



MD 4722 B1 2020.11.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) 4722 (13) B1
(51) Int.Cl: A61K 35/748 (2015.01)
A61K 31/07 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENTIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de inventie, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2019 0077 (22) Data depozit: 2019.10.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.11.30, BOPI nr. 11/2020
(71) Solicitanți: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: BULIMAGA Valentina, MD; ULINICI Mariana, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titulari: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Remediu antibacterian contra bacteriilor *Staphylococcus aureus*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotecnologie și medicină, și anume la utilizarea pigmentului natural mixoxantofila în calitate de remediu antibacterian.

Se propune utilizarea mixoxantofilei în concentrație de 0,0104 - 0,0416 mg/ml de soluție hidro-etanolică de 80% în calitate de

2
remediu antibacterian contra bacteriilor *Staphylococcus aureus*.

Rezultatul invenției constă în micșorarea de până la 120 de ori a concentrației minime de inhibiție a creșterii bacteriilor gram-pozițive *S. aureus*.

Revendicări: 1

(54) Antibacterial agent against *Staphylococcus aureus* bacteria

(57) Abstract:

1

The invention relates to biotechnology and medicine, namely to the use of a natural pigment mixoxanthophyll as an antibacterial agent.

It is proposed the use of mixoxanthophyll in a concentration of 0.0104 - 0.0416 mg/ml of 80% aqueous-ethanol

2

solution as an antibacterial agent against *Staphylococcus aureus* bacteria.

The result of the invention consists in reducing up to 120 times the minimum concentration of inhibition of the *S. aureus* gram-positive bacteria growth.

Claims: 1

(54) Антибактериальное средство против бактерий *Staphylococcus aureus*

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к биотехнологии и медицине, а именно к применению природного пигмента миксоксантофилла в качестве антибактериального средства.

Предлагается применение миксоксантофилла в концентрации 0,0104 - 0,0416 мг/мл 80%-ного водно-этанольного

2

раствора в качестве антибактериального средства против бактерий *Staphylococcus aureus*.

Результат изобретения состоит в снижении до 120 раз минимальной концентрации ингибирования роста грамположительных бактерий *S. aureus*.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și medicină, și anume la utilizarea pigmentului natural mixoxantofila în calitate de remediu antibacterian.

În ultimii ani la tratarea unor infecții provocate de multe bacterii se întâlnesc dificultăți, legate de capacitatea acestora de a forma rezistență la antibiotice sau alte substanțe medicamentoase de sinteză chimică. De aceea, în prezent se investighează noi agenți de origine naturală cu o posibilă activitate antibacteriană, care ar putea fi utilizati la tratarea infecțiilor.

Este cunoscut că unele extracte brute metanolice și acetonice din cianobacteria *Spirulina platensis* posedă activitate antimicrobiană contra *Staphylococcus aureus* și *Salmonella typhimurium* [1]. Concentrațiile extractelor de *S. platensis* au fost preparate de la 250 ppm până la 7000 ppm (sau 0,25 mg/ml până la 7 mg/ml, respectiv) în ambii solvenți. În cazul *S. aureus*, extractul acetonic a demonstrat o inhibiție maximă a creșterii (21,5 mm) la 5000 ppm sau 5 mg/ml, iar în cazul extactului metanolic inhibiția maximă a fost observată la 6000 ppm sau 6 mg/ml (19,0 mm), iar cu majorarea concentrației până la 7000 ppm inhibarea descrește în cazul extractului acetonic (18,5 mm), cât și celui metanolic (18,75 mm). Controlul negativ (solventul) n-a indicat inhibiție, iar controlul pozitiv (antibiotic, chloramphenicol) a indicat o inhibare de 24,0 mm în metanol și 27,0 mm în acetonă.

Dezavantajele acestor extracte sunt utilizarea:

- unor solvenți toxici și volatili (acetona și metanolul) pentru obținerea extractelor de *S. platensis*;
- metodei difuzimetrice la determinarea acțiunii prin măsurarea zonei de inhibiție, care nu este suficient de imformativă, deoarece prin această metodă nu este posibil de apreciat concentrația minimă de inhibiție a creșterii tulpinii microbiene, cu atât mai mult a concentrației minime bactericide;
- unor concentrații înalte ale extractelor pentru inhibarea maximă a creșterii bacteriilor - 5-7 mg/ml.

Mai este cunoscut că unele extracte brute din *Spirulina platensis* cu solvenți organici (metanol, acetonă, etanol, hexan și eter petroleic) manifestă activitate antibacteriană împotriva bacteriilor gram-pozițive și gram-negative [2]. Extractele de *Spirulina platensis* au fost dizolvate în DMSO 5% pentru a obține soluția stoc cu 128 mg/ml. S-au luat cate 0,5 ml de soluție stoc și 0,5 ml de bulion Mueller Hinton pentru ca bacteriile să obțină concentrația de 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,50 µg/ml și 1,25 µg/ml pentru extractele de *Spirulina platensis* și cate 50 µl de suspensie standardizată a organismului testat au fost transferate în fiecare tub. Tubul de control conținea numai tulpini de bacterii fără extract de *Spirulina platensis*. Tuburile de cultură au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore. Concentrația minimă de inhibiție (CMI) a extractelor de *Spirulina platensis* asupra creșterii izolatorilor bacteriene a fost testată în bulion Mueller Hinton prin metoda de diluare a bulionului Ericsson și Sherris (Ericsson H.M., J.C. Sherris. Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. Acta. Path. Microbiol. Scand., Sec. B, Suppl., 1971, p. 217). Valorile concentrației minime de inhibiție (CMI) ale extractelor de *Spirulina platensis* împotriva bacteriilor testate au fost distribuite în diapazonul 1,25-80 mg/l. Valoarea CMI cea mai mică (1,25 mg/ml) a fost înregistrată în cazul studiului efectului extractului brut de metanol asupra creșterii *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* și *Shigella flexneri*.

Dezavantajul acestor extracte constă în utilizarea unor solvenți toxici pentru obținerea extractelor din spirulină (cu excepția etanolului), precum și valorile relativ înalte ale concentrației minime de inhibiție (1,25-80 mg/ml), iar utilizarea unor extracte sumare de *Spirulina platensis* nu permite identificarea componentului individual care manifestă acțiune antibacteriană.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui remediu antibacterian cu acțiune inhibitoare mai eficientă asupra unor tulpini de bacterii gram-poziție, manifestată la concentrații mai mici.

Esența invenției constă în faptul, că se propune utilizarea mixoxantofilei în concentrație de 0,0104 - 0,0416 mg/ml de soluție hidro-etalonică de 80% în calitate de remediu antibacterian contra bacteriilor *Staphylococcus aureus*.

Rezultatul tehnic al invenției constă în elaborarea unui remediu natural antibacterian nou cu o concentrație minimă de inhibiție a creșterii tulpinilor de bacterii gram-pozitive (*S. aureus* ATCC 25923 fenotip salbatic sensibil, *S. aureus* ATCC 29213 fenotip meticilin rezistent) de circa 120 de ori mai mică (0,0104 mg/ml) în comparație cu soluția apropiată (1,25 mg/1).

Rezultatul tehnic al invenției se datorează structurii moleculare specifice a pigmentului mixoxantofila, care este un xantofil glicozadic glicozilat în poziția 2'-OH cu o catenă cu legături duble conjugate, care manifestă proprietăți antioxidantă și, posibil, afectează sistemul enzimatic al sintezei ADN (giraza, polimeraza) la microorganismele testate.

Exemple de realizare a inventiei

Exemplul 1

Pentru determinarea acțiunii antibacteriene a fost utilizată mixoxantofila, un pigment xantofilic, obținut din biomasa de *Spirulina platensis* conform procedeului descris în MD 4360 B1 2015.07.31. La 100 ml de biomă proaspătă (100 mg/ml), obținută în rezultatul filtrării și separării lichidului cultural, s-au adăugat 300 ml de alcool etilic de 96% și s-a agitat timp de 30 min. După filtrare, extractul obținut a fost transferat în pâlnie de separare și s-au adăugat repetat câte 50 ml de hexan pentru înlăturarea beta-carotenului și lipidelor. După saponificarea soluției de mixoxantofilă cu soluție alcoolică de KOH, soluția obținută a fost diluată cu apă distilată până la concentrația alcoolului etilic de 45-50%. Precipitatul solid (mixoxantofila) a fost separat prin filtrare și păstrat în flacon de culoare cafenie la 4°C.

Exemplul 2

Determinarea concentrației minime antibacteriene și bactericide a mixoxantofilei

10 mg de mixoxantofilă (în formă de cristale) au fost transferate într-un balon cotat de 100 ml și dizolvate prin adăugarea succesivă a soluției hidro-alcoolice de 80% (obținute prin diluarea alcoolului etilic de 96% cu apă purificată). Din soluția de mixoxantofilă cu concentrația de 0,1 mg/ml a fost preparată prin diluție soluția stoc (0,0832 mg/ml). Într-un tub steril a fost adăugat 1 ml de soluție stoc (0,0832 mg/ml de mixoxantofilă în soluție apoasă de alcool etilic de 80%) în 1 ml de bulion Muller Hinton și s-au efectuat diluții succesive pentru a obține concentrații de mixoxantofilă după cum urmează: 0,0832 mg/ml, 0,0416 mg/ml, 0,0208 mg/ml, 0,0104 mg/ml, 0,052 mg/ml, 0,026 mg/ml, 0,013 mg/ml, 0,0065 mg/ml. Inoculul standard al microorganismului testat (10^5 bacterii/ml) a fost transferat în fiecare tub. Tuburile de cultură au fost incubate la 37°C timp de 18-24 de ore. După incubarea adecvată (18-24 ore), a fost citită valoarea CMI prin observarea macroscopică a tuburilor: în primele tuburi, cu concentrații înalte de soluție de mixoxantofilă, creșterea culturii nu este vizibilă, microorganismele fiind omorâte sau inhibate în prezența extractului cu acțiune antimicrobiană. Concentrația de mixoxantofilă corespunzătoare tubului cu concentrația minimă, care inhibă creșterea vizibilă a culturii microbiene (0,0104 mg/ml), reprezintă valoarea CMI. În paralel au fost examinate urmatoarele probe: Control 1 (bulion Muller Hinton + suspensie standard a microorganismului testat (tulpini de referință: *S. aureus* ATCC 25923 fenotip salbatic sensibil, *S. aureus* ATCC 29213 fenotip meticilin rezistent; 89 tulpini *S. aureus* meticilin rezistente, izolate de la pacienți); Control 2 (bulion Muller Hinton + alcool de 80% + suspensie standard a microorganismului testat). S-a observat că în ambele probe de control mediul se tulbură, ca urmare a creșterii microbiene. Ca martor de sterilitate a servit proba Control 3 (bulion Muller Hinton) și Control 4 (bulion Muller Hinton + alcool de 80%), în care mediul a rămas steril (limpede).

Această metodă permite și aflarea valorii concentrației minime bactericide (CMB) a soluției alcoolice de mixoxantofilă testate. Pentru aceasta, din tubul la care s-a stabilit valoarea CMI și din tuburile anterioare, care prezintă concentrații superioare de mixoxantofilă, se prelevează 0,1 ml și se însământează pe suprafața unor plăci cu mediu solid. După incubare la 37°C timp de 18-24 de ore, a fost examinată dezvoltarea microorganismelor la diluția corespunzătoare.

Valoarea CMB reprezintă cea mai mică concentrație a soluției de mixoxantofilă, care reduce numărul coloniilor până la 99,9%, și a constituit 0,0208 mg/ml.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Kumar V., Bhatnagar A.K., Srivastava J.N. Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, v. 5(32), p. 7043-7048
2. Usharani G., Srinivasan, G. Sivasakthi, S.,Saranraj P. Antimicrobial Activity of Spirulina platensis Solvent Extracts Against Pathogenic Bacteria and Fungi. Advances in Biological Research, 2015, v. 9(5), p. 292-298

(57) Revendicări:

Utilizare a mixoxantofilei în concentrație de 0,0104 - 0,0416 mg/ml de soluție hidroetanolică de 80% în calitate de remediu antibacterian contra bacteriilor *Staphylococcus aureus*.