



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00697**

(22) Data de depozit: **31/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2024 BOPI nr. **5/2024**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN
CUZA" DIN IAȘI, BD. CAROL I NR. 11, IAȘI,
IS, RO**

(72) Inventatori:
• **BÎRSĂ MIHAIL LUCIAN,
STR.CLOPOTARI, NR.45, BL.604, SC.B,
AP.15, IAȘI, IS, RO;**

• **SÂRBU LAURA GABRIELA,
STR.OANCEA, NR.18, BL.353, SC.B, AP.12,
IAȘI, IS, RO;**
• **ȘTEFAN MARIUS, BD.TUDOR
VLADIMIRESCU, NR.6, BL.P13, SC.C, IAȘI,
IS, RO;**
• **MIHĂȘAN MARIUS, STR.TABACULUI,
NR.47, BL.Y4, ET.4, AP.4, IAȘI, IS, RO;**
• **MOLDOVAN CRISTINA-VERONICA,
STR.MITOCCELULUI, NR.18, SUCEAVA, SV,
RO;**
• **SAVU MIHAELA, STR.CUJBENI, NR.60,
SAT PLUTON, COMUNA PIPIRIGA, NT, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNEI NOI FLAVONOIDE
SINTETICE CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei flavonoide sintetice triciclice cu sulf și brom ca substituent halogenat cu activitate bacteriostatică și bactericidă împotriva bacteriei *Staphylococcus aureus* rezistentă la metilicilină (MRSA). Procedeu, conform invenției, constă în etapele: reacția dintre omega, 5-dibromo-2-hidroxiacetofenonă și N,N-dietilditiocarbamat de sodiu, reacția N,N-dietilamino-carboditioatului de 1-(5-bromo-2-hidroxifenil)-1-oxaetan-2-il rezultat cu amina 4-bromobenzaldehidei în metanol la reflux, timp de 4 h, tratarea flavanonei 3-ditiocarbamice țintă cu un ames-

tec de acid metansulfonic-acid acetic în raport 1 : 1 v/v la o temperatură de 40°C timp de 30 min, adăgare de soluție aposă de NaBF₄ din care rezultă tetrafluoroborat de 2-N,N-dietilamino-8-bromo-4-(4-clorofenil)-4H-1,3-ditiol[4,5-c] cromen-2- ilium cu un randament de 88%, având valori ale concentrației minime inhibitorii (CMI) de 0,97 μg/ml și valori ale concentrației minime bactericide (CMB) de 1,95 μg/ml.

Revendicări: 4
Figuri: 6



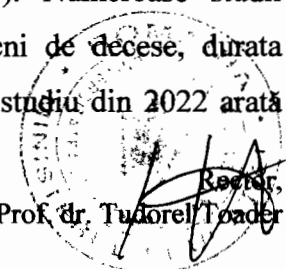
GA

Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu proprietăți antibacteriene

Invenția se încadrează în domeniul tehnic al Biochimiei și constă într-un procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu activitate bacteriostatică și bactericidă împotriva bacteriei *Staphylococcus aureus* rezistentă la meticilină (MRSA).

Rezistența la antibiotice – o problemă gravă la nivel global. Evoluția omenirii a fost marcată profund de bolile de natură infecțioasă încă de acum 100.000 – 200.000 de ani în urmă. O serie de descoperiri remarcabile din ultimele secole precum descoperirea și introducerea vaccinurilor și antibioticelor în practica medicală au avut un impact uriaș asupra speranței și calității vieții la nivel global. Astfel, descoperirea penicilinei și utilizarea ei în medicină începând cu anii 1940 a reprezentat **soluția** pentru tratarea bolilor de natură infecțioasă, fiind considerată unul din cele mai importante momente din evoluția medicinei moderne. Utilizarea antibioticelor a făcut posibilă nu doar tratarea infecțiilor bacteriene ci și realizarea unor intervenții chirurgicale complicate, a transplanturilor de organe, instituirea unor terapii pentru cancer, precum și posibilitatea tratării unor boli autoimune. Cu toate acestea, o bună parte din agenții patogeni au dezvoltat rezistență la antibiotice, punând sub semnul întrebării însăși utilizarea lor. Renunțarea la antibiotice datorită ineficienței lor în terapiile antimicrobiene ar avea efecte devastatoare, greu de cuantificat. Margaret Chan, director-general al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) afirma în 2012: *”O eră post-antibiotică înseamnă sfârșitul medicinei moderne așa cum o cunoaștem. Lucruri la fel de comune precum o amigdală inflamată sau genunchiul zgâriat al unui copil ar putea ucide din nou.”*

Rezistența la antibiotice a microorganismelor patogene reprezintă o preocupare majoră a omenirii, reprezentând o amenințare serioasă pentru sănătatea umană și dezvoltarea economică din întreaga lume. Potrivit OMS, rezistența microorganismelor la substanțe antimicrobiene este una dintre cele 10 amenințări globale pentru sănătatea publică cu care se confruntă omenirea astăzi, ducând la creșterea mortalității și morbidității și punând presiune pe sistemele de sănătate [1]. Rezistența la antibiotice este definită de ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) ca fiind capacitatea microorganismelor (virusuri, bacterii, ciuperci și paraziți) de a rezista acțiunii unuia sau mai multor agenți antimicrobieni [2]. Poate apărea atunci când medicamentele utilizate pentru tratarea infecțiilor devin ineficiente din cauza modificărilor microorganismelor patogene (în special a bacteriilor). Numeroase studii anterioare au estimat consecințele rezistenței la antibiotice în termeni de decese, durata spitalizării și costurile de îngrijire a sănătății [1-5]. Date noi dintr-un studiu din 2022 arată


Prof. dr. Tudorel Toader

adevărată povară a rezistenței la antibiotice, cu 4,95 milioane de decese asociate rezistenței bacteriene în 2019, inclusiv 1,27 milioane de decese ca urmare directă a infecțiilor provocate de bacterii rezistente la antibiotice [6]. Un singur agent patogen - *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină (MRSA) - este responsabil pentru mai mult de 100.000 de decese datorate rezistenței la antibiotice în 2019.

Utilizarea antibioticelor în contextul actual al rezistenței microorganismelor. Cele mai multe bacterii patogene printre care și MRSA prezintă rezistență la mai multe antibiotice (RMA), ceea ce limitează foarte mult posibilitatea tratării eficiente a bolilor infecțioase. Din acest punct de vedere, RMA este considerată în prezent una dintre cele mai mari probleme ale medicinei contemporane [7]. Cauzele RMA includ utilizarea inadecvată a antibioticelor, consumul excesiv de medicamente antibacteriene, condițiile sanitare inadecvate, practicile ineficiente de prevenire și control al infecțiilor [8].

Unul din cele mai importante dezavantaje determinate de rezistența dezvoltată de microorganisme este dat de faptul că din ce în ce mai mulți pacienți cu infecții provocate de bacterii rezistente la mai multe antibiotice nu mai răspund la tratamentele disponibile. În acest context, OMS plasează în 2017 bacteria *Staphylococcus aureus* (metilicilin-rezistentă, vancomicin-rezistentă) pe o listă de agenți patogeni prioritari la nivel mondial, cu rezistență ridicată la antibiotice. Astfel de microorganisme prezintă un risc crescut pentru sănătatea umană, fiind rezistente la majoritatea soluțiilor terapeutice existente în prezent.

Încă de la descoperire și prima utilizare în 1941, **penicilina**, un antibiotic cu un nucleu β -lactamic, a manifestat o eficacitate excelentă față de bacteriile Gram pozitive, în particular față de stafilococi [9]. Cu toate acestea, la scurt timp de la prima utilizare pe pacienți umani, în anul 1942 este descoperită prima tulpină de *Staphylococcus aureus* rezistentă la penicilină. Cauza rezistenței a fost pusă pe seama capacității bacteriilor de a produce penicilinaza (β -lactamaza) – enzimă care degradează penicilina. Soluția problemei a venit în 1959 prin descoperirea metilicinei, un antibiotic β -lactamic din clasa penicilinelor rezistent la penicilinaze. Doar nouă ani mai târziu, într-un spital din Boston (USA) este menționată prima epidemie determinată de stafilococul auriu metilicino-rezistent [10]. Până în acest moment, MRSA sunt responsabili de producerea de infecții bacteriene la om care sunt extrem de dificil de tratat, inclusiv de infecțiile nosocomiale, generând importante probleme sociale [11].

Deși OMS a încurajat comunitatea științifică să dezvolte tratamente inovatoare pentru bacteriile rezistente, identificarea de noi antibiotice eficiente constituie un proces foarte anevoios. Astfel, în prezent, ne aflăm în situația în care din 1987 nu a fost descoperită nicio clasă nouă de antibiotice. Acest lucru se explică în parte prin faptul că multe companii

farmaceutice au abandonat în ultimele decenii cercetarea și dezvoltarea antibioticelor noi, datorită scăderii profitabilității pieței antibioticelor. Cercetătorii au modificat antibioticele existente, însă această strategie este inutilă în fața capacității bacteriilor de a dezvolta rezistență. În plus, atunci când noi antibiotice ajung pe piață, microorganismele devin rapid rezistente la acestea.

Prin urmare găsirea de noi soluții inovatoare și eficiente pentru a ține pasul cu rezistența la antibiotice dezvoltată de agenții patogeni este deosebit de dificilă și reprezintă un obiectiv crucial al cercetării biomedicale actuale [12]. Un rol important ar trebui să îl joace moleculele noi, pentru care microorganismele patogene, printre care și MRSA, nu au dezvoltat încă rezistență.

Flavonoidele, un grup de compuși heterociclici naturali, sunt potențial buni candidați pentru dezvoltarea de noi agenți împotriva MRSA. În mod tradițional, flavonoidele au fost folosite de secole pentru a trata bolile umane datorită activităților lor antimicrobiene, antialergice, antiinflamatorii și antioxidante [13]. Există soluții patentate pe bază de flavonoide naturale destinate terapiei infecțiilor provocate de stafilococi rezistenți la meticilină. O astfel de soluție se bazează pe flavonoide de tipul 6,7-dihydroxiflavonă, 7,8-dihydroxiflavonă, 3',4'-dihydroxiflavonă, fisetină și kaempferidă (patent US-2006229262-A1). Activitatea anti-MRSA a acestor flavonoide poate fi apreciată prin valori ale concentrației minime inhibitorii variind între 31,3 și 250 μg/ml.

Problema tehnică identificată se referă la rezistența stafilococilor aurii (*Staphylococcus aureus*) la mai multe antibiotice utilizate în terapia bolilor infecțioase (ex. penicilină și meticilină). Stafilococii aurii rezistenți la meticilină (MRSA) reprezintă cauza principală a infecțiilor cutanate și ale țesuturilor moi la pacienții care se prezintă în unitățile de primire urgențe și unitățile de terapie intensivă și una din bacteriile incriminate de dobândirea infecțiilor nosocomiale [14]. Cele mai frecvent citate afecțiuni invazive legate de MRSA includ șocul septic (56%), pneumonia (32%), endocardita (19%), bacteriemia (10%) și celulita (6%) [15]. Tulpinile de stafilococ auriu rezistente la meticilină sunt rezistente și la alte clase de antibiotice (prin diferite mecanisme) limitând opțiunile de tratament, cu importante implicații medicale, economice și sociale [16,17]. După ultimele studii publicate în anul 2022, MRSA este responsabil pentru mai mult de 100.000 de decese datorate rezistenței la antibiotice în 2019 [6]. Rezistența MRSA la mai multe antibiotice constituie o problemă globală de sănătate publică [17], acest lucru conducând la necesitatea identificării de noi compuși activi împotriva acestor tulpini. În plus, introducerea unor noi antibiotice în terapia infecțiilor stafilococice constituie un proces lent și mai ales costisitor. Dezvoltarea unui antibiotic nou implică costuri uriașe,

timpul necesar identificării, testării, producerii și utilizării în terapie fiind estimat la 20 de ani. Astfel, pentru cele cinci antibiotice dezvoltate în perioada 2009-2018 (eravaciclina, oritavancina, fidaxomicina, omadaciclina și ceftolozan-tazobactam), costurile medii doar pentru aprobare au fost de aproximativ 1,297 miliarde USD [18]. La aceste costuri se mai adaugă în primii cinci ani de la introducerea pe piață între 250 și 500 de milioane USD pentru dezvoltarea rețelelor de distribuție și asigurarea angajamentelor post-aprobare.

În acest context, **soluția tehnică** propusă de prezenta invenție constă în obținerea și utilizarea unei noi flavonoide sintetice triciclice cu sulf și Br ca substituent halogenat împotriva stafilococilor auri rezistenți la mai multe antibiotice. Elementul original al invenției îl constituie sinteza unei flavonoide cu o structură nouă triciclică. Aceasta conține un ciclu 1,3-ditiolilic condensat la nucleul clasic benzopiranic al flavonoidelor. Poziția 2 a ciclului 1,3-ditiolilic, deficitară în sarcină, este susceptibilă la atacuri din partea unor specii nucleofile ce se găsesc din abundență în membrana celulară a bacteriilor. Astfel, este de așteptat ca introducerea unei astfel de substructuri pe ansamblul molecular al flavonoidelor clasice să aibă ca rezultat creșterea interacțiunii dintre noua structură triciclică și structuri moleculare bacteriene, implicit a activității antibacteriene, imprimând moleculei proprietăți bacteriostatice și bactericide importante.

Scopul invenției este de a propune o metodă de obținere a unei noi flavonoide sintetice triciclice cu sulf și Br ca substituent halogenat și utilizarea noii molecule împotriva unor bacterii patogene de origine umană în contextul ineficienței folosirii antibioticelor clasice în terapiile antibacteriene datorită rezistenței dezvoltată de microorganisme.

Problema tehnică identificată este reprezentată de creșterea alarmantă a rezistenței la mai multe antibiotice a stafilococilor auri și de aici imposibilitatea utilizării antibioticelor cunoscute în terapia infecțiilor stafilococice, cu un impact medical, social și economic major. Soluția pentru această problemă se bazează pe:

1. obținerea unei noi molecule reprezentată de o flavonoidă sintetică triciclică cu sulf și Br ca substituent halogenat.
2. utilizarea flavonoidei sintetice împotriva unei tulpini MRSA rezistente la mai multe antibiotice utilizate în practica medicală curentă.

Flavonoida propusă are o structură triciclică nouă – Figura 1. Aceasta conține un ciclu 1,3-ditiolilic condensat la nucleul clasic benzopiranic. Sinteza unui astfel de ciclu 1,3-ditiolilic necesită un precursor ditiocarbamic care în cataliză acidă suferă heterociclocondensare cu o grupare carbonil situată în poziția α . Astfel, sinteza unei flavonoide 3-ditiocarbamice care în

Prof. dr. Tudorel Toader

47

cataliză acidă să conducă la închiderea ciclului 1,3-ditiolilic reprezintă calea de obținere a noii structuri de flavonoidă triciclică cu sulf.

Procedeul de obținere a flavonoidei triciclice este descris în cele ce urmează. O metodă facilă de sinteză a unor flavanone ce conțin un rest de acid ditiocarbamic în poziția 3 a fost descrisă anterior de către noi [19]. Astfel, reacția ω ,5-dibromo-2-hidroxiacetofenonei cu *N,N*-dietilditiocarbamatul de sodiu conduce la *N,N*-dietilamino-1-carboditioatul de 1-(5-bromo-2-hidroxifenil)-1-oxaetan-2-il (1) - Figura 2. Acesta, în reacție cu amina 4-bromobenzaldehidei (2), în metanol la reflux timp de 4 ore, conduce la obținerea flavanonei țintă, *N,N*-dietilditiocarbamatul de 6-bromo-2-(4-bromofenil)-4-oxocroman-3-il (3), cu randament de 78%. Tratarea flavanonei 3-ditiocarbamice (3) cu un amestec de acid metansulfonic - acid acetic (1:1 v/v), la o temperatură de 40°C, timp de 30 minute are ca rezultat închiderea ciclului 1,3-ditiolilic. Adăugarea de soluție apoasă de NaBF₄ conduce la tetrafluorboratul de 2-*N,N*-dietilamino-8-bromo-4-(4-clorofenil)-4*H*-1,3-ditiol[4,5-*c*]cromen-2-iliu (4) - flavonoida BrBr, cu randament de 88% (Figura 2).

Produsul obținut prezintă o excelentă activitate antibacteriană împotriva stafilococilor auri - tulpini de referință (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) și MRSA-bio1 (cu rezistență la meticilină, eritromicină, moxifloxacin, cefoxitin, penicilină, tetraciclină și clindamicină). Activitatea antibacteriană se traduce atât printr-un efect bacteriostatic, cu valori ale concentrației minime inhibitorii (CMI) de 0,24, respectiv 0,97 μg/ml, cât și printr-un efect bactericid, cu valori ale concentrației minime bactericide (CMB) de 0,97, respectiv 1,95 μg/ml. Efectul bacteriostatic împotriva tulpinii patogene testate se înregistrează pe parcursul a 24 de ore de incubare în prezența flavonoidei sintetice. Raportul CMB/CMI denotă o puternică activitate bactericidă a flavonoidei BrBr. După șase, respectiv nouă ore de incubare la concentrații echivalente cu CMB, flavonoida sintetică determină moartea tuturor celulelor de *S. aureus* ATCC 25923 și MRSA-bio1.

Avantajele soluției prezentate sunt următoarele:

1. timpul scurt necesar reacției, precum și simplitatea metodelor de sinteză a flavanonei 3-ditiocarbamice (3) și a flavonoidei triciclice (4) (BrBr) - Figura 2; flavanona este obținută direct, fără a fi necesară obținerea unei calcone intermediare; totodată, produsul de reacție este relativ greu solubil în metanol, ceea ce ușurează prelucrarea reacției; toate aceste avantaje fac flavonoida sintetică mai ușor de obținut, într-un timp mai scurt și cu costuri semnificativ mai reduse.
2. flavonoida sintetică propusă ca agent anti-stafilococic reprezintă o moleculă nouă; din acest punct de vedere nu a existat un contact anterior al microorganismelor țintă

(MRSA-bio1) cu flavonoida sintetică propusă, prin urmare nu există posibilitatea existenței fenomenului de rezistență, ceea ce asigură eficiența utilizării sale în context clinic.

3. tulpina MRSA-bio1 testată prezintă o sensibilitate deosebită la flavonoida sintetică (CMI = 0,97 $\mu\text{g/ml}$, CMB = 1,95 $\mu\text{g/ml}$); tulpina este rezistentă la mai multe antibiotice utilizate ca standard în terapia bolilor infecțioase (meticilină, eritromicină, moxifloxacin, cefoxitin, penicilină, tetraciclină și clindamicină), ceea ce face imposibilă utilizarea lor; aceeași tulpină este sensibilă la cloramfenicol, dar la o valoare a CMB de 16 de ori mai mare (31,25 $\mu\text{g/ml}$) comparativ cu flavonoida sintetică (1,95 $\mu\text{g/ml}$).
4. față de alte soluții patentate, așa cum este cea bazată pe flavonoide de tipul 6,7-dihydroxiflavonă, 7,8-dihydroxiflavonă, 3',4'-dihydroxiflavonă, fisetină și kaempferidă (care face obiectul patentului patent US-2006229262-A1), flavonoida sintetică prezintă o activitate anti-MRSA mult mai importantă, cu valori ale CMI de 32 până la 257 ori mai mici.

Exemplul 1 - Sinteza flavonoidei triciclice (Figura 2-4)

La o soluție de acid metansulfonic : acid acetic glacial (3 ml, 1:1 v/v) se adaugă în cantități mici *N,N*-dietilditiocarbamatul de 6-bromo-2-(4-bromofenil)-4-oxocroman-3-il (Figura 2-3, 0,53 g, 1 mmol). Amestecul de reacție se păstrează la 40°C timp de 30 minute. Soluția omogenă obținută se toarnă într-o soluție apoasă de NaBF₄ (0,5 g în 50 mL apă). Precipitatul obținut este filtrat, uscat și recristalizat din etanol. Tetrafluoroboratul de 2-*N,N*-dietilamino-8-bromo-4-(4-clorofenil)-4*H*-1,3-ditol[4,5-*c*]cromen-2-iliu (Figura 2-4) se obține sub forma unui solid alb (0,52 g, 88%) cu p.t. 211-212°C.

Exemplu 2 – Activitatea anti-stafilococică a flavonoidei triciclice sintetice

Ca bacterii test s-au utilizat două tulpini de *Staphylococcus aureus*: una de referință - *S. aureus* ATCC 25923 și una izolată clinic - MRSA-bio1. Tulpina izolată clinic prezintă sensibilitate la cloramfenicol (CMI = 31,25 $\mu\text{g/ml}$) și este rezistentă la meticilină, eritromicină, moxifloxacin, cefoxitin, penicilină, tetraciclină și clindamicină. Ambele tulpini au fost păstrate la -80°C. Pentru cultivare s-a utilizat mediu LB agarizat (peptonă – 10 g, extract de drojdii – 5

Prof. dr. Tudorel Toader

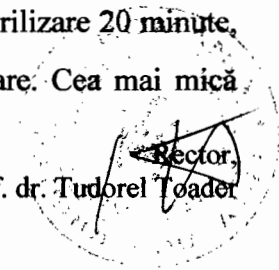
g, clorură de sodiu – 10 g, agar – 18 g, apă distilată - 1000 ml, sterilizare 20 minute, 121 °C). Incubarea s-a realizat la temperatura de 37 °C timp de 24 ore. După dezvoltare, o colonie reprezentativă a fost folosită ca sursă de inocul pentru toate experimentele.

Ca agent antibacterian s-a utilizat o flavonoidă sintetică triciclică cu Br ca substituent halogenat la nucleul benzopiranic (Figura 1). Diferite concentrații de lucru ale flavonoidei s-au obținut folosind dimetil sulfoxid (DMSO, 99,5%) ca solvent.

Metoda de testare presupune parcurgerea mai multor pași.

O colonie reprezentativă din fiecare tulpină testată a fost inoculată în 10 ml mediu bulion Mueller Hinton (MHB: extract de carne - 2 g, hidrolizat de cazeină -17,5 g, amidon - 1,50 g, apă distilată 1000 ml, sterilizare prin autoclavare, 20 minute, 121 °C) pentru înființarea unei preculturi, incubată pe un agitator orbital la 190 rpm timp de 18 ore la 37 °C. Precultura a fost utilizată pentru prepararea unui inocul reprezentat de o suspensie bacteriană având densitatea de 2×10^6 UFC/ml (UFC = unități formatoare de colonii).

Pentru determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) și a concentrației minime bactericide (CMB) s-a utilizat metoda micro-diluțiilor seriate [20] modificată, folosind plăci cu 96 de godeuri. În fiecare godeu al plăcii se adaugă 100 μl MHB. Flavonoida (100 μl) a fost diluată în același volum de MHB folosind DMSO (99,5%) astfel încât să se obțină în godeurile unei linii o serie de diluții $\frac{1}{2}$ cu concentrații finale de la 0,12 la 250 μg/ml. Ulterior se adaugă în fiecare godeu inoculul (100 μl). Controlul a fost reprezentat de 100 μl MHB suplimentat cu DMSO în concentrații echivalente, peste care s-au adăugat 100 μl inocul. Controlul de sterilitate a fost reprezentat de 200 μl MHB. Tulpina *S. aureus* ATCC 43300 a fost utilizată ca referință. Ca antibiotic de referință s-a utilizat cloramfenicolul. Incubarea s-a realizat în condiții staționare, timp de 24 ore la 37 °C. Evaluarea creșterii bacteriene consecutiv incubării s-a realizat prin adăugarea a 20 μl resazurină 0,01% în fiecare godeu al plăcii, urmată de termostatare la 37 °C, timp de o oră în condiții staționare. Apariția culorii albastru după adăugarea resazurinei a fost considerată echivalentă absenței creșterii bacteriene; apariția culorii roz consecutiv adăugării resazurinei a fost considerată echivalentă dezvoltării bacteriene. Cea mai mică concentrație care a inhibat dezvoltarea bacteriei test după 24 ore la 37 °C (culoare albastră în godeu) a fost considerată CMI. Pentru determinarea CMB, a fost preluat un volum de 15 μl din fiecare godeu în care nu a fost vizualizată creșterea (culoare albastră) și inoculat prin descriere de striuri pe plăci Petri conținând 15 ml mediu Mueller Hinton agar - MHA (extract de carne - 2 g, hidrolizat de cazeină -17,5 g, amidon - 1,50 g, agar - 18 g, apă distilată - 1000 ml, sterilizare 20 minute, 121 °C). Plăcile Petri au fost incubate 24 ore la 37 °C în condiții staționare. Cea mai mică



concentrație de BrBr pentru care nu s-a observat apariția coloniilor pe mediu MHA după incubare a fost considerată CMB. Toate testările au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1 ca valori medii. Așa cum se poate observa, flavonoida a avut o importantă activitate anti-stafilococică împotriva ambelor tulpini testate, inhibând creșterea stafilococilor aurii la concentrații de 0,24 $\mu\text{g/ml}$ (tulpina *S. aureus* ATCC 25923) și 0,97 $\mu\text{g/ml}$ (tulpina MRSA-bio1).

Tabel 1 – Activitatea antibacteriană a flavonoidei triciclice sintetice ($\mu\text{g/ml}$)

Tulpina bacteriană	CMI	CMB
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,24	0,97
<i>S. aureus</i> (MRSA-bio1)	0,97	1,95

CMI – concentrație minimă inhibitoare

CMB – concentrație minimă bactericidă

Exemplu 3 – Utilizarea flavonoidei triciclice sintetice ca agent bacteriostatic

Pentru realizarea experimentelor s-au folosit aceleași microorganisme test și aceleași medii de cultură ca cele prezentate anterior. Efectul BrBr asupra creșterii bacteriene a fost evaluat folosind metoda descrisă de noi [21], cu următoarele modificări. Un volum de 250 μl dintr-o precultură de 18 ore a fost adăugat într-un flacon cu 25 ml mediu MHB astfel încât să se atingă o densitate celulară finală de aproximativ 10^6 UFC/ml. Mediul de cultură a fost suplimentat cu flavonoida sintetică astfel încât să se atingă concentrații finale echivalente cu $\frac{1}{2}$ CMI, CMI și $2 \times$ CMI. Ca martor a fost utilizat un volum de 25 ml mediu MHB inoculat și suplimentat cu DMSO la concentrații echivalente. Toate flacoanele au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore în condiții de agitare (190 rpm). Creșterea a fost monitorizată prin măsurarea spectrofotometrică a densității optice la 600 nm a probelor prelevate din oră în oră până la 12 ore (perioadă corespunzătoare fazei de creștere exponențială – fază în care bacteriile sunt cel mai sensibile la acțiunea antibioticelor). Pentru tulpina MRSA-bio1 s-au analizat probe recoltate și la 24 de ore după inoculare. Pe baza rezultatelor obținute s-au construit grafice (Figura 3 și Figura 4) care reprezintă curbe de creștere - variația densității optice (dezvoltarea culturii) în timp. Toate experimentele au fost realizate în triplicat, valorile prezentate fiind mediile calculate.

Prof. dr. Tudorel Toader

Rector,

Așa cum se poate observa în Figura 3, flavonoida sintetică a determinat un efect bacteriostatic (absența dezvoltării) asupra tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 până la 12 ore la concentrații echivalente cu $\frac{1}{2}$ CMI (0,12 $\mu\text{g/ml}$). Pentru concentrații echivalente cu CMI și $2 \times$ CMI măsurătorile spectrofotometrice nu au evidențiat creșterea bacteriană pe toată durata desfășurării experimentelor.

Rezultate asemănătoare s-au obținut și pentru tulpina MRSA-bio 1 cu mențiunea că toate concentrațiile testate au determinat o inhibare a creșterii până la 12 ore de incubare, cu excepția concentrației echivalente cu $2 \times$ CMI pentru care nu s-a evidențiat creștere până la 24 de ore de la inoculare, ceea ce demonstrează un efect bacteriostatic semnificativ – Figura 4.

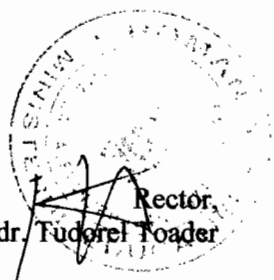
Exemplu 4 – Utilizarea flavonoidei triciclice sintetice ca agent bactericid

Pentru realizarea experimentelor s-au folosit aceleași microorganisme test și aceleași medii de cultură ca cele prezentate anterior. În plus s-a utilizat un tampon fosfat salin (PBS - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH = 7,2, sterilizare prin autoclavare, 20 minute, 121 °C).

Efectul bactericid al flavonoidei sintetice a fost cuantificat prin aprecierea reducerii numărului de UFC/ml, urmând o metodă prezentată de Aqil și colab. [22], cu următoarele modificări. După dezvoltare în MHB, celulele bacteriene au fost recoltate prin centrifugare (4.000 rpm, 20 minute) și spălate de două ori cu PBS. Densitatea celulară a fost ajustată pentru a obține o suspensie bacteriană de aproximativ 0,5 McFarland la 600 nm. Un volum de 100 μl din această suspensie celulară a servit ca inocul și a fost adăugat în 10 ml PBS suplimentat cu o concentrație de flavonoidă sintetică echivalentă cu valoarea CMB (densitatea finală a celulelor fiind de aproximativ 10^6 UFC/ml). Controlul a fost preparat în mod similar utilizând DMSO la concentrația corespunzătoare. Toate flacoanele au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore în condiții de agitare (190 rpm). Probele au fost prelevate din jumătate în jumătate de oră până la 2 ore, apoi la fiecare oră sau din două în două ore până la 12 ore, diluate în PBS (10 μl probă la 990 μl PBS), inoculate pe mediu MHA și incubate la 37°C timp de 24 ore în condiții staționare. Ulterior, s-au numărat coloniile dezvoltate pe suprafața mediului de cultură și s-a calculat numărul de UFC/ml [23]. Valoarea obținută a fost transformată în \log_{10} . S-a considerat activitate bactericidă atunci când s-a constatat o reducere mai mare de 3 \log_{10} a numărului total de UFC/ml față de inoculul inițial. Pe baza valorilor obținute s-au construit curbe de distrugere a celulelor bacteriene (Figura 5 și Figura 6). Experimentele s-au efectuat în triplicat, fiind reprezentate grafic valorile medii obținute.

62

Flavonoida sintetică testată determină asupra tulpinii de referință un efect bactericid total la doar șase ore de expunere la concentrații echivalente cu CMB - Figura 5. În cazul tulpinii MRSA-bio1, flavonoida BrBr a determinat moartea tuturor celulelor la 9 ore de expunere – Figura 6. De remarcat faptul că până la finele experimentului nu s-au evidențiat celule bacteriene viabile pentru nici una din tulpinile testate.



Prof. dr. Tudorel Poader
Rector

Bibliografie

1. Al-Tawfiq, J.A.; Momattin, H.; Al-Ali, A.Y.; Eljaaly, K.; Tirupathi, R.; Haradwala, M.B.; Areti, S.; Alhumaid, S.; Rabaan, A.A.; Al Mutair, A.; et al. Antibiotics in the pipeline: a literature review (2017-2020). *Infection* **2022**, *50*, 553-564, doi:10.1007/s15010-021-01709-3.
2. WHO Regional Office for Europe; European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe - 2020 data*. WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, 2022.
3. Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect Drug Resist* **2019**, *12*, 3903-3910, doi:10.2147/idr.S234610.
4. World Health Organization. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) Report*; World Health Organization: Geneva, 2021.
5. Jit, M.; Ng, D.H.L.; Luangasanatip, N.; Sandmann, N.; Atkins, F.; Robotham, K.E.; Pouwels, J.V.; B., K. Quantifying the economic cost of antibiotic resistance and the impact of related interventions: rapid methodological review, conceptual framework and recommendations for future studies. *BMC Medicine* **2020**, *18*, 38, doi:10.1186/s12916-020-1507-2.
6. Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **2022**, *399*, 629-655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
7. Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 539, doi:10.3389/fmicb.2019.00539.
8. Ušjak, D.; Ivković, B.; Božić, D.D.; Bošković, L.; Milenković, M. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* **2019**, *131*, 186-196, doi:10.1016/j.micpath.2019.04.015.
9. Gaynes, R. The Discovery of Penicillin—New Insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases* **2017**, *23*, doi:10.3201/eid2305.161556.
10. Enright, M.C.; Robinson, D.A.; Randle, G.; Feil, E.J.; Grundmann, H.; Spratt, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 7687-7692, doi:10.1073/pnas.122108599.
11. Green, B.N.; Johnson, C.D.; Egan, J.T.; Rosenthal, M.; Griffith, E.A.; Evans, M.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists. *J Chiropr Med* **2012**, *11*, 64-76, doi:10.1016/j.jcm.2011.12.001.
12. Miethke, M.; Pieroni, M.; Weber, T.; Brönstrup, M.; Hammann, P.; Halby, L.; Arimondo, P.B.; Glaser, P.; Aigle, B.; Bode, H.B.; et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry* **2021**, *5*, 726-749, doi:10.1038/s41570-021-00313-1.
13. Cushnie, T.P.; Lamb, T.; J., A. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38*, 99-107, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014.
14. Carroll, K.C. Rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current status. *Mol Diagn Ther* **2008**, *12*, 15-24, doi:10.1007/bf03256265.
15. Klevens, R.M.; Morrison, M.A.; Nadle, J.; Petit, S.; Gershman, K.; Ray, S.; Harrison, L.H.; Lynfield, R.; Dumyati, G.; Townes, J.M.; et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama* **2007**, *298*, 1763-1771, doi:10.1001/jama.298.15.1763.
16. Stapleton, P.D.; Taylor, P.W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog* **2002**, *85*, 57-72, doi:10.3184/003685002783238870.

17. Liu, W.-T.; Chen, E.-Z.; Yang, L.; Peng, C.; Wang, Q.; Xu, Z.; Chen, D.-Q. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. *Microbial Pathogenesis* **2021**, *156*, 104915, doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104915>.
18. Wouters, O.J.; McKee, M.; Luyten, J. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. *Jama* **2020**, *323*, 844-853, doi:10.1001/jama.2020.1166.
19. Birsa, M.L. Synthesis of some new substituted flavanones and related 4-chromanones by a novel synthetic method. *Synthetic Communications* **2002**, *32*, 115-118, doi:10.1081/SCC-120001517.
20. Tarpay, M.M.; Welch, D.F.; Marks, M.I. Antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* by micro-broth dilution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1980**, *18*, 579-581, doi:doi:10.1128/AAC.18.4.579.
21. Savu, M.; Simo, M.K.; Fopokam, G.X.; Olaru, S.M.; Cioanca, O.; Boyom, F.F.; Stefan, M. New insights into the antimicrobial potential of *Polyalthia longifolia* - antibiofilm activity and synergistic effect in combination with penicillin against *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1943.
22. Aqil, F.; Ahmad, I.; Owais, M. Evaluation of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity and synergy of some bioactive plant extracts. *Biotechnol J* **2006**, *1*, 1093-1102, doi:10.1002/biot.200600130.
23. Dunca, S.; Ailiesei, O.; Nimitan, E.; Stefan, M. *Microbiologie aplicată*; Editura Tehnopress: Iasi, 2004.

US-2006229262-A1 -Direct compression formulation and process

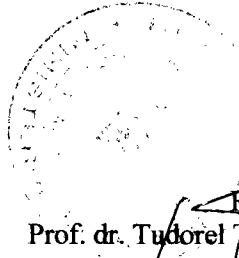
Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu proprietăți antibacteriene

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu proprietăți antibacteriene **caracterizat prin aceea că** flavonoida sintetică triciclică cu sulf și brom ca substituent, tetrafluoroboratul de 2-*N,N*-dietilamino-8-bromo-4-(4-clorofenil)-4*H*-1,3-ditiol[4,5-*c*]cromen-2-iliu este formată dintr-un ciclu 1,3-ditiolilic condensat la nucleul clasic benzopiranic și se obține utilizând un precursor ditiocarbamic care în cataliză acidă suferă heterociclocondensare cu o grupare carbonil situată în poziția α .
2. Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu proprietăți antibacteriene *conform revendicării 1*, **caracterizat prin aceea că** reacția de obținere are loc între ω ,5-dibromo-2-hidroxiacetofenonă cu *N,N*-dietilditiocarbamatul de sodiu; rezultă *N,N*-dietilamino-1-carboditioatul de 1-(5-bromo-2-hidroxifenil)-1-oxaetan-2-il care reacționează cu amina 4-bromobenzaldehidei, în metanol la reflux timp de 4 ore; reacția conduce la obținerea flavanonei țintă, *N,N*-dietilditiocarbamatul de 6-bromo-2-(4-bromofenil)-4-oxocroman-3-il, cu randament de 78%. Tratarea flavanonei 3-ditiocarbamice cu un amestec de acid metansulfonic - acid acetic (1:1 v/v), la 40°C, timp de 30 min are ca rezultat închiderea ciclului 1,3-ditiolilic. Adăugarea de soluție apoasă de NaBF₄ (0,5 g în 50 mL apă) conduce la tetrafluoroboratul de 2-*N,N*-dietilamino-8-bromo-4-(4-clorofenil)-4*H*-1,3-ditiol[4,5-*c*]cromen-2-iliu, flavonoida BrBr, cu p.t. 211-212°C (randament de 88%).
3. Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu activitate bacteriostatică **caracterizat prin aceea că** la un volum de 25 ml de mediu de cultură MHB conținând celule de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923 și MRSA-bio1 - tulpină rezistentă la mai multe antibiotice) cu o densitatea bacteriană de aproximativ 10⁶ UFC/ml, se adaugă flavonoida sintetică cu efect bacteriostatic astfel încât să se atingă concentrații finale echivalente cu ½ CMI, CMI și 2 × CMI, și se incubează la 37°C timp de 24 de ore în condiții de agitare la 190 rpm; evaluarea creșterii se realizează prin prelevarea de probe din oră în oră până la 12 ore, măsurându-se densitatea optică la 600 nm.
4. Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu activitate bactericidă **caracterizat prin aceea că** la un volum de 10 ml PBS suplimentat cu flavonoidă sintetică la o concentrație finală echivalentă cu valoarea CMB se adaugă 100 μ l de suspensie celulară cu densitate de aproximativ 10⁸ UFC/ml, obținută prin adăugarea în

Prof. dr. Tudorel Toader

mediul de cultură MHB a unor celule de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923 și MRSA-bio1 - tulpină rezistentă la mai multe antibiotice), recoltate prin centrifugare (4.000 rpm, 20 minute) și spălate de două ori cu PBS (densitatea finală a celulelor fiind de aproximativ 10^6 UFC/ml), urmată de incubarea la 37°C timp de 24 de ore în condiții de agitare la 190 rpm. Probele au fost preluate la fiecare oră sau din 2 în 2 ore până la 12 ore, diluate în PBS (10 μ l probă la 990 μ l PBS), inoculate pe mediu MHA și incubate la 37°C timp de 24 ore în condiții staționare; ulterior, s-a apreciat viabilitatea celulară prin numărarea coloniile dezvoltate pe suprafața mediului de cultură și calcularea numărului de unități formatoare de colonii (UFC)/ml.



Rector,
Prof. dr. Tudorel Toader

Procedeu de obținere a unei noi flavonoide sintetice cu proprietăți antibacteriene

Desene și figuri

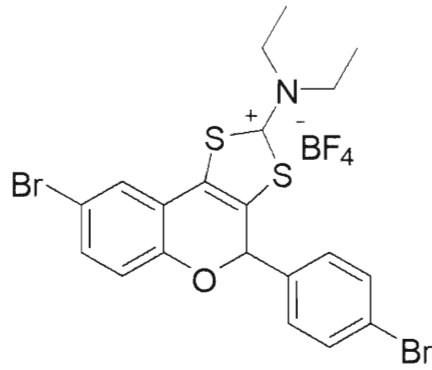


Figura 1. Structura flavonoidei sintetice triciclice cu sulf și Br ca substituent halogenat.

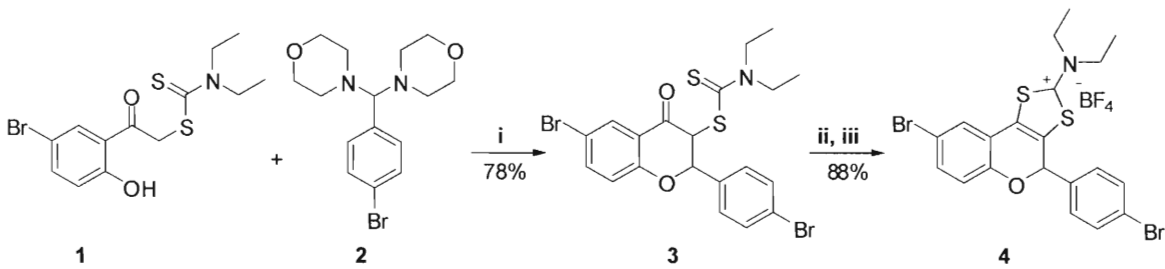


Figura 2. Sinteza flavanonei triciclice **4**. i) MeOH, reflux 4 h; ii) CH₃SO₃H/CH₃COOH (1:1 v/v), 40°C, 30 min; iii) NaBF₄ aq.



Rector,
Prof. dr. Tudorel Toader

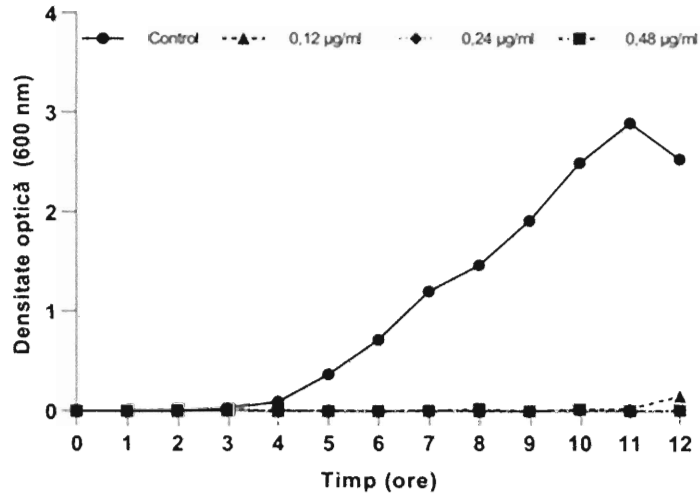


Figura 3. Dinamica creşterii tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 în prezenţa flavonoidei BrBr (CMI = 0,24 µg/ml)

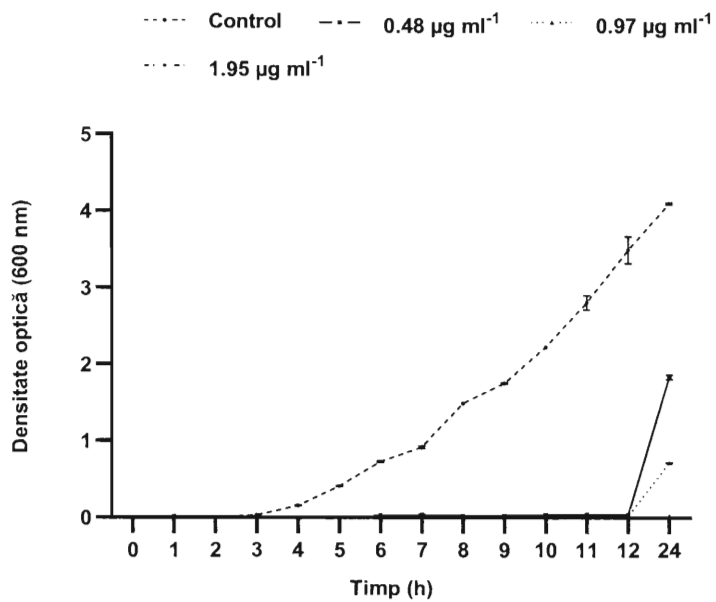
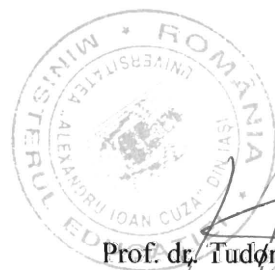


Figura 4. Dinamica creşterii tulpinii MRSA-biol în prezenţa flavonoidei BrBr (CMI = 0,97 µg/ml)



Rector,
Prof. dr. Tudorel Toader

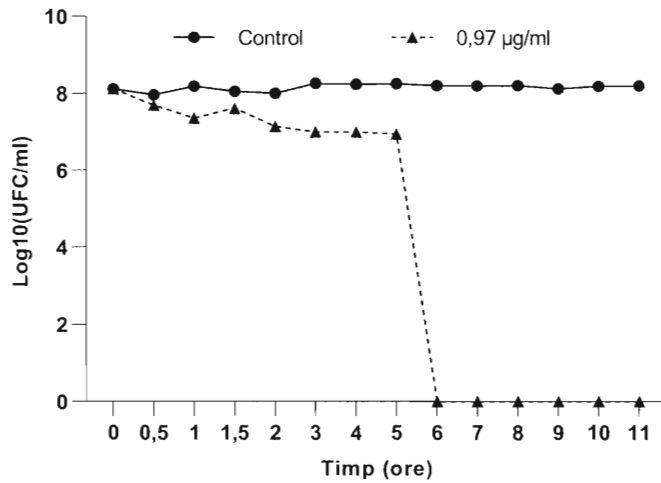


Figura 5. Efectul expunerii la flavonoida BrBr asupra viabilității celulelor de *S. aureus* ATCC 25923 (CMB = 0,97 µg/ml)

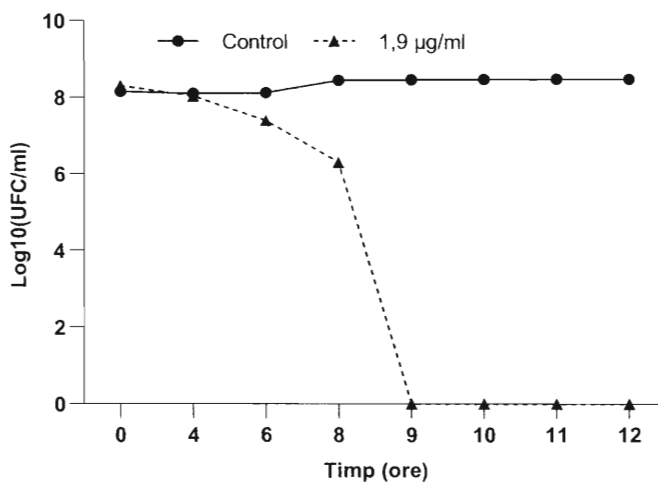


Figura 6. Efectul expunerii la flavonoida BrBr asupra viabilității celulelor tulpinii MRSA-bio1 (CMB = 1,95 µg/ml)