

UPOREDNI PRIKAZ ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI SRODNIH Co(II)/ Cu(II) KOMPLEKSA

Sladjana Tanasković¹, Mirjana Antonijević-Nikolic², Branka Dražić¹

¹Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

²Visoka medicinska i poslovno-tehnološka škola strukovnih studija,
15000 Šabac, Srbija

e-mail:sladjana@pharmacy.bg.ac.rs

Rad primljen: 10.05.2017.

Prihvaćen za štampu: 15.06.2017.

Izvod

Cilj ovog rada je poređenje efikasnosti nekih analognih kompleksa Co(II) i Cu(II) na bakterijske vrste patogene za čoveka koje mogu kontaminirati povrće i voće u bilo kojoj fazi njegove proizvodnje. Kompleksi Cu (II) i Co (II) sa N, N', N'', N''' - tetrakis (2-piridilmetil) -1,4,8,11-tetraazaciklotetradekanom (tpmc) i različitim dodatnim ligandima su testirani na Gram (+) i Gram (-) bakterije i neke sojeve gljiva. Kao kontrolna grupa su testirane i proste soli Co(II) i Cu(II) koje su korišćene kao polazne supstance u sintezi kao i ligandi i rastvarači. Određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) koje sprečavaju rast mikroorganizama. Ispitivani kompleksi pokazuju umerenu aktivnost prema sojevima bakterija. Kompleksi Co(II) su pokazali generalno veću aktivnost u odnosu na Cu (II) analoge. Pod istim uslovima i u primenjenim istim koncentracijama kontrolne grupe nisu pokazale aktivnost. Nijedno jedinjenje nije ispoljilo antigljivično dejstvo.

Ključne reči: kompleksi, Co(II), Cu(II), antimikrobna aktivnost

UVOD

U ranije objavljenim radovima (Ključev, 2012) je ispitivano prisustvo i izvršena identifikacija patogenih bakterija u vodi za navodnjavanje sa različitih izvorišta, na povrću, proučavan prenos patogenih bakterija iz vode do biljke i praćena sposobnost patogenih bakterija da površinski i endofitno kolonizuju koren, stablo i list različitih biljaka. Neke od identifikovanih bakterija su kolonizovale koren biljke i preko vaskularnog sistema dospele do listova. Sve patogene bakterije su površinski i endofitno kolonizovale koren, stablo i list ispitivanih biljnih vrsta. Endofitne patogene bakterije su bile prisutne u citoplazmi biljne ćelije, mada mehanizam njihovog dospevanja nije razjašnjen. Brojni radovi ukazuju na upotrebu kompleksa prelaznih metala kao antibakterijskih, antigljivičnih, anti-HIV, antivirusnih jedinjenja. Kompleksi sa N-donornim ligandima (piridin, 1,10-fenantrolin, 2,2'-bipiridin, Schiff-ove baze i azamakrocikli), kao i sa α,ω -dikarboksilatima, halogenidima, aminokarboksilatima i njihovim derivatima pokazuju širok spektar antifungalne i antibakterijske aktivnosti *in vitro* (Dendrinou-Samara et al., 2001).

Brojne *in vivo* studije su pokazale da biološki aktivna jedinjenja postaju bakteriostatici i karcinostatici nakon helatacije (Chohan et al., 2006). *In vitro* testovima kompleksa Cu(II)/Co(II) sa N,N',N'',N'''-tetrakis(2-piridilmetil)-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekanom (tpmc) i dodatnim ligandima (alifatični/aromatični ili aminokarboksilati/njihovi derivati, halogenidi) je utvrđena aktivnost ovih jedinjenja prema nekim mikroorganizmima (Vučković i sar., 2005; 2009). U ovom radu je ispitana i poređena mikrobiološka aktivnost Co(II) i Cu(II) analognih kompleksa.

MATERIJAL I METOD RADA

Test antimikrobne aktivnosti kompleksa je izveden metodom difuzije u agar pločama (Turnidge, 2005). Skrining je izveden na 6 kultura mikroorganizama: a) Gram(+) bakterije *Micrococcus lisodeikticus* ATCC 4698 (M.L.) i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (S.A.), Gram(+) bakterija koja formira spore *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B.S.), Gram(-) bakterija *Escherichia coli* ATCC 25922 (E.C.); b) gljive: *Candida albicans* ATCC 24433 (C.A.) i *Aspergillus niger* ATCC 12066 (A.N.). Kompleksi prikazani u Tabeli 1 su pripremljeni u čvrstom stanju (Vučković i sar., 1990; 2007; 2008; 2009).

Tabela 1. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u $\mu\text{g/ml}$ kompleksa u DMSO za bakterije *Micrococcus lisodeikticus* (M.L.), *Staphylococcus aureus* (S.A.), *Bacillus subtilis* (B.S.), *Escherichia coli* (E.C.)

Br.	Kompleks	M.L.	S.A.	E.C.	B.S.
1.	$[\text{Cu}_2\text{F}(\text{tpmc})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{CH}_3\text{CN}$	400	200	200	200
2.	$[\text{Co}_2\text{F}_2\text{tpmc}](\text{BF}_4)_2 \cdot \text{CH}_3\text{CN}$	100	100	100	100
3.	$[\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{tpmc})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	400	400	400	400
4.	$[\text{Co}_2\text{Cl}_2(\text{tpmc})](\text{BF}_4)_2$	100	200	200	200
5.	$[\text{Cu}_2\text{Br}(\text{tpmc})](\text{ClO}_4)_3$	200	400	400	400
6.	$[\text{Co}_2\text{Br}_2\text{tpmc}](\text{BF}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50	100	400	100
7.	$[\text{Cu}_2\text{I}(\text{tpmc})](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	200	200	400	400
8.	$[\text{Co}_2\text{I}_2(\text{tpmc})](\text{BF}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50	100	100	100
9.	$[\text{Cu}_4(\text{succ})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	400	400	400	400
10.	$[\text{Co}_2(\text{succ})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50	400	400	200
11.	$[\text{Cu}_4(\text{glut})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200	400	>400	>400
12.	$[\text{Co}_2(\text{glut})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100	200	100	100
13.	$[\text{Cu}_4(\text{adip})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200	>400	>400	>400

14.	$[\text{Co}_2(\text{adip})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$	100	200	100	100
15.	$[\text{Cu}_2(\text{S-pheala})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	>400	>400	>400	>400
16.	$[\text{Co}_2(\text{S-pheala})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_3$	50	100	200	>400
17.	$[\text{Cu}_4(\text{tpht})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	>400	>400	>400	>400
18.	$[\text{Co}_2(\text{tpht})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100	100	>400	>400

Odgovarajući slobodni ligandi koji mogu biti prisutni u malim količinama usled disocijacije, perhlorati Cu(II)/Co(II), Na-tetrafluoroborat i rastvarači su testirani istovremeno radi boljeg razmatranja rezultata kao kontrola. Rastvor jedinjenja u dimetilsulfoksidu (DMSO) zapremine 100 μl (pri koncentraciji (c) od 1 mg/ml), aplikovan je u otvore na agar pločama. Mueller-Hinton agar je korišćen za kultivaciju bakterija i Sabouraud dekstrozni agar za gljive. Temperatura inkubacije je iznosila 37 °C za bakterije, i 28 °C za gljive. Nijedno od ispitivanih jedinjenja nije pokazalo antigljivičnu aktivnost. S toga je kvantitativni test izveden samo za bakterije. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) u $\mu\text{g/ml}$ (Ericsson and Sherris, 1971), kao najniža koncentracija koja suzbija rast bakterija detektovana je agar dilucionom metodom, posle inkubacije 24 h na 37 °C (Amsterdam, 1996). Rastvori kompleksnih jedinjenja su pripremljeni u DMSO. Agar ploče su pripremljene mešanjem rastvora ispitivanih jedinjenja (0,5 ml) u c = 8 - 0,125 mg/ml sa otopljenim i ohlađenim Mueller-Hinton agarom (9,5 ml). Na površini ploča zasejane su bakterije. Ista metoda je korišćena za jedinjenja primenjena u kontroli.

REZULTATI I DISKUSIJA

Veliki broj ispitivanih kompleksa Cu(II) imao je MIC jednak ili veći od 400 $\mu\text{g/ml}$ nezavisno od vrste bakterije, izuzev kompleksa 1, 5, 7, 11 i 13. Co (II) kompleksi su generalno aktivniji. Eksperimentalni rezultati su prikazani u Tabeli 1. Vrednosti MIC su u skladu sa umereno selektivnom antibakterijskom aktivnosti ispitivanih Co(II) kompleksa. Na ovu razliku u antimikrobnom dejstvu između kompleksa različitih metala graditelja utiče helatni efekat, naelektrisanje kompleksnog jona, broj centralnih metalnih jona po molekulu, priroda atoma N-donora, centralni jon metala, rastvorljivost, tip i dužina veze između metala i liganada itd. Rezultati ovog *in vitro* testa se mogu objasniti i relativnom stabilnošću kompleksa prema hidrolizi i/ili disocijaciji u primenjenom rastvaraču. Zahvaljujući vezivanju M(II) za tpmc, pored dodatnog liganda, koji hidrofobnom makrocikličnom šupljinom štiti metalni centar, on je manje dostupan za mikroorganizme.

Za razliku u aktivnosti Cu(II) u poređenju sa Co(II) odgovorno je nekoliko faktora: priroda centralnog atoma, broj metalnih centara po molekulu (Cu(II) kompleksi su i tetranuklearni dok su Co(II) uvek binuklearnih), različito ukupno naelektrisanje kompleksnog jona, kinetička nestabilnost Co(II) kompleksa prema

supstituciji dodatnih liganada prema OH⁻ jonu. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost primene Co(II) kompleksa kao antibakterijskih sredstava.

ZAKLJUČAK

Makrociklični kompleksi Cu(II) i Co(II) sa oktaazamakrociklom i dodatnim karboksilato i halogenido ligandima su ispitivani *in vitro* na antimikrobnu aktivnost prema bakterijama i gljivama. Na osnovu minimalnih inhibitornih koncentracija je utvrđena umerena aktivnost kompleksa i selektivnost prema bakterijama. Rastvori liganada, rastvarača i prostih soli su bili neaktivni, dok su Co(II) kompleksi aktivniji od Cu(II) analoga. Nijedno jedinjenje nije pokazalo antifungalnu aktivnost.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je pomognuta sredstvima Minisatrstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat br. 172014).

LITERATURA

- Amsterdam, D., (1996): Susceptibility Testing of Antimicrobial in Liquid Media in Antibiotics in Lab. Medicine, Lorian V., 4 Edition, W & W, Baltimore: 52-111.
- Chohan, Z. H., Arif, M., Akhtar, M. A., Supuran, C. T., (2006): Metal-Based Antibacterial and Antifungal Agents: Synthesis, Characterization, and *In Vitro* Biological Evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) Complexes with Amino Acid-Derived Compounds. *Bioinorganic Chemistry and Applications*: 1-13.
- Dendrinou-Samara, C., Psomas, G., Raptopoulou, C. P., Kessissoglou, D. P., (2001): Copper(II) complexes with phenoxyalkanoic acids and nitrogen donor heterocyclic ligands: structure and bioactivity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83: 7-16.
- Ericsson, H. M., Sherris, J. C., (1971): Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. Scand. Suppl.* 217: 3-90.
- Geraghty, M., Cronin, J. F., Devereux, M., McCann, M., (2000): Synthesis and antimicrobial activity of Cu(II) and Mn(II) α,ω -dicarboxylate complexes. *BioMetals*, 13: 1-8.
- Kljujev, I. (2012): Kontaminacija biljaka patogenim bakterijama iz vode za navodnjavanje. Poljoprivredni fakultet, Zemun, 134.
- Turnidge, J, Christiansen, K, (2005): Antibiotic use and resistance--proving the obvious. *Lancet*. 365(9459):548-549.
- Vučković, G., Asato, E., Matsumoto, N., Kida, S., (1990): Synthesis and characterization of novel binuclear copper(II) and nickel(II) complexes with N,N',N'',N'''-tetrakis(2-pyridylmethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (tpmc) containing various anions. X-ray analyses of [Cu₂F(tpmc)](ClO₄)₃·2CH₃CN and [Cu₂Cl(tpmc)](ClO₄)₃·2H₂O. *Inorganica Chimica Acta*, 171: 45-52.
- Vučković, G., Antonijević-Nikolić, M., Korabik, M., Mroziński, J., Manojlović, D. D., Gojgić-Cvijović, G., Matsumoto, N., (2005): Electrochem. and Antimicrobial Properties of Cu(II) Complexes with TPMC. *Polish Jour. of Chem.*, 79: 679-687.
- Vučković, G., Tanasković, S. B., Rychlewska, U., Radanović, D. D., Mroziński, J., Korabik, M., (2007): Preparation, characterization and X-ray analysis of [Co₂(Cl)₂tpmc](BF₄)₂.

- Comparative structural analysis with the complexes having analogous geometries and ligands. *Journal of Molecular Structure*, 827: 80–87.
- Vučković, G., Antonijević-Nikolić, M., Lis, T., Mroziński, J., Korabik, M., Radanović, D. D., (2008): X-ray analyses, spectroscopic and magnetic properties of $[\text{Cu}_4(\text{succinato})(\text{tpmc})_2](\text{ClO}_4)_6 \cdot 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Cu}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})\text{tpmc}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 0.5\text{CH}_3\text{OH} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ complexes. *Journal of Molecular Structure*, 872: 135-144.
- Vučković, G., Tanasković, S. B., Antonijević-Nikolić, M., Živković-Radovanović, V., Gojgić-Cvijović, G., (2009): A study of novel cobalt(II) octaazamacrocyclic complexes with aminocarboxylates or their derivatives. *Journal of Serbian Chemical Society*, 74: 629-640.

Abstract

COMPARISON OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF RELATED Co(II)/Cu(II) COMPLEXES

Sladana Tanasković¹, Mirjana Antonijević-Nikolić², Branka Dražić¹

¹Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450,
11000 Belgrade, Serbia

²Higher medical and business-technological school of professional studies,
Hajduk Veljkova 10, 15000 Šabac, Serbia
e-mail:sladjana@pharmacy.bg.ac.rs

The aim of this paper is to compare the efficiency of some analogue of Co (II) and Cu (II) complexes to bacteria pathogenic to humans, which can contaminate vegetables and fruit at any stage of its production. The complexes of Cu(II) and Co(II) with N, N', N'', N''' - tetrakis (2-pyridylmethyl) -1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (tpmc) and various additional ligands were tested against Gram (+) and Gram (-) bacteria and some strains of fungi. As a control group the free salts of Co(II) and Cu(II) which were used as starting substances in the synthesis, as well as ligands and solvents were tested. The minimum inhibition concentrations suppressing the visible growth of bacteria (MIC) were also screened. Investigated complexes showed a moderate activity against strains of bacteria. Complexes of Co(II) generally showed higher activity than Cu(II) analogues. Under the same conditions and the same concentrations, the control group showed no activity. No compound showed antifungal activity.

Key words: complexes, Co(II), Cu(II), antimicrobial activity