

## COMPUȘI NORLABDANICI BIOLOGIC ACTIVI. STUDIU COMPARATIV: TESTĂRILE *IN VITRO* VERSUS TESTUL DE ANDOCARE MOLECULARĂ

Lidia LUNGU, ORCID: 0000-0002-9495-2621

Alexandru CIOCĂRLAN, ORCID: 0000-0002-0776-5095

Svetlana BLAJA, ORCID: 0000-0002-4336-6809

Institutul de Chimie al USM, Chișinău, R Moldova

Nicoleta VORNICU, ORCID: 0000-0002-4025-2582

Centrul Mitropolitan de Cercetări T.A.B.O.R, Iași, România

Natalia BOLOCAN, ORCID: 0000-0002-1876-9091

USM, Chișinău, R Moldova

Aculina ARÎCU, ORCID: 0000-0001-7201-2519

Institutul de Chimie al USM, Chișinău, R Moldova

CZU: 547.596/.597.057

e-mail: lidia.lungu@ichem.md

e-mail: algeiocarlan@yahoo.com

e-mail: svetlana-blaja@mail.ru

e-mail: cmctaboriasi@yahoo.com

e-mail: natalia.bolocan@ichem.md

e-mail: aculina.aricu@gmail.com

*The results of this paper describe the comparative study of in vitro assays compared to the molecular docking assay of biologically active oxygenated norlabdane compounds and terpeno-heterocyclic hybrid compounds, obtained from (-)-sclareol, (+)-larixol and larixyl acetate. The in vitro antimicrobial activity of the obtained compounds was tested on five strains of fungi and two species of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results of the presented computational simulations correlate very well with the experimental outcome and highlight the three most active norlabdane compounds with heterocyclic fragment.*

**Cuvinte-cheie:** compuși norlabdanici, hibridi moleculari terpeno-heterociclici, activitate antibacteriană, andocare moleculară.

### INTRODUCERE

Compușii norlabdanici naturali și cei de sinteză manifestă multiple activități biologice, inclusiv cele antifungică și antibacteriană [1-3]. În prezent, rezistența la antibiotice devine una dintre principalele probleme ale medicinei moderne, iar o soluție pentru rezolvarea acesteia, ar fi elaborarea unor clase noi de antibiotice prin optimizarea sau combinarea lor cu compuși naturali biologic activi. Atât compușii norlabdanici cu funcționalizare avansată, cât și hibridii moleculari sunt considerați compatibili cu organismele superioare datorită originii naturale și a faptului, că au o toxicitate scăzută sau

ea lipsește în totalitate. A fost testată *in vitro* activitatea antifungică și antibacteriană a unor serii de compuși norlabdanici polifuncționalizați și hibridi moleculari cu fragmente semicarbazonice sau unități diazinice, oxadiazolice, tiadiazolice și triazolice prin metode omologate, accesibile și relevante.

În acest articol sunt descrise rezultatele studiului comparativ al testărilor *in vitro* și testului de andocare moleculară al celor mai activi compuși norlabdanici și al hibridilor terpeno-heterociclici din seriile obținute în bază de (-)-sclareol, (+)-larixol și acetat de larixil.

### MATERIAL ȘI METODĂ

Activitatea biologică a compușilor de sinteză a fost testată pe tulpini de funghi nepatogeni și fitopatogeni: *Aspergillus niger* (ATCC 53346), *A. flavus* (ATCC 20046), *Fusarium solani* (ATCC 20327), *Penicillium chrysogenum* (ATCC 20044), *P. frequentans* (ATCC 10110), *Alternaria alternata* (ATCC 8741), și specii de bacterii nepatogene: Gram-negative - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27813), și Gram-positive *Bacillus polymyxa* (ATCC 15970). Culturile pure de microorganisme au fost furnizate de American Type Culture Collection (ATCC, SUA). În calitate de compuși de referință pentru testarea activității antifungice și antibacteriene s-au folosit Caspofungina (strip test) și Kanamicina (strip test), ambele furnizate de firma Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italia).

Soluțiile compușilor de testat (de 2.0, 1.0 și 0.5%) au fost pregătite prin dizolvare în volume fixe de DMSO anhidru [4]. Determinările au fost realizate pe plăci Petri cu mediu de cultivare de tip agar Sabouraud cu dextroză (4%, SDA) pentru funghi și mediu agar nutritiv Standard I pentru bacterii, toate de la firma Merck (Schwalbach Hesse, Germania).

În studiu de andocare moleculară au fost utilizate patru modele proteice: ADN-girază din *Escherichia coli* (cod PDB: 1KZN), FabZ din *Pseudomonas aeruginosa* (cod PDB: 1U1Z), dihidrofolat reductază din *Candida albicans* (cod PDB: 3QLS) și MurB din *E. coli* (cod PDB: 2Q85). Structurile au fost pregătite conform protocolului, utilizând programul AutoDockTools 1.5.7 [5]: au fost îndepărtate moleculele de apă și liganzii nativi din structurile proteinelor, au fost adăugați hidrogeni polari și sarcinile Gasteiger. În protocolul de andocare, liganzii au fost tratați ca molecule flexibile și software-ul de andocare a fost lăsat să rotească toate legăturile rotabile ale liganzilor pentru a obține conformerul ligandului cu poziția optimă în situsul activ al enzimei. În fiecare caz, grila a fost construită și centrată corespunzător pentru a acoperi întreaga enzimă. Andocarea a fost efectuată utilizând procedura de rutină și parametrii implicați ai programului de andocare molecular Autodock Vina [6]. Din setul de conformații ale liganzilor obținuți prin procedura de andocare, pentru analiză ulterioară a fost selectată conformația cu cea mai mică energie de legare. Programul Discovery Studio Visualizer a fost utilizat pentru a cerceta interacțiunile hidrofobe și legăturile de hidrogen dintre liganzi și enzimele cercetate. Structurile în format 3D ale standardelor kanamicină și caspofungină au fost preluate din baza de date The Human Metabolome Database (hmdb.ca).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele acestei lucrări descriu un studiu comparativ a testărilor *in vitro* în comparație cu testul de andocare moleculară a compușilor norlabdanici oxigenați și a compușilor hibridi terpeno-heterociclici biologic activi. Au fost selectați 8 compuși ce au manifestat activitate antifungică și antibacteriană excelentă. Aceștea au fost clasificați în funcție de scheletul carbonic și grupările funcționale deținute. Primul grup include compuși de sinteză penta- **1** și **2**, și tetranorlabdanici **3/4** care conțin grupări acetat, hidroxi, iar în cazul lactonilor **3/4** o combinație de grupări funcționale (Figura 1).

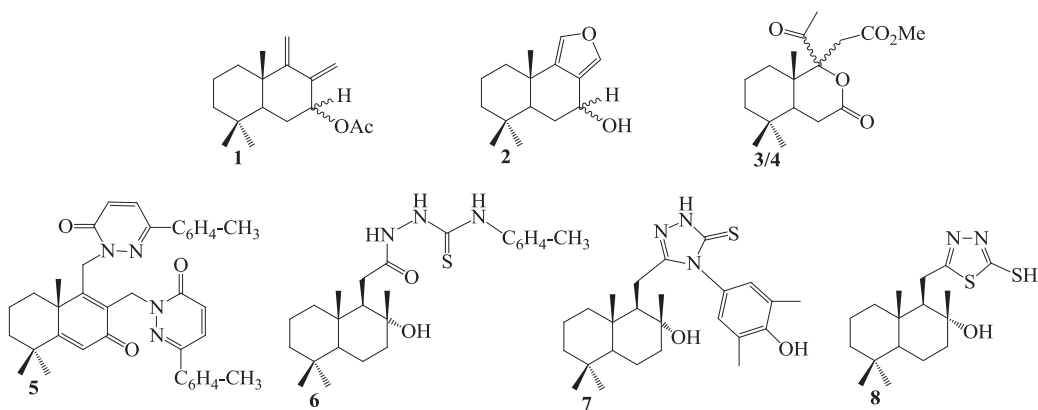


Fig. 1. Compuși norlabdanici cu proprietăți antimicrobiene înalte.

Valorile CMI ale compușilor din această serie (Tabel 1), relevă un efect antimicrobian bun al hidroxifuranului **2**, iar pentru compușii **1**, **3/4** unul excelent, în comparație cu compușii de referință. Conform acestor date, compușii **1** și **3/4** prezintă activitate antibacteriană de 66 și 62 de ori, respectiv, iar cea antifungică de 32 și 2 ori mai mare decât standardul, respectiv, iar 7-hidroxieurifuranul **2** este de ~ 4 ori mai activ [7, 8]

Tabel 1

### Rezultatele testării *in vitro* a activității antimicrobiene a compușilor 1-4.

Compus	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>1</b>	0.06	0.06	0.06	0.125	0.125
<b>2</b>	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0
<b>3/4</b>	0.064	0.064	0.064	2.0	2.0
Caspofungina	4.0	4.0	4.0	-	-
Kanamicina	-	-	-	4.0	4.0

Mult mai activi s-au dovedit a fi compușii hibridi terpeno-heterociclici cu unități diazinică **5** [9], hidrazincarbotioamidică **6**, triazolică **7** [10] și tiadiazolică **8** [11] valorile CMI ale cărora sunt prezentate în Tabelul 2 [9,10].

Tabel 2

**Rezultatele testării *in vitro* a activității antimicrobiene a compușilor 5-8.**

Compus	CMI (μg/mL)						
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Pseudomonas frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>5</b>	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.032	0.032
<b>6</b>	0.125	0.125	0.125	0.064	0.064	0.125	0.125
<b>7</b>	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.047	0.047
<b>8</b>	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.094	0.094
Casposfungina	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	-	-
Kanamicina	-	-	-	-	-	3.5	3.5

Aceștea depășesc de zeci de ori activitatea Casposfunginei și Kanamicinei, după cum urmează: compușii **5** (50/90 ori), **6** (2/62 ori), **7** (2.6/64 ori) și **8** (7.8/32 ori), respectiv. În baza datelor testărilor *in vitro* compușii pot fi aranjați în următoarele șiruri, în ordinea scăderii valorilor CMI ale acestora:

*activitate antifungală* **5 > 8 > 1 > 3/4 > 7 > 6 > 2**

*activitate antibacteriană* **5 > 7 > 8 > 6 > 1 > 2 > 3/4**

Pentru a explica mecanismele de inhibiție a microorganismelor prin interacțiunea intermoleculă ligand-receptor care definesc activitatea antimicrobiană a fost realizat un studiu de andocare moleculară comparativă a celor 8 compuși de sinteză cu activitate pronunțată pe 4 modele de proteine: ADN-giraza din *E. coli* (1KZN), Fabz din *P. aeruginosa* (1U1Z), dihidrofolat reductaza din *C. albicans* (3QLS) și MurB din *E. coli* (2Q85).

Energiile de legare a compușilor cercetați (Tabelul 3) sunt similare celor ale standardelor utilizate, iar în multe cazuri chiar le depășesc, demonstrând faptul, că aceștia se leagă eficient cu enzimele țintă contribuind la inhibiția lor. Rezultatele calculului computațional demonstrează faptul, că majoritatea compușilor au o afinitate mai mare de legare față de 1U1Z, sugerând ideea, că anume întreruperea biosintezei acizilor grași ar fi calea cea mai probabilă de acțiune a compușilor cercetați asupra patogenilor. Compusul **5** și casposfungina au arătat cea mai mare afinitate de legare de structura 3QLS, în

timp ce **2** și **8** s-au legat cel mai puternic de structura 2Q85. Kanamicina a demonstrat valori similare ale energiei de legare de structurile 3QLS și 2Q85, și anume -8,0 și -8,1 kcal/mol, respectiv.

Tabel 3

**Energia de legare a compușilor cercetați de enzimele țintă și valorile experimentale ale CMI (μg/mL).**

Compus cer- cetată	Energia de legare calculată (kcal/mol)				CMI (μg/mL) - conform tabe- lelor amintite în text
	<i>E. coli</i> ADN gi- raza, 1KZN	<i>P. aerugi- nosa</i> FabZ, 1U1Z	<i>C. albicans</i> di- hidrofolat re- ductaza, 3QLS	<i>E. coli</i> MurB, 2Q85	
<b>1</b>	-6.8	-7.7	-6.9	-6.7	0.06-0.125
<b>2</b>	-7.5	-7.7	-7.3	-8.1	0.9-1.0
<b>3</b>	-6.6	-7.7	-6.7	-7.1	0.064-2.0
<b>4</b>	-6.2	-7.7	-6.4	-6.4	0.064-2.0
<b>5</b>	-8.9	-8.8	-10.2	-8.4	0.005-0.032
<b>7</b>	-8.0	-10.0	-8.5	-7.7	0.047-0.094
<b>6</b>	-7.6	-9.7	-8.7	-7.4	0.064-0.125
<b>8</b>	-6.1	-6.3	-6.9	-7.3	0.032-0.094
Caspofungina	-6.1	-7.3	-7.7	-6.8	0.2-4.0
Kanamicina	-6.8	-8.0	-7.6	-8.1	

Pentru *E. coli* ADN girază (1KZN), șirul activității compușilor cercetați conform energiei de legare cu structura bacteriei este următorul:

**5 > 7 > 6 ≈ 2 > 1 = kanamicina > 3 > 4 ≈ 8 = caspofungina.** Vizualizarea detaliată a rezultatelor obținute arată, că toți compușii cercetați ocupă buzunarul proteic în același mod ca și standardele utilizate, caspofungina și kanamicina.

Pentru *Pseudomonas aeruginosa* FabZ (1U1Z), șirul activității compușilor cercetați conform energiei de legare cu structura bacteriei este următorul: **7 > 6 > 5 > kanamicina > 2 = 1 = 3/4 > caspofungina > 8.** Vizualizarea detaliată a rezultatelor obținute arată, că majoritatea compușilor cercetați ocupă buzunarul proteic în același mod ca și kanamicina. Compusul **5** se plasează în același buzunar cu caspofungina, iar compusul **8** se leagă în apropiere de caspofungină, însă în alt buzunar, cele două locații având proprietăți fizico-chimice diferite.

Pentru *C. albicans* dihidrofolat reductaza (3QLS), șirul activității compușilor cercetați conform energiei de legare cu structura bacteriei este următorul: **3 > kanamicina > 4 > 6 ≈ 7 > 8 > caspofungină = 5 > 2 > 1.** Vizualizarea detaliată a rezultatelor obținute arată, că structurile **3** și **4** ocupă buzunarul proteic în același mod ca și caspofungina, structurile **2**, **1** și **7** se leagă în buzunarul de legare a kanamicinei, iar structurile **5**, **6** și **8** ocupă un alt buzunar proteic.

Pentru *E. coli* MurB (2Q85), șirul activității compușilor cercetați conform energiei de legare cu structura bacteriei este următorul: **5** > **2** = kanamicină > **7** > **6** ≈ **8** > **3** > caspofungină ≈ **1** > **4**. Vizualizarea detaliată a rezultatelor obținute arată, că toate structurile compușilor sintetizați în afară de **2** se plasează în buzunarul proteic în același mod ca și caspofungina, iar kanamicina și compusul **2** ocupă două buzunare distincte.

Astfel, rezultatele simulărilor computaționale prezentate corelează foarte bine cu cele experimentale, fiind identificați corect cei mai activi trei compuși, și anume **5**, **7** și **6**. În același timp, astfel de simulări oferă o perspectivă mai cuprinzătoare asupra modului în care compușii se leagă de proteinele-țintă și acționează împotriva microorganismelor patogene, făcând posibilă, pe viitor, identificarea potențialilor compuși antimicrobieni înainte de a începe sinteza lor experimentală, prin testarea diverselor structuri moleculare și optimizarea proprietăților compușilor într-un mod mai rapid și mai eficient. Această abordare extrem de valoroasă poate duce la dezvoltarea de compuși antimicrobieni mai eficienți și mai siguri.

## CONCLUZII

A fost realizat un studiu comparativ a testărilor *in vitro* în comparație cu testul de andocare moleculară a compușilor norlabdanici oxigenați și a compușilor hibridi terpeno-heterociclici biologic activi. Activitatea antimicrobiană *in vitro* a compușilor de sinteză a fost testată pe cinci tulpini de fungi și două specii de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, iar andocare moleculară a fost realizată pe 8 structuri cu cea mai înaltă activitate antimicrobiană.

## Referințe:

1. JANSEN, B.J.M., DE GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. În: *Natural Product Reports*. 2004, nr. 21, 4, p. 449-477. ISSN 1478-6419.
2. FRAGA, B. Natural sesquiterpenoids. În: *Natural Product Reports*. 2013, nr. 30, p. 1226-1264. ISSN 1478-6419.
3. BARRERO, A. et al. Synthesis of biologically active drimanes and homodrimanes from (-)-sclareol. În: *Tetrahedron*. 1995, nr. 51, 27, pp. 7435-7450. ISSN 0040-4020.
4. Standard M02; Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. Clinical and Laboratory Standard Institute: Wayne, PA, USA, 2018, 13 p. [www.clsi.org](http://www.clsi.org)
5. MORRIS, G. M. et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. În: *Journal of Computational Chemistry*, 2009 nr. 30, 16, pp. 2785-91. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
6. TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithrea-

- ding. În: *Journal of computational chemistry*, 2010, nr. 31, pp. 455-461. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
7. VLAD, P. et al. Regio- and stereoselective synthesis of (+)-6-ketoeuryfuran, (+)-6-ketowinterin, and (-)-7-ketoeuryfuran from accessible labdane diterpenoids (+)-larixol and (-)-sclareol. În: *Tetrahedron*, 2013, nr. 69, 2, pp. 918-926. ISSN 0040-4020.
  8. CIOCARLAN, A. et al. Synthesis of polyfunctional drimanes from drim-7-,9(11)-diene and drim-8-en-7-one. În: *Synthetic Communications*. 2013, nr. 43, 22, pp. 3020–3033. ISSN 0039-7911.
  9. ARICU, A. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of new drimane sesquiterpenoids with azaheterocyclic units. În: *Medicinal Chemistry Research*. 2016, nr. 25, 10, pp. 2316–2323. ISSN 1054-2523.
  10. LUNGU, L. et al. Synthesis and evaluation of biological activity of homodrimane sesquiterpenoids bearing hydrazinecarbothioamide or 1,2,4-triazole unit. În: *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2019, nr. 55, pp. 716–724. ISSN 0009-3122.
  11. LUNGU, L. et al. Synthesis and evaluation of biological activity of homodrimane sesquiterpenoids bearing 1,3,4-oxadiazole or 1,3,4-thiadiazole units. În: *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2020, nr. 56, 5, pp. 578–585. ISSN 0009-3122.