul sporit pentru siguranță și eficacitate, care implică resurse financiare și de timp importante. Alte sunt de natură științifică, cum ar fi lipsa de idei principial noi sau

dificultatea de a descoperi noi substanțe chimice care au selectivitate față de patogeni și nu manifestă toxicitate față de alte organisme ori țesuturi adiacente [71].

În prezent sunt evidențiate mai multe strategii de descoperire a noi compuși antibacterieni cum ar fi: elaborarea de noi derivați ai agenților antibacterieni cunoscuți; îmbunătățirea activității unui agent antimicrobian cunoscut prin două strategii: (1) modificarea structurii chimice inițiale a unui agent antimicrobian pentru a evita mecanismele de rezistență antibacteriană și (2) dezvoltarea unui compus care inhibă mecanismele de rezistență la un agent antimicrobian; dezvoltarea de noi agenți antibacterieni ce vizează proteinele; dezvoltarea de inhibitori ai factorilor de virulență; dezvoltarea de nanoparticule cu proprietăți antimicrobiene; dezvoltarea de peptide antimicrobiene și peptidomimetice; elaborarea terapiilor cu fagi și enzime; și utilizarea oligonucleotidelor antisens [206].

Comunitatea științifică s-a dedicat în mod exhaustiv descoperirii de medicamente noi, mai sigure și eficiente, fie prin sinteza chimică dirijată a noilor compuși, fie prin exploatarea resurselor naturale. Nenumărate rapoarte au arătat deja capacitatea promițătoare a produselor naturale sau a moleculelor extrase din aceste resurse naturale, de a acționa ca agenți bacteriostatici și bactericizi. Mai important, acești agenți naturali prezintă efecte nocive semnificativ mai mici comparativ cu compușii de sinteză [55]. În schimb compușii chimici se caracterizează prin simplitate în manipulare și control și studii farmacocinetice și farmacodinamice, medicamentul fiind constituit dintr-un singur tip de molecule. În continuare ne vom referi la succesele înregistrate în ambele direcții menționate.

1.3.1. Compuși chimici noi în calitate de substanțe cu proprietăți antimicrobiene

Obstacolele cu care se confruntă dezvoltatorii de antibiotice includ dificultatea de a descoperi noi substanțe chimice care au un grad înalt de selectivitate față de microorganismele patogene și controlul de reglementare sporit pentru siguranță și eficacitate (Fernandes, 2015). Dintre toate antibioticele aprobate în ultimii ani foarte puține au formule chimice principial diferite de formele deja cunoscute, în timp ce restul sunt de fapt derivate ale claselor existente de compuși care totuși au anumite beneficii și avantaje față de antibioticele tradiționale [199]. Clasele noi de antibiotice oferă potențialul de a răspunde unei cereri medicale critice. Majoritatea agenților chimici noi care trec cu succes cel puțin primele faze ale studiului clinic în ultimii ani sunt elaborați direcționat și acționează pe un spectru restrâns de agenți patogeni, cum ar fi pseudomonadele, stafilococii sau micobacteriile. Succesul acestor substanțe chimice noi se bazează pe faptul, că acestea au ținte noi, asupra cărora nu acționează antibioticele aprobate existente. Descoperirea de noi clase de substanțe chimice care sunt eficiente față de țintele moleculare noi prezintă o oportunitate pentru o dezvoltare extinsă viitoare de agenți antimicrobieni cu spectru larg de

acțiune. Un exemplu în acest sens sunt noile metoxichinoline care inhibă țintele fluorochinolone, topoizomerazele de tip II. În condițiile unei situații, când soluțiile disponibile în raport cu țintele microbiene sunt epuizate, noile clase de agenți împotriva unor ținte noi capătă o semnificație suplimentară ca sursă importantă de antibiotice [144].

Dezvoltarea complexelor organometalice și anorganice de uz medicinal este un domeniu de importanță emergentă datorită dezvoltării intense a chimiei coordinative și multiplelor realizări în acest domeniu care au devenit disponibile în ultimele decenii. Combinația anumitor metale de tranziție și liganzi organici s-a dovedit a avea efecte sinergice prin îmbunătățirea activității biologice în complexe, inclusiv a activității antimicrobiene față de diferiți patogeni periculoși [37].

Primele antibiotice eficiente folosite pentru tratarea infecțiilor bacteriene, penicilinele, conțin în structura lor un inel tiazol. De asemenea, au fost dezvoltate câteva medicamente comerciale cu efecte antibiotice care conțin fragmente tiazolice, așa cum sunt bleomicina, abafungina, mixotiazolul și amoxicilina. Derivații de tiazol reprezintă un grup important de compuși heterociclici care au efecte terapeutice împotriva mai multor maladii provocate de fungi și bacterii patogene [128, 183]. Cercetările au demonstrat, că prezența mai multor inele de tiazol sporesc semnificativ eficiența compușilor chimici, iar multe echipe de chimiști au inițiat sinteza moleculelor de acest tip [20, 78]. Astfel, Althagafi și coautorii au realizat o astfel de sinteză prin reacția 2-brom-1-(4-metil-2-(metilamino)tiazol-5-il)etan-1-onei cu diferite amine heterociclice și tiosemicarbazone. Datorită posibilității de formare a mai mult de un izomer în cadrul acestor reacții cu aminelor heterociclice cu derivatul de bromură de fenacil, au fost obținuți diverși compuși cu activitate antimicrobiană împotriva diferitelor tipuri de bacterii și ciuperci. Rezultatele au arătat că derivații care au inele di- și tritiazol au o activitate care depășește antibioticelor standard utilizate (amfotericina B în cazul fungilor, ampicilina în cazul bacteriilor Gram + și gentamicina în cazul bacteriilor Gram -) [20].

Printre compușii chimici de perspectivă în sensul prezentei lucrări un rol important le revine tiosemicarbazonelor (TSCN) – o familie mare de compuși cu formula generală $R_1R_2C=N-NH-C(S)-NR_3R_4$, atractivă datorită faptului că mulți dintre ei prezintă o anumită activitate biologică împotriva unei game largi de microorganisme și celule canceroase. Structura tiosemicarbazonelor le face pe acestea liganzi donatori semnificativi prin atomii lor de azot și sulf hidrazin. De asemenea, aceste substanțe se pot coordona, ca liganzi multi-dentați, în funcție de prezența altor heteroatomi, care pot acționa ca centre donatoare pentru a forma complexe cu geometrii de coordonare diferite. Tiosemicarbazonele se pot coordona ca liganzi bidentati cu ionul metalic central ca forma de tionă neutră sau de tiolat anionic pentru a furniza un inel de chelare cu cinci elemente structurale. Ele se prezintă ca tautomeri tion-tiol datorită existenței grupului funcțional $-NH-C=S$, forma tionică fiind în stare solidă, iar cea tiolică – lichidă [74]. În anul 1956

a fost raportată prima tiosemicarbazone activă contra cancerului cu acțiune antileucemică, moment din care atenția față de acest grup de substanțe a fost în creștere continuă. În ultimele decenii, cercetări ample au condus la dezvoltarea mai multor medicamente pe bază de tiosemicarbazone. De exemplu, metisazona cu denumirea comercială Marboran, este o moleculă cu activitate antivirală și se aplică pentru tratarea variolei; 3-aminopiridin-2-carboxaldehida tiosemicarbazona, cu denumirea comercială Triapine și di-2-piridilcetonă 4-ciclohexil- 4-metil-3-tiosemicarbazonă (DpC) sunt medicamente antitumorale [74, 106, 160]. Activitatea lor biologică se explică prin proprietățile lor electronice și structurale, care oferă un set bogat de atomi donatori pentru coordonarea metalelor și o delocalizare electronică ridicată, oferind diferite moduri de legare pentru biomolecule [140].

Compușii organici par a fi printre cei mai indicați în calitate de substanțe cu efecte biologice pronunțate. Metalele de asemenea tot mai des sunt apreciate în calitate de componente active ale medicamentelor aplicate în diverse terapii. Unele dintre primele exemple de utilizare a metalelor în terapii sunt cele al arsenicului utilizat pentru primul tratament eficient al sifilisului; mercurului în componența unui antiseptic topic sau ca conservant al vaccinului și aurului în tratamentul poliartritei reumatoide [73]. Complexele metalice au devenit o parte indispensabilă a chimiei medicinale, în special după ce în anul 1978 a fost aprobat medicamentul chimioterapeutic pe bază de platină Cisplatin, care este încă utilizat în majoritatea tratamentelor cancerului [108]. În ultimul două decenii, mai multe complexe metalice pe bază de titan, fier, ruteniu, galiu, paladiu, argint, aur, bismut și cupru au ajuns la studii clinice umane ca tratamente pentru cancer, malarie și boli neurodegenerative [73]. Cu toate acestea, doar câteva studii s-au concentrat pe aplicațiile antibacteriene ale complexelor metalice. Antimicrobienele pe bază de bismut și argint sunt singurele elemente utilizate în unele intervenții clinice. Astfel, bismutul este administrat concomitent cu alte antibiotice pentru tratamentul infecțiilor cu *Helicobacter pylori* [143], iar xeroformul, tribromofenatbismut(III), este utilizat ca antimicrobian topic [34]. Argintul este, de asemenea, utilizat într-o varietate de forme pentru tratamentul rănilor și managementul infecțiilor. Sulfadiazina de argint se aplică fie ca cremă, fie ca soluție apoasă pentru tratamentul topic în cazul arsurilor [73]. Este regretabilă utilizarea la un nivel destul de scăzut a compușilor metalici, deoarece varietatea uriașă de modele structurale tridimensionale disponibile prin aplicarea chimiei coordinative a metalelor poate oferi soluții atrăgătoare pentru tratamentul infecțiilor rezistente. O analiză recentă a arătat că >75% din toate moleculele organice convenționale au o formă predominant 1D sau 2D. Compușii coordinativi cu structură 3D sunt preferențiale în calitate de potențiali agenți terapeutici, deoarece forma moleculară este unul dintre cei mai importanți factori în recunoașterea medicamentului de către biomolecule [147]. De asemenea, complexe metalice se caracterizează prin moduri diverse și chiar unice de acțiune: schimbul sau eliberarea liganzilor,

generarea speciilor reactive de oxigen, activarea redox și generarea catalitică a speciilor toxice sau epuizarea substraturilor esențiale [73, 142].

Compușii coordinativi ai Cu(II) care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide au demonstrat efecte antibacteriene față de mai multe tulpini de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* ATCC 25931 și *Salmonella enterica* ГИСК 03/03 y. Din această categorie de compuși chimici mulți au manifestat efecte mai pronunțate comparativ cu substanța de referință furacilina [7]. Compușii coordinativi ai Cu(II) din alte grupuri, de exemplu cei cu 4-(dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-formilpiridinei, sau cei cu n-piridin-2-iltiosemicarbazona 2-piridincarboxi-aldehidă au demonstrat efecte antibacteriene selective, doar față de unele dintre tulpinile de bacterii patogene. Unul dintre mecanismele de acțiune ale acestor compuși față de microorganismele patogene constă în crearea unei stări de stres oxidativ pronunțat, exprimat prin scăderea semnificativă a capacității antioxidante totale [7, 134].

Tiosemicarbazonele au o capacitate excelentă de a chela cu o gamă largă de ioni metalici relevanți din punct de vedere biologic, astfel că modul lor de acțiune implică întotdeauna interacțiunea cu ionii metalici. Complexarea acestor tiosemicarbazone multi-dentate la ionii metalici ar putea avea ca rezultat complecși metalici cu activități biologice îmbunătățite și să le modifice modurile de acțiune. Tiosemicarbazone, bis(thiosemicarbazone) și complexele lor metalice sunt testați atât ca substanțe antibacteriene, cât și ca potențiali agenți antifungici. Rezultatele obținute de numeroase grupuri de cercetători arată, că complecșii metalici sunt de obicei mai activi decât liganzii necoordonati [29, 104]. Investigațiile au arătat că complexele metalelor bivalente Cu(II), Ni(II), Co (II) și Zn (II) cu saliciliden tiosemicarbazone posedă activitate antibacteriană și antifungică [31, 51, 52, 163, 208]. De asemenea, compuși tiosemicarbazone cu metale trivalente (Co (III), Fe (III), Cr (III), Bi(III)) posedă activitate antimicrobiană și antiproliferativă [18, 164, 208].

1.3.2. Compuși naturali de perspectivă pentru utilizare în calitate de antibiotice

Produsele naturale joacă un rol predominant în dezvoltarea de noi agenți terapeutici [154]. Acestea sunt sintetizate de către reprezentanții tuturor grupurilor sistematice de organisme vii ca răspuns la provocările mediului în care se dezvoltă și sunt destinate asigurării unei protecții eficiente contra altor entități vii sau a unui succes în lupta concurentă pentru resurse. Numeroși agenți antimicrobieni naturali sunt sintetizați în celulele vegetale, animale și microbiene. În majoritatea cazurilor efectele produselor naturale sunt determinate de diferite principii active, metaboliți secundari sau fitochimicale precum alcaloizii, taninurile, terpenoidlee, uleiurile esențiale, flavonoidele, lectinele, celulele fagocitare și mulți alți constituenți organici. Activitatea

antimicrobiană a complexelor naturale rezultă frecvent din activitatea câtorva componente individuale, care acționează în energie cooperantă, iar impactul clinic este asigurat de efectele directe asupra microorganismelor patogene [182].

Printre cei mai cunoscuți și recunoscuți producători de substanțe cu efecte antibiotice sunt actinobacteriile, care sintetizează aproximativ două treimi din toate antibioticele de origine naturală utilizate în prezent în medicină, practica veterinară și agricultură. Majoritatea acestor molecule provin din genul *Streptomyces* [105]. Cu toate că acest grup de microorganisme este destul de intens studiat în scopul evidențierii de noi compuși cu proprietăți antimicrobiene, actinobacteriile sunt o sursă inepuizabilă în acest sens. În ultimul deceniu au fost descoperite și înregistrare substanțe naturale noi produse de actinobacterii în calitate de produși secundari, și care deja au fost recunoscute pentru proprietățile lor. Arenimicina C, Cromopeptida lactona RSP 01, Kocurina, Macrolactinele A1 și B1, Chaxamicina D, precum și Antracimicina obținute din actinobacterii sunt considerate cei mai eficienți compuși cu activitate antibacteriană [105].

Printre compușii naturali, inspirați de natură, peptidele antimicrobiene sunt unele dintre cele mai de perspectivă datorită potențialului lor clinic. În mod normal, peptidele antimicrobiene sunt prezente în toate formele celulare de viață, asigurând funcționarea sistemului imunitar. Fiind determinate genetic, acestea asigură imunitatea înăscută. Datorită caracterului lor conservativ, peptidele antimicrobiene au o predispoziție limitată la dezvoltarea formelor de rezistență față de acțiunea lor [45]. În plus, modificările chimice ale scheletului peptidic pot fi utilizate pentru a îmbunătăți activitatea și stabilitatea biologică a acestor molecule importante, precum și pentru a reduce toxicitatea lor.

În natură există o imensitate de peptide antimicrobiene, care diferă semnificativ unele de altele. Cu toate acestea, ele se deosebesc esențial de antibioticele tradiționale și au unele caracteristici comune, cum ar fi structura, alcătuită din mai puțin de 100 de aminoacizi, inclusiv în mod obligator reziduuri cu sarcini pozitive mai pronunțate, cum ar fi lizina, arginina și histidina, sau prezența unui număr mare (de peste jumătate din compus) a reziduurilor hidrofobe [45]. De asemenea, mecanismul de acțiune antimicrobiană a moleculelor din acest grup este realizat printr-o acțiune directă asupra membranei celulare microbiene [181]. Datorită acestei particularități, peptidele antimicrobiene au acțiune pronunțată atât asupra bacteriilor sensibile, cât și a celor rezistente la antibiotice. Deoarece peptidele antimicrobiene vizează membrana celulară, nu există nici o suprapunere în mecanismul lor de acțiune și nu se observă rezistență încrucișată, astfel acestea sunt o soluție în cazul microorganismelor multirezistente la antibiotice [45, 76].

În prezent, există zece antimicrobiene pe bază de peptide disponibile comercial (Bacitracina, dalbavancina, daptomycina, colistina, gramicidina D, oritavancina, Polimixina B, Teicoplanina, Talavancina și Vancomicina). Similar cu multe dintre antibioticele tradiționale,

șapte dintre acești compuși activi au fost izolați din speciile bacteriene *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Streptomyces roseosporus*, *Actinoplanes teichomyceticus*, *Amycolatopsis orientalis* [28, 77, 81, 121, 156, 157, 159, 166, 170, 207]. Trei dintre aceste antibiotice, și anume Dalbavancina, Telavancina și Oritavancina sunt derivați semisintetici ai Teicoplaninei și Vancomicinei [81, 121, 180]. Toate aceste antibiotice pe bază de peptide acționează asupra membranei celulare bacteriene, fie direct (liza membranei), fie indirect (inhibarea sintezei peretelui celular). Cu toate că peptidele antimicrobiene sunt considerate stabile la dezvoltarea rezistenței, în ultimul timp totuși sunt tot mai multe dovezi despre apariția tulpinilor clinice rezistente la acestea. Prima informație de acest gen a fost publicată în revista *Lancet Infectious Disease* la mijlocul lunii noiembrie 2015 și se referea la peptidele colistinice, aplicate ca ultimă soluție, despre care s-a aflat, că , au un determinant de rezistență cunoscut sub numele de *mcr-1* care apare în tulpinile clinice de agenți infecțioși [130]. Exemplu poate servi cazul Vancomicinei, care este un antibiotic de ultimă instanță pentru tratamentul infecțiilor severe cauzate de bacterii Gram pozitive, cum ar fi speciile de *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* și *Clostridioides difficile*. Vancomicina a fost mult timp considerată imună la rezistență datorită activității sale bactericide bazate pe legarea la nivelul peretelui celular și nu la o proteină țintă, așa cum este cazul majorității antibioticelor. Cu toate acestea, au fost descoperite două mecanisme complexe multienzimatic de rezistență, care sunt acum diseminate larg printre speciile patogene, ceea ce amenință eficiența clinică a vancomicinei [198].

Plantele sunt surse inepuizabile de substanțe cu activitate biologică înaltă, inclusiv cu proprietăți antimicrobiene. Din imensitatea de molecule active de origine vegetală, ne vom referi în special la un grup de substanțe de importanță pentru teza de doctorat, și anume, la taninuri. Taninurile prezintă un amestec de compuși cu o structură chimică complexă, polifenolică, care cuprinde multe grupări hidroxil fenolice, dar și grupări carboxilice, cu proprietăți astringente. Taninurile sunt produse practic în toate organele și țesuturile și sunt de două feluri: galice și catehice. Taninuri catehice sau condensate sunt nehidrolizabile și au la bază nucleul de 2 fenil benzopiran (3 flavanol). Taninurile galice sunt hidrolizabile și sunt esteri ai acidului galic sau ai acidului hexahidroxidifenic și diferite oze (de exemplu glucoza). Taninurile sunt capabile să formeze legături stabile cu proteinele de diferit tip. Se cunoaște că taninurile au capacitatea de a inactiva adevăratele microbicide, enzimele din diferite clase, proteinele de transport ale membranei celulare ceea ce determină în mare măsură activitatea lor antimicrobiană [182]. Taninurile, de rând cu alți polifenoli, prezintă o activitate antibacteriană semnificativă împotriva bacteriilor Gram - pozitive rezistente și nerezistente la valori scăzute ale CMI, în intervalul de $\mu\text{g/mL}$. Mecanismul lor de acțiune este destul de divers, vizând peretele celular, stratul lipidic al membranelor, receptorii membranari și canalele ionice, metabolismul bacteriilor și formarea biofilmelor [21]. Sa

dovedit că acidul tanic are proprietăți de modulare a efluxului la tulpinile de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină. Sa demonstrat că administrarea acidului tanic acționează ca o țintă alternativă pentru bacterii și promovează inhibarea rezistenței pompei de eflux și liza celulară [117].

Taninurile extrase din semințele de *Euphoria longana*, fructele *Terminalia chebula* și frunzele de *Terminalia macroptera* au prezentat afinitate de legare la enzima ADN-girază *Mycobacterium*, și deci un efect inhibitor semnificativ asupra ADN-girazei rezistente la chinolone [109]. Taninurile din scoarță de *Psidium guajava* prezintă o activitate antimicrobiană pronunțată împotriva diversilor agenți patogeni, declanșând fagocitoza celulară și activitate antiinfecțioasă. Extractul taninic inhibă creșterea bacteriilor, iar taninurile se leagă de peretele celular bacterian, modificând permeabilitatea și permițând accesul proteazelor în interiorul celulelor patogenilor [192]. Creșterea bacteriilor precum *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* și *Serratia marcescens* este inhibată de taninurile hidrosolubile extrase din scoarța de *Acacia mearnsii* [161]. Taninurile hidrolizabile extrase din castan a fost testat pentru a regla proliferarea *Clostridium perfringens* în intestin. Rezultatele au arătat că, chiar și la concentrații mici, taninurile de castan au un efect foarte pronunțat în controlul enteritei necrotice prin reducerea semnificativă a proliferării *Clostridium perfringens* [201].

Florotaninurile, un grup important de compuși polifenolici derivați din alge, sunt considerați agenți antibacterieni puternici atât în cazul aplicării lor independente, cât și în combinație cu medicamente antibacteriene disponibile comercial. Acești compuși sunt foarte eficienți în combaterea biofilmelor bacteriene, deoarece pătrund în peretele celular bacterian prin schimbarea formei membranei celulare și provocând moartea celulei. Deteriorarea permeabilității peretelui celular bacterian provocată de florotaninuri, duce la scurgeri de protoni prin membrana celulară, astfel încât modificări structurale duc la moartea celulelor bacteriene. În plus, florotaninurile au capacitatea de a inhiba reproducerea bacteriilor. Activitatea antibacteriană florotaninurilor mai este atribuită capacității lor de a bloca fosforilarea oxidativă, precum și capacității lor de a se atașa de proteinele bacteriene, provocând liza celulară [177]. Mai multe investigații au constatat că florotaninurile derivate din algele brune au o activitate antibacteriană mai puternică decât antibioticele tradiționale împotriva speciilor de *Klebsiella*, *Bacillus cereus* și *Pseudomonas aeruginosa* [17, 167, 177].

O materie primă adecvată pentru obținerea taninurilor condensate o constituie semințele de struguri, din care se obține un amestec complex de oligomeri catecol și epicatecol. Taninurile din semințe de struguri au fost denumite enotaninuri. Compoziția lor variază de la monomeri la decameri de catechină sau epicatechină. Lanțul polimeric se formează prin condensarea grupărilor funcționale la atomul de carbon C₄ în ciclul C și atomul de carbon C₈ în ciclul A. Semințele de

struguri constituie cea mai potrivită sursă de taninuri în Republica Moldova. Conținutul de enotaninuri din semințele de struguri depinde de soiul de struguri, precum și de zonele geografice de cultivare și este între 3,1 și 14,1 % din masa de semințe uscate. A fost demonstrată activitatea antimicrobiană și antifungică atât a enotaninurilor condensate, cât și a derivatelor lor hidrosolubile obținute prin oxidarea formelor inițiale [12].

O sursă importantă de substanțe cu activitate biologică înaltă sunt cianobacteriile – unele dintre cele mai vechi organisme fotosintezatoare de pe Pământ. Se știe că cianobacteriile produc mai mulți metaboliți secundari care posedă activitate antimicrobiană împotriva bacteriilor Gram- și Gram+, cum ar fi policetidele, peptidele, alcaloizii, terpenele, posifenolii ș.a. [48, 62, 194]. Primul antibiotic policetidic izolat din cianobacteria *Lyngbya majuscula* este malingolidă care inhibă creșterea mai multor tulpini patogene umane *Streptococcus pyogenes* și *Staphylococcus aureus*. Majoritatea antibioticelor policetide au fost izolate din speciile de Nostoc, inclusiv carbamidociclofani, care prezintă valori ale concentrației minime inhibitorii în interval nanomolar față de *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină, dar și față de stafilococi rezistenți la metilicilină și vancomicină și *Mycobacterium tuberculosis* [48, 180].

Peptidele ciclice sunt cei mai abundenți metaboliți secundari cu activitatea biologică ai cianobacteriilor printre acestea sunt și cianobactrinele. Unele dintre acestea posedă activitate antibacteriană, de exemplu kawaguchipectinele A și B, izolate din *Microcystis aeruginosa* NIES-88, active față de *Staphylococcus aureus*, precum peptide nonribozomale (NRP), pitipeptolidele A, B, C, E și F active împotriva *Mycobacterium tuberculosis* [48].

Majoritatea alcaloizilor antibacterieni izolați din cianobacterii sunt compuși care conțin indol. Cea mai reprezentativă familie de alcaloizi indolici, cu până la 80 de membri, este cea a compușilor de tip hapalindol, inclusiv hapalindolii, hapalonamidlee, ambiguinele, fischerindolele, fischerellinele și fischambuiginele. Acești compuși naturali sunt produse de mai multe genuri de cianobacterii și posedă o structură de bază similară compusă dintr-un fragment indol și o unitate de izopren ciclizat, precum și un substituent - izocianida. Majoritatea compușilor de tip hapalindol posedă activitate puternică împotriva bacteriilor Gram + și Gram –. Printre mecanismele de acțiune se numără inhibarea ARN polimerazei bacteriene modularea activității canalelor de sodiu și inhibare proliferării celulelor T ale gazdei [48, 53]. Au fost, de asemenea, identificați și câțiva terpeni ai cianobacteriilor, care posedă activitate antibacteriană. Diterpenoidul noscomin a fost izolat din cianobacteria *Nostoc commune* și este activ împotriva *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* și *Escherichia coli*. Terpenoizii scitoscalarol și cibastacinele A și B, sesterterpene care conțin guanidiniu sau un grup guanidino, au fost izolați din *Scytonema* și, respectiv, *Nostoc*. Aceste produse naturale posedă valori MIC în intervalul micromolar față de bacteriile Gram +, iar scitoscalarolul este activ și față de *Escherichia coli* [46, 48, 158]. Polifenolii cianobacterieni, în

special cei halogenați de asemenea posedă activitate antimicrobiană. Compușii polifenolici clorurați, izolați din *Fischerella ambigua* și polibromurații izolați din cianobacteria *Leptolyngbya crossbyana* prezintă activitate puternică împotriva mai multor tulpini Gram +, inclusiv contra *Staphylococcus aureus* rezistent la metilclindamicină [48].

Cianobacteriile pot produce acizi grași nesaturați, inclusiv acid γ -linolenic, acid eicosapentaenoic, acid hexadecatrienoic, acid docosahexaenoic, acid palmitoleic, acid lauric, acid oleic, acid arahidonic ș.a. care manifestă activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* și *Staphylococcus aureus*. Capacitatea acizilor grași de a inhiba creșterea bacteriilor depinde de gradul lor de nesaturare și lungimea catenei. Un acid gras cu mai mult de 10 atomi de carbon determină liza protoplastelor bacteriene. Cu toate acestea, acizii grași nesaturați vizează structurile membranelor, ceea ce trage după sine nu numai liza bacteriană directă, dar și dereglarea roceselor ce au loc cu implicarea lanțurilor transportoare de [189].

Problema majoră în cazul metaboliților cianobacterieni cu activitate antimicrobiană constă în toxicitatea lor față de alte organisme, afară de microorganismele patogene. Într-un studiu bibliografic realizat de Demay și coautorii se arată, că dintre cele 43 de molecule antibacteriene izolate din cianobacterii, 22 sunt citotoxice, 16 prezintă activitate letală față de nevertebratelor mici și doar trei dintre ele - eucapsitrionă, molecule asemănătoare kulolidei și acidul abietic - pot avea activitate antimicrobiană specifică și nici o activitate împotriva altor organisme [62]. Eucapsitrionul și moleculele asemănătoare kulolidei prezintă activitate antibacteriană față de *Mycobacterium tuberculosis*. Eucapsitrionul este o moleculă derivată de antrachinonă izolată din cianobacteria *Eucapsis* sp. Această familie de compuși fenolici este binecunoscută în plante și în unele microorganisme și a demonstrat o gamă largă de bioactivități, inclusiv proprietăți antimicrobiene [62].

Compușii antimicrobieni sau antibioticele derivate din cianobacterii sunt promițători și pot fi utilizați în locul antibioticelor convenționale. În plus, diversitatea chimică a metaboliților secundari obținuți din cianobacterii îi poziționează pe acesteia ca o nouă clasă de medicamente [213]. În această ordine de idei, cianobacteria *Arthrospira platensis*, cunoscută ca Spirulina, este o sursă valoroasă de compuși cu activitate biologică înaltă. Pe lângă valoarea nutritivă înaltă a Spirulinei, numeroase studii au oferit dovezi solide pentru potențialele sale aplicații terapeutice. Spirulina conține antioxidanți naturali distinctivi, cum ar fi polifenolii, carotenoizii și ficocianina. Această cianobacterie nu posedă potențial toxic, este aprobată pentru izul animal și uman, este bine studiată și crescută în condiții industriale în multiple locații geografice. Chiar și suspensia cianobacteriei, fără extragere și purificare a componentelor active, oate demonstra atractivitate în calitate de antimicrobian față de anumite specii patogene. Suspensia de microalge a fost testată

față de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Candida albicans*. Rezultatul arată că suspensia de Spirulina a prezentat o activitate joasă față de *C. albicans* și *E. coli*, dar nici o activitate antimicrobiană împotriva *S. aureus* [179].

Extracțele de diferită natură din biomasa de Spirulină prezintă activitate antimicrobiană variată. Astfel, extracțele hidrice din biomasa de spirulină au arătat activitate maximă împotriva *P. aeruginosa*, extractul metanolic - împotriva *E. coli*, iar extractul în cloroform - față de ambii agenți patogeni bacterieni. Cu toate acestea, majoritatea datelor disponibile arată, că bacteriile Gram-pozitive (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* și *Listeria monocytogenes*) prezintă o sensibilitate mai mare la extracțele de Spirulina decât bacteriile Gram-negative. Extractul metanolic de spirulina are o activitate antimicrobiană mai mare decât extracțele obținute cu alți solvenți, cu zone de inhibiție variind de la 17 la 22 mm pentru o concentrație de 10 mg/mL. Valoarea CMI față de microorganismele testate pentru extractul metanolic de Spirulina a fost mai joasă (1–2 mg/mL) în comparație cu alte tipuri de extracțe [14].

Extracțele din spirulină conțin multiple substanțe, care pot contribui la manifestarea efectului antibacterian. Contribuția polifenolilor în acest efect a fost studiată de Martelli și coautorii. Au fost luate în considerare efectele antimicrobiene ale extracțelor din Spirulină față de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus*. În general, extracțele au arătat o activitate antimicrobiană bună *in vitro* față de toate microorganismele testate, în special față de *L. monocytogenes*, efectul fiind persistent în timp. În baza cuantificării conținutului de fenoli s-a ajuns la concluzia, că prezența compușilor fenolici ar putea fi asociată cu activitatea antimicrobiană, dar fenolii nu sunt unicele componente ale acestei activități, lipsind corelarea între conținutul de fenoli și efectul antimicrobian [138]. O confirmare a rolului fenolilor în activitatea antibacteriană a extractului metanolic de spirulină a fost adus de către Alshuniaber și coautorii. Aceștia au obținut un extract metanolic care conținea o cantitate mare de polifenoli care prezintă efecte antimicrobiene cu spectru larg împotriva agenților patogeni bacterieni rezistenți la medicamente. Metaboliți secundari potențiali, cum ar fi benzofenona, dihidro-metil-fenilacridina, acid carbanilic, dinitrobenzoat, propandiamină, izochinolină, piperidină, oxazolidină și pirolidină, identificați în acest extract sunt activi împotriva agenților patogeni gram-pozitivi și gram-negativi. Acest rezultat sugerează că totuși, compușii fenolici din Spirulina oferă o sursă naturală și durabilă de antibiotici naturali [19].

Rezistența la antibiotice este o problemă clinică la nivel mondial, care se amplifică pe an ce trece. Din cauza unei dezvoltări limitate a medicamentelor antimicrobiene noi, sau a eficienței reduse *in vivo* a celor dezvoltate, terapia combinativă, care presupune combinarea substanțelor din diferite clase chimice, dar și din diferite surse în cazul preparatelor naturale, este o strategie de perspectivă pentru combaterea patogenilor multirezistenți. Combinațiile antibacteriene pot

îmbunătăți eficacitatea antibioticelor și pot suprima rezistența antibacteriană prin activități independente, sinergice sau chiar antagoniste [224]. În opinia noastră pentru a asigura progrese semnificative în domeniul antimicrobienele eficiente în condițiile unei rezistențe sporite a patogenilor la antibiotice, este necesar de a realiza cercetări în domeniul sintezei direcționate de noi substanțe chimice, în direcția descoperirii de noi produse naturale cu efecte antimicrobine, dar și în elaborarea de combinații multifuncționale, componentele cărora sunt orientate spre mai multe ținte concomitent, asigurând astfel succesul în combaterea microorganismelor multirezistente .

1.4. Concluzii la capitolul 1

Studiul situației în domeniu permite evidențierea unei situații dramatice cauzată de dezvoltarea rezistenței la antibiotice, care este un proces continuu. Acest fenomen afectează umanitatea, creează o situație de criză în cercetare și devine o problemă nu numai medicală dar și socială și politică. Rezistența la antibiotice are ca rezultat reducerea gradului de eficacitate a medicamentelor antibacteriene și antifungice, ceea ce face ca tratamentul pacienților să fie complicat, costisitor sau în anumite cazuri, chiar imposibil. Dezvoltarea rapidă a mecanismelor de rezistență la antibiotice de către microorganismele patogene a fost și rămâne fatală pentru milioane de oameni din întreaga lume. Cauza majoră a mecanismelor de rezistență este utilizarea excesivă a preparatelor cu efecte antimicrobiene.

Dezvoltarea de noi medicamente antimicrobiene este considerată drept o prioritate primordială, dar și o necesitate stringentă. Evoluțiile recente se concentrează pe două direcții de bază: sinteza chimică a substanțelor cu proprietăți predeterminate și screening-ul produselor naturale. Există și strategii, care implică aplicarea antibioticelor deja cunoscute în formule hibride, fie cu un adjuvant, fie cu o moleculă chimică cu proprietăți diferite de cele ale antibioticului, fie cu alt antibiotic natural sau sintetic. Printre compușii chimici un rol important le revine tiosemicarbazonelor multe dintre care prezintă o anumită activitate biologică împotriva unei game largi de microorganisme patogene. Structura tiosemicarbazonelor le face pe acestea liganzi donatori semnificativi și le atribuie o capacitate excelentă de a chela cu o gamă largă de ioni metalici relevanți din punct de vedere biologic, formând complexi metalici cu activități biologice îmbunătățite și moduri de acțiune modificate.

Numeroși agenți antimicrobieni naturali sunt sintetizați în celulele vegetale, animale și microbiene. În majoritatea cazurilor efectele produselor naturale sunt determinate de diferite principii active, metaboliți secundari sau fitochimicale. Activitatea antimicrobiană a complexelor naturale rezultă frecvent din activitatea câtorva componente individuale, care acționează în energie cooperantă, iar impactul clinic este asigurat de efectele directe asupra microorganismelor patogene Taninurile - compuși cu o structură chimică complexă, polifenolică, care cuprinde multe

grupări hidroxil fenolice, dar și grupări carboxilice, sunt produse practic în toate organele și țesuturile și sunt de două feluri: galice și catehice. Taninurile sunt capabile să formeze legături stabile cu proteinele de diferit tip, au capacitatea de a inactiva adezinele microbiene, enzimele din diferite clase, proteinele de transport ale membranei celulare ceea ce determină în mare măsură activitatea lor antimicrobiană.

O sursă importantă de substanțe cu activitate biologică înaltă sunt cianobacteriile. Se știe că cianobacteriile produc mai mulți metaboliți secundari care posedă activitate antimicrobiană. Cianobacteria *Arthrospira platensis* se caracterizează prin valoarea nutritivă înaltă și conținut de substanțe bioactive, inclusiv cu proprietăți antimicrobine. În lipsa unui potențial toxic în raport cu omul, această cianobacterie este o sursă valoroasă de preparate antimicrobiene. Pentru a asigura progrese semnificative în domeniul elaborării substanțelor cu efecte antimicrobiene în condițiile unei rezistențe sporite a patogenilor la antibiotice, este necesar de a realiza cercetări în domeniul sintezei direcționate de noi substanțe chimice, în direcția descoperirii de noi produse naturale cu efecte antimicrobiene, dar și în elaborarea de combinații multifuncționale, componentele cărora sunt orientate spre mai multe ținte concomitent, asigurând astfel succesul în combaterea microorganismelor multirezistente.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările incluse în prezenta teză de doctorat au fost realizate în perioada de timp 2012 – 2022 în cadrul Disciplinei microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Laboratorul microbiologic al Agenției Naționale de Sănătate Publică, precum și în Laboratorul Ficobiotehnologie din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. Conducător științific: Rudic Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova (specialitatea 313.02 Microbiologie, virusologie medicală) și consultant științific Gulea Aurelian, dr. hab. șt. chim., prof. univ., acad., Om Emerit al Republicii Moldova (specialitatea 141.01. Chimie anorganică; 141.02; Chimie coordinativă).

Metodologia cercetării a fost aprobată de către Comitetul de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, avizul nr. 4 din 06 noiembrie 2013.

Lucrarea include un studiu *in vitro*, realizat pe culturi microbiene de referință cu aplicarea metodelor microbiologice clasice și a metodelor contemporane de investigații biochimice.

2.1. Obiectele de studiu

Testele *in vitro* au fost efectuate cu utilizarea tulpinilor de referință din colecțiile ATCC (American Type Culture Collection) 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 - Коллекция Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича), care conform pașapoartelor eliberate de colecțiile respective sunt destinate pentru testarea sensibilității la antibiotice și alte substanțe de sinteză chimică ori naturale: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.

În calitate de substanțe cu efecte antimicrobiene au fost testați compușii coordinați ai Cu (II); Co(III) și Ni (II) sintetizați și caracterizați la catedra Chimie anorganică (Universitatea de Stat din Moldova), Institutul de Chimie și Institutul de Fizică aplicată. Precursorii de sinteză utilizați au fost de puritate înaltă, procurați de la Sigma-Aldrich.

În continuare este dată caracterizarea tulpinilor utilizate în studiu și substanțele, activitatea cătora a fost testată în raport cu tulpinile respective.

2.1.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria; Filumul Bacillota; Clasa Bacilli; Ordinul Bacillales; Familia Staphylococcaceae; Genul *Staphylococcus*.

Denumirea completă conform pașaportului de colecție al acestei tulpini este *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™). Tulpina a fost depozitată în scopul utilizării ei ulterioare pentru testarea produselor lactate și a mediilor nutritive, inclusiv a mediului agarizat Mueller-Hinton, precum și pentru controlul produselor Autobac, Abbott, API. Aceasta este una dintre tulpinile de referință utilizată în cadrul testului de sensibilitate la antibiotice și alte substanțe cu efect antimicrobian.

Examenul microscopic al culturii de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 evidențiază prezența cocilor cu diametrul de 0,5-1,5 μm, dispuși în ciorchini de formă neregulată, Gram+. Celulele sunt imobile, nu formează spori, sunt lipsite de capsulă. Sunt aerobe, dar se pot dezvolta și în condiții facultativ anaerobe. Sunt mezofile, dezvoltându-se în condiții de temperaturi de la 10 la 40°C, cu un optim pronunțat la 37°C. Prezintă reacție pozitivă la catalază. Formează colonii de formă rotundă, elevate convex. Culoarea coloniilor este galbe-aurie. Pe mediul nutritiv geloză cu sânge coloniile formate sunt înconjurată de o zonă transparentă de hemoliză completă. Sunt tolerante la salinitate înaltă. Produc coagulază, dezoxiribonuclează, catalază, lipază – enzime cu rol de promovare a virulenței și difuziunii infecției în țesuturi.

2.1.2. *Bacillus cereus* FIICK 8035

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria; Filumul Bacillota; Clasa Bacilli; Ordinul Bacillales; Familia Bacillaceae; Genul *Bacillus*.

Tulpina *Bacillus cereus* 8035 conform pașaportului de colecție se utilizează pentru testarea mediilor nutritive, precum și în calitate de material de referință pentru testarea eficienței antibioticelor și altor substanțe antimicrobiene.

Examenul microscopic al culturii scoate în evidență celule în formă de tijă, cu lățimea de 1,0 μm și lungimea de 3-4 μm, care conțin endospori, ce nu deformează celula. Pe medii nutritive dense formează colonii rigide, opace, plate, rugoase, ușor concave, mate, cu diametrul mediu de 0,3 cm. Marginea coloniilor este ondulată. *Bacillus cereus* 8035 este o cultură facultativ aerobă, cu capacitate mare de adaptare la condiții de mediu diverse, mezofilă, care se dezvoltă la temperaturi între 20°C și 40°C, fără un optim bine definit. Crește la un nivel înalt al salinității (până la 6,5% NaCl). Produce catalază și lecitinază.

2.1.3. *Escherichia coli* ATCC 25922

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria; Filumul Pseudomonada; Clasa Gammaproteobacteria; Ordinul Enterobacterales; Familia Enterobacteriaceae; Genul *Escherichia*.

Tulpina a fost depozitată în scopul utilizării ei ulterioare pentru testarea produselor lactate și a mediilor nutritive, inclusiv a mediului agarizat Mueller-Hinton, precum și pentru controlul produselor Autobac, Abbott, API, Difco, IDS, BBL, Microscan, Micromedia, Roche Diagnostics ș.a. Aceasta este una dintre tulpinile de referință utilizată în cadrul testului de sensibilitate la antibiotice și alte substanțe cu efect antimicrobian.

Examenul microscopic al culturii evidențiază prezența celulelor în formă de bastonașe Gram -. Forma bastonașelor este dreaptă ori puțin incurbată. Lungimea maximală este de 3 μm, iar lățimea – de 1 μm. Nu formează spori, sunt lipsite de capsulă. Capetele bastonașelor sunt rotunjite. Se caracterizează prin cerințe minime față de mediul nutritiv. Pe medii solide formează colonii lucioase (de tip S). Coloniile sunt specifice în dependență de mediul utilizat. Astfel, pe mediu Endo, cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922 formează colonii de tip S, umede și cremoase, cu profil bombat și diametrul de 0,2 cm, de culoare roșie, cu luciu metalic. Pe medii lactozate formează colonii lactozo-pozitive. Este o cultură facultativ anaerobă, mezofilă cu optimul la 37°C. Fermentează glucoza, cu producerea ulterioară de acizi grași. Produce indol. Folosește acetatul în calitate de sursă unică de carbon.

2.1.4. *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria; Filumul Pseudomonada; Clasa Gammaproteobacteria; Ordinul Enterobacterales; Familia Enterobacteriaceae; Genul *Salmonella*.

Denumirea deplină a tulpinii este *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar abony ГИСК 03/03y. Sinonim și denumirea veche a acestei tulpini este *Salmonella abony* ГИСК 03/03y. Tulpina a fost obținută din Colecția Microorganismelor Patogene a Institutului de Stat de cercetări științifice în domeniul standardizării și controlului preparatelor medicale biologice în numele lui L.A. Tarasevici. Conform pașaportului de depozitare este o tulpină de referință care este utilizată în controlul gradului de contaminare microbiologică a produselor, precum și în procesul de monitorizare a infecțiilor intestinale emergente.

Examenul microscopic al culturii denotă că aceasta constă din celule în formă de bastonașe, Gram -, dotate cu flageli, care realizează metabolism de tip aerob. Pe mediu nutritiv selectiv SS-agar formează colonii de tip S, lucioase, umede, cremoase, cu diametrul de 0,2 cm. În centru coloniile sunt de culoare neagră, iar spre periferie devin practic incolore și transparente. Este o tulpină mezofilă cu optim de creștere la 37°C.

2.1.5. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria; Filumul Pseudomonada; Clasa Gammaproteobacteria; Ordinul Enterobacteriales; Familia Enterobacteriaceae; Genul *Klebsiella*. Examenul microscopic arată, că cultura conține din coco-bacili mici, cu dimensiunea de 0,5-0,8x 1.0-2,0 μm. Se colorează Gram -, nu prezintă motilitate și nu formează spori. Celulele sunt solitare, sau se poziționează câte două sau în conglomerat. Formează capsulă pronunțată. Pe mediu solid formează colonii elevate, în formă de cupolă, cu diametrul de 3-4 mm, acoperite de un strat mucozitar, de culoare albă-gri. Se caracterizează prin metabolism chemoorganoheterotrof, este facultativ anaerob. Este o tulpină mezofilă, fără un optim de temperatură pronunțat, dezvoltându-se practic identic la temperaturi de la 30 la 37°C.

2.1.6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Poziția sistematică: Domeniul Bacteria; Filumul Pseudomonada; Clasa Gammaproteobacteria; Ordinul Pseudomonadales; Familia Pseudomonadaceae; Genul *Pseudomonas*. Examenul microscopic al culturii evidențiază prezența celulelor în formă de bastonașe Gram -, mobile. Forma bastonașelor este dreaptă ori puțin incurbată. Lungimea maximală este de 1-5 μm, iar lățimea – de 0,5 - 1 μm. Nu formează spori, au capsulă bine pronunțată. Capetele bastonașelor sunt rotunjite. Pe medii solide formează colonii de trei tipuri – R, S și M. Produce pigmenți. Metabolismul este de tip hemoorganoheterotrof, aerob. Poate crește la temperaturi de până la 40°C, optimul fiind la 37°C.

2.1.7. *Candida albicans* ATCC 10231

Poziția sistematică: Regnul Fungi, Filumul Ascomycota, Clasa Saccharomycetes, Ordinul Saccharomycetales, Familia Saccharomycetaceae, Genul *Candida*, Specia *Candida albicans*. Organism bimorf, cele două forme – filamentoasă și levuriană - fiind determinate de condițiile de mediu. La temperaturi de până la 30°C *Candida albicans* crește în forma sa filamentoasă, iar la temperatura de 37°C „*in vitro*”, crește în forma sa levuriană. În forma de drojdie, celulele de *Candida albicans* variază în dimensiune de la 10 la 12 μm. Sporii (numiți clamidospori) se formează pe pseudohife și sunt foarte rezistenți la condițiile nefavorabile. La colorare se comportă ca microorganismele Gram pozitive. Pe mediul Sabouraud cu geloză formează colonii untoase, bombate, cu margini netede, lucioase.

2.1.8. Compuși coordinativi

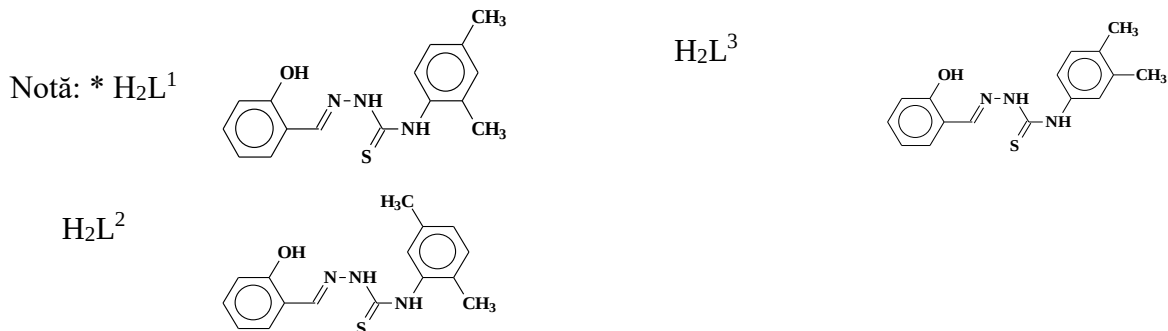
Compușii chimici testați pe durata realizării acestei teze au fost sintetizați la Catedra Chimie anorganică, Universitatea de Stat din Moldova, precum și la Institutul de Chimie. În total au fost testați 385 compuși coordinativi ai cuprului (II), cobaltului (III), nichelului (II), dar și a Zn(II), Fe(III). În teză sunt trecuți 47 dintre acești compuși, care conform screeningului primar au fost considerați de perspectivă pentru cercetare în calitate de substanțe cu efecte antimicrobiene. Compușii descriși în lucrare conțin în mare majoritate Cu(II), și un număr mai mic – Co(III) și Ni(II). În dependență de structură, proprietăți și modul de sinteză, compușii au fost grupați în mai multe categorii, după cum urmează:

a) *Tiosemicarbazonații Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotioamidă; N-(2,5-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotioamidă și N-(3,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotioamidă*

Denumirile și formulele acestor compuși sunt prezentați în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Denumirile și formulele compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(II) și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotioamidă*

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută*
1. CMSA 25	Clorură de bis[N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotioamido(1-)]-cobalt(III)	$\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$
2. CMSA 58	Clorură de bis[N-(3,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotioamido(1-)]-cobalt(III)	$\text{Co}(\text{HL}^3)_2\text{Cl C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$
3. CMSA 26	Cloro-[N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotioamido(1-)]-cupru	$\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClCu N}_3\text{OS}$
4. CMSA 27	[N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotioamido(2-)]aqua cupru	$\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O C}_{16}\text{H}_{17}\text{Cu N}_3\text{O}_2\text{S}$
5. CMSA 57	Cloro-[N-(3,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotioamido(1-)]-cupru	$\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{Cl C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClCu N}_3\text{OS}$
6. CMSA 59	Cloro-[N-(2,5-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotioamido(1-)]-nichel	$\text{Ni}(\text{HL}^2)\text{Cl C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNiN}_3\text{OS}$
7. CMSA 68	Cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbotioamido(1-)]-nichel (II)	$\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNiN}_3\text{OS}$



În rezultatul cercetărilor realizare cu acest grup de compuși a fost depus și obținut un brevet de invenție având ca obiect compusul CMSA 68 [3].

b) *Tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă*

Denumirile și formulele acestor compuși sunt prezentați în tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Denumirile și formulele compuşilor tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută*
1. NB 2	Nitrat de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il) metiliden]- N-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbonotioamidă) cupru(II)	$\text{Cu}(\text{HL})_2(\text{NO}_3)_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuN}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_2$
2. NB 6	Bromură de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbonotioamidă) cupru(II)	$\text{Cu}(\text{HL})_2\text{Br}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuBr}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$
3. NB 9	Clorură de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă)cupru(II)	$\text{Cu}(\text{HL})_2\text{Cl}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuCl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$
4. NB 10	Perclorat de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă)cupru(II)	$\text{Cu}(\text{HL})_2(\text{ClO}_4)_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuCl}_2\text{N}_8\text{O}_{14}\text{S}_2$
5. NB 13	Sulfat de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă)cupru(II)	$\text{Cu}(\text{HL})_2\text{SO}_4$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuN}_8\text{O}_{10}\text{S}_3$
6. NB 16	bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamido)nickel	NiL_2 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NiN}_8\text{O}_6\text{S}_2$
7. NB 19	Clorură de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă)nickel(II)	$\text{Ni}(\text{HL})_2\text{Cl}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NiCl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$

L* 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă

c) *Tiosemicarbazonații Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat*

Denumirile și formulele acestor compuși sunt prezentați în tabelul 2.3.

În rezultatul cercetărilor realizare cu acest grup de compuși a fost depus și obținut un brevet de invenție având ca obiect compusul TI 22 [2].

Tabelul 2.3. Denumirile și formulele compuşilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută*
1. TI 1	Cloro(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato) aquacupru	$\text{Cu(L)Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$
2. TI 2	Bromo(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato) aquacupru	$\text{Cu(L)Br} \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrCuN}_3\text{O}_2\text{S}$
3. TI 3	Nitratul de (metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)-diaquacupru(II)	$\text{Cu(L)NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{CuN}_4\text{O}_6\text{S}$
4. TI 4	Acetato(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru	$\text{Cu(L)(CH}_3\text{COO)}$ $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{CuN}_3\text{O}_3\text{S}$
5. TI 6	Bromură de bis(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cobalt(III)	$\text{Co(L)}_2\text{Br}$ $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{BrCoN}_6\text{O}_2\text{S}_2$
6. TI 7	Clorură de bis(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cobalt(III)	$\text{Co(L)}_2\text{Cl}$ $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{ClCoN}_6\text{O}_2\text{S}_2$
7. TI 9	Iodură de bis(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cobalt(III)	$\text{Co(L)}_2\text{I}$ $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{CoIN}_6\text{O}_2\text{S}_2$
8. TI 10	Nitratul de bis(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cobalt(III)	$\text{Co(L)}_2\text{NO}_3$ $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{CoN}_7\text{O}_5\text{S}_2$
9. TI 11	bis(metil- <i>N'</i> -(2-hidroxi-benziliden)- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)niche	Ni(L)_2 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{NiO}_2\text{S}_2$
10. TI 22	metil <i>N'</i> -[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metiliden]- <i>N</i> -prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OS}$

Notă: * L

metil *N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat

d) Tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbonotioamidă; 2-[(5-nitro-furan-2-il)metiliden]-*N*-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbonotioamidă; 2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă și 2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă

Tabelul 2.4. Denumirile și formulele compuşilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II)

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută*	
1. VGB 1	Hidratul de cloro(2-(2-hidroxibenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	Cu(HL ¹)Cl·H ₂ O C ₁₁ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	
2. VGB 2	Cloro(2-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metilidene]- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	Cu(HL ¹)Cl C ₁₅ H ₁₄ ClCuN ₃ OS	
3. VGB 10	Clorură de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă)cupru(II)	Cu(HL ²) ₂ Cl ₂ C ₁₈ H ₂₀ CuCl ₂ N ₈ O ₆ S ₂	
4. VGB 16	(2-(2-hidroxibenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido(2-))aquacupru	Cu(L ¹)H ₂ O C ₁₁ H ₁₃ CuN ₃ O ₂ S	
5. VGB 24	Nitratul de (2-(3,5-dibromo-2-hidroxibenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)aquacupru(II)	Cu(HL ³)NO ₃ ·H ₂ O C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₅ S	
6. VGB 26	Cloro(2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	Cu(HL ⁴)Cl C ₁₂ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	
7. VGB 28	Cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cupru	Cu(HL ⁴)Cl C ₁₁ H ₁₁ ClCuN ₄ O ₃ S	
8. VGB 23	Nitratul de bis(2-(3,5-dibromo-2-hidroxibenziliden)- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamido)cobalt(III)	Co(HL ³) ₂ NO ₃ C ₂₂ H ₂₀ Br ₄ CoN ₇ O ₅ S ₂	
Notă: * HL	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ OS	HL ³	C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ N ₃ OS
HL ²	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₃ S	HL ⁴	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S

e) Compuși hidrazonici ai cuprului (II) care conțin S-metil-β-N-(2-hidroxil-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazat.

Tabelul 2.5. Denumirile și formulele compuşilor hidrazonici ai Cu(II) cu S-metil-β-N-(2-hidroxil-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazat

Compusul	Denumirea chimică	Formula brută*
1.	Cloro-(S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbazato-N,O,S)-cupru(II)	[Cu(H ₂ L)Cl] H ₂ O
2.	Bromo-(S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbazato-N,O,S)-cupru(II) quinque etanol	[Cu(H ₂ L)Br] 0,5C ₂ H ₅ OH
3.	Aqua-(S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbazato-N,O,S)-cupru(II)	[Cu(H ₂ L) (H ₂ O)]
4.	Cloro-(S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbazato-N,O,S)-cupru(II) dimetilsulfoxidă	[Cu(H ₂ L)Cl] DMSO
5.	Catena-{Bromo-(S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbazato-N,O,S)- cupru(II) dimetilsulfoxidă}	[Cu(H ₂ L)Br] DMSO
6.	(S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbazato-N,O,S)-dimetilsulfoxidă cupru(II)	[Cu(HL)(DMSO)]
7.	(S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftiliden)ditiocarbazato-N,O,S)-dimetilformamidă cupru(II)	[Cu(HL)(DMF)]

Notă: * L C₁₃H₁₁N₃SO₃ CH₃OH

În rezultatul cercetărilor realizare cu acest grup de compuși a fost depus și obținut un brevet de invenție având ca obiecti cei 7 compuși din grup [6].

2.1.9. Preparatul BioR

Preparatul BioR este un preparat inovativ obținut printr-o tehnologie originală de extragere, fracționare și purificare a principiilor bioactive din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, produs de compania cu profil biotehnologic și farmaceutic Ficoteharm SRL [8].

BioR este un preparat natural care conține substanțe bioactive derivate din cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira*). Preparatul conține aminoacizi dispensabili și indispensabili (*arginina, fenilalanina, histidina, izoleucina, leucina, lizina, metionina, treonina, triptofanul, valina*, aceștea din urmă ne fiind sintetizați de organismul uman, solicitând astfel surse a lor din exterior) în stare liberă și combinați în peptide și proteine, formulă care asigură o biodisponibilitate foarte înaltă pentru organism, macro- și microelemente.

BioR este obținut pe cale biotehnologică printr-o tehnologie originală de extragere succesivă și purificare a lor din biomasa de *Spirulina* (*Arthrospira*) care, la rândul său se obține în cadrul unor procese de cultivare în condiții controlate și este în totalitate inofensivă, nu conține erbicide, toxine sau conservanți. Preparatul BioR este cunoscut pentru efectele sale terapeutice în diferite maladii, iar extractul hidroetanolic din biomasa de spirulină este intens studiat pentru multiplele sale efecte benefice pentru sănătatea omului [8, 187].

2.1.10. Extractul din spirulină

Extractul din spirulină a fost obținut în laboratorul Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie. Extractul din spirulina este un produs de origine vegetală ce constă dintr-o combinație complexă sinergică de componente biologice active (aminoacizi liberi, oligopeptide, protein, polizaharide sulfatate, fosfolipide și proteoglicani) extrase succesiv din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-11. *Arthrospira platensis* este o cianobacterie binecunoscută pentru proprietățile sale remarcabile. Fiind o sursă sigură de proteină ideală, acest obiect biotehnologic pune la dispoziția cercetătorilor din domeniul farmaceutic o serie de peptide antimicrobiene, dar și compuși din alte grupuri, cum ar fi fenolii și acizii grași specifici, care de asemenea, pot manifesta efecte antibacteriene și antifungice [19, 67].

2.1.11. Enotanina hidrosolubilă

Taninurile se utilizează în practica medicală ca substanțe cu acțiune astringentă, antibacteriană și antiinflamatoare locală. Acțiunea astringentă este legată de capacitatea lor de a se precipita cu formarea tanatului de proteină. Aplicat pe țesutul lezat taninurile formează o peliculă de albuminat, care acționează ca un protector mecanic. Soluțiile apoase de taninuri formează cu alcaloizii și glicozizii complexe insolubile cu mulți ioni de metale grele. De aceea, taninurile posedă o anumită valoare ca antidot chimic în intoxicații. De obicei, taninurile utilizate

în medicină sunt obținute din *Gallae turcicae*, *Rhus coriara*, *Cotinus coggygia* și *Rhus cotinus*, specii de plante, care practic nu se întâlnesc în Republica Moldova. Din acest motiv sursa sigură pentru obținerea taninurilor în Republica Moldova sunt semințe de struguri. Enotanina hidrosolubilă se obține printr-un procedeu de solubilizare oxidativă a enotaninei, inițial insolubile în apă, care, la rândul său, se obține din materie primă naturală – semințe de struguri, care reprezintă produse secundare ale industriei vinicole [1, 10-13]. Enotanina hidrosolubilă a fost obținută din semințele de struguri printr-un procedeu de solubilizare oxidativă a formei ei insolubile. Pentru cercetare substanța a fost oferită de academicianul Tudor Lupașcu.

2.2. Metode de cercetare

Pentru realizarea acestei lucrări au fost aplicate metode microbiologice de determinare a sensibilității culturilor microbiene la noii compuși chimici și de origine naturală, precum și la combinațiile dintre aceste două categorii de substanțe. De asemenea, au fost utilizate metode biochimice, care permit evidențierea unor modificări în procesul de eliberare a componentelor celulare în mediul înconjurător și de activitate a enzimelor în culturile microbiene supuse acțiunii noilor compuși.

2.2.1. Determinarea sensibilității microorganismelor la diferiți compuși antimicrobieni

În scopul determinării gradului de sensibilitate a microorganismelor la acțiunea compușilor antimicrobieni pe parcursul realizării acestei teze de doctorat au fost utilizate două metode de bază: metoda diluțiilor de serie (sau a diluțiilor succesive) și metoda de difuzie în strat de mediu agarizat. Unul dintre criteriile de bază prin care se realizează aprecierea cantitativă a activității antimicrobiene a diferitor compuși de sinteză, sau extrași din natură este concentrația minimă de inhibiție (CMI), care exprimă cantitatea minimă de substanță, ce provoacă inhibarea creșterii culturii microbiene pe medii lichide sau solide. Un alt criteriu cantitativ utilizat în microbiologie în acest scop este concentrația minimă bactericidă/fungicidă (CMB/CMF), care exprimă cantitatea minimă de substanță activă, care provoacă moartea microorganismului analizat.

Stabilirea CMI constă în determinarea experimentală a celei mai mici concentrații de substanță, care fiind adăugată la mediul nutritiv inhibă complet multiplicarea germenilor microbieni. Mediile cu conținut de agent de inhibiție este inoculat cu cultura bacteriană și supus incubării, după care se evaluează creșterea microorganismelor.

Metoda diluțiilor succesive (de serie) se realizează prin executarea următoarelor etape: prepararea mediilor nutritive, caracteristice tulpinilor bacteriene/fungice luate în studiu; pregătirea inoculului; inocularea culturii bacteriene/fungice; incubarea culturii bacteriene/fungice în condiții recomandate; citirea, analiza și interpretarea rezultatelor.

Prepararea mediilor nutritive. Pentru creșterea culturilor bacteriene a fost utilizat un mediu standard de fabricație industrială, și anume bulionul peptonat de 2% cu valoarea pH-ului de 7,0. Mediul nutritiv bulion peptonat se pregătește în strictă conformitate cu recomandările producătorului. Sterilizarea mediului preparat se face prin autoclavare. Repartizarea mediului steril în tuburile destinate evaluărilor cantitative se face imediat după autoclavare. Pentru *Candida albicans*, de asemenea, se utilizează mediul standard fabricat industrial Sabouraud Dextrose Agar (SDA), care se prepară conform indicațiilor de la producător.

Prepararea inoculumului. În scopul testării activității antibacteriene/antifungice se utilizează inoculum standardizat după numărul de unități formatoare de colonii (UFC). Concentrația inoculumului se aduce la o concentrație de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Această concentrație corespunde standardului de turbiditate de 0,5 McFarland. În scopul preparării concentrației necesare de microorganisme, acestea pot fi colectate de pe mediu solid sau din mediu lichid.

În cazul preparării inoculumului din cultură bacteriană/fungică de pe mediu solid este folosită cultura bacteriană/fungică cu vârsta de 24 ore care a crescut pe mediu solid în cutii Petri. În acest scop se prelevează materialul biologic din vârful a câtorva colonii izolate. Microorganismele colectate se transferă în bulion peptonat. Procedura se repetă până când concentrația microorganismelor în mediu corespunde exact standardului de turbiditate de 0,5 McFarland. Intervalul de timp dintre prepararea inoculumului și utilizarea lui este de maxim 15 minute.

În cazul preparării inoculumului din cultura bacteriană/fungică crescută pe mediu lichid, materialul bacterian se prelevează în cantități mici din colonii izolate, se introduce în mediu lichid nutritiv care se incubează în condiții specifice tulpinii bacteriene timp de cel mult 6 ore. Densitatea celulelor microbiene se ajustează la standardul de turbiditate de 0,5 McFarland prin diluare cu mediu nutritiv steril.

Prepararea standardului de turbiditate de 0.5 după McFarland se realizează cu utilizarea soluției de clorură de bariu și acidului sulfuric. Pentru aceasta la 0,5 mL soluție BaCl_2 de 0,048 M se adaugă 99,5 mL soluție H_2SO_4 de 0,18 M. Adăugarea acidului se face foarte lent și se agită activ. În final se obține o suspensie omogenă, a cărei absorbantă se măsoară la lungimea de undă de 625 nm, calea optică fiind de 1 cm. Valoarea absorbantei se ajustează la 0.08-0.10. Suspensia se repartizează în tuburi de sticlă cu dop etanș și se păstrează la temperatura camerei, la întuneric. Pentru utilizarea în calitate de standard de turbiditate conținutul tuburilor se agită intens și se apreciază gradul de omogenitate. Se utilizează ca standard doar tuburile cu conținut perfect omogen.

Diluțiile de serie (succesive) în bulion aplicate pentru culturile bacteriene

Diluțiile de serie se pregătesc în tuburi de sticlă cu capacitatea de 5 mL, identice celor, în care se prepară standardul de turbiditate. 0,5 mL de bulion peptonat se toarnă în fiecare tub. Se prepară un număr de tuburi egal cu numărul de diluții și plus tuburile pentru martorul negativ.

Soluțiile stoc ale compușilor testați se prepară în solventul specific fiecărui compus. Din acestea se prepară soluțiile de lucru, prin diluare cu mediu nutritiv lichid. Concentrația soluției de lucru se calculează pentru volumul final de lucru în tubul cu cea mai mare concentrație a compusului testat. 0,5 mL soluție de lucru se trece în primul tub cu 0,5 mL de bulion. Se agită activ conținutul tubului, după care 0,5 mL din conținutul lui se transferă în al doilea tub cu 0,5 mL bulion. Procedura se repetă până la completarea seriilor de diluții. Din ultimul tub se înlătură 0,5 mL de mediu. Toate manipulările se fac cu utilizarea pipetelor sterile.

Au fost testați atât compușii individuali, cât și combinațiile lor. Combinațiile au fost alcătuite în baza celor 3 compuși naturali și a celor mai eficienți compuși chimici, identificați la prima etapă de screening a eficienței acestora. Fiecare dintre compușii chimici selectați a fost combinat cu fiecare dintre cei 3 compuși naturali. Soluțiile stoc pentru substanțele chimice și cele de origine naturală se prepară separat și se combină la ultima etapă – de diluare cu mediu nutritiv lichid.

În eprubetele pregătite în asemenea mod se introduce inoculumul – suspensia bacteriană cu concentrația de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (standard de turbiditate 0,5 McFarland), diluată de 100 de ori, până la concentrația de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Cantitatea de inoculum preparat astfel pentru fiecare tub este de 0,5 mL. Aceeași cantitate se introduce în eprubeta cu martorul negativ.

Tuburile cu diluțiile succesive ale compușilor testați și inoculum se închid cu dopuri sau capace sterile și se incubează la o temperatură de 35°C. Timpul de incubare se stabilește în dependență de microorganismul inoculat, de la 16 la 24 ore. Martorul negativ se păstrează în frigider la 4-8°C iar rezultatul se citește odată cu celelalte tuburi. Creșterea microorganismelor se determină în baza examinării comparate cu martorul negativ în flux de lumină emergentă. În calitate de CMI se consideră concentrația substanței testate în ultimul tub al seriei descrescătoare în care nu este creștere microbiană. Lipsa creșterii poate fi determinată atât de moartea microorganismelor, cât și de inhibarea procesului de reproducere a acestora.

Determinarea concentrației minime bactericide (CMB)

Determinarea CMB este o continuare a metodei de determinare a CMI, descrisă mai sus. În acest scop din tubul în care este CMI a compusului testat și a celor anterioare lui (în care concentrațiile de compus sunt mai mari) se prelevează în condiții sterile 0,1 mL conținut care se transferă pe suprafața mediului solid nesuplimentat compusul testat, în plăci Petri. Plăcile se incubează în condiții specifice tulpinii, iar rezultatul se citește peste 24-48 ore. Valoarea CMB este

acea, care corespunde concentrației compusului în ultimul tub din seria descrescătoare în care nu se depistează colonii.

Metoda standardizată EUCAST Def.7.1 de determinare a CMI pentru Candida albicans

În esența sa este o metodă a diluțiilor de serie aplicată pentru tulpina *Candida albicans* ATCC 10231. În această metodă se aplică mediul RPMI 1640, dublu concentrat, care conține glutamină, indicator de pH, glucoză 2% și nu include bicarbonatul de sodiu (se utilizează cantitatea de 20,8 g mediu RPMI la 1000 mL mediu). În scopul menținerii unui pH constant pe durata testului la mediu se adaugă 0,165 M MOPS (acid 3-(N-morpholino) propanesulfonic).

Principiul metodei și realizarea este identică cu cea descrisă mai sus pentru tulpinile bacteriene. Pentru fiecare compus se folosesc 10 tuburi, dintre care 8 pentru diluțiile compusului și 2 pentru martorul negativ. Inoculumul final se prepară astfel, ca să aibă o concentrație de germeni de la 1×10^5 până la $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Pentru aceasta cultura fungică crescută pe mediul Sabouraud cu geloză se transferă în apă distilată sterilă astfel ca turbiditatea să fie în corespundere cu standardul de 0,5 McFarland, după care se diluează cu apă distilată sterilă 1:10. Inoculumul se utilizează pe durata a cel mult 30 min după preparare. În fiecare tub cu 1,5 mL mediu RPMI cu concentrația respectivă a compusului testat se inoculează 1,5 mL inoculum preparat în modul descris mai sus. Tuburile pregătite astfel se incubează la temperatura de 35-37°C, timp de 24 - 48 ore. Martorul negativ se păstrează în frigider. La final se citește absorbanta la lungimea de undă de 530 nm față de martorul negativ. CMI este considerată concentrația minimă a compusului, care a inhibat creșterea.

Concentrația minim fungicidă se determină analog concentrației minime bactericide. Mediu utilizat în cutiile Petri în care se face testarea este mediul Sabouraud agarizat.

Metoda de difuzie în geloză. Metoda are la bază proprietatea moleculelor substanțelor testate de a pătrunde în mediul nutritiv cu geloză fie din godeurile umplute cu soluția respectivă, fie de pe discurile impregnate cu soluțiile testate. În ambele cazuri concentrația substanțelor testate trebuie să fie cunoscută. Atunci când substanțele testate posedă activitate antibacteriană/antifungică, pătrunderea lor în mediul din zona imediat apropiată godeului ori discului impregnat, generează un efect de inhibiție a creșterii culturilor bacteriene/fungice inoculate de suprafața mediului.

Pentru tulpinile bacteriene se utilizează mediul bulion peptonat cu geloză, iar pentru *Candida albicans* – mediul Sabouraud. Mediul se toarnă în plăci Petri astfel ca stratul de geloză să fie de $4,0 \pm 0,5$ mm. În acest studiu a fost aplicată metoda discurilor impregnate. Prepararea discurilor se realizează în laborator în condiții sterile. Compușii chimici, naturali și combinațiile lor se impregnează pe discuri confecționate din hârtie de filtru cu diametrul de 6 mm. Pe fiecare disc se aplică 4 μ l din soluția testată.

Se prepară inoculum standardizat pentru fiecare cultură microbiană conform metodei descrise anterior. 2 mL de inoculumul standardizat se transferă pe suprafața mediului solidificat din plăcile Petri. După uscarea suprafeței gelozei pe suprafața acesteia se aplică discurile impregnate cu substanțele testate. Discurile se plasează uniform, distanțat, astfel ca în jurul lor să fie un diametru de 30 mm liber. Plăcile Petri pregătite astfel se incubează la 35 - 37°C, timp de 24 - 48 ore. Pentru citirea rezultatelor plăcile Petri se plasează pe un fon mat închis la culoare și se examinează în lumină ce cade sub un unghi de 45°. Diametrul zonelor de inhibiție se măsoară cu precizie de 1 mm, cu ajutorul șublerului.

2.2.2. Prelucrarea masei celulare pentru efectuarea testelor biochimice

Masa celulară se separă de lichidul cultural prin centrifugare. Lichidul cultural se utilizează pentru determinarea activității exoenzimelor. Determinările se fac imediat după prelevare. Sedimentul celular se spală cu soluție tampon fosfat (pH 7,0). 100 mg de sediment celular se trece într-o porție nouă de tampon fosfat, se adaugă 100 mg perle de sticlă cu diametrul de 150 μm. Amestecul se agită la vortex 1 min, după care urmează o pauză de 5 min, în 5-10 reprize, la gheață. După aceasta resturile celulare se separă prin centrifugare la 6000 g, la temperatura de 4°C timp de 10 min. Supernatantul se supune analizelor. Cantitatea de biomasă se determină conform metodei descrise de Lozan-Tîrșu (Lozan-Tîrșu, 2016).

2.2.3. Aprecierea integrității membranelor celulelor bacteriene prin cuantificarea cantității de acizi nucleici (AN) eliberați

Integritatea membranelor celulare se apreciază indirect prin cuantificarea eliberării în mediu a componentelor celulare, în special în cazul acestei metode – cantitatea de acizi nucleici. Cultura bacteriană cu vârsta de 24 ore se separă de mediul de cultivare prin centrifugare la 5000 g timp de 5 min. Celulele sedimentate se transferă în tampon fosfat de 0,01 M. Concentrația se ajustează astfel, ca absorbanta suspensiei la 600 nm să fie de 0,5 unități. La suspensia bacteriană se adaugă compusul sau combinația testată, astfel, ca concentrația finală să fie cea necesară. După perioada de incubare amestecul se filtrează prin seringă cu filtru de 0,22 μm pentru înlăturarea resturilor celulare și altor componente. Soluția filtrată se supune citirii absorbantei la 260 nm [107, 224].

2.2.4. Determinarea nivelului de stress oxidativ prin cuantificarea speciilor reactive ale oxigenului (ROS) în celulele bacteriene

Testarea stresului oxidativ în celulele bacteriene se realizează aplicând metoda de reducere a tetrazoliului nitroblue (TNB) care se produce la acțiunea speciilor reactive ale oxigenului formate în celule fie în mod natural, în cadrul reacțiilor metabolice normale, fie în mod patologic ca

rezultat al acțiunii unor substanțe cu efecte antimicrobiene în cazul acestui studiu. Suspensia bacteriană (10^6 UFC/mL) în 0,1 mL de soluție salină echilibrată Hanks (HBSS) se incubează cu iodinat la 37 ° C timp de 5, 10, 15, 20 și, respectiv, 30 de minute. Se adaugă 0,5 mL soluție de 1 mg/mL de tetrazoliu nitroblue la fiecare dintre soluții și se incubează timp de 30 de minute la 37 C. Reacția se oprește cu 0,1 mL soluție de 0,1 M HCl, se centrifughează la 5000g timp de 10 minute pentru a separa celulele de supernatant. Sedimentul celular se tratează cu 0,4 mL de dimetil sulfoxid (DMSO) pentru a extrage TNB redus, după care se adaugă a 0,8 mL de HBSS pentru diluare. Absorbția formazanului albastru obținut din celule se măsoară la 575 nm [33].

2.2.5. Metoda de determinare a activității lactat dehidrogenazei eliberate

Lactatdehidrogenaza este o endoenzimă, eliberarea căreia în mediul extracelular are loc doar în cazul dereglării permeabilității membranei citoplasmatică și integrității peretelui celular. În această lucrare a fost aplicată o adaptare propusă de Arokiyaraj și coautorii cu [26] la o metodă descrisă de Borna și coautorii [43]. Principiul metodei constă în reducerea nicotinamid-dinucleotidei NAD de către LDH. Pentru realizarea metodei se utilizează cultura de *Candida albicans* cu vârsta de 48 ore, crescută pe mediu Sabouraud standard. Biomasa se separă de mediul nutritiv, se spală cu tampon fosfat, se resuspendează într-o porție nouă de tampon fosfat care conține compusul sau combinația de compuși testați în concentrație finală solicitată. După incubarea culturii de fungi cu compușii testați biomasa se separă prin centrifugare. Pentru analiză se utilizează 0,1 mL supernatant, care se transferă într-un amestec reactant preparat din timp. Amestecul reactant se prepară din 0,5 mL de piruvat de 100 mM și 20 mL soluție tampon de fosfat de potasiu de 500 mM cu pH 7.5, care conțin 5 mg NAD. Se citește absorbanta la lungimea de undă de 340 nm imediat și peste 5 min. Activitatea LDH se exprimă în unități de activitate pe mL (U/mL). O unitate de activitate este egală cu cantitatea de enzimă care reduce 1 μ M de NAD timp de 1 min. Formula de calcul este următoarea:

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta A / \text{min} \times TV \times 1000}{d} \times d \times \epsilon \times SV \quad (2.1)$$

unde: ΔA este diferența de absorbanță la 340 nm, TV este volumul total de reacție, 1000 este coeficientul de trecere de la U/mL la U/L, d este calea fluxului luminos în cm, ϵ reprezintă coeficientul molar de extincție, iar SV este volumul probei în mL [165].

2.2.6. Metoda de determinare a activității superoxidismutazei

Pentru determinarea activității superoxidismutazei se aplică setul de reactivi RANSOD (RANDOX®LABORATORIES, CrumLin, UK). Determinarea se face conform indicațiilor producătorului. În această metodă se utilizează capacitatea de generare a radicalului superoxid de către xantină și xantin oxidază (XO). Radicalul format reacționează cu clorura de 2- (4-iodofenil) -3- (4-nitrofenol) -5-feniltetrazolium (INT) cu formarea unui colorant de culoare roșie - formazanul. Superoxidismutaza este un inhibitor al acestei reacții. O unitate de activitate SOD se exprimă prin cantitatea de enzimă care inhibă 50% a ratei de reducere a INT. Reacțiile implicate în această metodă sunt următoarele:



Extracțele celulare obținute în modul descris mai sus se diluează cu tampon fosfat pH 7,0 de 0,01 M, astfel încât procentul de inhibiție să fie între 30% și 60%. Factorul de diluție pentru extracțele bacteriene/fungice este de 200.

La 60 μl extract diluat se adaugă 2 mL substrat (0,05 nM de xantină, 0,025 nM INT în tampon (CAPS – 40 mM, pH 10,2 + EDTA 0,94 mM)). După, se adaugă 300 μl xantin oxidază cu activitate de 80 U/l). Se prepară și o probă standard după aceeași schemă, doar că în loc de extract celular se adaugă 60 μl de standard (se prepară diluantul de probă S₁ -tamponul fosfat de 0,01 mmol, pH 7,0). Absorbanța A₁ se citește peste 30 min. de la adăugarea standardului și peste 3 minute - A₂, la lungimea de undă de 505 nm. Calculul se efectuează în baza curbei de calibrare cu utilizarea standardului de sueroxidismutază.

Pentru fiecare probă se calculează diferența de absorbanță:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = -A/\text{min} \quad (2.5)$$

Procentul de inhibiție se calculează conform formulelor:

$$\% \text{ Inhibiție (standard)} = 100 - \frac{(-A_{\text{std/min}} \times 100)}{(-A_{S1/\text{min}})} \quad (2.6)$$

$$\% \text{ Inhibiție (probă)} = 100 - \frac{(-A_{\text{prb/min}} \times 100)}{(-A_{S1/\text{min}})} \quad (2.7)$$

În baza procentului de inhibiție calculat utilizând curba de calibrare construită în baza standardului de sueroxidismutază activitatea enzimei se exprimă în unități SOD.

2.2.7. Metoda de determinare a activității catalazei

Activitatea catalazei se face aplicând setul Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich) conform protocolului de la producător. Catalaza (CAT) este responsabilă de reacția de descompunere a peroxidului de hidrogen (H_2O_2) în H_2O și O_2 . Peroxidul de hidrogen se formează în calitate de produs secundar al activității diferitelor enzime-oxidaze și a superoxiddismutazei. Setul aplicat în acest studiu asigură o procedură simplă și reprezentativă, care permite determinarea cantitativă a activității catalazei.

Metoda are la bază determinarea cantitativă a substratului de reacție – peroxidul de hidrogen, care rămâne după acțiunea enzimei catalaza. Prima etapă a metodei constă în derularea normală a reacției de transformare a peroxidului de hidrogen în apă și oxigen de către enzima catalaza. La cea de a doua etapă reacția enzimatică este oprită cu azida de sodiu. După aceasta în amestecul de reacție se cuantifică cantitatea de peroxid de hidrogen, rămas netransformat. Pentru aceasta se determină cantitatea de (N- (4-antipiril) -3-clor-5-sulfonatep-benzochinonă-mono imină) – o substanță de culoare roșie cu maximul de absorbție la 520 nm, care se formează în reacția dintre acidul 3,5-diclor-2-hidroxibenzensulfonic cu 4-aminoantipirina în prezența peroxidului de hidrogen și peroxidazei (RP). Pentru această analiză se folosește peroxid de hidrogen de 50 mM. Reacția se are loc la temperatura camerei. De asemenea, la temperatura camerei se produce și echilibrarea soluției tampon fosfat de 500 mM și cu pH 7,0, soluției de substrat (200 mM H_2O_2) și reactivului de culoare.

La 25 μ l extract de analizat se adaugă 50 μ l soluție tampon. Pentru inițierea reacției se adaugă 25 μ l peroxid de hidrogen și 900 μ l soluție de stopare a reacției. Proba martor în loc de extract bacterian conține soluție tampon. Amestecul se incubează timp de 5 min. 10 μ l din amestec se pune într-un tub Eppendorf, se adaugă 1 mL soluție colorant. Tuburile stau la temperatura camerei până la apariția culorii, absorbanta se măsoară la lungimea de undă de 520 nm.

Calculul se realizează în baza curbei de calibrare. Se face diferența dintre cantitatea de H_2O_2 rămas, în μ M în martor și probă.

Activitatea catalazei se calculează în unități de activitate per mililitru conform formulei:

$$A(CAT)\mu\frac{\frac{mol}{min}}{ml} = \frac{\Delta\mu mol(H_2O_2) \times d \times 100}{V \times t} \quad (2.8)$$

unde: $\Delta\mu mol (H_2O_2)$ – diferența dintre cantitatea de H_2O_2 în martor și probă;

d – factorul de diluție;

t - timpul de reacție, min;

V – volumul probei;

100 – diluția amestecului de reacție

O unitate de activitate a catalazei corespunde cantității de enzimă care descompune 1 μ M de peroxid de hidrogen timp de 1 min (pH 7,0, la temperatura camerei, concentrația a substratului de 50 mM).

2.2.8. Metoda de determinare a activității proteazelor extracelulare

Activitatea proteazelor extracelulare a fost determinată aplicând testul collagenazei impregnate cu colorant azoic. Se cântăresc 5 mg azocol (Sigma, SUA), care se dizolvă cu tampon fosfat de potasiu steril (pH 7,2). Soluția se echilibrează la 37°C timp de o oră. La soluția de azocol în tampon fosfat se adaugă 50 μ g de supernatant de cultură după incubarea cu substanțele de interes, se incubează la 37°C, cu agitare, 65 rpm, timp de o oră. Mediul nutritiv neinoculat servește drept control pentru fiecare set de teste. Exact la o oră reacția se stopează prin centrifugarea azocolului rezidual la 12.000 rpm timp de 20 min. Se măsoară absorbanta supernatantului rezultat la 520 nm. O unitate de activitate a proteazelor extracelulare se consideră cantitatea de enzimă care prezintă valoarea absorbantei la 520 nm egală cu 0.5 unități [191].

2.2.9. Analiză statistică a datelor

Toate experiențele au fost realizate în trei repetări. Toate rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive și analizei corelaționale. Valorile exprimate în teză sunt date ca media $\pm$ deviația standard. Calculul indicatorilor statistici a fost efectuat utilizând posibilitățile MS Excel. În calitate de test de semnificație a fost aplicat testul Student. Acest test a fost selectat în baza satisfacerii de către setul de date analizat a următoarelor criterii:

- Mediile eșantioanelor analizate au o distribuție normală;
- Datele inițiale în eșantioanele de dimensiuni mici caracteristice experiențelor din această lucrare de asemenea, au o distribuție normală;
- În eșantioanele independente analizate se respectă condiția egalității dispersiilor.

2.3. Concluzii la capitolul 2

Pentru realizarea tezei de doctor în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate 5 tulpini de referință de microorganisme patogene (două Gram - 2 Gram + și una fungică), ceea ce a permis evidențierea particularităților de acțiune a compușilor chimici noi și a celor de origine naturală. În calitate de substanțe cu efecte antibacteriene și antifungice au fost utilizați compuși noi cu segmentul tiosemicarbazinic, coordonat cu metale de tranziție - cobalt, nichel și cupru; preparatul BioR, extractul din spirulină și enotanina hidrosolubilă.

În cercetare au fost aplicate metode microbiologice standard, care au permis stabilirea parametrilor calitativi și cantitativi ai acțiunii antibacteriene/antifungice a compușilor chimici, naturali și a combinațiilor acestora. Metodele biochimice aplicate în această lucrare au permis identificarea unor mecanismelor de acțiune a compușilor studiați.

3. ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI NOI

Una dintre provocările majore care stau în fața științei contemporane este necesitatea de a depăși constrângerea provocată de dezvoltarea rapidă a rezistenței microorganismelor patogene la antibioticele contemporane și clasice. În procesul de elaborare a noilor remedii se implică specialiști din diferite domenii, care încearcă identificarea substanțelor naturale cu efecte antimicrobiene, dar și sinteza de compuși chimici noi. Cu toate acestea, nu putem afirma că există un salt cantitativ sau calitativ în domeniul dat. Numărul de compuși antimicrobieni, care ajung la etapa de studii clinice este foarte mic, comparativ cu medicamentele elaborate pentru alte scopuri terapeutice. De exemplu, în anul 2019 s-au aflat în teste clinice 42 de potențiale antibiotice, în timp ce substanțe anticancer testate au fost peste 1100 [73]. Această cifră practic nu crește de la an la an. De exemplu, în 2021 au fost testate 43 substanțe pentru aplicare în calitate de antibiotice [225].

Idei principal noi despre natura noilor substanțe antibiotice sunt foarte limitate. Mai mult de $\frac{3}{4}$ din substanțele aflate în proces de testare clinică în calitate de compuși cu efect antimicrobial sunt simple derivate ale substanțelor binecunoscute și aplicate pe larg, și deci, la care este foarte probabil să se dezvolte rezistența după aceeași schema, ca și față de substanța originală. Dintre puținii compuși originali testați anual pentru aplicare în calitate de antibiotic mai puțin de 0,5% sunt eficienți față de tulpinile patogene gram-negative [225].

Astfel, este absolut clar, că sunt necesare abordări noi, inovative, în procesul de elaborarea și punere în aplicare a noilor medicamente cu efecte antimicrobiene. Cercetările realizate în cadrul acestei teze țin de screeningul primar al noilor compuși elaborați conform anumitor supoziții despre o potențială structură chimică, care poate asigura efectele dorite ale substanței.

3.1. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi tiosemicarbazonaților Cu(II), Co(II) și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazin-carbotioamidă

Compușii, activitatea cărora este examinată în acest subcapitol au fost sintetizați în cadrul catedrei de chimie anorganică a Universității de Stat din Moldova [91].

Rezultatele pentru concentrațiile minime de inhibiție și minim bactericide/fungicide stabilite în testele efectuate sunt prezentate în tabelele 3.1. și 3.2.

Compușii care au în calitate de ligand N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotioamida, și anume compușii $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}$ - $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$; $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$ - $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClCuN}_3\text{OS}$; $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$ - $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{CuN}_3\text{O}_2\text{S}$ manifestă o activitate antimicrobiană mai mică față de tulpina *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 comparativ cu ligandul aplicat independent (Tabelul 3.1). Astfel, CMI a ligandului este de 0,0015 mg/mL, în timp ce CMI a compușilor este

de 0,03-0,06 mg/mL. Ligandul manifestă activitate antimicrobiană față de această tulpină de 2 ori mai mare decât antisepticul de referință.

În același timp, activitatea antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 a doi dintre compușii menționați anterior este semnificativ mai mare comparativ cu activitatea ligandului (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Activitatea antimicrobiană a tiosemicarbazonaților Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin N-dimetilfenil hidrazincarbonatamidă față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231 (mg/mL)

Compusul	Microorganismele			
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	CMI	CMB	CMI	CFM
Co(HL ¹) ₂ Cl C ₃₂ H ₃₂ CoClN ₆ O ₂ S ₂	0,06	0,12	0,0007	0,003
Co(HL ³) ₂ Cl C ₃₂ H ₃₂ CoClN ₆ O ₂ S ₂	0,03	0,06	0,03	0,03
Cu(HL ¹)Cl C ₁₆ H ₁₆ ClCu N ₃ OS	0,06	0,06	0,0015	0,003
Cu(L ¹)H ₂ O C ₁₆ H ₁₇ Cu N ₃ O ₂ S	0,03	0,03	-	-
Cu(HL ³)Cl C ₁₆ H ₁₆ ClCu N ₃ OS	0,5	0,5	-	-
Ni(HL ²)Cl C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ NiOS	1,0	1,0	-	-
Ni(HL ³) ₂ Cl C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ NiOS	0,0015	0,0015	0,0007	0,0015
Compușii inițiali ^{a)}				
H2L1(19)	0,0015	0,0015	0,5	0,5
H2L2 (40)	0,03	0,03	-	-
H2L3 (43)	0,03	0,03	-	-
Furacilina	0,009	0,009	0,005	0,005

Astfel, concentrația minimă de inhibiție a CMSA 25 față de *C.albicans* este de 0,0007 mg/mL, iar cea fungicidă – de 0,003 mg/mL, comparativ cu valoarea de 0,5 mg/mL pentru ligand (la ambii parametri). Compusul CMSA 26, cu toate că este mai puțin activ comparativ cu cel analizat anterior, are o activitate antifungică mult mai înaltă comparativ cu activitatea ligandului, dar și comparativ cu cea a furacilinei. Ligandul N-(2,5-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbonatamida, precum și compusul coordinativ al nichelului obținut în baza acestuia - CMSA 59, au o activitate antibacteriană față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mult mai joasă față de activitatea furacilinei, și nu au activitate antifungică față de *Candida albicans* ATCC 10231, în limita concentrațiilor testate.

Același lucru se observă și cu referință la cel de-al treilea ligand - N-(3,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamida și unul dintre compușii coordinativi obținuți în baza lui - CMSA 57. În schimb compusul cu nichel în baza aceluiași ligand - CMSA 68 se remarcă printr-o activitate antimicrobiană înaltă atât față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, cât și față de *Candida albicans* ATCC 10231. Astfel, CMI față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 a acestui compus, la fel ca și CMB este de 0,0015 mg/mL, iar CMI față de *Candida albicans* ATCC 10231 este de 0,0007 mg/mL (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonaților Cu(II), Co(II) și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamidă față de microorganismele Gram- (mg/mL)

Compusul	Microorganismele Gram(-)					
	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Co(HL ¹) ₂ Cl C ₃₂ H ₃₂ CoClN ₆ O ₂ S ₂	0,007	0,03	0,007	0,03	0,12	0,12
Co(HL ³) ₂ Cl C ₃₂ H ₃₂ CoClN ₆ O ₂ S ₂	1,0	1,0	0,25	0,25	-	-
Cu(HL ¹)Cl C ₁₆ H ₁₆ ClCu N ₃ OS	0,25	1,0	0,25	0,5	-	-
Cu(L ¹)H ₂ O C ₁₆ H ₁₇ Cu N ₃ O ₂ S	0,12	0,25	0,06	0,25	-	-
Cu(HL ³)Cl C ₁₆ H ₁₆ ClCu N ₃ OS	0,25	0,25	0,12	0,12	-	-
Ni(HL ²)Cl C ₁₆ H ₁₆ ClNiN ₃ IOS	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-
Ni (HL ³) ₂ Cl C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ NiIOS (Brevet 4462)	0,0015	0,0015	0,0007	0,0012	0,0007	0,0012
Compușii inițiali ^{a)}						
H2L1(19)	1,0	2,0	0,03	0,03	0,5	0,5
H2L2 (40)	0,25	1,0	1,0	1,0	-	-
H2L3 (43)	1,0	1,0	1,0	2,0	-	-
Furacilina	0,012	0,024	0,07	0,15	0,03	0,06

Activitatea antibacteriană față de microorganismele Gram - a acestui grup de compuși poate fi urmărită în tabelul 3.2.

Nici unul dintre cei trei liganzi utilizați pentru sinteza compușilor din această categorie nu a avut o activitate antibacteriană față de *Escherichia coli*, ATCC 25922 și *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 mai pronunțată decât activitatea antisepticului de referință, iar doi dintre ei - N-(2,5-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazincarbotoamida și Cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbo-tioamido (1-)]-nichel (II) nu au activitate antibacteriană față de tulpina *Pseudomonas aeruginosa* în limita concentrațiilor studiate în această lucrare. Majoritatea compușilor coordinativi din acest grup la fel, au demonstrat activitate mai joasă ca antisepticul de referință. Excepție face compusul CMSA 25, care are o activitate semnificativă față de *Escherichia coli*, ATCC 25922 și *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Astfel, CMI față de aceste două tulpini

este de 0,007 mg/mL, iar CMB este de 0,03 mg/mL. De menționat, CMI a acestui compus față de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 este identică cu CMI a furacilinei pentru tulpina respectivă.

O atenție aparte merită compusul cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbonotioamido(1-)]-nichel (II)], care a fost remarcat și în cazul tulpinilor *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231. Activitatea acestui compus față de tulpinile de microorganisme Gram(-) a fost mai înaltă comparativ cu activitatea antisepticului de referință furacilina. Astfel, CMI și CMB față de *Escherichia coli*, ATCC 25922 a fost de 0,0015 mg/mL; față de tulpina *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - de 0,0007 (CMI) și 0,0012 (CMB) mg/mL.

Testarea compușilor din această categorie a permis de a evidenția o substanță cu activitate antimicrobiană performantă atât față de microorganismele Gram +, cât și față de cele Gram -. De asemenea, acest compus a avut activitate antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231, la concentrații mai mici comparativ cu cele ale antisepticului de referință și cele ale precursorilor de sinteză. Acest compus coordinativ se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50...55° C) ale hexahidratului clorurii de nichel(II) cu N-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazona 2- hidroxiacetofenonei, luate în raport molar de 1:1. Reacția decurge în 50...60 min. Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul că în timpul sintezei în amestecul reactant are loc adiția la ionul de nichel (2+) a unei molecule de N-(3,4- 25 dimetilfenil) tiosemicarbazona 2- hidroxiacetofenonei, care joacă rolul de ligand-O,N,S tridentat. În rezultatul acestor procese are loc formarea complexului cu structură plan-pătratică cu activitate antimicrobiană pronunțată, inclusiv față de tulpinile de microorganisme Gram -.

3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi noi tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă

Au fost testați 32 compuși din acest grup, iar 7 dintre aceștia au avut activitate antimicrobiană cu toate că această activitate a fost în toate cazurile mai joasă comparativ cu compușii din grupul analizat anterior sau comparativ cu antisepticul de referință [83]. Atât ligandul 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă, cât și 5 compuși coordinativi ai Cu(II) și doi compuși ai Ni(II) au arătat o CMI în limitele de 0,12-0,25 mg/mL față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, comparativ cu 0,009 mg/mL CMI al furacilinei pentru această tulpină (tabelul 3.3).

Tabelul. 3.3. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231 (mg/mL)

Compușul	Microorganismele			
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	CMI	CBM	CMI	CBM
$\text{Cu}(\text{HL}^*)_2(\text{NO}_3)_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuN}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_2$	0,25	0,5	0,5	0,5
$\text{Cu}(\text{HL}^*)_2\text{Br}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuBr}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,5	1,0	0,5	1,0
$\text{Cu}(\text{HL}^*)_2\text{Cl}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuCl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,5	1,0	-	-
$\text{Cu}(\text{HL}^*)_2(\text{ClO}_4)_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuCl}_2\text{N}_8\text{O}_{14}\text{S}_2$	0,5	0,5	-	-
$\text{Cu}(\text{HL}^*)_2\text{SO}_4$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuN}_8\text{O}_{10}\text{S}_3$	0,5	0,5	0,5	1,0
NiL^*_2 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NiN}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,12	0,25	0,12	0,25
$\text{Ni}(\text{HL}^*)_2\text{Cl}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NiCl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,5	1,0	0,5	1,0
Furacilina	0,009	0,009	0,005	0,005
HL *	0,12	0,5	0,12	0,25

Notă: L* 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă

CMB a compușilor testați din acest grup a fost de 0,25-1,0 mg/mL comparativ cu 0,009 mg/mL CMB al furacilinei față de această tulpină Gram (+). CMI și CMB față de tulpina de fungi levuriformi *Candida albicans* ATCC 10231 a compușilor din această categorie au fost în aceleași limite valorice ca și cele înregistrate pentru *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923.

Deosebirea constă în aceea, că doi dintre compuși - clorura de bis (2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă)cupru(II) și percloratul de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă)cupru(II) nu au manifestat activitate față de *Candida albicans* ATCC 10231 (tabelul 3.3).

Rezultatele obținute la testarea activității antimicrobiene a compușilor coordinativi ai Cu (II) și Ni(II) clasificați în acest grup, față de microorganismele Gram - sunt prezentate în tabelul 3.4. Valorile CMI și CMB sunt foarte apropiate unele de altele, încadrându-se pentru cele două tulpini și 7 compuși în limitele de la 0,12 la 0,5 mg/mL.

Tabelul. 3.4. Activitatea antimicrobiană a compușilor coordinativi tiosemicarbazonații Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă față de microorganismele Gram- (mg/mL)

Compusul	Microorganismele			
	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		<i>Salmonella enterica</i> (S. Abony ГИСК 03/03)	
	CMI	CBM	CMI	CBM
$\text{Cu}(\text{HL})_2(\text{NO}_3)_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuN}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_2$	0,5	1,0	0,25	0,5
$\text{Cu}(\text{HL})_2\text{Br}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuBr}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,5	2,0	0,5	2,0
$\text{Cu}(\text{HL})_2\text{Cl}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuCl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,5	1,0	0,5	1,0
$\text{Cu}(\text{HL})_2(\text{ClO}_4)_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuCl}_2\text{N}_8\text{O}_{14}\text{S}_2$	0,5	0,5	0,5	0,5
$\text{Cu}(\text{HL})_2\text{SO}_4$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{CuN}_8\text{O}_{10}\text{S}_3$	0,5	0,5	0,5	0,5
NiL_2 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NiN}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,12	0,5	0,25	0,5
$\text{Ni}(\text{HL})_2\text{Cl}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NiCl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2$	0,25	0,5	0,5	0,5
Furacilina	0,012	0,024	0,06	0,25
HL *	0,3	0,5	0,12	0,25

Notă: L* 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă

Aceleași valori sunt caracteristice și pentru ligandul utilizat pentru sinteză, în cazul căruia CMI este de 0,3 și 0,12 mg/mL pentru tulpinile *Escherichia coli*, ATCC 25922 și *Salmonella enterica* (S. Abony ГИСК 03/03) respectiv. CMB este de 0,5 mg/mL tulpinii în cazul *Escherichia coli*, ATCC 25922 și de 0,25 mg/mL în cazul tulpinii *Salmonella enterica* (S. Abony ГИСК 03/03). Valorile CMI și CMB pentru substanțele testate sunt de 5-10 ori mai mari comparativ cu valorile caracteristice antisepticului de referință utilizat în cercetare.

Compușii din acest grup nu au manifestat activitate antimicrobiană față de tulpinile Gram-, nici față de tulpina fungică, nici față de cea Gram + luate în studiu.

Cu toate acestea, din cei 7 compuși investigați o activitate antimicrobiană mai pronunțată față de toate tulpinile a avut-o compusul NB 16. CMI pentru 3 dintre tulpinile studiate (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli*, ATCC 25922) a fost de 0,12 mg/mL, fiind cea mai mică valoare în această serie de substanțe testate.

3.3. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonații Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxi-benziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazo notioat

Din această serie de substanțe au fost testați 13 compuși. Dintre aceștia 9 au manifestat activitate antimicrobiană, 4 fiind compuși coordinativi ai cuprului, 4 – ai cobaltului și unu – al nichelului [169]. Rezultatele obținute în cadrul testării acțiunii acestor compuși asupra tulpinilor *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231 sunt prezentate în tabelul 3.5.

Tabelul 3.5. Activitatea antimicrobiană a compușilor Tiosemicarbazonații Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxi-benziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231 (mg/mL)

Compusul	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	CMI	CMB	CMI	CMF
Cu(L)Cl·H ₂ O C ₁₂ H ₁₆ ClCuN ₃ O ₂ S	0,12	0,12	0,03	0,06
Cu(L)Br·H ₂ O C ₁₂ H ₁₆ BrCuN ₃ O ₂ S	0,12	0,12	0,12	0,25
Cu(L)NO ₃ ·2H ₂ O C ₁₂ H ₁₈ CuN ₄ O ₆ S	0,25	0,25	0,25	0,25
Cu(L)(CH ₃ COO) C ₁₄ H ₁₇ CuN ₃ O ₃ S	0,25	0,25	0,06	0,12
Co(L) ₂ Br C ₂₄ H ₂₈ BrCoN ₆ O ₂ S ₂	1,0	1,0	1,0	1,0
Co(L) ₂ Cl C ₂₄ H ₂₈ ClCoN ₆ O ₂ S ₂	1,0	1,0	0,5	1,0
Co(L) ₂ I C ₂₄ H ₂₈ CoIN ₆ O ₂ S ₂	1,0	1,0	0,5	1,0
Co(L) ₂ NO ₃ C ₂₄ H ₂₈ CoN ₇ O ₅ S ₂	1,0	2,0	1,0	2,0
Ni(L) ₂ C ₂₄ H ₂₈ N ₆ NiO ₂ S ₂	0,5	1,0	1,0	1,0
HL ¹ C ₁₆ H ₁₇ N ₃ OS Brevet 4402	1,0	1,0	0,0007	0,0007
L*	1,0	1,0	1,0	1,0
Furacilina	0,009	0,009	0,005	0,005

Notă: L* - metil N'-(2-hidroxi-benziliden)-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat

L¹ - metil N'-[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat

Ca și în cazul seriei de compuși analizați anterior, compușii din acest grup, de asemenea, au manifestat o activitate antimicrobiană față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 la un nivel mai jos, comparativ cu antisepticul de referință, dar evidentă în context general. Cele mai bune

rezultate în acest sens au fost obținute pentru doi dintre compușii cu cupru - cloro(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru și bromo(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru.

Aceștia au arătat același grad de activitate, având CMI și CMB la același nivel de 120 mg/mL. Încă doi compuși ai cuprului din această categorie au manifestat activitate antibacteriană înaltă față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, dar cu valori mai mari ale CMI și CBI, și anume 250 mg/mL. Aceștia au fost TI 3 și 4(II). Ceilalți compuși au demonstrat activitate antibacteriană față de *Staphylococcus aureus*, la o concentrație egală sau mai mare de 1 mg/mL.

Activitatea antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231, la fel, a fost mai joasă comparativ cu activitatea antisepticului de referință. Cu toate acestea putem evidenția compusul acetato(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru care a demonstrat valori joase ale CMI și CMF – de 0,06 și 0,12 mg/mL respectiv. Următorul compus după activitate față de tulpina de funghi levuriformi analizată este compusul cloro(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru, cu CMI de 0,03 mg/mL și CMF de 0,06 mg/mL. Acest compus a manifestat efect antibacterian superior și față de *Staphylococcus aureus*. Ceilalți compuși au demonstrat activitate antifungică față de *Candida albicans*, la o concentrație egală sau mai mare de 0,5 mg/mL.

În acest grup de substanțe a fost inclus un derivat al ligandului metil *N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat, și anume metil *N'*-[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metiliden]-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat. Anume acest compus a demonstrat cea mai înaltă activitate antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231. Acesta a fost de 10 ori mai activ comparativ cu antisepticul de referință, arătând valori de 0,0007mg/mL ale CMI și CMF. Cu toate că nu este un compus cu conținut de metale, acesta a fost selectat pentru cercetările ulterioare, pornind de la faptul, că substanțe cu efecte antifungice se găsesc mult mai puține, iar cazurile de succes merită o atenție deosebită și o cercetare minuțioasă în vederea evidențierii mecanismelor de acțiune a lor. În baza acestui compus a fost obținut un brevet de invenție [2]. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat față de de micro-organismele Gram (-) este prezentată în tabelul 3.6.

Tabelul 3.6. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) care conțin metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat față de de microorganisme Gram- (mg/mL)

Compusul	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		<i>Salmonella enterica</i> (S. Abony ГИСК 03/03)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Cu(L)Cl·H ₂ O C ₁₂ H ₁₆ ClCuN ₃ O ₂ S	0,12	0,12	0,12	0,25
Cu(L)Br·H ₂ O C ₁₂ H ₁₆ BrCuN ₃ O ₂ S	0,12	0,12	0,12	0,25
Cu(L)NO ₃ ·2H ₂ O C ₁₂ H ₁₈ CuN ₄ O ₆ S	0,12	0,25	0,06	0,50
Cu(L)(CH ₃ COO) C ₁₄ H ₁₇ CuN ₃ O ₃ S	0,06	0,06	0,12	0,12
Co(L) ₂ Br C ₂₄ H ₂₈ BrCoN ₆ O ₂ S ₂	1,0	1,0	1,0	1,0
Co(L) ₂ Cl C ₂₄ H ₂₈ ClCoN ₆ O ₂ S ₂	1,0	1,0	1,0	1,0
Co(L) ₂ I C ₂₄ H ₂₈ CoIN ₆ O ₂ S ₂	1,0	1,0	1,0	1,0
Co(L) ₂ NO ₃ C ₂₄ H ₂₈ CoN ₇ O ₅ S ₂	1,0	1,0	1,0	1,0
Ni(L) ₂ C ₂₄ H ₂₈ N ₆ NiO ₂ S ₂	1,0	1,0	1,0	1,0
L*	1,0	1,0	1,0	1,0
HL ¹ C ₁₆ H ₁₇ N ₃ OS Brevet 4402	0,5	0,5	1,0	1,0
Furacilina	0,012	0,024	0,06	0,25

Notă: *L- metil N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat

L¹ - metil N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden])-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioat

Activitatea antibacteriană față de tulpina *Escherichia coli*, ATCC 25922 în toate variantele experimentale a fost mai joasă comparativ cu activitatea antisepticului de referință, dar destul de relevantă. Se evidențiază în special compusul acetato(metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazono tioato)cupru, care a avut valori ale CMI și CMB la nivel de 0,06 mg/mL. Încă doi compuși, de asemenea cu conținut de cupru, au demonstrat valori ale CMI și CMB de două ori mai mari comparativ cu compusul analizat anterior, dar la un nivel semnificativ, de 0,12 mg/mL. Aceștia au fost TI 1 și TI 2. Nitratul de (metil-N'-(2-hidroxibenziliden)-N-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)-diaqua cupru(II) a demonstrat valori ale CMI la nivelul celor doi compuși analizați, dar o CMB de 2 ori mai mare – de 0,25 mg/mL. Ceilalți compuși analizați au demonstrat activitate antibacteriană față de *Escherichia coli*, la valori ale CMI și CMB în jur de 1 mg/mL.

Unii dintre compușii din acest grup au demonstrat activitate antibacteriană față de tulpina *Salmonella enterica* (S. Abony ГИСК 03/03). TI 3 a arătat valoarea CMI la nivelul antisepticului

de referință, dar o valoare de 2 ori mai mare a CMB. Trei compuși, și anume Cloro(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru, Bromo(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru și acetato(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato)cupru au avut valorile CMI la nivelul de 0,12 mg/mL, primii doi fiind remarcați cu valoarea CMB la nivelul antisepticului de referință.

Compusul acetato(metil-*N'*-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-prop-2-en-1-ilcarbamohidrazonotioato) cupru manifestă activitate bactericidă față de *Salmonella enterica* la o concentrație de 2 ori mai joasă comparativ cu antisepticul de referință.

Astfel, compușii tiosemicarbazonați ai Cu(II), care conțin metil-*N'*-(2-hidroxi benzil iden)-*N*-prop-2-en-1-il au demonstrat activitate antibacteriană față de tulpinile de bacterii Gram (-), în special față de *Salmonella enterica*, ceea ce demonstrează perspectivitatea lor în calitate de candidați pentru studiile ulterioare în vederea identificării substanțelor noi cu proprietăți antimicrobiene.

3.4. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonați Cu(II) și Co (III) care conțin hidrazincarbonotioamidă

Au fost testați 32 compuși cu conținut de hidrazincarbonotioamidă. Dintre aceștia 12 au manifestat activitatea antimicrobiană semnificativă față de anumite tulpini de microorganisme patogene, 7 conținând cupru, 1 – cobalt. De asemenea, 4 compuși sunt liganzii aplicați pentru sinteză. Rezultatele obținute pentru activitatea antimicrobiană a compușilor enumerați față de bacteriile Gram + și față de tulpina de fungi *Candida albicans* ATCC 10231 sunt prezentate în tabelul 3.7. Șase dintre compușii testați (5 ai cuprului și unu al cobaltului) și doi liganzi utilizați pentru sinteză au manifestat activitate antibacteriană foarte înaltă față de tulpina *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923. Compușii: VGB 1, VGB 2 și VGB 16 au demonstrat valori ale CMI și CMB mult mai joase comparativ cu ligandul utilizat pentru sinteza lor (2-(2-hidroxi-benziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbo tioamidă), dar și comparativ cu antisepticul de referință. Primii doi dintre aceștia au avut valorile egale ale CMI – de 0,7mg/mL și ale CMB – de 3 mg/mL. Cel de-al treilea compus a demonstrat activitate antibacteriană la valori de 2 ori mai mari, atât pentru CMI, cât și pentru CMB, dar semnificativ mai joase comparativ cu antisepticul de referință.

Compusul VGB 24 a demonstrat activitate antibacteriană semnificativă la valori egale ale CMI și CMB – de 1,5 mg/mL. Ligandul utilizat pentru sinteza acestuia (2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-*N*-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonotioamidă a fost mai puțin activ comparativ cu compusul, cu valoarea CMI de 3,0 mg/mL și CMB de 7 mg/mL. În același timp și compusul și ligandul, în baza căruia a fost sintetizat, au o activitate antibacteriană față de *Staphylococcus*

aureus mai mare ca cea a antisepticului de referință. Compusul coordinativ al cobaltului cu același ligand a manifestat și el activitate antibacteriană față de această tulpină la nivelul valorilor obținute pentru ligand.

Tabelul 3.7. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonații Cu(II) și Co(III) care conțin hidrazincarbotoamidă față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035 și *Candida albicans* ATCC 10231 (mg/mL)

Compusul	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMF
Cu(HL ¹)Cl·H ₂ O C ₁₁ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	0,0007	0,003	0,0007	0,003	0,06	0,12
Cu(HL ¹)Cl C ₁₅ H ₁₄ ClCuN ₃ OS	0,0007	0,003	0,0007	0,003	-	-
Cu(HL ²) ₂ Cl ₂ C ₁₈ H ₂₀ CuCl ₂ N ₈ O ₆ S ₂	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	-
Cu(L ¹)H ₂ O C ₁₁ H ₁₃ CuN ₃ O ₂ S	0,0015	0,007	0,003	0,03	0,007	0,06
Cu(HL ³)NO ₃ ·H ₂ O C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₅ S	0,0015	0,0015	0,0015	0,003	0,00 15	0,003
Cu(HL ⁴)Cl C ₁₂ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	0,007	0,06	0,007	0,03	0,015	0,06
Cu(HL ⁴)Cl C ₁₁ H ₁₁ ClCuN ₄ O ₃ S	0,015	0,12	0,0015	0,015	0,003	0,015
Co(HL ³) ₂ NO ₃ C ₂₂ H ₂₀ Br ₄ CoN ₇ O ₅ S ₂	0,003	0,007	-	-	0,0015	0,003
HL ¹ - C ₁₁ H ₁₃ N ₃ OS	0,007	0,06	0,007	0,06	-	-
HL ² - C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₃ S	-	-	-	-	-	-
HL ³ - C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ N ₃ OS	0,003	0,007	0,0015	0,003	0,0015	0,003
HL ⁴ - C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	-	-	-	-	-	-
Furacilina	0,009	0,009	0,005	0,005	0,005	0,005

Notă: * HL¹ C₁₁H₁₃N₃OS
HL² C₉H₁₀N₄O₃S

HL³ C₁₁H₁₁Br₂N₃OS
HL⁴ C₁₂H₁₅N₃O₂S

În mod separat 3 compuși, liganzii cărora nu au activitate antibacteriană față de *Staphylococcus aureus* au manifestat activitate antibacteriană față de această tulpină. Astfel clorura de bis(2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă)cupru(II) a manifestat activitate antibacteriană la nivelul de CMI de 0,25 mg/mL și CMB – de 0,5 mg/mL, în timp ce ligandul (2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamida) nu are efect antibacterian. Cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbotoamido) cupru și Cloro(2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbotoamido) cupru au ca ligand 2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamida, care nu are efect antibacterian față de *Staphylococcus aureus*. Compușii coordinative cu cupru numiți mai sus au, însă, o activitate antistafilococică relevantă.

O activitatea practic identică o au compușii din acest grup și față de tulpina *Bacillus cereus* ГИСК 8035. Excepție prezintă compusul care conține cobalt (III), VGB 23, care este lipsit de acțiune antibacteriană față de tulpina *Bacillus cereus* ГИСК 8035. Compusul VGB 28 are o activitate antibacteriană față de *Bacillus cereus* care este de 10 ori mai mare comparativ cu acțiunea față de *Staphylococcus aureus*.

Față de tulpina de fungi levuriformi compușii din acest grup au manifestat efecte antimicrobiene mai atenuate, comparativ cu tulpinile de bacterii Gram +, dar suficient de înaltă, ca aceste substanțe să prezinte interes pentru cercetările ulterioare. Ligandul 2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă este unicul dintre liganzi, care are efect antifungic față de *Candida albicans*, valorile CMI și CMF fiind de 1,5 și 3,0 mg/mL respectiv. Același nivel al activității antifungice a fost determinat și pentru compușii coordinativi sintetizați în baza acestui ligand - VGB 24 și VGB 23. Ceilalți compuși din acest grup au avut o activitate puțin mai joasă comparativ cu furacilina față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231, iar compusul VGB 2 nu are acțiune antimicrobiană față de aceasta.

Tabelul 3.8. Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II) și Co(III) care conțin hidrazincarbotoamidă față de microorganismele Gram- (mg/mL)

Compusul	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		<i>Salmonella enterica</i> (S. Abony ГИСК 03/03)	
	CMI	CBM	CMI	CBM
Cu(HL ¹)Cl·H ₂ O C ₁₁ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	0,03	0,06	0,03	0,06
Cu(HL ¹)Cl C ₁₅ H ₁₄ ClCuN ₃ OS	0,25	0,5	0,25	0,5
Cu(HL ²) ₂ Cl ₂ C ₁₈ H ₂₀ CuCl ₂ N ₈ O ₆ S ₂	0,5	-	0,25	0,5
Cu(L ¹)H ₂ O C ₁₁ H ₁₃ CuN ₃ O ₂ S	0,015	0,03	0,03	0,12
Cu(HL ³)NO ₃ ·H ₂ O C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ CuN ₄ O ₅ S	-	-	-	-
Cu(HL ⁴)Cl C ₁₂ H ₁₄ ClCuN ₃ O ₂ S	0,03	0,12	0,015	0,06
Cu(HL ⁴)Cl C ₁₁ H ₁₁ ClCuN ₄ O ₃ S	0,015	0,12	0,12	0,12
Co(HL ³) ₂ NO ₃ C ₂₂ H ₂₀ Br ₄ CoN ₇ O ₅ S ₂	-	-	-	-
HL ¹ - C ₁₁ H ₁₃ N ₃ OS	-	-	-	-
HL ² - C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₃ S	-	-	-	-
HL ³ - C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ N ₃ OS	-	-	-	-
HL ⁴ - C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	-	-	-	-
Furacilina	0,012	0,024	0,06	0,25

Notă: * HL¹ C₁₁H₁₃N₃OS
HL² C₉H₁₀N₄O₃S

HL³ C₁₁H₁₁Br₂N₃OS
HL⁴ C₁₂H₁₅N₃O₂S

Activitatea antimicrobiană a compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II) și Ni(II) care conțin hidrazincarbotoamidă față de microorganismele Gram - este prezentată în tabelul 3.8. Liganzii

utilizați pentru sinteză și doi compuși: VGB 24 și VGB 23 nu au acțiune antibacteriană față de cele două tulpini testate. Restul compușilor din acest grup au avut acțiune antibacteriană atât față de *Escherichia coli* ATCC 25922, cât și față de *Salmonella enterica* (S. Abony ГИСК 03/03). Cea mai înaltă acțiune antibacteriană față de tulpina *Escherichia coli*, ATCC 25922 a avut-o VGB 16 și VGB 28, valorile activității cărora sunt comparabile cu cele obținute pentru antisepticul de referință.

De asemenea, față de această tulpină o activitate înaltă o au VGB 1 și VGB 2, care au arătat acțiune antibacteriană la valori ale CMI de 0,03 mg/mL. VGB 10 nu are efect bactericid asupra tulpinii *Escherichia coli*, ATCC 25922, pentru care CMI este de 0,5 mg/mL.

Trei dintre compușii testați au o activitate antibacteriană față de *Salmonella enterica* (S. Abony ГИСК 03/03) mai înaltă comparativ cu antisepticul de referință. Astfel VGB 1 și VGB 16 au valoarea CMI de 0,03 mg/mL, iar valoarea CMB de 0,06 și 0,12 mg/mL respectiv.

Cea mai pronunțată activitate antibacteriană față de *Salmonella enterica* o are compusul VGB 26, cu CMI de 0,015 mg/mL și CMB de 0,06 mg/mL. Menționăm, că toți compușii cuprului din acest grup au o activitate bactericidă față de *Salmonella enterica* comparabilă sau mai pronunțată comparativ cu cea demonstrată de furacilină.

3.5. Activitatea antimicrobiană a compușilor hidrazonici ai Cu(II) ce conțin S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat

Din acest grup fac parte 7 compuși, toți fiind caracterizați prin activitate antimicrobiană semnificativă față de bacteriile Gram + și Gram - testate, precum și față de fungii levuriformi. În toți acești compuși ligandul S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat este coordonat cu cuprul (II).

Rezultatele obținute pentru activitatea antimicrobiană a celor 7 compuși coordonativi ai Cu(II) și a ligandului utilizat față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și față de tulpina de fungi *Candida albicans* ATCC 10231 sunt prezentate în tabelul 3.9.

Inițial menționăm, că ligandul are o activitate antimicrobiană față de ambele tulpini mai joasă comparativ cu compușii coordonativi cu cupru, ceea ce demonstrează că coordinarea ligandului organic cu ionul de cupru amplifică semnificativ proprietățile antimicrobiene ale compusului obținut [6, 122, 123].

Trei dintre acești compuși au arătat valori ale CMI față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 mai joase comparativ cu antisepticul de referință. Acestea sunt $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})\text{Cl}] \cdot \text{H}_2\text{O}$ și $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})\text{Br}] \cdot 0,5\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ cu CMI de 3 μg/mL, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}) (\text{H}_2\text{O})]$ cu CMI de 5 μg/mL. Pentru primii doi compuși CMB față de *Staphylococcus aureus* este, de asemenea, mai mică comparativ cu cea a antisepticului de referință și constituie 7 μg/mL.

Tabelul 3.9. Activitatea antimicrobiană a compuşilor hidrazonici ai Cu(II) ce conţin S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231 (mg/mL) (brevet 4611)

Compusul	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	CMI	CMB	CMI	CMF
[Cu(H ₂ L)Cl] H ₂ O	0,003	0,007	0,003	0,015
[Cu(H ₂ L)Br] 0,5C ₂ H ₅ OH	0,003	0,007	0,003	0,015
[Cu(H ₂ L) (H ₂ O)]	0,003	0,015	0,015	0,030
[Cu(H ₂ L)Cl] DMSO	0,06	0,25	0,06	0,12
[Cu(H ₂ L)Br] DMSO	0,06	0,12	0,03	0,06
[Cu(HL)(DMSO)]	0,03	0,03	0,03	0,06
[Cu(HL)(DMF)]	0,03	0,03	0,03	0,03
L *	0,12	0,25	0,12	0,12
Furacilina	0,009	0,009	0,06	0,25

Notă: * L

C₁₃H₁₁N₃SO₃ CH₃OH

Toți compuşii testați, dar și ligandul aplicat pentru sinteza acestora au manifestat acțiune antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231. Cea mai înaltă activitate au avut-o compuşii [Cu(H₂L)Cl] H₂O și [Cu(H₂L)Br] 0,5C₂H₅OH, ambii cu CMI de 0.003 mg/mL și CMF de 0,015 mg/mL. Trei compuşii -[Cu(H₂L)Cl] DMSO, [Cu(HL)(DMSO)], și [Cu(HL)(DMF)] – de asemenea, se caracterizează prin acțiune pronunțată antifungică față de *Candida albicans*. CMI pentru acești compuşii a fost de 0,03 mg/mL, iar CMF a fost de 0,06 mg/mL pentru primii doi compuşii și de 0,06 mg/mL – pentru ultimul.

Activitatea antimicrobiană a compuşilor hidrazonici ai Cu(II) ce conţin S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat față de microorganismele Gram(-) este prezentată în tabelul 3.10.

Tabelul 3.10. Activitatea antimicrobiană a compuşilor hidrazonici ai Cu(II) ce conţin S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat față de microorganismele Gram- (mg/mL)

Compusul	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	CMI	CBM	CMI	CBM
[Cu(H ₂ L)Cl] H ₂ O	0,125	0,250	0,125	0,250
[Cu(H ₂ L)Br] 0,5C ₂ H ₅ OH	0,500	0,500	0,500	0,500
[Cu(H ₂ L) (H ₂ O)]	0,500	1,000	0,500	0,500
[Cu(H ₂ L)Cl] DMSO	0,03	0,06	1,000	2,000
[Cu(H ₂ L)Br] DMSO	0,500	0,500	0,500	0,500
[Cu(HL)(DMSO)]	0,500	0,500	0,500	0,500
[Cu(HL)(DMF)]	0,500	0,500	0,500	0,500
L - C ₁₃ H ₁₁ N ₃ SO ₃ CH ₃ OH	0,500	0,500	0,500	0,500
Furacilina	0,012	0,024	0,06	0,15

Notă: * L

C₁₃H₁₁N₃SO₃ CH₃OH

Performanța compușilor din acest grup în calitate de remedii antibacteriene a fost mult mai modestă în cazul bacteriilor Gram -. Compușii testați au fost mai activi sau la fel de activi ca ligandul folosit pentru sinteză, dar au fost mai slabi comparativ cu antisepticul de referință. Astfel, în cazul tulpinii *Escherichia coli*, ATCC 25922 CMI a fost în limitele de 0,03 și 0,5 mg/mL, iar CMB a fost de 0,06 -1,0 mg/mL. Se evidențiază compusul $[Cu(H_2L)Cl]$ DMSO, care are activitate antibacteriană față de această tulpină foarte apropiată de activitatea antisepticului de referință.

Față de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 CMI a compușilor testați a fost între 0,125 și 1,0 mg/mL, iar CMB – între 0,25 și 2,0 mg/mL. Valorile înregistrate au fost de 2-15 ori mai mici comparativ cu cele caracteristice antisepticului de referință.

3.6. Acțiunea antimicrobiană a compușilor de origine naturală și combinațiilor lor cu compușii coordinativi ai metalelor de tranziție

De rând cu noile substanțe obținute prin sinteză chimică în calitate de remedii antimicrobiene în lume în permanență se testează un număr mare de compuși naturali. Diversitatea acestora este impunătoare, fiind prezente substanțe din toate clasele de compuși organici cunoscuți. Din diversitatea enormă a acestora în prezenta teză au fost incluse trei preparate de origine naturală – produse obținute în rezultatul cercetărilor științifice realizate sub conducerea academicianului Valeriu Ridic (preparatul BioR și extractul hidro-etanolc din *Arthrospira platensis* ES) și sub conducerea academicianului Teodor Lupașcu (enotanina hidrosolubilă obținută din semințe de viță-de-vie).

Este cunoscut faptul, că compușii naturali manifestă efectele biologice la concentrații mai mari ca compușii chimici, iar efectul, de cele mai multe ori este țintit și nu afectează alte celule decât cele vizate direct. Din acest punct de vedere produsele de origine naturală sunt mai ușor acceptate, dar sunt mai complicat de gestionat. Rezultatele obținute în procesul acestei testări confirmă teza cu referire la concentrațiile active. Observăm că CMI și CMB/CMF obținute sunt mai mari, comparativ cu cele descrise în compartimentele anterioare. Cele mai mici valori ale CMI au fost obținute pentru preparatul BioR față de tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 și avut valoarea de 0,626 mg/mL. Astfel, nu putem evidenția o diferențiere de efect în dependență pe poziția sistematică a microorganismului, lista fiind constituită din două specii Gram+, o specie Gram- și o specie de fungi levuriformi. CMB a BioR-ului față de tulpinile testate a fost de 2,5-5,0 mg/mL, iar CMF față de *Candida albicans* ATCC 10231 a fost de 1,25 mg/mL.

Extractul hidroetanolic ES este mai puțin activ comparativ cu preparatul BioR. Cea mai înaltă activitate antimicrobiană acesta îl manifestă față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231, cu CMI de 1,25 mg/mL și CMF de 2,5 mg/mL. Față de tulpinile bacteriene Gram+ și Gram- CMI

este de 2,5-5,0 mg/mL, iar CMB – de 5,0-10,0 mg/mL. Enotanina hidrosolubilă manifestă cea mai înaltă activitate antibacteriană față de *Bacillus cereus*, CMI fiind de 0,7 mg/mL, iar CMB – de 3,0 mg/mL. Față de celelalte tulpini de referință luate în studiu CMI este de la 3,0 la 6,0 mg/mL, iar CMB – de la 6,0 la 25,0 mg/mL.

Rezultatele obținute pentru acțiunea antimicrobiană a celor trei compuși de origine naturală față de microorganismele luate în studiu sunt prezentate în tabelul 3.11.

Tabelul 3.11. Activitatea antimicrobiană a compușilor de origine naturală față de microorganismele de referință (mg/mL)

Tulpina	BioR		ES		Enotanina solubilă	
	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,625	1,25	2,5	5,0	3,0	6,0
<i>Bacillus cereus</i> ГИСК 8035	0,625	1,25	5,0	5,0	0,7	3,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,625	1,25	2,5	5,0	3,0	6,0
<i>Salmonella enterica</i> ГИСК 03/03y	1,25	2,50	2,5	5,0	6,0	12,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	2,5	5,0	5,0	10,0	6,0	25,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0	6,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,625	1,25	1,25	2,5	3,0	6,0

În continuare au fost realizate diferite combinații între compușii chimici și cei naturali. Unele cercetări anterioare au demonstrat, că această tactică poate da efecte de amplificare a efectelor antimicrobiene și diminuarea efectelor adverse ale substanțelor chimice [30-32]. Pornind de la faptul, că preparatele de origine naturale sunt suplimentate la compozițiile antibacteriene în scopul diminuării efectelor toxice asupra celulelor care nu prezintă ținte directe ale substanței de bază, este important, ca acestea să nu diminueze sau să compromită efectul antimicrobian. Iată de ce în continuare am testat efectele antimicrobiene ale combinațiilor dintre compușii chimici evidențiați în etapele de screening și compușii de origine naturală.

Pentru fiecare tulpină microbiană s-au aplicat concentrațiile minime de inhibiție, determinate la etapele anterioare, atât pentru compușii chimici, cât și pentru preparatele de origine naturală. Pentru comparare a fost luat antibioticul cu spectru larg de acțiune ampicilina, în concentrație de 15 μg/mL.

Rezultatele obținute la combinarea compușilor chimici cu activitate față de *Staphylococcus aureus* cu compușii de origine naturală sunt prezentate în figura 3.1.

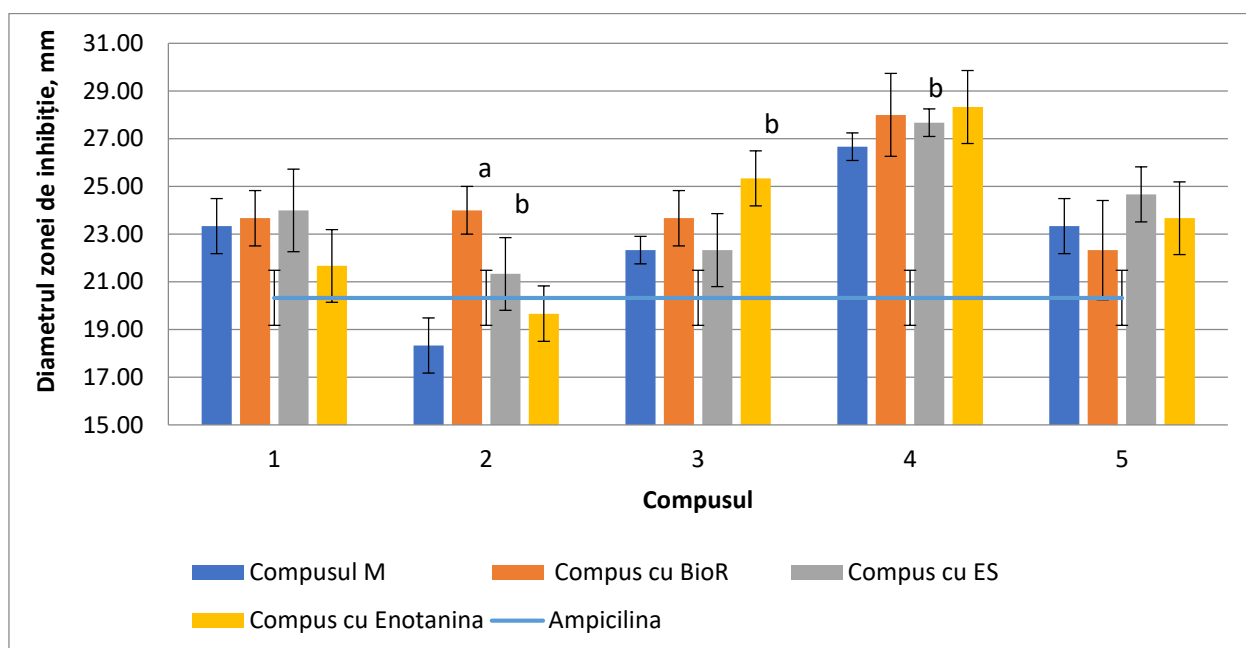


Figura 3.1. Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală: 1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{NiOS}$ (CMSA 68); 2. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_3\text{O}_2\text{S}$ (VGB 16); 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}$ (VGB 24); 4. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$ (VGB 1); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{OS}$ (VGB 2) (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compusul 1 – tab.2.1; L pentru compușii 2-5, tab.2.4)

Au fost testați 5 compuși, dintre care unul face parte din grupul de tiosemicarbazonați care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-benziliden)-hidrazincarbotoamidă, iar alți patru – din grupul de compuși tiosemicarbazonați care conțin 2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă; 2-[(5-nitrofur-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă; 2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă și 2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă. Din figură se vede, că diametrul zonelor de inhibiție a creșterii tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, specifice compușilor chimici nu s-au diminuat ca rezultat al combinării cu preparatele de origine naturală. Din contra, au fost înregistrate creșteri veridice din punct de vedere statistic al acestui parametru. Primul compus - CMSA 68 își păstrează activitatea antibacteriană față de *Staphylococcus aureus* la același nivel indiferent de prezența preparatelor de origine naturală adăugate, iar valorile obținute pentru zonele de inhibiție a creșterii patogenului în toate combinațiile nu se deosebesc din punct de vedere statistic de cele caracteristice compusului chimic aplicat independent.

În cazul compusului VGB16 combinațiile cu preparatul BioR și extractul hidro-etanolic din spirulină activitatea antibacteriană față de *Staphylococcus aureus* a crescut veridic comparativ

cu activitatea compusului aplicat individual. Astfel, în cazul preparatului BioR $p=0,0015$ ($p<0,005$), iar în cazul preparatului ES $p=0,0267$ ($p<0,05$). Putem presupune, că preparatele din spirulina acționează sinergic cu compusul chimic menționat și aceștia pot fi utilizați împreună pentru formularea unei compoziții cu acțiune antibacteriană față de tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Activitatea antibacteriană față de *Staphylococcus aureus* a VGB 24 de asemenea, nu este diminuată în prezența preparatelor de origine naturală. În cazul acestui compus un efect sinergic a fost observat în cazul combinării lui cu enotanina hidrosolubilă, semnificația diferenței dintre variante fiind înaltă, $p=0,0079$.

Activitatea antibacteriană a VGB 1 față de tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nu a suferit diminuări la combinarea lui cu preparatele de origine naturală. Și în acest caz a fost înregistrat un exemplu de acțiune sinergică a compusului cu extractul hidro-etanolic din spirulină ($p=0,050$).

Rezultatele obținute la combinarea compușilor chimici cu activitate față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 cu compușii de origine naturală sunt prezentate în figura 3.2.

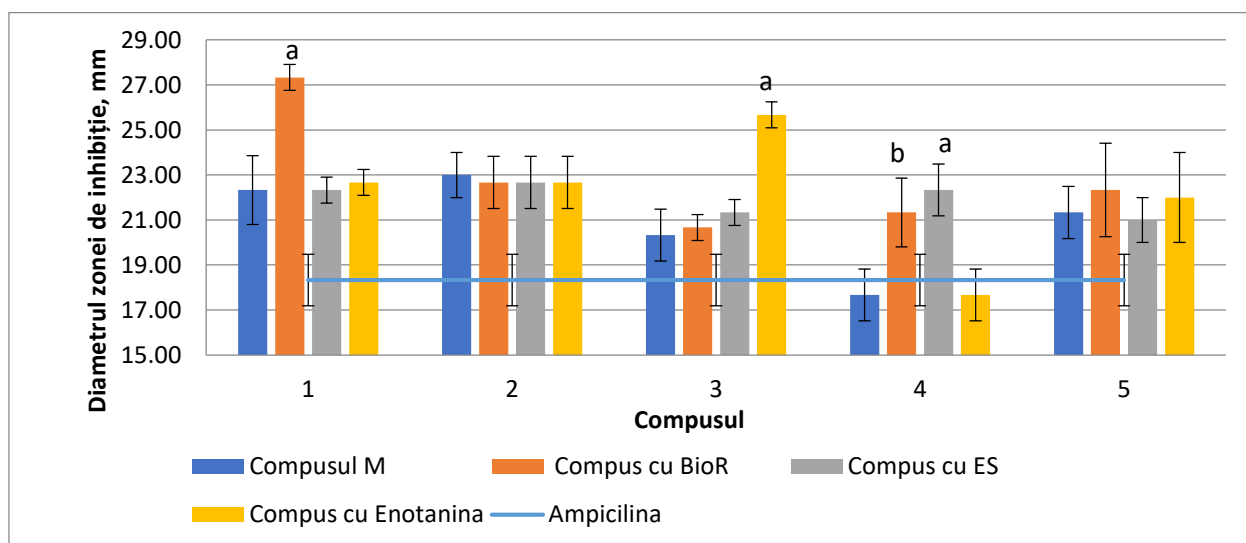


Figura 3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina *Bacillus cereus*

ГИСК 8035 în combinare cu compușii de origine naturală: 1. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$; 2. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$ $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{OS}$; 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}$; 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$; 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$ (^a- $p<0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p<0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L, tab.2.4)

Toți cei cinci compuși cu activitatea antibacteriană față de tulpina menționată fac parte din grupul compușilor tiosemicarbazonați ai Cu(II) și Ni(II) care conțin 2-(2-hidroxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă; 2-[(5-nitrofuran-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il) hidrazincarbo-tioamidă; 2-(3,5-dibromo-2-hidroxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbo-tioamidă și 2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă.

Ca și în cazul *Staphylococcus aureus*, preparatele de origine naturală nu au redus din activitatea antibacteriană a celor cinci compuși selectați față de *Bacillus cereus*. Din contra, au fost înregistrate câteva cazuri de amplificare a acțiunii acestora. Astfel, preparatul BioR din spirulină a amplificat activitatea a doi dintre compușii testați, și anume: VGB 1 ($p=0,003$) și a VGB 28 ($p=0,0147$).

Acțiunea antibacteriană față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035 a celui de al doilea compus nominalizat de asemenea, este amplificată de extractul hidroetanolic din spirulină ($p=0,0038$). Activitatea antibacteriană față de *Bacillus cereus* a nitratului de VGB 24 este amplificată de prezența enotaninei hidrosolubile ($p=0,001$). Astfel, putem afirma că și în cazul tulpinii *Bacillus cereus* ГИСК 8035 acțiunea antibacteriană a trei dintre compușii chimici selectați poate fi sporită datorită combinării lor cu preparatele naturale BioR, extractul hidroetanolic din spirulină și enotanina hidrosolubilă.

Rezultatele obținute la combinarea compușilor chimici cu activitate față de *Escherichia coli* ATCC 25922 cu compușii de origine naturală sunt prezentate în figura 3.3.

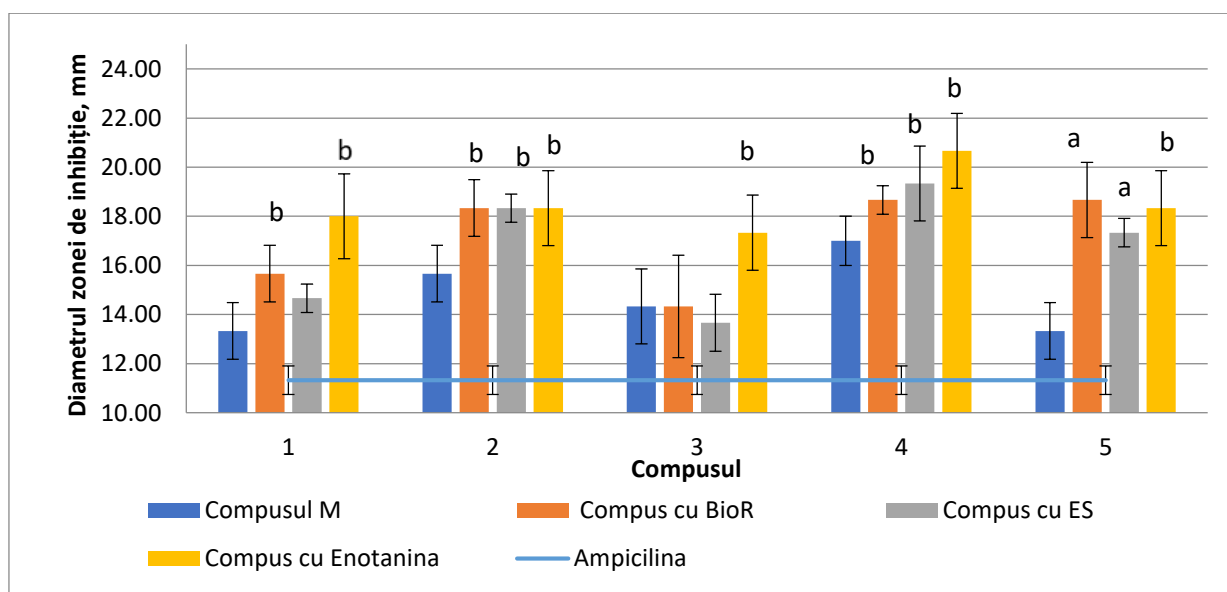


Figura 3.3. Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina *Escherichia coli*

ATCC 259223 în combinație cu compușii de origine naturală: 1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{NiOS}$ (CMSA 68); 2. $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}$ $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ (CMSA 25) 3. $\text{Cu}(\text{L}^1)_2\text{H}_2\text{O}$

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_3\text{O}_2\text{S}$ (VGB 16); 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)_2\text{Cl}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$ (VGB 28); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)_2\text{Cl}$

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$ (VGB 26) (^a- $p<0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p<0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2 – tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4)

În calitate de substanțe antibacteriene active față de *Escherichia coli* ATCC 259223 au fost selectați doi compuși tiosemicarbazonați ai Cu(II) și Co(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-benziliden)-hidrazincarbotoamidă și trei compuși tiosemicarbazonați ai Cu(II) care conțin

2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă; 2-[(5-nitrofur-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă; 2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă și 2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă. În majoritatea variantelor experimentale preparatele de origine naturală adăugate la compuşii chimici evidențiați au condus la creșterea activității antimicrobiene a amestecului față de tulpina bacteriei Gram- *Escherichia coli* ATCC 259223.

Prezența preparatului BioR obținut din spirulină a dus la mărirea veridică din punct de vedere statistic a activității antimicrobiene a 4 din cei cinci compuși testați. Astfel, activitatea CMSA 25 ($\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl} \cdot \text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$) ; CMSA 68 ($\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl} \cdot \text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{NiOS}$;) și a VGB 28 ($\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \cdot \text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$) cu adaos de BioR se deosebește de cea a compusului respectiv aplicat de unul singur la valori ale lui $p < 0,05$, iar în cazul compusului VGB 26 ($\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \cdot \text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$) – la valori de $p < 0,005$.

Extractul hidroetanolic din biomasa de spirulină potentează acțiunea antibacteriană față de *Escherichia coli* pentru 3 dintre cei 5 compuși analizați: CMSA 25 ($\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl} \cdot \text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$), VGB 28 ($\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \cdot \text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$) și VGB 26 ($\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \cdot \text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$). Prezența enotaninei hidrosolubile a dus la creșterea statistic veridică a activității antibacteriene față de *Escherichia coli* a tuturor celor 5 compuși testați.

Efectele sinergice ale preparatelor de origine naturală și a compuşilor chimici noi sunt foarte importante în contextul numărului limitat de compoziții eficiente contra bacteriilor Gram-. În cazul tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 preparatele din spirulină și enotanina solubilă în apă pot spori efectul antibacterian al compuşilor coordinați cu nichel, cobalt și cupru în componența lor.

Din totalul de compuși chimici noi studiați au fost selectați cinci, care au manifestat activitate antibacteriană pronunțată față de o altă tulpină de bacterii Gram- *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y. Acești compuși fac parte din două grupuri: unul din compuşii tiosemicarbazonați ai Cu(II), care conțin metil-N'-(2-hidroxi-benziliden)-N-prop-2-en-1-il carbamohidrazonotioat (TI 22) și alți patru din grupul compuşilor tiosemicarbazonați ai Cu(II) care conțin 2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă ; 2-[(5-nitrofur-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă (VGB 10) ; 2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă (VGB 24) și 2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonatamidă (VGB 26). Rezultatele sunt prezentate în figura 3.4.

Cu excepția compusului VGB 28, compuşii examinați în raport cu tulpina *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y au demonstrat activitate antibacteriană semnificativă, care poate fi mărită în prezența preparatelor de origine naturală. Astfel, TI 3 are diametrul zonei de inhibiție de 17,33

mm, iar la adăugarea preparatului BioR aceasta crește până la 20,67, diferența fiind veridică din punct de vedere statistic ($p=0,0011$). La fel, activitatea antibacteriană a compusului crește și în cazul adaosului de extract hidroetanolic din spirulină, dar și a enotaninei hidrosolubile, dar în aceste cazuri la un nivel mai jos de semnificație ($p < 0,05$).

Activitatea hidratului de cloro(2-(2-hidroxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin-carbo tioamido)cupru (VGB1) este modificată în direcția intensificării doar în prezența enotaninei hidrosolubile ($p=0,017$). Preparatele obținute pe bază de spirulină, cu toate că au demonstrat o tendință de creștere a diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii *Salmonella enterica*, nu au generat diferențe semnificative din punct de vedere statistic.

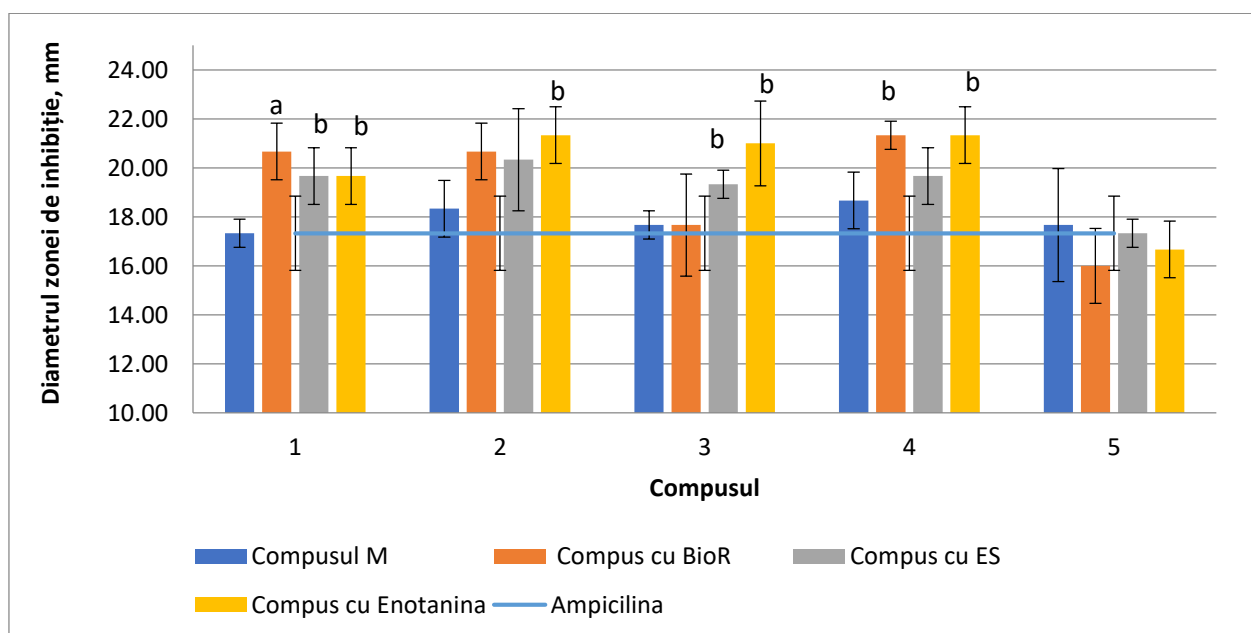


Figura 3.4. Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y în combinaire cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Cu}(\text{L})\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{CuN}_4\text{O}_6\text{S}$ (**TI 3**) ; 2. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$ (**VGB 1**);
3. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_3\text{O}_2\text{S}$; (**VGB 16**) . 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$ (**VGB 26**); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$ (**VGB 28**) (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compusul 1 – tab.2.3; L pentru compușii 2-5, tab.2.4)

Activitatea antibacteriană a compusului VGB 16 față de *Salmonella enterica* este amplificată în prezența extractului hidroetanolic din biomasa de spirulină și de enotanina hidrosolubilă. În ambele cazuri diferențele între diametrele zonelor de inhibiție a creșterii bacteriei Gram(-) *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y, provocate de compusul aplicat de unul singur și

împreună cu preparatele de origine natural menționate sunt veridice din punct de vedere statistic ($p < 0,05$).

Zona de inhibiție a VGB 1 crește la adăugarea preparatului BioR din spirulina și a enotaninei hidrosolubile. În ambele cazuri diferențele sunt statistic veridice ($p < 0,05$).

Mai mulți dintre compușii testați au manifestat activitate antifungică față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231. Pentru testele de compatibilitate cu preparatele de origine naturală au fost selectați 5 compuși din două grupuri testate: doi compuși tiosemicarbazonați ai Cu(II), și Ni(II) care conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-benziliden)-hidrazincarbotoamidă și trei compuși tiosemicarbazonați ai Cu(II) și Co(II) care conțin 2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă; 2-[(5-nitrofur-2-il)metiliden]-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă; 2-(3,5-dibromo-2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă și 2-(2-hidroxi-3-metoxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotoamidă. Acești compuși au manifestat efecte antimicrobiene la concentrații reduse ale substanței active. Rezultatele obținute pentru combinațiile de compus chimic, preparate din spirulina și enotanina solubilă sunt prezentate în figura 3.5.

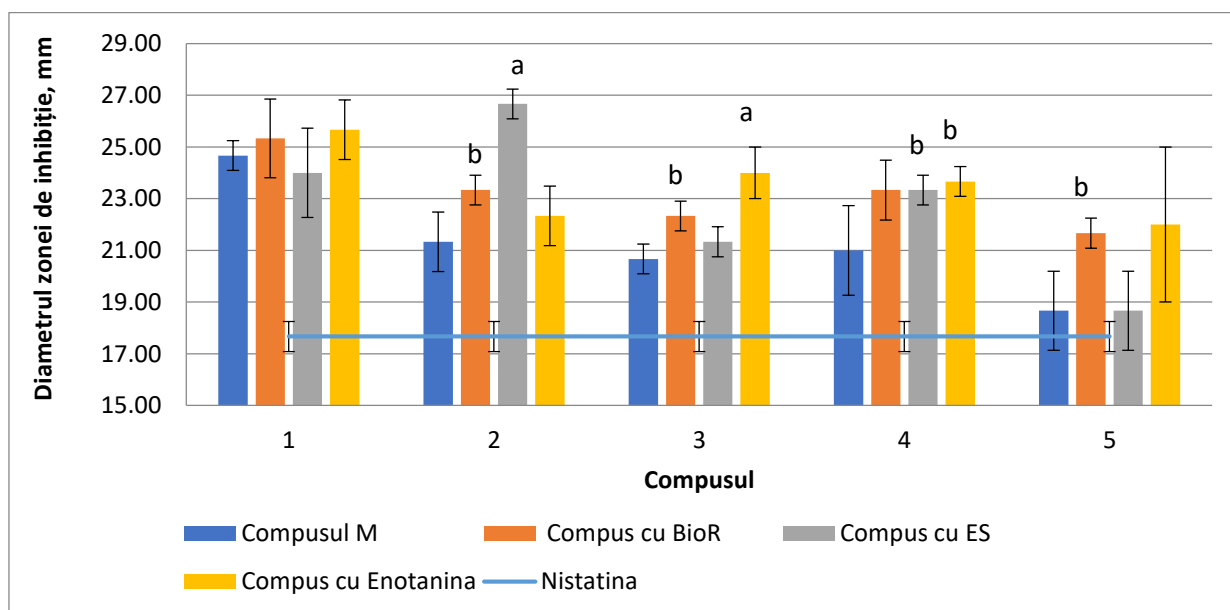


Figura 3.5. Activitatea antimicrobiană a compușilor activi față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 în combinație cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl} \cdot \text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{NiOS}$ (CMSA 68);
 2. $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl} \cdot \text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$ (CMSA 25);
 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}$ (VGB 24);
 4. $\text{Co}(\text{HL}^3)_2\text{NO}_3 \cdot \text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Br}_4\text{CoN}_7\text{O}_5\text{S}_2$ (VGB 23);
 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \cdot \text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$ (VGB 28)
- (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2 – tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4)

Compusul CMSA 68, care are cea mai înaltă activitate față de tulpina de fungi levuriformi *Candida albicans* ATCC 10231, atunci când este aplicat de unul singur, a rămas la același nivel

de activitate la adăugarea preparatelor de origine naturală, zonele de inhibiție a creșterii fungilor rămânând neschimbate ca dimensiune în toate variantele experimentale.

Preparatul BioR obținut din biomasă de spirulină a amplificat activitatea antifungică a trei dintre compușii selectați dintre care unul este cu conținut de cobalt, iar alți doi - cu conținut de cupru, și anume a CMSA 25, VGB 24 și a VGB 28. În toate cele trei cazuri s-a atestat o creștere veridică din punct de vedere statistic a zonelor de inhibiție a creșterii *Candida albicans*, $p < 0,05$ pentru toate variantele.

Extractul hidro-etanolic din biomasa de spirulina de asemenea, a fost un factor sinergic pentru acțiunea antifungică a doi dintre compușii testați – CMSA 25 și VGB 23. Ambii compuși au în calitate de parte componentă cobaltul. Este de menționat, că în cazul combinării CMSA 25 cu extractul hidroetanolic din spirulina a fost obținută cea mai mare putere de inhibiție a creșterii *Candida albicans* în cadrul acestei testări, diferența dintre efectul combinației fiind veridic mai înalt față de efectul compusului aplicat de unul singur la un nivel de semnificație de $p = 0,001$.

Enotanina hidrosolubilă, de asemenea, a amplificat efectul antifungic a doi dintre compușii testați – VGB 23 și VGB 24.

Astfel, în acest compartiment al lucrării, pentru fiecare tulpină microbiană studiată, au fost selectați 5 cei mai activi compuși, identificați la etapa de screening:

Pentru ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl} \text{ C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{NiOS}$;
2. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O} \text{ C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_3\text{O}_2\text{S}$;
3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \text{ C}_{11}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}$;
4. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O} \text{ C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$;
5. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \text{ C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{OS}$

Pentru ***Bacillus cereus* ГИСК 8035:**

1. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O} \text{ C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$;
2. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \text{ C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{OS}$;
3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \text{ C}_{11}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}$;
4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \text{ C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$;
5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \text{ C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$

Pentru ***Escherichia coli* ATCC 259223:**

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl} \text{ C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{NiOS}$;
2. $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl} \text{ C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$;
3. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O} \text{ C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_3\text{O}_2\text{S}$;
4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \text{ C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$;
5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl} \text{ C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$

Pentru ***Salmonella enterica* ГИСК 03/03y:**

1. $\text{Cu(L)NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{CuN}_4\text{O}_6\text{S}$;
2. $\text{Cu(HL}^1\text{)Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$;
3. $\text{Cu(L}^1\text{)H}_2\text{O}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_3\text{O}_2\text{S}$;
4. $\text{Cu(HL}^4\text{)Cl}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClCuN}_3\text{O}_2\text{S}$;
5. $\text{Cu(HL}^4\text{)Cl}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$

Pentru ***Candida albicans* ATCC 10231:**

1. $\text{Ni(HL}^3\text{)}_2\text{Cl}$ $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNiN}_3\text{NiOS}$;
2. $\text{Co(HL}^1\text{)}_2\text{Cl}$ $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{CoClN}_6\text{O}_2\text{S}_2$;
3. $\text{Cu(HL}^3\text{)NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}$;
4. $\text{Co(HL}^3\text{)}_2\text{NO}_3$ $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Br}_4\text{CoN}_7\text{O}_5\text{S}_2$;
5. $\text{Cu(HL}^4\text{)Cl}$ $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClCuN}_4\text{O}_3\text{S}$

Acești compuși au manifestat o activitate antibacteriană/antifungică perfoamnată fiind aplicați individual, deaceia au fost incluși în studiul ulterior, în care s-a făcut încercarea de amplifica efectul lor prin combinare cu compuși de origine naturală.

Astfel, putem constata, că majoritatea compușilor chimici noi selectați la etapa de screening pentru activitate antimicrobiană pronunțată formează compoziții active cu extracte din spirulina și cu enotanina hidrosolubilă, iar efectul antibacterian și antifungic al amestecurilor este mai pronunțat, comparativ cu cel al compusului respectiv aplicat individual. Ținând cont de faptul, că preparatele de origine naturală au de cele mai multe ori și efecte benefice asupra celulelor, care nu prezintă ținte directe ale compușilor chimici, efectele *in vivo* ale acestor combinații pot fi mult mai valoroase, decât doar acțiunea antimicrobiană, iar aceasta poate constitui obiectul unor studii de perspectivă.

3.7. Concluzii la capitolul 3

Compușii tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) cercetați în cadrul acestui studiu manifestă activitate antimicrobiană față de bacterii Gram+ și Gram- și față de *Candida albicans*.

În majoritatea cazurilor investigate, activitatea antimicrobiană a liganzilor este semnificativ mai joasă comparativ cu activitatea compușilor coordinativi ai acestora cu metalele Cu(II), Co(III) și Ni(II). Cele mai performante rezultate au fost obținute pentru două tipuri de compuși studiați: compușii ce conțin N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-hidroxibenziliden)-hidrazin carbotioamidă și 2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbotioamidă.

Activitatea majorității dintre compușii studiați este specifică cu referire la tipul de microorganisme și tulpinile testate. Astfel, majoritatea compușilor au manifestat efecte antimicrobiene de diferită intensitate față de bacteriile Gram+, în lipsa acestora față de bacteriile Gram- și *Candida albicans*. Compușii hidrazonici ai Cu(II) ce conțin S-metil- β -N-(2-hidroxi-3-carboxinaftil metilen) ditiocarbazonat au manifestat activitatea pronunțată față de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 și *Candida albicans* ATCC 10231, și o activitate antimicrobiană moderată față de tulpinile de microorganisme Gram-.

Compusul TI 22 are un efect antifungic performant față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 cu valori ale CMI și CMF la 0,7 μ g/mL, fiind un candidat excelent pentru testări ulterioare. Compusul CMSA 68 se caracterizează prin activitate antimicrobiană universală în raport cu tulpinile de microorganisme testate în cadrul acestui studiu. Astfel, concentrațiile compusului cu efecte asupra tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ATCC 10231 sunt de până la 0.015 mg/mL, ceea ce poate fi apreciat cu activitate antimicrobiană înaltă. O activitate antimicrobiană cu caracter universală a manifestat VGB 28, cu efecte performante față de *Bacillus cereus* ГИСК 8035, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y și *Candida albicans* ATCC 10231 la concentrații de până la 15 μ g/mL.

Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi poate fi amplificată prin elaborarea de combinații între aceștia și preparatele de origine naturală – extracte din biomasa de spirulină și enotantină hidrosolubilă.

4. MECANISMELE POSIBILE DE ACȚIUNE A NOILOR COMPUȘI ASUPRA MICROORGANISMELOR PATOGENE

Tiosemicarbazonele și efectele lor biologice sunt studiate deja de câteva decenii, dar până în prezent, mecanismele acțiunii antimicrobiene a acestor compuși nu sunt cunoscute în detaliu. Marea majoritate a publicațiilor consacrate acestor substanțe remarcabile raportează în special detalii ce țin de sinteza și caracteristica structurală a acestora [29, 31, 40, 41, 51, 57, 59, 66, 68, 74, 84, 88, 111, 113, 153, 172, 175, 178, 218]. Ce ține de efectele biologice, sunt date valorile concentrației minime de inhibiție a creșterii sau celei minime bactericide/fungicide față de cele mai importante tulpini de referință utilizate în aceste scopuri și doar unele includ studii de elucidare a unor posibile mecanisme de acțiune.

Tiosemicarbazonele și complexele lor metalice sunt deja recunoscute pentru diverse activități biologice, fiind considerate în calitate de potențiale remedii în diferite condiții patologice, de la infecții microbiene până la proliferarea celulară anormală. Activitatea antiproliferativă a acestor substanțe este studiată mai intens și se cunosc mai multe despre mecanismele de acțiune în acest sens. Astfel, s-a stabilit că tiosemicarbazonele interacționează cu guanina din componenta ADN formând legături de hidrogen, ceea ce determină fragmentarea ADN-ului și în final - apoptoza celulelor canceroase [75].

Ribonucleotid reductaza (RNR), enzima care transformă ribonucleotidele în dezoxiribonucleotide și a cărei activitate corelează cu proliferarea celulară, este considerată una dintre principalele ținte ale tiosemicarbazonelor. De asemenea, se presupune existența unor ținte suplimentare, responsabile de efectele tiosemicarbazonelor și ale complexelor lor metalice, cum ar fi topoizomeraza II, metaloenzimele xantin oxidaza și tirozinaza [35].

Se poate presupune că unele dintre mecanismele cunoscute de acțiune ale tiosemicarbazonelor și complexelor lor metalice asupra celulelor tumorale ar putea fi, de asemenea, responsabile pentru eficacitatea antimicrobiană [153]. În același timp pot fi evidențiate și alte mecanisme, ceea ce indică asupra necesității unor studii profunde în acest domeniu.

4.1. Efectele compușilor noi cu acțiune antimicrobiană asupra permeabilității învelișurilor celulare ale microorganismelor patogene

Învelișurile celulare (membrana citoplasmatică, peretele celular și capsula) prezintă prima barieră de care se lovesc factorii antimicrobieni. Una dintre principalele funcții îndeplinite de membrana citoplasmatică este cea de asigurare a permeabilității selective, care asigură afluxul substanțelor necesare pentru asigurarea necesităților celulare și efluxul toxinelor, deșeurilor metabolice și a xenobioticelor. Anumite substanțe eliberate eronat de către celule în mediul extern

por servi drept markeri ai dereglării funcției de barieră chimică a membranei celulare. Printre acestea se numără enzime specifice, dar și acizii nucleici. În cazul organismelor procariote eliberarea acizilor nucleici în caz de deterioarare a membranei citoplasmatică este un proces rapid și ușor de monitorizat, în timp ce pentru organismele eucariote enzimele specifice, cum ar fi lactatdehidrogenaza, sunt un indicator mai util. Această enzimă este eliminată doar în cazul unui efect toxic asupra celulei, iar în condiții normale enzima este localizată în reticulul endoplasmatic.

La această etapă de studiu a fost cercetat procesul de eliberare a acizilor nucleici de către culturile bacteriene și de eliberare a lactatdehidrogenazei de către celulele fungice sub acțiunea compușilor chimici noi aplicați individual, dar și în combinație cu substanțele de origine naturală (extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă). Acțiunea compușilor și a combinațiilor a fost comparată cu acțiunea ampicilinei în cazul bacteriilor și a nistatinei în cazul fungilor levuriformi.

Rezultatele pentru *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sunt prezentate în figura 4.1. Ca și în cercetările descrise în capitolul anterior (subcapitolul 3.7), compușii chimici și cei naturali au fost aplicați în concentrații egale cu CMI stabilită la etapele anterioare, iar ampicilina – în concentrație de 15 $\mu\text{g/mL}$. Eliberarea de acizi nucleici în cazul biomasei martor netratate este neglijabilă ($\text{abs} = 0.014 \pm 0.004$), în timp ce în toate variantele experimentale fenomenul este unul foarte pronunțat cu valori ale absorbantei între 0.099 și 0.207). Și compușii de origine naturală au un efect toxic slab pronunțat, exprimat prin următoarele valori cu referire la eliberarea acizilor nucleici: preparatul BioR – $0,067 \pm 0,005$; Extractul din spirulină – $0,046 \pm 0,006$; enotanina hidrosolubilă – $0,058 \pm 0,004$.

Aplicați în mod individual, compușii chimici au afectat în mod diferit permeabilitatea celulară la tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Astfel, cel mai jos nivel de toxicitate în raport cu eliberarea de acizi nucleici de către celule a fost înregistrat în cazul compusului VGB 16.

În acest caz cantitatea de acizi nucleici eliberați este de 7,7 ori mai mare decât în cazul culturii netratate.

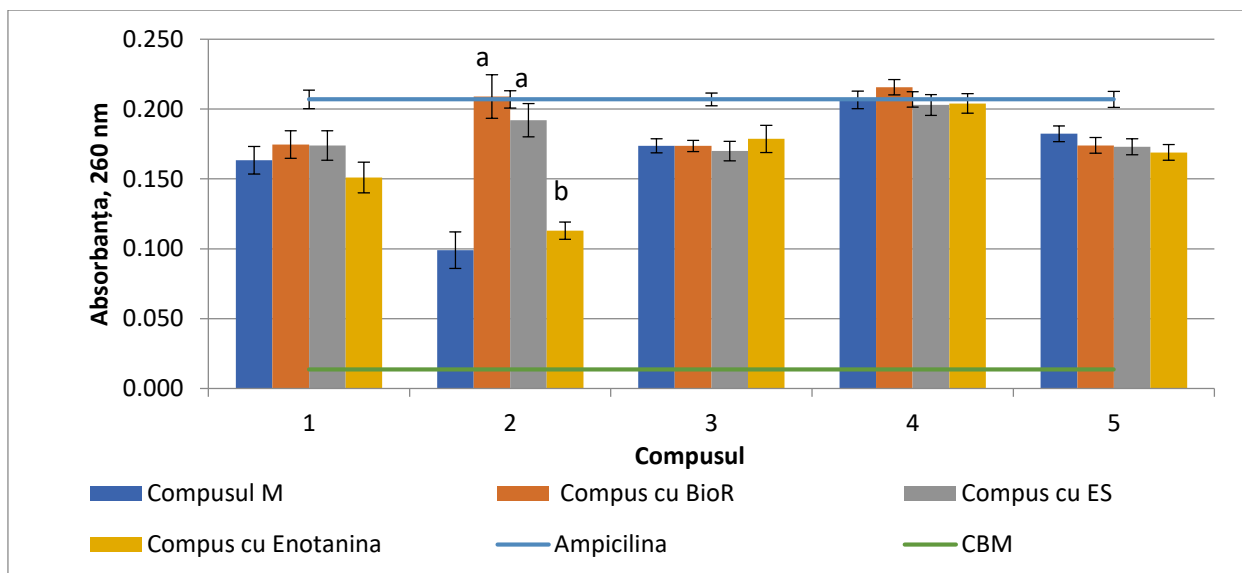


Figura 4.1. Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală :

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$ (CMSA 68); 2. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$ (VGB 16); 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 24); 4. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 1); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$ (VGB 2); CBM – control biomasă netratată (^a- $p < 0,0001$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compusul , tab. 2.1; L pentru compușii 2-5, tab. 2.4)

Alți trei compuși: CMSA 68 , VGB 24, VGB 2 au avut o acțiune toxică mai puternică, la valori foarte apropiate, între 0,163 și 0,207. Cel mai puternic efect exprimat prin eliberarea de acizi nucleici a fost observat la VGB 1, caz în care în mediul extern se elimină de 14,8 ori mai mult conținut intern față de biomasă netratată.

Combinarea compușilor chimici cu preparatul BioR, extractul din spirulină și enotanina hidrosolubilă în cazul a patru dintre compușii testați nu au dat efectele scontate – adică o creștere a gradului de eliberare a acizilor nucleici în mediul extracelular. În schimb în cazul compusului compusului VGB 16 în combinațiile menționate am obținut un efect sinergic pronunțat, datorită căruia activitatea acestui compus s-a ridicat la nivelul compusului VGB 1, atunci când a fost combinat cu preparatul BioR și cu extractul din spirulină. Și enotanina solubilă a mărit efectul compusului la un nivel de semnificație $< 0,05$, dar mult mai modest comparativ cu primele două produse de origine naturală.

Efectul compusului VGB 1 aplicat independent și a compusului VGB 16 combinat cu BioR sau cu extractul din spirulină nu se deosebește ca intensitate de efectul general de ampicilină, antibiotic cunoscut pentru mecanismul de acțiune bazat pe dereglarea mecanismelor de sinteză a peptidoglicanului și ca urmare, de deterioare a integrității celulare.

Rezultatele pentru *Bacillus cereus* ГИСК 8035 cu referire la efectul compușilor chimici noi evidențiați ca fiind activi față de această tulpină și combinațiilor acestora asupra procesului de eliberare a acizilor nucleici în mediul extracelular sunt prezentate în figura 4.2

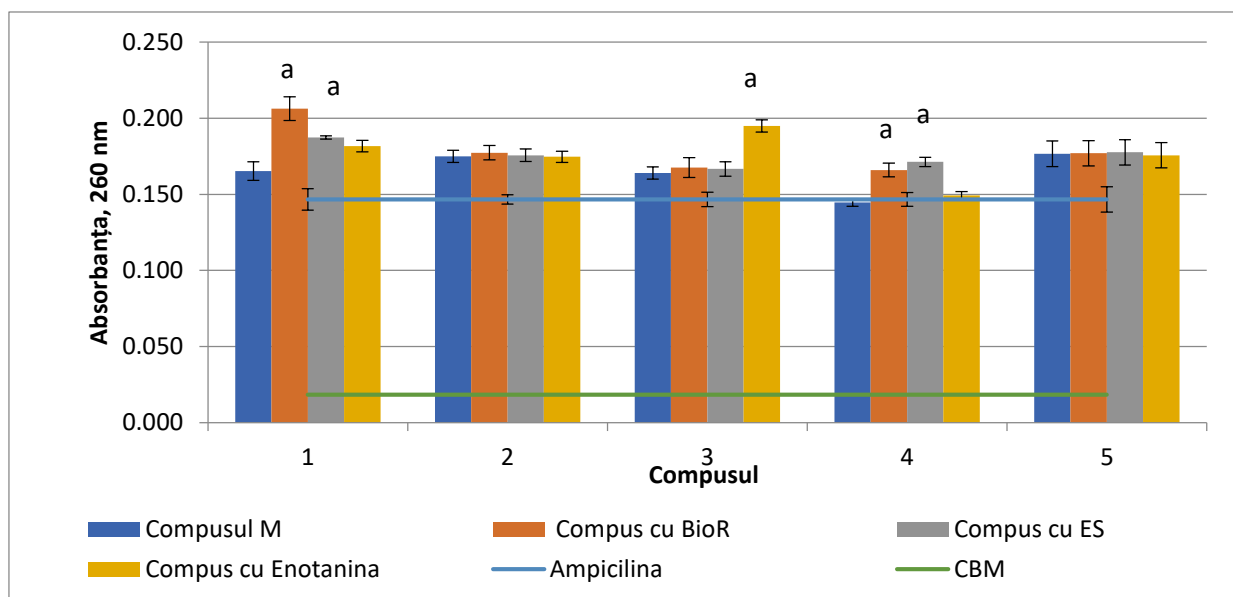


Figura 4.2. Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii

***Bacillus cereus* ГИСК 8035 în combinaire cu compușii de origine naturală:**

1. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$; 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$; 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$; CBM – control biomasă netratată (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; L, tab.2.4)

Ca și în cazul tulpinii examinate anterior, efectul compușilor aplicați individual și în combinație cu compușii de origine naturală asupra *Bacillus cereus* ГИСК 8035 a fost comparat cu efectul ampicilinei. De asemenea, a fost apreciat și nivelul de eliberare a acizilor nucleici din biomasa netratată, care în cazul *Bacillus cereus* este și mai mică ($\text{abs} = 0,018 \pm 0,002$). Compușii de origine naturală au avut efecte diferite asupra permeabilității membranare. Astfel, extractul din spirulină nu a modificat nivelul de eliberare a acizilor nucleici, în timp ce preparatul BioR și enotanina solubilă măresc acest indicator de 1,5 și 3,0 ori respectiv. Cu toate că în ultimile două cazuri efectul este semnificativ statistic ($p < 0,05$ și $p < 0,0001$ respectiv), acesta este net inferior celui manifestat de compușii chimici și combinațiile acestora.

Acțiunea antibioticului de referință asupra permeabilității învelișurilor celulare este mai puțin pronunțată comparativ cu acțiunea față de stafilococ, dar destul de semnificativă. Față de această tulpină compușii selectați pentru studiu au avut un efect semnificativ mai mare, sau în cazul unuia dintre compuși – egală.

Combinarea compușilor chimici cu preparatele de origine naturală în trei cazuri a permis de a evidenția efecte sinergice cu mărirea semnificativă a cantității de substanță eliberată de

celulele bacteriene. Astfel, activitatea compusului VGB 1 este ameliorată în toate cazurile de mix cu compușii de origine naturală. Cel mai înalt efect a fost observat în cazul amestecului de compus cu preparatu BioR, urmat de extractul de spirulină și enotanina hidrosolubilă.

Efectul compusului VGB 24 a fost mărit doar în combinație cu enotanina hidrosolubilă, preparatele pe bază de spirulină fiind inefficiente ca compuși sinergici pentru acest compus chimic. Și din contra, efectul toxic al compusului VGB 28 a fost influențat doar de preparatul BioR și de extractul din spirulină, nu și de enotanina hidrosolubilă.

Cel de-al treilea model de acțiune asupra tulpinii *Bacillus cereus* ГИСК 8035 l-au manifestat compușii VGB 2 și VGB 26. În cazul acestor doi compuși combinarea lor cu cele trei produse de origine naturală nu a modificat efectul asupra permeabilității membranei celulei bacteriene, acesta menținându-se la nivelul caracteristic pentru compușii aplicați în mod individual.

Efectul compușilor chimici noi evidențiați ca fiind activi față de această tulpină și combinațiilor acestora asupra procesului de eliberare a acizilor nucleici în mediul extracelular asupra tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 poate fi urmărit în figura 4.3 Nivelul de eliberare a acizilor nucleici din biomasa netratată în cazul tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 este chiar mai mică decât în cazul tulpinii analizate anterior ($abs=0,014\pm0,002$). Compușii de origine naturală au avut efecte diferite în ceea ce ține de permeabilitatea membranelor, atunci când au fost aplicați independent. Astfel, extractul din spirulină și enotanina hidrosolubilă au dat un efect de eliberare a acizilor nucleici în mediul extracelular de 3 ori mai mare ca în biomasa netratată, iar preparatul BioR – de 2 ori. Ca și în cazul culturii *Bacillus cereus* efectul compușilor naturali, fiind semnificativ din punct de vedere statistic ($p<0,005$ în cazul extractului de spirulină și a enotaninei hidrosolubile și $p<0,01$ în cazul preparatului BioR), acesta este totuși net inferior efectului compușilor chimici aplicați individual. Acestea aplicați în concentrațiile egale cu CMI produc o scurgere a conținutului celular de 7,6-11,4 mai pronunțat decât în cazul culturii netratate.

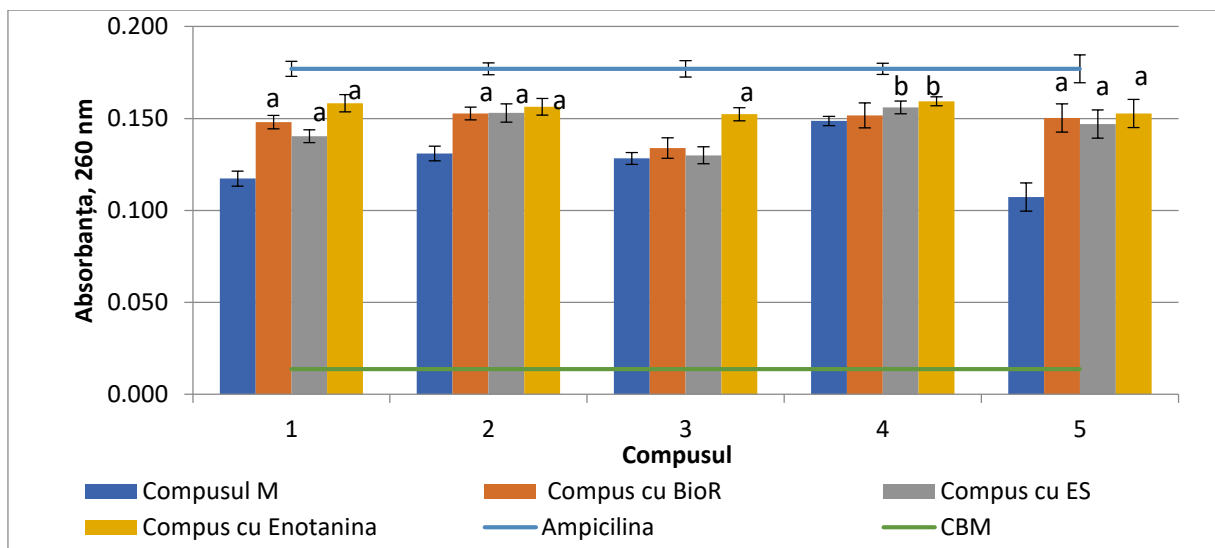


Figura 4.3 . Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 în combinaire cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$ (CMSA 68); 2. $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}$ (CMSA 25); 3. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$ (VGB 16); 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ (VGB 26); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ (VGB 28); CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2, tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4)

Combinarea compușilor chimici cu cei naturali a avut efecte sinergice semnificative. Pentru trei dintre compușii chimici testați, și anume pentru CMSA 68; CMSA 25 și VGB 26, toate variantele de combinații au dus la o creștere a efectului antibacterian la un nivel de semnificație de $p < 0,0005$. Acțiunea compusului VGB 16 este amplificată doar de enotanina hidrosolubilă, iar cea a compusului VGB 28 - de extractul de spirulină și de enotanina hidro solubilă, dar la un nivel mai jos al semnificației statistice ($p < 0,05$).

Cea mai sensibilă cultură bacteriană testată la acțiunea compușilor chimici noi a fost *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y, rezultatele pentru care sunt prezentate în figura 4.4. Nivelul de eliberare a acizilor nucleici din biomasa netratată a *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y a fost comparabil cu cel înregistrat pentru alte tulpini cercetate ($\text{abs} = 0,017 \pm 0,002$). Dintre compușii de origine naturală s-a manifestat ca agent, care dereglează permeabilitatea membranelor la această tulpină doar enotanina hidrosolubilă, în timp de preparatul BioR și extractul din spirulină nu au modificat esențial cantitatea de acizi nucleici eliberată în mediul extracelular. Astfel, enotanina hidrosolubilă a dat un efect de eliberare a acizilor nucleici în mediul extracelular de 2 ori mai mare ca în biomasa netratată la un nivel al semnificației statistice a diferențelor $p < 0,005$. Compușii chimici, spre deosebire de cei naturali, aplicați individual în concentrațiile egale cu CMI au produs o scurgere a conținutului celular de 9,6-11,9 mai pronunțat decât în cazul culturii netratate. În cazul

tulpinii de *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y efectele observate au fost mult mai uniforme comparativ cu alte culturi investigate.

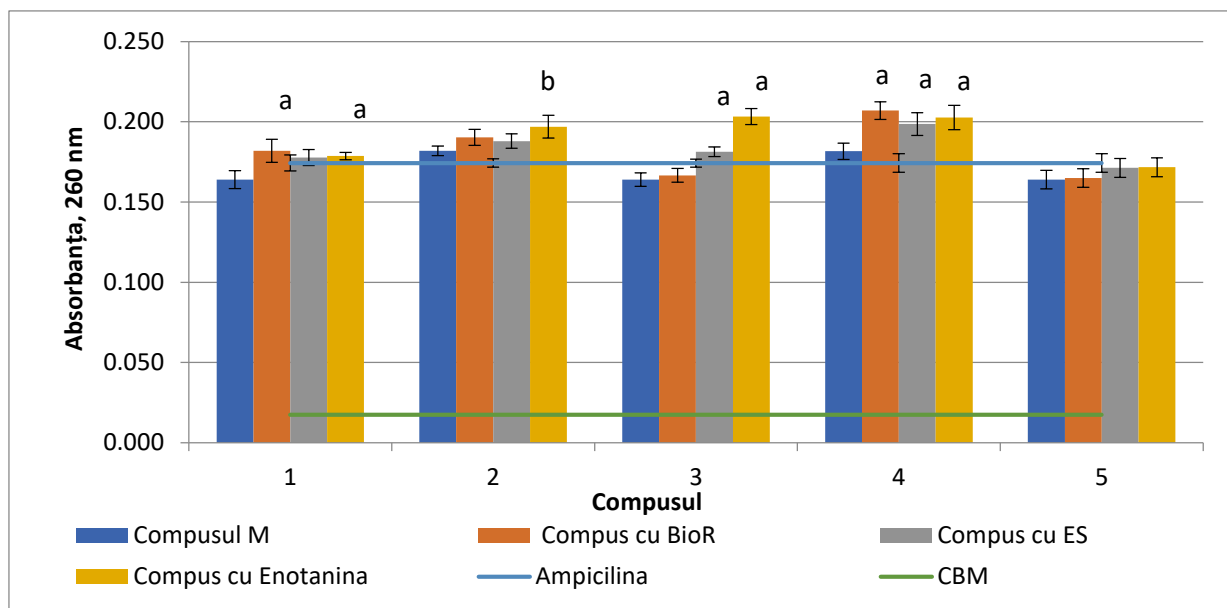


Figura 4.4. Eliberarea acizilor nucleici. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y în combinaire cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Cu(L)NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (TI 3); 2. $\text{Cu(HL}^1\text{)Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 1); 3. $\text{Cu(L}^1\text{)H}_2\text{O}$ (GVB 16);
 4. $\text{Cu(HL}^4\text{)Cl}$ (VGB 26); 5. $\text{Cu(HL}^4\text{)Cl}$ (VGB 28); CBM – control biomasă netratată; (^a-
 $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M;
 L pentru compusul 1, tab.2.3; L pentru compușii 2-5, tab.2.4)

Efecte sinergice au fost înregistrate în cazul aplicării concomitente a compusului TI 3 cu preparatul BioR și cu enotanina hidrosolubilă; a compusului VGB 1 cu enotanina hidrosolubilă; a compusului VGB 16 cu extractul din spirulină și enotanina hidrosolubilă și a compusului VGB 26 cu toți cei trei compuși de origine naturală. Acțiunea compusului VGB 28 nu se modifică la combinarea cu preparatele de origine naturală, cantitatea de acizi nucleici eliberați fiind aceeași în toate variantele experimentale.

Tulpina de fungi levuriformi *Candida albicans* ATCC 10231, de asemenea reacționează la acțiune compușilor cu efect antimicrobian prin eliberarea de substanțe nespecifice mediului extracelular. În cazul organismelor eucariote, eliberarea de enzime nespecifice de obicei este mai semnificativă comparativ cu eliberarea de acizi nucleici în cazul celulelor procariote. Din această cauză pentru a aprecia în ce măsură este deteriorată funcția de permeabilitate a membranei celulare a fost cuantificată activitatea lactatdehidrogenazei (LDH) – enzimă care în celulele neafectate este localizată în reticulul endoplasmatic, iar eliberarea ei în mediul extracelular este considerat un marker sigur al acțiunii toxice. Pentru comparare în calitate de remediu antifungic de referință a

fost luată nistatina în concentrație de 0,015mg/mL. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 4.5.

Figura 4.5 reflectă efectele compușilor chimici, care au manifestat efecte fungistatice și fungicide față de tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 aplicate individual sau în combinație cu compușii de origine naturală.

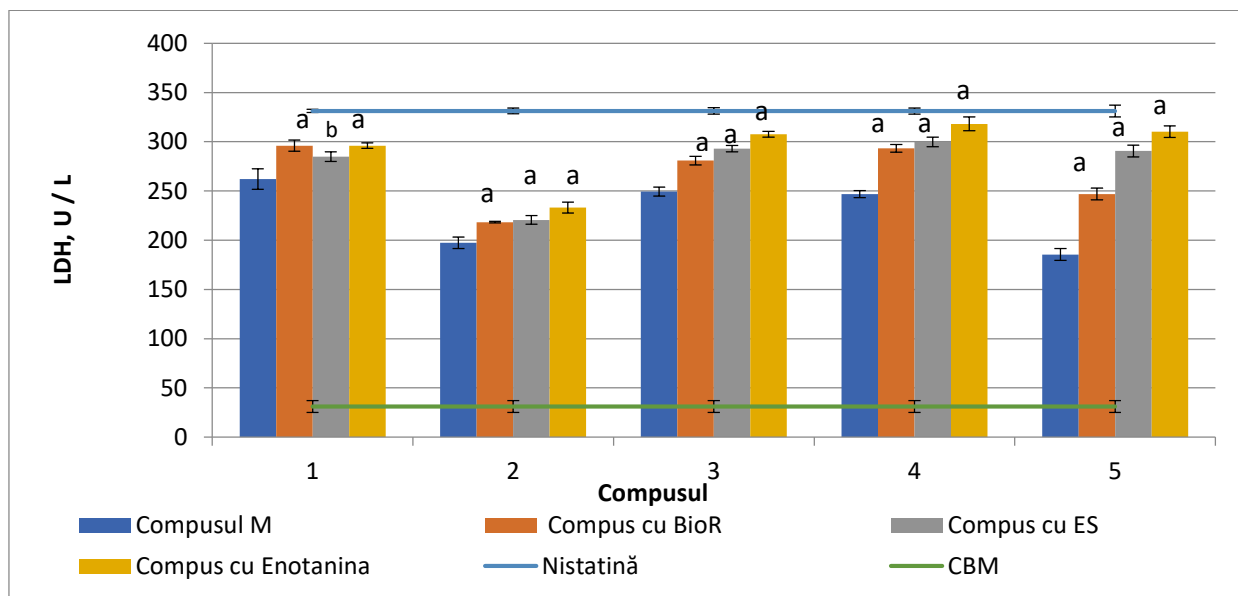


Figura 4.5 . Eliberarea lactatdehidrogenazei (LDH). Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 în combinație cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$ (CMSA 68); 2. $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}$; 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 4. $\text{Co}(\text{HL}^3)_2\text{NO}_3$; 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$; CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2, tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4).

Efectul separat al acestora de asemenea a fost testat și se exprimă în următoarele valori de activitate LDH: $25,6 \pm 8,2$ U/L în cazul preparatului BioR; $42,7 \pm 2,9$ U/L în cazul extractului din biomasa de spirulină; $86,2 \pm 8,7$ U/L în cazul enotaninei hidrosolubile. Cultura celulară netratată de asemenea, are un nivel de fond al activității LDH în mediul extracelular, care constituie $31,0 \pm 5,9$ U/L. Astfel, preparatul BioR nu poate fi considerat ca un potențial produs care destabilizează permeabilitatea membranară. În cazul extractului de spirulină cantitatea de LDH eliberată este cu peste 30% mai mare ca în cazul culturii netratate, iar în cazul enotaninei hidrosolubile – cantitatea de LDH crește de peste 2 ori.

Cu toate acestea, rezultatele demonstrate de compușii de origine naturală sunt destul de modeste comparativ cu cele ale compușilor chimici și a combinațiilor acestora cu compușii de origine naturală. Activitatea LDH eliberată sub acțiunea compușilor chimici noi aplicați individual

a fost între 218,3 și 296,0 U/L și este semnificativ mai joasă comparativ cu activitatea enzimei la tratarea culturii cu nistatină, când aceasta constituie 331,3 U/L. Cea mai joasă activitate a LDH sub acțiunea compușilor chimici a fost în cazul VGB 28. În schimb tot în cazul acestui compus avem cele mai pronunțate efecte sinergice ca urmare a combinării acțiunii compusului chimic cu cei naturali. Astfel, în combinație cu preparatul BioR activitatea LHD crește de 1,3 ori față de compusul chimic aplicat individual; în combinație cu extractul de spirulină – de 1,6 ori, iar în cazul enotaninei hidrosolubile – de 1,67 ori.

Clorura de bis[N-(2,4-dimetilfenil)-2-(2-oxibenziliden)-hidrazincarbotoamido(1-)]-cobalt (III) are efecte apropiate de cele ale compusului examinat mai sus, în cazul când este aplicată individual. Compușii de origine naturală provoacă o creștere a activității LDH, dar în proporții mai reduse de până la 1,2 ori în cazul enotaninei hidrosolubile.

Alți trei compuși: CMSA 68 , nitratul de (2-(3,5-dibromo-2-hidroxibenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazin carbotoamido)cupru(II) și VGB 23 aplicați individual au dus la o eliberare masivă de LDH cu activitate între 246 și 262 U / L, iar în cazul combinațiilor cu compușii naturali activitatea enzimei a crescut la 280 – 318 U/L. Menționăm, că gradul de semnificație statistică a diferențelor activității enzimatice în cazul combinațiilor versus compus individual sunt destul de înalte în marea majoritatea a cazurilor - $p < 0,0005$, și doar într-un singur caz - $p < 0,05$ (compusul CMSA 68 în combinație cu extractul de spirulină).

Astfel, putem afirma cu siguranță, că unul dintre mecanismele de acțiune a compușilor chimici testați este dereglarea permeabilității membranelor celulare (posibil degradarea lor fizică), care duce la eliberarea conținutului celular în mediul extracelular și ca urmare, moartea celulelor. Compușii naturali nu au efect deteriorant foarte pronunțat asupra membranelor, în schimb aceștia pot genera un efect sinergic pronunțat fiind aplicați împreună cu compușii chimici. În cazul bacteriilor Gram - și al tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 cel mai pronunțat efect sinergic se observă în cazul combinării compușilor chimici cu enotanina hidrosolubilă, iar în cazul bacteriilor Gram+ în calitate de potențatori ai efectului de permeabilizare a membranelor pot fi considerate preparatele pe bază de spirulină.

4.2. Formarea speciilor reactive ale oxigenului în celulele microbiene sub influența compușilor noi antimicrobieni

Cu toate că antibioticele vizează anumite procese, cum ar fi asamblarea peretelui celular (de exemplu, ampicilină), sinteza proteinelor (de exemplu, kanamicina), replicarea ADN-ului (de exemplu, norfloxacină) ș.a. numeroase studii realizate pe diferite culturi microbiene au raportat o observație foarte valoroasă, și anume că antibioticele generează SRO prin suprastimularea electronilor prin ciclul acizilor tricarboxilici și eliberarea fierului din clusterelor fier-sulf, activând

reacția Fenton. Astfel, s-a descoperit că antibioticele cu moduri primare de acțiune neînrudite folosesc o țintă secundară comună prin generarea de SRO [203].

SRO sunt definite ca molecule foarte reactive, printre care oxigenul molecular (O_2), anionul superoxid ($O_2^{\bullet-}$), peroxidul de hidrogen (H_2O_2), radicalul hidroxil ($\bullet OH$) ș.a. A fost confirmat, că SRO manifestă activitate antimicrobiană împotriva unei game largi de agenți patogeni prin inducerea stresului oxidativ - un dezechilibru între SRO și capacitatea sistemului de apărare antioxidantă de a detoxifica SRO. Stresul oxidativ dependent de SRO poate deteriora macromoleculele celulare, inclusiv ADN-ul, lipidele și proteinele [120].

Bacteriile aerobe necesită O_2 pentru respirație sau oxidarea nutrienților în scopul de a genera energie. SRO se formează endogen în procesul de metabolism microbian, iar procesul de formare a SRO endogene poate fi accelerat prin diferite acțiuni externe. Formarea și detoxifierea constantă a SRO asigură un statut redox fin controlat și bine echilibrat în celulele normale. Dezechilibrul între generarea și degradarea SRO apare din cauza supraproducției de ROS sau deteriorării sistemului antioxidant. Acest fenomen duce la creșterea nivelului intracelular de SRO care depășesc toleranța celulară și poate fi cuantificat prin diferite metode [141].

În această teză pentru evaluarea cantitativă a nivelului de stres oxidativ a fost aplicat testul cu tetrazolium nitroblue (NBT). În cazul când în celule este o stare de echilibru între formarea și eliminarea SRO, valorile testului NBT sunt neglijabile, în timp ce în cazul stresului oxidativ aceste valori sunt foarte ridicate. Etapa de cercetare descrisă în continuare a constatat în monitorizarea eliminării SRO de către culturile microbiene sub influența compușilor chimici aplicați individual și în combinație cu compușii de origine naturală. Rezultatele obținute pentru tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sunt prezentate în figura 4.6. În cazul *Staphylococcus aureus* cultura celulară netratată prezintă un nivel de stres minimal exprimat prin cea mai joasă absorbantă înregistrată în această serie experimentală. De asemenea a fost determinat și nivelul de stres provocat de aplicarea individuală a compușilor de origine naturală. Absorbanta produselor de reducere a tetrazoliului nitroblue în cazul preparatului BioR a fost de $0,037 \pm 0,006$, în cazul extractului din biomasa de spirulină – de $0,047 \pm 0,003$; și de $0,070 \pm 0,001$ în cazul enotaninei hidrosolubile. Valorile înregistrate pentru preparatul BioR sunt foarte apropiate de cele specifice controlului netratat. O creștere cu 27% a nivelului de SRO față de martorul netratat s-a observat la aplicarea extractului din biomasa de spirulină și o dublare a nivelului de stres a fost atestată în cazul aplicării enotaninei hidrosolubile. Rezultatele obținute permit să afirmăm, că preparatul BioR nu poate fi considerat ca un potențial produs care induce stresul oxidativ la *Staphylococcus aureus*, iar extractul de spirulină și enotanina hidrosolubilă provoacă un stres moderat în celulele patogenului, efectul lor fiind destul de modest comparativ cu cel al compușilor chimici și a combinațiilor acestora cu compușii de origine naturală.

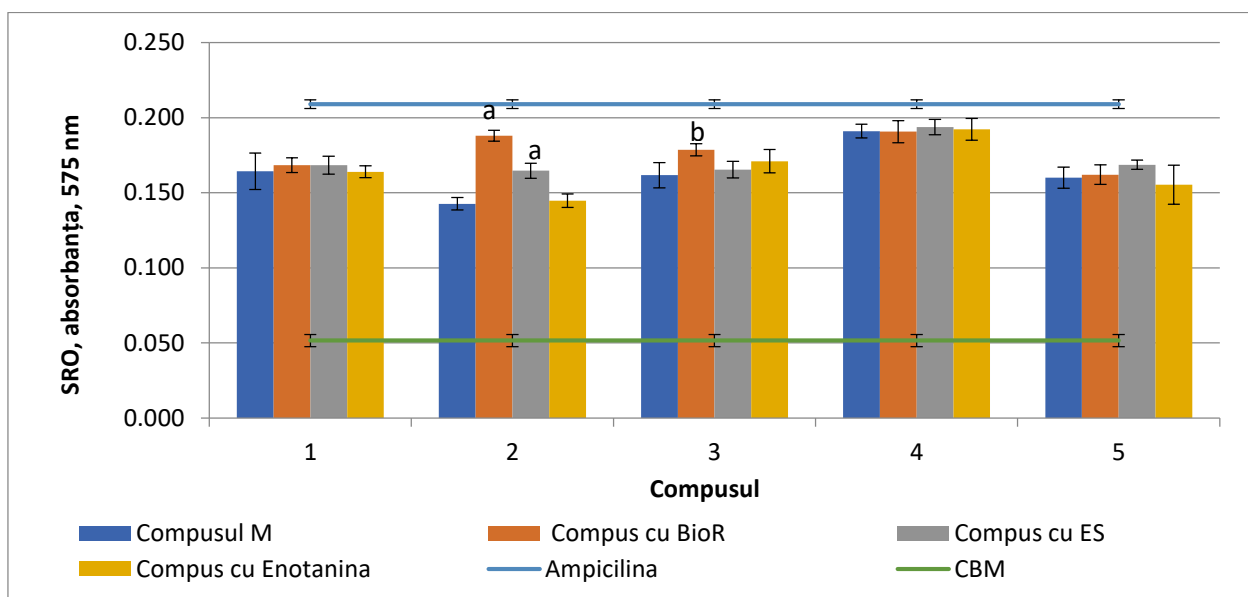


Figura 4.6. Formarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală :
 1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$ (CMSA 68); 2. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$ (VGB 16) ; 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VB 24);
 4. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 1); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$ (VGB 2); CBM – control biomasă netratată (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compusul 1, tab.2.1; L pentru compușii 2-5, tab.2.4)

Stresul oxidativ provocat de compușii chimici testați a fost destul de uniform, și doar VGB 1 a avut un efect mai pronunțat. Activitatea compusilor CMSA 68, VGB 1 și VGB 2 nu a fost modificată la combinarea acestora cu preparatul BioR, extractul de spirulină sau enotanina solubilă, păstrându-se aceleași valori ale produselor de reducere a tetrazoliului nitroblue. În schimb, activitatea a doi compuși: VGB 16 și VGB 24 a fost mărită semnificativ de preparatul BioR, iar cea a ultimului compus, de asemenea a fost mărită și de extractul obținut din biomasa de spirulină.

Rezultatele obținute pentru *Bacillus cereus* sunt prezentate în figura 4.7. În cazul acestui microorganism Gram+ cultura celulară netratată elimină un nivel minimal de produse ale reducerii NBT ($\text{Abs}_{575} = 0,035 \pm 0,0056$). Compușii de origine naturală aplicați la cultura de *Bacillus cereus* fiecare individual nu au modificat semnificativ valorile absorbantei NBT redus. Astfel, absorbanta produselor de reducere a tetrazoliului nitroblue în cazul preparatului BioR a fost de $0,030 \pm 0,004$, în cazul extractului din biomasa de spirulină – de $0,034 \pm 0,0037$; și de $0,035 \pm 0,0049$ în cazul enotaninei hidrosolubile. Rezultatele obținute permit să afirmăm, că compușii de origine naturală nu pot fi considerați ca potențiali produși care induc stresul oxidativ la tulpina *Bacillus cereus* ГИСК 8035.

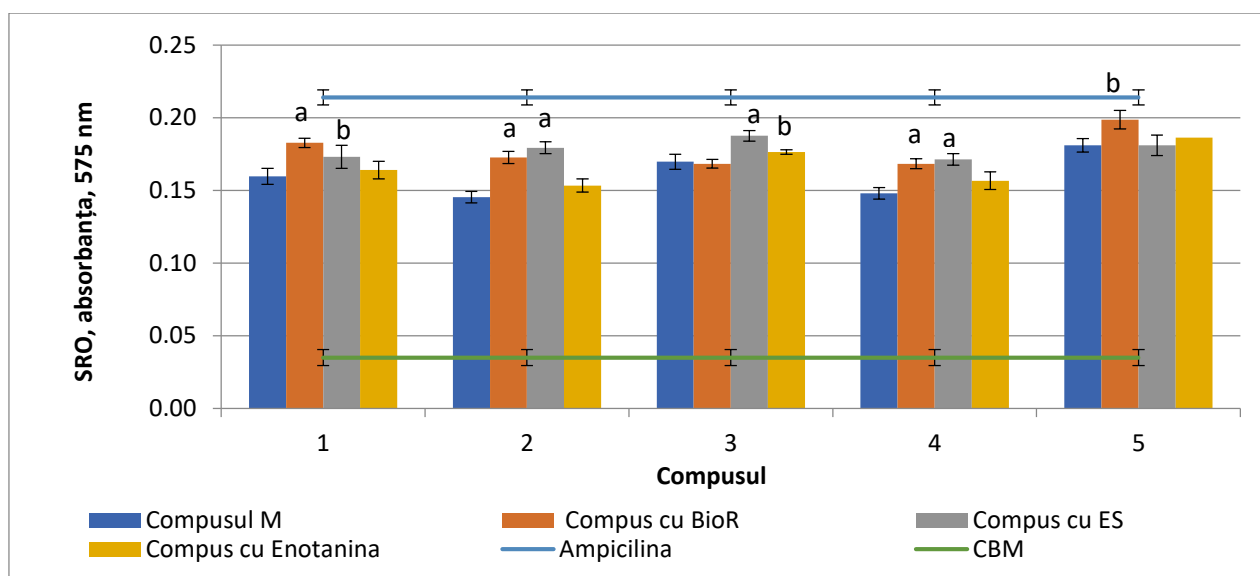


Figura 4.7. Formarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Bacillus cereus* ГИСК 8035 în combinaire cu compușii de origine naturală: 1. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 1); 2. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$ (VGB 2); 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 24); 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ (VGB 26); 5. $\text{Co}(\text{HL}^4)\text{NO}_3$ (VGB 23); CBM – control biomasă netratată (^a- $p < 0,0005$, ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L, tab.2.4)

Cei cinci compuși selectați ca fiind eficienți față de *Bacillus cereus* au demonstrat eficiență înaltă la un nivel comparabil față de tulpina de referință. Valorile absorbantei NBT redus în cazul acestora au fost de 4,1 -5,2 ori mai mari decât cele înregistrate în cazul culturii bacteriene netratate.

Combinarea compușilor chimici cu cei de origine naturală au produs efectele antimicrobiene doar în cazul extractelor din spirulină. Atât preparatul BioR, cât și extractul din biomasa de spirulină au produs o creștere a eficienței compușilor chimici testați. În cazul a trei dintre compușii testați, și anume VGB 1, VGB 2 și VGB 26 efectul de potențare a acțiunii a fost observat atât la combinarea compusului cu preparatul BioR, cât și cu extractul de spirulină. Acțiunea VGB 23 a fost potențată doar de preparatul BioR, iar cea a VGB 24– doar de extractul de spirulina. În cazul ultimului compus efect sinergic a fost observat și la combinarea lui cu enotanina hidrosolubilă, acesta fiind unicul exemplu pozitiv cu enotanina în seria experimentală analizată aici.

Tulpinile de bacterii Gram - studiate par a fi mai sensibile în ceea ce ține de formarea speciilor reactive ale oxigenului ca răspuns la acțiunea compușilor chimici tiosemibazonici aplicați independent sau în combinație cu compușii de origine naturală. Valorile obținute pentru NBT redus în cazul tulpinilor *Escherichia coli* ATCC 259223 și *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y le depășesc pe cele obținute pentru tulpinile Gram+ de 4.0-6.5 ori (figurile 4.8., 4.9). O altă deosebire a răspunsului tulpinilor Gram- constă în faptul, că producerea de specii reactive ale

oxigenului sub influența ampicilinei este mai joasă decât sub influența compușilor chimici și a combinațiilor lor.

Rezultatele obținute cu referire la eliberarea speciilor reactive ale oxigenului de către cultura *Escherichia coli* ATCC 259223 pot fi urmărite în figura 4.8.

Nivelul de fon al SRO la această tulpină este nesemnificativ, valoarea absorbantei fiind de $0,04 \pm 0,0031$. În cazul tratării culturii cu ampicilină această valoare este de 11,5 ori mai mare, iar valoarea absorbantei constituie $0,495 \pm 0,023$. Compușii de origine naturală au arătat următoarele valori ale Abs₅₇₅: $0,029 \pm 0,003$ pentru BioR; $0,033 \pm 0,0021$ pentru extractul de spirulină și $0,059 \pm 0,0044$ pentru enotanina hidrosolubilă. Astfel, doar ultima are potențial în ceea ce ține de generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, extractele în bază de spirulină fiind lipsite de această proprietate.

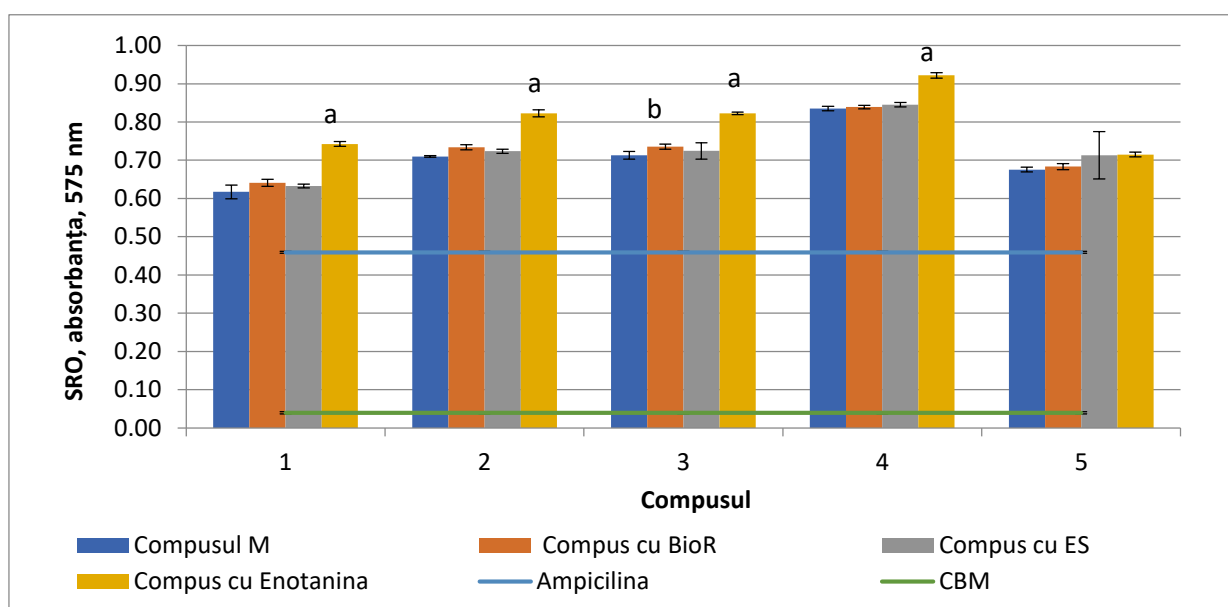


Figura 4.8. Formarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 în combinaire cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$ (CMSA 68);
 2. $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}$ (CMSA 25);
 3. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$ (VGB 16);
 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ (VGB 28);
 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ (VGB 26);
- CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2, tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4)

Acțiunea compusului VGB 26 este unicul dintre cei selectați, activitatea căruia nu a fost amplificată de compușii de origine naturală. O tendință de creștere statistic semnificativă ($p < 0,05$) a capacității de a genera SRO a compusului VGB 16 a fost observată la combinarea acestuia cu preparatul BioR, iar enotanina hidrosolubilă a produs efect sinergic la combinarea cu CMSA 68, CMSA 25, VGB 16 și VGB 28. În toate cele patru cazuri menționate creșterea nivelului de SRO

generate în celulele bacteriene la combinarea compușilor respectivi cu enotanina hidrosolubilă este destul de importantă, la un nivel de semnificație statistică $p < 0,0005$, deosebindu-se de efectul compusului aplicat în mod individual.

Rezultatele obținute în cazul tulpinii *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y sunt prezentate în figura 4.9. Nivelul de fon al SRO la această tulpină este nesemnificativ, valoarea absorbantei fiind de $0,052 \pm 0,0035$. În cazul aplicării ampicilinei această valoare este de 10,8 ori mai mare și constituie $0,561 \pm 0,014$. Compușii de origine naturală au arătat următoarele valori ale Abs₅₇₅: $0,059 \pm 0,004$ pentru BioR; $0,062 \pm 0,01$ pentru extractul de spirulină și $0,076 \pm 0,01$ pentru enotanina hidrosolubilă. Ca și în cazul tulpinii *Escherichia coli*, doar enotanina hidrosolubilă are potențial în ceea ce ține de generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, iar extractele din spirulină sunt lipsite de această proprietate.

Compușii chimici selectați ca fiind activi față de tulpina *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y aplicați individual au produs o eliberare de specii reactive de oxigen la un nivel comparabil între ei, valorile Abs₅₇₅ încadrându-se între $0,672 \pm 0,010$ și $0,837 \pm 0,016$. Activitatea compusului cloro(2-(2-hidroxi-3-nitrobenziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbonat) cupru nu a fost modificat în cazul combinării lui cu extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă. În cazul celorlalți patru compuși au fost înregistrate efecte sinergice de diferită amplitudă. Enotanina hidrosolubilă a amplificat acțiunea de generare a SRO a celor 4 compuși de 1,4-2,0 ori. Și extractele din spirulină (preparatul BioR și ES) de asemenea, au avut efect de amplificare a efectului compușilor chimici, dar acesta a fost mult mai modest – de până la 20 % față de compusul aplicat în mod individual.

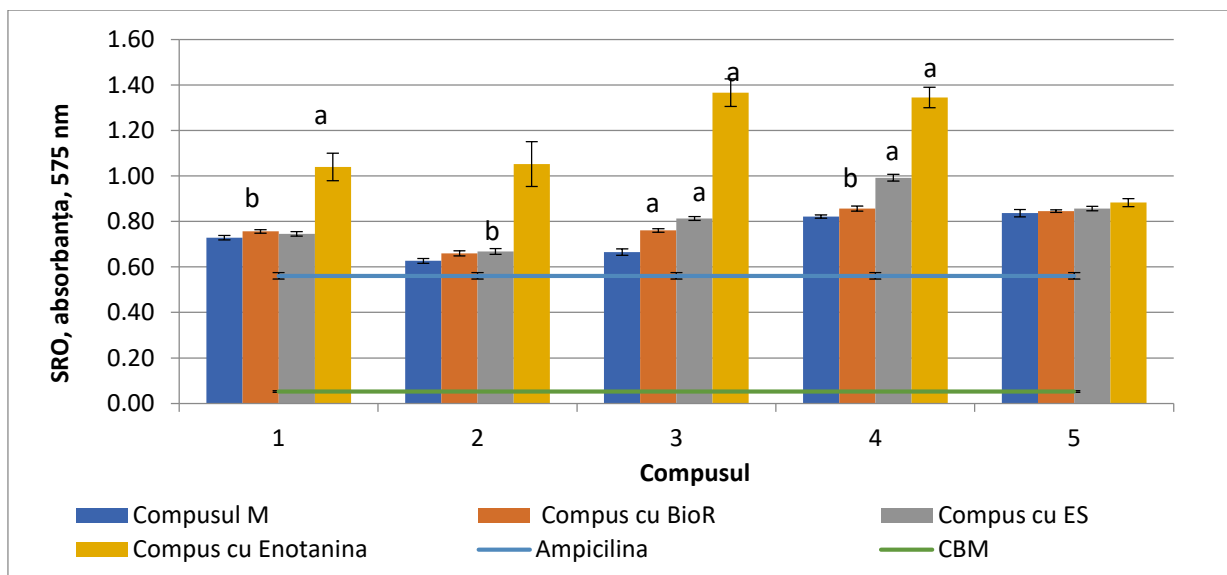


Figura 4.9. Formarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Salmonella enterica* FIICK 03/03y în combinaire cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Cu}(\text{L})\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$; 3. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$; 4. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$; 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$; CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compusul 1, tab.2.3; L pentru compușii 2-5, tab.2.4).

Rezultatele pentru tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 pot fi urmărite în figura 4.10. În cazul tulpinii de fungi levuriformi acțiunea compușilor chimici și a combinațiilor acestora cu extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă a fost comparată cu acțiunea nistatinei. Abs₅₇₅ pentru antifungul de referință a constituit $0,735 \pm 0,0083$, de 6,44 ori mai mult comparativ cu nivelul de referință în cultura netratată, care a fost de $0,114 \pm 0,0098$.

Compușii de origine naturală au arătat următoarele valori ale Abs₅₇₅: $0,273 \pm 0,013$ pentru BioR; $0,224 \pm 0,009$ pentru extractul de spirulină și $0,283 \pm 0,02$ pentru enotanina hidrosolubilă. Din aceste rezultate reiese că cantitatea de SRO eliberate de celule sub acțiunea celor trei compuși de origine naturală este de 2,39; 1,96 și 2,48 ori mai mare ca nivelul de fon specific culturii netratate. Spre deosebire de bacteriile Gram + și cele Gram - studiate în această lucrare, în cazul tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă provoacă producerea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, ceea ce le face atractive pentru studiile ulterioare.

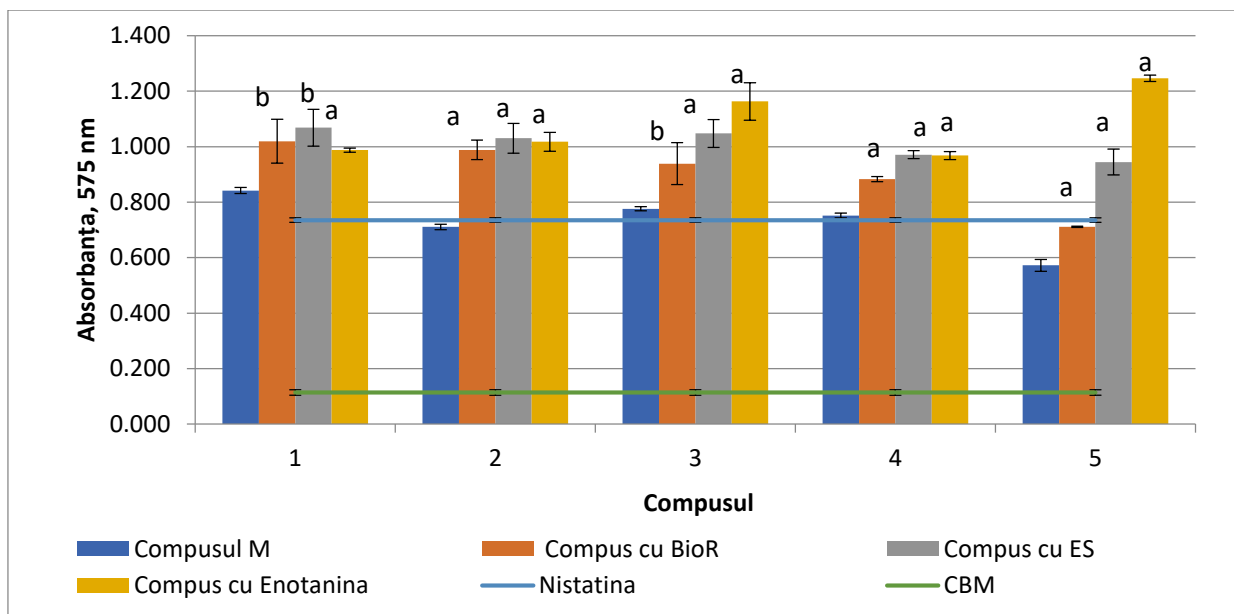


Figura 4.10. Formarea SRO. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 în combinaire cu compușii de origine naturală: 1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$ (CMSA 68); 2. $\text{Co}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}$ (CMSA 25); 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 24); 4. $\text{Co}(\text{HL}^3)_2\text{NO}_3$ (VGB 23); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^4)\text{Cl}$ (VGB 28); CBM – control biomasă netratată; (^a- $p < 0,0005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2, tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4).

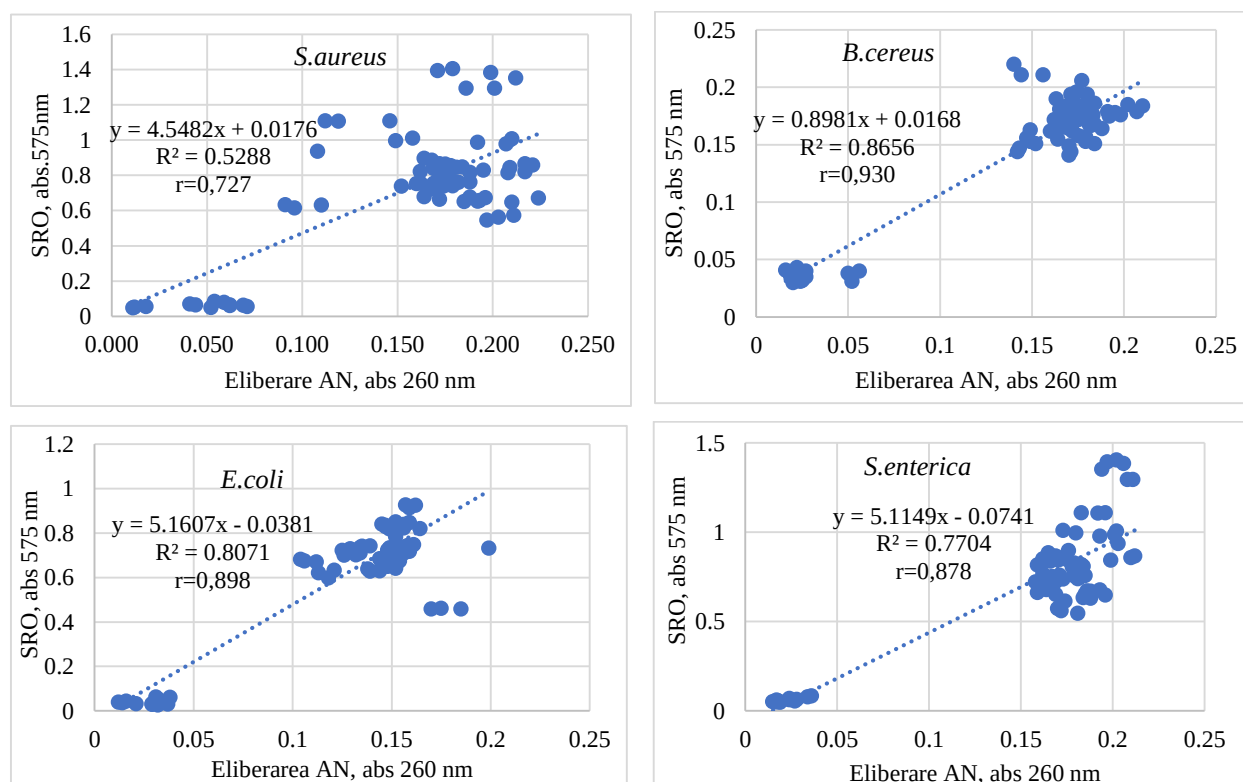
Cea mai mică (dintre compușii testați) cantitate de SRO s-au format în celulele fungice la aplicarea compusului VGB 28. În același timp menționăm, că nivelul SRO în acest caz îl depășește pe cel din cultura de referință de 5 ori. Ceilalți 4 compuși: CMSA 68, CMSA 25, VGB 24 și VGB 23 aplicați individual fiecare au provocat producerea de cantități similare de SRO.

Compușii de origine naturală s-au dovedit a fi sinergici compușilor chimici testați, astfel că în toate variantele de combinații am obținut o creștere semnificativă a nivelului de SRO față de varianta compusului aplicat de unul singur. În cazul CMSA 68, CMSA 25 și VGB 23 efectele sinergice ale celor trei compuși naturali au fost foarte apropiate între ele, fără diferențe semnificative statistice, în timp ce în cazul compușilor: VGB 24 și VGB 28 se vede clar o creștere a intensității sinergiei de la BioR la ES și la Enotanina hidrosolubilă. Cel mai pronunțat efect a fost obținut în cazul combinației VGB 28 cu enotanina hidrosolubilă, în care se înregistrează cel mai înalt nivel de SRO.

Astfel, este clar, că efectul antimicrobian al compușilor chimici noi este asociat cu generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, care provoacă starea de stres oxidativ. În toate variantele experimentale nivelul SRO depășește semnificativ nivelul lor în cultura netratată, fiind comparabil sau chiar mai mare față de nivelul de SRO indus de substanțele antimicrobiene

de referință. Nivelul de SRO este mult mai înalt la tulpinile de bacterii Gram- și la *Candida albicans* comparativ cu bacteriile Gram+. Enotanina solubilă aplicată de una singură are efecte de inducere a procesului de generare excesivă a SRO, în special la bacteriile Gram- și la *Candida albicans*. La fel, *Candida albicans* răspunde prin creșterea semnificativă a SRO în prezența preparatului BioR și a extractului din spirulină. are un efect sinergic față de compușii chimici în ceea ce privește producerea de SRO în combinaire cu majoritatea compușilor testați și la toate tulpinile microbiene cercetate, cu o amplitudine mult mai înaltă în cazul bacteriilor Gram- și a tulpinii fungice *Candida albicans*. Preparatul BioR și extractul din biomasa de spirulină de asemenea au acțiune sinergică în ceea ce ține de producerea de SRO de către *Candida albicans* ATCC 10231 la combinaire cu compușii chimici selectați pentru activitatea lor antifungică.

Stresul oxidativ este cauza degradării oxidative a lipidelor, inclusiv a celor membranare. Ca rezultat, se modifică structura și permeabilitatea acestora, astfel, că scurgerea componentelor celulare în mediul extracelular poate avea la bază formarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului. Analiza corelațională a rezultatelor obținute în cadrul celor două teste (eliberarea de AN sau LDH și eliberarea de SRO) susține această ipoteză (figura 4.11).



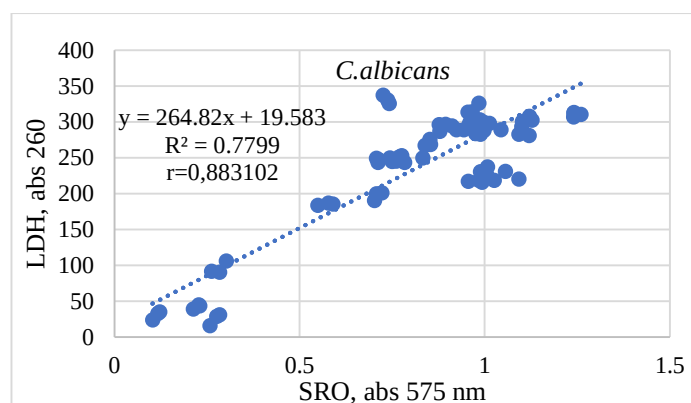


Figura 4.11. Corelarea dintre nivelul speciilor reactive ale oxigenului și cel de eliberare a acizilor nucleici/lactatdehidrogenazei intracelulare la tulpinile microbiene sub influența compușilor chimici noi și a combinațiilor lor cu combinațiilor lor cu compuși de origine naturală.

Analiza corelațională a întregului masiv de date experimentale, care a fost acumulat, pentru toate cele 5 tulpini microbiene au fost identificate corelări puternice și foarte puternice între rezultatele celor două teste analizate, astfel că putem vorbi despre faptul, că producerea excesivă de specii reactive de oxigen într-adevăr una din cauzele determinante ale scurgerilor de conținut intracelular în spațiul extracelular, sau cel puțin, că aceste două evenimente (producerea de SRO și eliberarea de conținut) au paterne foarte asemănătoare de modificare în condițiile acțiunii factorilor cu potențial toxic mai mult sau mai puțin pronunțat. Cel mai semnificativ nivel de corelare între rezultatele testului SRO și de eliberare a conținutului intracelular a fost în cazul tulpinii *Bacillus cereus* ГИСК 8035 ($r=0.930$), urmat de *Escherichia coli* ATCC 259223 (0.898), *Candida albicans* ATCC 10231($r=0.883$) și *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y ($r=0.878$). În cazul tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 valoarea coeficientului Pearson este de 0.727 .

În același timp observăm o grupare a rezultatelor pe clustere, ceea ce ne-a determinat să analizăm grupurile de substanțe separat. Astfel, au fost analizate rezultatele obținute pentru cele două teste în cazul aplicării compușilor chimici; compușilor chimici în combinație cu preparatul BioR; compușilor chimici în combinație cu extractul de spirulină; compușilor chimici în combinație cu enotanina hidrosolubilă. Figura 4.12 demonstrează rezultatele obținute pentru tulpina *Candida albicans* ATCC 10231.

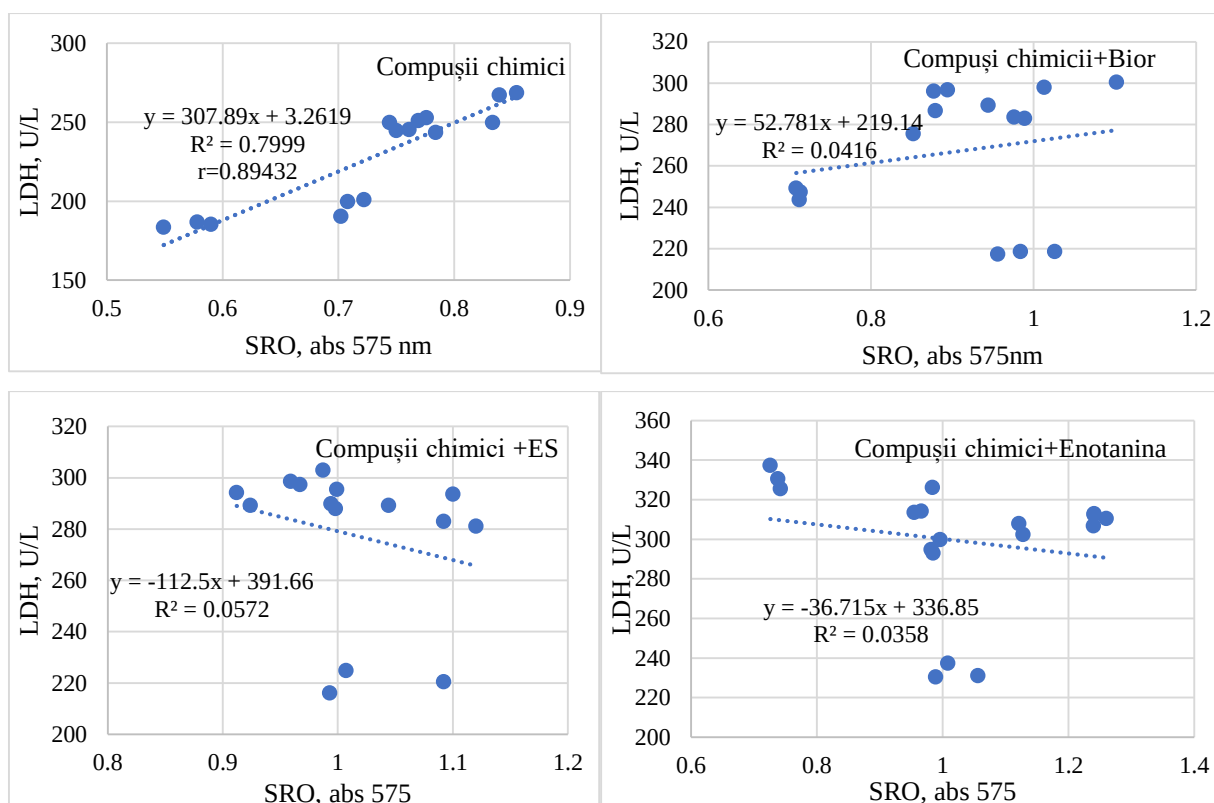


Figura 4.12. Corelarea dintre nivelul speciilor reactive ale oxigenului și cel de eliberare a lactatdehidrogenazei intracelulare la *Candida albicans* ATCC 10231 sub acțiunea compușilor chimici aplicați individual versus aplicați în combinație cu compuși de origine naturală

Rezultatele obținute arată, că numai în cazul tratării culturii de fungi levuriformi cu compuși chimici aplicați individual, se observă o corelare puternică dintre cantitatea de specii reactive ale oxigenului formate și eliberarea lactatdehidrogenazei intracelulare ($r=0.894$). Astfel, stresul oxidativ generat de substanțele chimice este cauza determinantă a permeabilității anormale a membranei celulare sau chiar a deteriorării fizice a acesteia.

Situația este complet diferită în cazul aplicării compușilor chimici în combinație cu extractele din spirulină și enotanina hidrosolubilă. În cele trei grupuri de date selectate pentru analiză corelarea dintre cantitatea SRO și cantitatea de LDH eliberată nu a fost depistată. În același timp, este evident efectul antimicrobian al acestor combinații, care cel puțin nu este mai mic decât efectul compușilor chimici aplicați individual, iar în multe cazuri – îl depășește semnificativ pe acesta. De asemenea nu a fost identificată o corelare a rezultatelor acestor două teste în cazul aplicării compușilor de origine naturală, în acest caz relația fiind descrisă de formula $y = 488.27x - 71.926$, $R^2 = 0.2063$, iar $r=0.486$. Rezultatele obținute ne conduc spre ideea, că spre deosebire de compușii chimici, substanțele naturale și combinațiile lor cu compușii chimici își realizează efectul

antimicrobian prin mai multe mecanisme, iar stresului oxidativ nu îi revine un rol determinant în dereglarea permeabilității membranare.

Rezultate asemănătoare au fost obținute și în cazul altor două dintre tulpinile studiate: *Escherichia coli* ATCC 259223, și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, în cazul cărora acțiunea compușilor chimici noi este asociată cu o corelare înaltă între producerea de SRO și eliberarea de acizi nucleici în mediul extracelular (figura 4.13).

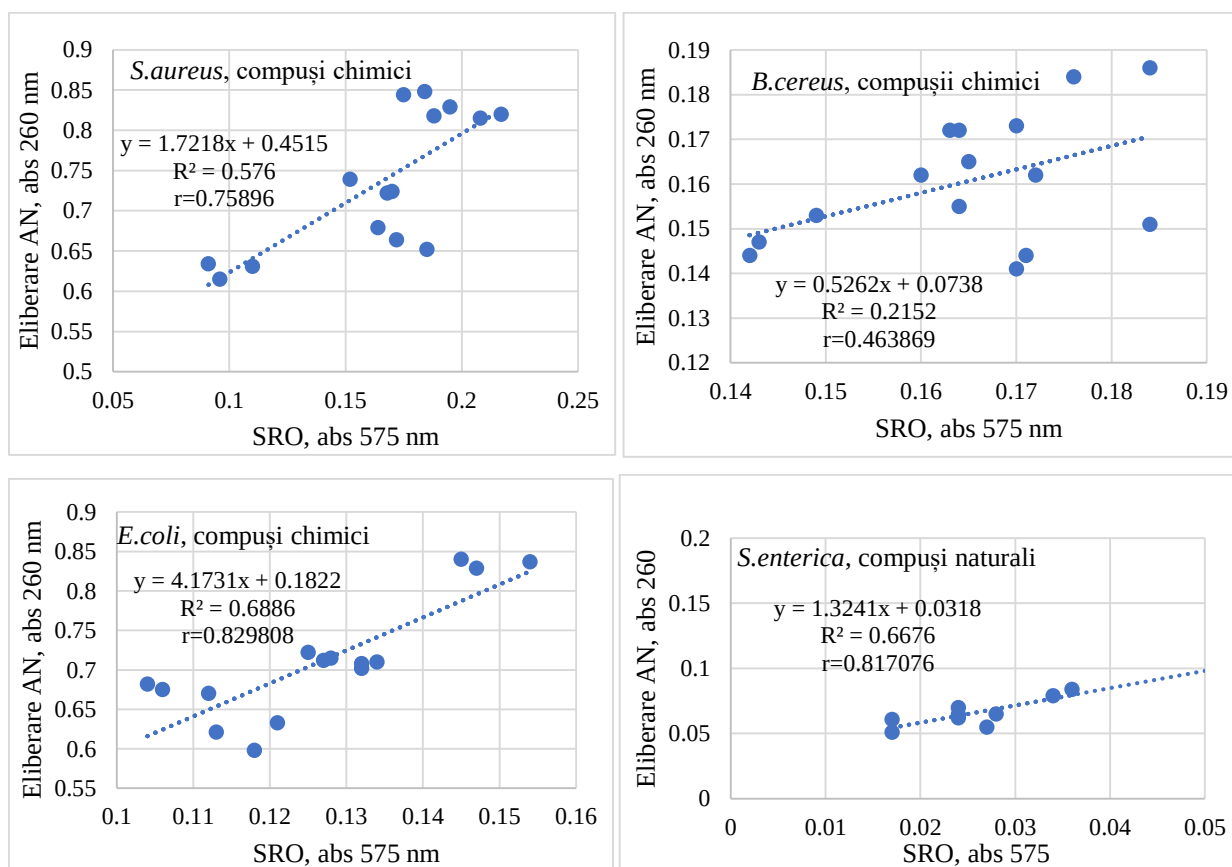


Figura 4.13. Corelarea dintre nivelul speciilor reactive ale oxigenului și cel de eliberare a acizilor nucleici intracelulare la tulpinile bacteriene sub influența compușilor chimici noi.

Cel mai semnificativ nivel de corelare între rezultatele testului SRO și de eliberare a conținutului intracelular a fost în cazul tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 ($r = 0.829$), în timp ce în cazul combinațiilor acestor compuși cu BioR, ES și enotanina valoarea coeficientului de determinare R^2 a fost între 0.009 și 0.488. În cazul tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 coeficientul de corelare este egal cu 0.759 pentru acțiunea compușilor chimici, iar R^2 a fost între 0.0047 și 0.1019. Valori neglijabile ale coeficientului de corelare s-au obținut și în cazul analizei clusterului de date obținut ca urmare a acțiunii compușilor de origine naturală asupra acestor două tulpini. Un caz aparte prezintă tulpina *Salmonella enterica* ГИСК 03/03y în cazul căreia corelarea între nivelul de SRO produse și nivelul de pierdere a conținutului celular a fost observată în cazul

aplicării compușilor de origine naturală ($r=0.817$) și într-o măsură mai mică, în cazul combinației dintre compușii chimici și enotanina hidrosolubilă.

Astfel, la 4 dintre cele 5 tulpini bacteriene, pierderea conținutului intracelular sub acțiunea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană, este asociată cu producerea în exces a speciilor reactive ale oxigenului, iar în cazul uneia – sub acțiunea compușilor de origine naturală. În cazul combinațiilor dintre compușii chimici și cei naturali stresul oxidativ nu este unicul mecanism prin care are loc eliberarea conținutului celular în mediul extracelular.

4.3. Influența compușilor antimicrobieni noi asupra unor procese enzimaticice la *Escherichia coli coli* ATCC®25923™ și *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™

Staphylococcus aureus și *Escherichia coli* sunt doi patogeni care prezintă cauză principală a bacteriemiei comunitare dobândite și celei spitalicești. *Staphylococcus aureus* este agentul patogen cel mai frecvent izolat din infecțiile pielii umane și este principala cauză a infecțiilor nosocomiale la nivelul plăgilor.

Ambii agenți patogeni posedă un arsenal bogat de factori de virulență, principalii fiind toxinele și sistemul enzimatic extra și intracelular. Datorită acestor factori de virulență patogenii, în special formele lor rezistente la acțiunea antibioticelor, evită acțiunea sistemului imunitar al gazdei, conducând la infecții recurente / cronice, inflamație de lungă durată și vindecare întârziată. Infecțiile inițial ușoare se pot dezvolta în infecții invazive care în cele din urmă duc la septicemie. Printre factorii de virulență produși de *Staphylococcus aureus* sunt toxinele, factorii imunomodulatori și exoenzimele (proteaze, lipaze, nucleaze, catalaza, superoxid dismutaza, coagulaza, betalactamaza ș.a.).

Rezultatele expuse în subcapitolele 4.3 și 4.2 conduc spre concluzia, că o contribuție majoră în manifestarea unui efect antimicrobian ca urmare a acțiunii diferitor tipuri de substanțe, o are stresul oxidativ. Este evident, că speciile reactive ale oxigenului sunt prezente într-o cantitate importantă în biomasa microbiană tratată cu substanțe chimice și cu combinațiile acestora cu substanțele de origine naturală. Pentru anihilarea acestora celulele bacteriene sunt înzestrate cu mecanisme de protecție, prima linie fiind constituită de enzimele antioxidante primare – superoxid dismutaza și catalaza [212]. Efectele pozitive ale superoxid dismutazei și catalazei în protecția patogenilor contra mecanismelor de protecție ale gazdei au fost observate de mai mulți cercetători [36, 50].

Astfel, în continuarea cercetării a fost studiat efectul compușilor chimici selectați pentru activitatea lor pronunțată asupra celor două tulpini - *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli coli* ATCC 25923, precum și a compușilor de origine naturală și a combinațiilor dintre ei asupra activității a două enzime cheie ale protecției antioxidante – SOD și CAT.

Compușii de origine naturală testați de noi au modificat activitatea acestor enzime în direcția inhibării sau nu au produs modificări semnificative. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.1. Preparatul BioR și extractul din spirulină au produs modificări mai puțin pronunțate ale activității enzimelor SOD și CAT la cele două tulpini bacterine. Astfel, preparatul BioR aplicat în concentrație de 0,626 mg/mL a dus la scădere neînsemnată (de până la 6%) a activității SOD la ambele tulpini și nu a modificat activitatea catalaze. Efectele extractului din spirulină a fost diferit în cazul celor două tulpini. Astfel, în cazul *Staphylococcus aureus* activitatea SOD a scăzut comparativ cu martorul și a constituit 87.3% M, în timp ce activitatea catalazei a rămas nemodificată. În cazul *Escherichia coli* activitatea ambelor enzime a rămas la nivelul martorului.

Tabelul 4.1. Efectul compușilor de origine naturală asupra activității enzimelor antioxidante la *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923

Tulpina	Compusul de origine naturală	Concentrația, mg/mL	Activitatea enzimatică, U/mL	
			SOD	CAT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	Preparatul BioR	0,626	428,555±8,712*	10,099±0,149
	Extractul din spirulină	2,500	395,539±9,947***	10,098±0,108*
	Enotanina hidrosolubilă	3,000	303,992±17,358***	5,489±0,096***
	Martor	-	453,74±6,556	10,466±0,163
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	Preparatul BioR	0,626	44,283±1,586	8,295±0,080
	Extractul din spirulină	2,500	47,652±2,656	8,677±0,161
	Enotanina hidrosolubilă	3,000	23,360±2,316***	4,924±0,058***
	Martor	-	46,675±2,504	8,402±0,184

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Un efect pronunțat inhibitor a fost observat în cazul aplicării enotaninei hidrosolubile. Astfel, la tulpina *S.aureus* activitatea SOD a fost redusă cu 33%, iar cea a CAT – cu 45% față de martor. În cazul tulpinii *E.coli* efectul inhibitor al enotaninei de asemenea, s-a manifestat. Astfel, activitatea SOD s-a redus în jumătate, iar activitatea catalazei – cu 39% față de martor.

Efectul compușilor chimici noi aplicați individual și în combinație cu compușii de origine naturală asupra activității superoxiddismutazei la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 este prezentat în figura 4.14. Compușii chimici produc o reducere semnificativă, cu 32-54%, a activității SOD față de martor. În același timp, efectul realizat de antibioticul de referință a rămas mai pronunțat. În cazul acestuia reducerea activității SOD a fost cu 65% față de martor. Preparatul BioR s-a manifestat ca fiind sinergic doar în asociere cu compusul VGB 2. Extractul din biomasa de spirulina, de asemenea, a amplificat efectul inhibitor al 3 dintre compușii chimici - VGB 16, VGB 24 și VGB 2. În cazul compusului CMSA 68 efectul combinării lui cu extractul din spirulină a dus la diminuare efectului compusului aplicat individual.

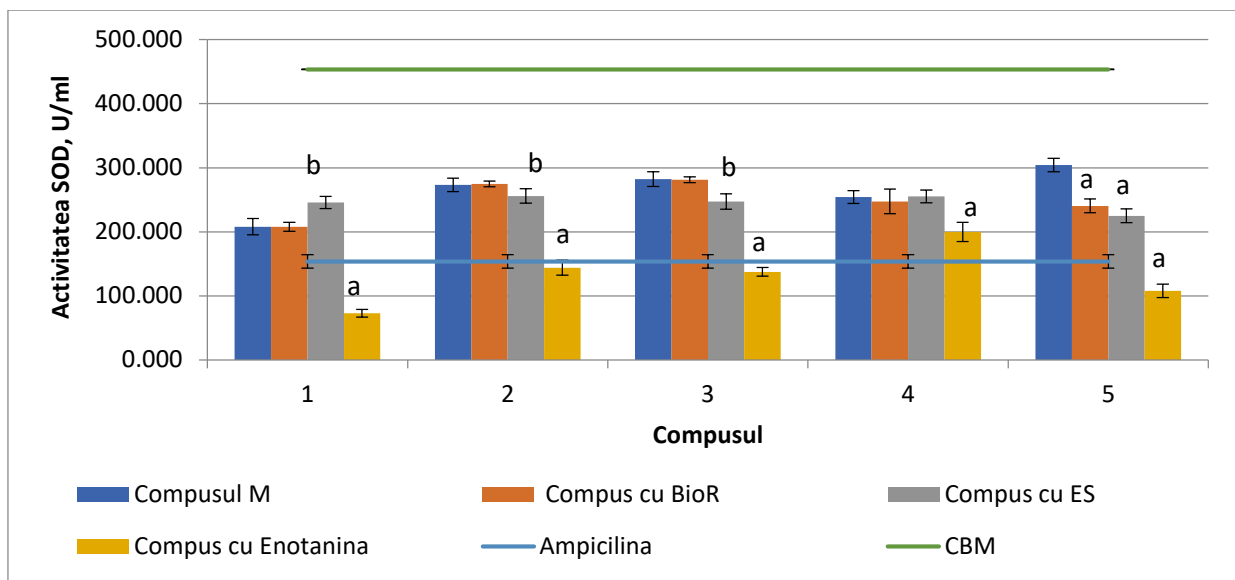


Figura 4.14. Activitatea supeoxiddismutazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală:

1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$ (CMSA 68); 2. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$ (VGB 16); 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 24); 4. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VGB 1); 5. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$ (VGB 2); CBM – control biomasă netratată (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compusul 1, tab.2.1; L pentru compușii 2-5, tab.2.4).

Cel mai pronunțat efect sinergic l-a avut combinația dintre compușii chimici cu enotanina hidrosolubilă. Efectul inhibitor ale acestor combinații s-a apropiat de cel al ampicilinei, iar în cazul combinației cu CMSA 68 și VGB 2 l-a depășit pe acesta. Ultimul compus demonstrează cele mai bune performanțe atât individual, cât și în combinație sinergică cu enotanina hidrosolubilă.

Mult mai pronunțat este efectul compușilor chimici și a combinațiilor asupra activității catalazei la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (figura 4.15), scăderea fiind de 2,2 – 5,1 ori. Combinațiile au fost mai eficiente comparativ cu compusul aplicat individual în cazul a trei compuși chimici –VGB 16, VGB 24 și VGB 2. În cazul celorlalți doi compuși efectele sinergice au fost semnificative doar în cazul combinării cu enotanina hidrosolubilă. Efectul inhibitor al combinațiilor cu enotanina doar în cazul compusului VGB 2 a fost mai slab ca efectul ampicilinei. În cazul celorlalți compusi efectul sinergic a fost similar efectului produs de antibioticul de referință sau chiar mai semnificativ. Cele mai joase valori pentru activitatea catalazei la *S.aureus* au fost generate de compusul CMSA 68 , și în special combinația lui cu enotanina solubilă. În acest caz activitatea CAT constituie 13% din activitatea catalazei în biomasa bacteriană netratată.

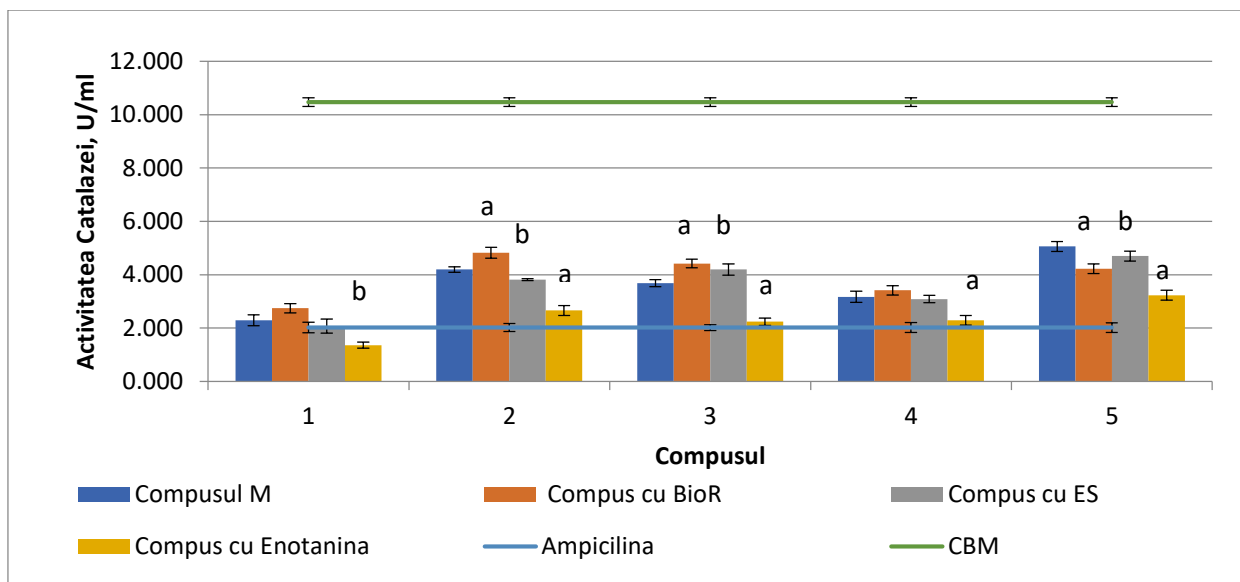


Figura 4.15. Activitatea catalazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 în combinație cu compușii de origine naturală : 1. $\text{Ni}(\text{HL}^3)_2\text{Cl}$; 2. $\text{Cu}(\text{L}^1)\text{H}_2\text{O}$; 3. $\text{Cu}(\text{HL}^3)\text{NO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$; 4. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$; 5. $\text{Cu}(\text{HL}^1)\text{Cl}$; CBM – control biomasă netratată (^a- $p < 0,005$ pentru diferență față de Compusul M; ^b- $p < 0,05$ pentru diferență față de Compusul M; L pentru compusul 1, tab.2.1; L pentru compușii 2-5, tab.2.4).

La tulpina *Escherichia coli* ATCC 259223 atât compușii chimici aplicați individual, cât și în asociere cu compușii de origine naturală au provocat reduceri semnificative ale nivelului de activitate a enzimelor antioxidante superoxiddismutaza și catalaza. Rezultatele obținute pot fi urmărite în figurile 4.16 și 4.17. Activitatea SOD la *Escherichia coli* scade cu 27-95% comparativ cu martorul, la acțiune compușilor chimici aplicați individual. Cel mai activ inhibitor al activității SOD s-a dovedit a fi compusul CMSA 68, sub influența căruia nivelul de activitate al SOD ajunge la același nivel, ca și în cazul aplicării antibioticului de referință. În cazul altor compuși chimici, totuși, activitatea SOD rămâne semnificativ mai mare comparativ cu cultura tratată cu ampicilină. Combinația compușilor chimici cu cei de origine naturală au avut efecte variate asupra activității SOD. Astfel, în cazul a doi compuși CMSA 68 și VGB 16 extractul din spirulină ES a dus la micșorarea efectului inhibitor al compusului chimic aplicat de unul singur, iar în cazul primului dintre acești compuși preparatul BioR a avut un efect similar.

Doar în cazul unui singur compus, și anume a VGB 1, extractul de spirulină ES a avut efect sinergic cu compusul în ceea ce ține de activitatea SOD. O acțiune sinergică cu toți compușii chimici a avut-o enotanina hidrosolubilă, care a redus practic de 2 ori activitatea SOD comparativ cu nivelul obținut la tratarea cu compusul chimic.

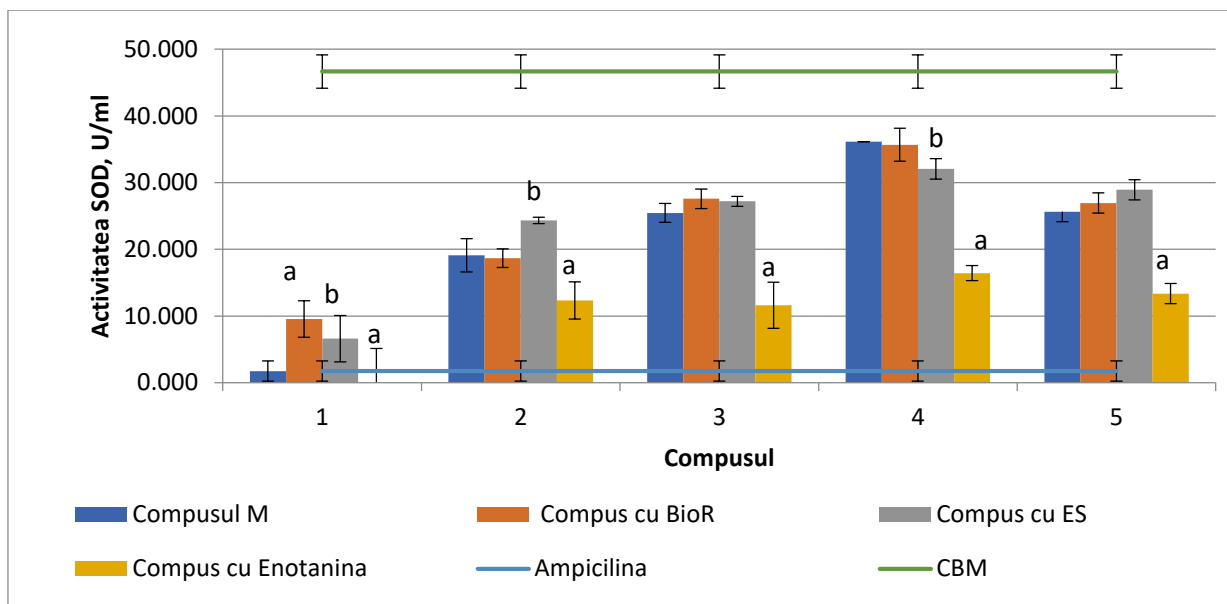


Figura 4.16. Activitatea supeoxidismutazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 în combinație cu compușii de origine naturală: 1. Ni (HL³)₂Cl (CMSA 68); 2. Co(HL¹)₂Cl (CMSA 25); 3. Cu(HL¹)Cl H₂O (VGB 1); 4. Cu(HL⁴)Cl (VGB 26); 5. Cu(HL⁴)Cl (VGB 28); CBM – control biomasă netratată; (^a- p<0,0005 pentru diferență față de Compusul M; ^b- p<0,05 pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2, tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4).

În cazul compusului CMSA 68 combinat cu enotanina hidrosolubilă activitatea SOD a fost inhibată complet.

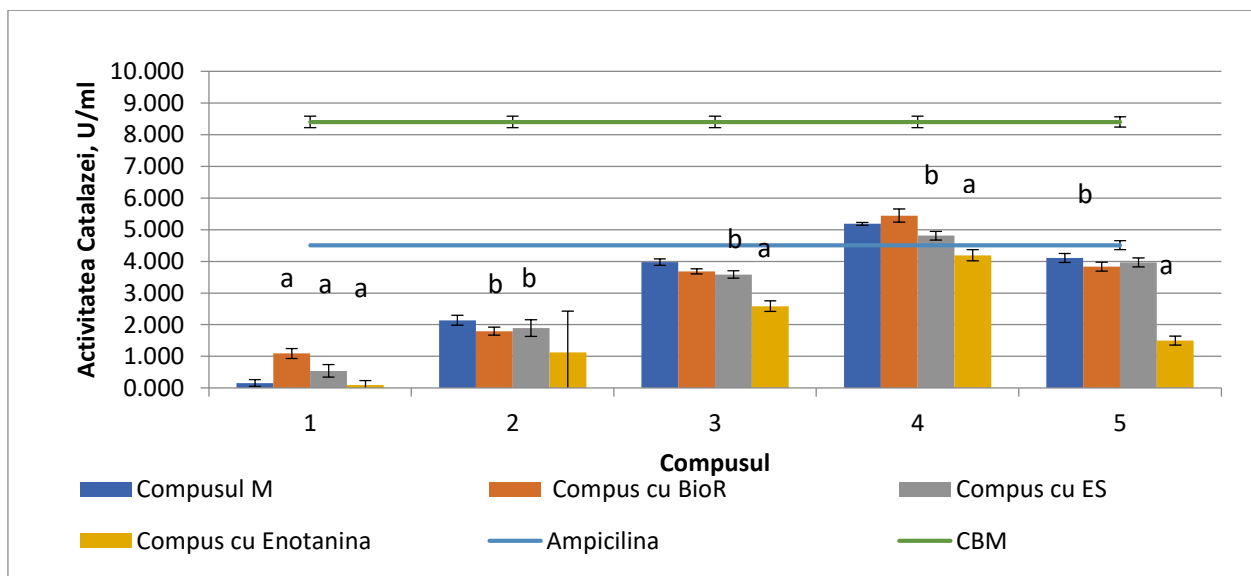


Figura 4.17. Activitatea catalazei. Efectul compușilor chimici activi asupra tulpinii *Escherichia coli* ATCC 259223 în combinație cu compușii de origine naturală: 1. Ni (HL³)₂Cl (CMSA 68); 2. Co(HL¹)₂Cl; 3. Cu(L¹)H₂O; 4. Cu(HL⁴)Cl; 5. Cu(HL⁴)Cl; CBM – control biomasă netratată; (^a- p<0,0005 pentru diferență față de Compusul M; ^b- p<0,05 pentru diferență față de Compusul M; L pentru compușii 1,2, tab.2.1; L pentru compușii 3-5, tab.2.4).

Compușii chimici s-au dovedit a fi mult mai eficienți în ceea ce ține de inhibarea activității catalazei. Cu excepția VGB 1, toți ceilalți compuși aplicați individual au produs la diminuarea activității CAT până la un nivel mai jos decât cel indus de ampicilină. Combinarea compușilor chimici cu cei naturali duc la manifestarea efectelor diverse – de la diminuarea efectului de inhibiție, până la amplificarea semnificativă a acestuia. Ca și în cazurile analizate anterior, enotanina hidrosolubilă s-a dovedit a fi cel mai eficient compus sinergist pentru compușii chimici în inhibarea activității CAT.

Astfel, în cercetările descrise mai sus a fost evidențiat un compus chimic - CMSA 68 , și unul natural – enotanina hidrosolubilă, care atât individual, cât și în combinație dau efecte performante în ceea ce privește inhibarea activității enzimelor antioxidante la *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. În cazul combinației acestor doi compuși se obține o inhibare completă a activității catalazei și o reducere de până la 10 ori a activității SOD. În aceste condiții ne-am fixat drept scop identificarea posibilității de a aplica concentrații mai mici ale compușilor respectivi cu efecte inhibitoare înalte asupra sistemului de protecție antioxidantă a bacteriilor.

Pentru aceasta au fost aplicate concentrații mai mici și egale cu concentrația minimă de inhibiție pentru enotanină: 0,75 mg/mL; 1,50 mg/mL și 3 mg/mL, astfel, ca culturile microbiene să rămână viabile pe durata acțiunii compusului antimicrobian. Durata contactului culturii bacteriene cu enotanina hidrosolubilă a fost de 24 ore, după care biomasa a fost colectată, iar testele enzimactice au fost efectuate atât în lichidul cultural, cât și în extractele celulare obținute. În această serie de experiențe s-au cuantificat separat exoenzimele eliminate și endoenzimele celulare.

Activitatea exoenzimelor după incubarea culturilor de *S.aureus* și *E.coli* cu enotanină hidrosolubilă, comparativ cu culturile crescute pe mediu standard sunt prezentate în figura 4.18. Ambele culturi microbiene se caracterizează prin activitate pronunțată a enzimelor antioxidante catalaza și superoxiddismutaza în mediul extracelular. La stafilococ de asemenea se mai atestă și o activitate proteolitică. Aceasta din urmă scade semnificativ (cu peste 45% față de martor) la toate concentrațiile de enotanină aplicate. Diferență semnificativă între variantele cu diferite concentrații nu au fost depistate. Activitatea enzimelor antioxidante (SOD și CAT) de asemenea scade la *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Această scădere este doză-dependentă și este mai pronunțată la concentrațiile de 1,5 și 3,0 mg/mL compus antibacterian.

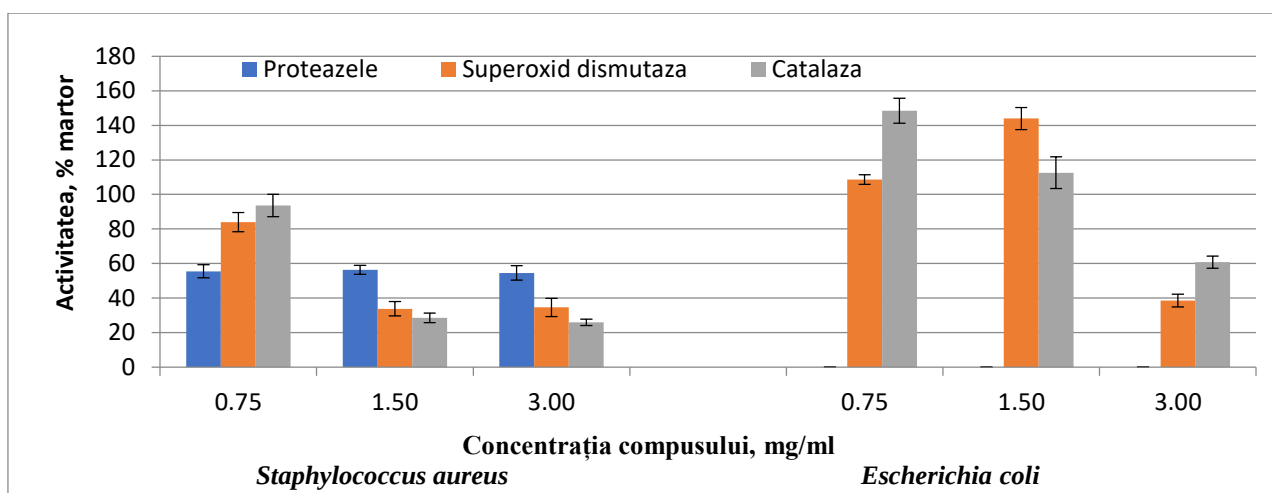


Fig.4.18. Modificarea activității exoenzimelor la *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ și *Escherichia coli* ATCC®25923™ la interacțiunea culturilor cu enotaninula hidrosolubilă.

În cazul tulpinii *Escherichia coli* ATCC 25923 rezultatele obținute diferă. Astfel, la adăugarea enotaninei se atestă o creștere semnificativă a activității catalazei (la concentrația de 0,75 mg/mL) și a superoxid dismutazei (la concentrația de 1,50 mg/mL). În schimb concentrația de 3 mg/mL, care a fost stabilită ca fiind minim inhibitoare, duce la o scădere de peste 2 ori a activității superoxid dismutazei și de aproape 2 ori a catalazei.

Activitatea enzimelor antioxidante intracelulare de asemenea se modifică la interacțiunea culturilor microbiene cu enotanina hidrosolubilă.

Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 4.19.

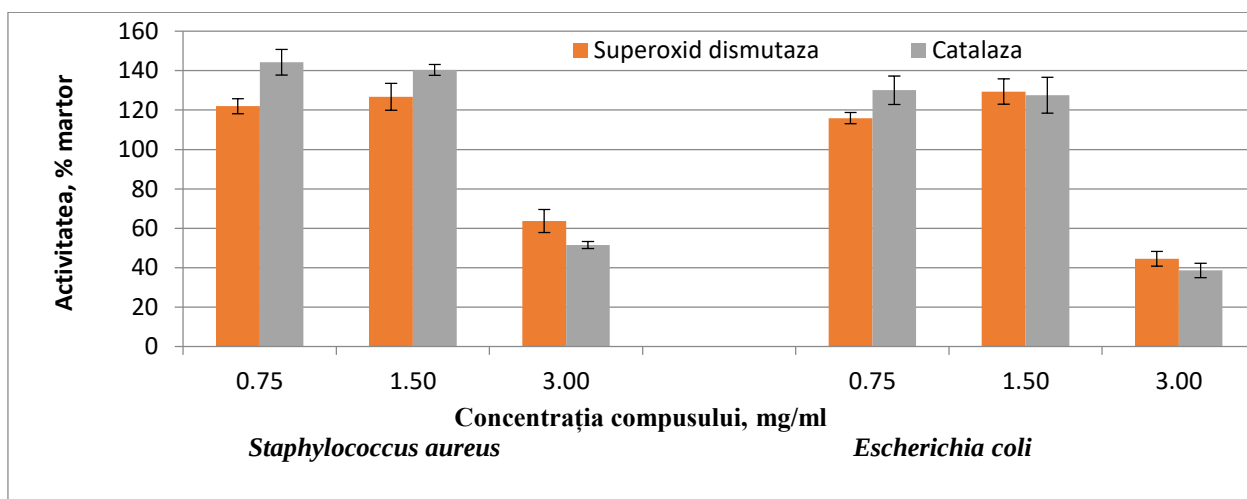


Fig.4.19. Modificarea activității endoenzimelor antioxidante la *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ și *Escherichia coli* ATCC®25923™ la interacțiunea culturilor cu enotanină hidrosolubilă

Concentrațiile mai joase decât cea minim inhibitoare duc la creștere semnificativă a activității catalazei și superoxid dismutazei, în timp ce concentrația înaltă de enotanină (3,0

mg/mL) a provocat o scădere pronunțată a activității enzimelor antioxidante în interiorul celulelor bacteriene. Astfel, am observat, că enotanina are acțiune similară asupra activității enzimelor antioxidante intracelulare în cazul ambelor culturi microbiene studiate. La concentrații mai joase decât cea minimă de inhibiție are loc o creștere a activității acestor enzime, iar la concentrația stabilită ca fiind minimă de inhibiție (3 mg/mL) are loc o inhibare puternică a activității enzimatică antioxidante, ceea ce poate fi una din explicațiile dereglării mecanismelor de protecție a culturii bacteriene și inhibării procesului de creștere a culturii.

Cercetările realizate anterior au permis evidențierea unui compus chimic nou - CMSA 68 - cu efect anti micro bian pronunțat asupra tulpinilor *Staphylococcus aureus* ATCC®25922 și *Escherichia coli* ATCC®25923™. CMI pentru ambele tulpini a fost de 1,5 μg/mL. În exeperința ulterioară au fost testate concentrațiile mai joase, și anume cele de 0,4; 0,8 și 1,3 μg/mL ale acestui compus asupra celor două tulpini de microorganisme. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.2.

Efectul compusului testat asupra activității exoenzimelor eliberate și a acelor endocelulare la *Staphylococcus aureus* ATCC®25922™ a fost negativ în toate variantele experienței. Prezența compusului chimic duce la inactivarea completă sau parțială a activității enzimelor antioxidante. Astfel, la concentrația de 0,8 μg/mL a compusului activitatea catalazei exocelulare scade cu aproape 96%, iar a SOD extracelulare – cu 73,6% față de martor. Activitatea endoenzimelor antioxidante, de asemenea se diminuează semnificativ, dar nu atât de drastic ca cele exocelulare (cu 41,8% scade activitatea catalazei și cu 60,7% scade activitatea supeoxiddismutazei). Combinarea acestei concentrații a compusului cu ½ CMI pentru enotanina hidrosolubilă duce la inhibarea completă a exoenzimelor antioxidante exocelulare și inhibarea cu 86,7% a activității catalazei intracelulare și 85,3% a superoxiddismutazei intracelulare.

Tabelul 4.2. Activitatea enzimatică la *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923 la interacțiunea culturii cu concentrații subinhibitorii ale $C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$ și enotaninei hidrosolubile

Tulpina	Concen- trația,	Activitatea enzimelor extracelulare, %M		Activitatea enzimelor intracelulare, %M	
		SOD	CAT	SOD	CAT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	$C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$ $\mu g/mL$				
	0,4	31,4 $\pm$ 5,1	7,5 $\pm$ 0,9	54,9 $\pm$ 5,4	60,5 $\pm$ 4,8
	0,8	26,5 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 0,07	39,3 $\pm$ 0,8	58,2 $\pm$ 3,4
	1,3	3,5 $\pm$ 1,7	3,3 $\pm$ 1,2	21,5 $\pm$ 1,6	45,8 $\pm$ 5,3
	Enotantină hidrosolubilă, mg/mL + $C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$, $\mu g/mL$				
	1,50 + 0,8	0	0	14,7 $\pm$ 2,3	13,3 $\pm$ 0,7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	$C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$ $\mu g/mL$				
	0,4	52,6 $\pm$ 3,6	0	62,5 $\pm$ 2,4	27,3 $\pm$ 0,6
	0,8	27,2 $\pm$ 3,3	0	44,2 $\pm$ 3,2	7,9 $\pm$ 1,1
	1,3	0	0	3,3 $\pm$ 1,8	3,7 $\pm$ 1,7
	Enotantină hidrosolubilă, mg/mL + $C_{17}H_{18}ClN_3NiOS$, $\mu g/mL$				
	1,50 + 0,8	0	0	0	0

Efectul compusului testat asupra activității exoenzimelor eliberate și a acelor endocelulare la *Escherichia coli* ATCC 25923 de asemenea, a fost negativ în toate variantele experienței. Prezența compusului chimic duce la inactivarea completă sau parțială a activității enzimelor antioxidante. Astfel, la toate concentrațiile testate are loc inhibarea completă a activității catalazei exocelulare. Activitatea SOD extracelulară de asemenea scade semnificativ – cu 47,4% în cazul concentrației de 0,4 $\mu g/mL$ a compusului și cu 72,8% în cazul concentrației de 0,8 $\mu g/mL$. Concentrația de 1,3 $\mu g/mL$ duce la inhibarea completă a activității SOD extracelulare. Activitatea endoenzimelor antioxidante, de asemenea se diminuează semnificativ. În special, scade activitatea catalazei intracelulare cu 72,7% la concentrația compusului de 0,4 $\mu g/mL$, cu 92,1% la concentrația de 0,8 $\mu g/mL$ și cu 96,3% la concentrația de 1,3 $\mu g/mL$ a compusului. Activitatea supeoxidismutazei intracelulare în cazul primelor două concentrații scade mai puțin ca activitatea catalazei (cu 37,5 și 55,8% respectiv), iar la concentrația de 1,3 $\mu g/mL$ această diminuare este cu 96,7% față de martor. Combinarea concentrației de 0,8 $\mu g/mL$ a compusului cu $\frac{1}{2}$ CMI pentru enotanina hidrosolubilă duce la inhibarea completă a exoenzimelor și endoenzimelor antioxidante la *Escherichia coli*.

Astfel a fost stabilit, că concentrațiile minime de inhibiție a compușilor chimici noi au efecte inhibitorii pronunțate asupra activității enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923. Dintre compușii naturali efecte pronunțate asupra activității enzimatică o are enotanina hidrosolubilă, care poate fi considerată un compus sinergist eficient, care potențează efectul antibacterian al compușilor chimici. În dependență de

compușii cu care sunt combinate, preparatele din spirulina (BioR și ES) sunt capabile atât să sporească, cât și să diminueze efectul antibacterian al compușilor chimici. Un efect inhibitor semnificativ asupra enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923 poate fi obținut și în cazul aplicării concentrațiilor $\frac{1}{2}$ CMI de CMSA 68 în combinație cu $\frac{1}{2}$ CMI enotanină hidrosolubilă.

4.4. Concluzii la capitolul 4

Unul dintre mecanismele de acțiune a compușilor chimici testați este dereglarea permeabilității membranelor celulare, care duce la eliberarea conținutului celular și ca urmare, moartea celulelor. Compușii naturali nu au efect deterioarant foarte pronunțat asupra membranelor, în schimb aceștia pot genera un efect sinergic pronunțat fiind aplicați împreună cu compușii chimici. În cazul bacteriilor Gram - și al tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 cel mai pronunțat efect sinergic se observă în cazul combinării compușilor chimici cu enotanina hidrosolubilă, iar în cazul bacteriilor Gram + în calitate de potențatori ai efectului de permeabilizare a membranelor pot fi considerate preparatele pe bază de spirulină

Efectul antimicrobian al compușilor chimici noi este asociat cu generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, care provoacă starea de stres oxidativ. În toate variantele experimentale nivelul SRO depășește semnificativ nivelul lor în cultura netratată, fiind comparabil sau chiar mai mare față de nivelul de SRO indus de substanțele antimicrobiene de referință. Nivelul de SRO este mult mai înalt la tulpinile de bacterii Gram - și la *Candida albicans* comparativ cu bacteriile Gram +.

Enotanina solubilă aplicată individual are efecte de inducere a procesului de generare excesivă a SRO, în special la bacteriile Gram - și la *Candida albicans*. Enotanina are un efect sinergic față de compușii chimici în ceea ce privește producerea de SRO în combinație cu majoritatea compușilor testați și la toate tulpinile microbiene cercetate, cu o amplitudine mult mai înaltă în cazul bacteriilor Gram (-) și a tulpinii fungice *Candida albicans*.

Preparatul Bior și extractul din biomasa de spirulină de asemenea au acțiune sinergică în ceea ce ține de producerea de SRO de către *Candida albicans* ATCC 10231 la combinație cu compușii chimici selectați pentru activitatea lor antifungică. La 4 dintre cele 5 tulpini de microorganisme (*S.aureus*, *E.coli*, *B.cereus*, *C.albicans*) studiate, pierderea conținutului intracelular sub acțiunea compușilor chimici noi cu activitate antimicrobiană, este asociată cu producerea în exces a speciilor reactive ale oxigenului, iar în cazul uneia (*S.enterica*) – sub acțiunea compușilor de origine naturală. În cazul combinațiilor dintre compușii chimici și cei naturali stresul oxidativ nu este unicul mecanism prin care are loc eliberarea conținutului celular în mediul extracelular.

Concentrațiile minime de inhibiție a compușilor chimici noi au efecte inhibitorii pronunțate asupra activității enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923. Dintre compușii naturali efecte pronunțate asupra activității enzimactice o are enotanina hidrosolubilă, care poate fi considerată un compus sinergist eficient, care potențează efectul antibacterian al compușilor chimici. În dependență de compușii cu care sunt combinate, preparatele din spirulina (BioR și ES) sunt capabile atât să sporească, cât și să diminueze efectul antibacterian al compușilor chimici. Un efect inhibitor semnificativ asupra enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923 poate fi obținut și în cazul aplicării concentrațiilor $\frac{1}{2}$ CMI de cloro[N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-etiliden)-hidrazincarbonat]amido (1-)]-nichel (II) în combinație cu $\frac{1}{2}$ CMI enotanină hidrosolubilă.

CONCLUZII GENERALE

1. Compușii tiosemicarbazonați ai Cu(II), Co(III) și Ni(II) manifestă activitate antimicrobiană specifică cu referire la poziția sistematică a microorganismelor testate. Astfel, majoritatea compușilor au manifestat efecte antimicrobiene de diferită intensitate față de bacteriile Gram(+), Gram(-) și *Candida albicans*.
2. Activitatea antimicrobiană a compușilor chimici noi este amplificată prin elaborarea de combinații între aceștia și preparatele de origine naturală – extracte din biomasa de spirulină și enotanină hidrosolubilă.
3. Unul dintre mecanismele de acțiune a compușilor chimici testați este dereglarea permeabilității membranelor celulare, care duce la eliberarea conținutului celular și ca urmare, moartea celulelor. Compușii naturali generează un efect sinergic pronunțat fiind aplicați împreună cu compușii chimici. În cazul bacteriilor Gram (-) și al tulpinii *Candida albicans* ATCC 10231 cel mai pronunțat efect sinergic se observă în cazul combinării compușilor chimici cu enotanina hidrosolubilă, iar în cazul bacteriilor Gram (+) în calitate de potențatori ai efectului de permeabilizare a membranelor pot fi considerate preparatele pe bază de spirulină.
4. Efectul antimicrobian al compușilor chimici noi este asociat cu generarea excesivă a speciilor reactive ale oxigenului, care provoacă starea de stres oxidativ. Nivelul de SRO este mult mai înalt la tulpinile de bacterii Gram (-) și la *Candida albicans* comparativ cu bacteriile Gram (+).
5. Enotanina are un efect sinergic față de compușii chimici în ceea ce privește producerea de SRO în combinație cu majoritatea compușilor testați și la toate tulpinile microbiene cercetate, cu o amplitudine mult mai înaltă în cazul bacteriilor Gram (-) și a tulpinii fungice *Candida albicans*. Preparatul Bior și extractul din biomasa de spirulină de asemenea au acțiune sinergică în ceea ce ține de producerea de SRO de către *Candida albicans* ATCC 10231 la combinație cu compușii chimici selectați pentru activitatea lor antifungică.
6. Concentrațiile minime de inhibiție ale compușilor chimici noi au efecte inhibitorii pronunțate asupra activității enzimelor antioxidante la tulpinile *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 și *Escherichia coli* ATCC 25923. Dintre compușii naturali efecte pronunțate asupra activității enzimatice o are enotanina hidrosolubilă, care poate fi considerată un compus sinergist eficient, care potențează efectul antibacterian al compușilor chimici. În dependență de compușii cu care sunt combinate, preparatele din spirulina (BioR și ES) sunt capabile atât să sporească, cât și să diminueze efectul antibacterian al compușilor chimici.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în elucidarea efectelor antimicrobiene a unor noi substanțe chimice, compuși naturali noi și combinații dintre acestea asupra tulpinilor de microorganisme patogene, ceea ce a contribuit la evidențierea țintelor de acțiune a substanțelor și combinațiilor noi, fapt ce a permis confirmarea caracterului polifuncțional al acestora.

Aportul personal. Planificarea experiențelor, selectarea grupurilor de substanțe pentru includerea lor în screening, experiențele au fost realizate de autoare. Analiza rezultatelor, generalizările și concluziile aparțin autoarei. În publicații autoarei îi revine cota-parte în corespundere cu lista autorilor.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă combinația compușilor selectați cu enotanina în scopul obținerii unor efecte antimicrobiene amplificate pentru testări pe tulpini clinice.
2. Se recomandă compuși biologic activi cu activitate antimicrobiană pronunțată în calitate de substanțe cu efecte antibacteriene față de tulpinile de referință și se propune continuarea cercetărilor clinice privind elaborarea produselor antimicrobiene combinate de sinteză și naturiste.
3. Pentru a asigura inofensivitatea compușilor testați sunt necesare studii ca continuitate a prezentei lucrări în vederea determinării proprietăților farmacologice *in vivo* și potențialul acestora de a fi utilizați ca agenți antimicrobieni.
4. Metodele aplicate și rezultatele obținute în prezentul studiu pot fi utilizate în procesul de instruire universitară și postuniversitară la disciplinele microbiologie clinică și laboratorul microbiologic.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Realizarea testelor biomedicale în scopul validării efectelor compușilor și combinațiilor identificate *in vivo*.
2. Realizarea cercetărilor genetico-moleculare în vederea evidențierii efectului compușilor și combinațiilor evidențiate asupra expresiei unor gene la tulpinile testate în scopul identificării țintelor noi asupra cărora acționează acestea.

BIBLIOGRAFIE

În română:

1. GONCIAR, V., **ZARICIUC, E.**, BACINSCHI, N., LUPAȘCU, T., PLUGARU, Ș., RUDIC, V., CERLAT, S. Remediul antibacterian. Brevet de invenție MD 3228. A61K 36/87 UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD, Nr de depozit a 2006 0081, Data de depozit 2007.01.31. Publicat 2007.01.31. BOPI 2007, nr.1, oo.31-32.
2. GRAUR, V.; **ZARICIUC E.**; USATAIA, I.; ȚAPCOV, V.; RUDIC, V.; GULEA, A. *Metil-N' -[(2-hidroxi-naftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioat, care manifestă activitate antimicrobică față de Candida albicans.* Brevet de invenție MD 4402. C07C 337/08 UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD, Nr de depozit a a 2015 0084, Data de depozit 2016.02.29. Publicat 2016.02.29. BOPI 2016, nr.2, pp.32-33
3. ISTRATI, D., GULEA, A., ȚAPCOV, V., **ZARICIUC, E.**, COTOVAIA, A. Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbonotioamido(1-)}nichel, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*. Brevetul de invenție MD 4462. C07F 15/04 UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE, MD, Nr de depozit a 2016 0021, Data de depozit 2016.02.29. Publicat 2017.01.31. BOPI 2017, nr.1, pp.28-29.
4. LĂZĂRESCU, A., **ZARICIUC, E.**, COJOCARI, D., GONCIAR, V., BOUROȘ, P., TURTĂ, C. Derivați tiosemicarbazonici ai acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu proprietăți antibacteriene. Brevet de invenție MD 4174. 2012.06.30 C07C 337/08 INSTITUTUL DE CHIMIE, MD, Nr de depozit a 2011 0096, Data de depozit 2012.06.30. Publicat 2012.06.30. BOPI 2012, nr.6, pp.23-24.
5. LAZARESCU, A.; MELNIC, E.; BOUROȘ, P.; **ZARICIUC, E.** Compus hidrazonic al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic care manifestă activitate antimicrobiană. Brevet de invenție MD 4600. C07C 337/04 INSTITUTUL DE CHIMIE, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD, Nr de depozit a 2017 0061, Data de depozit 2017.06.06. Publicat 2018.11.30. BOPI 2018, nr.11, p.54.

6. LAZARESCU, A.; MELNIC, E.; BOUROȘ, P.; **ZARICIUC, E.** Compuși coordinativi ai cuprului(II) cu S-metil- b -N- (2- h i drox i -3-carbox i na f t ilmetil en)ditiocarbazat care manifestă activitate antimicrobiană Brevet de invenție MD 4611. C07C 337/04 INSTITUTUL DE CHIMIE, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD, Nr de depozit a 2017 0062, Data de depozit 2017.06.06. Publicat 2018.11.30. BOPI 2018, nr.12, pp.43-44.
7. LOZAN-TÎRȘU, C. Efecte antimicrobiene ale unor substanțe chimice din produse autohtone” Teză de doctor în științe medicale. 2017, 167 p.
8. RUDIC, V. BioR. Studii biomedicale și clinice. Chișinău: S.n., 2007 (Tipografia ”Elena V.I.” SRL), 376p. ISBN 978-9975-9548-8-4
9. RUDIC, V., LOZAN-TÎRȘU, C., **ZARICIUC, E.**, GULEA, A., ȚAPCOV, V. Inhibitorii proliferării bacteriei *Bacillus cereus* în baza compușilor coordinativi ai cuprului care conțin 4-feniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei și sulfanilamide. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2014, nr. 1(322), p. 139-146. ISSN 1857-064X
10. **ZARICIUC, E.** Activitatea antimicrobiană *in vitro* a unor compuși autohtoni noi. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2017, nr. 2(332), p.146-153. ISSN 1857-064X
11. **ZARICIUC, E.** Influența unor compuși chimici noi asupra proceselor enzimactice la *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2018, nr. 3(336), p. 151-159. ISSN 1857-064X.
12. **ZARICIUC, E.**, SAVINA-GROSU, A., RUDIC, V., MUSET, GH., LUPASCU, L., PLUGARU, Ș., CALANCEA, A. Studiul activității antibacteriene și antifungice a Enoxilului. În: *Produse vinicole secundare*/In redacția acad. Gheorghe Duca. Chișinău: „Știința”, 2011, p. 178-184.
13. **ZARICIUC, Elena;** RUDIC, Valeriu. Acțiunea sinergică a enotaninului solubil și a compușilor tiosemicarbazonici asupra activității enzimelor antioxidante ale unor microorganisme. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină* . 2019, nr. 2(80), pp. 61-65. ISSN 1729-8687.

In engleză:

14. ABDEL-MONEIM, A.-M. E., EL-SAADONY, M. T., SHEHATA, A. M., SAAD, A. M., ALDHUMRI, S. A., OUDA, S. M., MESALAM, N. M. Antioxidant and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extracts and biogenic selenium nanoparticles against selected

- pathogenic bacteria and fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2022, 29(2), 1197–1209. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.046>. ISSN 1319562X.
15. AJIBOYE, T. O., NAIBI, A. M., ABDULAZEEZ, I. O., ALEGE, I. O., MOHAMMED, A. O., BELLO, S. A., YUSUF, I. I., IBITOYE, O. B., MURITALA, H. F.. Involvement of oxidative stress in bactericidal activity of 2-(2-nitrovinyl) furan against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 91, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.020>. ISSN 1096-1208
 16. ALEXANDER, J. A. N., RADAIEVA, M., KING, D. T., CHAMBERS, H. F., CHERKASOV, A., CHATTERJEE, S. S., STRYNADKA, N. C. J. Structural analysis of avibactam-mediated activation of the bla and mec divergons in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(32), 10870–10884. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013029>. ISSN 1083-351X.
 17. ALGHAZEER, R., WHIDA, F., ABDUELHRMAN, E., GAMMOUDI, F., AZWAI, S. Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *Natural Science*, 2013. 05(01), 7–14. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.51002>. ISSN 2150-4091, 2150-4105.
 18. ALMEIDA, J. C. L., AMIM, R. S., PESSOA, C., LOURENÇO, M. C. S., MENDES, I. C., LESSA, J. A. Bismuth(III) complexes with pyrazineformamide thiosemicarbazones: Investigation on the antimicrobial and cytotoxic effects. *Polyhedron*, 2020, 189, 114709. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114709>. ISSN 02775387.
 19. ALSHUNIABER, M. A., KRISHNAMOORTHY, R., ALQHTANI, W. H. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds from *Spirulina* against food-borne bacterial pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(1), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.029>. ISSN 1319562X.
 20. ALTHAGAFI, I., EL-METWALY, N., FARGHALY, T. A. New Series of Thiazole Derivatives: Synthesis, Structural Elucidation, Antimicrobial Activity, Molecular Modeling and MOE Docking. *Molecules*, 2019, 24(9), 1741. <https://doi.org/10.3390/molecules24091741>. ISSN 1420-3049.
 21. ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J., BARRAJÓN-CATALÁN, E., ENCINAR, J. A., RODRÍGUEZ-DÍAZ, J. C., MICOL, V. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Current Medicinal Chemistry*, 2020, 27(15), 2576–2606. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008115650>. ISSN 09298673.
 22. ANDRADE, J. C., MORAIS BRAGA, M. F. B., GUEDES, G. M. M., TINTINO, S. R., FREITAS, M. A., QUINTANS, L. J., MENEZES, I. R. A., COUTINHO, H. D. M. Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization

- mechanism. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, 24(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.004>. ISSN 1319-562X.
23. ANDREI, S., DROC, G., STEFAN, G. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. *Discoveries*, 2019, 7(4), e102. <https://doi.org/10.15190/d.2019.15>. ISSN 23597232.
 24. ANNUNZIATO, G. Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23), E5844. <https://doi.org/10.3390/ijms20235844>. ISSN 1422-0067
 25. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. In *Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease*. 2013, <https://doi.org/CS239559-B>
 26. AROKIYARAJ, S., ARASU, M. V., VINCENT, S., PRAKASH, N. U., CHOI, S. H., OH, Y.-K., CHOI, K. C., KIM, K. H. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* L and its antibacterial and cytotoxic effects: An in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9, 379–388. <https://doi.org/10.2147/IJN.S53546>. ISSN 1178-2013.
 27. ASLAM, B., WANG, W., ARSHAD, M. I., KHURSHID, M., MUZAMMIL, S., RASOOL, M. H., NISAR, M. A., ALVI, R. F., ASLAM, M. A., QAMAR, M. U., SALAMAT, M. K. F., BALOCH, Z. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 2018, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>. ISSN 1178-6973.
 28. AVEDISSIAN, S. N., LIU, J., RHODES, N. J., LEE, A., PAIS, G. M., HAUSER, A. R., SCHEETZ, M. H. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Polymyxin B. *Antibiotics*, 2019, 8(1), 31. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010031>. ISSN 2079-6382.
 29. BAJAJ, K., BUCHANAN, R. M., GRAPPERHAUS, C. A. Antifungal activity of thiosemicarbazones, bis(thiosemicarbazones), and their metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, 225, 111620. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111620>
 30. BALAN, G.; BURDUNIUC (POPA), O. Synergistic antimicrobial activity of some chemical compounds combined with spirulina extracts. In: *Scientific Collection "InterConf"*. Vol. 44, 6-8 martie 2021, Ottawa. Ottawa, Canada: Methuen Publishing House, 2021, pp. 437-439. ISBN 978-0-458-20903-3. ISSN 01620134
 31. BALAN, G., BURDUNIUC, O., USATAIA, I., GRAUR, V., CHUMAKOV, Y., PETRENKO, P., GUDUMAC, V., GULEA, A., PAHONTU, E. Novel 2-formylpyridine 4-allyl- S -methylisothiosemicarbazone and Zn(II), Cu(II), Ni(II) and Co(III) complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity. *Applied Organometallic Chemistry*, 2020, 34(3). <https://doi.org/10.1002/aoc.5423>. ISSN 0268-2605, 1099-0739.

32. BALAN, G; PUȘCAȘ, N., LOZAN-TÎRȘU, C; **ZARICIUC, E**, RUDIC V. Bacterial profile and antibiotic resistance in patients with trophic ulcer. In: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 4th edition. – Chișinău, October, 11-12, 2018, p.27.
33. BANERJEE, M., MALLICK, S., PAUL, A., CHATTOPADHYAY, A., GHOSH, S. S. Heightened Reactive Oxygen Species Generation in the Antimicrobial Activity of a Three Component Iodinated Chitosan–Silver Nanoparticle Composite. *Langmuir*, 2010, 26(8), 5901–5908. <https://doi.org/10.1021/la9038528>. ISSN 0743-7463, 1520-5827
34. BARILLO, D. J., BARILLO, A. R., KORN, S., LAM, K., ATTAR, P. S.. The antimicrobial spectrum of Xeroform ®. *Burns*, 2017, 43(6), 1189–1194. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.10.023>. ISSN 0305-4179.
35. BARUFFINI, E., RUOTOLO, R., BISCEGLIE, F., MONTALBANO, S., OTTONELLO, S., PELOSI, G., BUSCHINI, A., LODI, T. Mechanistic insights on the mode of action of an antiproliferative thiosemicarbazone-nickel complex revealed by an integrated chemogenomic profiling study. *Scientific Reports*, 2020, 10(1), 10524. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67439-y>. ISSN 2045-2322
36. BEAVERS, W. N., SKAAR, E. P. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease*, 2016, 74(6), ftw060. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw060>. ISSN 2049-632X.
37. BECKFORD, F. A., WEBB, K. R. Copper complexes containing thiosemicarbazones derived from 6-nitropiperonal: Antimicrobial and biophysical properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 183, 158–171. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.04.057>. ISSN 1386-1425.
38. BERNAL, P., MOLINA-SANTIAGO, C., DADDAOUA, A., LLAMAS, M. A. Antibiotic adjuvants: Identification and clinical use. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(5), 445–449. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12044>. ISSN 1751-7915.
39. BETONI, J. E. C., MANTOVANI, R. P., BARBOSA, L. N., DI STASI, L. C., FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2006, 101(4), 387–390. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762006000400007>. ISSN 0074-0276.
40. BIHARI, B., GAUTAM, G. K., VED, A. Synthesis, Characterization, In-Vitro Antimicrobial Evaluation and Molecular Docking Studies of Aromatic Aldehydes Substituted Thiosemicarbazide Quinoxaline Derivatives. *International Journal of Current Research and Review*, 2021, 13(13), 45–55. <https://doi.org/10.31782/IJCRR.2021.131302>. ISSN 22312196, 09755241.

41. BISCEGLIE, F., BACCI, C., VISMARRA, A., BARILLI, E., PIOLI, M., ORSONI, N., PELOSI, G. Antibacterial activity of metal complexes based on cinnamaldehyde thiosemicarbazone analogues. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2020, 203, 110888. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110888>. ISSN 01620134.
42. BOLLA, J.-M., ALIBERT-FRANCO, S., HANDZLIK, J., CHEVALIER, J., MAHAMOUD, A., BOYER, G., KIEĆ-KONONOWICZ, K., PAGÈS, J.-M. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 2011, 585(11), 1682–1690. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.054>. ISSN 00145793.
43. BORNA, S., ABDOLLAHI, A., MIRZAEI, F. Predictive value of mid-trimester amniotic fluid high-sensitive C-reactive protein, ferritin, and lactate dehydrogenase for fetal growth restriction. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;**52**(4):498–500. ISSN-0377-4929
44. BREIJYEH, Z., JUBEH, B., KARAMAN, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(6), E1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>. ISSN 1420-3049.
45. BROWNE, K., CHAKRABORTY, S., CHEN, R., WILLCOX, M. D., BLACK, D. S., WALSH, W. R., KUMAR, N. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19), 7047. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>. ISSN 1422-0067.
46. CABANILLAS, A. H., TENA PÉREZ, V., MADERUELO CORRAL, S., ROSERO VALENCIA, D. F., MARTEL QUINTANA, A., ORTEGA DOMÉNECH, M., RUMBERO SÁNCHEZ, Á. Cybastacines A and B: Antibiotic Sesterterpenes from a *Nostoc* sp. Cyanobacterium. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(2), 410–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00638>. ISSN 0163-3864, 1520-6025
47. CAPATINA, T; JALBA, A; **ZARICIUC, E**; SOFRONI, L; SOFRONI, D; TSAPKOV, V; GULEA, A. Synthesis, structure, antitumor and antimicrobial activity of 3d-metal momplexes with some derivatives of pyridine-2-carbaldehyde 4(pyridine2-yl)thiosemicarbazones. In: The XVII-th International Conference Physical methods in coordination and supramolecular chemistry., Chisinau, 2012, October, 24-25, p. 83-84
48. CARPINE, R., SIEBER, S. Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health. *Current Research in Biotechnology*, 2021, 3, 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.03.001>. ISSN 2590-2628
49. Center for Disease Dynamics Economics Policy. The State of the world’s antibiotics 2015. *Centre for Disease Dynamics, Economics Policy, CDDEP: Washington, D.C*, 2015, 1–84. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)

50. CHAITHAWIWAT, K., VANGNAI, A., MCEVOY, J. M., PRUESS, B., KRAJANGPAN, S., KHAN, E. Role of oxidative stress in inactivation of *Escherichia coli* BW25113 by nanoscale zero-valent iron. *The Science of the Total Environment*, 2016, 565, 857–862. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.191>. ISSN 1879-1026
51. CHANDRA, S. VANDANA. Synthesis, spectroscopic, anticancer and antibacterial studies of Ni(II) and Cu(II) complexes with 2-carboxybenzaldehyde thiosemicarbazone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 129, 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.141>. ISSN 1386-1425.
52. CHANDRA, S., BARGUJAR, S., NIRWAL, R., YADAV, N. Synthesis, spectral characterization and biological evaluation of copper(II) and nickel(II) complexes with thiosemicarbazones derived from a bidentate Schiff base. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, 106, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.12.014>. ISSN 1386-1425.
53. CHILCZUK, T., STEINBORN, C., BREINLINGER, S., ZIMMERMANN-KLEMD, A. M., HUBER, R., ENKE, H., ENKE, D., NIEDERMEYER, T. H. J., & GRÜNDEMANN, C. Hapalindoles from the Cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. Inhibit T Cell Proliferation. *Planta Medica*, 2020, 86(02), 96–103. <https://doi.org/10.1055/a-1045-5178>. ISSN 0032-0943, 1439-0221.
54. CHUSRI, S., NA-PHATTHALUNG, P., SIRIYONG, T., PAOSEN, S., VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Holarrhena antidysenterica as a resistance modifying agent against *Acinetobacter baumannii*: Its effects on bacterial outer membrane permeability and efflux pumps. *Microbiological Research*, 2014, 169(5–6), 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.004>. ISSN 1618-0623
55. CORRÊA, R. C. G., HELENO, S. A., ALVES, M. J., FERREIRA, I. C. F. R. Bacterial Resistance: Antibiotics of Last Generation used in Clinical Practice and the Arise of Natural Products as New Therapeutic Alternatives. *Current Pharmaceutical Design*, 2020, 26(8), 815–837. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200224105153>. ISSN 1381-6128.
56. COX, G., WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013, 303(6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>. ISSN 1438-4221.
57. DAMIT, N. S. H. H., HAMID, M. H. S. A., RAHMAN, N. S. R. H. A., ILIAS, S. N. H. H., KEASBERRY, N. A. Synthesis, structural characterisation and antibacterial activities of lead(II) and some transition metal complexes derived from quinoline-2-carboxaldehyde 4-methyl-3-thiosemicarbazone. *Inorganica Chimica Acta*, 2021, 527, 120557. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120557>. ISSN 0020-1693.

58. DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>. ISSN 1092-2172, 1098-5557.
59. DE ARAÚJO NETO, L. N., DO CARMO ALVES DE LIMA, M., DE OLIVEIRA, J. F., DE SOUZA, E. R., BUONAFINA, M. D. S., VITOR ANJOS, M. N., BRAYNER, F. A., ALVES, L. C., NEVES, R. P., MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 272, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.005>. ISSN 0009-2797.
60. DE KRAKER, M. E. A., DAVEY, P. G., GRUNDMANN, H., BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: Estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS Medicine*, 2011, 8(10), e1001104. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001104>. ISSN 1549-1676.
61. DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2009, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>. ISSN 0006-3002.
62. DEMAY, J., BERNARD, C., REINHARDT, A., MARIE, B. Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities. *Marine Drugs*, 2019, 17(6), 320. <https://doi.org/10.3390/md17060320>. ISSN 1660-3397.
63. DHILLON, S. Meropenem/Vaborbactam: A Review in Complicated Urinary Tract Infections. *Drugs*, 2018, 78(12), 1259–1270. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0966-7>. ISSN 1179-1950.
64. DOUAFFER, H., ANDRIEU, V., PHANSTIEL, O., BRUNEL, J. M. Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62(19), 8665–8681. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01781>. ISSN 1520-4804.
65. DUBIN, G. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biological Chemistry*, 2002, 383(7–8), 1075–1086. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.116>. ISSN 1431-6730.
66. EL-SAWAF, A. K., EL-ESSAWY, F., NASSAR, A. A., EL-SAMANODY, E.-S. A. Synthesis, spectral, thermal and antimicrobial studies on cobalt(II), nickel(II), copper(II), zinc(II) and palladium(II) complexes containing thiosemicarbazone ligand. *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1157, 381–394. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.075>. ISSN 0022-2860.
67. EL-SHEEKH, M. M., DABOOR, S. M., SWELIM, M. A., MOHAMED, S. Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. *Iranian Journal of Microbiology*, 2014, 6(2), 112–119. ISBN 2008-3289.

68. EZZAT, A., MOHAMED, M. B. I., MAHMOUD, A. M., FARAG, R. S., EL-TABL, ABDU. S., & RAGAB, A. Synthesis, spectral characterization, antimicrobial evaluation and molecular docking studies of new Cu (II), Zn (II) thiosemicarbazone based on sulfonyl isatin. *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1251, 132004. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132004>. ISSN 0022-2860.
69. FDA.. *New FDA Approved Drugs for 2017. CenterWatch.* (2017) <https://www.Centerwatch.Com/Drug-Information/Fda-Approved-Drugs/>.
<http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/>
70. FEDOROWICZ, J., SĄCZEWSKI, J. Modifications of quinolones and fluoroquinolones: Hybrid compounds and dual-action molecules. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 2018, 149(7), 1199–1245. <https://doi.org/10.1007/s00706-018-2215-x>. ISSN 0026-9247, 1434-4475.
71. FERNANDES, P. The global challenge of new classes of antibacterial agents: An industry perspective. *Current Opinion in Pharmacology*, 2015, 24, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.06.003>. ISSN 1471-4892.
72. FERREIRA, J. B., RAPOPORT, P. B., SAKANO, E., KÓs, A. O. D. A., PILTCHER, O. B., PIGNATARI, S. S. N., PINHEIRO, S. D., MOCELLIN, M. Efficacy and safety of Sultamicillin (Ampicillin/Sulbactam) and Amoxicillin/Clavulanic acid in the treatment of upper respiratory tract infections in adults-An open-label, multicentric, randomized trial. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 2006, 72(1), 104–111. [https://doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)30041-0](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)30041-0). ISSN 1808-8694.
73. FREI, A., ZUEGG, J., ELLIOTT, A. G., BAKER, M., BRAESE, S., BROWN, C., CHEN, F., G. DOWSON, C., DUJARDIN, G., JUNG, N., KING, A. P., MANSOUR, A. M., MASSI, M., MOAT, J., MOHAMED, H. A., RENFREW, A. K., RUTLEDGE, P. J., SADLER, P. J., TODD, M. H., BLASKOVICH, M. A. T. Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chemical Science*, 2020, 11(10), 2627–2639. <https://doi.org/10.1039/C9SC06460E>. ISSN 2041-6520, 2041-6539.
74. GABER, A., REFAT, M. S., BELAL, A. A. M., EL-DEEN, I. M., HASSAN, N., ZAKARIA, R., ALHOMRANI, M., ALAMRI, A. S., ALSANIE, W. F., M. SAIED, E. M. New Mononuclear and Binuclear Cu(II), Co(II), Ni(II), and Zn(II) Thiosemicarbazone Complexes with Potential Biological Activity: Antimicrobial and Molecular Docking Study. *Molecules*, 2021, 26(8), 2288. <https://doi.org/10.3390/molecules26082288>. ISSN 1420-3049.
75. GARBUZ, O.. *New inorganic and organic molecular inhibitors of cancer cells proliferation, the mechanisms of action* [Doctoral]. State University of Moldova. 2021, 175 p.

76. GIULIANI, A., PIRRI, G., NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2007, 2(1), 1–33. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>. ISSN 2391-5412.
77. GLASCOTT, E. L. Polymyxin B or polymyxin E: Does it really matter? *Journal of Pharmacy Practice and Research*, 2018, 48(5), 492–494. <https://doi.org/10.1002/jppr.1435>. ISSN 1445-937X.
78. GONG, C.-J., GAO, A.-H., ZHANG, Y.-M., SU, M.-B., CHEN, F., SHENG, L., ZHOU, Y.-B., LI, J.-Y., LI, J., NAN, F.-J. Design, synthesis and biological evaluation of bithiazole-based trifluoromethyl ketone derivatives as potent HDAC inhibitors with improved cellular efficacy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 112, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.003>. ISSN 1768-3254.
79. GORITYALA, B. K., GUCHHAIT, G., FERNANDO, D. M., DEO, S., MCKENNA, S. A., ZHANEL, G. G., KUMAR, A., SCHWEIZER, F. Adjuvants Based on Hybrid Antibiotics Overcome Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Enhance Fluoroquinolone Efficacy. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(2), 555–559. <https://doi.org/10.1002/anie.201508330>. ISSN 1433-7851.
80. GORITYALA, B. K., GUCHHAIT, G., GOSWAMI, S., FERNANDO, D. M., KUMAR, A., ZHANEL, G. G., SCHWEIZER, F. Hybrid Antibiotic Overcomes Resistance in *P. aeruginosa* by Enhancing Outer Membrane Penetration and Reducing Efflux. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(18), 8441–8455. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00867>. ISSN 0022-2623, 1520-4804.
81. GOULD, I. M., MIRÓ, J. M., RYBAK, M. J. Daptomycin: The role of high-dose and combination therapy for Gram-positive infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, 42(3), 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.005> ISSN 0924-8579.
82. GRAUR V., GARBUZ O., **ZARICIUC E.**, GUDUMAC V., GULEA A. Synthesis and biological activity of 2-formylpyridine n(4)-allyl-3-seleno-semicarbazone and its copper coordination compound. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2015, nr. 3(327), p. 135-142. ISSN 1857-064X
83. GRAUR V., **ZARICIUC E.**, TSAPKOV V., BARBA N., GULEA A. Synthesis and biological activity of nickel and copper coordination compounds of 5-nitrofuran-2-carbaldehyde n(4)-allyl-3-thiosemicarbazone. In: Studia Universitatis Moldaviae, Seria “Științe reale și ale naturii” 2014, nr.6(76), p.119-123. ISSN 1814-3237.
84. GRAUR, V., USATAIA, I., BOUROSH, P., KRAVTSOV, V., GARBUZ, O., HUREAU, C., GULEA, A. Synthesis, characterization, and biological activity of novel 3 d metal

- coordination compounds with 2-acetylpyridine N^4 -allyl- S -methylisothiosemicarbazone. *Applied Organometallic Chemistry*, 2021, 35(4). <https://doi.org/10.1002/aoc.6172>. ISSN 0268-2605, 1099-0739.
85. GRAUR, Vasiliu O.; CHUMAKOV, Yurii; **ZARICIUC, Elena**; PETRENKO, Peter A.; TSAPKOV, Victor I.; GULEA, Aurelian. Coordination compounds of some 3D-metals with 4-allylthiosemicarbazones of salicylaldehyde and its derivatives. In: *The International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. 28-30 mai 2014, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Chimie al AŞM, 2014, p. 77.
 86. GRAUR, Vasiliu O.; **ZARICIUC, Elena**; TSAPKOV, Victor I.; GULEA, Aurelian. Synthesis and antimicrobial activity of cobalt, nickel, copper, and zinc coordination compounds with 5-nitro-2-furfurilidene-4-allylthiosemicarbazide. In: *The International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. 28-30 mai 2014, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Chimie al AŞM, 2014, p. 141.
 87. GUANÍ-GUERRA, E., SANTOS-MENDOZA, T., LUGO-REYES, S. O., TERÁN, L. M. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 2010, 135(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004>. ISSN 1521-7035.
 88. GULEA, A. P., MITKEVICH, N. L., CHUMAKOV, YU. M., PETRENKO, P. A., BALAN, G. G., BURDUNIUC, O. S., TSAPKOV, V. I. Synthesis, Structure, and Biological Activity of Coordination Compounds of Cobalt(II), Nickel(II), and Copper(II) with N -(Methoxyphenyl)-2-[(5-nitrofuryl)methylene]hydrazine Carbothioamides. *Russian Journal of General Chemistry*, 2019, 89(7), 1415–1423. <https://doi.org/10.1134/S1070363219070119> ISSN 1070-3632, 1608-3350.
 89. GULEA, A; GRAUR, V; **ZARICIUC, E**; TSAPKOV, V. Synthesis, structure and biological activity of some 3d-metal complexes of some derivative of salicylaldehyde 4-allylthiosemicarbazones. The XVII-th International Conference Physical methods in coordination and supramolecular chemistry., Chisinau, 2012, October, 24-25, p. 109-110
 90. GULEA, A; GRAUR, V; **ZARICIUC, E**; JALBA, A; TSAPKOV, V; SOFRONI, L; RUDIC, V. Synthesis, antitumor, and antimicrobial activity of some 3d- metal complexes with 4-allylthiosemicarbazones of salicylaldehyde and its derivatives. În: 2nd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, October 03-05, 2012, Iaşi, Romania, p.59.
 91. GULEA, Aurelian; ERHAN, Tatiana; **ZARICIUC, Elena**; PETRENKO, Peter A.; CHUMAKOV, Yurii; JALBA, Svetlana; TSAPKOV, Victor I.. Synthesis, structure and

- antimicrobial activity of salicylaldehyde 4-(dimethylphenyl) thiosemicarbazones and biometal coordination compounds with these ligands. In: *Ecological and environmental chemistry - 2017*. Ediția 6, 2-3 martie 2017, Chișinău. Chisinau, Republic of Moldova: Academy of Sciences of Moldova, 2017, p. 215.
92. GULEA, Aurelian; GRAUR, Vasilii O.; TRUHINA, Irina; **ZARICIUC, Elena**; GARBUZ, Olga; LIPKOVSKY, A.. Synthesis, structure, antimicrobial and antitumor activity of 3D-metal complexes with salicylaldehyde 4-allyl-S-methylthiosemicarbazone. In: *The International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. 28-30 mai 2014, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Chimie al AȘM, 2014, p. 128
 93. GULEA, Aurelian; GRAUR, Vasilii O.; **ZARICIUC, Elena**; CIUNEAEVA, Anastasia; TSAPKOV, Victor I.. Template synthesis, structure and antimicrobial activity of 3D metal complexes with acetylacetone bis-(4-allylthiosemicarbazone). In: *The International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. 28-30 mai 2014, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Chimie al AȘM, 2014, p. 78. ISBN 978-9975-4432-8-9.
 94. GULEA, Aurelian; RUDIC, Valeriu; LOZAN-TÎRȘU, Carolina; **ZARICIUC, Elena**; TSAPKOV, Victor I.. Antimicrobial effect coordinative compounds of copper with 4-(dimethylphenyl)-thiosemicarbazones of 2-phormylpyridine. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 2, 9-10 octombrie 2014, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2014, p. 135. ISBN 978-9975-4432-8-9.
 95. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; GRAUR, Vasilii O.; TSAPKOV, Victor I.; RUDIC, Valeriu. The study of antimicrobial and antitumor activity of biometal coordination compounds of substituted salicylaldehyde 4-allylthiosemicarbazones. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 3, 12-13 octombrie 2016, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2016, pp. 67-68.
 96. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; GRAUR, Vasilii O.; TSAPKOV, Victor I.; RUDIC, Valeriu. Antimicrobial effect of copper and cobalt coordination compounds with salicylidene-4-allylthiosemicarbazide and its derivatives. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 2, 9-10 octombrie 2014, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2014, p. 136. ISBN 978-9975-4432-8-9
 97. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; MITKEVICH, N.; DAMIAN, Ina; TSAPKOV, Victor I.; COTOVAIA, Aliona; PAHONTU, Elena Mihaela; RUDIC, Valeriu. Bacteriostatic and bactericidal activities of cobalt, nickel, and copper coordination compounds of salicylidene-4-(methoxyphenyl)thiosemicarbazides. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 3,

- 12-13 octombrie 2016, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie, 2016, pp. 69-70.
98. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; MITKEVICH, N.; TSAPKOV, Victor I.; COTOVAIA, Aliona; RUDIC, Valeriu. Antimicrobial and antifungal effect of some biometal coordination compounds of 5-nitro-2-furaldehyde 4-(methoxyphenyl)thiosemicarbazones. In: *Microbial Biotechnology*. Ediţia 3, 12-13 octombrie 2016, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie, 2016, p. 71
 99. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; POIRIER, Donald; TSAPKOV, Victor I.; RUDIC, Valeriu. Synthesis, antimicrobial and antitumor activity of copper(II) salicylidene- and naphthalidene-4-alkylthiosemicarbazidates containing sulphanilamides. In: *The International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. 28-30 mai 2014, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Chimie al AŞM, 2014, p. 129
 100. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; TRUHINA, Irina; GRAUR, Vasili O.; TSAPKOV, Victor I.; RUDIC, Valeriu. Bacteriostatic and bactericidal activities of 3D-metal complexes with salicylaldehyde 4-allyl-s-methylthiosemicarbazone. In: *Microbial Biotechnology*. Ediţia 2, 9-10 octombrie 2014, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie, 2014, p. 137. ISBN 978-9975-4432-8-9..
 101. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; TSAPKOV, Victor I.; RUDIC, Valeriu. The study of the antimicrobial activity of copper(II) salicylideneand naphthalidene-4-alkylthiosemicarbazidates containing sulphanilamides. In: *Microbial Biotechnology*. Ediţia 2, 9-10 octombrie 2014, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie, 2014, pp. 138-139. ISBN 978-9975-4432-8-9.
 102. GULEA, Aurelian; **ZARICIUC, Elena**; USATAIA, Irina; GRAUR, Vasili O.; VASYLCA, M.; CERNOBAI, A.; TSAPKOV, Victor I.; RUDIC, Valeriu. Antimicrobial and antifungal activities of some 3d metal coordination compounds of salicylaldehyde 4-allyl-s-alkylisothiosemicarbazone and its derivatives. In: *Microbial Biotechnology*. Ediţia 3, 12-13 octombrie 2016, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie, 2016, pp. 72-73
 103. GUPTA, V., DATTA, P. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. *The Indian Journal of Medical Research*, 2019, 149(2), 97–106. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_755_18. ISSN 0971-5916
 104. GUTSANU, V., LISA, G. Composites containing metal and thiosemicarbazone: Thermal, antimicrobial and antifungal properties. *Polyhedron*, 2020, 191, 114800. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114800>. ISSN 0277-5387.

105. JAKUBIEC-KRZESNIAK, K., RAJNISZ-MATEUSIAK, A., GUSPIEL, A., ZIEMSKA, J., SOLECKA, J. Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Polish Journal of Microbiology*, 2018, 67(3), 259–272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>. ISSN 1733-1331
106. JANSSON, P. J., KALINOWSKI, D. S., LANE, D. J. R., KOVACEVIC, Z., SEEBACHER, N. A., FOUANI, L., SAHNI, S., MERLOT, A. M., RICHARDSON, D. R. The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the ‘Triad of Death’ in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones. *Pharmacological Research*, 2015, 100, 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.013>. ISSN 1096-1186.
107. JIA, X., AHMAD, I., YANG, R., WANG, C. Versatile graphene-based photothermal nanocomposites for effectively capturing and killing bacteria, and for destroying bacterial biofilms. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(13), 2459–2467. <https://doi.org/10.1039/C6TB03084J>. ISSN 2050-750X, 2050-7518.
108. JOHNSTONE, T. C., SUNTHARALINGAM, K., LIPPARD, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews*, 2016, 116(5), 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>. ISSN 0009-2665, 1520-6890.
109. JUBAIR, N., RAJAGOPAL, M., CHINNAPPAN, S., ABDULLAH, N. B., FATIMA, A. Review on the Antibacterial Mechanism of Plant-Derived Compounds against Multidrug-Resistant Bacteria (MDR). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–30. <https://doi.org/10.1155/2021/3663315>. ISSN 1741-4288, 1741-427X.
110. JUSKO, M., POTEPA, J., KANTYKA, T., BIELECKA, E., MILLER, H. K., KALINSKA, M., DUBIN, G., GARRED, P., SHAW, L. N., BLOM, A. M. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *Journal of Innate Immunity*, 2014, 6(1), 31–46. <https://doi.org/10.1159/000351458>. ISSN 1662-8128.
111. KALHOR, M., SHABANI, M., NIKOKAR, I., REYHANEH BANISAEED, S. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of some Novel Thiosemicarbazides, 1,2,4-Triazol-3-thiols and their S-substituted Derivatives. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 2015, 14(1), 67–75. ISSN 1735-0328
112. KANAGARATNAM, R., SHEIKH, R., ALHARBI, F., KWON, D. H. An efflux pump (MexAB-OprM) of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with antibacterial activity of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2017, 36, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.010>. ISSN 1618-095X.

113. KAPLANCIKLI, Z. A., ALTINTOP, M. D., SEVER, B., CANTÜRK, Z., ÖZDEMİR, A. Synthesis and *In Vitro* Evaluation of New Thiosemicarbazone Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Journal of Chemistry*, 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/1692540>. ISSN 2090-9063, 2090-9071.
114. KAPOOR, G., SAIGAL, S., ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 2017, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15. ISSN 0970-9185.
115. KATSUBE, T., WAJIMA, T., ISHIBASHI, T., ARJONA FERREIRA, J. C., ECHOLS, R. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling and Simulation of Cefiderocol, a Parenteral Siderophore Cephalosporin, for Dose Adjustment Based on Renal Function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(1), e01381-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01381-16>. ISSN 0066-4804, 1098-6596.
116. KEYNAN, Y., RUBINSTEIN, E. Staphylococcus aureus bacteremia, risk factors, complications, and management. *Critical Care Clinics*, 2013, 29(3), 547–562. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.008>. ISSN 1557-8232.
117. KHAN, T., SANKHE, K., SUVARNA, V., SHERJE, A., PATEL, K., DRAVYAKAR, B. DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2018, 103, 923–938. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.021>. ISSN 0753-3322.
118. KODURU, J. R., LEE, K. D. Evaluation of thiosemicarbazone derivative as chelating agent for the simultaneous removal and trace determination of Cd(II) and Pb(II) in food and water samples. *Food Chemistry*, 2014, 150, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.104>. ISSN 0308-8146.
119. KOMP LINDGREN, P., KARLSSON, A., HUGHES, D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in Escherichia coli isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(10), 3222–3232. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003>. ISSN 0066-4804.
120. LAM, P.-L., WONG, R. S.-M., LAM, K.-H., HUNG, L.-K., WONG, M.-M., YUNG, L.-H., HO, Y.-W., WONG, W.-Y., HAU, D. K.-P., GAMBARI, R., CHUI, C.-H. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. *Chemico-Biological Interactions*, 2020, 320, 109023. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109023>. ISSN 0009-2797.
121. LAMPEJO, T. Dalbavancin and telavancin in the treatment of infective endocarditis: A literature review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 56(3), 106072. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106072>. ISSN 0924-8579.

122. LAZARESCU, Ana; MELNIC, Elena; BOUROSH, Pavlina; TRACHEVSKII, V.; MELNYK, Andriy; **ZARICIUC, Elena**. Double-deprotonated form of ligand in copper(II) dithiocarbomethoxyhydrazone complexes derived from 4-formyl-3-hydroxy-2-naphthoic acid. In: *Materials Science a*; Moldova: Institutul de Fizică Aplicată, 2018, p. 112
123. LAZARESCU, Ana; **ZARICIUC, Elena**; RUDIC, Valeriu; TURTA, Constantin. Antimicrobial activity of some thiosemicarbazone copper(II) complexes derived from 4-formyl-3-hydroxy-2-naphthoic acid. In: *The International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova*. 28-30 mai 2014, Chişinău. Chişinău, Republica Moldova: Institutul de Chimie al AŞM, 2014, p. 87
124. Li, G., Zhang, J., Li, C., Guo, Q., Jiang, Y., Wei, J., Qiu, Y., Zhao, X., Zhao, L., Lu, J., Wan, K. (2016). Antimycobacterial activity of five efflux pump inhibitors against Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *The Journal of Antibiotics*, 69(3), 173–175. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.101>. ISSN 0021-8820, 1881-1469.
125. Li, P., Li, J., Wu, C., Wu, Q., Li, J. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2005, 16(9), 1912–1917. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/9/082> ISSN 0957-4484, 1361-6528.
126. LI, X.-Z., PLÉSIAT, P., NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>. ISSN 1098-6618.
127. LI, Y.-Q., SUN, X.-X., FENG, J.-L., MO, H.-Z. Antibacterial activities and membrane permeability actions of glycinin basic peptide against Escherichia coli. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 2015, 31, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.009>. ISSN 1466-8564.
128. LINO, C. I., GONÇALVES DE SOUZA, I., BORELLI, B. M., SILVÉRIO MATOS, T. T., SANTOS TEIXEIRA, I. N., RAMOS, J. P., MARIA DE SOUZA FAGUNDES, E., DE OLIVEIRA FERNANDES, P., MALTAROLLO, V. G., JOHANN, S., DE OLIVEIRA, R. B. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 151, 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.083>. ISSN 1768-3254.
129. LIU, Y., LI, R., XIAO, X., WANG, Z. Antibiotic adjuvants: An alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2019, 45(3), 301–314. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1599813>. ISSN 1040-841X, 1549-7828.

130. LIU, Y.-Y., WANG, Y., WALSH, T. R., YI, L.-X., ZHANG, R., SPENCER, J., DOI, Y., TIAN, G., DONG, B., HUANG, X., YU, L.-F., GU, D., REN, H., CHEN, X., LV, L., HE, D., ZHOU, H., LIANG, Z., LIU, J.-H., SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7). ISSN 1473-3099.
131. LOCHER, H. H., SEILER, P., CHEN, X., SCHROEDER, S., PFAFF, P., ENDERLIN, M., KLENK, A., FOURNIER, E., HUBSCHWERLEN, C., RITZ, D., KELLY, C. P., KECK, W. In vitro and in vivo antibacterial evaluation of cadazolid, a new antibiotic for treatment of *Clostridium difficile* infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(2), 892–900. <https://doi.org/10.1128/AAC.01830-13> ISSN 1098-6596.
132. LOZAN-TIRSU C., **ZARICIUC E.** Antimicrobial activity against *Bacillus cereus* of the coordinative compound [(2-carbamatoilhidrazon)propionate(2-)]-(4-aminobenzenesulfamide) copper. In: Moldovan Journal of Health Sciences. 2016, Vol.9(3), p.45-50. ISSN 2537-6381
133. LOZAN-TÎRȘU, Carolina; **ZARICIUC, Elena.** Biochemical composition changes of gram-negative microorganisms under the action of new chemical compounds. In: *One Health and Risk Management*. 2021, nr. 2(3), pp. 55-60. ISSN 2587-3458. DOI: 10/38045/ohrm.2021.3.09 ISSN: 2587-3458, 2587-3466
134. LOZAN-TÎRȘU, Carolina; **ZARICIUC, Elena.** Modification of oxidative stress indices in cultures of pathogenic microorganisms under the influence of novel chemical compounds. In: *One Health and Risk Management*. 2022, nr. 3(2), pp. 24-31. ISSN 2587-3458. DOI: 10.38045/ohrm.2022.2.04 ISSN: 2587-3458, 2587-3466
135. LUYT, C.-E., BRECHOT, N., TROUILLET, J.-L., CHASTRE, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Critical Care (London, England)*, 2014, 18(5), 480. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0480-6>. ISSN 1364-8535.
136. LV, X., CHENG, J.-H. Evaluation of the Effects of Cold Plasma on Cell Membrane Lipids and Oxidative Injury of *Salmonella typhimurium*. *Molecules*, 2022, 27(3), 640. <https://doi.org/10.3390/molecules27030640>. ISSN 1420-3049.
137. LYU, Y., YANG, X., GOSWAMI, S., GORITYALA, B. K., IDOWU, T., DOMALAON, R., ZHANEL, G. G., SHAN, A., SCHWEIZER, F. Amphiphilic Tobramycin–Lysine Conjugates Sensitize Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria to Rifampicin and Minocycline. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(9), 3684–3702. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01742>. ISSN 0022-2623, 1520-4804

138. MARTELLI, F., CIRLINI, M., LAZZI, C., NEVIANI, E., BERNINI, V. Edible Seaweeds and Spirulina Extracts for Food Application: In Vitro and In Situ Evaluation of Antimicrobial Activity towards Foodborne Pathogenic Bacteria. *Foods*, 2020, 9(10), 1442. <https://doi.org/10.3390/foods9101442>. ISSN 2304-8158.
139. MARTENS, E., DEMAÏN, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics*, 2017, 70(5), 520–526. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.30>. ISSN 1881-1469
140. MATESANZ, A. I., HERRERO, J. M., QUIROGA, A. G. Chemical and Biological Evaluation of Thiosemicarbazone-Bearing Heterocyclic Metal Complexes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2021, 21(1), 59–72. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201022144004>. ISSN 1568-0266.
141. MEMAR, M. Y., GHOTASLOU, R., SAMIEI, M., ADIBKIA, K. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: Current insights. *Infection and Drug Resistance*, 2018, 11, 567–576. <https://doi.org/10.2147/IDR.S142397>. ISSN 1178-6973.
142. MEOLA, G., BRABAND, H., SCHMUTZ, P., BENZ, M., SPINGLER, B., ALBERTO, R. Bis-Arene Complexes $[\text{Re}(\eta^6\text{-arene})_2]^+$ as Highly Stable Bioorganometallic Scaffolds. *Inorganic Chemistry*, 2016, 55(21), 11131–11139. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01748>. ISSN 0020-1669, 1520-510X.
143. MJOS, K. D., ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chemical Reviews*, 114(8), 4540–4563. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>. ISSN 0009-2665, 1520-6890.
144. MOIR, D. T., OPPERMAN, T. J., BUTLER, M. M., BOWLIN, T. L. (2012). New classes of antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, 12(5), 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.004>. ISSN 1471-4892.
145. MORA-OCHOMOGO, M., LOHANS, C. T. β -Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: From covalent inhibitors to substrates. *RSC Medicinal Chemistry*, 2021, 12(10), 1623–1639. <https://doi.org/10.1039/D1MD00200G>. ISSN 2632-8682.
146. MORA-RILLO, M., FERNÁNDEZ-ROMERO, N., NAVARRO-SAN FRANCISCO, C., DÍEZ-SEBASTIÁN, J., ROMERO-GÓMEZ, M. P., FERNÁNDEZ, F. A., LÓPEZ, J. R. A., MINGORANCE, J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence*, 2015, 6(1), 93–100. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.991234>. ISSN 2150-5608.
147. MORRISON, C. N., PROSSER, K. E., STOKES, R. W., CORDES, A., METZLER-NOLTE, N., COHEN, S. M. Expanding medicinal chemistry into 3D space: Metallofragments as 3D scaffolds for fragment-based drug discovery. *Chemical Science*, 2015, 11(5), 1216–1225. <https://doi.org/10.1039/C9SC05586J>. ISSN 2041-6520, 2041-6539.

148. MOYNIÉ, L., LUSCHER, A., ROLO, D., PLETZER, D., TORTAJADA, A., WEINGART, H., BRAUN, Y., PAGE, M. G. P., NAISMITH, J. H., KÖHLER, T. Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(4), e02531-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02531-16>. ISSN 0066-4804, 1098-6596.
149. MU, S., ZHU, Y., WANG, Y., QU, S., HUANG, Y., ZHENG, L., DUAN, S., YU, B., QIN, M., XU, F. Cationic Polysaccharide Conjugates as Antibiotic Adjuvants Resensitize Multidrug Resistant Bacteria and Prevent Resistance. *Advanced Materials*, 2022, 34(41), 2204065. <https://doi.org/10.1002/adma.202204065>. ISSN 0935-9648, 1521-4095.
150. MUN, S.-H., JOUNG, D.-K., KIM, Y.-S., KANG, O.-H., KIM, S.-B., SEO, Y.-S., KIM, Y.-C., LEE, D.-S., SHIN, D.-W., KWEON, K.-T., KWON, D.-Y. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2013, 20(8–9), 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.006>. ISSN 1618-095X.
151. MUNITA, J. M., ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>. ISSN 2165-0497.
152. NAKATSUJI, T., CHEN, T. H., TWO, A. M., CHUN, K. A., NARALA, S., GEHA, R. S., HATA, T. R., GALLO, R. L. *Staphylococcus aureus* Exploits Epidermal Barrier Defects in Atopic Dermatitis to Trigger Cytokine Expression. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(11), 2192–2200. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.05.127>. ISSN 1523-1747.
153. NAMIECIŃSKA, E., SOBIESIAK, M., MAŁECKA, M., GUGA, P., ROZALSKA, B., BUDZISZ, E. Antimicrobial and Structural Properties of Metal Ions Complexes with Thiosemicarbazide Motif and Related Heterocyclic Compounds. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(4), 664–693. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180228164656>. ISSN 0929-8673.
154. NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>. ISSN 0163-3864, 1520-6025.
155. NGO, S. C., ZIMHONY, O., CHUNG, W. J., SAYAHI, H., JACOBS, W. R., WELCH, J. T. Inhibition of Isolated *Mycobacterium tuberculosis* Fatty Acid Synthase I by Pyrazinamide Analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(7), 2430–2435. <https://doi.org/10.1128/AAC.01458-06>. ISSN 0066-4804, 1098-6596.
156. NGUYEN, M.-T., LUQMAN, A., BITSCHAR, K., HERTLEIN, T., DICK, J., OHLSEN, K., BRÖKER, B., SCHITTEK, B., GÖTZ, F. Staphylococcal (phospho)lipases promote biofilm

- formation and host cell invasion. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 2018, 308(6), 653–663. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.013>. ISSN 1618-0607.
157. NGUYEN, R., KHANNA, N. R., SAFADI, A. O., SUN, Y. Bacitracin Topical. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. 2018, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536993/>
 158. NIEDERMEYER, T. Anti-infective Natural Products from Cyanobacteria. *Planta Medica*, 2015, 81(15), 1309–1325. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546055>
 159. NÚÑEZ-NÚÑEZ, M., CASAS-HIDALGO, I., GARCÍA-FUMERO, R., VALLEJO-RODRÍGUEZ, I., ANGUITA-SANTOS, F., HERNÁNDEZ-QUERO, J., CABEZA-BARRERA, J., RUIZ-SANCHO, A. Dalbavancin is a novel antimicrobial against Gram-positive pathogens: Clinical experience beyond labelled indications. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 2020, 27(5), 310–312. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2018-001711>. ISSN 2047-9956, 2047-9964.
 160. NUTTING, C. M., VAN HERPEN, C. M. L., MIAH, A. B., BHIDE, S. A., MACHIELS, J.-P., BUTER, J., KELLY, C., DE RAUCOURT, D., HARRINGTON, K. J. Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 2009, 20(7), 1275–1279. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn775>. ISSN 1569-8041.
 161. OGAWA, S., YAZAKI, Y. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin Determination and Biological Activities. *Molecules*, 2018, 23(4), 837. <https://doi.org/10.3390/molecules23040837>. ISSN 1420-3049.
 162. OOGAI, Y., MATSUO, M., HASHIMOTO, M., KATO, F., SUGAI, M., KOMATSUZAWA, H. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22), 8097–8105. <https://doi.org/10.1128/AEM.05316-11>. ISSN 1098-5336.
 163. PAHONTU, E., FALA, V., GULEA, A., POIRIER, D., TAPCOV, V., ROSU, T. Synthesis and Characterization of Some New Cu(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes with Salicylidene Thiosemicarbazones: Antibacterial, Antifungal and in Vitro Antileukemia Activity. *Molecules*, 2013, 18(8), 8812–8836. <https://doi.org/10.3390/molecules18088812>. ISSN 1420-3049.
 164. PAHONTU, E., USATAIA, I., GRAUR, V., CHUMAKOV, Y., PETRENKO, P., GUDUMAC, V., GULEA, A. Synthesis, characterization, crystal structure of novel Cu (II), Co (III), Fe (III) and Cr (III) complexes with 2-hydroxybenzaldehyde-4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone: Antimicrobial, antioxidant and in vitro antiproliferative activity: metal complexes, X-ray crystal structure, biological activity. *Applied Organometallic Chemistry*, 2018, 32(12), e4544. <https://doi.org/10.1002/aoc.4544>. ISSN 0268-2605.

165. PANDIAN, C. J., PALANIVEL, R., DHANASEKARAN, S. Screening Antimicrobial Activity of Nickel Nanoparticles Synthesized Using Ocimum sanctum Leaf Extract. *Journal of Nanoparticles*, 2016, 4694367. <https://doi.org/10.1155/2016/4694367>. ISSN 1753-2515, 1753-2507
166. PAVITHRRA, G., RAJASEKARAN, R. Gramicidin Peptide to Combat Antibiotic Resistance: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(1), 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09828-0>. ISSN 1573-3149, 1573-3904.
167. PEREZ, M., FALQUE, E., DOMINGUEZ, H. Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs*, 2016, 14(3), 52. <https://doi.org/10.3390/md14030052>. ISSN 1660-3397.
168. PETERSON, E., KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928> ISSN 1664-302X.
169. PETRENKO, Peter A.; GRAUR, Vasili O.; CHUMAKOV, Yurii; TRUHINA, Irina; TSAPKOV, Victor I.; PRISAKARI, Viorel I.; **ZARICIUC, Elena**; RUDIC, Valeriu; GULEA, Aurelian. The crystal structure and antimicrobial activity of bis[methyln’-(2-hydroxybenzylidene)-n-prop-2-en-1-yl]-carbamo-hydrazono thioate]chromium(III) nitrate. In: *Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry*. XVIII, 8-9 octombrie 2015, Chişinău. Chisinau, Republic of Moldova: 2015, p. 121.
170. PFALLER, M. A., MENDES, R. E., DUNCAN, L. R., FLAMM, R. K., SADER, H. S. Activity of dalbavancin and comparator agents against Gram-positive cocci from clinical infections in the USA and Europe 2015–16. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(10), 2748–2756. <https://doi.org/10.1093/jac/dky235>. ISSN 0305-7453, 1460-2091.
171. PIERONI, M., MACHADO, D., AZZALI, E., SANTOS COSTA, S., COUTO, I., COSTANTINO, G., VIVEIROS, M. Rational Design and Synthesis of Thioridazine Analogues as Enhancers of the Antituberculosis Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58(15), 5842–5853. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00428>. ISSN 0022-2623, 1520-4804.
172. PITUCHA, M., KARCZMARZYK, Z., SWATKO-OSSOR, M., WYSOCKI, W., WOS, M., CHUDZIK, K., GINALSKA, G., FRUZINSKI, A. Synthesis, In Vitro Screening and Docking Studies of New Thiosemicarbazide Derivatives as Antitubercular Agents. *Molecules*, 2019, 24(2), 251. <https://doi.org/10.3390/molecules24020251>. ISSN 1420-3049.

173. POKROVSKAYA, V., BAASOV, T. Dual-acting hybrid antibiotics: A promising strategy to combat bacterial resistance. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2010, 5(9), 883–902. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.508069>. ISSN 1746-045X.
174. POKROVSKAYA, V., BELAKHOV, V., HAINRICHSON, M., YARON, S., BAASOV, T. Design, synthesis, and evaluation of novel fluoroquinolone-aminoglycoside hybrid antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52(8), 2243–2254. <https://doi.org/10.1021/jm900028n>. ISSN 1520-4804.
175. POLO-CERÓN, D. Cu(II) and Ni(II) Complexes with New Tridentate NNS Thiosemicarbazones: Synthesis, Characterisation, DNA Interaction, and Antibacterial Activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/3520837>. ISSN 1565-3633, 1687-479X.
176. PRADEL, E., PAGÈS, J.-M. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(8), 2640–2643. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2640-2643.2002>. ISSN 0066-4804.
177. PRADHAN, B., NAYAK, R., BHUYAN, P. P., PATRA, S., BEHERA, C., SAHOO, S., KI, J.-S., QUARTA, A., RAGUSA, A., JENA, M. Algal Phlorotannins as Novel Antibacterial Agents with Reference to the Antioxidant Modulation: Current Advances and Future Directions. *Marine Drugs*, 2022, 20(6), 403. <https://doi.org/10.3390/md20060403>. ISSN 1660-3397.
178. PRAJAPATI, N. P., PATEL, H. D. Novel thiosemicarbazone derivatives and their metal complexes: Recent development. *Synthetic Communications*, 2019, 1–38. <https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1649432>. ISSN 0039-7911, 1532-2432.
179. PRATITA, A., FATHUROHMAN, M., RUSWANTO, R., KHUSNUL, SUHARTATI, R. Potential of Autotroph Microalgae (*Spirulina plantensis*) as Antimicrobial agent. *Journal of Physics: Conference Series*, 2019, 1179(1), 012173. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1179/1/012173>. ISSN: 1742-6596, 1742-6588.
180. PREISITSCH, M., HEIDEN, S., BEERBAUM, M., NIEDERMEYER, T., SCHNEEFELD, M., HERRMANN, J., KUMPFMÜLLER, J., THÜRMER, A., NEIDHARDT, I., WIESNER, C., DANIEL, R., MÜLLER, R., BANGE, F.-C., SCHMIEDER, P., SCHWEDER, T., MUNDT, S. Effects of Halide Ions on the Carbamidocyclophane Biosynthesis in *Nostoc* sp. CAVN2. *Marine Drugs*, 2016, 14(1), 21. <https://doi.org/10.3390/md14010021>. ISSN 1660-3397

181. PUSHPANATHAN, M., GUNASEKARAN, P., RAJENDHRAN, J. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, 2013, 675391. <https://doi.org/10.1155/2013/675391> ISSN 1687-9767
182. RAHMAN, MD. M., RAHAMAN, MD. S., ISLAM, MD. R., HOSSAIN, MD. E., MANNAN MITHI, F., AHMED, M., SALDÍAS, M., AKKOL, E. K., SOBARZO-SÁNCHEZ, E. Multifunctional Therapeutic Potential of Phytocomplexes and Natural Extracts for Antimicrobial Properties. *Antibiotics*, 2021, 10(9), 1076. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091076> ISSN 2079-6382
183. REDDY, G. M., GARCIA, J. R., REDDY, V. H., DE ANDRADE, A. M., CAMILO, A., PONTES RIBEIRO, R. A., DE LAZARO, S. R. Synthesis, antimicrobial activity and advances in structure-activity relationships (SARs) of novel tri-substituted thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 123, 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.062> ISSN 1768-3254
184. REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 2018, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>. ISSN 2471-1888
185. ROKICKA-KONIECZNA, P., WANAG, A., SIENKIEWICZ, A., KUSIAK-NEJMAN, E., MORAWSKI, A. W. Effect of APTES modified TiO₂ on antioxidant enzymes activity secreted by Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 534, 1064–1068. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.034> ISSN 0006-291X
186. ROSSOLINI, G. M., ARENA, F., PECILE, P., POLLINI, S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, 18, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006> ISSN 14714892
187. RUDIC, V.; BALAN, G. COJOCARI, D.; LOZAN-TÎRȘU, C.; **ZARICIUC, E.** Antibacterian and antifungal properties of algae product BioR. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 3, 12-13 octombrie 2016, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2016, p. 81.
188. RUDIC, V.; GULEA, A.; LOZAN-TÎRȘU, C.; **ZARICIUC, E.**; TSAPKOV, V. Use DI(μ-S)-bis{chloro-[1-pyridine-2-ylethanone-4-methylthiosemicarbazonato(1-)]copper}, as substance with antimicrobial activity against staphylococcus aureus. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 2, 9-10 octombrie 2014, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2014, p. 165. ISSN 978-9975-4432-8-9
189. SAAD, M. H., EL-FAKHARANY, E. M., SALEM, M. S., SIDKEY, N. M. The use of cyanobacterial metabolites as natural medical and biotechnological tools: Review article.

- Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2022, 40(6), 2828–2850.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1838948>. ISSN 0739-1102, 1538-0254
190. SALMI, C., LONCLE, C., VIDAL, N., LETOURNEUX, Y., FANTINI, J., MARESCA, M., TAÏEB, N., PAGÈS, J.-M., BRUNEL, J. M. Squalamine: An appropriate strategy against the emergence of multidrug resistant gram-negative bacteria? *PloS One*, 2008, 3(7), e2765.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002765> ISSN 1932-6203
 191. SAXENA, S., GOMBER, CH. Superoxide dismutase, protease and lipase expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a tool for antimicrobial drug discovery. *Mol Cell Biochem.* 2010. v. 341, p.217–223 ISSN 0300-8177
 192. SHIN, J., PRABHAKARAN, V.-S., KIM, K. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.043>. ISSN 0882-4010
 193. SHIRIAEV, D. I., SOFRONOVA, A. A., BERDNIKOVICH, E. A., LUKIANOV, D. A., KOMAROVA, E. S., MARINA, V. I., ZAKALYUKINA, Y. V., BIRYUKOV, M. V., MAVIZA, T. P., IVANENKOV, Y. A., SERGIEV, P. V., OSTERMAN, I. A., DONTSOVA, O. A. Nybomycin Inhibits both Fluoroquinolone-Sensitive and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(5), e00777-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00777-20> ISSN 0066-4804, 1098-6596
 194. SINGH, R., PARIHAR, P., SINGH, M., BAJGUZ, A., KUMAR, J., SINGH, S., SINGH, V. P., PRASAD, S. M. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 515. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00515>. ISSN 1664-302X
 195. SIRIYONG, T., SRIMANOTE, P., CHUSRI, S., YINGYONGNARONGKUL, B., SUAISOM, C., TIPMANEE, V., VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1), 405. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1913-y>. ISSN 1472-6882
 196. SPENGLER, G., KINCSES, A., GAJDÁCS, M., AMARAL, L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22(3), E468.
<https://doi.org/10.3390/molecules22030468>. ISSN 1420-3049

197. STACH, N., KASZYCKI, P., WŁADYKA, B., DUBIN, G. Extracellular Proteases of *Staphylococcus* spp. In *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* 2018, (pp. 135–145). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00011-X>. ISBN: 9780128135488
198. STOGIOS, P. J., SAVCHENKO, A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*, 2020, 29(3), 654–669. <https://doi.org/10.1002/pro.3819> ISSN:1469-896X
199. TERRENI, M., TACCANI, M., PREGNOLATO, M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules*, 2020, 26(9), 2671. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>. ISSN 1420-3049
200. THIBAUT, C., LAVIGNE, J., LITALIEN, C., KASSIR, N., THEORET, Y., AUTMIZGUINE, J. Population Pharmacokinetics and Safety of Piperacillin-Tazobactam Extended Infusions in Infants and Children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(11), e01260-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01260-19>. ISSN 1098-6596
201. MARENCHINO, L., MELE, M. Efficacy Test of a Hydrolysable Tannin Extract Against Necrotic Enteritis in Challenged Broiler Chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 2013, 12(3), e62. <https://doi.org/10.4081/ijas.2013.e62>. ISSN 1828-051X
202. USATAIA, I., GRAUR, V., ZARICIUC, E., GARBUZ, O., GULEA, A. Synthesis and biological activity of copper(II), nickel(II) and cobalt(III) coordination compounds with 2-benzoylpyridine N(4)-allyl-S-methylisothiosemicarbazone. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2018, nr. 2(335), p. 103-112. ISSN 1857-064X
203. VAISHAMPAYAN, A., GROHMANN, E. Antimicrobials Functioning through ROS-Mediated Mechanisms: Current Insights. *Microorganisms*, 2021, 10(1), 61. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010061>. ISSN 2076-2607
204. VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *P T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* (2015), 40(4), 277–283. <https://doi.org/Article>. ISSN 1052-1372
205. VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: Part 2: Management strategies and new agents. *P T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 2015, 40(5), 344–352. ISSN 1052-1372
206. VILA, J., MORENO-MORALES, J., BALLESTÉ-DELPierre, C. Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, 26(5), 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.015>. ISSN 1198-743X.
207. VIMBERG, V. Teicoplanin-A New Use for an Old Drug in the COVID-19 Era? *Pharmaceuticals*, 2021, 14(12), 1227. <https://doi.org/10.3390/ph14121227>. ISSN 1424-8247.
208. VIÑUELAS-ZAHÍÑOS, E., LUNA-GILES, F., TORRES-GARCÍA, P., FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C. Co(III), Ni(II), Zn(II) and Cd(II) complexes with 2-acetyl-2-thiazoline

- thiosemicarbazone: Synthesis, characterization, X-ray structures and antibacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46(1), 150–159. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.10.030. ISSN 1768-3254
209. VOOTURI, S. K., FIRESTINE, S. M. Synthetic membrane-targeted antibiotics. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(21), 2292–2300. <https://doi.org/10.2174/092986710791331059>. ISSN 1875-533X.
 210. WADITZER, M., BUCAR, F. Flavonoids as Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(22), 6904. <https://doi.org/10.3390/molecules26226904>. ISSN 1420-3049
 211. WALLENBURG, E., TER HEINE, R., SCHOUTEN, J. A., RAAIJMAKERS, J., TEN OEVER, J., KOLWIJCK, E., BURGER, D. M., PICKKERS, P., FRENZEL, T., BRÜGGEMANN, R. J. M. An Integral Pharmacokinetic Analysis of Piperacillin and Tazobactam in Plasma and Urine in Critically Ill Patients. *Clinical Pharmacokinetics*, 2022, 61(6), 907–918. <https://doi.org/10.1007/s40262-022-01113-6>. ISSN 1179-1926.
 212. WAN, B., ZHANG, Q., NI, J., LI, S., WEN, D., LI, J., XIAO, H., HE, P., OU, H.-Y., TAO, J., TENG, Q., LU, J., WU, W., YAO, Y.-F. Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic Escherichia coli virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathogens*, 2017, 13(3), e1006246. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006246>. ISSN 1553-7374
 213. WANI, A. K., AKHTAR, N., DATTA, B., PANDEY, J., AMIN-UL MANNAN, M. Cyanobacteria-derived small molecules: A new class of drugs. In *Volatiles and Metabolites of Microbes*, 2021, (pp. 283–303). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824523-1.00003-1>. ISBN 978-0-12-824523-1
 214. WATT, K. M., HORNIK, C. P., BALEVIC, S. J., MUNDAKEL, G., COTTEN, C. M., HARPER, B., BENJAMIN, D. K., ANAND, R., LAUGHON, M., SMITH, P. B., COHEN-WOLKOWIEZ, M., Best Pharmaceuticals for Children Act - Pediatric Trials Network Steering Committee. Pharmacokinetics of ticarcillin-clavulanate in premature infants. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2019, 85(5), 1021–1027. <https://doi.org/10.1111/bcp.13882>. ISSN 1365-2125
 215. WENCEWICZ, T. A. Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(18), 3370–3399. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.033>. ISSN: 0022-2836; 1089-8638
 216. WHO. (2014). Antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, 2019, 61(3), 383–394. <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>

217. WINDELS, E. M., MICHIELS, J. E., VAN DEN BERGH, B., FAUVART, M., MICHIELS, J. Antibiotics: Combatting Tolerance To Stop Resistance. *MBio*, 2019, 10(5), e02095-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02095-19>. ISSN 2150-7511.
218. WOS, M., MIAZGA-KARSKA, M., KACZOR, A. A., KLIMEK, K., KARZMARZYK, Z., KOWALCZUK, D., WYSOCKI, W., GINALSKA, G., URBANCZYK-LIPKOWSKA, Z., MORAWIAK, M., PITUCHA, M. Novel thiosemicarbazide derivatives with 4-nitrophenyl group as multi-target drugs: α -glucosidase inhibitors with antibacterial and antiproliferative activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 93, 1269–1276. doi: 10.3390/biom12020151. ISSN 0753-3322.
219. WRIGHT, G. D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(11), 928. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.009. ISSN 1878-4380.
220. YILMAZ, M., ELALDI, N., BALKAN, İ. İ., ARSLAN, F., BATIREL, A. A., BAKICI, M. Z., GOZEL, M. G., ALKAN, S., ÇELİK, A. D., YETKIN, M. A., BODUR, H., SINIRTAŞ, M., AKALIN, H., ALTAY, F. A., ŞENCAN, İ., AZAK, E., GÜNDEŞ, S., CEYLAN, B., ÖZTÜRK, R., ... MERT, A. Mortality predictors of Staphylococcus aureus bacteremia: A prospective multicenter study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2016, 15, 7. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0122-8>. ISSN 1476-0711
221. ZAHN, M., BHAMIDIMARRI, S. P., BASLÉ, A., WINTERHALTER, M., VAN DEN BERG, B. (2016). Structural Insights into Outer Membrane Permeability of *Acinetobacter baumannii*. *Structure (London, England: 1993)*, 24(2), 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.009>. ISSN 1878-4186
222. ZECHINI, B., VERSACE, I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2009, 4(1), 37–50. <https://doi.org/10.2174/157489109787236256>. ISSN 1574-891X
223. ZHANG, F. Y., DU, G. J., ZHANG, L., ZHANG, C. L., LU, W. L., LIANG, W. Naringenin Enhances the Anti-Tumor Effect of Doxorubicin Through Selectively Inhibiting the Activity of Multidrug Resistance-Associated Proteins but not P-glycoprotein. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26(4), 914–925. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9793-y>.
224. ZHAO, M., ZHU, X.-Y., LI, Y.-Z., CHANG, J.-N., LI, M.-X., MA, L.-H., GUO, X.-Y. A Lindqvist-type [W6O19]²⁻ organic–inorganic compound: Synthesis, characterization, antibacterial activity and preliminary studies on the mechanism of action. *Tungsten*, 2022, 4(2), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s42864-021-00073-x>. ISSN 2661-8028, 2661-8036

Web:

225. <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development>, accessed 10.02.2022.

ANEXE

Anexa 1. Brevete de invenție



MD 3228 F1 2007.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3228** (13) **F1**
(51) Int. Cl.: *A61K 36/87* (2006.01)
A61K 131/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C08H 5/00 (2006.01)
C08F 8/06 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2006 0081 (22) Data depozit: 2006.03.07	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.01.31, BOPI nr. 1/2007
(71) Solicitanți: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: GONCIAR Veaceslav, MD; ZARICIUC Elena, MD; BACINSCHI Nicolae, MD; LUPAȘCU Tudor, MD; RUDIC Valeriu, MD; PLUGARU Ștefan, MD; CERLAT Sergiu, MD (73) Titulari: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (74) Reprezentant: VOZIANU Maria, MD	

(54) Remediu antibacterian

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină și medicina
veterinară, în particular la un remediu antibac-
terian.

2
În calitate de remediu antibacterian se propune
utilizarea enotaninului hidrosolubil, obținut la
oxidarea enotaninului cu peroxid de hidrogen.
Revendicări: 1

10

MD 3228 F1 2007.01.31



MD 4174 B1 2012.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4174** ⁽¹³⁾ **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/08* (2006.01)
C07C 65/11 (2006.01)
C07C 65/30 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

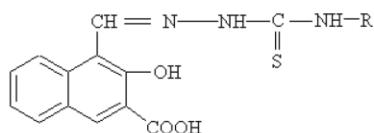
Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2011 0096 (22) Data depozit: 2011.10.25	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2012.06.30, BOPI nr. 6/2012
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: LAZARESCU Ana, MD; ZARICIUC Elena, MD; COJOCARI Daniela, MD; GONCIAR Veaceslav, MD; BOUROȘ Polina, MD; TURTĂ Constantin, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Derivați tiosemicarbazonici ai acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu
proprietăți antibacteriene**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la compuși organici din clasa tiosemicarbazonelor care posedă activitate antibacteriană. Compușii pot fi utilizați în medicină, medicina veterinară și agricultură.

Esența invenției constă în sinteza derivaților noi ai acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu formula:



unde R = H (1) și C₆H₅ (2). Compușii manifestă proprietăți bacteriostatice și bactericide față de microorganismele patogene *S. aureus* și *E. coli*.

Revendicări: 1

Figuri: 1

MD 4174 B1 2012.06.30



MD 4402 B1 2016.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4402** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/08* (2006.01)
C07C 39/38 (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2015 0084 (22) Data depozit: 2015.09.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.02.29, BOPI nr. 2/2016
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GRAUR Vasilii, MD; ZARICIUC Elena, MD; USATAIA Irina, MD; ȚAPCOV Victor, MD; RUDIC Valeriu, MD; GULEA Aurelian, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

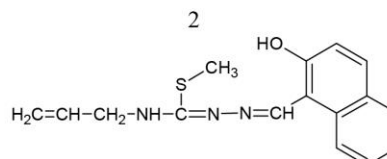
MD 4402 B1 2016.02.29

(54) Metil-N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioat, care manifestă activitate antimicotică față de *Candida albicans*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazonelor.

Esența invenției constă în sinteza compusului metil-N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-N-prop-2-en-1-ilhidrazonotioat cu formula:



Compusul manifestă activitate antimicotică față de *Candida albicans* și poate găsi aplicare în medicină și medicina veterinară la profilaxia și tratamentul micozelor.

Revendicări: 2

Figuri: 1



MD 4462 B1 2017.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4462** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07F 15/04* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

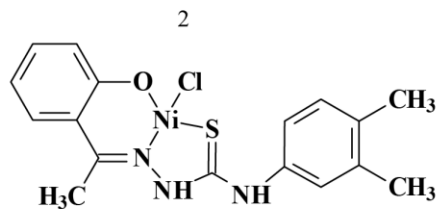
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2016 0021 (22) Data depozit: 2016.02.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.01.31, BOPI nr. 1/2017
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ISTRATI Dorin, MD; GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; ZARICIUC Elena, MD; COTOVAIA Aliona, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotoamido(1-)}nichel, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ nou de nichel, biologic activ, din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în medicină și medicina veterinară în calitate de preparat cu acțiune antimicrobiană sau în calitate de ingredient la crearea mediilor nutritive selective de cultivare a microorganismelor.

Esența invenției constă în obținerea unui compus coordinativ cu activitate antibacteriană înaltă cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotoamido(1-)}nichel cu formula:



Acest compus manifestă o activitate bacteriostatică și bactericidă față de bacteriile gram-negative din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* în limitele concentrațiilor de 0,7...3,0 μg/mL.

Revendicări: 2

MD 4462 B1 2017.01.31



MD 4600 B1 2018.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4600** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/04* (2006.01)
C07C 65/11 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

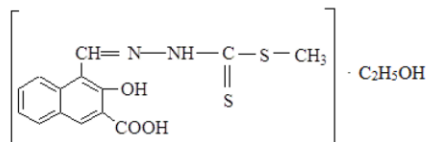
(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2017 0061 (22) Data depozit: 2017.06.06	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.11.30, BOPI nr. 11/2018
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: LAZARESCU Ana, MD; MELNIC Elena, MD; BOUROȘ Pavlina, MD; ZARICIUC Elena, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Compus hidrazonic al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic care manifestă activitate antimicrobiană

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimia organică și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa ditiohidrazonelor, derivat al acidului 4-formil-3-hidroxi-2-naftoic cu formula:



care posedă activitate antimicrobiană față de microorganismele grampozitive și gramnegative.

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4600 B1 2018.11.30



MD 4611 B1 2018.12.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4611** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/04* (2006.01)
C07C 65/01 (2006.01)
C07C 65/11 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

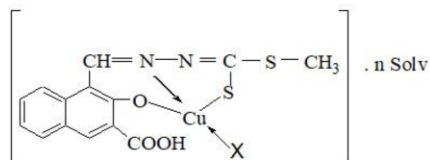
(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2017 0062 (22) Data depozit: 2017.06.06	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.12.31, BOPI nr. 12/2018
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: LAZARESCU Ana, MD; MELNIC Elena, MD; BOUROȘ Pavlina, MD; ZARICIUC Elena, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE FIZICĂ APLICATĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Compuși coordinativi ai cuprului(II) cu S-metil-β-N-(2-hidroxi-3-carboxinaftilmetilen)ditiocarbazonat care manifestă activitate antimicrobiană

(57) Rezumat:

Invenția se referă la compuși hidrazonici cu formula generală:



(1-7),

unde: X = Cl, n Solv = 2H₂O (1); X = Br, n Solv = 0,5C₂H₅OH (2); X = H₂O, n Solv lipsește (3); X = Cl, n Solv = DMSO (4); X = Br, n Solv = DMSO (5); X = DMSO, n Solv lipsește (6); X = DMF, n Solv lipsește (7).

Compușii manifestă activitate antimicrobiană față de microorganismele grampozitive și gramnegative.

Revendicări: 2

Figuri: 4

MD 4611 B1 2018.12.31



ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
PATENT OFFICE
OF THE REPUBLIC OF POLAND



INTERNATIONAL WARSAW
INVENTION SHOW
IWIS 2016



SILVER
MEDAL

FOR
A. GULEA, IU, OLTU, V. GRAUR, E. ZARICIUC, V. TAPCOV, V. GUDUMAC

FROM
ACADEMY OF SCIENCES OF R. MOLDOVA
MOLDOVA

FOR THE INVENTION
NEW ANTIFUNGAL INHIBITOR



THE PRESIDENT OF JURY

PROF. MICHAŁ SZOTA

WARSAW, 10-12TH OF OCTOBER 2016



40TH INTERNATIONAL INVENTION SHOW
11TH INVENTION AND PROTOTYPE SHOW AND STUDENT
BUSINESS PLAN COMPETITION

Silver

GULEA AURELIAN, LOZAN-TIRSHU
C., OLTU IU., ZARICIUC E., TAPCOV
VICTOR, GUDUMAC VALENTIN
REPUBLIC OF MOLDOVA

NEW ANTIFUNGAL INHIBITORS

KARLOVAC, CROATIA, 05.-07. November 2015.



Međunarodni ocjenjivački sud
International Jury
Predsjednik/President
MScBA Andrej Škrinjar, univ.dipl.ing.stroj.

Andrej Škrinjar

Hrvatski savez inovatora
Croatian Inventors Association
Predsjednica/President
Ljiljana Pedišić, mag.ing.cheming.

Ljiljana Pedišić

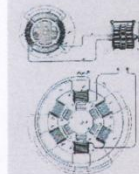
F. VRANCIC



E.S. PENKALA



I. VUCETIC



N. TESLA



MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION AND SCIENTIFIC RESEARCH
NATIONAL AUTHORITY FOR SCIENTIFIC RESEARCH AND INNOVATION

DIPLOMA

On behalf of the **Scientific Community of ROMANIA**
this diploma is awarded to
Inventor ZARICIUC Elena

for the high scientific and technological level of the invention
Coordination compound with selectif activity against
Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa

presented at the 44th edition of the
International Exhibition of Inventions GENEVA 2016

President,
Mihai-Robert Dima



Inventions
Geneva
44th International Exhibition
of Inventions Geneva
The world's most important
13>17 April 2016

DIPLOME



SALON INTERNATIONAL DES INVENTIONS GENÈVE

Après examen, le Jury International a décidé

de remettre à:

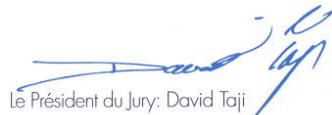
**GULEA A., ISTRATI D., USATAIA I., GRAUR V.,
TSAPKOV V., ZARICIUC E**

pour l'invention:

Nouveaux agents antimicotique contre la Candida albicans



MÉDAILLE D'OR
GOLD MEDAL
GOLDMEDAILLE



Le Président du Jury: David Tajj



Le Président du Salon: Jean-Luc Vincent

DIPLÔME

Ginventions
eneva

SALON INTERNATIONAL DES INVENTIONS GENÈVE

Après examen, le Jury International a décidé

de remettre à: Istrati Dorin., Gulea Aurelian., Tsapcov Victor,
Zariciuc Elena, Cotovaya Aliona
pour l'invention: Composé de coordination avec une activité sélective
contre Klebsiella pneumoniae et Pseudomonas



MÉDAILLE D'OR
GOLD MEDAL
GOLDMEDAILLE

Genève, le 15 avril 2016


Le Président du Jury: David Tajj


Le Président du Salon: Jean-Luc Vincent

ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PATENT OFFICE
OF THE REPUBLIC OF POLAND



INTERNATIONAL WARSAW
INVENTION SHOW
IWIS 2016



BRONZE MEDAL

FOR

DORIN ISTRATI, AURELIAN GULEA, VICTOR TSAPCOV, ELENA ZARICIUC,
ALION COTOVAYA

FROM

ACADEMY OF SCIENCES OF R. MOLDOVA
MOLDOVA

FOR THE INVENTION

COORDINATION COMPOUND WITH SELECTIF ACTIVITY AGAINST
KLEBSIELLA PNEUMONAE AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA



THE PRESIDENT OF JURY

PROF. MICHAŁ SZOTA

WARSAW, 10-12TH OF OCTOBER 2016



SALONUL INTERNAȚIONAL DE

**INVENȚII
INOVAȚII**

"TRAIAN VUIA" TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



**MEDALIA
DE ARGINT**

p e n t r u i n v e n Ț i a

COMPUS HIDRAZONIC AL ACIDULUI
4-FORMIL-3-HIDROXI-2-NAFTOIC CARE
MANIFESTĂ ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ

a u t o r i

Lazarescu Ana, Md; Melnic Elena, Md; Bouroș Pavlina, Md; Zariciuc Elena,
Md

i n s t i t u Ț i a

UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINA ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMITANU",
R.MOLDOVA

Președinte juriu
Camelia MARINESCU



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 15 octombrie 2020



SALONUL INTERNAȚIONAL DE

**INVENȚII
INOVAȚII**

"TRAIAN VUIA" TIMIȘOARA



Diplomă

SE ACORDĂ



MEDALIA
DE AUR

pentru invenția

COMPUȘI COORDINATIVI AI CUPRULUI(II) CU SMETIL-B-N-(2-HI-
DROXI-3-CARBOXINAFTILMETILEN) DITIOCARBAZAT CARE MANIFESTĂ
ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ

a u t o r i

Lazarescu Ana, Md; Melnic Elena, Md; Bouroș Pavlina, Md; Zariciuc Elena,
Md

i n s t i t u Ț i a

UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINA ȘI FARMACIE
"NICOLAE TESTEMITANU", R.MOLDOVA

Președinte juriu
Camelia MARINESCU



Președinte salon
Remi RĂDULESCU

Data 15 octombrie 2020

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.

Zariciuc Elena

Data

CURRICULUL VITAE

INFORMAȚII PERSONALE

ZARICIUC ELENA

Or. Chisinau, MD 2025 R. Moldova

+373 690 77 95 7

✉ elena.zariciuc@usmf.md



EDUCAȚIE ȘI FORMARE

2015–prezent

Competitor, Universitatea de Stat de Medicină

și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova,
Disciplina de microbiologie și imunologie specialitatea
Microbiologie

2006–2008 Studii postuniversitare

Studii postuniversitare prin rezidentiat in cadrul Universitatii de Stat
de Medicina Farmacie " Nicolae Testemițanu " din Republica
Moldova, specializarea Microbiologie

1991–1992 Studii postuniversitare

Studii postuniversitare prin internatura in cadrul Universitatii de
Stat de Medicina si Farmacie " Nicolae Testemițanu " din Republica
Moldova, specializarea pediatrie

1985–1991 Diplomă de licență

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae
Testemițanu" din Republica Moldova, FacultateaPediatrie,
specialitatea Medic pediatru.

1974 -1984 Studii generale

Școala Medie, Fetesti, r-l Edinet, Republica Moldova

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

1992 - prezent	Asistent universitar
	Disciplina microbiologie și imunologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova, Chișinău.
Domeniul de activitate	Microbiologie, Virusologie, Imunologie
Activitatea științifică:	Studiul activității antimicrobiene ale unor compuși chimici coordinați ai elementelor 3d și procedee de creare anpreparatelor polifuncționale.

Participări în proiecte științifice naționale și internaționale:

- naționale	18.51.07.01A/PS 2018 – 2019” Diminuarea contaminării materiei prime și produselor alimentare cu microorganisme patogene” 16.00353.50.02.A Materiale avansate în biofarmaceutica. Sinteza chimică, proprietăți anticancer și antibacteriene. 15.817.02.24F Strategii de elaborare a inhibitorilor moleculari antitumorali de o nouă generație. Sinteza, proprietăți și mecanisme de acțiune.
- internaționale	Programul bilateral de colaborare între Academia de Științe a Moldovei și Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică din România (ANCS). ”Obținerea și valorificarea unor noi produse de uz dermatologic pe bază de extracte naturale cu proprietăți terapeutice amplificate”.
Lucrări științifice și științifico-metodice	Monografii – 1; elaborări metodice – 3; lucrări științifice – 50; inclusiv 9 articole, dintre care 2 în monoautorat; teze - 17, brevete de invenție - 6, medalii la saloanele de invenții – 10.
Cursuri de perfecționare	1995- Stagiul la catedra microbiologie, Universitatea de Medicină și Farmacie “ I. Popa din Iași, România; 2001- Cursuri de perfecționare strategii L.S.D.G.C. oferite de către centrul educațional “PRO-DIDACTICA.

2001- Stagiu la catedra microbiologie, Universitatea de Medicina si Farmacie “ I.T Popa ” din Iasi, Romania;

2012- Stagiu la catedra microbiologie, Universitatea de Medicina si Farmacie din Craiova

2017- Stagiu de perfectionare la catedra Microbiologie, Universitatea de medicina si Farmacie „ Victor Babes”, Timisoara, Romania

2010 - Cursuri de perfecționare Microbiologia infecțiilor sexual transmisibile, Chișinău, Republica Moldova.

2014- Cursuri de perfecționare Psihopedagogia învățământului superior, Chișinău, Republica Moldova.

**Mențiuni,
distincții:**

Medalie de aur. *Salon International des inventions. Geneve le 15 avril 2016,.* Compose de cordination avec une activite selective contre klebsiella pneumoniae et Pseudomonas., Diploma Gold Medal.

Medalie de argint. *International Warsaw Invention Show Iwis, Warsaw, 10-12th October 2016,.; New antifungal inhibitor.*Diploma, Silver Medal.

Medalie de bronz. *International Warsaw Invention Show Iwis, Warsaw, 10-12th October 2016 .Cordination compounds with selectif activity against Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa.* Diploma, Bronze Medal.

Medalie de aur. *Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia” Timișoara , ediția a VI -a,perioada 13-15 octombrie 2020 în Timișoara, Din partea USMF „Nicolae Testemitanu”*

Medalie de argint. *Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia” Timișoara ,*

ediția a VI -a,perioada 13-15 octombrie 2020 în Timișoara, Din partea USMF „Nicolae Testemitanu”

Medalie de aur. *Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii PRO INVENT,*

ediția a XVII-a, 20-22 martie 2019, Sala Polivalentă, CLUJ-NAPOCA

44th International Exhibition of Inventions Geneva. Genve, 13- 17 April,, 2016: *Diploma for high scientific and technological level of the invention on behalf of the Scientific Community of Romania*

Medalie de aur. 46E Salon International des Inventions de Genève. Genève, 13 Avril, 2016: Gold Medal.

Medalie de argint for the inovation New antifungal inhibitor.
Brussels, 21th November 2015.

Afilieri:

1. Membru al Societății Microbiologilor din Republica Moldova,
2. Membru al Asociației Biosiguranța și Biosecuritate din Republica Moldova
- 3.The Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC)

Participări la foruri științifice (naționale și internaționale)

Internation Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 4th edition. – Chișinău, october, 11-12, 2018

The 6th International Conference Ecological and Envinronmental Chemistry – 2017. Chisinau, March 2-3, 2017

The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition, Chisinau, October 12-13, 2016

The XVIII-th International Conference Physical methods in coordination and supramolecular chemistry., Chisinau, 2015, October.

International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition), Chișinău, Moldova, October 9-10, 2014.

2nd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, October 03-05, 2012, Iași, Romania.

Limba maternă Română

Limbi straine Engleza, Rusa

Date de contact:

tel.: +37369077957, adresa serviciu: str. Testenitanu 26/2, Chisinau, Republica Moldova

e-mail: elena.zariciuc@usmf.md