

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 utilizați la tratarea infecțiilor.

Este cunoscut că unele extracte brute metanolice și acetone 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 extractului 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 descreește 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, chloramfenicol) 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 informativă, 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-pozitive 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 câte 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 câte 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 izolatelor 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-pozitive, 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-etanolică 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/l).

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

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Pentru determinarea acțiunii antibacteriene a fost utilizată mixoxantofila, un pigment xantofilic, obținut din biomasa de *Spirulina platensis* conform procedurii descris în MD 4360 B1 2015.07.31. La 100 ml de biomasă 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 pâlnia 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 cotate 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, 0,0052 mg/ml, 0,0026 mg/ml, 0,0013 mg/ml, 0,00065 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 următoarele 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 însămânțează 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.