

## Acción antibacteriana de 2',4-disililchalcona y sus combinaciones binarias y ternarias con ácido nalidíxico y rutina frente a *Escherichia coli* ATCC 25 922

Juan Manuel Talia, Nora Beatriz Debattista, Carlos Eugenio Tonn, Nora Beatriz Pappano

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. 5700 San Luis. E-mail: jmtalia@unsl.edu.ar

**Introducción:** *Escherichia coli* es una bacteria patógena que está implicada en un gran número de enfermedades infecciosas. El uso indiscriminado de antibióticos ha contribuido a la aparición de resistencia bacteriana por presión selectiva. En la permanente búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos se ha derivatizado una chalcona sililada a partir de 2',4-dihidroxichalcona, flavonoide que presenta actividad antibacteriana frente al microorganismo Gram negativo, con el objeto de incrementar su acción [1]. Se ensayaron, además, combinaciones binarias y ternarias del nuevo compuesto, utilizando ácido nalidíxico (antimicrobiano de uso comercial) y rutina (flavonoide inactivo) con el fin de determinar la posible existencia de sinergismo [2].

### **Materiales y Método:**

**Compuestos utilizados:** 2',4-disililchalcona (2',4-DSC), derivatizada a partir de 2',4-dihidroxichalcona (2',4-DHC); ácido nalidíxico (AN) y rutina (Ru).

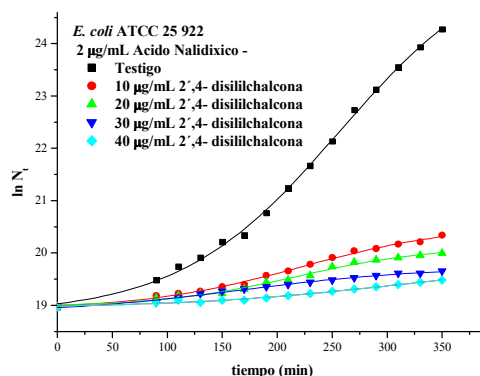
Derivatización de 2',4-DHC: la chalcona pura se colocó en un balón conteniendo un magneto, se tapó herméticamente el recipiente y se inyectó argón para lograr una atmósfera inerte permanente. Se adicionaron imidazol y diclorometano en cantidades adecuadas y por último tetrametilclorosilano. La mezcla se mantuvo con agitación permanente durante 24 h. La reacción se detuvo volcando la misma sobre una solución de cloruro de amonio al 15%. Se realizaron sucesivas extracciones con éter y el extracto se lavó con agua y solución saturada de cloruro de sodio. La fase etérea se secó con sulfato de amonio anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto se evidenció por cromatografía en placa fina y se identificó por RMN.

**Método cinético-turbidimétrico:** Para determinar cuantitativamente la sensibilidad de *E.coli* ATCC 25 922 frente a 2',4-DSC y el incremento de la actividad antibacteriana del compuesto cuando se utilizaron sus combinaciones binarias con AN (concentración constante: 2 µg/mL) y Ru (concentración constante: 20 µg/mL) y su combinación ternaria con AN (2 µg/mL) – Ru (20 µg/mL), se empleó un método cinético-turbidimétrico desarrollado previamente [1]. El contenido de un cultivo en agar inclinado de *E. coli* de 24 h fue transferido a un frasco Erlenmeyer conteniendo 30 mL de caldo Müller Hinton e incubado a 35° C durante 18 h, con agitación permanente. Se realizaron experiencias cinéticas de crecimiento microbiano en frascos Erlenmeyers conteniendo 100 mL de caldo Müller Hinton adicionados de concentraciones crecientes de 2',4-DSC, incorporando 2 mL del inóculo previamente preparado. Posteriormente, se incubaron en una cámara de cultivo Rosi 1000 (35 °C, 180 rpm), se extrajeron alícuotas a intervalos de 20 min durante 5 h y se leyeron las transmitancias a 720 nm, utilizando como blanco caldo Müller - Hinton. Para la determinación de sinergismo se realizaron experiencias similares pero agregando además una concentración constante de AN (2 µg/mL) o Ru (20 µg/mL) (combinaciones binarias) y su combinación ternaria con AN (2 µg/mL) – Ru (20 µg/mL). Con la siguiente ecuación:

$$\ln N_t = 27,1 - 8,56 \cdot T$$

donde  $N_t$ : u.f.c mL<sup>-1</sup> y T: transmitancia a 720 nm, se calcularon los valores de  $\ln N_t$  para obtener las curvas de crecimiento, para distintas concentraciones de AN aislado y en las combinaciones binarias y ternaria, respectivamente [2]. A modo de ejemplo se

ilustran a continuación las curvas de crecimiento de *E. coli* obtenidas en presencia de la combinación 2',4-DSCH variable – AN constante.



**Figura 1.** Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25 922 en presencia de 2',4-disililchalcona – ácido nalidíxico (2 µg.mL<sup>-1</sup>).

**Resultados:** De las pendientes de las correspondientes curvas de crecimiento del microorganismo, se evaluaron las velocidades específicas de crecimiento del germen en ausencia (testigo) y en presencia del compuesto sililado y sus combinaciones binarias y ternaria. Como se observa en la Fig 1., las pendientes de las curvas de crecimiento disminuyen notablemente a medida que se incrementa la concentración de 2',4-DSCH en el medio de cultivo. Los valores de velocidad específica y la aplicación de un mecanismo de acción permitieron calcular las correspondientes concentraciones inhibitorias mínimas que se informan en la siguiente Tabla:

Valores de concentración inhibitoria mínima para 2',4-disililchalcona frente a *E. coli* ATCC 25 922 y todas las combinaciones enyadadas.

Combinación	2',4-DSCH	2',4-DSCH-Ru	2',4-DSCH-AN	2',4-DSCH-AN-Ru
CIM (µg.mL <sup>-1</sup> )	66,8	61,2	47,9	41,0

**Conclusiones:** Los valores de concentración inhibitoria mínima obtenidos indican que, si bien, las combinaciones binarias mostraron sinergismo, la combinación ternaria fue la más eficaz con una CIM de 41,0 µg/mL. Estos resultados alientan a proseguir con la derivatización de chalconas dihidroxiladas antibacterianas para obtener compuestos con superior actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos patógenos.

#### Referencias:

- [1] Pappano NB, Centorbi OP, Ferretti FH, "DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA A PARTIR DE PARAMETROS CINETICOS DE CRECIMIENTO", Rev. Microbiol., TEC art Editora, San Pablo, Brasil, ISSN: 0001-3714, 21(2):183-188, 1990.
- [2] Alvarez MA, Debattista NB, Pappano NB. "ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND SYNERGISM OF SOME SUBSTITUTED FLAVONOIDS", Folia Microbiol. 53(1):23-28, 2008.