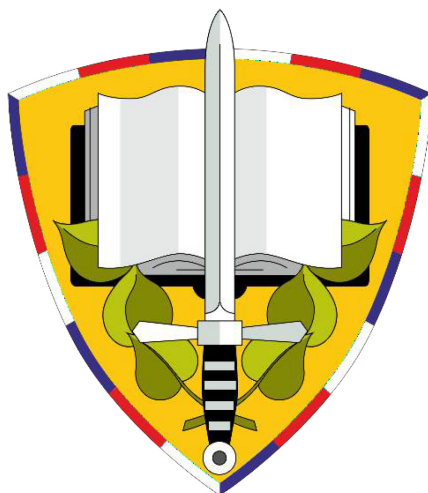


UNIVERZITA OBRANY V BRNĚ  
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ

**Doktorský studijní program: Lékařská mikrobiologie**



## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Název: Testování antimikrobiální účinnosti nově  
syntetizovaných látek**

Zpracoval: Mgr. Markéta Benková

Školitel: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2020

## Písemné zadání disertační práce

Mgr. Markéta PASDIOROVÁ

### Stanovení tématu disertační práce

Studentka: **Mgr. Markéta PASDIOROVÁ**

Stanovené téma disertační práce: **Testování antimikrobiální účinnosti nově syntetizovaných látek**

**Klíčová slova v ČJ (5-10):** antimikrobiální látky, minimální inhibiční koncentrace (MIC), minimální baktericidní/fungicidní koncentrace (MBC/MFC), dezinfekce

**Klíčová slova v AJ (5-10):** antimicrobial compounds, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC), disinfection

**Stručná anotace disertační práce v ČJ (v rozsahu 5 řádků):** V rámci disertační práce budou testovány nové látky nebo skupiny navzájem podobných látek s potenciálním dezinfekčním účinkem. Budou využity dostupné testovací metody na sbírkových i klinických kmenech. Účinnost látek bude porovnána s komerčně používanými dezinfekčními prostředky. Látky by v případě nadějněho účinku mohly být rovněž otestovány i jako potenciální dekontaminanty bakteriologických zbraní a mohly by se stát jednou ze složek dekontaminačních směsí používaných pro vojenské účely.

**Stručná anotace disertační práce v AJ (v rozsahu 5 řádků):** The aim of the thesis will be the evaluation of new compounds or groups of homologue compounds for their potential disinfection effect. The available methods of antimicrobial tests will be used for collected and clinical strains. The effectiveness of the substances will be compared with commercially used disinfectants. In the case of promising effect, the compounds could also be tested as a potential decontaminates against biological agents and could become one of the components of decontamination mixtures used in the army.

Stanovisko oborové rady:

**Souhlasím – nesouhlasím\*** se stanoveným tématem disertační práce.

26. 11. 2014  
.....  
datum

prof. MUDr. Roman Chlíbek, Ph. D.  
.....  
předseda oborové rady

Schvaluji.

27. XI. 2014  
.....  
datum

.....  
děkan

\*/ nehodící se škrtněte

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především svému školiteli PharmDr. Janu Markovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu celého mého postgraduálního studia.

Dále bych ráda vyjádřila upřímné poděkování svým kolegům jak z Centra biomedicínského výzkumu FN HK, tak i z Katedry epidemiologie FVZ UO, za velmi příjemnou atmosféru na pracovišti i mimo něj. Obzvláště bych chtěla poděkovat vedoucímu Centra biomedicínského výzkumu doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. za profesionální vedení našeho vědeckého týmu a za posun v mé vědecké kariéře. Rovněž děkuji své školitelce prof. Kristině Sepčič, Ph.D., dalším pracovníkům i studentům slovinské Biotechnologické fakulty Univerzity v Lublani za příjemnou a užitečnou zahraniční pracovní stáž.

Také děkuji paní Idě Dufkové z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK, která mi pomohla na začátcích mého postgraduálního studia a zasvětila mě do problematiky testování antimikrobiální účinnosti na jejich pracovišti, a rovněž Mgr. Michaele Hympanové, která se během svého studia podílela na několika výsledcích testování mikrodiluční bujónovou metodou v rámci své diplomové práce.

Velké poděkování patří mému manželovi PharmDr. Ondřeji Benkovi, Ph.D. a ostatním členům rodiny za podporu nejen během mého studia.

## **Poděkování grantové podpoře**

- Specifický vysokoškolský výzkum, MŠMT ČR (SV/FVZ201607) – projekt s názvem „Testování antimikrobiální účinnosti nově syntetizovaných látek jako potenciálních aktivních složek dekontaminačních směsí či dezinfekčních přípravků“ – hlavní řešitel, úspěšně obhájeno.
- Agentura pro zdravotnický výzkum, MZ ČR (15-31847A) – projekt s názvem „Vývoj nových dezinfekčních činidel proti patogenům vyskytujících se v nemocničním prostředí“ – člen týmu, úspěšně obhájeno.
- Agentura pro zdravotnický výzkum, MZ ČR (NV18-09-00181) – projekt s názvem “Vývoj polyvalentního dekontaminačního činidla” – člen týmu, projekt je v současné době řešen.

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a s použitím uvedené literatury. Dále prohlašuji, že tato disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 11.5.2020

Mgr. Markéta Benková

## **Abstrakt**

V disertační práci jsme se věnovali testování antimikrobiální účinnosti (proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím, kvasinkám i vláknitým houbám) nově syntetizovaných látek a sledování vztahu mezi jejich strukturou a právě antimikrobiální účinností. Tyto látky na bázi kvartérních amoniových solí s různými strukturálními obměnami byly připraveny v rámci spolupráce s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové na společném projektu Agentury pro zdravotnický výzkum.

První částí této práce byl výběr metodiky testování antimikrobiální účinnosti. K tomuto byla vybrána standardně používaná mikrodiluční bujónová metoda, která byla na pracovišti úspěšně zavedena.

Další fází bylo *in vitro* testování vybraných syntetizovaných látek proti několika bakteriálním a fungálním kmenům. Několik látek bylo hodnoceno i na inhibici růstu zelených mikrořas (z hlediska šetrnosti k životnímu prostředí). Dále proběhlo testování cytotoxického účinku na savčí buněčné linii pro posouzení, zda jsou látky vhodnější jako antiseptika nebo povrchové dezinfekce. Proti jednotlivým mikroorganismům bylo vždy nalezeno několik účinných látek.

Na základě výsledků výše zmíněných základních testování byly vybrány a nakombinovány nejúčinnější látky, ze kterých byly následně formulovány čtyři ve vodě rozpustné směsi se silně dezinfekčním a širokospektrým účinkem proti různým mikroorganismům. Následně byl proveden test kožní dráždivosti a kvantitativní suspenzní testy za daný expoziční čas. Směs 4, obsahující 12-C<sub>12</sub> a 18-C<sub>14</sub>, vykazala stejné nebo v několika případech lepší účinky než komerční přípravek Ajatin. Tato směs byla oproti Ajatinu účinnější proti viru varicella-zoster a byla méně dráždivá k lidské epidermis. Dle těchto výsledků bylo zhodnoceno, že směs 4 může být v budoucnu komerčně využita jako vysoce účinný dezinfekční přípravek.

## **Klíčová slova**

antimikrobiální látky, minimální inhibiční koncentrace (MIC), minimální baktericidní/fungicidní koncentrace (MBC/MFC), dezinfekce

## **Abstract**

In the dissertation thesis we dealt with the antimicrobial susceptibility testing (against gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts and filamentous fungi) of newly synthesized compounds and their structure-antimicrobial activity relationship monitoring. These compounds based on quaternary ammonium salts with various structural modifications were prepared in cooperation with the Department of Toxicology and Military Pharmacy of the Faculty of Military Health Sciences of the University of Defence and Biomedical Research Centre at the University Hospital Hradec Králové on a joint project of the Czech Health Research Council.

Selection of a methodology for antimicrobial susceptibility testing was the first part of the thesis. The microdilution broth method, which was successfully implemented at the department, was chosen for this purpose.

The *in vitro* testing of selected synthesized compounds against several bacterial and fungal strains was the next phase of the work. Several substances have also been evaluated for the green microalgae growth inhibition (in terms of environmental friendliness). In addition, cytotoxic effects were tested on mammalian cell line to assess whether the compounds were more suitable as antiseptics or surface disinfectants. Several substances active against individual microorganisms have been identified.

Based on the results of the above-mentioned primary tests, the most effective compounds were selected and consequently combined within four water-soluble mixtures with strong disinfectant and broad-spectrum activity against various microorganisms. Subsequently, a skin irritation test and quantitative suspension tests over a given exposure time were performed. Mixture 4, containing 12-C<sub>12</sub> and 18-C<sub>14</sub>, showed the same or in several cases better effects than the commercial detergent Ajatin. This mixture was more effective against varicella-zoster virus in comparison with Ajatin and less irritant to the human epidermis. Based on these results, it was assessed that the mixture 4 could be commercially used as a highly effective disinfectant in the future.

## **Keywords**

antimicrobial compounds, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC), disinfection

## Obsah

1	ÚVOD.....	21
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	22
2.1	Dekontaminace.....	22
2.1.1	Dekontaminační postupy a metody.....	24
2.1.2	Dekontaminační prostředky.....	26
2.1.3	Dekontaminační směsi v AČR a Integrovaném záchranném systému .....	26
2.2	Mikrobiální dekontaminace .....	27
2.3	Dezinfekce.....	31
2.3.1	Fyzikální způsob dezinfekce.....	33
2.3.2	Chemický způsob dezinfekce .....	33
2.3.3	Fyzikálně-chemický způsob dezinfekce .....	35
2.4	Sterilizace .....	36
2.4.1	Fyzikální metody sterilizace .....	37
2.4.2	Chemické metody sterilizace .....	38
2.5	Kvartérní amoniové soli.....	39
2.5.1	Chemická struktura .....	39
2.5.2	Mechanismus účinku .....	40
2.5.3	Antimikrobiální účinnost.....	42
2.5.4	Využití kvartérních amoniových solí.....	43
2.6	Testování antimikrobiální účinnosti.....	44
3	CÍLE PRÁCE .....	45
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	46
4.1	Testované látky .....	46
4.2	Testování antibakteriální účinnosti .....	49
4.2.1	Použitý materiál .....	49
4.2.2	Postup testování .....	51
4.3	Testování antifungální účinnosti .....	52
4.3.1	Použitý materiál .....	53
4.3.2	Postup testování .....	54
4.4	Testování inhibice růstu zelených řas .....	55



4.4.1	Použitý materiál .....	55
4.4.2	Postup testování .....	56
4.5	<i>In vitro</i> testování cytotoxicity .....	57
4.5.1	Použitý materiál .....	57
4.5.2	Postup testování .....	58
4.6	Formulace dezinfekčních směsí .....	59
4.6.1	Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s aerobními bakteriemi a kvasinkami.....	60
4.6.2	Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s kmeny <i>Clostridium difficile</i> a <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	63
4.6.3	Kvantitativní zkouška s použitím suspenze s virem varicella-zoster.....	65
4.6.4	Testování kožní dráždivosti .....	68
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	71
5.1	Testování antibakteriální účinnosti .....	71
5.2	Testování antifungální účinnosti .....	79
5.3	Testování inhibice růstu zelených řas .....	83
5.4	<i>In vitro</i> testování cytotoxicity a lipofilita .....	88
5.5	Formulace dezinfekčních směsí .....	92
5.5.1	Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s aerobními bakteriemi a kvasinkami.....	94
5.5.2	Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s kmeny <i>Clostridium difficile</i> a <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	96
5.5.3	Kvantitativní zkouška s použitím suspenze s virem varicella-zoster.....	98
5.5.4	Souhrn výsledků kvantitativních zkoušek .....	99
5.5.5	Testování kožní dráždivosti .....	101
6	ZÁVĚR.....	103
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	106
8	SEZNAM PŘÍLOH .....	117

## Seznam použitých zkratek

ACBA	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AČR	Armáda České republiky
ASNI	<i>Aspergillus niger</i>
ASVE	<i>Aspergillus versicolor</i>
ATCC	Americká sbírka typových kultur (z angl. American Type Culture Collection)
AUME	<i>Aureobasidium melanogenum</i>
AZV	Agentura pro zdravotnický výzkum
BAC	benzalkoniové soli
B-agens	biologická agens
BIDI	<i>Bisifusarium dimerum</i>
CAPA	<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>
CDKR	<i>Candida krusei</i>
CFU	jednotky tvořící kolonie
CHO-K1	ovariální buňky křečička čínského (z angl. Chinese hamster ovary)
Clog <i>P</i>	vypočítaný logaritmus rozdělovacího koeficientu (z angl. calculated decadic logarithm of partition coefficient in <i>n</i> -octanol/water system)
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur
CRNE	<i>Cryptococcus neoformans</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
ECACC	Evropská sbírka buněčných kultur (z angl. European Collection of Authenticated Cell Cultures)
ESCO	<i>Escherichia coli</i>
EXDE	<i>Exophiala dermatitidis</i>
G-	gramnegativní
G+	grampozitivní
IC <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% inhibici růstu
KAS	kvartérní amoniové soli
KLPN ES-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KLPN ES+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produkující širokospektré β-laktamázy

logP	rozdělovací koeficient
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MEA	Malt Extract agar
MEB	Malt Extract bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	met icilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98%
NC	negativní kontrola
NHLF	lidské plicní fibroblasty izolované z plicní tkáně pacientů bez diagnostikovaného astma, cystické fibrózy a chronické obstrukční plicní nemoci (z angl. Normal Human Lung Fibroblasts)
OD	optická denzita
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development)
PBS	fosfátový pufr (z angl. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
PC	pozitivní kontrola
PECH	<i>Penicillium chrysogenum</i>
PSAE MR	multirezistentní <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RHMU	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SEM	standardní chyba průměru (směrodatná odchylka)
STMA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
TCID <sub>50</sub>	50% infekční dávka pro tkáňovou kulturu (z angl. 50% Tissue Culture Infectious Dose)
TS	testovaná směs
VRE	vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus</i>
VZV	virus varicella-zoster
YEBE	<i>Yersinia bercovieri</i>

## Seznam obrázků

**Obrázek 1.** Obecná struktura kvartérních amoniových solí, str. 40.

**Obrázek 2.** Části molekuly kvartérních amoniových solí, str. 40.

**Obrázek 3.** Mechanismus působení KAS na bakteriální membrány, str. 41.

**Obrázek 4.** Rozdíly ve stavbě buněčných stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií, str. 42.

**Obrázek 5.** Při dosažení kritické micelární koncentrace monomery surfaktantu formují termodynamicky stabilní agregáty nazývané micely, str. 43.

**Obrázek 6.** Testování inhibice kvasinky *Aureobasidium melanogenum* (EXF-8432) látkou 4-C<sub>14</sub> na Malt Extract agaru; MIC = 30 μmol/l, str. 82.

**Obrázek 7.** Rychlost růstu řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* (počet buněk/ml) v přítomnosti jednotlivých látek a standardních benzalkoniových solí (BAC<sub>12-16</sub>) v porovnání s kontrolami (OECD médium bez DMSO a OECD médium s DMSO) měřená pomocí průtokového cytometru po 1, 2 a 3 dnech, str. 85.

**Obrázek 8.** Procentuální inhibice růstu zelených řas *Pseudokirchneriella subcapitata* po 72 hodinách, str. 86.

**Obrázek 9.** Normalizovaná inhibice růstu zelené řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* po 72 hodinách odvozená od procentuální inhibice, str. 87.

**Obrázek 10.** Redukce žluté tetrazoliové soli MTT mitochondriálními reduktázami dýchacího řetězce na fialový formazan, str. 88.

**Obrázek 11.** Závislost buněčné viability, resp. cytotoxického potenciálu připravených sloučenin a standardních látek BAC<sub>12-16</sub>, (vyjádřené jako log IC<sub>50</sub>) na lipofilitě látek (vyjádřené jako Clog *P*), str. 91.

**Obrázek 12.** Formulace dezinfekčních směsí (1–4) z nejúčinnějších látek (4-C<sub>16</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 13-C<sub>8</sub>, 17-C<sub>14</sub>, 17-C<sub>16</sub>, 18-C<sub>12</sub>, 18-C<sub>14</sub>) za účelem pokrytí celého spektra patogenů

(grampozitivní a gramnegativní bakterie, anaerobní bakterie *Clostridium difficile*, virus varicella-zoster, kvasinky, vláknité houby), str. 93.

**Obrázek 13.** Relativní buněčná viabilita (vyjádřena v %) po expozici testovaných směsí (1–4) o koncentracích 0,1 % na kožní inserty. NC – negativní kontrola (fosfátový pufr), PC – pozitivní kontrola (5% dodecylsíran sodný), Ajatin – standardní dezinfekční prostředek pro porovnání výsledků; n = 2, str. 102.

**Obrázek 14.** Posloupnost práce na daném tématu: 1) syntéza, 2) biologické stanovení (*in vitro* antibakteriální, antifungální a virucidní testování, hodnocení cytotoxického potenciálu), 3) sledování vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, 4) formulace dezinfekčních směsí, 5) testování kožní dráždivosti vytvořených směsí, str. 104.

## Seznam tabulek

**Tabulka 1.** Parametry vybraných dekontaminačních směsí EDS a HVĚZDA S.C.H. používaných v AČR, str. 27.

**Tabulka 2.** Parametry dezinfekčních roztoků Persteril 36% a Persteril 15% používaných v Hasičských záchranných sborech ČR, str. 27.

**Tabulka 3.** Nově syntetizované látky, jejich struktury a označení, str. 47.

**Tabulka 4.** Minimální (MIC; 24/48hodinová inkubace) a baktericidní (MBC; 48 hodinová inkubace) koncentrace (vyjádřena v  $\mu\text{mol/l}$ ) připravených látek (série 1–18) a standardních benzalkoniových solí ( $\text{BAC}_{12-16}$ ). *In vitro* aktivita byla stanovena na třech gram pozitivních bakteriálních kmenech (*Staphylococcus aureus*, meticilin-rezistentní *S. aureus*, vankomycin-rezistentní *Enterococcus*), str. 71.

**Tabulka 5.** Minimální (MIC; 24/48hodinová inkubace) a baktericidní (MBC; 48hodinová inkubace) koncentrace (vyjádřena v  $\mu\text{mol/l}$ ) připravených látek (série 1–18) a standardních benzalkoniových solí ( $\text{BAC}_{12-16}$ ). *In vitro* aktivita byla stanovena na sedmi gramnegativních bakteriálních kmenech (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy, multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia bercovieri*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*), str. 74.

**Tabulka 6.** Minimální inhibiční koncentrace (MIC; v  $\mu\text{mol/l}$ ) nasyntetizovaných látek a benzalkoniových solí ( $\text{BAC}_{12-16}$ ). *In vitro* aktivita byla stanovena na čtyřech kmech kvasinek (*Candida parapsilosis sensu stricto*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Exophiala dermatitidis*, *Aureobasidium melanogenum*) a čtyřech kmech vláknitých hub (*Bisifusarium dimerum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*). Inkubační doba byla 72 hodin (kvasinky)/168 hodin (vláknité houby), str. 80.

**Tabulka 7.** Cytotoxický potenciál a Clog *P* připravených sloučenin a *N*- benzalkoniových solí ( $\text{BAC}_{12-16}$ ). *In vitro* aktivita je vyjádřena jako  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{mol/l}$ )  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ), str. 89.

**Tabulka 8.** Testování 0,1% směsí (1–4), 0,1% Ajatinu a kontroly proti kmenu *Clostridium difficile* po expozičním čase 5 a 10 minut, str. 97.

**Tabulka 9.** Testování 0,1% směsí (1–4), 0,1% Ajatinu a kontroly proti kmeni *Aspergillus fumigatus* po expozičním čase 5 minut, str. 98.

**Tabulka 10.** Výsledky testování 0,1% směsí 1–4 proti obalenému viru varicella-zoster vyjádřených v lg TCID<sub>50</sub> za expoziční čas 0 a 5 minut, str. 99.

**Tabulka 11.** Fotky nárůstu negativních kontrol, účinností pozitivní kontroly Ajatinu a testovaných směsí 2 či 4 o koncentracích 0,1 % vůči různým mikroorganismům (\*podtržení značí, o který mikroorganismus se zrovna jedná) testovaných pomocí kvantitativních expozičních testů, str. 100.

## SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ

### Publikace vzniklé v rámci disertační práce

Soukup O.<sup>#</sup>, **Benková M.**<sup>#</sup>, Doležal R., Sleha R., Maliňák D., Salajková Š., Marková A., Hympanová M., Prchal L., Ryšková L., Hobzová L., Sepčíč K., Gunde-Cimerman N., Korábečný J., Jun D., Boštíková V., Boštík P., Marek J.: The wide-spectrum antimicrobial effect of novel *N*-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, in press. IF<sub>(2018/2019)</sub> 4,833

<sup>#</sup>Sdílení prvoautoři.

**Benková M.**, Soukup O., Marek J.: Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*. 2020, in press. IF<sub>(2018/2019)</sub> 2,683

Salajková Š., **Benková M.**, Marek J., Sleha R., Prchal L., Maliňák D., Doležal R., Sepčíč K., Gunde-Cimerman N., Kuča K., Soukup O.: Wide-antimicrobial spectrum of picolinium salts. *Molecules*. 2020, **25**, in press. IF<sub>(2018/2019)</sub> 3,060

**Benková M.**, Soukup O., Prchal L., Sleha R., Eleršek T., Novák M., Sepčíč K., Gunde-Cimerman N., Doležal R., Boštíková V., Boštík P., Marek J.: Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained *N*-Alkylammonium Salts. *ChemistrySelect*. 2019, **4**(41), 12076-12084. IF<sub>(2018/2019)</sub> 1,716

Salajková Š., Šrámek M., Maliňák D., Havel F., Musílek K., **Benková M.**, Soukup O., Vašicová P., Prchal L., Doležal R., Hodný Z., Bártek J., Žárská M., Kuča K.: Highly hydrophilic cationic gold nanorods stabilized by novel quaternary ammonium surfactant with negligible cytotoxicity. *Journal of biophotonics*. 2019, **12**(12), e201900024. IF<sub>(2018/2019)</sub> 3,763



Marek J., Maliňák D., Doležal R., Soukup O., **Benková M.**, Nachtigal P., Vávra P., Kuča K.: Novel Series of Quaternary Ammonium Surfactants Based on 2,3-Dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-ol Ring: Synthesis, Analysis and Antimicrobial Evaluation. *Letters in Organic Chemistry*. 2018, **15**(1), 3-9. IF<sub>(2018)</sub> 0,723

Marek J., Josková V., Doležal R., Soukup O., **Benková M.**, Fučíková A., Maliňák D., Boštíková V., Kuča K.: Synthesis, antimicrobial effect and surface properties of hydroxymethyl-substituted pyridinium salts. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2018, **15**(8), 828-842. IF<sub>(2018)</sub> 0,953

Doležal R., Soukup O., Maliňák D., Savedra M. L. R., Marek J., Doležalová M., **Pasdiorová M.**, Salajková Š., Korábečný J., Honegr J., Ramalho C. T., Kuča K.: Towards understanding the mechanism of action of antibacterial *N*-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, **121**, 699-711. IF<sub>(2016)</sub> 4,519

Soukup O., Doležal R., Maliňák D., Marek J., Salajková Š., **Pasdiorová M.**, Honegr J., Korábečný J., Nachtigal P., Nachon F., Jun D., Kuča K.: Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2016, **24**(4), 841-848. IF<sub>(2016)</sub> 2,93

Marek J., Maliňák D., Doležal R., Soukup O., **Pasdiorová M.**, Doležal M., Kuča K.: Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules*. 2015, **20**(3), 3681-3696. IF<sub>(2015)</sub> 2,465

## Publikace vzniklé nad rámec disertační práce

Chalupová K., Korábečný J., Bartolini M., Monti B., Lamba D., Caliandro R., Pesaresi A., Brazzolotto X., Gastellier A. J., Nachon F., Pejchal J., Jarošová M., Hepnarová V., Jun D., Hrabínová M., Doležal R., Karasová J. Z., Mžik M., Křištofiková Z., Misík J., Múčková L., Jošt P., Soukup O., **Benková M.**, Setnička V., Habartová L., Chvojková M., Kletečková L., Valeš K., Mezeiová E., Uliassi E., Vališ M., Nepovimová E., Bolognesi M. L., Kuča K.: Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019, **168**, 491-514. IF<sub>(2018/2019)</sub> 4,833

Honegr J., Doležal R., Maliňák D., **Benková M.**, Soukup O., de Almeida J. S., Franca T. C. C., Kuča K., Prymula R.: Rational Design of a New Class of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Tryptamine Related Agonists by Means of the Structure- and Ligand-Based Virtual Screening for Vaccine Adjuvant Discovery. *Molecules*. 2018, **23**(1), 102. IF<sub>(2018)</sub> 3,060

Honegr J., Maliňák D., Doležal R., Soukup O., **Benková M.**, Hroch L., Benek O., Janočková J., Kuča K., Prymula R.: Rational design of novel TLR4 ligands by *in silico* screening and their functional and structural characterization *in vitro*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **146**, 38-46. IF<sub>(2018)</sub> 4,833

Lenčo J., Vajrychová M., Pimková K., Prokšová M., **Benková M.**, Klimentová J., Tambor V., Soukup O.: Conventional-Flow Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Exploratory Bottom-Up Proteomic Analyses. *Analytical Chemistry*. 2018, **90**(8), 5381-5389. IF<sub>(2018)</sub> 6,350

Janočková J., Doležal R., Nepovimová E., Kobrlová T., **Benková M.**, Kuča K., Konečný J., Mezeiová E., Melíková M., Hepnarová V., Ring A., Soukup O., Korábečný J.: Investigation of new orexin 2 receptor modulators using *in silico* and *in vitro* methods. *Molecules*. 2018, **23**(11), 2926. IF<sub>(2018)</sub> 3,060

Wieckowska A., Wichur T., Godyn J., Bucki A., Marcinkowska M., Siwek A., Wieckowski K., Zareba P., Knez D., Gluch-Lutwin M., Kazek G., Latacz G., Mika K., Kolaczowski M., Korábečný J., Soukup O., **Benková M.**, Kiec-Kononowicz K., Gobec S., Malawska B.: Novel multitarget-directed ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018, **9**(5), 1195-1214. IF<sub>(2018)</sub> 3,861

Zorbaz T., Maliňák D., Marakovic N., Hrvat N., Zandona A., Novotný M., Skarka A., Andrýs R., **Benková M.**, Soukup O., Katalinic M., Kuča K., Kovarik Z., Musílek K.: Pyridinium oximes with ortho-positioned chlorine moiety exhibit improved physicochemical properties and efficient reactivation of human Acetylcholinesterase inhibited by several nerve agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **61**(23), 10753-10766. IF<sub>(2018)</sub> 6,054

Benek O., Hroch L., Aitken L., Doležal R., Hughes R., Guest P., **Benková M.**, Soukup O., Musil K., Kuča K., Smith T., Gunn-Moore F., Musílek K.: 6- Benzothiazolyl ureas, thioureas and guanidines are potent inhibitors of ABAD/17 beta-HSD10 and potential drugs for Alzheimer's disease treatment: Design, synthesis and *in vitro* evaluation. *Medicinal Chemistry*. 2017, **13**(4), 345-358. IF<sub>(2017)</sub> 2,631

Němeček J., Sychra P., Macháček M., **Benková M.**, Karabanovich G., Konečná K., Kavková V., Stolaříková J., Hrabálek A., Vávrová K., Soukup O., Roh J., Klimešová V.: Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, **130**, 419- 432. IF<sub>(2017)</sub> 4,816

Nepovimová E., Korábečný J., Doležal R., Nguyen T. D., Jun D., Soukup O., **Pasdiorová M.**, Jošt P., Múčková L., Maliňák D., Górecki L., Musílek K., Kuča K.: A 7-methoxytacrine-4-pyridinealdoxime hybrid as a novel prophylactic agent with reactivation properties in organophosphate intoxication. *Toxicology Research*. 2016, **5**(4), 1012-1016. IF<sub>(2016)</sub> 1,969

Benek O., Soukup O., **Pasdiorová M.**, Hroch L., Šepsová V., Jošt P., Hrabínová M., Jun D., Kuča K., Zala D., Ramsay R. R., Marco-Contelles J., Musílek K.: Design, Synthesis and *in vitro* Evaluation of Indolotacrine Analogues as Multitarget-Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ChemMedChem*. 2016, **11**(12), 1264-1269. IF<sub>(2016)</sub> 3,225

Boštíková V., **Pasdiorová M.**, Marek J., Prášil P., Salavec M., Sleha R., Střítecká H., Blažek P., Hanovcová I., Šošovičková R., Šplíňo M., Smetana J., Chlíbek R., Hytych V., Kuča K., Boštík P.: Biologické faktory ovlivňující vybrané infekční nemoci přenášené invazivními druhy komárů. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2016, **22**(2), 75-85. Časopis je indexován a excerptován v databázích Medline/Index Medicus, Embase/Excerpta Medica Database a Scopus.

Boštíková V., Kuča K., Blažek P., Sleha R., **Pasdiorová M.**, Marek J., Střítecká H., Hytych V., Boštík P. Zika virus – a review. *Military Medical Science Letters*. 2016, **85**(3), 94-103. Recenzované neimpaktované periodikum indexováno v databázi Embase a Scopus.

Boštíková V., Hobzová L., **Pasdiorová M.**, Marek J., Prášil P., Salavec M., Sleha R., Kuča K., Boštík P.: Současné možnosti prevence proti nově hrožícím komáry přenášeným importovaným infekčním nákazám. *Vakcinologie*. 2016, **10**(2), 85-88. Recenzované neimpaktované periodikum indexováno v databázi Embase a Scopus.

Boštíková V., Kuča K., Sleha R., **Pasdiorová M.**, Marek J., Boštík P.: Potřeba vakcíny proti Zika viru pro těhotné ženy. *Vakcinologie*. 2016, **10**(2), 91-95. Recenzované neimpaktované periodikum indexováno v databázi Embase a Scopus.

Karabanovich G., Roh J., Soukup O., Pávková I., **Pasdiorová M.**, Tambor V., Stolaříková J., Vejsová M., Vávrová K., Klimešová V., Hrabálek A.: Tetrazole regioisomers in the development of nitro group-containing antitubercular agents. *MedChemComm*. 2015, **6**(1), 174-181. IF<sub>(2015)</sub> 2,319

# 1 ÚVOD

Při dlouhodobém a zrychlujícím se trendu výskytu rezistencí mikroorganismů na antimikrobiální látky je stále nutné připravovat a testovat látky nové. Jedná se o celosvětový problém související s nadužíváním antibiotik u lidí, zvyšujícím se užíváním antibiotik v potravinářském průmyslu a nedostatkem specifických léčiv pro rizikové pacienty trpící více onemocněními současně (1, 2).

Jednou z několika možností je obměna struktur již známých antimikrobiálních látek, v našem případě kvartérních amoniových solí, a tím potenciálně zvýšit účinnost daných látek vůči mikroorganismům. Existují strukturně specifické kvartérní amoniové soli, které svými vlastnostmi řadíme do skupiny povrchově aktivních látek. V praxi jsou mnohé z nich používány jako účinné složky dezinfekčních přípravků (3). Přestože jsou kvartérní amoniové soli známé již od roku 1890 (4), dodnes jsou z důvodu nízké toxicity, minimální rezistence a dobré antimikrobiální účinnosti syntetizovány a publikovány stále nové struktury společně s jejich biologickým hodnocením (5-8).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Dekontaminace

Důvodem provádění dekontaminace je kontaminace, dříve též nazývaná zamoření. **Kontaminace** vzniká znečištěním osob, zvířat, rostlin, předmětů, prostoru či prostředí škodlivými látkami. Může k ní dojít při haváriích s únikem nebezpečných látek, při výskytu infekčních onemocnění a nálezů a při požárech. Při teroristických útocích mohou být použity všechny způsoby kontaminace. Forma kontaminace se rozděluje na vnější a vnitřní. V případě vnější formy se jedná o kontaminaci povrchu lidského těla, zvířat, rostlin nebo předmětů. Vnitřní forma kontaminace se projevuje proniknutím kontaminantu do vnitřních vrstev těla vdechnutím (inhalací), požitím (ingescí) či prostupem kůží (inokulací). Rozhodujícím faktorem pro průnik kontaminantu je v případě chemických a radioaktivních látek povrch materiálu a vlastnosti mikroorganismů a jejich toxinů u biologických látek (9).

**Dekontaminace** (dříve nazývaná speciální očištěním) je soubor opatření, při kterých se odstraňují nebo zneškodňují toxické chemické látky, biologické látky (mikroorganismy) nebo radioaktivní látky z povrchu těla osob, výzbroje a jiného materiálu, objektů či terénu pomocí dekontaminačních látek tak, aby s nimi bylo možné dále bezpečně manipulovat. Cílem je snížení ztrát a zkrácení doby používání ochranných prostředků. Z hlediska použitých dekontaminačních látek a postupů se dekontaminace dělí na dezaktivaci, detoxikaci (odmořování) a dezinfekci. Z operačního hlediska dle Českého obranného standardu se dělí na okamžitou, částečnou a úplnou. Z hlediska dekontaminačního postupu se skládá z hrubé očištění, vlastní dekontaminace dekontaminační směsí a zpravidla i následného oplachu nekontaminovanou vodou. Tato rozdělení jsou rozebrána níže. Zvláštní případ dekontaminace je dekontaminace, která umožňuje uvedení techniky do mírového používání tak, aby splňovala hygienické normy (AAP-21) (10).

### **Rozdělení dle typu dekontaminační látky a postupů:**

- **Dezaktivace** – jedná se o odstraňování radioaktivních látek z povrchů osob, výzbroje a jiného materiálu, objektů a terénu pomocí dezaktivčních směsí tak, aby jejich kontaminované části mohly být znovu využity, popř. odstraněny jako neradioaktivní odpad. Dezaktivční procesy zpravidla produkují sekundární odpady, které také musí být brány v potaz a musí být ošetřeny. Tato dekontaminace je prospěšná, pokud je hodnota obnoveného objektu nebo jeho získaná výhoda vyšší než poplatek za dekontaminační proces, transport a likvidaci produkovaného sekundárního odpadu. Také musí být bráno v úvahu vystavení operátérů podílejících se na dekontaminačních operacích (11).
- **Detoxikace (odmořování)** - chemický rozklad toxických chemických látek nebo jejich mechanické odstraňování z kontaminovaných povrchů, které vede ke snížení kontaminace na fyziologicky únosnou míru.
- **Dezinfekce** - zneškodnění nebo odstranění patogenních mikroorganismů a jejich toxických produktů z kontaminovaných povrchů. Dezinfekce, resp. mikrobiální dekontaminace, je rozebrána podrobněji níže.

### **Dle operačního hlediska Českého obranného standardu:**

- **Okamžitá dekontaminace** – provádí ji jednotlivec ihned po zasažení toxickými látkami zpravidla pomocí individuálního protichemického balíčku. Cílem je záchrana života a zmenšení následků kontaminace. Do okamžité dekontaminace může být zahrnuta rovněž dekontaminace výzbroje a výstroje.
- **Částečná dekontaminace** – uskutečňuje ji jednotlivec nebo jednotka s omezením na pracoviště, určité části výzbroje či jiného materiálu. Cílem je co největší omezení styku se škodlivinou a zabránění jejímu šíření tak, aby se dalo pokračovat v bojové činnosti. Také může zahrnovat dekontaminaci materiálu, jednotlivců nad rámec okamžité

dekontaminace, zásob nezbytných pro splnění daného úkolu a omezených úseků terénu.

- **Úplná dekontaminace** – provádí ji jednotka buď vlastními silami a prostředky, nebo s podporou jiné jednotky. Cílem je dekontaminace celého objektu pro dosažení bezpečné koncentrace kontaminantu z pohledu kontaktního i inhalačního působení, umožnění částečného nebo úplného sejmutí prostředků individuální ochrany a pokračování v bojové činnosti s co nejmenším zdržením. Zde může být zahrnuta i dekontaminace terénu (10).

Podle definic o okamžité a částečné dekontaminaci nelze zcela jasně vyvodit hranici mezi těmito dvěma dekontaminačními postupy (12). Navíc slovo „částečná“ může u některých lidí vyvolávat dojem, že se jedná spíše o neúplnou, nedokonalou či málo účinnou dekontaminaci (13). Český obranný standard sice zavazuje všechny příslušníky Armády ČR (AČR) k používání těchto pojmů ve všech nových dokumentech a publikacích, můžeme se ale v novější vojenské literatuře pro okamžitou a částečnou dekontaminaci setkat také s jinými pojmy, např. s „primární“ či „prvotní dekontaminací“ (13, 14). V některých dokumentech AČR se rovněž používá pojem „prvotní individuální dekontaminace“ (15).

K vyloučení pojmových nesrovnalostí je pro potřeby Hasičského záchranného sboru ČR a pro účely tohoto sdělení používán pojem „individuální dekontaminace“. Tímto je myšlen postup dekontaminace kontaminovaných částí povrchu těla, prostředků individuální ochrany a věcných prostředků ihned po kontaminaci, který se provádí svépomocí nebo s pomocí dalších osob s využitím předepsaných nebo improvizovaných prostředků (16). Z pohledu Armády ČR se pak jedná o činnost zahrnující jak okamžitou, tak i částečnou dekontaminaci (10, 17).

### **2.1.1 Dekontaminační postupy a metody**

Dekontaminační postup je sled po sobě jdoucích operací zahrnující hrubou očistu, aplikaci dekontaminační směsi a zpravidla závěrečný oplach nekontaminovanou vodou,



popř. i další operace. Cílem je dosažení co nejnižší přípustné zbytkové kontaminace dekontaminovaného objektu. Dekontaminační postup je charakterizován dekontaminační směsí, tlakem a teplotou vody, použitou součástí dekontaminační techniky (proudnice, tryska, oplachový rám). Dekontaminační směs je pak charakterizována typem, její spotřebou, teplotou, plošnou hustotou jejího nánosu na dekontaminovaný povrch, dobou jejího působení a způsobem její aplikace (10).

#### **Metody provádění dekontaminace:**

- **fyzikální** – smývání nebo otírání (organickými rozpouštědly, vodnými roztoky tenzidů), odpařování, sorpce
- **chemické** – reakcí vhodného činidla s kontaminantem dochází k celkovému rozložení látky nebo přeměně molekulární struktury toxické látky na její méně toxické či netoxické produkty pomocí oxidace, hydrolýzy, fotochemické reakce a nukleofilní substituce
- **mechanické** – vytřepávání, vyklepávání, vysávání, kartáčování (9, 18, 19).

#### **Dle forem provedení dekontaminace:**

- **suchý způsob** – prováděn hlavně mechanickými dekontaminačními metodami a svlečením kontaminovaného oděvu, nezávislý na vodních zdrojích a teplotě, většinou na něj navazuje mokřý způsob z důvodu nedostatečné účinnosti suchého způsobu
- **polosuchý způsob** – prováděn pomocí suchých pěn vznikajících v generátoru pěn ve spojení s tlakovou láhví (při použití čistých plynů) a vysokotlakým kompresorem
- **mokřý způsob** – převažuje při provádění dekontaminace jednotkami požární ochrany hlavně v kombinaci mechanické a chemické metody dekontaminace pomocí vodných i nevodných roztoků a směsí, těžkých pěn, vodních par, postřiků a smývání za použití sprch, postřikových rámu, proudnic s i bez kartáčů; kontaminovaná odpadní voda se musí ekologicky zlikvidovat (18, 19).

### 2.1.2 Dekontaminační prostředky

Dekontaminační prostředek je technický prostředek, který umožňuje provedení dekontaminace i rozměrné vojenské techniky a materiálu, objektů a terénu, a jedná se o prostředky rozdělené podle charakteru na:

- **osobní** – dekontaminační soupravy (protichemický balíček jednotlivce IPB-80 obsahující sorbent DESPRACH (13), zdravotnický prostředek jednotlivce ZPJ-80 také se sorbentem DESPRACH, dekontaminační rukavice ZNOTECTOR firmy Chemcomex Praha (15)
- **ruční a přenosné technické prostředky** - rozstříkovače, malé dekontaminační agregáty
- **dekontaminační vozidla** – ACHR-90 (10).

### 2.1.3 Dekontaminační směsi v AČR a Integrovaném záchranném systému

Dekontaminační směs je směs látek daného složení určená pro dekontaminaci. Směs je složena z vody, organických rozpouštědel a dezaktivacích, detoxikačních či dezinfekčních látek. Může se skládat také i z jiných přísad, např. ze solí, pěnotvorných látek nebo makromolekulárních látek. Směsi se liší způsobem aplikace, složením (% hmotnostní jednotky), teplotním intervalem využitelnosti (°C), jednotkovou spotřebou ( $\text{dm}^3 \cdot \text{m}^{-2}$ ) a dobou působení (min).

Zavedené dekontaminační směsi v rámci Armády České republiky mohou být modifikovány. V Armádě ČR je nyní používána např. emulzní dekontaminační směs EDS (odmořovací a dezinfekční účinek) a sporicidní dezinfekční látka HVĚZDA S.C.H. (10). V Hasičských záchranných sborech ČR se pro dekontaminaci hasičů v ochranných protichemických přetlakových oděvech využívají dezinfekční roztoky Persteril 36%, popř. Persteril 15%, které se na oděv aplikují ručně či dekontaminační sprchou (9). Parametry vybraných dekontaminačních směsí používaných v AČR a u požárních jednotek jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

**Tabulka 1.** Parametry vybraných dekontaminačních směsí EDS a HVĚZDA S.C.H. používaných v AČR (10).

Dekontaminační směs	Složení	Doba působení (min)	Teplotní interval využitelnosti (°C)	Jednotková spotřeba (dm <sup>3</sup> .m <sup>-2</sup> )
<b>EDS</b>	15 % emulgační olej 85 % chlornanová susp.	30	-10 až +40	1
<b>HVĚZDA S.C.H.</b>	2 % (obj.) neionický tenzid 8 % (obj.) kationický tenzid 3 % (obj.) peroxid vodíku alkalizovaný na pH 12	3 až 10	-5 až +55	0,1 až 0,3 (pěna) 0,3 až 0,5 (kapalina)

**Tabulka 2.** Parametry dezinfekčních roztoků Persteril 36% a Persteril 15% používaných v Hasičských záchranných sborech ČR (9).

Dezinfekční roztok	Způsob aplikace na oděv	Dezinfekce hasiče v ochranném protichemickém přetlakovém oděvu	Dezinfekce pokožky osob
<b>Persteril 36%</b>	dekontaminační sprcha	2% roztok, doba působení 1 min	0,2% roztok, expozice 1 min
	ruční	2% roztok, doba působení 2 min	
<b>Persteril 15%</b>	dekontaminační sprcha	4% roztok, doba působení 1 min	0,4% roztok, expozice 1 min
	ruční	4% roztok, doba působení 2 min	

## 2.2 Mikrobiální dekontaminace

Kontaminanty, které je třeba řešit v rámci mikrobiální dekontaminace, jsou biologické látky, často nazývané B-agens (biologická agens). Jedná se o živé, choroboplodné mikroorganismy nebo toxiny schopné vyvolat onemocnění či úmrtí lidí, zvířat nebo rostlin, a pojednává se o nich v souvislosti s rizikem zneužití pro teroristické útoky. B-agens se vyznačují především vysokou virulencí, nízkou infekční dávkou, krátkou inkubační dobou, rychlým průběhem a vysokou úmrtností. Zneužití těchto kontaminantů formou suchého prášku nebo v kapalně formě rozptýlením prášku, aerosolovým mrakem, infikováním zvířat či kontaminací potravinových řetězců může

mít za následek narušení zdroje potravin, úmrtí zvířat, paniku, oslabení ekonomiky, pracovní síly atd. Kontaminované prostředí bez následné dekontaminace může působit infekčně i po 40 letech (9).

**B-agens řazená do jednotlivých kategorií (podle Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta) pro možná zneužití při teroristickém útoku (20):**

- a) **Kategorie A** – mikroorganismy a jimi vyvolaná onemocnění uvedené v této kategorii představují vysoké riziko pro národní bezpečnost, protože je lze snadno šířit a přenášet z osoby na osobu, mají za následek vysokou míru úmrtnosti a dopad na veřejné zdraví a vyžadují zvláštní opatření pro pohotovostní režim.
- *Orthopoxvirus variolae* (pravé neštovice)
  - *Bacillus anthracis* (antrax)
  - *Yersinia pestis* (mor)
  - toxin bakterie *Clostridium botulinum* (botulismus)
  - *Francisella tularensis* (tularémie)
  - *Filoviridae* (hemoragické horečky - Ebola, Marburg)
  - *Arenaviridae* (hemoragická horečka - Lassa)
- b) **Kategorie B** – mikroorganismy a jimi vyvolaná onemocnění jsou zahrnuty v této kategorii, protože je lze celkem jednoduše šířit, mají za následek mírnou míru morbidity a mortality a vyžadují zvýšený dohled nad nemocemi.
- *Coxiella burnetii* (q-horečka)
  - *Brucella* sp. (brucelóza)
  - *Burkholderia mallei* (vozhřivka)
  - *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, *Shigella* (gastroenteritidy z kontaminované potravy)
  - *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum* (gastroenteritidy z kontaminované vody)
  - Epsilon toxin bakterie *Clostridium perfringens*
  - *Burkholderia pseudomallei* (melioidóza)

- *Rickettsia prowazekii* (skvrnitý tyfus)
  - *Chlamydia psittaci* (psitakóza)
  - Alfavirus (encefalitidy)
  - toxin ricin rostliny *Ricinus communis*
  - stafylokokový enterotoxin B
- c) **Kategorie C** – do této kategorie se řadí nově vznikající patogeny, které by mohly být v budoucnu připraveny pro hromadné šíření díky dostupnosti těchto kmenů, snadné produkci a šíření, pro svůj potenciál vysoké mortality a morbiditidy a významný dopad na lidské zdraví.
- Hantavirus
  - Nipah virus

**Mikrobiální dekontaminace zahrnuje podle stupně účinnosti tyto způsoby dekontaminace:**

- **Sanitace (mechanická očista)** – jedná se o soubor postupů snižující a odstraňující anorganické a organické nečistoty, taktéž biofilmy z předmětů a ploch (21).
- **Dezinfekce** – zajišťuje zneškodnění vegetativních forem patogenních mikroorganismů na povrchu lidského těla i v prostředí pomocí fyzikálních, chemických či fyzikálně-chemických postupů tak, aby se přerušila cesta nákazy od zdroje k vnímavému jedinci (22, 23).
- **Vyšší stupeň dezinfekce** – zajišťuje usmrcení bakterií a některých méně odolných bakteriálních spor, virů a mikroskopických hub, nezajišťují však usmrcení vysoce rezistentních spor a vývojových stádií protozoí, helmintů a jejich vajíček. Tato metoda je určena pro dekontaminaci optických a termolabilních nástrojů a přístrojů působením některých chemických látek, u kterých se sterilizační fyzikální metody nedají použít. První fází vyššího stupně dezinfekce je mechanická očista, dezinfekce, oplach pitnou vodou a následné osušení. V případě kontaminace biologickým materiálem se nejprve provede dezinfekce virucidním prostředkem. Dalším krokem je

ponoření předmětů do sporicidního roztoku (2% glutaraldehyd alkalizovaný 0,3% hydrogenuhličitanem sodným; 1,5 – 5% Sekusept forte) na stanovenou dobu tak, aby byly ponořeny a naplněny všechny jejich duté části. Poté se předměty pro odstranění reziduí dezinfekčních prostředků opláchnou sterilní vodou, následně se sterilně osuší. Takto dezinfikované nástroje a přístroje jsou určeny k okamžitému použití, popř. ke krátkodobému skladování (až 8 hodin) kryté sterilní rouškou ve sterilních nádobách (uzavřené kazety) nebo v prostorách chráněných před sekundární kontaminací (skříně). Účinnost roztoku pro vyšší stupeň dezinfekce musí být A, B, C, T, M, V (účinnosti jsou podrobněji rozebrány níže) (22-24).

- **Sterilizace** – je proces, díky kterému dojde k usmrcení všech forem patogenních i nepatogenních mikroorganismů, včetně spor bakterií vyskytujících se v určitém prostředí, na materiálech či předmětech, k ireverzibilní inaktivaci virů, usmrcení významných protozoí, helmintů a jejich vajíček. Spory bakterií dokážou být vysoce termorezistentní, odolávají i teplotě 100 °C, stejně tak virus hepatitidy B může odolávat, pokud je v biologickém materiálu, proto je vždy třeba vybrat účinnou formu sterilizace s dostatečně vysokou teplotou (23, 25-27).
- **Antisepse** – slouží ke zneškodnění patogenních mikroorganismů v živých tkáních (na povrchu lidského těla a v tělních dutinách) např. výplachy antiseptickými roztoky, lokální aplikací antibiotik. Antiseptika přicházejí do styku s živými tkáněmi, proto musí splňovat všechna kritéria požadovaná u léčiv (tzn. dobrou snášenlivost, netoxičnost, minimální schopnost alergizovat apod.). Jako antiseptika se používají alkoholové roztoky kvartérních amoniových solí (Ajatin tinktura, Septonex, Cutasept), alkoholové roztoky s obsahem chlorhexidinu, peroxidu vodíku (Spitaderm), vodné roztoky obsahující povidon-jod (Jodisol, Betadine) a ve formě obvazů jako neadhezivní obvaz obsahující povidon-jod (Inadine) nejčastěji při léčbě bércových vředů.

- **Asepsa** – jedná se o opatření a postupy k zabránění kontaminace tkání průnikem mikroorganismu do tkáně lidského těla (užíváním ochranných pomůcek, chirurgickým mytím rukou, používáním sterilních nástrojů) a k zachování sterilního prostředí. Dbát na dodržování aseptických postupů je třeba hlavně při práci s imunosuprimovaným pacientem (23, 25, 27).
- **Dezinsekce** – je soubor opatření vedoucích k odstranění škodlivých a epidemiologicky významných členovců (vší, blech, klíšťat, mravenců, much, komárů atd.) z prostředí nejčastěji pomocí dýchacích a nervových kontaktních jedů (přípravky ve sprejích, návnady aj.). Užitečné jsou prostředky založené na feromonech zabraňující reprodukci členovců. Řada z nich se uplatňuje jako přenašeči nákaz, proto je jejich likvidace důležitá.
- **Deratizace** – znamená snížení počtu a likvidaci hlodavců, kteří bývají rezervoáry infekcí. K jejich potlačení může dojít buď profylakticky (včasným odstraňováním odpadků a zbytků potravin), nebo represivně (otrávenou návnadou, pastí atd.). Člověk se nakazí přímým kontaktem s hlodavcem nebo s jeho exkremty, kontaminovanou vodou či potravou, a také prostřednictvím členovců, kteří se sáním hlodavců infikují (23, 25, 28).

## 2.3 Dezinfekce

Dezinfekce je součástí protiepidemického režimu ve všech zdravotnických zařízeních. Provádí se fyzikálním nebo chemickým způsobem či kombinací obou postupů. Jejím hlavním cílem je přerušení cesty nákazy od zdroje k vnímavé osobě zneškodněním mikroorganismů ve vnějším prostředí, na neživých předmětech, plochách a na neporušené pokožce (24). Dezinfekce se vykonává jedním pracovním krokem (použitím dezinfekčního přípravku s čisticími vlastnostmi) nebo dvěma pracovními kroky, kterými se nejdříve provede mechanická očista, poté vlastní dezinfikování. Druhý, dvouetapový, přístup lze sjednotit použitím dezinfekčních prostředků s mycími a souběžně čisticími vlastnostmi. V ohnisku infekce a u biologicky kontaminovaných předmětů a povrchů se nejdříve uskutečňuje dezinfekce prostředkem s virucidním účinkem, a až poté mechanická očista (22).

Způsob dezinfekce se vybírá podle vlivu vnějšího prostředí (teplota, vlhkost, pH), cesty a mechanismu přenosu infekčního onemocnění, expoziční délky, odolnosti patogenů na dezinfekci a vlivu na dezinfikovaný předmět (24). Ideální dezinfekční prostředek by měl splňovat tyto vlastnosti: ekonomická dostupnost, přijatelné balení a dávkování, příjemná vůně, širokospektrální účinnost, krátká doba expozice, odolnost (vůči prostředí i dezinfikovanému předmětu), kožní snášenlivost, stabilita roztoků a nízká toxicita (25). Pro kontrolu účinnosti dezinfekce se využívají chemické a mikrobiologické metody. Pomocí chemických metod se kvalitativně a kvantitativně stanovují aktivní látky a jejich obsah v dezinfekčních přípravcích. Mikrobiologickými metodami je zjišťována účinnost dezinfekcí a případná mikrobiální kontaminace povrchů kontrolována stěry, oplachy, otisky atd. (27). U těchto přípravků je nutné pracovat podle návodu výrobce uvedeného na etiketě výrobku a řídit se doporučením zdravotnických ústavů (23).

#### **Dělení dezinfekce dle účelu použití a konkrétní situace:**

- **Profylaktická (ochranná)** – využívá se pro dezinfekci (vody, materiálu atd.) nejčastěji v kolektivních, zdravotnických zařízeních a všude tam, kde se předpokládá výskyt choroboplodných zárodků i bez jejich prokázané přítomnosti.
- **Ohnisková (represivní)** – slouží ke zneškodnění patogenu v ohnisku nákazy a jeho dalšímu šíření. Průběžná forma se provádí v okolí nemocného, konečná forma po převezení nemocného nebo po jeho úmrtí (23).

#### **Dle spektra účinnosti (při konkrétní době expozice, nejčastěji v minutách) a značení na dezinfekčních přípravcích (velkými písmeny):**

A = baktericidní (vegetativní formy bakterií)

T = tuberkulocidní (*Mycobacterium tuberculosis*)

M = působení na atypická mykobakteria

V = fungicidní (mikroskopické kvasinky i vláknité houby)

C = sporocidní (inaktivace spor bakterií)

B = virucidní.



### 2.3.1 Fyzikální způsob dezinfekce

Fyzikální způsob dezinfekce je ekologicky výhodný a je prováděn pomocí vlhkého či suchého tepla nebo záření těmito způsoby:

- spalování, filtrace, žihání
- dezinfekce pomocí přístrojů (mycí, prací a parní přístroje s teplotou vyšší než 90 °C)
- var v přetlakových nádobách (20 min)
- var za atmosférického tlaku (30 min)
- proudící horký vzduch (sušičky, 110 °C na 30 min)
- UV záření (germicidní zářivky, v rozmezí vlnových délek 253–264 nm)
- pasterizace (zahřátím na 60–65 °C na 30 min, rychlým zahřátím na 85–90 °C nebo 134 °C na několik sekund s následujícím rychlým zchlazením) (24, 27).

### 2.3.2 Chemický způsob dezinfekce

V praxi převažují chemické způsoby dezinfekce nad metodami fyzikálními. Patogeny jsou roztoky nebo aerosolem o dané koncentraci, spektru účinnosti na mikroorganismy a době expozice buď usmrceny (baktericidní účinek) nebo je jejich růst zastaven (bakteriostatický účinek). Chemická dezinfekce se tedy provádí otřením, ponořením, postřikem, aerosolem, odpařováním par roztoků, plynováním nebo pěnou (22). Mechanismus a spektrum účinku se u jednotlivých dezinfekčních látek liší (23).

**Chemický způsob dle mechanismu působení na mikroorganismy** (poškozením struktury mikroorganismů nebo narušením jejich základních metabolických funkcí):

- změnou permeability (detergenty)
- oxidací (peroxydy, peroxokyseliny, sloučeniny chloru)
- redukcí (aldehydy)
- hydrolýzou (hydroxidy, kyseliny)
- dehydratací (alkoholy)
- koagulací bílkovin (fenoly, alkoholy)

- inaktivací enzymů (cyklické sloučeniny) (25).

**Nejčastěji používané chemické látky jsou:**

- **Zásady a kyseliny:**
  - anorganické – hydroxid draselný, hydroxid sodný, hydroxid vápenatý (k hrubé dezinfekci např. septiků), kyselina boritá (oční kapky, masti apod.)
  - organické – kyselina peroctová (ve směsi s peroxidem vodíku a kyselinou sírovou tvoří přípravek Persteril, který v rámci několika minut působí baktericidně na vegetativní formy bakterií, na spory a viry ve velmi nízkých koncentracích 0,01–0,1 %), některé kyseliny nacházejí uplatnění také jako konzervancia a antiseptika (23, 25, 27, 29-32).
- **Halogeny** – sloučeniny chloru (chlorové vápno, chlornany, organické chloraminy), antiseptika obsahující jód (jodová tinktura, jod s glykoly, jodofory), brom nebo fluor; často však vyvolávají alergie; přípravky – Chloramin B (mytí rukou, dezinfekce prádla a povrchů), Chloramin BM (na povrchy), Chloramin BS (dezinfekce prádla), Savo (povrchy), Neodisher Alka (strojní mytí), Jodisol (na drobná poranění a místa vpichů), Betadine (ošetření ran, popálenin, dekubitů, kůže), Jodonal B (povrchová dezinfekce) (23, 25, 27, 33).
- **Oxidační přípravky** – peroxid vodíku (pokožka, drobná poranění, výplachy, stomatologie), ozón, manganistan draselný (23, 25, 27, 34, 35).
- **Alkoholy** – ethylalkohol, isopropanol (dez. rukou a pokožky); mají tradiční využití v medicíně; přípravky – Decidin tinktura (před vpichy), Desmanol (dez. kůže), Sterilium (kůže), Spitaderm (kůže) (23, 25, 27, 36, 37).
- **Sloučeniny těžkých kovů** – sloučeniny rtuti, mědi, stříbra a cínu; pro svoji toxicitu se využívají čím dál méně; mají většinou jen bakteriostatický účinek (23, 25, 27, 38).

- **Aldehydy** – formaldehyd (dez. nástrojů, ve formě plynu k dezinfekci místností, s vodní párou k dezinfekci matrací) a glutaraldehyd (endoskopy a nástroje, které nejsou odolné ke sterilizaci teplem) účinkují na základě redukčních a alkylačních vlastností způsobujících inaktivaci buněčných enzymů; přípravky – Sekusept forte (kombinace formaldehydu s glutaraldehydem na dezinfekci nástrojů, endoskopů, plastových předmětů), Cidex (kombinace glutaraldehydu s hydrogenuhličitanem sodným) (23, 25, 27, 39, 40).
- **Cyklické sloučeniny** – fenol, krezol, chlorhexidin atd.; přípravek – Orthosan BF 12 (hrubá povrchová dezinfekce), Kresolum saponatum (dezinfekční, mycí a detergenční vlastnosti, slouží k dezinfekci a mytí podlah) (23, 25, 27, 41, 42).
- **Tenzidy a jiné surfaktanty** – tenzidy jsou povrchově aktivní látky, mezi které patří i kvartérní amoniové soli (KAS); přípravky – Ajatin (povrchy, nástroje), Ajatinová tinktura (pokožka před vpichy), Cutasept (kůže před vpichy), Septonex (pokožka před vpichy a při poranění, povrchy), Ophthalmo Septonex (oční antiseptikum); KAS jsou podrobněji popsány níže (23, 25, 27, 43).
- **Kombinované sloučeniny** – jedná se o kombinaci výše uvedených látek; většinou jde o kombinaci kvartérních amoniových solí, tenzidů, aldehydů, chlorhexidinu, alkoholů, peroxidu vodíku k dosažení specifického působení; přípravky – Dezident (povrchy), Bacillool plus (léčebny a laboratoře na tuberkulózu), Incidur (povrchy ve zdravotnictví) (23, 25, 27, 44).

### 2.3.3 Fyzikálně-chemický způsob dezinfekce

Současným působením fyzikálního a chemického způsobu je dezinfekce vykonávaná těmito metodami:

- **paraformaldehydová komora** – působení vodní páry při 45–75 °C a páry formaldehydu; pro dezinfekci výrobků z vlny, umělé hmoty, kůže, kožešiny a textilu
- **mycí, čistící a prací stroje** – dezinfekce probíhá při teplotě do 60 °C a s přísadou chemických dezinfekčních prostředků (22, 27).

## 2.4 Sterilizace

Jak již bylo výše řečeno, sterilizací dojde k likvidaci všech mikroorganismů. Cílem sterilizace je zajištění úrovně bezpečné sterility  $10^6$ , která vyjadřuje, že maximálně jeden předmět je z celkového počtu jednoho milionu vysterilizovaných předmětů nesterilní. Navíc vysterilizovaný materiál může obsahovat pyrogenní látky, tzn. že usmrcené mikroorganismy nebyly z materiálu odstraněny (jejich následné odstranění není podmínkou sterilizace).

Sterilizace se skládá celkově ze tří důležitých fází – předsterilizační příprava, sterilizace po danou dobu, uložení a expedice. První fází je předsterilizační příprava, která zahrnuje ruční mechanickou očistu po předešlé dezinfekci nástrojů a pomůcek virucidním prostředkem nebo dekontaminaci v myčkách za použití kyselého, alkalického či enzymatického prostředku společně s termickou (> 90 °C, 10 min) nebo termochemickou (60 °C, 20 min, společně s dezinfekčním prostředkem) dezinfekcí. Jako doplněk ruční a strojové očisty se používá také čištění ultrazvukem (frekvence 35 kHz). Po těchto krocích se přechází k důkladnému osušení materiálu, popř. vyřazení těch poškozených, a vložení do vhodných obalů pro zachování sterility po skončení procesu. Během poslední fáze se kontroluje materiál a testy proběhlé sterilizace, zapíše se doba expirace materiálu a nakonec se skladuje (doporučená teplota 15–25 °C) nebo expeduje. Kontrola sterilizace zahrnuje kontrolu sterilizačního cyklu, účinnosti sterilizačního přístrojů (biologickými testy – mikrobiálními spory, nebiologickými testy reagující změnou barvy, sledováním fyzikálních parametrů přístroje), monitorování a validaci sterilizace a kontrolu vysterilizovaného materiálu (22, 24, 27).

### 2.4.1 Fyzikální metody sterilizace

- **Parní sterilizace** – provádí se vlhkým teplem (sytou vodní párou) v parních přístrojích zvaných autokláv. Tato metoda je vhodná pro předměty ze skla, kovu, porcelánu, gumy, textilu, keramiky, odolných plastů a dalších materiálů. Nebalené kovové nástroje (sterilizační doba 4 minuty) určené k okamžitému použití a balené materiály (7 minut sterilizace) lze sterilizovat při 134 °C za podmínky, že byl proveden vakuový test a Bowie-Dick test (tj. test správného odvětrání a pronikání páry) a při odvětrávání bylo dosaženo podtlaku nejméně –87 kPa. Pro inaktivaci prionů se také využívá teploty 134 °C, avšak po dobu 60 minut. Dalšími parametry jsou 121 °C po expoziční dobu 20 minut a 134 °C po dobu 10 minut.
- **Horkovzdušná sterilizace** – jedná se o sterilizaci proudícím horkým vzduchem (suchým teplem) prováděnou v horkovzdušném sterilizátoru s nucenou cirkulací vzduchu s danými parametry (160 °C po dobu 60 minut, 170 °C po dobu 30 minut a 180 °C po dobu 20 minut). Je určena pro termorezistentní materiál (sklo, kamenina, kov, porcelán), naopak není určena pro papír, gumu, většinu plastů, vatu a textil. Sterilizátor se po skončení cyklu otevírá až po zchladnutí alespoň na teplotu 80 °C.
- **Plazmová sterilizace** – využívá plazmy vznikající ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli, které působí na páry peroxidu vodíku či jiné chemické látky ve vysokém vakuu při teplotě 50–60 °C. Nepoužívá se na materiál na bázi celulózy, ani na porézní a savý materiál.
- **Radiační sterilizace** – účinek je vyvolán kobaltem jako radioizotopem a gama zářením v dávce 25 kGy. Tento typ je využíván v průmyslové výrobě jednorázového sterilního materiálu, případně k opakované sterilizaci expirovaného zdravotnického materiálu (22-24, 27).

## 2.4.2 Chemické metody sterilizace

Tento způsob sterilizace je vhodný zejména pro termolabilní materiál, jenž nelze sterilizovat fyzikálními způsoby. Účinkují na základě plynů předepsané koncentrace a složení.

- **Formaldehydová sterilizace** – je prováděna v tlakových přístrojích v podtlaku za působení plynné směsi formaldehydu s vodní párou při teplotě 60–80 °C a slouží pro sterilizaci termolabilních předmětů, gumy, optických přístrojů a ostrých kovových nástrojů. Není vhodná pro sterilizaci textilu.
- **Ethylenoxidová sterilizace** – je prováděna ve speciálních tlakových přístrojích za přetlaku nebo podtlaku, při teplotě 37–55 °C a relativní vlhkosti 70 %. Je určena pro termolabilní předměty, plasty, gumu, optické přístroje, ostré nástroje, papír, peří, molitan a matrace. Ethylenoxid je sterilizovanými předměty značně absorbován, proto se před použitím odvětrávají po dobu 3–7 dní (23, 24).

## 2.5 Kvartérní amoniové soli

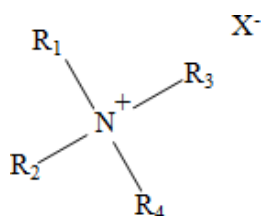
Od roku 1876, kdy Robert Koch zjistil, že mikroorganismy způsobují infekční onemocnění, se lékaři, mikrobiologové a chemici snaží najít léky k prevenci nemocí (45). V roce 1890 byly poprvé Menschutkinem připraveny KAS v reakci terciárních aminů s alkylovými halogenidy, které byly během 20. století podrobně studovány (4, 46). První postřehy ohledně antimikrobiální aktivity KAS byly publikovány v roce 1916 Jacobsem a spolupracovníky, kteří studovali vztah mezi strukturou a baktericidním efektem u hexamethyltetraaminu (47). Již ve 30. letech 20. století byl, společně s prvními sulfonamidovými antibiotiky (48), objeven celý potenciál KAS, a pro tyto účely byly ihned podávány žádosti o patenty (45).

Kvartérní amoniové soli (KAS) patří do skupiny kationtových surfaktantů aplikovatelných v různých odvětvích (3, 49) a obecně jsou používány jako biocidy, které se vyznačují antimikrobiálním účinkem proti široké škále mikroorganismů (50). Tyto látky jsou charakteristické nízkou cenou, jednoduchou přípravou a vysokou účinností (33). Jejich účinnost lze zlepšit zvýšením teploty na 50–60 °C (22). Typicky se skládají z jednoho kvartérního dusíku propojeného s nejméně jedním hlavním hydrofobním substituentem. Mezi zástupce KAS např. patří deriváty cetrionia neboli cetrimid (obecně *n*-alkyltrimethyl amoniové soli s *n*-alkylovou skupinou mezi osmi a osmnácti uhlíky), benzalkonia (směsi *n*-alkyldimethylbenzyl amoniové soli) (51), stearalkonia, cetylpyridinia (52), carbethopendeciniia (53), benzoxonia, tetrazolia, benzethonia a mecetronium ethylsulfát (54).

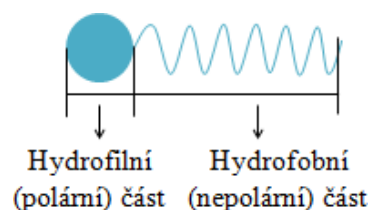
### 2.5.1 Chemická struktura

Kvartérní amoniové soli jsou obvykle chemické struktury  $N^+R_1R_2R_3R_4 X^-$  (obr. 1). KAS s antimikrobiální aktivitou jsou tedy složeny z pozitivně nabitého atomu dusíku, který je buď inkorporovaný do aromatického kruhu (pyridinium, imidazolium, quinolinium a isoquinolinium) nebo se vyskytuje jako necyklický atom (benzalkonium nebo cetrionium) (49, 55-58) kovalentně vázaný na čtyři atomy uhlíku, kde alespoň jeden substituent (R) je rovný *n*-alkylový řetězec s různým počtem uhlíků ( $C_8-C_{18}$ ) (52) a další substituenty (R) reprezentují jakoukoliv skupinu atomů. Chlorid ( $Cl^-$ ) nebo

bromid ( $\text{Br}^-$ ) obvykle představují anion (59, 60). Tento kvartérní dusík představuje hydrofilní (polární) část molekuly (obr. 2), která je schopná interagovat s polárním prostředím a je zodpovědná za rozpustnost ve vodě, zatímco dlouhý alkylový řetězec formuje hydrofobní (nepolární) část schopnou penetrovat nepolární aglomeráty a ovlivňovat biologické struktury, jako např. membrány, receptory a lipidy (61, 62).



**Obrázek 1.** Obecná struktura kvartérních amoniových solí.



**Obrázek 2.** Části molekuly kvartérních amoniových solí.

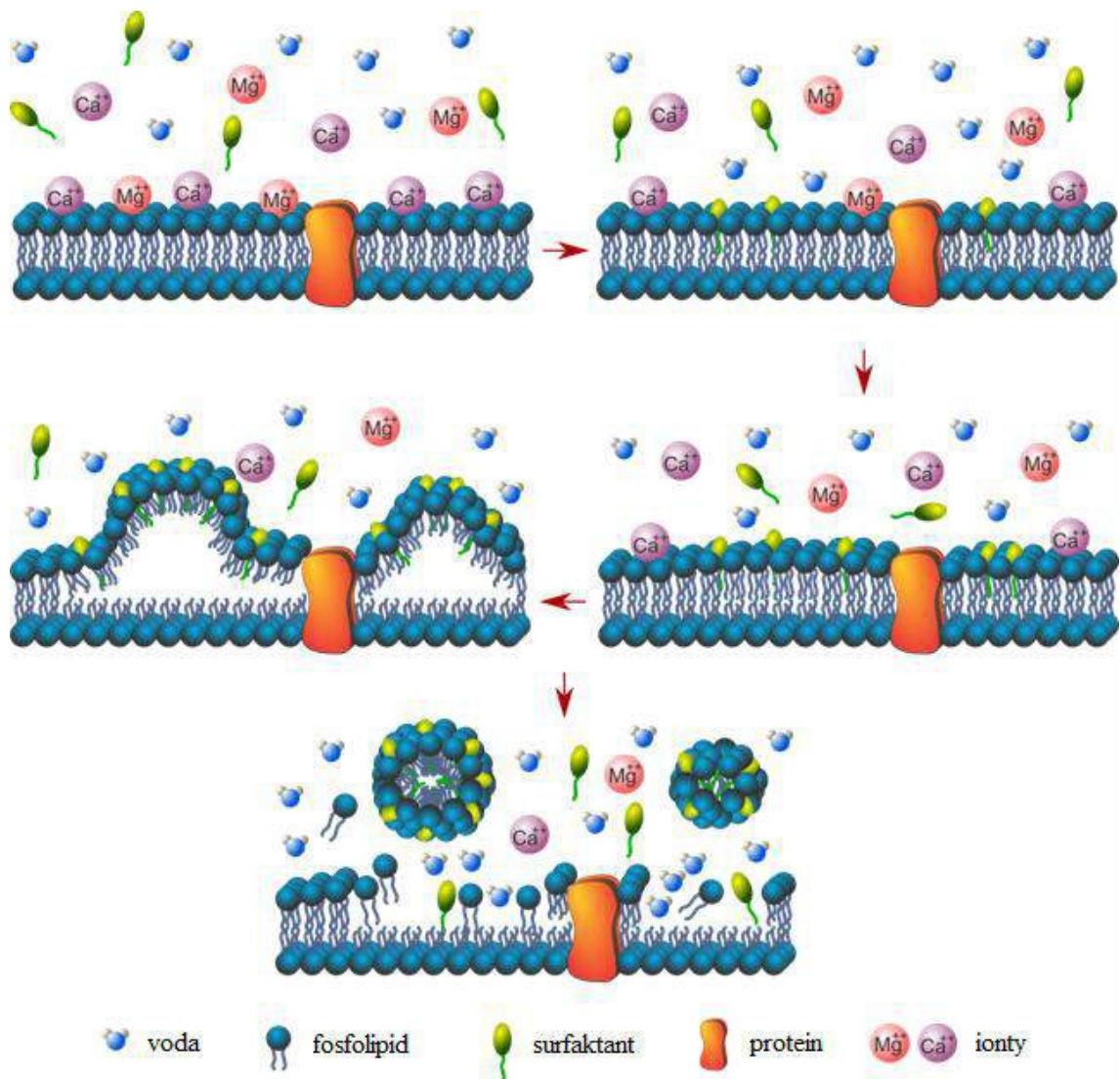
## 2.5.2 Mechanismus účinku

Mechanismus působení KAS, znázorněný na obrázku 3 (obrázek byl upraven dle publikace Doležal a kol. (63)), pramení z faktu, že negativně nabitý povrch bakteriálních membrán je stabilizován divalentními kationy, tj.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  kationy na povrchu membrány jsou po aplikaci kationaktivních látek nahrazeny pozitivním nábojem těchto látek a tato výměna má za následek zanoření hydrofobního alkylového řetězce do fosfolipidové vrstvy mikroorganismu. To vede ke ztrátě fluidity membrány a k segmentaci membrány do shluků, které jsou poté vytrženy z fosfolipidové dvojvrstvy do vodného prostředí vedoucí k buněčné smrti (3). Látky se dvěma dlouhými alkylovými řetězci (didecyldimethylammonium) také způsobují degradaci membrány, což má za následek únik intracelulárních molekul do prostředí a následnou buněčnou smrt (64). Nicméně, v tomto případě se mechanismus účinku zdá více komplexní než jen jednoduchá disrupce membrány. Navíc již byla popsána i interakce KAS s intracelulárními proteiny a nukleovými kyselinami (45). KAS o nízkých koncentracích se pevně vážou na anionická místa na povrchu membrány, způsobují buňkám ztrátu osmoregulační schopnosti a únik draslíkových iontů a protonů (65). Střední hodnoty rozrušují fyziologické funkce, jako je respirace, transport rozpuštěných látek a biosyntézu



buněčné membrány (66). Vysoké koncentrace,

používané v mnoha biocidních přípravcích, zabíjí buňky solubilizací membrán a následným uvolněním obsahu buňky, proto jsou navrhovány jako biologické detergenty (67).



**Obrázek 3.** Mechanismus působení KAS na bakteriální membrány (obrázek byl upraven dle publikace Doležal a kol. (63)).

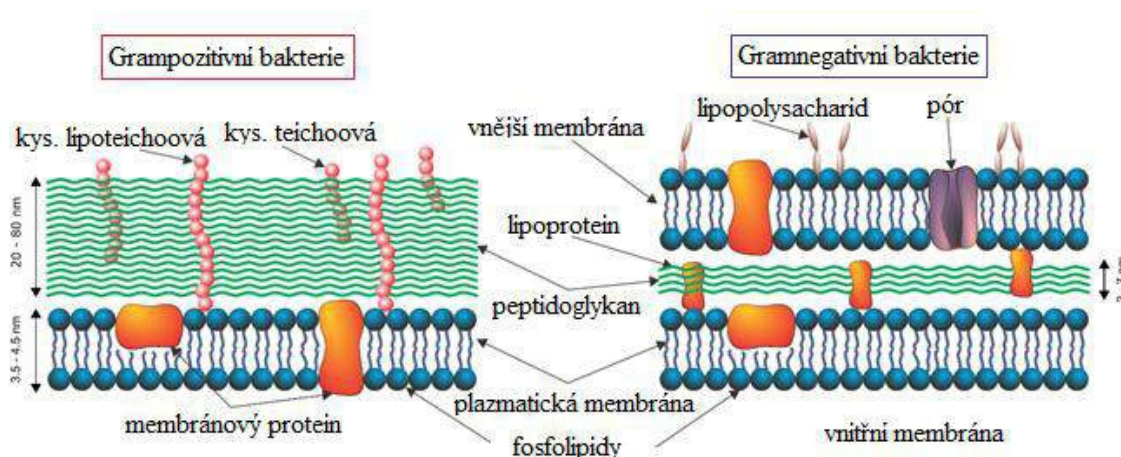
Na molekulární úrovni spočívá účinek KAS v asociaci pozitivně nabitého kvartérního dusíku s hydrofilní hlavou kyselých fosfolipidů nacházejících se v membráně. Hydrofobní řetězec KAS se poté zaplétá do samotné hydrofobní membrány. Proto při nízkých koncentracích (zhruba v hodnotách minimální inhibiční koncentrace) takové interakce zvyšují povrchový tlak a teplotu fázového přechodu. Membrána mění svůj skupenský stav na tekutý, krystalický a ztrácí osmoregulační

schopnost a fyziologické funkce, membránové jádro se snižuje v hydrofobicitě a fosfolipidy mají sklony ke stabilnímu hexagonálnímu uspořádání. V použitelných koncentracích KAS formují micelární agregáty, které rozpouštějí hydrofobní komponenty membrány (např. lipid A, fosfolipidy atd.) (3, 68).

Taková různorodost specifických interakcí poukazuje na to, že různí zástupci KAS mohou mít jiné účinky na různé mikroorganismy (69).

### 2.5.3 Antimikrobiální účinnost

Struktura KAS, obzvláště délka alkylového řetězce, hraje významnou roli v aktivitě dané látky vůči různým mikroorganismům (70). Maximální efekt těchto látek proti houbám byl zpozorován v přítomnosti alkylového řetězce s počtem uhlíků  $n = 12$  (69), proti grampozitivním (G+) bakteriím a kvasinkám byl zpozorován při počtu uhlíků  $n = 12-14$ . V případě gramnegativních (G-) bakterií byla maximální aktivita splněna při  $n = 14-16$ . Látky s délkou řetězce  $n \leq 4$  a  $n \geq 18$  jsou prakticky antimikrobiálně neaktivní (3).



**Obrázek 4.** Rozdíly ve stavbě buněčných stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií (obrázek byl upraven dle publikace Doležal a kol. (63)).

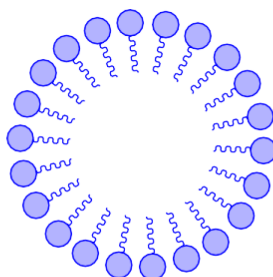
KAS projevují širokou účinnost (bakteriostatickou, sporistatickou, tuberkulostatickou, algistatickou) při velmi nízkých koncentracích (33). Nicméně, G+ bakterie jsou více citlivé ke KAS v porovnání s G- bakteriemi hlavně díky rozdílům v bakteriálních buněčných stěnách (obr. 4, upraven dle publikace Doležal a kol. (63)) a

neschopnosti KAS penetrovat vnější membránu a následně vnitřní cytoplazmatickou membránu G<sup>-</sup> bakterií, a tím způsobit disrupci membrány a únik iontů (71).

#### 2.5.4 Využití kvartérních amoniových solí

KAS jsou běžně používány v očních kapkách, hydratačních krémech a čistících přípravcích na obličej, opalovacích krémech a dezinfekčních prostředcích na ruce (50, 72). Tyto látky jsou také široce využívány pro purifikaci vody a zpracování potravin, protože vykazují nízkou toxicitu pro lidi a disponují vysokou antimikrobiální účinností (73). Kationické surfaktanty jsou často používány jako lokální dezinfekce (povrchové dezinfekční přípravky aplikovatelné na neporušenou sliznici atd.) a jako detergenty (74). Díky jejich toxickému efektu proti zeleným řasám mohou být také aplikované na povrchy bazénů, fontán, dřevěných lodí a všude tam, kde je jejich růst nežádoucí (75, 76).

**Obrázek 5.** Při dosažení kritické micelární koncentrace monomery surfaktantu formují



termodynamicky stabilní agregáty nazývané micely.

Po dosažení konkrétní koncentrace, nazývané kritická micelární koncentrace, monomery surfaktantu formují termodynamicky stabilní sférické agregáty ve vodných roztocích známé jako micely, znázorněny na obrázku 5 (77). Navzájem propletené uhlovodíkové řetězce molekul povrchově aktivních látek (nepolární část) tvoří ve vodném prostředí jádro micely a polární skupiny těchto látek jsou rozmístěny na vnějším povrchu micely. Ty mohou tvořit různé tvary (kulovité, válcovité, hexagonální kapalné krystaly, laminární micely) podle koncentrace roztoku (ve zředěných roztocích vznikají kulovité, ionogenní, tzv. Hartleyovy, micely; při vysokých koncentracích naopak laminární, tzv. McBainovy, micely složené ze dvou vrstev povrchově aktivních látek) (78). Micely jsou užitečné jako katalyzátory akcelerující rozklad chemikálií, a proto jsou tyto látky využívány i jako dekontaminanty (79).

## **2.6 Testování antimikrobiální účinnosti**

Metody testování antimikrobiální účinnosti byly podrobně popsány v přehledovém článku (80).

### 3 CÍLE PRÁCE

- 1) Zavedení a optimalizace metodiky testování antimikrobiální účinnosti (mikrodiluční bujónová metoda) na Katedře epidemiologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (FVZ UO).
- 2) *In vitro* testování vybraných skupin nově připravených látek (cca 60 látek) na bázi kvartérních amoniových solí – testování antibakteriální a antifungální účinnosti, dále navíc měření cytotoxicity a inhibice růstu zelených řas.
- 3) Sledování vztahu mezi strukturou látek a jejich antimikrobiální účinností.
- 4) Formulace ve vodě rozpustných širokospektrých směsí z nejúčinnějších látek a následné otestování jejich účinnosti (testování kožní dráždivosti, kvantitativní expoziční testy na aerobních bakteriích a kvasinkách). V rámci projektu byla pro ucelenost výsledků tato práce doplněna také kvantitativními expozičními testy proti anaerobní bakterii, vláknité houbě a viru.

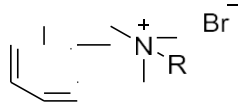
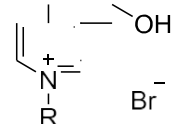
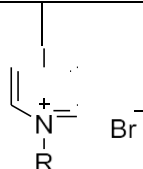
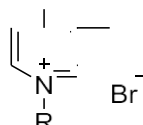
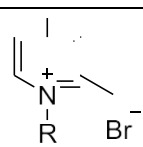
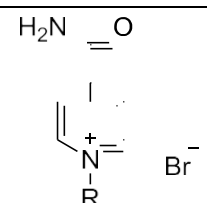
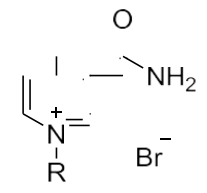
## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Testované látky

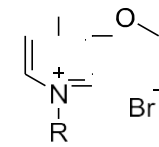
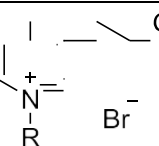
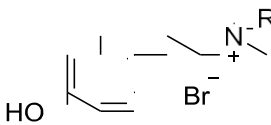
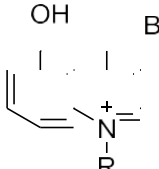
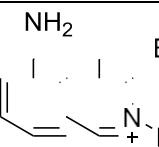
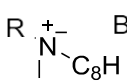
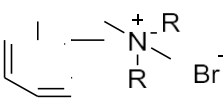
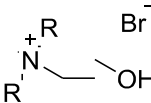
Ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO a Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové v rámci podpory „Vývoj nových dezinfekčních činidel proti patogenům vyskytujících se v nemocničním prostředí“ (15-31847A) Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV) bylo celkem připraveno 64 nových látek typu kvartérních amoniových solí. Jako referenční látky byly připraveny 3 standardně používané benzalkoniové soli (v textu označeny BAC<sub>12</sub>, BAC<sub>14</sub>, BAC<sub>16</sub>), které jsou obsaženy jako směs hlavních aktivních látek v komerčním dezinfekčním přípravku Ajatin. Pro tuto disertační práci bylo vybráno celkem 18 řad, tj. 52 testovaných látek, společně se třemi standardními benzalkoniovými solemi BAC (tzn. dohromady 55 testovaných látek). Látky jsou číslovány jako řady 1–18 s tím, že označení C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> a C<sub>16</sub> udává délku alkylového řetězce s daným počtem uhlíků (v případě bis-alkylových solí řad 13 a 14 se jedná o délku řetězců C<sub>8</sub> a C<sub>10</sub>). Nové látky, jejich označení a struktury, jsou shrnuty v tabulce

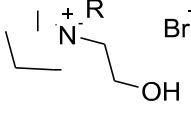
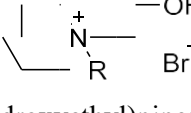
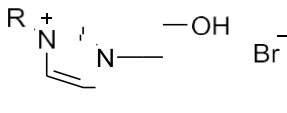
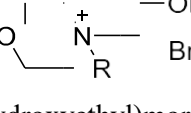
3. U připravených látek byla potvrzena jejich identita a čistota pomocí instrumentálních metod, tj. nukleární magnetické rezonance a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Syntéza a biologická testování látek uvedených v disertační práci byla publikována již v několika zahraničních odborných časopisech (57, 81-83). Příprava referenčních BAC byla popsána v publikaci Kuča a kol. (84).

**Tabulka 3.** Nově syntetizované látky, jejich struktury a označení.

Řada	Struktura	Označení
BAC	 <p><i>N</i>-alkyl-<i>N</i>-benzyl-<i>N</i>, <i>N</i>-dimethylamonium-bromid</p>	BAC <sub>12</sub>
		BAC <sub>14</sub>
		BAC <sub>16</sub>
1	 <p>1-alkyl-3-hydroxymethylpyridinium-bromid</p>	1-C <sub>12</sub>
		1-C <sub>14</sub>
		1-C <sub>16</sub>
2	 <p>1-alkyl-4-methylpyridinium-bromid</p>	2-C <sub>12</sub>
		2-C <sub>14</sub>
		2-C <sub>16</sub>
3	 <p>1-alkyl-3-methylpyridinium-bromid</p>	3-C <sub>12</sub>
		3-C <sub>14</sub>
		3-C <sub>16</sub>
4	 <p>1-alkyl-2-methylpyridinium-bromid</p>	4-C <sub>12</sub>
		4-C <sub>14</sub>
		4-C <sub>16</sub>
5	 <p>1-alkyl-4-karbamoylpyridinium-bromid</p>	5-C <sub>12</sub>
		5-C <sub>14</sub>
		5-C <sub>16</sub>
6	 <p>1-alkyl-3-karbamoylpyridinium-bromid</p>	6-C <sub>12</sub>
		6-C <sub>14</sub>
		6-C <sub>16</sub>



7	 <p>1-alkyl-3-methoxypyridinium-bromid</p>	7-C <sub>12</sub>
		7-C <sub>14</sub>
		7-C <sub>16</sub>
8	 <p>1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)pyridinium-bromid</p>	8-C <sub>12</sub>
		8-C <sub>14</sub>
		8-C <sub>16</sub>
9	 <p><i>N</i>-alkyl-<i>N</i>, <i>N</i>-dimethyl-<i>N</i>-(4-hydroxyphenylethyl)amonium-bromid</p>	9-C <sub>12</sub>
		9-C <sub>14</sub>
		9-C <sub>16</sub>
10	 <p>1-alkyl-5-hydroxyquinolinium-bromid</p>	10-C <sub>12</sub>
		10-C <sub>14</sub>
		10-C <sub>16</sub>
11	 <p>1-alkyl-5-aminoisochinolinium-bromid</p>	11-C <sub>12</sub>
		11-C <sub>14</sub>
		11-C <sub>16</sub>
12	 <p><i>N</i>-alkyl-<i>N</i>, <i>N</i>-dimethyl-<i>N</i>-oktylamonium-bromid</p>	12-C <sub>12</sub>
		12-C <sub>14</sub>
		12-C <sub>16</sub>
13	 <p><i>N</i>-benzyl-<i>N</i>, <i>N</i>-dialkyl-<i>N</i>-methylamonium-bromid</p>	13-C <sub>8</sub>
		13-C <sub>10</sub>
14	 <p><i>N</i>, <i>N</i>-dialkyl-<i>N</i>-(2-hydroxyethyl)-<i>N</i>-methylamonium-bromid</p>	14- C <sub>8</sub>
		14-C <sub>10</sub>

15	 1-alkyl-1-(2-hydroxyethyl)pyrrolidinium-bromid	15-C <sub>12</sub>
		15-C <sub>14</sub>
		15-C <sub>16</sub>
16	 1-alkyl-1-(2-hydroxyethyl)piperidinium-bromid	16-C <sub>12</sub>
		16-C <sub>14</sub>
		16-C <sub>16</sub>
17	 1-alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-bromid	17-C <sub>12</sub>
		17-C <sub>14</sub>
		17-C <sub>16</sub>
18	 N-alkyl-N-(2-hydroxyethyl)morfolinium-bromid	18-C <sub>12</sub>
		18-C <sub>14</sub>
		18-C <sub>16</sub>

## 4.2 Testování antibakteriální účinnosti

### 4.2.1 Použitý materiál

#### 4.2.1.1 Bakterie

Pro testování antibakteriální účinnosti byly vybrány odolnější klinické izoláty získané z Fakultní nemocnice Hradec Králové. Pouze kmen *Yersinia bercovieri* byl objednán z České národní sbírky typových kultur (CNCTC, Praha, Česká republika). Všechny mikroorganismy byly uchovávány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  v ITEST kryobankách (ITEST plus s.r.o., Hradec Králové, Česká republika). Před testováním byly kmeny rozmrazeny a kultivovány na Müeller-Hintonově agaru (HiMedia, Bombaj, Indie). Níže jsou uvedeny bakteriální kmeny a jejich značení:

#### Grampozitivní bakterie

- *Staphylococcus aureus* C1947

- meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) C1926
- vankomycin-rezistentní *Enterococcus* (VRE) S2484

### **Gramnegativní bakterie**

- *Escherichia coli* (ESCO) A1235
- *Klebsiella pneumoniae* (KLPN ES-) C1950
- *K. pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy (KLPN ES+) C1934
- multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR) A1245
- *Acinetobacter baumannii* (ACBA) J3474
- *Stenotrophomonas maltophilia* (STMA) J3552
- *Yersinia bercovieri* (YEBE) CNCTC 6230

#### 4.2.1.2 Kultivační média

Média, Mueller-Hinton bujón M391 (HiMedia, Bombaj, Indie) a Mueller-Hinton agar M173 (HiMedia, Bombaj, Indie), byla připravena dle pokynů výrobce a následně 15 minut sterilizována v autoklávu při 121 °C. Poté byla ve vodní lázni ochlazena na 50 °C a v případě agaru rozplněna za aseptických podmínek do Petriho misek o průměru 90 mm (výška agaru 4–5 mm). Po zaschnutí byly naplněné misky společně s bujónem uskladněny v lednici při 4 °C. Složení médií bylo následující:

#### **Mueller-Hinton bujón M391**

- Hovězí masová infúze (300 g/l)
- Enzymatický hydrolyzát kaseinu (17,5 g/l)
- Škrob (1,5 g/l)
- pH 7,3±0,1

#### **Mueller-Hinton agar M173**

- Hovězí masová infúze (300 g/l)
- Kyselý hydrolyzát kaseinu (17,5 g/l)
- Škrob (1,5 g/l)
- Agar (17 g/l)
- pH 7,4±0,1

#### 4.2.1.3 Chemikálie

- Dimethyl sulfoxide (DMSO) for molecular biology  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

#### 4.2.2 Postup testování

Antibakteriální aktivita připravených látek byla testována pomocí mikrodiluční bujónové metody modifikované podle M07-A10 standardu (85). Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním příslušných látek v DMSO tak, aby nejvyšší testovaná koncentrace látky v první jamce mikrotitrační destičky byla 500  $\mu\text{mol/l}$  a zároveň koncentrace DMSO v této jamce nepřesáhla 1 %. Látky tedy byly 100x koncentrovanější z důvodu následného ředění látek v DMSO (20  $\mu\text{l}$ ) růstovým médiem (1980  $\mu\text{l}$ ) pro získání první testované koncentrace. Příprava je popsána rovnicí (1).

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \cdot 10^6}{c \cdot M \cdot 100} = x \text{ (}\mu\text{l DMSO)} \quad (1)$$

m      navážka [g]

$10^6$     pro převod na  $\mu\text{l}$

c      nejvyšší testovaná koncentrace [mol/l]  $\rightarrow$  (500  $\mu\text{mol/l}$  = 0,0005 mol/l)

M      molární hmotnost testované látky

100    ředění roztoku 100x

Pro přípravu bakteriálních suspenzí byly do sterilních zkumavek pipetovány 3 ml sterilní vody, do kterých byly resuspendovány bakteriální kolonie očkované předchozí den na nový agar (24hodinové kolonie), a vše bylo promícháno. Jejich turbidita byla změřena pomocí denzitometru a upravena na stupeň 0,5 podle McFarlandovy zákalové stupnice.

Do jamek 2–11 sterilního 12jamkového rezervoáru bylo pipetováno 200  $\mu\text{l}$  DMSO. 200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku látky rozpuštěné v DMSO bylo přidáno do jamky č. 2, obsah byl promíchán a následně bylo 200  $\mu\text{l}$  přeneseno z jamky č. 2 do jamky č. 3. Jamka č. 3 byla opět promíchána a 200  $\mu\text{l}$  bylo přeneseno do jamky č. 4. Takto se postupovalo až

do poslední 11. jamky, tímto postupem byly látky dvojkově zředěny. Do 5ml zkumavky a do jamek 2–12 dalšího sterilního 12jamkového rezervoáru bylo napipetováno 1980  $\mu$ l Müeller-Hintonova bujónu. Do 5ml zkumavky bylo dále přidáno 20  $\mu$ l zásobního roztoku látky rozpuštěné v DMSO, obsah byl promíchán pomocí vortexu. Tímto krokem byla provedena kontrola, zda látka nebyla v bujónu vysrážena. Z této zkumavky bylo přepipetováno celé množství (2 ml) do první jamky rezervoáru (druhého použitého) a zde se nacházela nejvyšší koncentrace látky (500  $\mu$ mol/l). Do jamek 2–12 tohoto rezervoáru bylo přidáno 20  $\mu$ l odpovídající naředěné testované látky (tj. z jamky č. 2 prvního rezervoáru do jamky č. 2 druhého rezervoáru, z jamky č. 3 prvního rezervoáru do jamky č. 3 druhého rezervoáru atd., až po jamku č. 11). Do poslední jamky č. 12 bylo pro kontrolu růstu přidáno 20  $\mu$ l DMSO bez testované látky. Pomocí vícekanálové pipety bylo pipetováno 200  $\mu$ l z každé jamky druhého rezervoáru do všech řad 96jamkové mikrotitrační destičky tak, aby nejvyšší koncentrace látky byla v 1. sloupci a kontrola ve 12. sloupci. Do každé jamky bylo pak pipetováno 10  $\mu$ l mikrobiální suspenze tak, aby v každé řadě byl jiný bakteriální kmen. Do každé destičky bylo tedy nasazeno 8 různých kmenů a 1 testovaná látka, a poté byly destičky inkubovány 24 a 48 hodin v termostatu při 37 °C.

Po uplynutí inkubační doby byl v jednotlivých jamkách vizuálně hodnocen nárůst projevující se zákalem či sedimentem. Pokud byla bakterie inhibována, jamka zůstala čirá, bez zákalu nebo sedimentu. Výsledkem byla minimální inhibiční koncentrace (MIC), která odpovídala první čiré jamce s nejnižší koncentrací látky a která je definovaná jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky již inhibující viditelný růst. Také byly po 48hodinové inkubaci stanoveny hodnoty minimální baktericidní koncentrace (MBC) poskytující  $\geq 99,9$  % úbytku v počtu kolonií po přeočkování 10  $\mu$ l ze všech jamek destičky určené pro odečet MIC (po 24 hodinách inkubace) do 200  $\mu$ l čerstvého Müeller-Hintonova bujónu.

### **4.3 Testování antifungální účinnosti**

Testování účinnosti proti kvasinkám a vláknitým houbám bylo provedeno během tříměsíční zahraniční pracovní stáže v laboratořích Biotechnologické fakulty Univerzity v Lublani ve Slovinsku v rámci programu Erasmus+.

### 4.3.1 Použitý materiál

#### 4.3.1.1 Houby

Kmeny byly získány z Mikrobiální sbírky kultur Ex (v rámci Infrastrukturního centra Mycosmo), která je součástí Katedry biologie Biotechnologické fakulty Univerzity v Lublani ve Slovinsku. Před samotným testováním byly všechny izoláty uchovávány na Malt Extract agaru při teplotě 4 °C. Jedná se o tyto kvasinky a vláknité houby:

##### **Kvasinky**

- *Candida parapsilosis sensu stricto* (CAPA) EXF-8411
- *Rhodotorula mucilaginosa* (RHMU) EXF-8417
- *Exophiala dermatitidis* (EXDE) EXF-8470
- *Aureobasidium melanogenum* (AUME) EXF-8432

##### **Vláknité houby**

- *Bisifusarium dimerum* (BIDI) EXF-8427
- *Penicillium chrysogenum* (PECH) EXF-1818
- *Aspergillus versicolor* (ASVE) EXF-8692
- *Aspergillus niger* (ASNI) EXF-10185

#### 4.3.1.2 Kultivační média

Živná média, Malt Extract bujón (MEB) a Malt Extract agar (MEA), byla připravena v poměru složek uvedených níže, rozpuštěna v destilované vodě a následně 15 minut sterilizována v tlakové nádobě při 121 °C. Poté byla ve vodní lázni ochlazená na 45 °C. Za aseptických podmínek byl agar rozplněn do Petriho misek o průměru 85 mm (plněno objemem 20 ml pomocí kádinek) a bujón po 10 ml do Erlenmeyerových baněk o objemu 150 ml. Po zaschnutí byly misky uskladněny při 4 °C, s bujónem se vždy hned pracovalo. Složení médií bylo následující:

### **Malt Extract bujón**

- Malt Extract (20 g/l), (Biolife Italiana S.r.l., Milán, Itálie)
- Peptone from meat (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- D-(+)-glucose, anhydrous, p.a. (20 g/l), (Kemika d.d., Záhřeb, Chorvatsko)

### **Malt Extract agar**

- Malt Extract (20 g/l), (Biolife Italiana S.r.l., Milán, Itálie)
- Peptone from meat (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- D-(+)-glucose, anhydrous, p.a. (20 g/l), (Kemika d.d., Záhřeb, Chorvatsko)
- Agar (20 g/l), (Formedium, Hunstanton, Velká Británie)

#### 4.3.1.3 Chemikálie

- Dimethyl sulfoxide puriss., absolute, over molecular sieve (H<sub>2</sub>O ≤0,005 %), ≥99,5% (GC), (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

### **4.3.2 Postup testování**

Testování antifungálního účinku proti kvasinkám a vláknitým houbám bylo provedeno agarovou jamkovou difúzní metodou podle upraveného protokolu publikovaného Zovko a kol. (86). Před samotným testováním byla nejprve vybrána nejvhodnější velikost jamky (tj.  $\varnothing = 5,5$  mm), která se do agaru vyřezávala tzv. korkovrtem, a také objem jamky (tj. 50  $\mu$ l). Jednotlivé kmeny v exponenciální (logaritmické) fázi růstu, ve které probíhá intenzivní množení daného kmene, byly inokulovány 1  $\mu$ l očkovací kličkou do 10 ml tekutého MEB rozplněného v Erlenmeyerově baňce a 100  $\mu$ l takto připravené suspenze bylo nalito na pevný MEA a rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou po jeho povrchu. Po zaschnutí suspenze na agaru bylo korkovrtem vyřezáno šest válcovitých jamek v inokulovaném agaru. 50  $\mu$ l testovaných látek rozpuštěných v DMSO bylo napipetováno do vytvořených jamek. Každá koncentrace (1000; 500; 300; 100; 30; 10  $\mu$ mol/l) látek byla testována třikrát. Plotny byly opatrně zabaleny do igelitových pytlů a inkubovány při pokojové teplotě

25 °C. Po 72 h (kvasinky) či 168 h (vláknité houby) inkubace byly odečteny výsledky vyjádřeny jako MIC, jež jsou definovány jako nejnižší koncentrace, které jsou schopny inhibovat viditelný růst mikroorganismu. Jako inhibiční zóna pro stanovení MIC byla stanovena nejkratší vzdálenost (0,5–1 mm) z vnějšího okraje jamky po počáteční bod růstu mikroorganismu měřená pravítkem. Inhibiční aktivita rozpouštědla DMSO byla taktéž kontrolována. Jeho potenciální inhibiční zóna by byla odečtena od inhibičních zón jednotlivých látek, DMSO však žádnou inhibici nevykazovalo, tudíž tyto hodnoty nemusely být odečítány. Pro porovnání výsledků byly přidány i standardní benzalkoniové soli (BAC<sub>12–16</sub>).

## 4.4 Testování inhibice růstu zelených řas

Testování inhibice růstu zelených řas bylo také provedeno během tříměsíční zahraniční stáže ve spolupráci s Katedrou genetické toxikologie a biologie rakoviny Národního institutu biologie v Lublani ve Slovinsku pouze jako doplňkové testování.

### 4.4.1 Použitý materiál

#### 4.4.1.1 Zelené řasy

Zelená sladkovodní mikrořasa *Pseudokirchneriella subcapitata*, známá také pod názvem *Raphidocelis subcapitata* (87) a *Selenastrum capricornutum* (88), byla získána z kolekce řas (SAG 61.81) Univerzity v Göttingenu (Německo) a uchovávána při pokojové teplotě.

#### 4.4.1.2 Růstové médium

OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) TG 201 růstové médium bylo připraveno přidáním příslušného množství čtyř komerčně dodávaných zásobních roztoků 1–4, které byly předem sterilizované membránovou filtrací či autoklávováním a uchovávány ve tmě při 4 °C, do sterilizované vody podle ISO 8692 a dle pokynů dodavatele. Následně bylo takto připravené růstové médium uskladněno ve 4 °C.



#### 4.4.1.3 Chemikálie

- 3,5-dichlorophenol 97% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Dimethyl sulfoxide EMSURE® ACS (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

#### 4.4.1.4 Přístrojové vybavení a software

- Průtokový cytometr MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo)
- GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA)

### 4.4.2 Postup testování

Testování efektu našich látek na růst řas bylo provedeno podle protokolu “OECD guideline 201 Growth Inhibition Test” (89). Testované látky byly nejprve rozpuštěny v DMSO a poté pipetovány do 20 ml OECD média tak, aby koncentrace DMSO v OECD médiu byla 1 % (v/v). Následně bylo pod mikroskopem pomocí počítačích komůrky spočítáno množství zásobních řas *Pseudokirchneriella subcapitata*. Do konečného objemu 2 ml/jamku destičky byl vypočítán potřebný objem zásobních řas v médiu/jamku (tj.  $1 \times 10^4$  buněk/ml) i čerstvého OECD média, od kterého byl odečten vypočítaný objem řas i objem testované látky (20  $\mu$ l/jamku; finální koncentrace DMSO v jamce byla tedy 0,01 %). Takto byly řasy s testovanými látkami v OECD růstovém médiu kultivovány ve 12jamkových destičkách po dobu 24, 48 a 72 hodin za definovaných podmínek, tzn. při dané teplotě ( $24 \pm 2$  °C), konstantním třepání s orbitálním pohybem (100 kmitů/min) a konstantním osvětlením (24 h/den) se světelnou intenzitou 80–120  $\mu$ mol(fotonů).m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Finální koncentrace látek v destičkách byla

1  $\mu$ g/ml. Finální koncentrace DMSO (0,01 %) odpovídala doporučené maximální hodnotě uváděné v OECD protokolu. Stejná koncentrace DMSO (0,01 %) byla přidána také ke kontrolám, které se skládaly z OECD média, řas ( $1 \times 10^4$  buněk/ml) a DMSO. Jako referenční toxická látka pro ověření správnosti testování byl použit 3,5- dichlorfenol. Po uplynutí každé inkubační doby (24, 48 a 72 hodin) bylo přepipetováno 100  $\mu$ l z každé jamky 12jamkových destiček do 96jamkových destiček a následně byla průtokovým cytometrem měřena buněčná hustota (resp. počet buněk/ml). Účinnost

každé látky byla měřena celkem třikrát vždy v triplicátu. Získaným endpointem byla inhibice růstu, která je vyjádřena jako rozdíl v logaritmickém zvýšení počtu buněk (průměrná specifická rychlost růstu) během expoziční doby testovaných látek na řasy v porovnání s nárůstem kontroly měřené po 72 hodinách. Maximální relativní inhibice rovna 1 byla odvozena od látky s největším inhibičním účinkem. Kontrola byla stanovena jako minimální inhibice rovna 0.

## **4.5 *In vitro* testování cytotoxicity**

### **4.5.1 Použitý materiál**

#### 4.5.1.1 Buněčná linie

- Ovariální buňky křečička čínského (CHO-K1), z angl. Chinese hamster ovary (Evropská sbírka buněčných kultur, z angl. European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Velká Británie)

#### 4.5.1.2 Růstové médium

- Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Fetal Bovine Serum, Research Grade, 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Penicillin-Streptomycin 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

#### 4.5.1.3 Chemikálie

- Dimethyl sulfoxide for molecular biology  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Dimethylsulfoxid p.a. (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr), (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

- Trypsin-EDTA solution 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98% (MTT), (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

#### 4.5.1.4 Přístrojové vybavení a software

- Spektrofotometr Synergy HT (BioTek, Winooski, Vermont, USA)
- GraphPad Prism 5.03 a 7.03 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA)

### 4.5.2 Postup testování

MTT test byl proveden podle protokolu dodavatele buněk CHO-K1 (ovariální buňky křečička čínského). První den testování byly do čirých 96jamkových mikrotitračních destiček s plochým dnem nasazeny buňky CHO-K1. Z inkubátoru do laminárního boxu byla přenesena kultivační láhev s těmito buňkami. Do odpadní kádinky bylo z láhve odsáto všechno médium. Buňky byly opatrně propláchnuty 5 ml fosfátového pufru. Poté byl pro uvolnění buněk ode dna láhve napipetován 1 ml trypsinu a láhev byla inkubována (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) 5 minut. Po této době bylo přidáno 5 ml kultivačního média a obsah láhve byl promíchán. Pomocí Bürkerovy komůrky byl mikroskopicky stanoven celkový počet buněk v láhvi a následně objem těchto buněk v médiu, který je nutný odebrat pro nasazení 96jamkové destičky tak, aby v objemu 100 µl/jamku bylo 8 000 buněk. Do sloupců 1–11 byly nasazeny buňky v médiu o daném počtu, ve 12. sloupci bylo pouze kultivační médium sloužící jako tzv. blank (slepý vzorek). Destička byla inkubována (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) 24 hodin. Přebytečné množství v láhvi bylo použito pro další kultivaci buněk, neboli zpasážování, tak, že se v láhvi ponechalo přibližně 0,5–1 ml buněčné suspenze, médiem byla láhev doplněna do 10 ml a přenesena do inkubátoru.

Druhý den byly testované látky rozpuštěny v DMSO a následně ve 3 ml média takovým způsobem, aby finální koncentrace DMSO nepřesáhla 0,5 % a aby se dosáhlo požadované koncentrace látky (tj. zásobní roztoky). Poté se připravily dvojkové ředící řady těchto látek následujícím způsobem. V rezervoáru do řad B–H (1 látka/1 sloupec)

bylo pipetováno 500  $\mu$ l média/jamku. 500  $\mu$ l připraveného zásobního roztoku o dané koncentraci bylo přidáno do řady A i B. Z řady B bylo přeneseno 500  $\mu$ l do řady C, z řady C do D, a tak dále až po řadu H. Z inkubátoru byly do laminárního boxu přeneseny destičky s buňkami z předchozího dne a veškeré médium bylo odsáto do odpadního rezervoáru. Každá látka byla po 100  $\mu$ l/jamku pipetována do destičky v triplicátu (sloupce 1–3 = 1. látka, 4–6 = 2. látka, 7–9 = 3. látka). Do sloupců 10–12 bylo pipetováno čerstvé kultivační médium (100  $\mu$ l/jamku). Sloupce 10–11 byly použity jako negativní kontroly (buňky s médiem bez testovaných látek), sloupec 12 jako blank (pouze médium). Destičky byly opět inkubovány 24 hodin.

Třetí den byly 1ml alikvoty MTT (5 mg/ml) promíchány s 9 ml média a po odsátí média z destičky z předchozího dne bylo takto připravené MTT pipetováno po 100  $\mu$ l/jamku. Destičky byly inkubovány 3 hodiny, kdy docházelo mitochondriálními enzymy k redukcí MTT na modré (uváděno také jako fialové) soli formazanu. Po inkubační době byl obsah destiček odsát a vzniklé krystalky formazanu byly 2minutovým vortexováním rozpuštěny ve 100  $\mu$ l DMSO/jamku. Buněčná viabilita byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 570 a 650 nm (referenční vlnová délka). Hodnota  $IC_{50}$ , definovaná jako koncentrace způsobující 50% inhibici růstu, byla vypočítaná pomocí softwaru GraphPad Prism 5.03 a 7.03 (nelineární regrese, čtyři parametry).  $IC_{50}$  a standardní chyby průměru (SEM) byly získány zprůměrováním tří nezávislých měření.

## 4.6 Formulace dezinfekčních směsí

V souladu s cíli byly všechny látky, jejichž rozpustnost umožňovala testování, hodnoceny proti G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriím, dále proti vláknitým houbám a kvasinkám. Několik vybraných látek bylo testováno na inhibici růstu zelených řas *Pseudokirchneriella subcapitata* (lze hodnotit jako ekologickou šetrnost připravených látek). Ve spolupráci na projektu AZV byly látky testovány také proti anaerobní bakterii *Clostridium difficile* a proti viru varicella-zoster (VZV) – podrobné výsledky jednotlivých látek proti oběma zmíněným patogenům nejsou součástí této práce, pro ucelenost práce jsou ale zmíněny výsledky u formulovaných dezinfekčních směsí. Účinnost definovaných směsí byla porovnána s přípravkem Ajatin, který obsahuje blíže

nespecifikovanou směs výše zmíněných referenčních látek typu benzalkonií o přibližně stejné koncentraci.

Na základě těchto *in vitro* základních testování jednotlivých látek byly vybrány ty nejúčinnější. Z těchto nejnadějnějších látek byly dále vytvořeny dezinfekční směsi tak, aby pokryly co nejširší spektrum patogenů. Na těchto směsích se proti několika aerobním bakteriím, anaerobní bakterii *Clostridium difficile*, kvasinkám, vláknité houbě *Aspergillus fumigatus* a VZV prováděla kvantitativní zkouška s použitím suspenze za daný expoziční čas a testování kožní dráždivosti.

V následujících sekcích bude pojednáváno o 0,1% či 1% formulovaných směsích a Ajatinu. Pro snazší interpretaci a porovnání výsledků představují uvedená procenta přesný obsah směsi účinných látek v roztoku. Především pro Ajatin je třeba tuto skutečnost zmínit, aby nedošlo k dojmu, že roztoky jsou neporovnatelné (nejde zde o klasické ředění při přípravě dezinfekčních roztoků z komerčně zakoupeného koncentrátu dle výrobce).

#### **4.6.1 Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s aerobními bakteriemi a kvasinkami**

##### 4.6.1.1 Použitý materiál

###### 4.6.1.1.1 Mikroorganismy

Pro vykonání kvantitativní zkoušky s použitím suspenze byly vybrány stejné bakterie jako pro testování jednotlivých látek, avšak v menším počtu. Klinické izoláty byly opět poskytnuty Fakultní nemocnicí Hradec Králové a uchovávány v ITEST kryobankách (ITEST plus s.r.o., Hradec Králové, Česká republika) při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Totéž platí o izolátech kvasinek. Jedná se o tyto mikroorganismy:

##### **Grampozitivní bakterie**

- met icilin-rezistentní *S. aureus* C1926
- vankomycin-rezistentní *Enterococcus* S2484

### **Gramnegativní bakterie**

- *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy C1934
- multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* A1245

### **Kvasinky**

- *Candida krusei* (bez označení)
- *Cryptococcus neoformans* M917

#### *4.6.1.1.2 Kultivační média*

Média Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar) M290 (Himedia, Bombaj, Indie) pro bakterie a Malt Extract Agar Base M137 (Himedia, Bombaj, Indie) pro kvasinky byly připraveny dle pokynů výrobce a následně sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Poté byla média ve vodní lázni ochlazená na 50 °C a v laminárním boxu rozplněna do Petriho misek o průměru 90 mm (výška rozplněného agaru 4–5 mm). Po zaschnutí byly misky uskladněny ve 4 °C. Složení médií bylo následující:

#### **Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar) M290**

- enzymatický hydrolyzát kaseinu (15 g/l)
- sojový pepton (5 g/l)
- chlorid sodný (5 g/l)
- agar (15 g/l)

#### **Malt Extract Agar Base M137**

- sladový extrakt (30 g/l)
- mykologický pepton (5 g/l)
- agar (15 g/l)

#### *4.6.1.1.3 Chemikálie*

- Dimethyl sulfoxide for molecular biology  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

- Aqua pro injectione = sterilní voda (Miniplasco), (B. Braun, Melsungen, Německo)
- Chlorid sodný 0,9% (Miniplasco), (B. Braun, Melsungen, Německo)
- Tween-80 from non-animal source (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Sodium dodecyl sulfate BioXtra,  $\geq 99,0\%$  (GC), (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Lecithin from egg yolk,  $\sim 60\%$  (TLC), (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

#### 4.6.1.1.4 Přístrojové vybavení

- Barnstead™ Smart2Pure 3 UV/UF™ Water Purification System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

#### 4.6.1.2 Metodika

Všechny čtyři dezinfekční směsi byly rozpuštěny v ultračisté vodě pomocí přístroje Barnstead™ Smart2Pure 3 UV/UF™ Water Purification System na finální koncentraci 1 % účinných látek v ekvivalentním poměru. Na základě výborných výsledků 1% směsí (v této práci nejsou uvedeny, měly 100% cidní účinek) jsme se rozhodli otestovat směsi, Ajatin a pozitivní kontrolu i při nižší koncentraci, konkrétně 0,1 %. Jako negativní kontrola bylo použito neutralizační činidlo ke zneutralizování testované směsi připravené podle České technické normy (ČSN EN 13727+A2 – baktericidní aktivita, ČSN EN 1275 – fungicidní aktivita) ve složení 30 g/l Tween-80, 4 g/l dodecylsírany sodného, 3 g/l lecitinu, a poté skladovaného ve 4 °C. Pro porovnání, zda neutralizační činidlo je schopno neutralizace testovaných látek a není toxické k mikroorganismům, byla přidána i druhá negativní kontrola, kdy se namísto neutralizačního činidla použila sterilní voda sloužící ke zředění testovaných látek, nikoliv k jejich zneutralizování neutralizačním činidlem. Expoziční čas 5 minut byl pro kvartérní amoniové soli opět vybrán dle doporučení České technické normy s ohledem na skutečnou expozici v reálných podmínkách. Protokol byl vytvořen podle České technické normy

s přihlédnutím k postupu v publikaci Adamse a kolektivu (90). Testování probíhalo při pokojové teplotě.

Před testováním byly bakteriální kmeny inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin na Soyabean Casein Digest agaru; kvasinky při 37 °C během 48 hodin (*Candida krusei*), resp. 120 hodin (*Cryptococcus neoformans*) na Malt Extract Agar Base agaru. Mikrobiální suspenze byly upraveny na stupeň 5 podle McFarlandovy stupnice zákalu ve 3 ml sterilní vody. 10 µl mikrobiální suspenze bylo přidáno do 990 µl testované směsi a promícháno. Po expozičním čase 5 minut bylo 100 µl z předchozího kroku odebráno a přidáno jak do 900 µl neutralizačního činidla (pro zneutralizování), tak i do 900 µl sterilní vody (pro zředění). Vše bylo promícháno a ponecháno účinkovat dalších 5 minut. Takto byly testovány i negativní kontroly, ale namísto kroku s testovanou látkou se pracovalo se sterilní vodou (tj. 10 µl mikrobiální suspenze do 990 µl sterilní vody). Poté byly roztoky desítkovou ředící řadou ředěny 0,9% roztokem chloridu sodného, po 100 µl hokejkou rozetřeny po celém povrchu agarové plotny a po zaschnutí inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin (bakterie), 48 hodin (*Candida krusei*) či 120 hodin (*Cryptococcus neoformans*). Pro kontrolu nárůstu a pro výpočet CFU (jednotky tvořící kolonie)/ml mikrobiální suspenze se základní suspenze všech kmenů ředila pouze desítkovou řadou, inokulovala po 100 µl na agarové plotny a inkubovala za stejných podmínek jako testované směsi. Po inkubační době byly počítány narostlé kolonie vyjádřené v jednotkách CFU/ml.

#### **4.6.2 Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s kmeny *Clostridium difficile* a *Aspergillus fumigatus***

Testování bylo prováděno MUDr. Lenkou Ryškovou, Ph.D. z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové během spolupráce na projektu AZV. Z tohoto pracoviště pocházely testované kmeny (klinické izoláty), které byly skladovány při -80 °C.



#### 4.6.2.1 Použitý materiál

##### 4.6.2.1.1 Mikroorganismy

###### **Anaerobní bakterie**

- *Clostridium difficile*

###### **Vláknitá houba**

- *Aspergillus fumigatus*

##### 4.6.2.1.2 Kultivační média

- Schaedlerův agar (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francie)
- Sabouraudův agar (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francie)

##### 4.6.2.1.3 Chemikálie

- chlorid sodný 0,9% = fyziologický roztok (Ardeapharma, a.s., Ševětín, Česká republika)
- ethanol 96% (připraveno ve Fakultní nemocnici Hradec Králové)

##### 4.6.2.1.4 Přístrojové vybavení

- Barnstead™ Smart2Pure 3 UV/UF™ Water Purification System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Anaerostat BugBox Dual Gas, pro anaerobní kultivaci (The Baker Company, Sanford, Maine, USA)
- Inkubátor Memmert IN 160, pro aerobní kultivaci (Mettler GmbH, Schwabach, Německo)

#### 4.6.2.2 Metodika

Všechny čtyři dezinfekční směsi spolu s referenčním dezinfekčním prostředkem Ajatin byly rozpuštěny v ultračisté vodě (přístrojem Barnstead™ Smart2Pure 3 UV/UF™ Water Purification System) na finální koncentraci 0,1 %. Jako negativní kontrola byl použit 0,9% chlorid sodný. Expoziční časy 5 a 10 minut pro bakterii *Clostridium*

*difficile* a 5 minut pro houbu *Aspergillus fumigatus* byly vybrány na základě doporučeného rozmezí kontaktních dob uvedených v České technické normě (ČSN EN 13727+A2 – baktericidní aktivita, ČSN EN 1275 – fungicidní aktivita) a dle kontaktních časů u běžně používaných dezinfekčních prostředků jako simulace pravděpodobných, skutečných expozičních. Testování probíhalo za pokojové teploty. Před testováním byl kmen *Clostridium difficile* kultivovaný 24 hodin v anaerostatu Bugbox na Schaedlerově agaru a houba *Aspergillus fumigatus* byla kultivována 48 hodin na Sabouraudově agaru.

Z 24hodinové kultury *Clostridium difficile* byla připravena suspenze do fyziologického roztoku se zákalem 0,5 dle McFarlandovy zákalové stupnice. Tato suspenze byla inkubována po dobu 40 minut s 96% ethanolem (vegetativní buňky jsou totiž citlivé na ethanol, zatímco spory jsou na něj velmi rezistentní (91)) při pokojové teplotě. Po inkubaci byla zkumavka na 10 minut centrifugována (5000 ot./min.). Supernatant byl odstraněn, sediment byl resuspendován ve fyziologickém roztoku na 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenze vláknité houby byla připravena z vysporulovaných kolonií kmene *Aspergillus fumigatus* a upravena na 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice v 0,9% chloridu sodném.

K 900 µl každé dezinfekční směsi (směs 1, 2, 3 a 4 o koncentracích 0,1 %) či kontrole (0,1% Ajatin – pozitivní kontrola, fyziologický roztok – negativní kontrola) bylo napipetováno 100 µl připravené suspenze s testovaným kmenem a vše důkladně promícháno. Doba expozice směsi na testovaný kmen byla 5 a 10 minut pro *Clostridium difficile* a 5 minut pro *Aspergillus fumigatus*. Po uplynutí této doby bylo 100 µl každé suspenze vyočkováno na Schaedlerův agar (*Clostridium difficile*) či Sabouraudův agar (*Aspergillus fumigatus*), a tyto kultury inkubovány v BugBoxu při 37 °C po dobu 48 hodin (*Clostridium difficile*) či v inkubátoru pro aerobní kultivaci při 37 °C také po dobu 48 hodin (*Aspergillus fumigatus*). Po inkubační periodě byl nárůst hodnocen vizuálně.

#### **4.6.3 Kvantitativní zkouška s použitím suspenze s virem varicella-zoster**

Testování bylo provedeno Mgr. Radkem Slehou, Ph.D. z Katedry epidemiologie Fakulty vojenského zdravotnictví UO.

#### 4.6.3.1 Použitý materiál

##### 4.6.3.1.1 *Buněčná linie*

- NHLF (normální lidské plicní fibroblasty) buněčná linie (Americká sbírka typových kultur, z angl. American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Virginie, USA). Práce s buňkami byla od rozmrazení alikvotu limitována na méně než 11 pasáží.

##### 4.6.3.1.2 *Růstové médium*

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium with low glucose 1 g/l (Lonza, Basilej, Švýcarsko)
- Fetal Bovine Serum 10% (Lonza, Basilej, Švýcarsko)
- Ultraglutamine 1% (Lonza, Basilej, Švýcarsko)
- Gentamicin 1% (Lonza, Basilej, Švýcarsko)

##### 4.6.3.1.3 *Virový kmen*

VZV byl izolován z kožních lézí pacientů s varicelou či herpes zoster infekcí. Klinické vzorky byly získány z Oddělení dermatologie či Kliniky infekčních onemocnění Fakultní nemocnice Hradec Králové, během erupční fáze nemoci. Sterilní tampon byl použit pro drcení nepoškozených vezikulárních lézí a transportován v médiu UTM-RT (Copan Diagnostics, Murietta, Kalifornie, USA). Vzorky byly poté množeny na NHLF buňkách, dokud nedosáhly cytopatického efektu. Buněčná suspenze lyzovaná virovou infekcí byla pro budoucí analýzy následně koncentrována, alikvotována a skladována v zamrazovacím médiu (popsáno níže) při -80 °C. Kmen je uchováván na Katedře epidemiologie Fakulty vojenského zdravotnictví UO.

##### 4.6.3.1.4 *Chemikálie*

- Phosphate-Buffered Saline (Lonza, Basilej, Švýcarsko)
- Trypsin/EDTA (Lonza, Basilej, Švýcarsko)
- Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

#### 4.6.3.2 Metodika

Nejprve byla získána suspenze testovaného VZV, který byl pomnožen v buňkách lidských plicních fibroblastů (NHLF). Narostlá monovrstva NHLF buněk, dosahující konfluencie alespoň 60 %, byla infikována zásobním alikvotem VZV uchovávaného při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v zamrazovacím médiu (50% Fetal Bovine Serum, 45% Dulbecco's Modified Eagle's Medium a 5% DMSO). Buňky byly následně inkubovány v  $\text{CO}_2$  inkubátoru při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a monitorovány každý den na výskyt cytopatického efektu. Při výskytu cytopatického efektu více než 80 % byla suspenze infikovaných buněk sklizena trypsinizací a následně zakoncentrována centrifugací ( $400\times\text{ g}/5\text{ minut}$ ) na požadovaný objem.

Samotné testování bylo prováděno v 15ml zkumavce, v níž bylo 100  $\mu\text{l}$  virové suspenze smícháno se 100  $\mu\text{l}$  fetálního bovinního séra ředěného fosfátovým pufrem (1:5,5) a 800  $\mu\text{l}$  testovaných dezinfekčních směsí, Ajatinu (pozitivní kontrola) či DMEM (negativní kontrola). Následně probíhala inkubace těchto směsí po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí doby expozice byla provedena neutralizace působení testovaných směsí přidáním 9 ml ledem chlazeného DMEM. Z každé zkumavky s testovanou směsí i kontrolami byla následně vytvořena desítkovým ředěním s DMEM koncentrační řada  $10^1$ – $10^8$  a 100  $\mu\text{l}$  každého ředění bylo umístěno do 96jamkové destičky s narostlou monovrstvou NHLF buněk. Destičky byly následně inkubovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve vlhké atmosféře s 5 %  $\text{CO}_2$ , dokud nebyl detekován cytopatický efekt, zhruba 10–12 dní. Každá testovaná směs i kontroly byly testovány v šesti sloupcích. Jako negativní kontrola byly použity NHLF buňky bez VZV, ale s identickými koncentracemi proteinu, pro potvrzení, že nedochází k samovolnému rozpadu monovrstvy.

Titru viru byl stanoven metodou dle Spearmana a Kaerbera a vyjádřen jako  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub> (50% infekční dávka pro tkáňovou kulturu)/ml (92). Podle Evropského standardu pro virucidní aktivitu dezinfekcí EN 14476 by měl přípravek prokázat nejméně 4  $\log_{10}$  redukci virového titru, korespondující s 99,99% inaktivací viru (93). Pro rozlišení mezi virem indukovanými cytopatickými změnami a toxickým efektem způsobeným testovanými směsí byla buněčná monovrstva pro sledování morfologických změn po expozici dezinfekčních směsí monitorována až do konce testování virucidní aktivity.

#### 4.6.4 Testování kožní dráždivosti

##### 4.6.4.1 Použitý materiál

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- EPI-200-SIT Kit (MatTek In Vitro Life Science Laboratories, Bratislava, Slovensko)
- MTT-100 Assay Kit (MatTek In Vitro Life Science Laboratories, Bratislava, Slovensko)

##### 4.6.4.2 Metodika

V souladu s doporučením OECD 439 (94) a se zákonem 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (aktuální znění 359/2012 Sb.), bylo z etických důvodů upuštěno od testů dráždivosti využívajících živá laboratorní zvířata. Pro testování kožní dráždivosti byl proto použit „*In vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT)“ kit společně s protokolem od dodavatele MatTek *In Vitro* Life Science Laboratories (Bratislava, Slovensko) (95). Testování probíhalo na rekonstruovaných lidských epidermálních keratinocytech, které byly kultivovány tak, aby tvořily vícevrstevný, vysoce diferencovaný model lidské pokožky skládající se z vrstev *stratum basale*, *spinosum*, *granulosum* a *corneum*. Tyto keratinocyty, komerčně označované jako EpiDerm™ tkáň (s povrchem 0,63 cm<sup>2</sup>), jsou kultivovány na speciálně připravených insertech a jsou součástí dodávaného kitu. Epidermální buňky jsou získávány od zdravých dobrovolníků (negativních na HIV a hepatitidu).

Den před dávkováním testovaných směsí (TS) bylo pipetováno 0,9 ml média (součástí kitu) o pokojové teplotě do každé jamky 6jamkových destiček (pro 24 insertů bylo připraveno osm 6jamkových destiček). Z dodané 24jamkové destičky s inserty byly tyto inserty sterilní pinzetou vytaženy, vizuálně zkontrolovány, buničitou vatou očištěny od agarózy, usušeny a následně přemístěny do horních jamek 6jamkových destiček předplněných médiem. Poté byly inkubovány na 60±5 minut (37±1 °C, 5±1 % CO<sub>2</sub>, 95% relativní vlhkost). Po inkubační době byly inserty přemístěny z horních

jamek do spodních. Tyto destičky byly inkubovány (vždy stejné inkubační podmínky jako výše) přes noc po dobu  $18 \pm 3$  hodin.

První den testování bylo vyměněno médium v horní řadě inkubovaných destiček tak, že se odsálo staré médium, jamky se 2x propláchly PBS (nebylo součástí kitu) a naplnily se novým médiem o objemu 0,9 ml. 30  $\mu$ l šesti dezinfekčních směsí rozpuštěných v PBS (max. 2 % DMSO), stejně tak PBS jako negativní kontroly (NC) a 5% dodecylsíranu sodného (součástí kitu) jako pozitivní kontroly (PC), se postupně pipetovalo k jednotlivým tkáním v triplicátech (1 destička = 1 chemikálie = 3 inserty) v časovém intervalu 1 minuta. Všechny destičky byly inkubovány  $35 \pm 1$  minut. Pro odstranění vlivu testovaných směsí a kontrol na inserty byly po inkubační době tkáně proplachovány fosfátovým pufrem, usušeny buničitou vatou a přemístěny do 6jamkových destiček naplněných čerstvým médiem (0,9 ml/jamku) v horních řadách (tento krok byl již proveden v prvním kroku tohoto dne testování) a dány do inkubátoru na dalších  $24 \pm 2$  hodin.

Druhý den se pouze vyměnilo médium ve spodní řadě 6jamkových destiček (0,9 ml/jamku) stejným postupem jako během prvního dne, inserty se přemístily z horních řad do spodních a destičky se opět inkubovaly na dalších  $18 \pm 2$  hodin.

Poslední třetí den se podle protokolu připravilo MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) médium (1 mg/ml). 300  $\mu$ l MTT média bylo pipetováno do každé jamky 24jamkové destičky. Inserty byly po osušení dna buničitou vatou přemístěny z 6jamkových destiček do 24jamkové obsahující MTT médium. Po  $3 \text{ h} \pm 5$  minut inkubace bylo MTT médium ze všech jamek jemně odsáto, inserty byly 3x propláchnuty PBS, osušeny a přemístěny do nové 24jamkové destičky. Poté byl formazan, který vznikl redukcí MTT díky mitochondriálním enzymům, extrahovaný dodaným isopropanolem (2 ml/insert). Destička byla kvůli zamezení evaporace utěsněna parafilmem a na 2 hodiny při pokojové teplotě třepána na třepačce (120 RPM). Po této době se sterilní jehlou propíchny inserty (21 G;  $\varnothing$  0,8 mm), a tím byl extraktu umožněn odtok z insertů do jamek destičky, inserty byly vyhozeny a extrakty byly promíchány. Z extraktu každé tkáně se přepipetovalo dvakrát 200  $\mu$ l alikvotů formazanu do 96jamkové mikrotitrační destičky s rovným dnem.

Optická denzita (OD) extrahovaného formazanu byla stanovena spektrofotometricky při 570 nm. Isopropanol byl použit jako blank. Výsledky byly zpracovávány podle pokynů poskytovaných MatTek společností.

Výsledkem byla relativní buněčná viabilita počítaná pro každou tkáň (rovnice 2–4) a vztažena k průměru výsledků tkání negativních kontrol. Pokud byla relativní buněčná viabilita pod 50 %, předpokládal se potenciál kožní dráždivosti testované látky, a naopak.

$$\text{Relativní viabilita TS (\%)} = (\text{OD}_{\text{TS}} / \text{průměr OD}_{\text{NC}}) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Relativní viabilita NC (\%)} = (\text{OD}_{\text{NC}} / \text{průměr OD}_{\text{NC}}) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Relativní viabilita PC (\%)} = (\text{OD}_{\text{PC}} / \text{průměr OD}_{\text{NC}}) \times 100 \quad (4)$$

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Testování antibakteriální účinnosti

Antibakteriální aktivita nových látek byla otestována mikrodiluční bujónovou metodou a porovnána s účinností standardních benzalkoniových solí BAC<sub>12-16</sub>. Účinnost látek (při koncentracích 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49  $\mu\text{mol/l}$ ) byla vyhodnocena jako minimální inhibiční (MIC; po 24- a 48hodinové inkubaci) a baktericidní (MBC; po 48hodinové inkubaci) koncentrace na deseti bakteriálních kmenech, třech grampozitivních (*Staphylococcus aureus*, meticilin- rezistentní *S. aureus*, vankomycin-rezistentní *Enterococcus*; shrnuto v tabulce 4) a sedmi gramnegativních (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy, multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia bercovieri*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*; shrnuto v tabulce 5) bakteriích. Výsledné hodnoty triplikátů byly zprůměrovány. V případě, že látka ani při nejvyšší testované koncentraci 500  $\mu\text{mol/l}$  nedokázala účinkovat na konkrétní kmen, výsledek byl označen jako >500  $\mu\text{mol/l}$ .

**Tabulka 4.** Minimální (MIC; 24/48hodinová inkubace) a baktericidní (MBC; 48hodinová inkubace) koncentrace (vyjádřena v  $\mu\text{mol/l}$ ) připravených látek (série 1–18) a referenčních benzalkoniových solí (BAC<sub>12-16</sub>). *In vitro* aktivita látek byla stanovena na třech grampozitivních bakteriálních kmenech (*Staphylococcus aureus*, meticilin-rezistentní *S. aureus*, vankomycin-rezistentní *Enterococcus*).

Látka	Kmen	MIC ( $\mu\text{mol/l}$ ); 24h/48h inkubace MBC ( $\mu\text{mol/l}$ ); 48h inkubace		
		<i>S. aureus</i> (C1947)	meticilin-rezistentní <i>S. aureus</i> (C1926)	vankomycin -rezistentní <i>Enterococcus</i> (S2484)
BAC <sub>12</sub>		1,63/3,26 15,63	3,91/5,37 7,81	13,68/13,68 15,63
BAC <sub>14</sub>		1,14/1,46 0,98	0,98/0,98 1,95	2,93/2,93 1,95
BAC <sub>16</sub>		1,3/1,3 0,98	1,47/1,47 0,98	2,44/2,44 1,47



1-C12	3,91/3,91 3,91	31,25/31,25 31,25	46,88/62,5 35,16
1-C14	0,98/0,98 0,98	3,91/3,91 3,91	11,72/11,72 11,72
1-C16	0,74/0,74 0,49	1,95/1,95 1,95	3,91/5,86 5,86
2-C12	1,95/1,95 2,93	7,81/15,63 31,25	31,25/31,25 31,25
2-C14	0,49/0,49 0,74	1,47/1,47 2,93	3,91/3,91 7,81
2-C16	0,49/0,49 0,49	0,74/1,47 1,47	1,95/7,81 7,81
3-C12	1,95/1,95 5,86	7,81/15,63 23,44	31,25/31,25 31,25
3-C14	0,74/0,74 0,74	1,47/1,47 5,86	1,95/1,95 3,91
3-C16	0,74/0,74 0,98	1,47/1,47 2,93	3,91/3,91 7,81
4-C12	1,95/1,95 9,77	11,72/15,63 46,88	46,88/46,88 24,07
4-C14	0,98/1,47 2,45	1,95/1,95 5,86	7,81/7,81 7,81
4-C16	0,49/0,49 1,22	1,47/1,47 1,95	1,95/1,95 2,93
5-C12	2,93/7,81 7,81	31,25/31,25 31,25	125/62,5 62,5
5-C14	1,95/1,95 1,95	3,91/3,91 3,91	7,81/7,81 15,63
5-C16	0,98/0,98 0,74	1,95/1,95 1,95	3,91/3,91 3,91
6-C12	4,27/4,4 4,15	31,25/31,25 31,25	125/62,5 62,5
6-C14	2,77/2,77 2,77	3,91/3,91 3,91	7,81/7,81 7,81
6-C16	1,95/1,95 1,95	1,95/1,95 3,91	1,95/3,91 3,91
7-C12	83,66/104,17 62,5	125/125 166,67	250/208,33 208,33
7-C14	42,32/62,5 62,5	104,17/125 125	125/250 125
7-C16	5,37/26,04 15,63	62,5/62,5 62,5	104,17/104,17 83,33
8-C12	5,86/5,86 7,81	31,25/46,88 93,75	31,25/46,88 62,5
8-C14	1,47/1,47 1,47	7,81/7,81 5,86	15,63/15,63 7,81
8-C16	0,98/0,98 0,98	1,95/1,95 1,95	3,91/3,91 3,91
9-C12	1,95/1,95 1,95	5,86/5,86 7,81	15,63/15,63 11,72
9-C14	1,47/1,47 0,98	1,95/1,95 1,95	3,91/7,81 3,91
9-C16	1,47/1,47 0,98	2,93/2,93 2,93	3,91/9,77 3,91

10-C <sub>12</sub>	7,81/7,81 7,81	7,81/15,63 15,63	>500/>500 >500
10-C <sub>14</sub>	3,91/126,96 125,98	3,91/3,91 3,91	>500/>500 >500
10-C <sub>16</sub>	3,91/3,91 1,95	7,81/7,81 7,81	>500/>500 >500
11-C <sub>12</sub>	0,98/0,98 0,98	2,93/3,91 5,86	7,81/11,72 17,58
11-C <sub>14</sub>	0,98/0,98 0,98	1,95/1,95 1,47	5,86/4,88 5,86
11-C <sub>16</sub>	0,98/0,98 0,98	1,95/1,95 1,95	5,86/5,86 5,86
12-C <sub>12</sub>	1,47/1,47 1,47	1,95/1,95 1,95	2,93/4,88 5,86
12-C <sub>14</sub>	0,98/0,98 0,98	1,95/1,95 1,47	1,95/1,95 16,6
12-C <sub>16</sub>	1,95/1,95 1,95	3,91/19,53 17,58	1,95/16,6 32,23
13-C <sub>8</sub>	1,95/2,93 2,93	3,91/3,91 9,77	7,81/7,81 5,86
13-C <sub>10</sub>	1,47/1,47 1,47	1,95/1,95 1,95	1,95/1,95 1,95
14-C <sub>8</sub>	3,91/3,91 3,91	31,25/31,25 15,63	46,88/46,88 31,25
14-C <sub>10</sub>	1,47/1,47 1,47	1,95/1,95 1,47	2,93/5,86 3,91
15-C <sub>12</sub>	7,81/15,63 7,81	31,25/62,5 62,5	125/125 78,13
15-C <sub>14</sub>	0,98/1,95 0,98	2,93/2,93 4,88	5,86/7,81 5,86
15-C <sub>16</sub>	0,98/0,98 1,95	1,95/1,95 2,93	1,95/1,95 1,95
16-C <sub>12</sub>	3,91/3,91 3,91	31,25/31,25 31,25	31,25/62,5 46,88
16-C <sub>14</sub>	1,95/1,95 1,95	3,91/3,91 2,93	7,81/7,81 7,81
16-C <sub>16</sub>	0,98/0,98 0,98	0,98/0,98 0,98	1,95/1,95 1,95
17-C <sub>12</sub>	2,93/2,93 2,93	9,77/9,77 32,23	46,88/46,88 46,88
17-C <sub>14</sub>	0,98/0,98 0,98	2,93/5,86 7,81	11,72/11,72 11,72
17-C <sub>16</sub>	0,74/0,74 0,74	1,47/1,47 2,93	3,91/3,91 3,91
18-C <sub>12</sub>	15,63/15,63 23,44	62,5/62,5 187,5	62,5/62,5 93,75
18-C <sub>14</sub>	2,93/2,93 1,95	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 7,81
18-C <sub>16</sub>	1,95/6,95 1,95	3,91/3,91 2,93	3,91/3,91 2,93

\*Červeně jsou označeny nejúčinnější látky, které svým antibakteriálním účinkem předčily standardní BAC<sub>12-16</sub> alespoň ve třech případech, tzn. proti třem různým G<sup>+</sup> či G<sup>-</sup> bakteriálním kmenům.

**Tabulka 5.** Minimální (MIC; 24/48hodinová inkubace) a baktericidní (MBC; 48hodinová inkubace) koncentrace (vyjádřena v  $\mu\text{mol/l}$ ) připravených látek (série 1–18) a standardních benzalkoniových solí (BAC<sub>12–16</sub>). *In vitro* aktivita byla stanovena na sedmi gramnegativních bakteriálních kmenech (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy, multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia bercovieri*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*).

MIC ( $\mu\text{mol/l}$ ); 24h/48h inkubace MBC ( $\mu\text{mol/l}$ ); 48h inkubace							
Kmen <sup>a</sup> Látka	ESCO (A1235)	KLPN ES– (C1950)	KLPN ES+ (C1934)	PSAE MR (A1245)	YEBE (CNCTC 6230)	ACBA (J3474)	STMA (J3552)
<b>BAC<sub>12</sub></b>	15,63/15,63	31,25/31,25	62,5/78,13	>500/>500	15,63/15,63	23,44/23,44	31,25/46,88
	15,63	31,25	93,75	500	15,63	23,44	62,5
<b>BAC<sub>14</sub></b>	3,91/3,91	7,81/7,81	13,68/15,63	250/250	1,95/1,95	3,91/3,91	3,91/3,91
	7,81	7,81	15,63	250	1,95	5,86	9,77
<b>BAC<sub>16</sub></b>	3,91/3,91	7,81/7,81	11,72/11,72	250/375	1,95/1,95	3,91/3,91	3,91/3,91
	3,91	7,81	11,72	500	1,95	3,91	3,91
<b>1-C<sub>12</sub></b>	62,5/62,5	125/125	250/250	>500/>500	31,25/46,88	46,88/46,88	250/375
	93,75	125	250	>500	62,5	46,88	375
<b>1-C<sub>14</sub></b>	15,63/15,63	31,25/31,25	46,88/46,88	500/500	7,81/15,63	11,72/15,63	31,25/31,25
	15,63	31,25	46,88	500	128,91	23,44	31,25
<b>1-C<sub>16</sub></b>	11,72/11,72	11,72/11,72	23,44/23,44	500/500	3,91/3,91	3,91/3,91	11,72/11,72
	11,72	11,72	23,44	500	33,21	3,91	19,53
<b>2-C<sub>12</sub></b>	46,88/62,5	46,88/46,88	125/125	>500/>500	31,25/31,25	15,63/15,63	62,5/62,5
	62,5	46,88	125	>500	23,44	15,63	93,75
<b>2-C<sub>14</sub></b>	7,81/7,81	11,72/19,53	31,25/31,25	500/500	2,93/3,91	3,91/3,91	15,63/15,63
	7,81	19,53	31,25	500	5,86	3,91	31,25
<b>2-C<sub>16</sub></b>	5,86/5,86	7,81/19,53	11,72/19,53	>500/>500	4,88/2,93	7,81/5,86	7,81/11,72
	7,81	11,72	23,44	>500	19,53	7,81	11,72
<b>3-C<sub>12</sub></b>	62,5/62,5	93,75/93,75	187,5/187,5	>500/>500	15,63/39,07	15,63/15,63	125/250
	62,5	93,75	187,5	>500	46,88	15,63	250
<b>3-C<sub>14</sub></b>	11,72/11,72	19,53/19,53	39,07/39,07	>500/>500	4,88/4,88	7,81/7,81	15,63/31,25
	11,72	19,53	39,07	>500	5,86	7,81	31,25
<b>3-C<sub>16</sub></b>	11,72/11,72	11,72/19,53	23,44/23,44	>500/>500	1,95/2,93	3,91/3,91	7,81/7,81
	11,72	19,53	23,44	>500	3,91	3,91	7,81
<b>4-C<sub>12</sub></b>	46,88/46,88	47,5/47,5	125/125	>500/>500	17,25/23,44	15,63/23,44	125/250
	46,88	62,5	125	>500	23,44	23,44	250
<b>4-C<sub>14</sub></b>	11,72/15,63	23,44/23,44	31,25/31,25	500/500	3,25/3,91	3,91/3,91	15,63/31,25
	15,63	23,44	31,25	500	5,86	3,91	31,25
<b>4-C<sub>16</sub></b>	5,86/5,86	7,81/7,81	7,81/19,53	>500/500	1,95/7,81	2,93/2,93	5,86/5,86
	5,86	7,81	15,63	500	2,45	2,93	5,86

<b>5-C<sub>12</sub></b>	125/125 125	125/250 250	250/250 250	>500/>500 >500	15,63/15,63 15,63	125/187,5 187,5	125/125 125
<b>5-C<sub>14</sub></b>	15,63/15,63 15,63	15,63/15,63 15,63	15,63/15,63 15,63	500/500 500	3,91/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63	31,25/31,25 31,25
<b>5-C<sub>16</sub></b>	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 7,81	>500/>500 >500	1,95/1,95 1,95	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63
<b>6-C<sub>12</sub></b>	125/125 125	125/125 125	250/250 250	>500/>500 >500	15,63/31,25 31,25	62,5/93,75 93,75	250/250 500
<b>6-C<sub>14</sub></b>	15,63/15,63 15,63	15,63/15,63 15,63	15,63/15,63 15,63	500/500 500	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63	31,25/46,88 62,5
<b>6-C<sub>16</sub></b>	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 7,81	>500/>500 >500	1,95/1,95 1,95	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 11,72
<b>7-C<sub>12</sub></b>	250/250 250	250/250 250	500/500 500	>500/>500 >500	250/250 250	250/250 250	500/500 500
<b>7-C<sub>14</sub></b>	187,5/187,5 187,5	125/125 125	250/333,33 250	>500/>500 >500	250/500 125	125/375 375	416,7/416,7 416,7
<b>7-C<sub>16</sub></b>	125/125 125	125/125 125	333,33/250 208,33	500/>500 >500	250/125 125	125/125 166,67	125/125 166,67
<b>8-C<sub>12</sub></b>	125/125 125	250/250 250	375/375 375	>500/>500 >500	46,88/46,88 93,75	93,75/93,75 93,75	250/250 250
<b>8-C<sub>14</sub></b>	31,25/31,25 46,88	62,5/62,5 62,5	62,5/62,5 62,5	>500/>500 >500	7,81/11,72 15,63	15,63/15,63 15,63	46,88/46,88 62,5
<b>8-C<sub>16</sub></b>	11,72/11,72 15,63	15,63/15,63 15,63	31,25/31,25 31,25	>500/>500 >500	3,91/3,91 5,86	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63
<b>9-C<sub>12</sub></b>	23,44/23,44 23,44	46,88/46,88 46,88	78,13/78,13 93,75	375/375 375	11,72/15,63 15,63	23,44/39,07 39,07	93,75/93,75 93,75
<b>9-C<sub>14</sub></b>	7,81/7,81 11,72	15,63/23,44 23,44	15,63/23,44 23,44	375/250 250	5,86/128,91 128,91	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63
<b>9-C<sub>16</sub></b>	7,81/15,63 15,63	46,88/46,88 46,88	62,5/62,5 62,5	>500/500 500	3,91/64,46 126,96	5,86/5,86 5,86	7,81/7,81 19,53
<b>10-C<sub>12</sub></b>	7,81/7,81 7,81	>500/>500 >500	>500/>500 >500	>500/>500 >500	281,25/375 375	23,44/23,44 23,44	62,5/93,75 93,75
<b>10-C<sub>14</sub></b>	3,91/500 500	>500/>500 >500	>500/>500 >500	>500/>500 >500	>500/>500 500	31,25/>500 62,5	281,3/>500 >500
<b>10-C<sub>16</sub></b>	3,91/3,91 3,91	>500/>500 >500	>500/>500 >500	>500/>500 >500	125/>500 >500	93,75/>500 >500	>500/>500 >500
<b>11-C<sub>12</sub></b>	9,77/9,77 9,77	15,63/15,63 23,44	23,44/23,44 23,44	>500/>500 >500	7,81/15,63 23,44	7,81/11,72 11,72	39,07/46,88 46,88
<b>11-C<sub>14</sub></b>	4,88/4,88 4,88	11,72/15,63 23,44	23,44/23,44 70,32	>500/>500 >500	3,91/3,91 7,81	3,91/3,91 3,91	15,63/15,63 15,63
<b>11-C<sub>16</sub></b>	4,88/4,88 4,88	15,63/15,63 15,63	23,44/23,44 39,07	>500/>500 >500	1,95/1,95 3,91	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63

<b>12-C12</b>	7,81/7,81 7,81	11,72/11,72 15,63	15,63/15,63 15,63	>500/>500 >500	1,95/375 500	3,91/3,91 3,91	7,81/7,81 7,81
<b>12-C14</b>	7,81/7,81 7,81	7,81/19,53 35,16	19,53/19,53 253,91	>500/>500 >500	1,95/250 500	3,91/3,91 3,91	7,81/7,81 7,81
<b>12-C16</b>	62,5/62,5 62,5	187,5/312,5 312,5	500/500 500	>500/>500 >500	4,88/500 500	11,72/11,72 11,72	7,81/7,81 7,81
<b>13-C8</b>	46,88/62,5 62,5	125/125 125	250/250 250	>500/>500 >500	15,63/23,44 31,25	11,72/11,72 11,72	46,88/62,5 62,5
<b>13-C10</b>	5,86/7,81 7,81	7,81/7,81 11,72	11,72/11,72 11,72	>500/>500 >500	1,95/1,95 3,91	3,91/3,91 7,81	7,81/7,81 7,81
<b>14-C8</b>	93,75/125 93,75	125/125 125	375/375 375	>500/>500 >500	46,88/46,88 62,5	93,75/93,75 93,75	187,5/250 375
<b>14-C10</b>	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 39,07	>500/>500 >500	2,93/46,88 62,5	7,81/7,81 7,81	11,72/11,72 15,63
<b>15-C12</b>	125/250 250	500/250 250	500/500 500	>500/>500 >500	7,81/62,5 62,5	125/125 125	500/500 500
<b>15-C14</b>	15,63/15,63 15,63	31,25/31,25 31,25	31,25/31,25 31,25	>500/>500 >500	7,81/7,81 15,63	6,51/6,51 5,86	31,25/31,25 39,06
<b>15-C16</b>	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63	15,63/15,63 15,63	>500/>500 >500	3,91/7,81 7,81	5,86/5,86 5,86	11,72/11,72 11,72
<b>16-C12</b>	62,5/62,5 62,5	125/125 125	250/250 250	>500/>500 >500	31,25/31,25 62,5	62,5/62,5 93,75	375/375 375
<b>16-C14</b>	15,63/15,63 15,63	31,25/31,25 31,25	31,25/31,25 31,25	>500/>500 >500	7,81/7,81 15,63	7,81/15,63 257,82	31,25/31,25 54,69
<b>16-C16</b>	3,91/3,91 3,91	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 7,81	>500/>500 >500	1,95/1,95 1,95	1,95/15,63 251,96	3,91/5,86 5,86
<b>17-C12</b>	31,25/31,25 31,25	62,5/62,5 62,5	125/125 125	>500/>500 >500	31,25/31,25 62,5	46,88/46,88 46,88	125/187,5 250
<b>17-C14</b>	15,63/15,63 15,63	15,63/15,63 15,63	31,25/31,25 31,25	500/500 500	7,81/7,81 7,81	7,81/7,81 7,81	15,63/250 250
<b>17-C16</b>	3,91/3,91 7,81	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63	>500/>500 >500	3,91/3,91 3,91	3,91/3,91 3,91	7,81/375 375
<b>18-C12</b>	375/500 500	>500/>500 >500	>500/>500 >500	>500/>500 >500	125/187,5 375	375/375 375	>500/>500 >500
<b>18-C14</b>	62,5/62,5 62,5	93,75/125 125	187,5/187,5 187,5	>500/>500 >500	78,13/140,6 156,25	31,25/46,88 46,88	93,75/125 187,5
<b>18-C16</b>	15,63/15,63 15,63	31,25/31,25 31,25	46,88/46,88 46,88	>500/>500 >500	7,81/42,81 7,81	7,81/7,81 7,81	15,63/15,63 15,63

<sup>a</sup>ESCO - *Escherichia coli* (A1235), KLPN ES- - *Klebsiella pneumoniae* (C1950), KLPN

ES+ - *K. pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy (C1934), PSAE MR - multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (A1245), YEBE - *Yersinia bercovieri* (CNCTC 6230), ACBA - *Acinetobacter baumannii* (J3474) a STMA - *Stenotrophomonas maltophilia* (J3552).

\*Červeně jsou označeny nejúčinnější látky, které svým antibakteriálním účinkem předčily standardní BAC<sub>12-16</sub> alespoň ve třech případech, tzn. proti třem různým G<sup>+</sup> či G<sup>-</sup> bakteriálním kmenům.

Jak se předpokládalo, G<sup>+</sup> bakterie byly v porovnání s G<sup>-</sup> bakteriemi k testovaným KAS citlivější díky rozdílnosti mezi buněčnými stěnami G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterií (vysvětleno v teoretické části práce) a zároveň slabší schopnosti KAS penetrovat vnější membránu G<sup>-</sup> bakterií a pod ní ležící cytoplazmatickou membránu způsobující její disrupci a únik iontů (71). Podle publikované studie Daouda a kolektivu (69) na grampozitivní bakterie maximálně působí látky s alkylovým řetězcem C<sub>14</sub> či podle Gilberta a Moora C<sub>12-14</sub> (3), zatímco na gramnegativní bakterie účinkují látky s C<sub>16</sub> (69) či C<sub>14-16</sub> (3). Z našich výsledků však vyplývá, že na G<sup>+</sup> bakterie nejefektivněji působily látky s C<sub>16</sub>. Výbornou aktivitu ovšem projevily i látky s C<sub>14</sub>. Nejslabší, i když stále ještě výbornou účinnost měly řetězce C<sub>12</sub>. Podobný efekt projevily látky i proti G<sup>-</sup> bakteriím, ovšem za použití vyšších koncentrací oproti G<sup>+</sup>. Co se týče grampozitivních bakterií, nemůžeme konstatovat, že naše výsledky odpovídají literatuře, kdežto u G<sup>-</sup> bakterií výsledky uvedeným publikacím odpovídají. Z pozorovaných výsledků nám tedy vyplývá, že účinnost látek není vždy řízena jen počtem uhlíků v dlouhém alkylovém řetězci, ale svou roli zde hraje i mnoho dalších faktorů, jako je přítomnost nukleofilních skupin v molekule, různorodá substituce aromatických uskupení či celkový počet uhlíkových atomů v molekule testovaných látek.

Všechny testované látky tedy vykazaly vysokou účinnost proti G<sup>+</sup> bakteriím a o něco slabší účinnost proti G<sup>-</sup> bakteriím. Nejcitlivějším kmenem byl *Staphylococcus aureus*. Výjimkou byl však rezistentní kmen *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR), proti kterému slabě působilo pouze několik látek při koncentraci 500 μmol/l a látky 9- C<sub>12</sub> a 9- C<sub>14</sub> při 375 či 250 μmol/l. Podobně na tuto gramnegativní bakterii působily i referenční látky BAC<sub>14</sub> a BAC<sub>16</sub>, BAC<sub>12</sub> proti ní neprojevila téměř žádný efekt. Slabý efekt testovaných látek na tento multirezistentní kmen se dal očekávat i na základě dříve publikovaných poznatků (96-98). Navíc byla zaznamenána zkřížená rezistence kromě benzalkonium chloridu také na jiné kvartérní amoniové soli (membránově-aktivní látky) (99, 100). Indukce multilékového efluxního systému (konkrétně MexCD-OprJ) byla pozorována po vystavení subinhibičním koncentracím dezinfekčních prostředků, jako jsou chlorhexidin a benzalkonium (101). Machado a kol. ukázali, že adaptivní

rezistence na benzalkonium chlorid podporovala některé změny v proteinech popsaných dříve jako proteiny zapojené v antibiotické rezistenci. Předpokládá se tedy, že existují společné mechanismy rezistence pro adaptivní a získanou rezistenci bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (102). Hodnoty logP (tj. rozdělovací koeficient) buněčných mastných kyselin byly vyšší než logP hydrofilní látky benzalkonium chlorid, která bývá obsažena v dezinfekčních přípravcích, v práci je použita jako referenční látka, a se kterou byly porovnávány výsledky testovaných KAS. Sakagami a kol. ve své publikaci diskutovali, že zvýšení množství mastných kyselin, které mají hodnoty logP vyšší než benzalkonium chloridy, snižuje schopnost benzalkonií proniknout do buněk a vede k získané rezistenci na benzalkonia. Výsledky získané v této studii naznačovaly, že rezistence kmene *Pseudomonas aeruginosa* na benzalkonia je zřejmě výsledkem zvýšeného množství fosfolipidů a neutrálních lipidů. Snížení permeability buněk při zvýšeném obsazení mastných kyselin v rezistentních kmenech nepřináší ztrátu bariérové funkce. Zdá se, že kmeny rezistentní k benzalkoniím jsou nepoškozené z důvodu snížení adsorpce a permeace buněčné stěny (103).

*Klebsiella pneumoniae* (KLPN ES<sup>-</sup>) a *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy (KLPN ES<sup>+</sup>) se jevily také odolně, resp. látka 18-C<sub>12</sub> a celá série 10 nedokázaly inhibovat či usmrtit tyto kmeny a společně s látkou 15-C<sub>12</sub> byly velmi málo účinné v porovnání s ostatními látkami. Společným strukturním znakem látek 15-C<sub>12</sub> a 18-C<sub>12</sub> je hydroxyethyllová skupina vázána přímo na dusík cyklického nearomatického heterocyklu (pyrolidin a morfolin), zatímco série 10 obsahuje hydroxylovou skupinu vázanou na cyklický aromatický heterocykl (chinolin). Tímto ale nelze jednoznačně tvrdit, že za slabý účinek může hydroxyethyllová či hydroxylová skupina, protože se vyskytovala i u některých aktivnějších sloučenin. Na druhou stranu ale zlepšuje rozpustnost testovaných látek, a tím i jejich praktickou použitelnost. Snížená citlivost této bakterie k benzalkoniiovým solím byla publikována např. v Abuzaid a kol. (104).

Při porovnání skupin 10 a 11, kdy obě obsahují aromatické bicyklické seskupení (chinolin a isochinolin), se jeví skupina 10 jako selektivní pro kmen *Escherichia coli*, ale na vankomycin-rezistentní *Enterococcus* a *Klebsiella* sp. nemá oproti isochinolinovému derivátu žádný efekt. Ačkoliv se tyto skupiny jeví jako stejné, liší se však tím, že na chinolinu je navázána hydroxylová skupina, kdežto na isochinolinu

aminoskupina. V případě porovnávání těchto dvou bicyklických heterocyklů by se dalo usuzovat, že aminoskupina hraje v antibakteriální aktivitě významnější roli.

Za zmínku také stojí celá řada 12, která sice po 24 hodinách inkubace významně inhibovala růst bakterie *Yersinia bercovieri*, ale po 48hodinové inkubaci (MIC i MBC) ji už nedokázala při nízkých koncentracích inhibovat ani usmrtit.

Jako nejslibnější dezinfekční látky zahrnující spektrum G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterií se po vyhodnocení jevíly následující zástupci: 4-C<sub>16</sub>, 5-C<sub>16</sub>, 6-C<sub>16</sub>, 11-C<sub>12</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 12-C<sub>14</sub>, 16-C<sub>16</sub> a 17-C<sub>16</sub>. Tyto látky předčily svým antibakteriálním účinkem standardní BAC alespoň ve třech případech, tzn. proti třem různým bakteriálním kmenům, a postoupily do úžšího výběru jednotlivých látek pro vytvoření dezinfekčních směsí.

## 5.2 Testování antifungální účinnosti

Během tříměsíční zahraniční stáže (program Erasmus+) na Katedře biologie Biotechnologické fakulty Univerzity v Lublani ve Slovinsku byla otestována antifungální účinnost nově syntetizovaných látek. Jelikož na testování byly určeny pouze tři měsíce, vybralo se několik látek, u kterých se alespoň částečně předpokládal antifungální potenciál. Účinnost látek (při koncentracích 1000; 500; 300; 100; 30; 10  $\mu\text{mol/l}$ ) byla testována na osmi houbových kmenech, resp. čtyřech kvasinkách (*Candida parapsilosis sensu stricto*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Exophiala dermatitidis*, *Aureobasidium melanogenum*) a čtyřech vláknitých houbách (*Bisifusarium dimerum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*). Všechny výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. Jako negativní kontrola bylo použito rozpouštědlo látek DMSO v odpovídající koncentraci, jehož inhibiční zóna měla být odečtena od inhibičních zón testovaných látek. Tento kosolvent, i když se jednalo o 100% DMSO, však neprojevil žádnou inhibici hub, proto nebyl odečet nakonec třeba. Antifungální účinnost proti kvasinkám byla stanovena po 72 hodinách inkubace, účinnost proti vláknitým houbám po 168 hodinách inkubace. Jako referenční látky byly opět použity standardní soli benzalkonia BAC<sub>12-16</sub>.



**Tabulka 6.** Minimální inhibiční koncentrace (MIC; v  $\mu\text{mol/l}$ ) nasyntetizovaných látek a benzalkoniových solí (BAC<sub>12-16</sub>). *In vitro* aktivita byla stanovena na čtyřech kmenech kvasinek (*Candida parapsilosis sensu stricto*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Exophiala dermatitidis*, *Aureobasidium melanogenum*) a čtyřech kmenech vláknitých hub (*Bisifusarium dimerum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*). Inkubační doba byla 72 hodin (kvasinky)/168 hodin (vláknité houby).

MIC ( $\mu\text{mol/l}$ ); 72h (kvasinky)/168h (vláknité houby) inkubace

Kmen <sup>a</sup> Látka	CAPA (EXF- 8411)	RHMU (EXF- 8417)	EXDE (EXF- 8470)	AUME (EXF- 8432)	BIDI (EXF- 8427)	PECH (EXF- 1818)	ASVE (EXF- 8692)	ASNI (EXF- 10185)
BAC <sub>12</sub>	1000	500	500	200	>1000	650	>1000	>1000
BAC <sub>14</sub>	300	100	100	100	1000	650	650	>1000
BAC <sub>16</sub>	1000	500	200	65	1000	650	1000	>1000
1-C <sub>12</sub>	>1000	1000	>1000	100	>1000	1000	>1000	>1000
1-C <sub>14</sub>	500	100	100	30	>1000	500	300	1000
1-C <sub>16</sub>	300	30	100	100	500	1000	300	>1000
2-C <sub>12</sub>	>1000	300	400	300	>1000	1000	1000	>1000
2-C <sub>14</sub>	300	30	30	30	>1000	300	300	>1000
2-C <sub>16</sub>	100	100	65	30	500	300	100	1000
3-C <sub>12</sub>	>1000	500	1000	300	>1000	1000	>1000	>1000
3-C <sub>14</sub>	300	100	30	30	>1000	300	100	>1000
3-C <sub>16</sub>	100	100	30	30	500	750	200	>1000
4-C <sub>12</sub>	>1000	500	1000	100	>1000	1000	1000	>1000
4-C <sub>14</sub>	300	100	100	30	>1000	100	100	>1000
4-C <sub>16</sub>	100	100	30	30	500	300	65	>1000
5-C <sub>12</sub>	>1000	>1000	>1000	300	>1000	>1000	>1000	>1000
8-C <sub>12</sub>	>1000	1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000
8-C <sub>14</sub>	500	100	500	100	>1000	300	500	>1000
8-C <sub>16</sub>	300	100	100	30	750	100	400	>1000
12-C <sub>12</sub>	200	100	100	30	300	200	200	>1000
12-C <sub>14</sub>	750	750	100	65	1000	200	300	>1000
12-C <sub>16</sub>	>1000	>1000	>1000	400	>1000	>1000	400	>1000
13-C <sub>8</sub>	500	1000	500	255	>1000	500	650	>1000
13-C <sub>10</sub>	30	30	100	100	500	300	500	>1000
14-C <sub>8</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
14-C <sub>10</sub>	100	100	100	65	300	100	300	>1000
15-C <sub>12</sub>	>1000	1000	1000	200	>1000	300	>1000	>1000
15-C <sub>14</sub>	500	300	100	30	>1000	>1000	500	>1000
15-C <sub>16</sub>	750	100	65	10	1000	300	500	>1000
16-C <sub>12</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
16-C <sub>14</sub>	500	300	500	100	>1000	500	1000	1000
16-C <sub>16</sub>	300	100	300	30	1000	100	1000	>1000

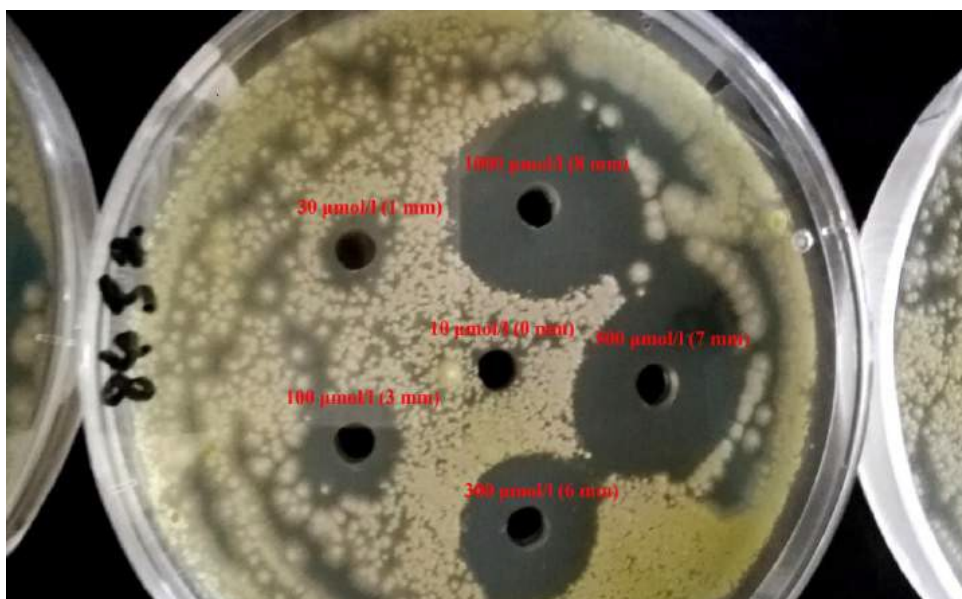
17-C <sub>12</sub>	1000	300	1000	300	>1000	>1000	1000	>1000
17-C <sub>14</sub>	200	30	65	20	1000	300	300	400
17-C <sub>16</sub>	300	100	30	55	1000	300	200	>1000
18-C <sub>12</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000
18-C <sub>14</sub>	1000	1000	500	65	1000	1000	1000	>1000
18-C <sub>16</sub>	500	300	100	20	1000	400	500	1000

<sup>a</sup>CAPA - *Candida parapsilosis sensu stricto* (EXF-8411), RHMU - *Rhodotorula mucilaginosa* (EXF-8417), EXDE - *Exophiala dermatitidis* (EXF-8470), AUME - *Aureobasidium melanogenum* (EXF-8432), BIDI - *Bisifusarium dimerum* (EXF-8427), PECH - *Penicillium chrysogenum* (EXF-1818), ASVE - *Aspergillus versicolor* (EXF-8692), ASNI - *Aspergillus niger* (EXF-10185).

\*Červeně jsou označeny nejúčinnější látky, které svým antifungálním účinkem předčily standardní benzalkoniové soli BAC<sub>12-16</sub>.

Téměř všechny testované látky vykazaly určitou účinnost proti testovaným kmenům hub. Výjimkou však byly látky 14-C<sub>8</sub> a 16-C<sub>12</sub> (popř. také 18-C<sub>12</sub>), které byly kompletně neúčinné proti všem kmenům i při nejvyšší koncentraci 1000 µmol/l. Strukturně můžeme říct, že u látky 14-C<sub>8</sub> i přes přítomnost dvou delších alkylových řetězců, a tudíž i větší lipofilitu látky, je třeba dodržet určitou minimální délku dlouhého lipofilního řetězce (tzn. více než 8 uhlíků), což nám potvrdily i výsledky řady 13, kde se látky chovaly podobně. U látek 16-C<sub>12</sub> a 18-C<sub>12</sub> bylo evidentní, že v případě jednoho dlouhého alkylového řetězce s 12 uhlíky v řadě napojeného na dusík, který je součástí šestičlenného nearomatického heterocyklu, byla antifungální aktivita významně omezena či úplně eliminována.

Z hlediska rezistence na KAS se plíseň *Aspergillus niger* jevila v porovnání s ostatními kmeny jednoznačně jako nejodolnější. Žádná standardní benzalkoniová sůl nebyla schopna inhibovat růst tohoto kmene. Z nových testovaných látek bylo pouze pět zástupců (1-C<sub>14</sub>, 2-C<sub>16</sub>, 16-C<sub>14</sub> a 18-C<sub>16</sub> při 1000 µmol/l; 17-C<sub>14</sub> při 400 µmol/l) schopno slabě inhibovat růst tohoto odolného kmene. Nicméně v literatuře byla necitlivost k benzalkoniím opakovaně publikována (105, 106). Naopak, nejcitlivějším kmenem byla kvasinka *Aureobasidium melanogenum* (obr. 6), která při testování inhibiční aktivity látkou 4-C<sub>14</sub> vykazala MIC = 30 µmol/l. Proti kvasinkám v porovnání s BAC<sub>12-16</sub> nejvíce účinkovaly látky 2-C<sub>14</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 13-C<sub>10</sub> a 17-C<sub>14</sub>. Nejvyšší citlivost proti vláknitým houbám byla pozorována u látek 2-C<sub>16</sub>, 4-C<sub>16</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 14-C<sub>10</sub> a 17-C<sub>14</sub>.



**Obrázek 6.** Testování inhibice kvasinky *Aureobasidium melanogenum* (EXF-8432) látkou 4-C<sub>14</sub> na Malt Extract agaru; MIC = 30 µmol/l.

Všechny látky s alkylovým řetězcem C<sub>16</sub> (nejvíce však 2-C<sub>16</sub>, 3-C<sub>16</sub>, 4-C<sub>16</sub>, 17-C<sub>16</sub>) projevily proti kvasinkám lepší účinek než standardní benzalkonia, s výjimkou 12-C<sub>16</sub>, na kterou byly odolné tři kmeny kvasinek ze čtyř. Je tedy evidentní, že pokud máme homologické řady látek s jedním dlouhým alkylovým řetězcem, je delší řetězec (v tomto případě 16 uhlíků) pro tuto aktivitu vhodnější. Můžeme také usuzovat, že antifungální aktivita opět do jisté míry roste, pokud se na struktuře nachází další menší lipofilní substituent (methyl, ethyl). Hydrofilní substituenty by v této aktivitě nemusely hrát až tak důležitou roli.

Ze skupiny látek 12, 13 i 14 je zřejmé, že pokud máme více dlouhých alkylových řetězců, je třeba brát v úvahu nejen jejich délku, ale nakonec i celkový součet uhlíků v těchto řetězcích. Jak bylo komentováno výše, dva alkylové řetězce s délkou C<sub>8</sub> (látky 13-C<sub>8</sub> a 14-C<sub>8</sub>) jsou pro nárůst antifungální aktivity nedostačující. Ale naopak, jestliže zachováme součet 20 uhlíků na dva alkylové řetězce, tedy dvakrát C<sub>10</sub> (13-C<sub>10</sub>, 14-C<sub>10</sub>) nebo C<sub>8</sub> + C<sub>12</sub> (12-C<sub>12</sub>), můžeme pozorovat významný nárůst antifungální aktivity. Při dalším zvyšování počtu uhlíků v řetězcích (12-C<sub>14</sub>, 12-C<sub>16</sub>) už k nárůstu aktivity dále nedocházelo, spíše naopak.

Z literatury je známo, že maximální aktivita proti kvasinkám je při délce alkylového řetězce s počtem uhlíků  $n = 12-14$  u cetrimonium bromidu a benzalkonium bromidu (3) a celkově proti houbám při  $n = 12$  u cetrimonium bromidu (69). Avšak v jiné literatuře

byla optimální antifungální aktivita stanovena kvadratickými rovnicemi vysvětlujícími závislost aktivity na délce alkylového řetězce a indikována při  $n = 16$  (107). Naše výsledky odpovídají spíše  $n = 14-16$ , pokud mezi sebou porovnááme MIC látek pouze s počtem uhlíků 12, 14 a 16. V různých publikacích jsou pro nejvhodnější efekt proti houbám udávány rozdílné délky alkylových řetězců, což může být způsobeno tím, že se jedná o obměny známých struktur a odlišné kmeny, z tohoto důvodu by mohly sloučeniny proti houbám působit jinak. Díky těmto výsledkům však můžeme konstatovat, že jako látky s nejvyšší aktivitou proti všem testovaným houbám, které předčily standardní látky, se jeví 2-C<sub>16</sub>, 4-C<sub>16</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 17-C<sub>14</sub>, a ty by potenciálně mohly představovat jedny ze složek nových dezinfekčních směsí.

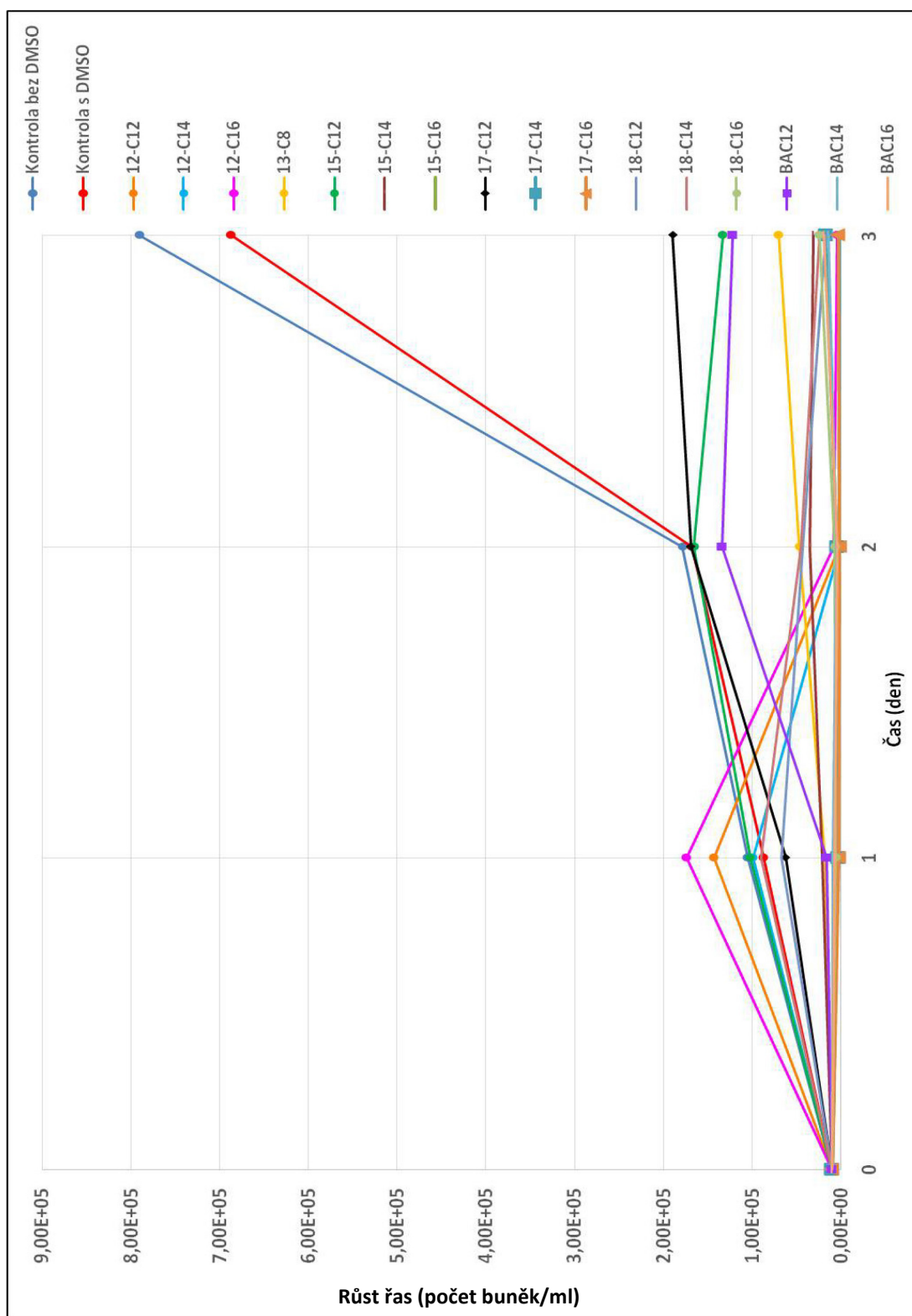
### 5.3 Testování inhibice růstu zelených řas

Během stáže v Lublani byly ve spolupráci s Katedrou genetické toxikologie a biologie rakoviny Národního institutu biologie ve Slovinsku otestovány vybrané látky také na inhibici růstu zelených jednobuněčných sladkovodních mikrořas *Pseudokirchneriella subcapitata*. Výsledky testovaných látek byly porovnávány se standardními benzalkoniovými solemi (obr. 7). Pro potvrzení správného postupu testování byla jako referenční toxická látka použita chemikálie 3,5-dichlorfenol.

V současné době je řasa *Pseudokirchneriella subcapitata* nejznámějším a nejčastěji používaným ekotoxikologickým bioindikátorem čistoty vody a přítomnosti toxických látek ve vodě doporučeným pro ekotoxikologické biologické testy (monitorování kvality vody a hodnocení ekologických rizik) Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj z důvodu její vyšší míry růstu, větší citlivosti na toxické látky a dobré reprodukovatelnosti ve srovnání s jinými řasami (88, 108).

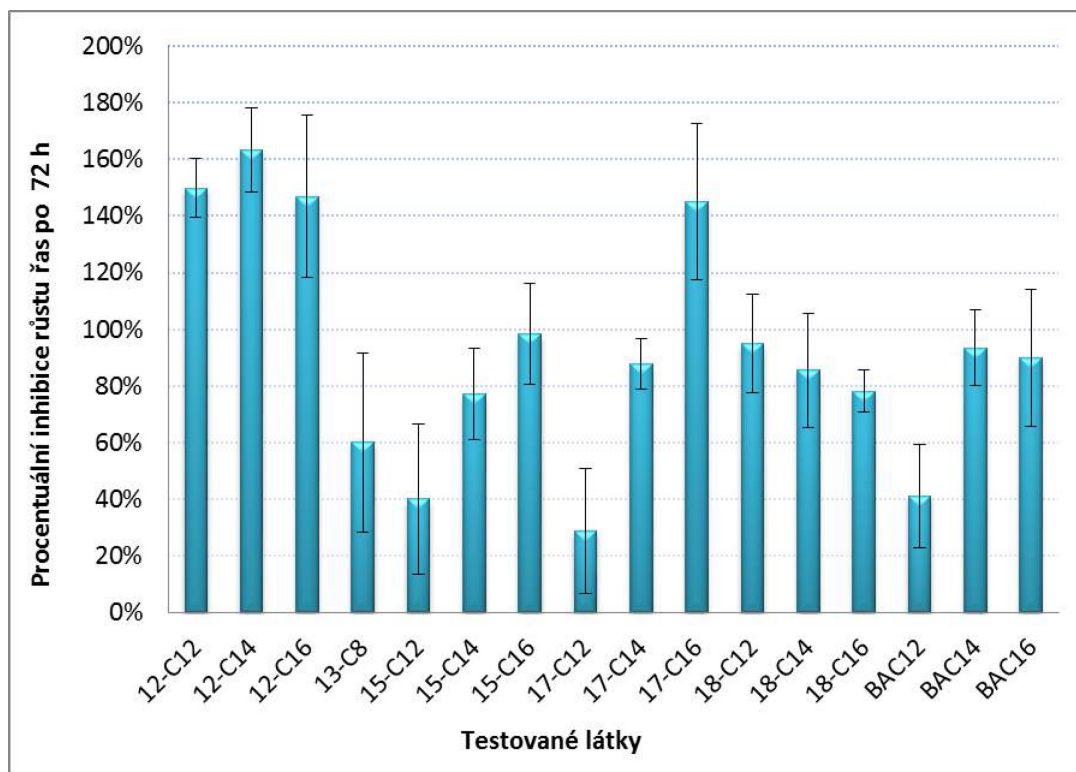
Obecně je známo, že benzalkonium chlorid je jedna z nejběžnějších složek nemocničních a domácích dezinfekcí, která je společně se zbytky léků pravidelně detekována v nemocničních i komunálních odpadních vodách. Ekotoxikologické studie prokázaly, že KAS jsou vysoce toxické k různým vodním organismům (109-115). Mimoto, ve vodním prostředí se KAS nevyskytují jako jednotlivé látky, ale ve směsích s jinými chemickými kontaminanty (116). Eleršek a kolektiv ve své publikaci (117) potvrdili vysokou toxicitu benzalkonium chloridu přímo na námi testované řasy

*Pseudokirchneriella subcapitata*. Nicméně, i přes tyto na pohled negativní vlastnosti KAS, by látky toxické pro řasy, tudíž nešetrné k životnímu prostředí, mohly potenciálně najít využití na místech, kde je jejich růst nechtěný, např. povrchy bazénů, fontán, monumentů, dřevěných lodí, raftů, turistických jeskyní atd. (75, 76).

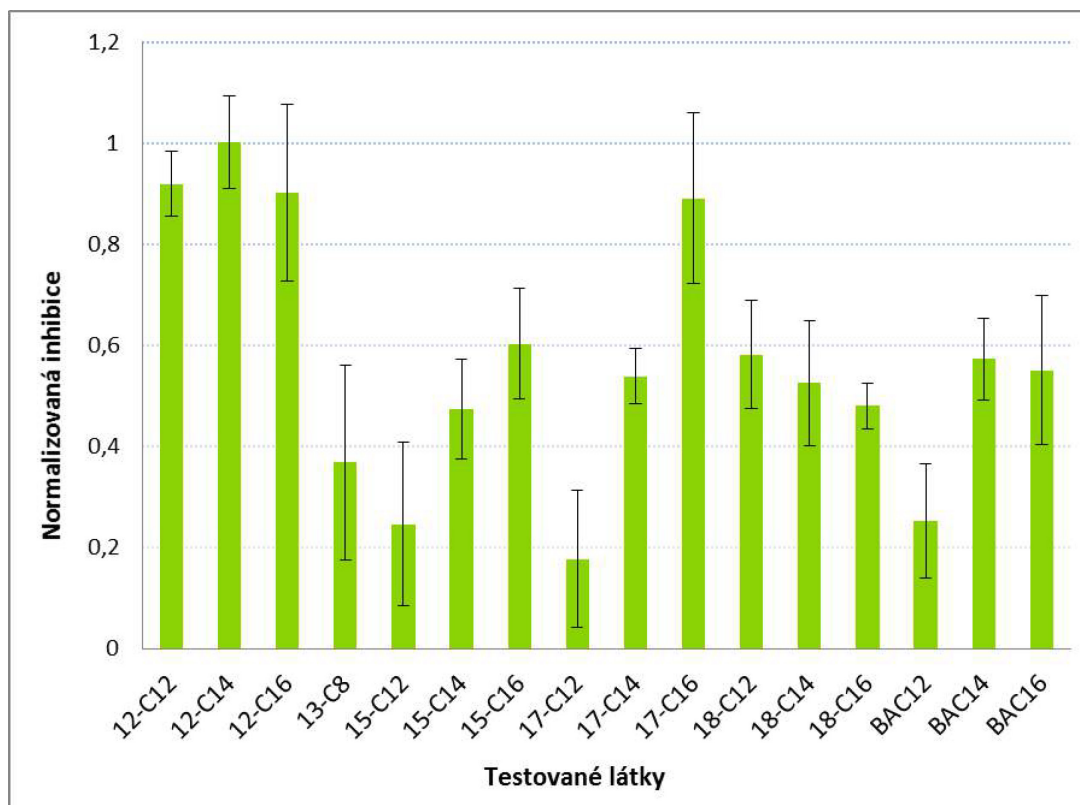


**Obrázek 7.** Rychlost růstu řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* (počet buněk/ml) v přítomnosti jednotlivých látek a standardních benzalkoniových solí (BAC<sub>12-16</sub>) v porovnání s kontrolami (OECD médium bez DMSO a OECD médium s DMSO) měřena pomocí průtokového cytometru po 1, 2 a 3 dnech.

Do následující části jsem vložila dva různé grafy (grafy s procentuální a normalizovanou inhibicí) vyjadřující stejné výsledky jiným způsobem z toho důvodu, že procentuální graf (obr. 8) vyjadřuje inhibici kvantitativně v procentech, ale v publikacích bývá většinou upřednostňován snadněji pochopitelný normalizovaný graf (obr. 9).



**Obrázek 8.** Procentuální inhibice růstu zelených řas *Pseudokirchneriella subcapitata* po 72 hodinách. Maximální procentuální inhibiční hodnota je 163 % (odvozeno od látky s největším inhibičním účinkem, tj. 12-C<sub>14</sub>) a minimální (resp. žádnou) inhibici představuje hodnota 0 % (maximální nárůst kontroly, tj. nárůst řasy v rozpouštědle DMSO a OECD médiu, po 72 hodinách). Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky.



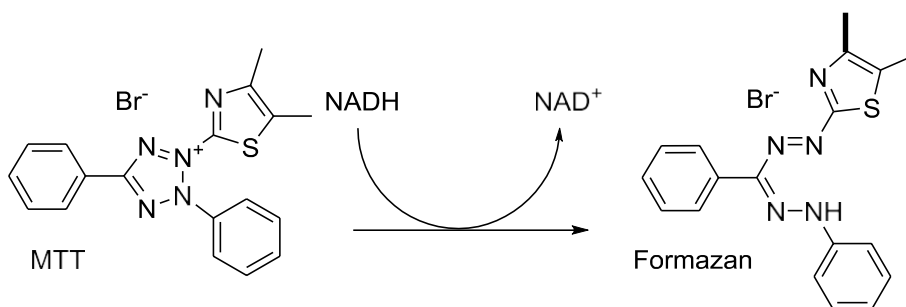
**Obrázek 9.** Normalizovaná inhibice růstu zelené řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* po 72 hodinách odvozená od procentuální inhibice. Maximální inhibiční hodnota je normalizovaná na hodnotu 1 (odvozeno od látky s největším inhibičním účinkem, tj. 12-C<sub>14</sub>) a minimální inhibice (resp. žádná) je normalizovaná na hodnotu 0 (odvozeno od kontroly, tj. řasy v rozpouštědle DMSO a OECD médiu). Směrodatné odchylky jsou prezentovány jako chybové úsečky.

I přes pokus najít netoxické látky nám všechny testované látky a standardní benzalkonia (BAC<sub>12-16</sub>) po 72 hodinách inhibovaly růst řas *Pseudokirchneriella subcapitata*. Ovšem tato vlastnost byla podle publikací u KAS předpovídaná. 17-C<sub>12</sub> prokázala ze všech testovaných látek nejšetnější potenciál k životnímu prostředí, stále však vykazovala 29% inhibici růstu. Celá série 12 a látka 17-C<sub>16</sub> byly stanoveny jako látky s největší inhibicí růstu řasy (v případě grafu s procentuální inhibicí růstu se jednalo o 145-163% inhibici uvedenými látkami, zatímco kontrola činila 0% inhibici). V porovnání se standardními solemi BAC (41-93% inhibice růstu) vykazovaly naše látky vyšší nebo srovnatelný inhibiční efekt, jak je znázorněno v grafu s procentuální (obr. 8) a normalizovanou (obr. 9) inhibicí. Největší inhibiční účinek řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* projevila látka 12-C<sub>14</sub>.



## 5.4 *In vitro* testování cytotoxicity a lipofilita

Hlavním smyslem MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) testování je měření viabilních buněk pomocí 96jamkových destiček bez nutnosti počítání buněk. Z tohoto důvodu je tato metoda nejběžněji používaná pro stanovení cytotoxicity látek při různých koncentracích. Principem MTT testu je, že pro většinu životaschopných buněk je mitochondriální aktivita konstantní, a proto zvýšení nebo snížení v počtu viabilních buněk je lineárně úměrné mitochondriální aktivitě (118). Mitochondriální aktivita buněk se odráží v konverzi (redukci) tetrazoliové soli MTT (inkubované 1–4 hodiny) na krystaly formazanu (obr. 10), které mohou být pro měření solubilizovány. Koncentrace formazanu (zvýšení nebo snížení v počtu životaschopných buněk) může být spektrofotometricky měřena zaznamenáváním změn v absorbanci při vlnové délce 570 nm (používá se také referenční vlnová délka 630 nm) (119). Hodnoty optických denzit jamek s buňkami inkubovaných s testovanými látkami jsou porovnávány s denzitami kontrolních jamek obsahující pouze buňky (bez exponování testovaným látkám). Snížení počtu buněk signalizuje inhibici buněčného růstu a výsledek je pak udáván jako koncentrace látky, která je nutná k dosažení 50% růstové inhibice ve srovnání s růstem kontroly bez testované látky ( $IC_{50}$ , 50% inhibiční koncentrace) (118).



**Obrázek 10.** Redukce žluté tetrazoliové soli MTT mitochondriálními reduktázami dýchacího řetězce na fialový formazan. Obrázek byl adaptován dle (119).

Lipofilita je jednou z nejvíce studovaných fyzikálně-chemických vlastností látek (vztahy mezi strukturou a aktivitou), často koreluje s biologickou aktivitou a hraje významnou roli v designování nových látek. Může být měřena metodami založenými na mikrotitračním dělení, vysoce účinné kapalinové chromatografii nebo kapilární

elektroforéze. Lipofilita organické sloučeniny je nejčastěji popsána tzv. rozdělovacím koeficientem logP (vyjádřeným jako calculated logP, tedy Clog *P*), který může být definován jako poměr koncentrace neionizované formy látky během rovnováhy mezi organickou a vodnou fází (120-122).

Počítání lipofility látek s použitím softwaru MarvinSketch (v14.9.8.0) prováděl PharmDr. Lukáš Prchal, Ph.D. společně s doc. Mgr. et Mgr. Rafaelem Doležalem, Ph.D. v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové. Jelikož je zde vypočítaná lipofilita uvedena pouze pro porovnání vztahu struktura-aktivita a nejedná se o *in vitro* metodiku, není v této práci uveden protokol.

**Tabulka 7.** Cytotoxický potenciál a Clog *P* připravených sloučenin a *N*-benzalkoniových solí (BAC<sub>12-16</sub>). *In vitro* aktivita je vyjádřena jako IC<sub>50</sub> (μmol/l) ± SEM (n = 3).

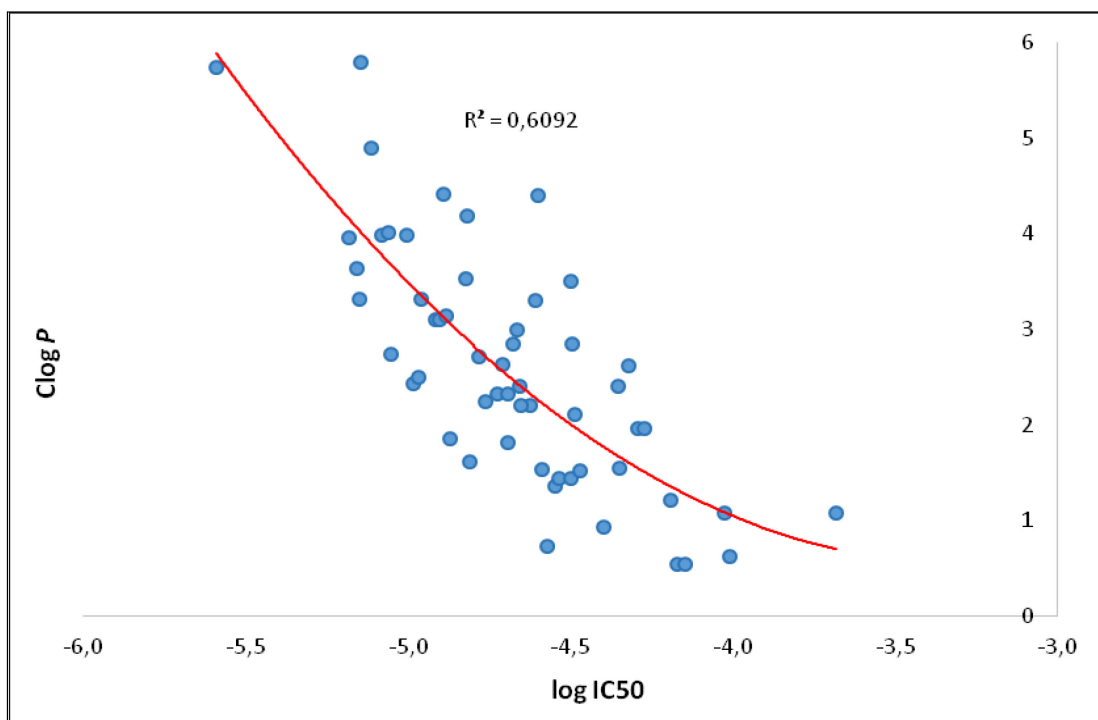
Testovaná látka	Cytotoxicita		Lipofilita
	IC <sub>50</sub> (μmol/l)	±SEM (μmol/l)	Clog <i>P</i>
<b>BAC<sub>12</sub></b>	19,54	1,2	2,63
<b>BAC<sub>14</sub></b>	15,04	0,1	3,52
<b>BAC<sub>16</sub></b>	12,85	1,4	4,41
<b>1-C<sub>12</sub></b>	39,83	5,1	0,93
<b>1-C<sub>14</sub></b>	20,31	2,4	1,81
<b>1-C<sub>16</sub></b>	16,45	2,1	2,70
<b>2-C<sub>12</sub></b>	23,85	4,3	2,21
<b>2-C<sub>14</sub></b>	12,18	0,3	3,10
<b>2-C<sub>16</sub></b>	9,88	0,1	3,98
<b>3-C<sub>12</sub></b>	22,34	1,3	2,21
<b>3-C<sub>14</sub></b>	12,48	1,1	3,10
<b>3-C<sub>16</sub></b>	8,27	1,6	3,98
<b>4-C<sub>12</sub></b>	28,29	3,9	1,36
<b>4-C<sub>14</sub></b>	17,25	1,9	2,25
<b>4-C<sub>16</sub></b>	13,07	0,0	3,14
<b>5-C<sub>12</sub></b>	67,07	0,0	0,54
<b>5-C<sub>14</sub></b>	29,16	0,2	1,43
<b>5-C<sub>16</sub></b>	18,87	1,2	2,32
<b>6-C<sub>12</sub></b>	71,42	11,7	0,54
<b>6-C<sub>14</sub></b>	31,58	4,6	1,43
<b>6-C<sub>16</sub></b>	20,24	2,7	2,32
<b>7-C<sub>12</sub></b>	25,94	0,3	1,54
<b>7-C<sub>14</sub></b>	10,41	0,8	2,42
<b>7-C<sub>16</sub></b>	7,07	0,6	3,31
<b>8-C<sub>12</sub></b>	64,48	7,5	1,21
<b>8-C<sub>14</sub></b>	32,46	3,3	2,10
<b>8-C<sub>16</sub></b>	21,69	2,1	2,99

9-C <sub>12</sub>	47,61	0,2	2,62
9-C <sub>14</sub>	31,68	2,2	3,51
9-C <sub>16</sub>	25,21	4,3	4,40
10-C <sub>12</sub>	44,17	1,2	2,41
10-C <sub>14</sub>	24,67	2,8	3,30
10-C <sub>16</sub>	15,19	0,8	4,19
11-C <sub>12</sub>	13,48	0,1	1,85
11-C <sub>14</sub>	8,83	0,1	2,74
11-C <sub>16</sub>	6,92	1,0	3,63
12-C <sub>12</sub>	8,69	0,3	4,01
12-C <sub>14</sub>	7,69	0,2	4,90
12-C <sub>16</sub>	7,12	0,7	5,79
13-C <sub>8</sub>	6,58	0,1	3,96
13-C <sub>10</sub>	2,57	0,7	5,74
14-C <sub>8</sub>	44,54	1,7	1,54
14-C <sub>10</sub>	10,97	3,4	3,32
15-C <sub>12</sub>	98,06	0,9	0,62
15-C <sub>14</sub>	33,94	1,3	1,51
15-C <sub>16</sub>	21,98	0,4	2,40
16-C <sub>12</sub>	93,94	5,2	1,07
16-C <sub>14</sub>	50,86	3,7	1,96
16-C <sub>16</sub>	21,10	0,0	2,85
17-C <sub>12</sub>	26,90	3,0	0,72
17-C <sub>14</sub>	15,51	0,9	1,61
17-C <sub>16</sub>	10,75	1,0	2,50
18-C <sub>12</sub>	208,35	40,8	1,07
18-C <sub>14</sub>	53,18	3,8	1,96
18-C <sub>16</sub>	31,90	1,9	2,85

\*Červeně je označena látka s nejnižším cytotoxickým účinkem.

*In vitro* testování cytotoxicity nových látek (tab. 7) potvrdilo předpokládaný trend popsany již dříve (49, 62), kdy se vzrůstající lipofilitou (resp. množstvím uhlíků ve struktuře) roste i cytotoxicita látek testována na savčích buňkách (čím nižší IC<sub>50</sub> vyjádřená v μmol/l, tím vyšší cytotoxický účinek látky), který byl zaznamenán i u KAS nesoucí dva alkylové řetězce (série 13 a 14). Tento efekt je pravděpodobně způsoben vzrůstající lipofilitou vyjádřenou jako Clog *P* (tab. 7) látek se stoupající délkou uhlíkatého řetězce (obr. 11), a tím pádem jeho schopností penetrovat do buněk snadněji. Jako nejméně toxická se tedy jevila látka 18-C<sub>12</sub> (IC<sub>50</sub> = 208,35 μmol/l, v tabulce označena červeně), naopak jako nejvíce toxická se projevovala látka 13-C<sub>10</sub> (IC<sub>50</sub> = 2,57 μmol/l). Pouze látky 11-C<sub>12</sub> a 12-C<sub>12</sub> byly více toxické než standardní benzalkonia o stejné délce uhlíkatého řetězce, s délkou řetězce 14 bylo oproti standardům stejné délky

řetězce toxičtějších pět látek (2-C<sub>14</sub>, 3-C<sub>14</sub>, 7-C<sub>14</sub>, 11-C<sub>14</sub>, 12-C<sub>14</sub>) a s počtem 16 uhlíků se jevílo šest látek (2-C<sub>16</sub>, 3-C<sub>16</sub>, 7-C<sub>16</sub>, 11-C<sub>16</sub>, 12-C<sub>16</sub>, 17-C<sub>16</sub>) toxičtějších než standardní soli. Co se týče cytotoxického potenciálu, dalo by se snížení cytotoxicity podle studie Yamamoto a kolektivu (123) vyřešit přípravou bis-kvartérních amoniových solí, u kterých je také méně pravděpodobné, že způsobí podráždění kůže než stávající KAS (např. BAC). Tato publikace však nezahrnovala testování antimikrobiální účinnosti.



**Obrázek 11.** Závislost buněčné viability, resp. cytotoxického potenciálu připravených sloučenin a standardních látek BAC<sub>12-16</sub>, (vyjádřené jako log IC<sub>50</sub>) na lipofilitě látek (vyjádřené jako Clog P).

Ze strukturální studie je zřejmé, že cytotoxicitu významně zvyšuje nejen narůstající počet uhlíků u dlouhých alkylových řetězců, ale rovněž přítomnost a počet aromatických uskupení (benzyl, pyridin, chinolin atd.). Naopak deriváty nasycených heterocyklů se při porovnání s aromatickými heterocykly jeví při stejných délkách a počtech postranních dlouhých řetězců jako méně cytotoxické. Dále lze z výsledků pozorovat, že přítomnost hydroxylové skupiny ve struktuře molekuly (pokud není významně přebita lipofilními uskupeními jako v případě řady 10) má pozitivní vliv na cytotoxicitu připravených látek a činí tak látky bezpečnější.

Cytotoxicita látky 13-C<sub>10</sub> je umocněna nejen přítomností dvou dlouhých řetězců, ale i benzylové skupiny, která taktéž významně zvyšuje cytotoxický vliv, proto se dalo předpokládat, že bude ze všech látek nejtoxičtější. I když obě řady 13 a 14 nesou na své molekule vždy dva stejně dlouhé alkylové řetězce (buď C<sub>8</sub> nebo C<sub>10</sub>), řada 13 však obsahuje již zmíněný benzylový místo 2-hydroxyethylu přítomného u řady 14, a tím se nám potvrdil předpoklad, že benzylový ještě více zvyšuje cytotoxický potenciál. U řady 12 je potřeba zmínit, že tyto homology nelze zcela porovnávat s BAC, protože oproti nim mají navíc jeden lipofilní řetězec, který také zvyšuje toxicitu, avšak na druhou stranu nemají benzylový substituent, takže je zřejmé, že další alkylový řetězec zvyšuje cytotoxicitu více než benzylový zbytek v molekule látky. Vliv pozice substituentu na pyridinovém jádře na cytotoxicitu nebyl hodnocen jako významný.

Byl také pozorován určitý vztah mezi cytotoxicitou a antimikrobiální účinností. Nejméně toxická látka (18-C<sub>12</sub>) potřebovala k projevu antimikrobiálního efektu dosti vysoké koncentrace oproti jiným látkám, zatímco u nejtoxičtější látky (13-C<sub>10</sub>) tomu bylo právě naopak.

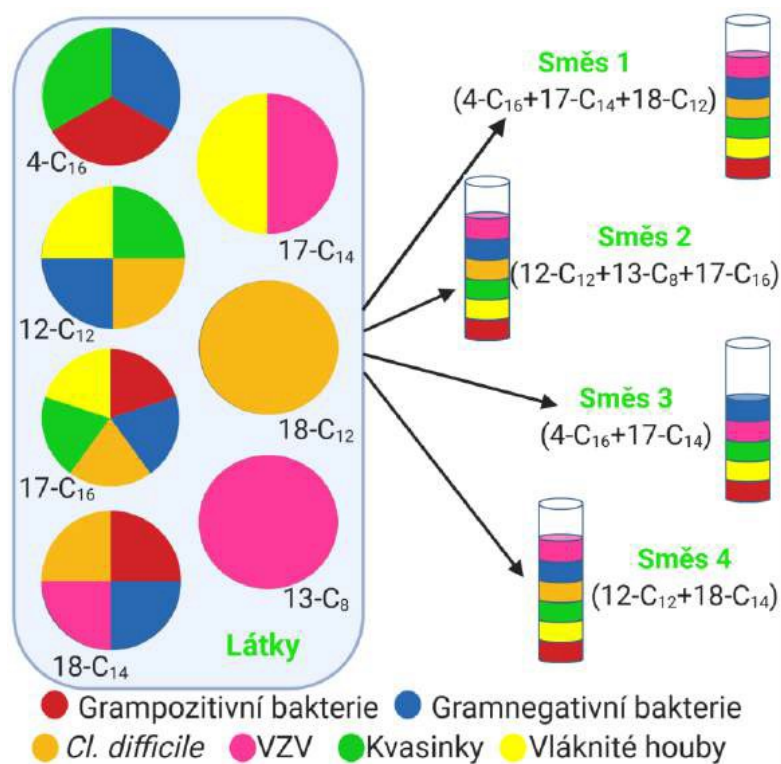
## 5.5 Formulace dezinfekčních směsí

Jako nejslibnější se proti aerobním bakteriím jevíly látky 4-C<sub>16</sub>, 5-C<sub>16</sub>, 6-C<sub>16</sub>, 11-C<sub>12</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 12-C<sub>14</sub>, 16-C<sub>16</sub>, 17-C<sub>16</sub> a 18-C<sub>14</sub>. Nejvyšší účinnost proti kvasinkám i vláknitým houbám byla zpozorována u látek 2-C<sub>14</sub>, 2-C<sub>16</sub>, 3-C<sub>16</sub>, 4-C<sub>16</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 13-C<sub>10</sub>, 14-C<sub>10</sub>, 17-C<sub>14</sub> a 17-C<sub>16</sub>.

Dále bylo provedeno testování jednotlivých látek proti anaerobní bakterii *Clostridium difficile* a VZV (v této práci sice nejsou samostatně uvedeny výsledky jednotlivých látek, ty nejlepší jsou níže rekapitulovány jednou větou a byly již publikovány naší skupinou v Soukup a kol. (82), ale jsou zde shrnuty výsledky všech dezinfekčních směsí). Proti anaerobní bakterii *Clostridium difficile* prokázaly nejvyšší účinnost při 8minutové expozici látky 12-C<sub>12</sub> (při koncentraci 0,5 %), 17-C<sub>16</sub> (0,05 %), 18-C<sub>12</sub> (0,5 %) a 18-C<sub>14</sub> (0,5 %). Látka 17-C<sub>14</sub> (0,01%) redukovala virový titr VZV o 5 řádů při 5minutové expozici viru dezinfekční látkou. O něco méně účinné byly látky 13-C<sub>8</sub> o koncentraci 0,01 % (redukční faktor 3,84) a 18-C<sub>14</sub> o stejné koncentraci (redukční faktor 3).

Hodnocením cytotoxicity pomocí MTT testu se jako nejméně toxická jevila látka 18-C<sub>12</sub> (IC<sub>50</sub> = 208,35 μmol/l), naopak jako nejvíce toxická se projevovala látka 13-C<sub>10</sub> (IC<sub>50</sub> = 2,57 μmol/l).

Na základě výše zmíněných výsledků *in vitro* testování byly vybrány tyto neúčinnější látky: 4-C<sub>16</sub> (G+ a G- bakterie, kvasinky), 12-C<sub>12</sub> (G- bakterie, kvasinky, vláknité houby, *C. difficile*), 13-C<sub>8</sub> (VZV), 17-C<sub>14</sub> (vláknité houby, VZV), 17-C<sub>16</sub> (G+ a G- bakterie, kvasinky, vláknité houby, *C. difficile*), 18-C<sub>12</sub> (*C. difficile*), 18-C<sub>14</sub> (G+ a G- bakterie, *C. difficile*, VZV). Následně byly navrženy kombinace látek za účelem pokrytí celého spektra patogenů.



**Obrázek 12.** Formulace dezinfekčních směsí (1–4) z neúčinnějších látek (4-C<sub>16</sub>, 12-C<sub>12</sub>, 13-C<sub>8</sub>, 17-C<sub>14</sub>, 17-C<sub>16</sub>, 18-C<sub>12</sub>, 18-C<sub>14</sub>) za účelem pokrytí celého spektra patogenů (grampozitivní a gramnegativní bakterie, anaerobní bakterie *Clostridium difficile*, virus varicella-zoster, kvasinky, vláknité houby).

Byly tedy formulovány směsi (obr. 12), které by měly vykazovat účinnost proti bakteriím, houbám i virům a v ideálním případě by neměly dráždit pokožku. Látky, které vykazovaly nízkou rozpustnost ve vodě, byly z dalšího testování vyloučeny,

protože by tato vlastnost znemožnila jejich formulaci do koncentrovaných vodných roztoků a tedy jejich praktické využití. Jednalo se tedy o tyto formulované směsi:

**Směs 1:** 4-C<sub>16</sub> + 17-C<sub>14</sub> + 18-C<sub>12</sub>

**Směs 2:** 12-C<sub>12</sub> + 13-C<sub>8</sub> + 17-C<sub>16</sub>

**Směs 3:** 4-C<sub>16</sub> + 17-C<sub>14</sub>

**Směs 4:** 12-C<sub>12</sub> + 18-C<sub>14</sub>

Dvě tříslložkové (1 a 2) a dvě dvousložkové (3 a 4) směsi byly nejprve připraveny v 1% souhrnné koncentraci účinných látek. Kvantitativními suspenzními testy proti aerobním bakteriím a kvasinkám byly však testovány směsi jak 1%, tak i 0,1%. Díky výborným výsledkům při obou koncentracích směsí, resp. jejich účinných látek, za expoziční čas 5 minut a snižující se kožní dráždivosti s klesající koncentrací jsme se rozhodli provést i zbývající testování (testy kožní dráždivosti a kvantitativní testování směsí proti anaerobní bakterii *Clostridium difficile*, plísni *Aspergillus fumigatus* a VZV) při nižší koncentraci (tj. 0,1 %).

Výsledky byly porovnávány se standardně používaným prostředkem Ajatin, jenž byl naředěn tak, aby taktéž obsahoval celkově 0,1 % účinných látek (tzn. solí BAC) a jeho výsledky tak mohly být korelovány s testovanými látkami. Jak již bylo dříve zmíněno, na následujících stránkách sice bude pojednáváno o 0,1% či 1% formulovaných směsích a Ajatinu, ve skutečnosti se však jedná o směsi a Ajatin souhrnně obsahující 0,1 či 1 % účinných látek.

### **5.5.1 Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s aerobními bakteriemi a kvasinkami**

Testování prokázalo, že po 5minutové expozici byly všechny testované kmeny (met icilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, vankomycin-rezistentní *Enterococcus*, *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy, multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*) maximálně citlivé jak vůči všem testovaným směsím (1–4) v koncentracích 0,1 % (účinných látek), tak i vůči přípravku Ajatin o stejné koncentraci jeho účinných látek, tj. BAC (viz níže).

Výsledky jsou vyjádřeny v CFU (kolonii tvořící jednotka)/ml. U každého kmene je uveden počet bakteriálních/kvasinkových buněk základních suspenzí (v CFU/ml), které byly pro testování použity. Ty sloužily pro porovnání s nárůstem kontrol (započítáno celkové ředění 1000x provedené během testování), popř. pro potenciální výpočet redukčního faktoru v počtu buněk.

#### Grampozitivní bakterie

- **met icilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)**
  - bakteriální suspenze –  $1,2 \times 10^9$  CFU/ml
  - kontrola se sterilní vodou –  $6,8 \times 10^8$  CFU/ml
  - kontrola s neutralizátorem –  $4,75 \times 10^7$  CFU/ml
  - výsledky – 0,1% směsi 1, 2, 3, 4; 0,1% Ajatin – 0 CFU/ml
- **vankomycin-rezistentní *Enterococcus* (VRE)**
  - bakteriální suspenze –  $3 \times 10^8$  CFU/ml
  - kontrola se sterilní vodou –  $4,1 \times 10^8$  CFU/ml
  - kontrola s neutralizátorem – 0 CFU/ml
  - výsledky – 0,1% směsi 1, 2, 3, 4; 0,1% Ajatin – 0 CFU/ml

#### Gramnegativní bakterie

- ***Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy (KLPN ES+)**
  - bakteriální suspenze –  $8,6 \times 10^8$  CFU/ml
  - kontrola se sterilní vodou –  $5 \times 10^8$  CFU/ml
  - kontrola s neutralizátorem –  $8 \times 10^8$  CFU/ml
  - výsledky – 0,1% směsi 1, 2, 3, 4; 0,1% Ajatin – 0 CFU/ml
- **multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR)**
  - bakteriální suspenze –  $6,7 \times 10^8$  CFU/ml
  - kontrola se sterilní vodou –  $4 \times 10^8$  CFU/ml
  - kontrola s neutralizátorem – 0 CFU/ml
  - výsledky – 0,1% směsi 1, 2, 3, 4; 0,1% Ajatin – 0 CFU/ml



## Kvasinky

- ***Candida krusei* (CDKR)**
  - kvasinková suspenze –  $1,2 \times 10^7$  CFU/ml
  - kontrola se sterilní vodou –  $1,06 \times 10^7$  CFU/ml
  - kontrola s neutralizátorem –  $1,34 \times 10^7$  CFU/ml
  - výsledky – 0,1% směsi 1, 2, 3, 4; 0,1% Ajatin – 0 CFU/ml
  
- ***Cryptococcus neoformans* (CRNE)**
  - kvasinková suspenze –  $3,3 \times 10^6$  CFU/ml
  - kontrola se sterilní vodou –  $1,08 \times 10^7$  CFU/ml
  - kontrola s neutralizátorem –  $5,5 \times 10^6$  CFU/ml
  - výsledky – 0,1% směsi 1, 2, 3, 4; 0,1% Ajatin – 0 CFU/ml

Ve dvou případech se stalo, že kontrola s neutralizačním činidlem usmrtila testované bakterie (vankomycin-rezistentní *Enterococcus* a multirezistentní kmen *Pseudomonas aeruginosa*), zatímco u kontroly se sterilní vodou byl růst patogenů, porovnatelný s počtem CFU/ml základních suspenzí, vždy zpozorován. Pro tyto možné případy a pro jisté pochybnosti o účinku samotných neutralizačních činidel (Tween-80 je neionogenní surfaktant (124)) na mikroorganismy byly zahrnuty i kontroly se sterilní vodou namísto neutralizačního činidla, které by měly testované směsi pouze zředit, nikoliv zneutralizovat jejich účinek, jako tomu je v případě neutralizačních činidel.

### **5.5.2 Kvantitativní zkouška s použitím suspenzí s kmeny *Clostridium difficile* a *Aspergillus fumigatus***

Dále byly všechny 0,1% směsi otestovány vůči kmenům *Clostridium difficile* (tab. 8) a *Aspergillus fumigatus* (tab. 9). Hodnocení škály růstu mikroorganismů semikvantitativně na křížky dle počtu jejich kolonií bylo následovné: negativní, ojedinele, +, ++, +++ . *Clostridium difficile* bylo testováno po dobu expozičního času 5 a 10 minut (při tomto čase pouze u vybraných směsí 1 a 4 plus kontroly), *Aspergillus fumigatus* po expozičním čase 5 minut.

Onemocnění kmenem *Clostridium difficile* nastává, když je normální, zdravá, intestinální bakteriální flóra tlumena užíváním antibiotik. To dovoluje této bakterii ve střevech vytvářet toxin, který pak způsobuje průjem. *Clostridium difficile* je vysoce anaerobní kmen. Vegetativní buňky umírají zhruba do 15 minut při expozici vzduchu a snadno podléhají teplu, vysychání a běžně používaným dezinfekcím (125). *Clostridium difficile* produkuje spory, které jsou vysoce odolné vůči chemickým látkám, což má za následek přetrvávání spor na površích s potenciálem k přenosu infekce. Spory jsou schopny přežít po mnoho měsíců a studie prokázaly, že povrchy prostředí a nemocniční pokoje se časem kontaminují spory této bakterie (126-131). Speight a kol. stanovili sporicidní aktivitu didecyldimethylamonium chloridu, který dosáhl požadované mikrobiální redukce viability po 1 a 60 minutách ( $>10^4$  násobná redukce) při simulaci čistých podmínek (s 0,3% albuminem), ale při znečištění (3% albumin) bylo zapotřebí 60 minut k dosažení potřebné redukce životaschopnosti (132). Kritériem úspěšnosti je podle Evropského Standardu BS EN 13704:2002 požadovaná redukce viability po 60 minutách  $>10^3$  (za čistých i znečištěných podmínek) (133). Zdá se tedy, že KAS mají velký potenciál účinkovat proti této sporulující bakterii.

**Tabulka 8.** Testování 0,1% směsí (1–4), 0,1% Ajatinu a kontroly proti kmenu *Clostridium difficile* po expozičním čase 5 a 10 minut.

Směs – koncentrace	*Doba expozice – 5 min	*Doba expozice – 10 min
<b>1 – 0,1%</b>	++	+
<b>2 – 0,1%</b>	++	netestováno
<b>3 – 0,1%</b>	++	netestováno
<b>4 – 0,1%</b>	++	+
<b>Ajatin 0,1%</b>	++	netestováno
<b>Kontrola</b>	++	++

\*Hodnotící škála růstu kmene dle počtu jeho kolonií: negativní, ojedinele, +, ++, +++.

U kmene *C. difficile* byla testována účinnost směsí při expoziční době 5 minut, nicméně při tomto čase byl kmen vůči všem směsím i Ajatinu rezistentní, proto se pouze pro zkoušku přistoupilo k delšímu expozičnímu času (tj. 10 minut), a to u vybraných směsí 1 a 4, které v porovnání s kontrolou prokázaly významnou redukci.

**Tabulka 9.** Testování 0,1% směsí (1–4), 0,1% Ajatinu a kontroly proti kmeni *Aspergillus fumigatus* po expozičním čase 5 minut.

Směs – koncentrace	*Doba expozice – 5 min
1 – 0,1%	++
2 – 0,1%	+++
3 – 0,1%	+
4 – 0,1%	ojediněle
Ajatin 0,1%	ojediněle
Kontrola	+++

\*Hodnotící škála růstu kmene dle počtu jeho kolonií: negativní, ojediněle, +, ++, +++.

Směs 4 po 5 minutách expozice výrazně působila proti plísni *A. fumigatus*, tato účinnost byla srovnatelná s referenčním Ajatinem. Směsi 1, 2 a 3 byly vůči této houbě méně efektivní.

### 5.5.3 Kvantitativní zkouška s použitím suspenze s virem varicella-zoster

Hodnoty 50% infekčních dávek pro tkáňovou kulturu (TCID<sub>50</sub>) virového titru před (0 minut) a po expozičním čase (5 minut) jsou shrnuty v tabulce 10. Účinnost virucidní aktivity je reprezentována log<sub>10</sub> redukčním faktorem TCID<sub>50</sub>. Virucidní směsi by měly prokázat nejméně 4 log<sub>10</sub> redukční faktor virového titru (93). Pro porovnání výsledků byl opět zahrnut přípravek Ajatin o stejné koncentraci účinné látky (0,1 %). Žádná z našich směsí nedokázala dosáhnout požadovaného redukčního faktoru. Nicméně, největšího efektu dosáhla směs 2 se svým redukčním faktorem 3,51, a tímto úbytkem virového titru předčila standardní přípravek Ajatin (0,67) stejně jako ostatní testované směsi (1, 3 a 4), ty ovšem svým efektem Ajatin taktéž překonaly.

**Tabulka 10.** Výsledky testování 0,1% směsí 1–4 proti obalenému VZV vyjádřených v lg TCID<sub>50</sub> za expoziční čas 0 a 5 minut. Redukční faktor virového titru je vyjádřen jako Δ lg TCID<sub>50</sub>. NK – negativní kontrola (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).



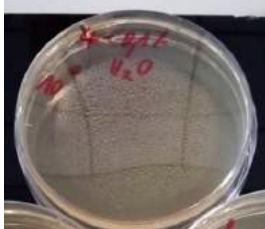
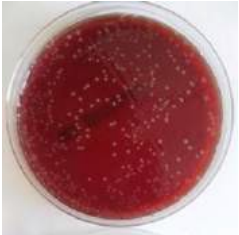




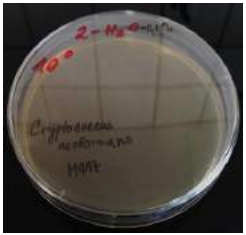
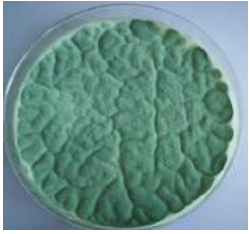


Směs – koncentrace	lg TCID <sub>50</sub> expoziční čas		Δ lg TCID <sub>50</sub>	Δ lg TCID <sub>50</sub> NK
	0 min	5 min		
1 – 0,1%	6	3,49	2,51	0
2 – 0,1%		2,49	3,51	
3 – 0,1%		3,49	2,51	
4 – 0,1%		3,49	2,51	
Ajatin	5,16	4,49	0,67	0

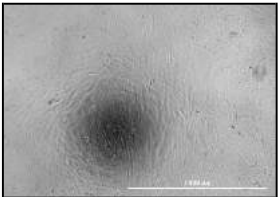
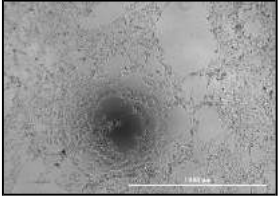
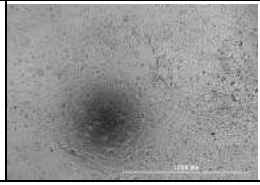
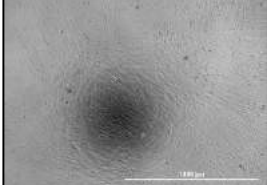
KAS jsou obecně považovány za účinné proti obaleným (lipofilním) virům a neúčinné proti neobaleným (hydrofilním) virům (134, 135). Toto se nám potvrdilo testováním na viru varicella-zoster (obalený) a viru Cocksackie (neobalený) při 5minutové expozici. Výsledky testování proti viru Cocksackie zde nejsou uvedeny, nicméně proti tomuto viru směsi ani o koncentraci 1 % účinnost neprokázaly, což se očekávalo.

#### 5.5.4 Souhrn výsledků kvantitativních zkoušek

Finální výsledky kvantitativních testů proti aerobním i anaerobním bakteriím, kvasinkám, vláknitě houbě a VZV jsou v tabulce 11 vizualizovány pro testovanou směs 2 či 4, kde je patrné, že tyto směsi byly v koncentraci 0,1 % absolutně účinné proti aerobním G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriím i kvasinkám. Dále výrazně působily proti sporulujícímu anaerobnímu G<sup>+</sup> bakteriálnímu kmeni *C. difficile* a plísni *A. fumigatus* (u těchto kmenů nebylo foto s porovnávaným Ajatinem pořízeno), účinnost byla vždy alespoň srovnatelná s referenčním přípravkem Ajatin. Velmi zajímavá byla účinnost směsi 4 proti VZV, která ve sledované koncentraci 0,1 % při 5minutové expozici prokázala vyšší účinnost než Ajatin s absolutním potlačením výskytu cytopatického efektu, tzn. morfologicky patrné důsledky infekce buňky virem, VZV na buněčnou linii (fibroblasty).

**Tabulka 11.** Fotky nárůstu negativních kontrol, účinností pozitivní kontroly Ajatinu a testovaných směsí 2 či 4 o koncentracích 0,1 % vůči různým mikroorganismům (\*podtržení značí, o který mikroorganismus se zrovna jedná) testovaných pomocí kvantitativních expozičních testů.

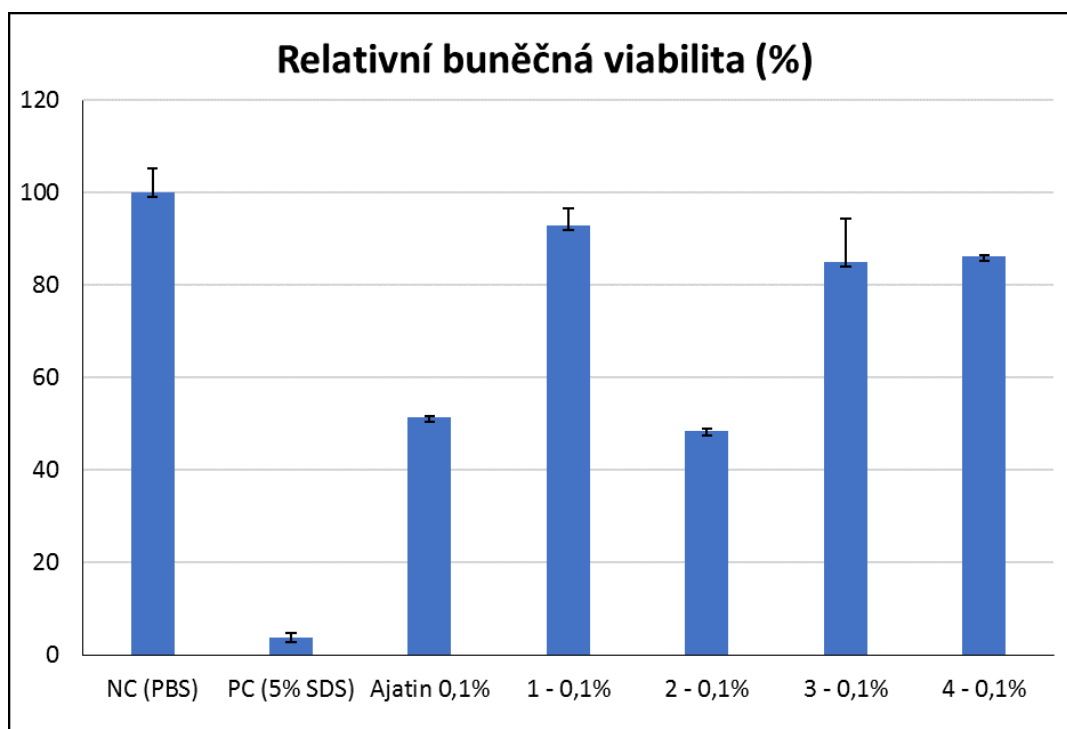
Mikroorganismus	Negativní kontrola	0,1% Ajatin	0,1% směs
Aerobní G+ (* <u>MRSA</u> , VRE) a G- bakterie (KLPN ES+, PSAE-MR)			
Anaerobní bakterie ( <i>Clostridium difficile</i> )			
Kvasinky ( <i>Candida krusei</i> , * <u>Cryptococcus neoformans</u> )			
Vláknité houby ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )			

Mikroorganismus	Negativní kontrola	0,1% Ajatin	0,1% směs
Virus varicella-zoster	 Fibroblasty		
	 Fibroblasty s pomnoženým VZV		

<sup>a</sup> MRSA - met icilin-rezistentní *S. aureus*, VRE - vankomycin-rezistentní *Enterococcus*, KLPN ES+ - *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy, PSAE-MR - multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*.

### 5.5.5 Testování kožní dráždivosti

Finální experiment s určením kožní dráždivosti byl proveden za účelem zjištění bezpečnosti pro personál potenciálně nakládající s těmito dezinfekčními směsmi. V souladu s doporučením OECD 439 (94) a se zákonem 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (aktuální znění 359/2012 Sb.) bylo z etických důvodů upuštěno od testů dráždivosti využívajících živá laboratorní zvířata.



**Obrázek 13.** Relativní buněčná viabilita (vyjádřena v %) po expozici testovaných směsí (1–4) o koncentracích 0,1 % na kožní inserty. NC – negativní kontrola (fosfátový pufr), PC – pozitivní kontrola (5% dodecylsírán sodný), Ajatin – standardní dezinfekční prostředek pro porovnání výsledků; n = 2.

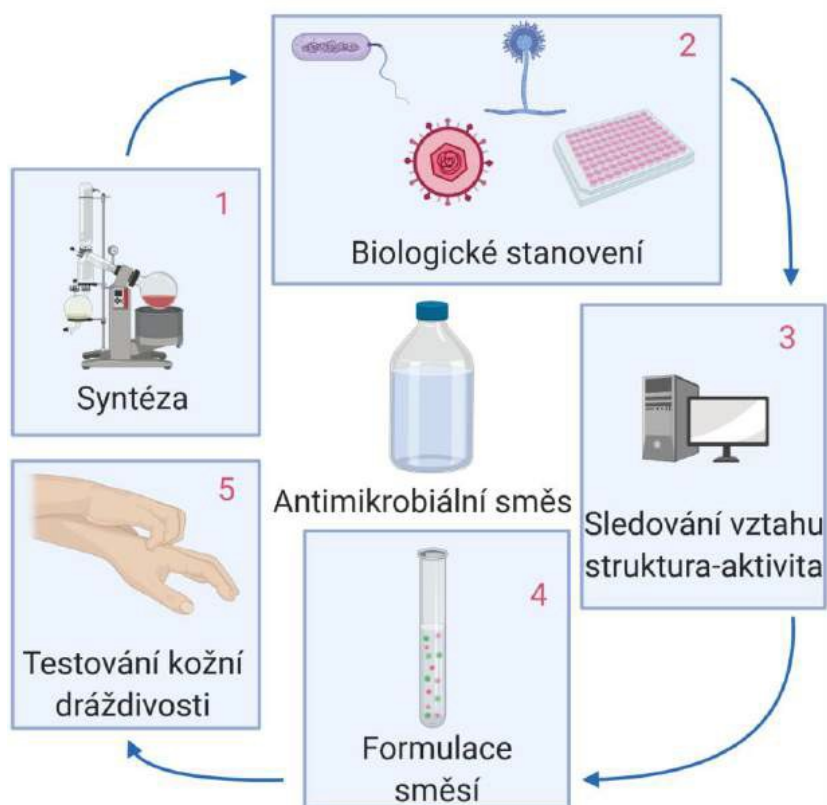
Výsledkem testování kožní dráždivosti je relativní buněčná viabilita vyjádřená v procentech. U relativní buněčné viability pod 50 % se předpokládá potenciál kožní dráždivosti testované směsi. Naopak, pokud je buněčná viabilita nad 50 %, pak se očekává nedráždivost směsi. Výsledky (obr. 13) ukazují, že směs 1 o koncentraci 0,1 % tedy neprokázala téměř žádnou kožní dráždivost a spolu se směsmi 3 a 4 o stejných koncentracích přesáhly viabilitu buněk 50 %, a tím předčily i standardní dezinfekční prostředek Ajatin (0,1%). Výsledky 0,1% směsi 2, stejně jako referenčního Ajatinu o stejné koncentraci, nelze jednoznačně zařadit jako dráždivé či nedráždivé, protože viabilita buněk po expozici těchto směsí na kožní inserty byla kolem 50 %. Můžeme tedy říct, že jako nejméně dráždivá, a tak nejbezpečnější směs z hlediska vzniku kožních alergií, se jeví směs 1.

## 6 ZÁVĚR

V souladu s cíli této disertační práce byla na pracovišti FVZ nejprve zavedena a optimalizována mikrodiluční bujónová metoda pro testování antimikrobiální účinnosti. Pro tuto práci bylo vybráno 18 sérií látek (celkem 52 látek) na bázi kvartérních amoniových solí společně se 3 referenčními benzalkoniovými solemi (BAC<sub>12-16</sub>), které tvoří účinnou složku v komerčním dezinfekčním přípravku Ajatin. Látky, jejichž rozpustnost umožňovala testování, pak byly hodnoceny *in vitro* proti aerobním grampozitivním a gramnegativním bakteriím, anaerobní bakterii *Clostridium difficile*, dále proti kvasinkám, vláknitým houbám a proti VZV. U vybraných kandidátů byl navíc doplňkově otestován také toxický efekt vůči zeleným řasám *Pseudokirchneriella subcapitata*. U všech látek byl zjišťován cytotoxický potenciál na savčí buněčné linii CHO-K1. Pro určení vztahu „struktura látky-její aktivita“ byla posuzována lipofilita či antimikrobiální účinnost látek vůči jejich cytotoxickému efektu na savčí buňky. Účinnost nově syntetizovaných látek byla porovnána s BAC<sub>12-16</sub>.

Na základě výše zmíněných *in vitro* testování a dle vztahu struktura-aktivita byly vybrány nejúčinnější látky tak, aby pokryly co nejširší spektrum patogenů. Proti aerobním G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakteriím se nejslibněji jevílo 8 látek, proti anaerobní bakterii a jejím sporám 2 látky, proti kvasinkám 7 látek a proti vláknitým houbám pak 5 látek. Jedna látka redukovala titr VZV o 5 řádů (potenciální dezinfekční prostředky by měly redukovat virový titr alespoň o 4 řády) při 5minutové expozici viru dezinfekční látkou. Nejbezpečnější potenciál k životnímu prostředí při doplňkovém testování na zelených řasách ukázala látka, která však stále inhibovala její růst z 29 %. Inhibice růstu řasy byla velmi vysoká u 4 látek. Jako nejméně toxická po testování buněčné viability se jevíla látka 18-C<sub>12</sub>, naopak jako nejvíce toxická látka 13-C<sub>10</sub>. Tyto nejúčinnější látky případně představovaly jednotlivé složky dále testovaných dezinfekčních směsí.





**Obrázek 14.** Posloupnost práce na daném tématu: 1) syntéza, 2) biologické stanovení (*in vitro* antibakteriální, antifungální a virucidní testování, hodnocení cytotoxického potenciálu), 3) sledování vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, 4) formulace dezinfekčních směsí, 5) testování kožní dráždivosti vytvořených směsí.

Podle zjištěných účinností byly tedy navrženy čtyři kombinace látek (tzn. formulovány čtyři směsi) za účelem pokrytí celého spektra patogenů, tj. proti bakteriím, houbám i virům. Tyto směsi byly otestovány kvantitativními expozičními testy na aerobních bakteriích, sporulujícím kmeni *C. difficile*, houbách a VZV. Bylo u nich provedeno také stanovení kožní dráždivosti. Lze tedy konstatovat, že primární cíle byly splněny (obr. 14). Byly vyvinuty vysoce účinné, ve vodě rozpustné, širokospektré směsi na bázi KAS a jejich účinnost byla porovnávána s komerčním přípravkem Ajatin (obsahující soli BAC o stejné celkové koncentraci účinných látek jako u testovaných směsí). Konkrétně směs 4 prokázala účinnost proti aerobním bakteriím, anaerobnímu kmeni, houbám a v neposlední řadě i proti obalenému viru. Všechny směsi ve virucidní účinnosti dokonce předčily referenční Ajatin, i když nedosáhly požadované redukce virového titru o nejméně 4 řády. Tento požadavek téměř splnila směs 2. Tři ze čtyř směsí (směs 1, 3 a 4) vykazovaly výrazně menší *in vitro* kožní dráždivost než Ajatin.

Tyto směsi by tedy mohly sloužit jako náhrada za aktuálně používané dezinfekční prostředky na bázi KAS. Z našeho pohledu nejúčinnější jednotlivá látka (17-C<sub>14</sub>) byla díky své výjimečné aktivitě patentována (136) a směs 1 tuto látku obsahující byla zapsána jako užitný vzor (137).

Hlavním přínosem této disertační práce je rozšíření spektra nových látek typu KAS jakožto případných nových složek dezinfekčních činidel s širokým spektrem účinnosti. Vzhledem k pozitivním výsledkům jejich antimikrobiální účinnosti lze v budoucnu uvažovat o jejich komerčním zavedení a začlenění do dezinfekčních plánů zdravotnických zařízení (civilních i vojenských), kde by jejich používání bylo vhodné z hlediska snížení počtu rezistentních kmenů. Nové přípravky by mohly vhodně nahradit látky, na které již byla vyvinuta zmiňovaná mikrobiální rezistence. Aplikovatelnost výsledků je podložena udělením patentu, užitého vzoru a toho, že z hlediska pohledu základního výzkumu je ve vědeckých publikacích stále diskutován mechanismus účinku těchto látek, vliv struktury na jejich účinnost a stále jsou publikovány nové, strukturně odlišné, KAS.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds-a critical review. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39(5): 381-389.
2. Cohen ML. Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance. *Ciba Found Symp*. 1997; 207: 223-231; discussion 231-227.
3. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*. 2005; 99(4): 703-715.
4. Menshutkin N. Beiträge zur Kenntnis der Affinitätskoeffizienten der Alkylhaloide und der organischen Amine. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 1890; 5(1): 589-600.
5. Duque-Benitez SM, Rios-Vasquez LA, Ocampo-Cardona R, Cedeno DL, Jones MA, Velez ID, et al. Synthesis of Novel Quaternary Ammonium Salts and Their in Vitro Antileishmanial Activity and U-937 Cell Cytotoxicity. *Molecules*. 2016; 21(4): 381.
6. Brycki B, Kozirog A, Kowalczyk I, Pospieszny T, Materna P, Marciniak J. Synthesis, Structure, Surface and Antimicrobial Properties of New Oligomeric Quaternary Ammonium Salts with Aromatic Spacers. *Molecules*. 2017; 22(11).
7. Shtyrlin NV, Sapozhnikov SV, Galiullina AS, Kayumov AR, Bondar OV, Mirchink EP, et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium 4-Deoxypyridoxine Derivatives. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 3864193.
8. Kourai H, Yabuhara T, Shirai A, Maeda T, Nagamune H. Syntheses and antimicrobial activities of a series of new bis-quaternary ammonium compounds. *Eur J Med Chem*. 2006; 41(4): 437-444.
9. Kotinský P. Dekontaminace. *150 Hoří*. 2002; 10: 14-16.
10. Český obranný standard č. 681001, Dekontaminační látky a směsi. 1. vyd. 2007, Úřad pro obrannou standardizaci, katalogizaci a státní ověřování jakosti: Praha.
11. Ojovan MI, Lee WE, 13 - Pre-treatment of Radioactive Wastes, in *An Introduction to Nuclear Waste Immobilisation (Second Edition)*, M.I. Ojovan and W.E. Lee, Editors. 2014, Elsevier: Oxford. p. 159-170.
12. Čapoun T, Krykorková J. Zabezpečení individuální dekontaminace nebezpečných chemických látek v HZS ČR. Část 1: Význam a prostředky individuální dekontaminace. *The science for population protection*. 2013; 3: 15.

13. Matoušek J, Urban I, Linhart P, *CBRN Detekce, monitorování, fyzická ochrana, dekontaminace*. 2008, Ostrava: SPBI.
14. Cabal J, *Primární dekontaminace osob, Chemické zbraně a ochrana proti nim*, V. Pitschmann, Editor. 2011, Manus: Praha. p. 160-172.
15. Bárta O, Rakušan V, Urbánek V, *Prostředek pro dekontaminaci toxických a/nebo radioaktivních škodlivin [Užitný vzor č. CZ15282]*. 2005, Chemcomex: Praha.
16. Čapoun T, Krykorková J, *Porovnání vybraných postupů a prostředků individuální dekontaminace [Výzkumná zpráva]*. 2012, MV – GR HZS ČR, Institut ochrany obyvatelstva: Lázně Bohdaneč. p. 67.
17. Skaličan Z, *Dekontaminace, Chemické zbraně a ochrana proti nim*, V. Pitschmann, Editor. 2011, Manus: Praha. p. 135-161.
18. Kotinský P, Hejdová J, *Dekontaminace v požární ochraně. 1. vyd*, ed. Spektrum. 2003, Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství.
19. Matějka J, *Chemická služba: učební skripta. 1. vyd*. 2012, Praha: Ministerstvo vnitra - generální ředitelství Hasičského záchranného sboru ČR.
20. Prevention CfDCA. *Bioterrorism Agents/Diseases*. 2018 April 4, 2018]; Available from: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>.
21. Tuček M, Slámová A, *Hygienu a epidemiologii pro bakaláře*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze ed. 2012, Praha: Karolinum.
22. Podstatová R, *Hygienu a epidemiologii pro ambulantní praxi 1. ed*. 2010, Praha: Maxdorf. 141.
23. Göpfertová D, Janovská D, Dohnal K, *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena. 2. ed*. 1999, Praha: Triton. 134.
24. Chlíbek R, Smetana J, Šindelář R, Vacková M, Hartmanová M, *Vojenská epidemiologie. Platná metodická nařízení. 1 ed. Vol. 338*. 2003, Hradec Králové: Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně. 113.
25. Ryšková O, *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium. 1. vyd*. 2008, Praha: Karolinum. 130.
26. Schindler J, *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů. 1 ed*. 2010, Praha: Grada. 223.
27. Tuček M, kol., *Hygienu a epidemiologii 2013*, Praha: Karolinum. 358.
28. Ticháček B, *Základy epidemiologie. 1 ed*. 1997, Praha: Galén, Karolinum. 240.
29. Abdelaziz KM, Combe EC, Hodges JS. The effect of disinfectants on the properties of dental gypsum, part 2: surface properties. *J Prosthodont*. 2002; 11(4): 234-240.

30. Adriztina I, Adenin LI, Lubis YM. Efficacy of Boric Acid as a Treatment of Choice for Chronic Suppurative Otitis Media and Its Ototoxicity. *Korean J Fam Med*. 2018; 39(1): 2-9.
31. Josefiova J, Pospisek M, Vanek D. Decontamination by Persteril 36 may affect the reliability of DNA-based detection of biological warfare agents-short communication. *Folia Microbiol (Praha)*. 2016; 61(5): 417-421.
32. Melichercikova V. Disinfectant effect of Persteril in combination with detergents. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1989; 33(1): 19-28.
33. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(1): 147-179.
34. Lineback CB, Nkemngong CA, Wu ST, Li X, Teska PJ, Oliver HF. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018; 7: 154.
35. Seki M, Ishikawa T, Terada H, Nashimoto M. Microbicidal Effects of Stored Aqueous Ozone Solution Generated by Nano-bubble Technology. *In Vivo*. 2017; 31(4): 579-583.
36. Kampf G. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *J Hosp Infect*. 2018; 98(4): 331-338.
37. Lecat P, Cropp E, McCord G, Haller NA. Ethanol-based cleanser versus isopropyl alcohol to decontaminate stethoscopes. *Am J Infect Control*. 2009; 37(3): 241-243.
38. Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(Database issue): D737-743.
39. Cheney JE, Collins CH. Formaldehyde disinfection in laboratories: limitations and hazards. *Br J Biomed Sci*. 1995; 52(3): 195-201.
40. Wilson J, Margolin AB. Efficacy of glutaraldehyde disinfectant against *Cryptosporidium parvum* in the presence of various organic soils. *J AOAC Int*. 2003; 86(1): 96-100.
41. Roode GJ, Butow KW. A Descriptive Study of Chlorhexidine as a Disinfectant in Cleft Palate Surgery. *Clin Med Res*. 2018; 16(1-2): 9-15.
42. Singh M, Sharma R, Gupta PK, Rana JK, Sharma M, Taneja N. Comparative efficacy evaluation of disinfectants routinely used in hospital practice: India. *Indian J Crit Care Med*. 2012; 16(3): 123-129.
43. Wirtanen G, Salo S, Helander IM, Mattila-Sandholm T. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2001; 20(1): 37-50.

44. Steinhauer K, Meyer S, Pfannebecker J, Teckemeyer K, Ockenfeld K, Weber K, et al. Antimicrobial efficacy and compatibility of solid copper alloys with chemical disinfectants. *PLoS One*. 2018; 13(8): e0200748.
45. Tischer M, Pradel G, Ohlsen K, Holzgrabe U. Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: targets or nonspecific interactions? *ChemMedChem*. 2012; 7(1): 22-31.
46. Miklas R, Miklasova N, Bukovsky M, Horvath B, Kubincova J, Devinsky F. Synthesis, surface and antimicrobial properties of some quaternary ammonium homochiral camphor sulfonamides. *Eur J Pharm Sci*. 2014; 65: 29-37.
47. Jacobs WA. The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine. I. The problem of the chemotherapy of experimental bacterial infections. *J Exp Med*. 23(5): 563-568.
48. Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr Opin Biotechnol*. 2015; 33: 296-304.
49. Soukup O, Dolezal R, Malinak D, Marek J, Salajkova S, Pasdiorova M, et al. Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorg Med Chem*. 2016; 24(4): 841-848.
50. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microb Drug Resist*. 2010; 16(2): 91-104.
51. Brannan DK, *Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook*. 1997, Boca Raton, Fla: CRC Press.
52. Walker EB, ed. *Handbook of topical antimicrobials: industrial applications in consumer products and pharmaceuticals*. Quaternary ammonium compounds, ed. D.S. Paulson. 2002, Marcel Dekker: New York. 99-116.
53. Petru K, Jac P, Sindelkova M, Polasek M. Determination of carbethopendecinium bromide in eye drops by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *J Sep Sci*. 2011; 34(10): 1174-1179.
54. Assadian O. Octenidine dihydrochloride: chemical characteristics and antimicrobial properties. *J Wound Care*. 2016; 25(3 Suppl): S3-6.
55. Aupoix A, Pégot B, Vo-Thanh G. Synthesis of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids and application of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as pre-catalysts for the benzoin condensation using solvent-free and microwave activation. *Tetrahedron*. 2010; 66(6): 1352-1356.

56. Marek J, Buchta V, Soukup O, Stodulka P, Cabal J, Ghosh KK, et al. Preparation of quinolinium salts differing in the length of the alkyl side chain. *Molecules*. 2012; 17(6): 6386-6394.
57. Marek J, Joskova V, Dolezal R, Soukup O, Benkova M, Fucikova A, et al. Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts. *Lett Drug Des Discov*. 2018; 15(8): 828 - 842.
58. Sandle T, Vijayakumar R, Saleh Al Aboody M, Saravanakumar S. In vitro fungicidal activity of biocides against pharmaceutical environmental fungal isolates. *J Appl Microbiol*. 2014; 117(5): 1267-1273.
59. Marek J, Malinak D, Dolezal R, Soukup O, Benkova M, Nachtigal P, et al. Novel Series of Quaternary Ammonium Surfactants Based on 2,3-Dihydro- 1,4 dioxino 2.3-b pyridin-7-ol Ring: Synthesis, Analysis and Antimicrobial Evaluation. *Lett Org Chem*. 2018; 15(1): 3-9.
60. Otto R, P. VEW. Quaternary Ammonium Compounds. *Annu Rev Microbiol*. 1947; 1(1): 173-192.
61. Bajpai P, 7 - *Chemicals Used in Deinking and Their Function*, in *Recycling and Deinking of Recovered Paper*. 2014, Elsevier Science Publishing Co. Inc.: Oxford. p. 121-137.
62. Marek J, Malinak D, Dolezal R, Soukup O, Pasdiorova M, Dolezal M, et al. Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules*. 2015; 20(3): 3681-3696.
63. Dolezal R, Soukup O, Malinak D, Savedra RML, Marek J, Dolezalova M, et al. Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *Eur J Med Chem*. 2016; 121: 699-711.
64. Yoshimatsu T, Hiyama K. Mechanism of the action of didecyldimethylammonium chloride (DDAC) against Escherichia coli and morphological changes of the cells. *Biocontrol Sci*. 2007; 12(3): 93-99.
65. Lambert PA, Hammond SM. Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro-organisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973; 54(2): 796-799.
66. Salt WG, Wiseman D. The relation between the uptake of cetyltrimethylammonium bromide by Escherichia coli and its effects on cell/growth and viability. *J Pharm Pharmacol*. 1970; 22(4): 261-264.
67. Salton MRJ. Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability. *Journal Gen Physiol*. 1968; 52(1): 227-252.

68. Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(2): 189-208.
69. Daoud NN, Dickinson NA, Gilbert P. Anti-microbial activity and physicochemical properties of some alkyldimethylbenzylammonium chlorides. *Microbios.* 1983; 37(148): 73-85.
70. Ioannou CJ, Hanlon GW, Denyer SP. Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(1): 296-306.
71. Russell AD, Gould GW. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *J Appl Bacteriol.* 1988; 65: 167S-195S.
72. Schallenhammer SA, Duggan SM, Morrison KR, Bentley BS, Wuest WM, Minbiole KPC. Hybrid BisQACs: Potent Biscationic Quaternary Ammonium Compounds Merging the Structures of Two Commercial Antiseptics. *ChemMedChem.* 2017; 12(23): 1931-1934.
73. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials.* 2006; 27(11): 2331-2339.
74. Chugunova EA, Akyzbekov NI, Mahrous EM, Voloshina AD, Kulik NV, Zobov VV, et al. Synthesis and study of antimicrobial activity of quaternary ammonium benzofuroxan salts. *Monatsh Chem.* 2018; 149(1): 119-126.
75. Berne S, Kalauz M, Lapat M, Savin L, Janussen D, Kersken D, et al. Screening of the Antarctic marine sponges (Porifera) as a source of bioactive compounds. *Polar Biol.* 2016; 39(5): 947-959.
76. Elersek T, Kosi G, Turk T, Pohleven F, Sepcic K. Influence of polymeric 3-alkylpyridinium salts from the marine sponge *Reniera sarai* on the growth of algae and wood decay fungi. *Biofouling.* 2008; 24(2): 137-143.
77. Chauhan S, Kaur M, Rana DS, Chauhan MS. Volumetric Analysis of Structural Changes of Cationic Micelles in the Presence of Quaternary Ammonium Salts. *J Chem Eng Data.* 2016; 61(11): 3770-3778.
78. Bartovská L, Šišková M. *Co je co v povrchové a koloidní chemii.* 2005.
79. Shah A, Shahzad S, Munir A, Nadagouda MN, Khan GS, Shams DF, et al. Micelles as Soil and Water Decontamination Agents. *Chem Rev.* 2016; 116(10): 6042-6074.
80. Benkova M, Soukup O, Marek J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J Appl Microbiol.* 2020, in press.



81. Salajkova S, Benkova M, Marek J, Sleha R, Prchal L, Malinak D, et al. Wide-antimicrobial spectrum of picolinium salts. *Molecules*. 2020, **25**, in press.
82. Soukup O, Benkova M, Dolezal R, Sleha R, Malinak D, Salajkova S, et al. The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. *Eur J Med Chem*. 2020, in press.
83. Benkova M, Soukup O, Prchal L, Sleha R, Eleršek T, Novak M, et al. Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained N-Alkylammonium Salts. *ChemistrySelect*. 2019; 4(41): 12076-12084.
84. Kuca K, Marek J, Stodulka P, Musilek K, Hanusova P, Hrabanova M, et al. Preparation of benzalkonium salts differing in the length of a side alkyl chain. *Molecules*. 2007; 12(10): 2341-2347.
85. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. CLSI document M07-A10. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA*. 2015.
86. Zovko A, Gabric MV, Sepcic K, Pohleven F, Jaklic D, Gunde-Cimerman N, et al. Antifungal and antibacterial activity of 3-alkylpyridinium polymeric analogs of marine toxins. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2012; 68: 71-77.
87. Krienitz L, Bock C, Nozaki H, Wolf M. SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga "Selenastrum capricornutum" recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta(1). *J Phycol*. 2011; 47(4): 880-893.
88. Yamagishi T, Yamaguchi H, Suzuki S, Horie Y, Tatarazako N. Cell reproductive patterns in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (=Selenastrum capricornutum) and their variations under exposure to the typical toxicants potassium dichromate and 3,5-DCP. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0171259.
89. *Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) (2011) Test no. 201: freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test, OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 2.*: OECD Publishing, Paris.
90. Adams D, Quayum M, Worthington T, Lambert P, Elliott T. Evaluation of a 2% chlorhexidine gluconate in 70% isopropyl alcohol skin disinfectant. *J Hosp Infect*. 2005; 61(4): 287-290.
91. Edwards AN, Karim ST, Pascual RA, Jowhar LM, Anderson SE, McBride SM. Chemical and Stress Resistances of *Clostridium difficile* Spores and Vegetative Cells. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1698.
92. Spearman C. The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae. *Br J Psychol*. 1908; 2(3): 227-242.

93. EN 14476 Chemical Disinfectants and Antiseptics – Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Virucidal Activity in the Medical Area – Test Method and Requirements (Phase 2, Step 1).
94. OECD, *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*. 2019.
95. Kandárová H, Hayden P, Klausner M, Kubilus J, Sheasgreen J. An In Vitro Skin Irritation Test (SIT) using the EpiDerm Reconstructed Human Epidermal (RHE) Model. *JoVE*. 2009(29): e1366.
96. Tandukar M, Oh S, Tezel U, Konstantinidis KT, Pavlostathis SG. Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance. *Environ Sci Technol*. 2013; 47(17): 9730-9738.
97. Russell AD, Mills AP. Comparative sensitivity and resistance of some strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas stutzeri* to antibacterial agents. *J Clin Pathol*. 1974; 27(6): 463-466.
98. Kadry AA, Serry FM, El-Ganiny AM, El-Baz AM. Integron occurrence is linked to reduced biocide susceptibility in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Br J Biomed Sci*. 2017; 74(2): 78-84.
99. Loughlin MF, Jones MV, Lambert PA. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49(4): 631-639.
100. Tabata A, Nagamune H, Maeda T, Murakami K, Miyake Y, Kourai H. Correlation between Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membrane Protein OprR. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(7): 2093-2099.
101. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*. 2014; 4: 422.
102. Machado I, Coquet L, Jouenne T, Pereira MO. Proteomic approach to *Pseudomonas aeruginosa* adaptive resistance to benzalkonium chloride. *J Proteomics*. 2013; 89: 273-279.
103. Sakagami Y, Yokoyama H, Nishimura H, Ose Y, Tashima T. Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 1989; 55(8): 2036-2040.
104. Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SG. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacDeltaE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *J Hosp Infect*. 2012; 81(2): 87-91.
105. Unkovic N, Ljaljevic Grbic M, Stupar M, Vukojevic J, Jankovic V, Jovic D, et al. Aspergilli Response to Benzalkonium Chloride and Novel-Synthesized

- Fullerenol/Benzalkonium Chloride Nanocomposite. *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015: 109262.
106. Brycki B, Malecka I, Kozirog A, Otlewska A. Synthesis, Structure and Antimicrobial Properties of Novel Benzalkonium Chloride Analogues with Pyridine Rings. *Molecules*. 2017; 22(1).
  107. Hansch C, Clayton JM. Lipophilic character and biological activity of drugs. II. The parabolic case. *J Pharm Sci*. 1973; 62(1): 1-21.
  108. Suzuki S, Yamaguchi H, Nakajima N, Kawachi M. *Raphidocelis subcapitata* (=Pseudokirchneriella subcapitata) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 8058.
  109. Chen Y, Geurts M, Sjollema SB, Kramer NI, Hermens JL, Droge ST. Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: how test design affects bioavailability and effect concentrations. *Environ Toxicol Chem*. 2014; 33(3): 606-615.
  110. Jing G, Zhou Z, Zhuo J. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of toxicity of quaternary ammonium compounds on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere*. 2012; 86(1): 76-82.
  111. Kreuzinger N, Fuerhacker M, Scharf S, Uhl M, Gans O, Grillitsch B, *Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substances — quaternary ammonium compounds as an example, in MEDAWATER International Conference on Sustainable Water Management, Rational Water Use, Wastewater Treatment and Reuse: June 8– 10, 2006. Desalination: Marrakech, Morocco. p. 209-222.*
  112. Liang T, Neumann CN, Ritter T. Introduction of fluorine and fluorine- containing functional groups. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013; 52(32): 8214- 8264.
  113. Nalecz-Jawecki G, Grabinska-Sota E, Narkiewicz P. The toxicity of cationic surfactants in four bioassays. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2003; 54(1): 87-91.
  114. Sanchez-Fortun S, Marva F, D'Ors A, Costas E. Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyldimethyl-ammonium bromide. *Ecotoxicology*. 2008; 17(4): 229-234.
  115. Zhu M, Ge F, Zhu R, Wang X, Zheng X. A DFT-based QSAR study of the toxicity of quaternary ammonium compounds on *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*. 2010; 80(1): 46-52.
  116. Zhang C, Cui F, Zeng GM, Jiang M, Yang ZZ, Yu ZG, et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): a review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Sci Total Environ*. 2015; 518-519: 352-362.

117. Elerseck T, Zenko M, Filipic M. Ecotoxicity of disinfectant benzalkonium chloride and its mixture with antineoplastic drug 5-fluorouracil towards alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *PeerJ*. 2018; 6: e4986.
118. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J, *Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, I.A. Cree, Editor. 2011, Humana Press: Totowa, NJ. p. 237-245.
119. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al., *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
120. Di L, Kerns EH, *Chapter 23 - Lipophilicity Methods*, in *Drug-Like Properties (Second Edition)*, L. Di and E.H. Kerns, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 299-306.
121. Di L, Kerns EH, *Chapter 5 - Lipophilicity*, in *Drug-Like Properties (Second Edition)*, L. Di and E.H. Kerns, Editors. 2016, Academic Press: Boston. p. 39- 50.
122. Gao Y, Gesenberg C, Zheng W, Qiu Y, Chen Y, Zhang GZ, et al., *Chapter 17 - Oral Formulations for Preclinical Studies: Principle, Design, and Development Considerations*, in *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. 2017, Academic Press: Boston. p. 455-495.
123. Yamamoto M, Matsumura R, Hirata Y, Nagamune H. A comparative study of skin irritation caused by novel bis-quaternary ammonium compounds and commonly used antiseptics by using cell culture methods. *Toxicol In Vitro*. 2019; 54: 75-81.
124. Kang S, Jeong HY. Sorption of a nonionic surfactant Tween 80 by minerals and soils. *J Hazard Mater*. 2015; 284: 143-150.
125. Jump RL, Pultz MJ, Donskey CJ. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(8): 2883-2887.
126. Kim KH, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J, Jr., et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis*. 1981; 143(1): 42-50.
127. Dumford DM, 3rd, Nerandzic MM, Eckstein BC, Donskey CJ. What is on that keyboard? Detecting hidden environmental reservoirs of *Clostridium difficile* during an outbreak associated with North American pulsed-field gel electrophoresis type 1 strains. *Am J Infect Control*. 2009; 37(1): 15-19.

128. Eckstein BC, Adams DA, Eckstein EC, Rao A, Sethi AK, Yadavalli GK, et al. Reduction of Clostridium Difficile and vancomycin-resistant Enterococcus contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. *BMC Infect Dis.* 2007; 7: 61.
129. Samore MH, Venkataraman L, DeGirolami PC, Arbeit RD, Karchmer AW. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial Clostridium difficile diarrhea. *Am J Med.* 1996; 100(1): 32-40.
130. Shapey S, Machin K, Levi K, Boswell TC. Activity of a dry mist hydrogen peroxide system against environmental Clostridium difficile contamination in elderly care wards. *J Hosp Infect.* 2008; 70(2): 136-141.
131. Wilcox MH, Fawley WN, Wigglesworth N, Parnell P, Verity P, Freeman J. Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of Clostridium difficile infection. *J Hosp Infect.* 2003; 54(2): 109-114.
132. Speight S, Moy A, Macken S, Chitnis R, Hoffman PN, Davies A, et al. Evaluation of the sporicidal activity of different chemical disinfectants used in hospitals against Clostridium difficile. *J Hosp Infect.* 2011; 79(1): 18-22.
133. *BS EN 13704:2002, Chemical Disinfectants-Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1).* 2002, British Standards Institute: London, UK.
134. Rutala WA, Weber DJ, Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, 301 - *Disinfection, Sterilization, and Control of Hospital Waste*, in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. 2015, Content Repository Only!: Philadelphia. p. 3294-3309.e3294.
135. Merianos JJ, *Surface-active agents*, in *Disinfection, sterilization and Preservation*, S.S. Block, Editor. 2001, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia. p. 283-320.
136. Fakultní nemocnice Hradec Králové. 1-Alkyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium-halogenid jako dezinfekční činidlo a dezinfekční kompozice, která jej obsahuje. Vynálezci: Ondřej Soukup, Daniel Jun, Jan Marek a Dávid Maliňák. Česká republika. Patentový spis CZ 307717 B6. 13.3.2019.
137. Fakultní nemocnice Hradec Králové. Kvarterní amoniová sůl a dezinfekční kompozice jí obsahující. Vynálezci: Ondřej Soukup, Daniel Jun, Jan Marek a Dávid Maliňák. Česká republika. Užité vzor CZ 32359 U1. 12.5.2018.

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

### ***Příloha A***

Salajková Š., **Benková M.**, Marek J., Sleha R., Prchal L., Maliňák D., Doležal R., Sepčíč K., Gunde-Cimerman N., Kuča K., Soukup O.: Wide-antimicrobial spectrum of picolinium salts. *Molecules*. 2020, **25**, in press.

### ***Příloha B***

**Benková M.**, Soukup O., Prchal L., Sleha R., Eleršek T., Novák M., Sepčíč K., Gunde-Cimerman N., Doležal R., Boštíková V., Boštík P., Marek J.: Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained N-Alkylammonium Salts. *ChemistrySelect*. 2019, **4**(41), 12076-12084.

### ***Příloha C***

Marek J., Josková V., Doležal R., Soukup O., **Benková M.**, Fučíková A., Maliňák D., Boštíková V., Kuča K.: Synthesis, antimicrobial effect and surface properties of hydroxymethyl-substituted pyridinium salts. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2018, **15**(8), 828-842.

### ***Příloha D***

Soukup O., Doležal R., Maliňák D., Marek J., Salajková Š., **Pasdiorová M.**, Honegr J., Korábečný J., Nachtigal P., Nachon F., Jun D., Kuča K.: Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2016, **24**(4), 841-848.

### ***Příloha E***

Doležal R., Soukup O., Maliňák D., Savedra M. L. R., Marek J., Doležalová M., **Pasdiorová M.**, Salajková Š., Korábečný J., Honegr J., Ramalho C. T., Kuča K.: Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3- hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, **121**, 699-711.

Article

# Wide-Antimicrobial Spectrum of Picolinium Salts

Sarka Salajkova <sup>1,2</sup>, Marketa Benkova <sup>1,3</sup>, Jan Marek <sup>1,3</sup>, Radek Sleha <sup>3</sup>, Lukas Prchal <sup>1</sup>, David Malinak <sup>1,4</sup>, Rafael Dolezal <sup>1,4</sup>, Kristina Sepčić <sup>5</sup>, Nina Gunde-Cimerman <sup>5</sup>, Kamil Kuca <sup>1,4,\*</sup> and Ondrej Soukup <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Biomedical Research Center, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; sarka.salajkova@img.cas.cz (Sa.S.); Marketa.Benkova@fnhk.cz (M.B.); jan.marek@fnhk.cz (J.M.); lukas.prchal@fnhk.cz (L.P.); david.malinak@uhk.cz (D.M.); rafael.dolezal@uhk.cz (R.D.)

<sup>2</sup> Department of Genome Integrity, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Epidemiology, University of Defence in Brno, Trebesska 1575, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; radek.sleha@unob.cz

<sup>4</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>5</sup> Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia; Kristina.Sepcic@bf.uni-lj.si (K.S.); Nina.Gunde-Cimerman@bf.uni-lj.si (N.G.-C.)

\* Correspondence: kamil.kuca@uhk.cz (K.K.); ondrej.soukup@fnhk.cz (O.S.); Tel.: +420-493-332-509 (K.K.); +420-495-833-447 (O.S.)

Academic Editors: Cheng-Wei Tom Chang, Jon Y. Takemoto and Jixun Zhan

Received: 17 April 2020; Accepted: 8 May 2020; Published: date

**Abstract:** Nosocomial infections, which greatly increase morbidity among hospitalized patients, together with growing antibiotic resistance still encourage many researchers to search for novel antimicrobial compounds. Picolinium salts with different lengths of alkyl chains (C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>) were prepared by Menshutkin-like reaction and evaluated with respect to their biological activity, i.e., lipophilicity and critical micellar concentration. Picolinium salts with C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> side chains achieved similar or even better results when in terms of antimicrobial efficacy than benzalkoniums; notably, their fungicidal efficiency was substantially more potent. The position of the methyl substituent on the aromatic ring does not seem to affect antimicrobial activity, in contrast to the effect of length of the *N*-alkyl chain. Concurrently, picolinium salts exhibited satisfactory low cytotoxicity against mammalian cells, i.e., lower than that of benzalkonium compounds, which are considered as safe.

**Keywords:** picolinium salts; quaternary ammonium compounds; surfactant; critical micellar concentration; antimicrobial activity; cytotoxicity

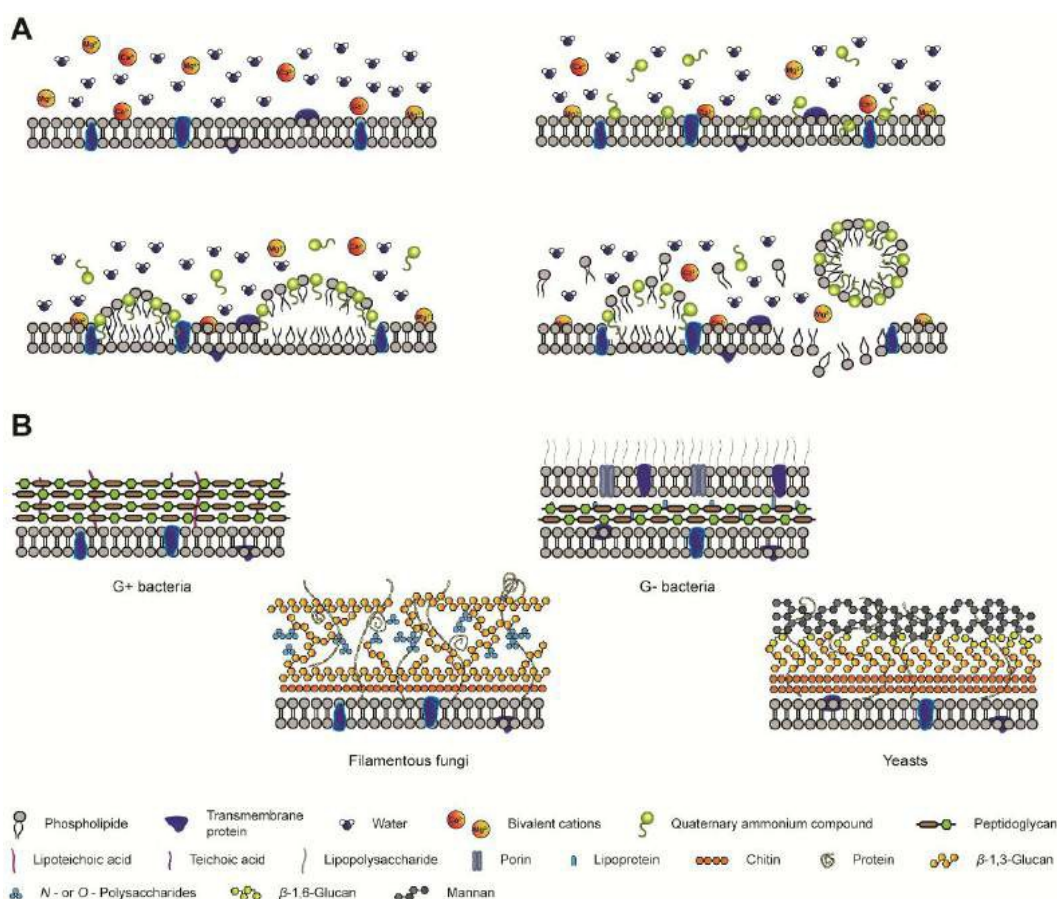
## 1. Introduction

Surfactants based on quaternary ammonium salts (QASs) are widely used from academic establishments to industry [1–4]. Because of their surface-active properties [5–7], they are commonly used as emulsifiers, moisturizers [8] and cleaning agents, as well as ointment disinfectants, pre-operative hand cleaning agents and topical hand sanitizers [9]. QASs can also be utilized as potential hydrolytic micellar catalysts to accelerate chemical decomposition, and such compounds can find uses as decontaminants [10–13] or in the preparation and coating of nanoparticles [14].

Most importantly, QASs have been used as disinfectants for years. The correct practice of disinfectants or their cocktail use within hospitals has long been considered the most appropriate first-line defense for decreasing the incidence of nosocomial infections and minimizing the

prescription of antibiotics [1,15–19]. The ordinarily applied QASs are derivatives of benzalkonium, benzoxonium, pyridinium or cetrimonium salts [11].

One of the most beneficial features of QASs is their cytotoxic effect at very low concentration to a broad spectrum of microorganisms, including bacteria, fungi, parasites and enveloped viruses, while showing relatively low toxicity to eukaryotic cells [20,21]. QASs generally act by disruption of the cytosolic membrane and outer lipid bilayer via replacement of bivalent ions and attachment to the membrane, followed by the incorporation of the hydrophobic side chain into the phospholipid bilayer and the creation of a mixed micelle with the phospholipids, resulting ultimately in cytosol leakage (Figure 1A) [10,18,22]. Whereas bacterial membranes are composed predominantly of negatively charged phospholipids, eukaryotic membranes mostly contain zwitterionic lipids and cholesterol [23–25]. Such a difference in composition is a good precondition for a selective effect against microbes, and therefore, QAS should exhibit selectivity to microorganisms over eukaryotic cells [4,15,25]. Indeed, selectivity is obvious even among microorganisms. Gram-positive (G+) bacteria are more sensitive than Gram-negative (G-). The increased resistance of G- is most likely a consequence of the presence of the outer membrane layer which grants the cells stronger physicochemical protection (Figure 1B) [18,25]. Interestingly, the relationship between the alkyl side-chain length and antibacterial activity is nonlinear. Optimal bioactivity is exhibited by C<sub>12</sub>–C<sub>14</sub> chains for G+, and C<sub>14</sub>–C<sub>16</sub> chains for G- bacteria [5,15,18,26]. However, the lipophilicity of the side chains seems to be a crucial factor [4,27], although the precise mechanism of action and structure–activity relationship is not yet fully understood.



**Figure 1.** Cidal effect of QAS. Disintegration mechanism of the membrane by QAS attachment on to the membrane, followed by incorporation of side chains into the membrane resulting in membrane rupture and cytosol leakage (A). Fundamental composition of cell walls (B).

Picolinium salts are pyridinium derivatives and can be prepared by modification of the Menshutkin reaction commonly used for the preparation of QAS [18,26,28–31]. Picolinium salts



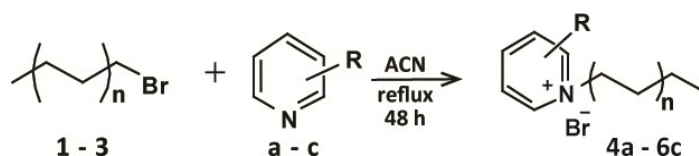
have, in many cases, been used as intermediates for the preparation of donor-acceptor molecules for the construction of promising photo- and electro-active materials [29,32–38]. In addition, their typical physicochemical features such as surface activity and micellization have been intensively studied in the line of their possible application [39–44]. For instance, *N*-(*n*-hexadecyl)- and *N*-(*n*-heptadecyl)-3-methylpyridinium bromide or 1-methyl-3-octylpyridinium alkyl sulfate were found to be effective for micelle-based drug delivery to improve drug solubility and the bioavailability of anionic drugs and metal complexes [28,43]. The Crooks' group systematically investigated mono- and bis-picolinium derivatives as promising antagonists of neuronal nicotinic acetylcholine receptors, mediating nicotine-evoked dopamine release [45–49]. Although the antimicrobial activities of quaternary ammonium salts are generally known, the published results regarding the antimicrobial activities of picolinium salts are inconsistent. Several publications have reported an effect of some picolinium representatives, such as 1-dodecyl-4-methylpyridinium bromide [42], 1-dodecyl-3-methylpyridinium bromide [30], 3-methyl-1-tetradecylpyridinium bromide and 1-hexadecyl-3-methylpyridinium bromide [43], against *Micrococcus luteus* [30], *Staphylococcus aureus* [30,31,42,43], *Enterobacter aerogenes* [30], *Escherichia coli* [30,31,42,43], *Klebsiella pneumonia* [43] and *Pseudomonas aeruginosa* [42]. However, there has been no study systematically evaluating the antimicrobial effectiveness of ortho, meta and para *N*-alkylpicolinium salts differing in their alkyl chain length. Furthermore, wide-spectrum efficacy against yeasts, fungi and viruses is unknown.

Therefore, the aim of this study is to systematically describe the biological properties of a picolinium series on a wide set of microorganisms, including bacteria, fungi and viruses. Besides evaluating the basic physicochemical parameters, we focused on the antimicrobial action in an attempt to elucidate the structure-activity relationship against various microbes and against mammalian cells for selectivity reasons.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Synthesis and Physicochemical Properties of Picolinium Salts

Surfactants **4a–6c** were prepared in one step by Menshutkin-like reaction. The reaction conditions were chosen to facilitate the bimolecular nucleophilic substitution of the corresponding bromoalkane **1–3** with the appropriate methylpyridine isomers **a–c** in acetonitrile (ACN) (Scheme 1) [18]. The crude products were crystallized from diethyl ether to afford **4–6** in moderate to high yields (Table 1).



**Scheme 1.** Preparation of alkyl chain compounds;  $n = 5, 6, 7$ ; R = CH<sub>3</sub>.

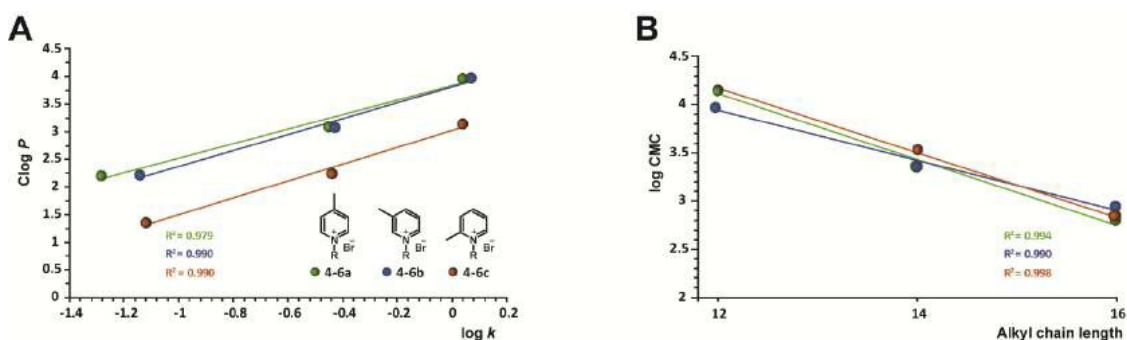
**Table 1.** Prepared compounds with alkyl chains and their physicochemical properties.

Structure	Cpd <sup>a</sup>	Chain Length	Yield [%]	m.p. <sup>b</sup> [°C]	$k^c$	log $k$	Clog $p^d$	CMC <sup>e</sup> [μmol/L]
	<b>4a</b>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	50	121.9–123.9	0.05 ± 0.01	−1.28	2.21	14,010
	<b>5a</b>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	95	125.7–127.4	0.35 ± 0.01	−0.45	3.10	2330
	<b>6a</b>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	98	126.8–128.8	1.09 ± 0.01	0.04	3.98	600
	<b>4b</b>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	80	34.0–36.0	0.07 ± 0.01	−1.14	2.21	9490
	<b>5b</b>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	95	72.3–74.3	0.37 ± 0.01	−0.43	3.10	2320
	<b>6b</b>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	96	70.8–72.6	1.18 ± 0.01	0.07	3.98	860
	<b>4c</b>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	88	41.4–42.8	0.08 ± 0.01	−1.12	1.36	14,160

$n = 5, 6, 7$	<b>5c</b>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	4	60.4–62.3	0.36 ± 0.02	−0.44	2.25	3460
	<b>6c</b>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	80	79.9–81.9	1.10 ± 0.01	0.04	3.14	650

<sup>a</sup> Compound (Cpd), <sup>b</sup> Melting point (m.p.), <sup>c</sup> Capacity factor ( $k$ ) was determined by an isocratic LC-MS method, <sup>d</sup> Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures (Clog  $p$ ), substructures and reactions, Marvin 17.21.0, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>), <sup>e</sup> Critical micellar concentration (CMP).

Lipophilicity is an important molecular descriptor governing the intercalation of the QAS side chain into the cell membrane, with its subsequent disruption and cell death. The lipophilicity of the compounds was estimated by chromatographic study using a simple HPLC-MS method with isocratic elution, as described previously [18,26]. The expected linear relationship between the prolongation of the alkyl chain of QAS **4a–6c** and the increasing lipophilicity driven by the length of the alkyl chain was observed with a high correlation coefficient ( $R^2 < 0.97$ ; values are listed in Figure 2). The position of the methyl group on the aromatic ring slightly affects the lipophilicity of the molecules. The position of the methyl group in the para- or meta- position did not result in any change on cLog  $p$ ; however, a noticeable effect was observed by introducing this group into the ortho- position. Thus, the lipophilicity of the picolinium compounds increased in the order *o*-picolinium (**6a–c**) < *m*-picolinium (**5a–c**) = *p*-picolinium (**4a–c**).



**Figure 2.** Correlation between compound structure and physicochemical properties. Graphs show the lipophilicity of the prepared compounds and their dependency on chain elongation (A). Stauff-Klevens plots of log CMC and extended chain of surfactants (B).

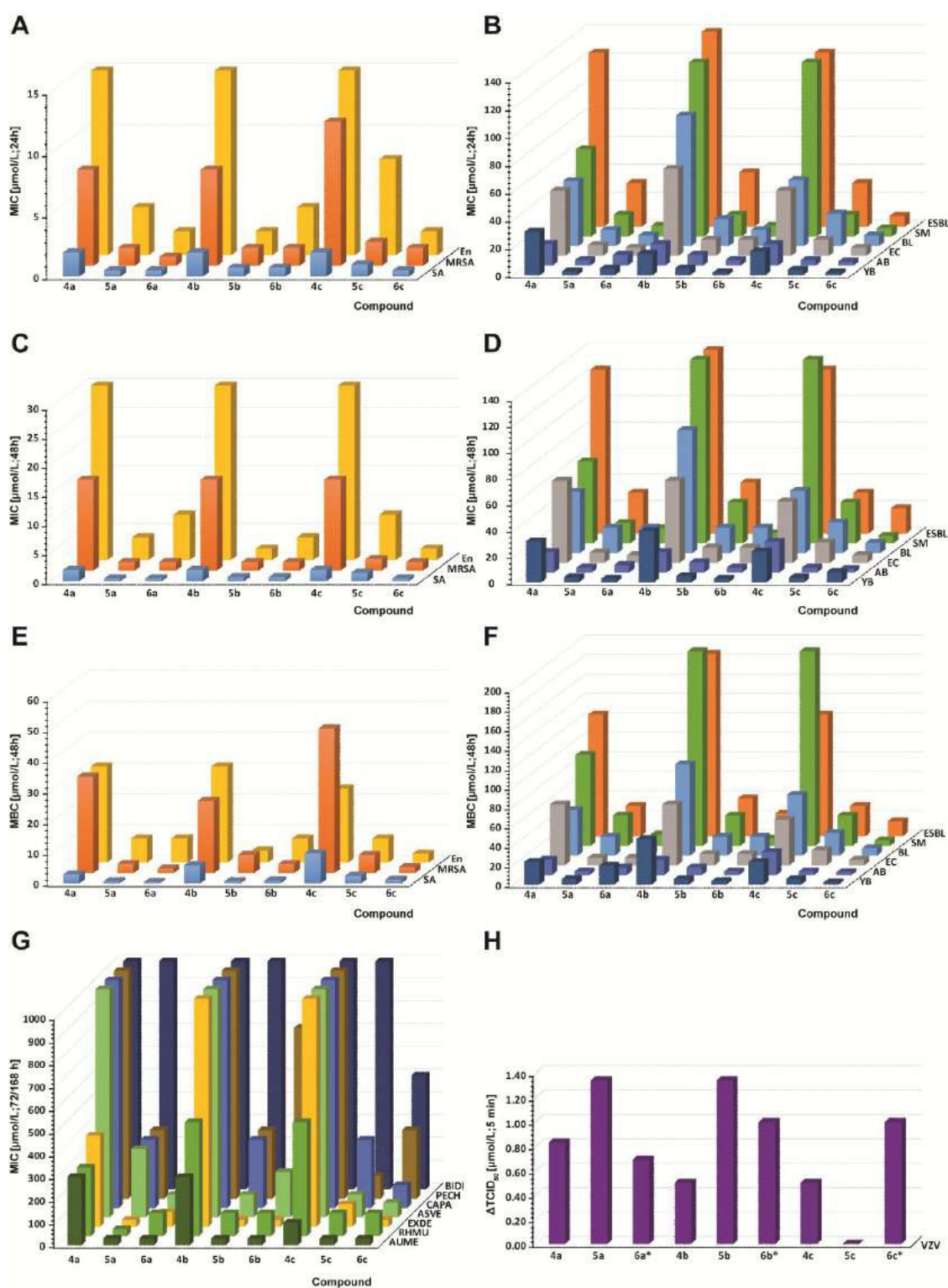
A specific characteristic of surfactants is their ability to create micelles characterized as the critical micelle concentration (CMC) [4,11,50,51]. CMC was measured using a conductometric method, and the parameters of the experiment were set according to our previous investigations [9,26]. Elongation of the alkyl chains decreases the CMC value according to the Traube rule (Figure 2). Furthermore, the position of the methyl group in the hydrophilic head of the compounds has a negligible influence on micelle formation, which is clear proof that the tail length is the dominant factor for micelle creation. Pernak et al. demonstrated a relationship between the CMC and the antibacterial properties of 1-alkyl-3-alkylthiomethylimidazolium chlorides [52,53]. The published results imply that the micelle formation enhances the local concentration of surfactant with its cationic charge, leading to a stronger interaction with the negatively charged net of the cell membrane [54,55].

However, it is still not clear how micelle formation affects the antimicrobial properties, and the published results are inconsistent in this context. The biological activity seems to be not affected directly by the structure of substituents attached to the polar heads, but rather, by the morphology of aggregates, such as the size, which is enhanced with increasing the alkyl chain length [56]. In line with this knowledge, compounds **4a–6c** were used in the subsequent biological evaluation far below their CMC.

## 2.2. Antimicrobial Activity of Picolinium Salts

The prepared picolinium salts showed strong antimicrobial properties below their CMC (Figure 3), as well as a broad spectrum of activities (Figure S2) against chosen microorganisms, including

bacteria, fungi and viruses, while having simultaneously satisfactory cytotoxicity for mammalian cells. The results were compared with the activity of benzalkonium salts, which are considered the gold standard of quaternary ammonium salt-based disinfectants (data are shown in Supplementary Information, SI).



**Figure 3.** The biological assessment of prepared picolinium salts 4a–6c. Minimum inhibitory concentration (MIC) after 24 h or 48 h incubation against Gram-positive (A or C) and Gram-negative bacteria (B or D). Minimum bactericidal concentration (MBC) after 48 h treatment against Gram-positive (E) and Gram-negative bacteria (F). Minimum inhibitory concentrations (MIC) determined on a panel of four yeasts and three filamentous fungi after 72 h (yeasts)/168 h

(filamentous fungi) incubation (G). Virucidal efficacy against varicella zoster virus (VZV); 5 min exposure to 0.01% or 0.005%; expressed as  $\Delta$ TCID<sub>50</sub> (H). Complete data are listed in Tables S1, S2 and S3.

The antibacterial properties were evaluated as the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC, respectively) for nine bacterial strains, namely the three G<sup>+</sup> strains, *Staphylococcus aureus* C1947 (SA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* C1926 (MRSA), and vancomycin-resistant enterococci S2484 (En), and the six G<sup>-</sup> strains, *Acinetobacter baumannii* J3474 (AB), *Escherichia coli* A1235 (EC), *Klebsiella pneumoniae* C1950 (BL), extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* C1934 (ESBL), *Stenotrophomonas maltophilia* J3552 (SM), and *Yersinia bercovieri* CNCTC6230 (YB). The quaternary ammonium salts with C<sub>12</sub> or C<sub>14</sub> alkyl chain lengths are considered the most efficacious against G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> bacteria, respectively. Interestingly, the antibacterial effect against each strain, as well as the width of the antibacterial spectrum, was enhanced with increasing the length of the side chains C<sub>12</sub> < C<sub>14</sub> < C<sub>16</sub>. Picolinium salts have a similar trend of activity towards both G<sup>-</sup> and G<sup>+</sup> bacteria (Figure 3A–D), yet the level of efficacy on those bacteria types is considerably different. The MIC and MBC for individual bacterial strains are listed in Table S1 (in SI).

Picolinium salts with a C<sub>12</sub> side-chain showed lower activity, particularly against enterococci. Both C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> derivatives (**5a–6b**) exhibited very good efficacy against the tested G<sup>+</sup> strains, with comparable or better antibacterial activity than that of benzalkonium salts (**5B**, **6B**) (Figure S2). Stronger activities than those of benzalkonium salts were shown against *Staphylococcus aureus* by compounds with a C<sub>14</sub> or C<sub>16</sub> side chain. In the case of MRSA, the activities of compounds **5a–6b** were similar to those of benzalkonium salts. The strains of G<sup>+</sup> bacteria were sensitive to the test compounds in the order: SA > MRSA > En.

The antibacterial activities against G<sup>-</sup> bacteria were significantly lower. The resistance of G<sup>-</sup> bacteria to antimicrobial agents presumably arises from the higher lipid content of the cell membrane and the presence of the outer phospholipid membrane layer with proteoglycans, which serves as a stronger physicochemical barrier [18,25,54,55,57]. The most promising activity was exhibited by compounds with a C<sub>16</sub> alkyl chain, followed by those with C<sub>14</sub>, which attained similar activity as the standards (**5B**, **6B**). These analogues also have broad-spectrum efficacy, like benzalkonium salts (see SI). C<sub>12</sub>-derivatives had lower antibacterial effects, and poor activity in the case of *Stenotrophomonas maltophilia* and both *Klebsiella* strains. Overall, varying the position of the methyl group on the aromatic ring had a negligible effect on antibacterial efficacy compared to the elongation of the alkyl chain. Our results correspond to published data by Viscari et al.; those authors compared the antibacterial efficiency of 1-dodecyl-4-methylpyridinium bromide (**4a**) and *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide (**4B**) as standards against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [42].

The antifungal efficiencies were assessed as the minimum inhibitory concentrations (MIC) for seven fungi: four yeast strains, i.e., *Candida parapsilosis sensu stricto* EXF-8411 (CAPA), *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-8417 (RHMU), *Exophiala dermatitidis* EXF-8470 (EXDE), *Aureobasidium melanogenum* EXF-8432 (AUME); and the three filamentous fungi, i.e., *Bisifusarium dimerum* EXF-8427 (BIDI), *Penicillium chrysogenum* EXF-1818 (PECH) and *Aspergillus versicolor* EXF-8692 (ASVE).

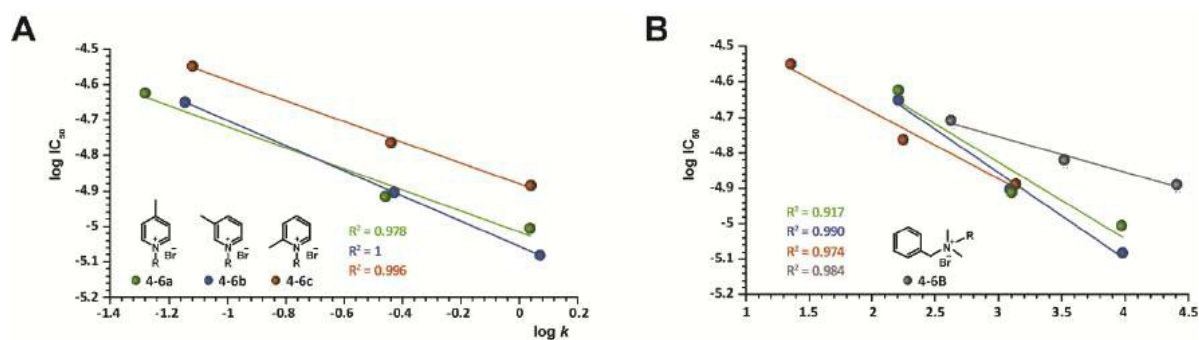
A similar relationship was observed between antifungal activity and picolinium side-chain prolongation as for antibacterial activity, i.e., the increasing trend of efficiency was with elongation of the side-chain C<sub>12</sub> < C<sub>14</sub> < C<sub>16</sub>. All prepared QASs had moderate to very good efficacy against *Aureobasidium melanogenum*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Exophiala dermatitidis*, while the remaining tested fungi showed only minor sensitivity to compounds bearing a C<sub>12</sub> chain (**4a–c**). Picolinium salts **5a–6c** were efficient against a whole spectrum of selected fungi, even more so than benzalkonium salts. Again, the position of the methyl substituent on the aromatic ring does not seem to affect antifungal activity significantly compared to the effect of the alkyl chain length. MIC for individual fungal strains are listed in Table S2 (in SI).

Finally, the antiviral activity against varicella zoster virus (VZV) was determined in order to evaluate the width of the antimicrobial spectrum. The reduction factors, expressed as the change of

values of 50% tissue culture infectious doses ( $\log\text{TCID}_{50}$ ) of viral titer before and after 5 min exposure time to compounds being tested are summarized in Table S3 (see SI). The efficacy of the antiviral activity of antiviral drugs should exhibit at least a reduction factor of 4 in the virus titer. However, none of our compounds or standards achieved such a result. The highest effect against VZV was manifested by benzalkonium salts with  $C_{12}$  alkyl chain (reduction factor = 4.67), and from the picolinium series **5a** and **5b**, which exerted some activity at a concentration of 0.01% (reduction factor = 1.34). Predictably, higher antiviral activity could be expected at higher concentrations, i.e., typically those used in practice in the case of QASs, against enveloped viruses. Unfortunately, no SAR can be deduced, since  $C_{16}$  analogues, due to their limited solubility, were tested at half the concentration (0.005%) of  $C_{12}$  and  $C_{14}$  analogues (0.01%).

### 2.3. Cytotoxic Effect on Mammalian Cells

A cell viability assay (the MTT assay) of the prepared compounds was performed on eukaryotic mammalian hamster ovarian cells (CHO-K1), and is expressed as  $\text{IC}_{50}$ . In contrast to the cidal effects of the compounds, their cytotoxic potential on eukaryotic cells was linearly dependent on their lipophilicity. Figure 4 shows a significant trend that side chain elongation relates to increasing lipophilicity of the compound and higher cytotoxic effect, facilitated by better penetration into the cell membrane. The influence of the substituent position on the aromatic ring was more pronounced in comparison to the cidal effects, with cytotoxicity increasing in the order *o*-picolinium < *p*-picolinium < *m*-picolinium. The cytotoxicity, expressed as the  $\text{IC}_{50}$  for individual compounds, is listed in Table S4 (in SI).



**Figure 4.** Cytotoxicity of prepared QASs **4a–6c** (A) and their comparison with benzalkonium salts **4–6B** (B).

The comparison of picolinium and benzalkonium salts with 3-hydroxypiridinium [18] clearly proved that the introduction of lipophobic substituents on pyridine contributes to the overall lipophilicity of compounds and increases their cytotoxic potential (Figure 4B). Moreover, the introduction of the hydroxyl substituent resulted in higher hydrophilicity of the whole structure and reduced cytotoxicity.

In summary, the cytotoxicity is clearly based on the lipophilicity of the compound in the way that the increasing lipophilicity causes higher toxic potential. However, the alkyl chain showed the major impact of the overall lipophilicity of the compounds; the minor contribution of the methyl substituent on aromatic ring was observed in the case of compounds **4a–6c**. Nevertheless, picolinium salts show a similar effect on cell viability as the benzalkoniums, which are considered to be nontoxic surfactants.

## 3. Materials and Methods

### 3.1. General Synthetic Data

All commercial reagents for synthesis were purchased as reagent grade from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic) and used without further purification. Anhydrous solvents for synthesis

were purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic), and the others were purchased from Penta chemicals Co or VWR International (Prague, Czech Republic). Acetonitrile, methanol and formic acid for LC-MS analyses were obtained from Sigma-Aldrich in LC-MS grade purity (Czech Republic). Ultrapure water was produced by Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF apparatus (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Thin-layer chromatography was carried out on Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> analytical plates (Prague, Czech Republic); detection was accomplished with phosphomolybdic acid stain (10 g PMA in 100 mL EtOH), or ultraviolet light (254 nm lamp). Uncorrected melting points of prepared compounds were determined by Melting Point Apparatus—Stuart SMP30 (Melting Point Apparatus – Stuart SMP30, Eaton, United Kingdom).

<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of the prepared compounds were recorded at ambient temperature on a Varian S500 spectrometer (499.87 MHz for <sup>1</sup>H and 125.71 MHz for <sup>13</sup>C, Varian, Palo Alto, CA, USA). The NMR spectra were processed with MestReNova 12.0.4-22023, 2018 Mestrelab Research S.L. The chemical shift values for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra are reported in ppm (δ) relative to residual solvent peak DMSO (δ<sub>H</sub> = 2.55 ppm, δ<sub>C</sub> = 39.52 ppm). For <sup>1</sup>H, δ are given in parts per million (ppm) relative to solvent, and the coupling constants (*J*) are expressed in Hertz (Hz). Signals are quoted as s = singlet, d = doublet, t = triplet or m = multiplet.

The HPLC-MS analysis of intermediates and final products was performed using a Dionex UltiMate 3000 analytical system coupled with a Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) according to a gradient method using a Waters Atlantis dC18 (2.1 × 100 mm/3 μm; Waters, Ireland) column previously described by Benkova et al. (2019) [26]. The purity of samples was determined from UV chromatograms recorded at a wavelength of 254 nm, and the HRMS results were determined from the total ion current spectra.

### 3.1.1. General Procedure for the Synthesis of Quaternary Ammonium Salts.

Appropriate bromide analogues (0.25 mmol, 1 eq) were dissolved in ACN (0.6 mL), and the corresponding amine (1.2 eq) was added. The reaction mixture was stirred under reflux for 48 h, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude products were purified by crystallization from diethyl ether, filtered, washed with diethyl ether at ambient temperature, and allowed to dry to obtain corresponding products in yields 50–98%.

*1-Dodecyl-4-methylpyridinium bromide (4a)*. Compound **4a** was obtained as white crystals (50%); m.p. 41.4 °C–42.8 °C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 8.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.60 (s, 3 H), 1.92–1.83 (m, 2H), 1.30–1.17 (m, 18 H), 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm): 158.69, 143.69, 128.30, 59.80, 31.26, 30.57, 28.97, 28.88, 28.76, 28.67, 28.35, 25.34, 22.06, 21.33, 13.92. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for [M<sup>+</sup>] C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sup>+</sup> (*m/z*) 262.2529; found 262.2527.

*4-Methyl-1-tetradecylpyridinium bromide (5a)*. Compound **5a** was obtained as white crystals (95%); m.p. 60.4 °C–62.3 °C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 8.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.91–1.80 (m, 2H), 1.36–1.09 (m, 22H), 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm): 158.71, 143.68, 128.31, 59.84, 31.27, 30.56, 29.03, 29.01, 28.99, 28.97, 28.89, 28.77, 28.68, 28.35, 25.35, 22.07, 21.34, 13.93. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for [M<sup>+</sup>] C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>N<sup>+</sup> (*m/z*) 290.2842; found: 290.2837.

*1-Hexadecyl-4-methylpyridinium bromide (6a)*. Compound **6a** was obtained as white crystals (98%); m.p. 79.9 °C–81.9 °C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 8.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.95–1.78 (m, 2H), 1.44–1.13 (m, 26H), 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm): 158.69, 143.68, 128.30, 59.81, 31.26, 30.56, 29.02, 28.97, 28.89, 28.77, 28.67, 28.36, 25.34, 22.06, 21.32, 13.91. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for [M<sup>+</sup>] C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sup>+</sup> (*m/z*): 318.3155; found: 318.3149.

*1-Dodecyl-3-methylpyridinium bromide (4b)*. Compound **4b** was obtained as white crystals (80%); m.p. 34.0 °C–36.0 °C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 9.09 (s, 1H), 8.98 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* =

8.0 Hz, 1H), 8.10–8.04 (m, 1H), 4.60–4.54 (m, 2H), 2.50 (s, 3H), 1.96–1.87 (m, 2H), 1.48–1.14 (m, 18H), 0.84 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 145.69, 144.22, 141.94, 138.68, 127.29, 60.49, 31.26, 30.62, 28.97, 28.89, 28.75, 28.67, 28.36, 25.37, 22.06, 17.83, 13.92. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for  $[\text{M}]^+ \text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}^+$  ( $m/z$ ): 262.2529; found: 262.2525.

**3-Methyl-1-tetradecylpyridinium bromide (5b).** Compound **5b** was obtained as white crystals (95%); m.p. 72.3 °C–74.3 °C.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 9.08 (s, 1H), 8.97 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 8.46 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.09–8.04 (m, 1H), 4.59–4.54 (m, 2H), 2.50 (s, 3H), 1.95–1.87 (m, 2H), 1.55–0.97 (m, 22H), 0.85 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 145.70, 144.21, 141.94, 138.70, 127.29, 60.52, 31.27, 30.62, 29.03, 29.01, 28.99, 28.98, 28.90, 28.75, 28.68, 28.37, 25.38, 22.07, 17.84, 13.92. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for  $[\text{M}]^+ (m/z) \text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}^+$  290.2842; found: 290.2835.

**1-Hexadecyl-3-methylpyridinium bromide (6b).** Compound **6b** was obtained as white crystals (96%); m.p. 70.8 °C–72.6 °C.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 9.09 (s, 1H), 8.98 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 8.46 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.10–8.03 (m, 1H), 4.60–4.53 (m, 2H), 2.50 (s, 3H), 1.96–1.86 (m, 2H), 1.48–1.14 (m, 26H), 0.84 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 145.69, 144.21, 141.94, 138.68, 127.28, 60.50, 31.26, 30.62, 29.02, 28.97, 28.90, 28.75, 28.67, 28.37, 25.38, 22.06, 17.82, 13.91. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for  $[\text{M}]^+ \text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}^+$  ( $m/z$ ): 318.31553; found: 318.3149.

**1-Dodecyl-2-methylpyridinium bromide (4c).** Compound **4c** was obtained as white crystals (88%); m.p. 121.9 °C–123.9 °C.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 9.07 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 8.51–8.45 (m, 1H), 8.07 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 8.01–7.95 (m, 1H), 4.59–4.54 (m, 2H), 2.85 (s, 3H), 1.88–1.79 (m, 2H), 1.42–1.13 (m, 18H), 0.84 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 155.04, 145.33, 145.00, 129.92, 125.52, 57.19, 31.25, 29.36, 28.97, 28.96, 28.90, 28.80, 28.67, 28.43, 25.63, 22.05, 19.55, 13.91. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for  $[\text{M}]^+ \text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}^+$  ( $m/z$ ): 262.25293; found: 262.2525.

**2-Methyl-1-tetradecylpyridinium bromide (5c).** Compound **5c** was obtained as white crystals (84%); m.p. 125.7 °C–127.4 °C.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 9.06 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 8.51–8.45 (m, 1H), 8.07 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 8.01–7.95 (m, 1H), 4.59–4.52 (m, 2H), 2.85 (s, 3H), 1.88–1.77 (m, 2H), 1.44–1.04 (m, 22H), 0.84 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 155.04, 145.33, 145.00, 129.92, 125.52, 57.19, 31.25, 29.36, 29.02, 29.00, 28.97, 28.91, 28.81, 28.67, 28.43, 25.63, 22.05, 19.54, 13.91. HRMS (HESI<sup>+</sup>): calculated for  $[\text{M}]^+ \text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{N}^+$  ( $m/z$ ): 290.28423, found: 290.2835.

**1-Hexadecyl-2-methylpyridinium bromide (6c).** Compound **6c** was obtained as white crystals (80%); m.p. 126.8 °C–128.8 °C.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 9.02 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 8.51–8.44 (m, 1H), 8.05 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 8.00–7.94 (m, 1H), 4.57–4.50 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.84 (s, 3H), 1.88–1.78 (m, 2H), 1.58–1.06 (m, 26 H), 0.85 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm): 155.06, 145.32, 145.01, 129.93, 125.54, 57.23, 31.26, 29.36, 29.02, 28.98, 28.91, 28.81, 28.68, 28.44, 25.65, 22.07, 19.53, 13.93. HRMS (HESI<sup>+</sup>) calculated for  $[\text{M}]^+ \text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}^+$  ( $m/z$ ): 318.31553; found: 318.3153.

### 3.1.2. Determination of Lipophilicity Expressed as Clog $k$ or Clog $p$

Capacity factors  $k$  of the final products were measured with the aforementioned HPLC-MS system using the isocratic method described by Benkova et al. (2019) [26], with the ratio of ACN:H<sub>2</sub>O (both with 0.1% formic acid  $v/v$ ) changed to 73:27. The studied compounds were dissolved in methanol. Uracil (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) was used as a void volume marker ( $t_0$ ). Retention times were determined from mass spectrometry total ion current scans. Capacity factors  $k$  were calculated using the equation:

$$(1)$$

where  $t_1$  = retention time of the analyte and  $t_0$  = void time. Uracil was used as a void volume marker. Lipophilicity expressed as Clog  $p$  was calculated using MarvinSketch (Marvin 17.21.0, ChemAxon, Budapest, Hungary, <https://www.chemaxon.com>), and the values were correlated to log  $k$  values. Lipophilicity was expressed as a dependence of log  $k$  to the calculated Clog  $p$ , and the results in the studied group were characterized by classical statistical criteria: coefficient of determination  $R^2$  (0.97+).

### 3.1.3. Conductivity Measurements

Conductivity measurements of aqueous solutions of the prepared surfactants were carried out in triplicate on a Tristar Orion conductivity meter with conductivity cell 013005MD (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The apparatus was controlled by the Navigator 21 software, using continuous data collection. The experiment was set up according to previous experience: the solutions were temperature-controlled at  $45 \pm 0.1$  °C [9]. Aqueous stock solutions of surfactants were prepared at concentrations of 0.1500 mol/L for C<sub>12</sub> homologs, 0.0200 mol/L for C<sub>14</sub> homologs and 0.0150 mol/L for C<sub>16</sub>. For the determination of CMC, the aqueous stock solutions of surfactants were further diluted. The linear pump Lineomat (VEB MLW Labortechnik Ilmenau, Ilmenau, Germany) was used with a flow rate of 0.43 mL/min. An AREX stirrer (VELP Scientifica Srl, Milano, Italy) was used for continuous agitation, and conductivity was recorded every 3 s. The equation for the linear regression and the coefficient of determination was calculated for both linear parts, and the intersection of both axes was determined as the value of CMC (Figure S1).

## 3.2. The biological Evaluation of Picolinium Salts

### 3.2.1. Evaluation of Antibacterial Activity

The antibacterial activities of the prepared compounds were investigated on nine bacterial strains, i.e., three Gram-positive (*Staphylococcus aureus* C1947, methicillin-resistant *S. aureus* C1926, vancomycin-resistant enterococci S2484), and six Gram-negative (*Escherichia coli* A1235, *Klebsiella pneumoniae* C1950, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *K. pneumoniae* C1934, *Acinetobacter baumannii* J3474, *Stenotrophomonas maltophilia* J3552 and *Yersinia bercovieri* CNCTC 6230). The latter was ordered from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), while the others were mostly resistant clinical isolates of patients from the University Hospital in Hradec Kralove (Czech Republic).

The antibacterial properties and the minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations of the compounds tested were determined by the broth microdilution testing method modified according to standard M07-A11 [58] and the protocol published previously [26]. Mueller-Hinton broth (M-H broth, HiMedia, Mumbai, India) adjusted to pH 7.4 ( $\pm 0.2$ ) was used as the test medium. All compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) so that the final concentration of DMSO did not exceed 1% in the test medium (also applied to growth control). The wells of the microtitration plates contained 200  $\mu$ L of the M-H broth with two-fold serial dilutions of the compounds (500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15.63; 7.81; 3.91; 1.95; 0.98; 0.49  $\mu$ mol/L), and were inoculated with 10  $\mu$ L of bacterial suspension. A bacterial inoculum in sterile water (B. Braun Medical s.r.o., Melsungen, Germany) was adjusted densitometrically to match 0.5 McFarland turbidity scale. The MIC values, defined as complete inhibition of bacterial growth, were read visually and verified by microscopy after 24 h and 48 h incubation at  $37 \pm 1$  °C. The MBCs were established for all prepared compounds as the concentrations that provided  $\geq 99.9\%$  decrease in the number of colonies after subculturing a 10  $\mu$ L aliquot from each well in 200  $\mu$ L of fresh M-H broth. The total incubation time was 48 h. For comparison, standard reference compounds *N*-benzalkonium bromide (**4B**, **5B**, **6B**) were included in the corresponding concentrations.

### 3.2.2. Evaluation of Antifungal Activity

The antifungal activity was evaluated on seven fungal strains, i.e., four yeasts (*Candida parapsilosis sensu stricto* EXF-8411, *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-8417 and *Exophiala dermatitidis* EXF-8470, *Aureobasidium melanogenum* EXF-8432), and three filamentous fungi (*Bisifusarium dimerum* EXF-8427, *Penicillium chrysogenum* EXF-1818, and *Aspergillus versicolor* EXF-8692). The strains were obtained from the Ex Culture collection (in the frame of the Infrastructural Centre Mycosmo) at the Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia. All isolates were maintained on malt extract agar (MEA) prior to being tested.

The antifungal activities were evaluated using the agar-well diffusion test according to the adjusted protocol published by Zovko et al. [59]. The fungal strain in the exponential (log) phase of



growth was inoculated into 10 mL of sterile liquid malt extract broth (MEB), and 100  $\mu$ L of the prepared suspension was poured onto solid MEA and spread on the plate surface. After the suspension dried, the circles of agar ( $\Phi = 5.5$  mm) were cut out from the inoculated culture plates. Then, 50  $\mu$ L of the prepared compounds diluted in DMSO was added into the wells in the agar plates. Each concentration (1, 0.5, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 mmol/L) of the compounds was tested three times using three separate agar plates. Plates were incubated at room temperature, and after 72 h (yeasts) or 7 days (filamentous fungi) of incubation, the minimum inhibitory concentrations (MICs), defined as the lowest concentrations which inhibit the visible growth of the microorganisms being tested, were determined. The diameters of the inhibition zones were measured with a ruler. The shortest distance (0.5 mm) from the outer margin of the well to the initial point of microbial growth was estimated as the inhibitory zone. The inhibitory activity of DMSO was also checked and found to be zero.

### 3.2.3. Evaluation of Virucidal Activity

The virucidal activity of synthesized agents was evaluated using a strain of the varicella zoster virus (VZV) from the collection of VZV isolates at the Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Hradec Kralove, Czech Republic.

A quantitative suspension test was used to determine the virucidal activity of the tested compounds against VZV. Briefly, one part of the virus suspension was mixed with one part of fetal bovine serum diluted with phosphate-buffered saline (1:5.5) and eight parts of the prepared compounds or reference drugs **4B**, **5B**, **6B**. The mixtures were kept at room temperature for 5 min (exposure time). After the exposure period, the mixtures were serially diluted ten-fold with ice-cold DMEM. Then, 100  $\mu$ L of each dilution were seeded into a 96-well microtiter plate with NHLF cells (ATCC, Manassas, VA, USA) and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until a cytopathic effect was detected, i.e., approximately 10–12 days. Six wells per sample dilution were inoculated. Virus-untreated controls with identical protein concentrations were also tested.

Virus titer was determined using the method of Spearman and Kaerber and expressed as log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL including the standard [60]. According to the European Standard EN 14476 for virucidal activity of disinfection, a product should demonstrate at least a log<sub>10</sub> reduction of 4 in virus titer, corresponding to 99.99% inactivation [61]. To differentiate between virus-induced cytopathogenic changes and the toxic effect caused by the tested compounds, the cell monolayer was monitored until the end of the virucidal activity testing period for morphological changes after exposure to the disinfectant solution.

### 3.2.4. Cell Viability Assessment

Standard MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used according to the manufacturer's protocol on CHO-K1 cells (Chinese hamster ovary, ECACC, Salisbury, UK) in order to compare the cytotoxic effect of the studied compounds [26]. The cells were cultured according to ECACC recommended conditions and seeded at a density of 8000 per well. Briefly, the tested compounds were dissolved in DMSO and subsequently in the growth medium (F-12) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin, so that the final concentration of DMSO did not exceed 0.5% (*v/v*). Cells were exposed to the tested compounds for 24 h. The medium was then replaced by a medium containing 0.5 mg/mL of MTT, and the cells were allowed to produce formazan for approximately another 3 h under surveillance. Thereafter, the medium with MTT was removed, and crystals of formazan were dissolved in DMSO (100  $\mu$ L). Cell viability was assessed spectrophotometrically by the amount of formazan produced. Absorbance was measured at 570 nm with a 650 nm reference wavelength on Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). IC<sub>50</sub> was then calculated from the control-subtracted triplicates using nonlinear regression (four parameters) in the GraphPad Prism 5.03 and 7.03 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Final IC<sub>50</sub> and SEM values were obtained as a mean of three independent measurements.

#### 4. Conclusions

Picolinium salts with an aliphatic carbon chain (C<sub>12</sub>–C<sub>16</sub>) were prepared by one-step synthesis. The products were characterized by common analytical methods (NMR and HRMS) and their biological activities, lipophilicity and critical micellar concentration (CMC) were evaluated. The prepared picolinium salts showed good antimicrobial properties as well as broad-spectrum activity against a selected panel of microorganisms including bacteria, fungi and enveloped viruses below their CMC values. Their activities were compared with the antimicrobial effect of commonly used benzalkonium analogues with the same alkyl chain length. Picolinium salts with C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> side chains achieved similar or better results for antimicrobial efficacy than the reference benzalkoniums. Their antibacterial activity was comparable to that of selected standards on both G<sup>+</sup> and G<sup>−</sup> bacteria, although against G<sup>−</sup> the antibacterial effect was weaker. The best activity was shown against *Staphylococcus aureus* (G<sup>+</sup>), while for G<sup>−</sup> strains, the greatest efficiency was observed against *Acinetobacter baumannii* and *Yersinia bercovieri*. Furthermore, they showed promising antifungal efficiency. Concurrently, the picolinium salts exhibited satisfactory low cytotoxicity against mammalian cells, i.e., comparable to that of benzalkonium compounds, which are considered as safe.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1). Figure S1: Dependency of CMC-specific conductivity on concentration; Figure S2: The broad-spectrum antimicrobial activity; Table S1: Antibacterial activity; Table S2: Antifungal activity; Table S3: Antiviral activity; Table S4.: Cytotoxicity and calculated lipophilicity

**Author Contributions:** Sa.S. and D.M. were responsible for the preparation of picolinium salts and characterization of their structure and purity; S.S. and J.M. assessed the critical micellar concentration of prepared QAS; L.P. and R.D. performed HPLC analysis including calculation of lipophilicity; R.S. assessed the antiviral activity; M.B. and O.S. were responsible for the evaluation of QAS antibacterial and antifungal properties and cytotoxicity assessment; C.S. and N.G.C. took part in antifungal evaluation; K.K. and O.S. participated in the QAS design, management of the study and final correction of the manuscript and correspondence. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Czech Health Research Council (no. NV19-09-00198).

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Ian McColl MD for assistance with the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

AB	<i>Acinetobacter baumannii</i> ;
ACN	acetonitrile;
ASVE	<i>Aspergillus versicolor</i> ;
AUME	<i>Aureobasidium melanogenum</i> ;
BIDI	<i>Bisifusarium dimerum</i> ;
BL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ;
CAPA	<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> ;
CMC	critical micelle concentration;
EC	<i>Escherichia coli</i> ;
En	Vancomycin-resistant enterococci;
ESBL	extended spectrum $\beta$ -lactamase producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> ;
EXDE	<i>Exophiala dermatitidis</i> ;
HPLC-MS	high-performance liquid chromatography coupled with massspectrometry;
HRMS	high resolution mass spectrometry;
MIC	minimum inhibitory concentration;
MBC	minimum bactericidal concentration;
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ;
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide;
NMR	nuclear magnetic resonance;
PECH	<i>Penicillium chrysogenum</i> ;

QAS	quaternary ammonium salts;
RHMU	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ;
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> ;
SEM	standard deviation;
SE	<i>Staphylococcus epidermis</i> ;
SM	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ;
VZV	Varicella zoster virus;
YB	<i>Yersinia bercovieri</i> ;

## References

1. Kuca, K.; Kivala, M.; Dohnal, V. A general method for the quaternization of *N,N*-dimethyl benzylamines with long chain *n*-alkylbromides. *J. Appl. Biomed.* **2004**, *2*, 195–198, doi:10.32725/jab.2004.023.
2. Augusta, S.; Gruber, H.F.; Streichsbier, F. Synthesis and antibacterial activity of immobilized quaternary ammonium salts. *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *53*, 1149–1163, doi:10.1002/app.1994.070530903.
3. Grenoble, Z.; Baldelli, S. Adsorption of the Cationic Surfactant Benzyltrimethylhexadecylammonium Chloride at the Silica–Water Interface and Metal Salt Effects on the Adsorption Kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *117*, 259–272, doi:10.1021/jp3091107.
4. Garcia, M.T.; Ribosa, I.; Perez, L.; Manresa, M.A.; Comelles, F. Aggregation Behavior and Antimicrobial Activity of Ester-Functionalized Imidazolium- and Pyridinium-Based Ionic Liquids in Aqueous Solution. *Langmuir* **2013**, *29*, 2536–2545, doi:10.1021/la304752e.
5. Jennings, M.C.; Minbiole, K.P.C.; Wuest, W.M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect Dis.* **2015**, *1*, 288–303, doi:10.1021/acsinfecdis.5b00047.
6. Marek, J.; Stodulka, P.; Cabal, J.; Soukup, O.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Preparation of the Pyridinium Salts Differing in the Length of the *N*-Alkyl Substituent. *Molecules* **2010**, *15*, 1967–1972, doi:10.3390/molecules15031967.
7. Marek, J.; Stodulka, P.; Soukup, O.; Musilek, K.; Cabal, J.; Ramalho, T.C. Synthesis of the Isoquinolinium Salts Differing in the Length of the Side Alkylating Chain. *Mil. Med. Sci. Lett.* **2012**, *81*, 76–81, doi:10.31482/mmsl.2012.010.
8. Obłąk, E.; Piecuch, A.; Guz-Regner, K.; Dworniczek, E. Antibacterial activity of gemini quaternary ammonium salts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *350*, 190–198, doi:10.1111/1574-6968.12331.
9. Marek, J.; Joskova, V.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Benkova, M.; Fucikova, A.; Malinak, D.; Bostik, V.; Kuca, K. Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts. *Lett. Drug Des. Discov.* **2018**, *15*, 828–842, doi:10.2174/1570180814666171110142233.
10. Shtyrlin, N.; Sapozhnikov, S.V.; Galiullina, A.S.; Kayumov, A.R.; Bondar, O.V.; Mirchink, E.P.; Isakova, E.B.; Firsov, A.A.; Balakin, K.V.; Shtyrlin, Y.G. Synthesis and Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium 4-Deoxy pyridoxine Derivatives. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–8, doi:10.1155/2016/3864193.
11. Marek, J.; Malinak, D.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Pasdiorova, M.; Dolezal, M.; Ramalho, T.C. Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules* **2015**, *20*, 3681–3696, doi:10.3390/molecules20033681.
12. Singh, N.; Ghosh, K.K.; Marek, J.; Ramalho, T.C. Hydrolysis of carboxylate and phosphate esters using monopyridinium oximes in cationic micellar media. *Int. J. Chem. Kinet.* **2011**, *43*, 569–578, doi:10.1002/kin.20590.
13. Singh, N.; Karpichev, Y.; Gupta, B.; Satnami, M.L.; Marek, J.; Ramalho, T.C.; Ghosh, K.K. Physicochemical Properties and Supernucleophilicity of Oxime-Functionalized Surfactants: Hydrolytic Catalysts toward Dephosphorylation of Di- and Triphosphate Esters. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 3806–3817, doi:10.1021/jp310010q.
14. Salajkova, S.; Sramek, M.; Malinak, D.; Havel, F.; Musilek, K.; Benkova, M.; Soukup, O.; Vasicova, P.; Prchal, L.; Dolezal, R.; et al. Highly hydrophilic cationic gold nanorods stabilized by novel quaternary ammonium surfactant with negligible cytotoxicity. *J. Biophotonics* **2019**, *12*, e201900024, doi:10.1002/jbio.201900024.
15. Ioannou, C.J.; Hanlon, G.W.; Denyer, S.P. Action of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *51*, 296–306, doi:10.1128/aac.00375-06.

16. Jadhav, M.; Kalhapure, R.S.; Rambharose, S.; Mocktar, C.; Govender, T. Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel heterocyclic quaternary ammonium surfactants. *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *47*, 405–414, doi:10.1016/j.jiec.2016.12.013.
17. Malinak, D.; Dolezal, R.; Marek, J.; Salajkova, S.; Soukup, O.; Vejsová, M.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Penhaker, M.; Musilek, K.; et al. 6-Hydroxyquinolinium salts differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antimicrobial activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5238–5241, doi:10.1016/j.bmcl.2014.09.060.
18. Dolezal, R.; Soukup, O.; Malinak, D.; Savedra, R.; Marek, J.; Dolezalova, M.; Pasdiorova, M.; Salajkova, S.; Korabecny, J.; Honegr, J.; et al. Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 699–711, doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.058.
19. Soukup, O.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Marek, J.; Salajkova, S.; Pasdiorova, M.; Honegr, J.; Korabecny, J.; Nachtigal, P.; Nachon, F.; et al. Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24*, 841–848, doi:10.1016/j.bmc.2016.01.006.
20. Jiao, Y.; Niu, L.-N.; Ma, S.; Li, J.; Tay, F.R.; Chen, J. Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance. *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *71*, 53–90, doi:10.1016/j.progpolymsci.2017.03.001.
21. Tezel, U.; Pavlostathis, S.G. Quaternary ammonium disinfectants: Microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 296–304, doi:10.1016/j.copbio.2015.03.018.
22. McBain, A.J.; Ledder, R.G.; Moore, L.E.; Catrenich, C.E.; Gilbert, P. Effects of Quaternary-Ammonium-Based Formulations on Bacterial Community Dynamics and Antimicrobial Susceptibility. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3449–3456, doi:10.1128/aem.70.6.3449-3456.2004.
23. Yeaman, M.R.; Yount, N.; Hauger, R.L.; Grigoriadis, D.E.; Dallman, M.F.; Plotsky, P.M.; Vale, W.W.; Dautzenberg, F.M. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 27–55, doi:10.1124/pr.55.1.2.
24. Dolezikova Mackova, I.; Macek, T.; Mackova, M. Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou. *Chem. Listy* **2011**, *105*, 346–255.
25. Kocourkova, L.; Novotná, P.; Cujova, S.; Cerovsky, V.; Urbanova, M.; Setnicka, V. Conformational study of melectin and antapin antimicrobial peptides in model membrane environments. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *170*, 247–255, doi:10.1016/j.saa.2016.07.015.
26. Benkova, M.; Soukup, O.; Prchal, L.; Sleha, R.; Elerseck, T.; Novak, M.; Sepčić, K.; Gunde-Cimerman, N.; Dolezal, R.; Bostik, V.; et al. Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained N -Alkylammonium Salts. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 12076–12084, doi:10.1002/slct.201902357.
27. El Hage, S.; Lajoie, B.; Stigliani, J.-L.; Furiga-Chusseau, A.; Roques, C.; Baziard, G. Synthesis, antimicrobial activity and physico-chemical properties of some n-alkyldimethylbenzylammonium halides. *J. Appl. Biomed.* **2014**, *12*, 245–253, doi:10.1016/j.jab.2014.02.002.
28. Williams, H.D.; Sahbaz, Y.; Ford, L.; Nguyen, T.-H.; Scammells, P.J.; Porter, C.J. Ionic liquids provide unique opportunities for oral drug delivery: Structure optimization and in vivo evidence of utility. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1688, doi:10.1039/c3cc48650h.
29. Samanta, S.K.; Bhattacharya, S. Aggregation induced emission switching and electrical properties of chain length dependent  $\pi$ -gels derived from phenylenedivinylen bis-pyridinium salts in alcohol–water mixtures. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 25277, doi:10.1039/c2jm35012b.
30. Fayyaz, S.; Talat, R.; Ali, S.; Khalid, N.; Shah, A.; Ullah, F. Synthesis, Characterization, and Micellization Behavior of Cationic Surfactants: N-Alkyl-3-Methylpyridinium Bromides and Their Drug Interaction Study by UV–Visible Spectroscopy and Conductometry. *J. Surfactants Deterg.* **2019**, *22*, 625–632, doi:10.1002/jsde.12263.
31. Fayyaz, S.; Ali, S.; Khalid, N.; Shah, A.; Ullah, F. One Pot Synthesis and Properties of Cationic Surfactants: N-Alkyl-3-Methylpyridinium Bromide. *J. Surfactants Deterg.* **2016**, *19*, 841–848, doi:10.1007/s11743-016-1817-8.
32. Mishra, A.; Patel, S.; Behera, R.K.; Mishra, B.K.; Behera, G.B. Dye-Surfactant Interaction: Role of an Alkyl Chain in the Localization of Styrylpyridinium Dyes in a Hydrophobic Force Field of a Cationic Surfactant (CTAB). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 2913–2918, doi:10.1246/bcsj.70.2913.

33. Bhattacharya, S.; Samanta, S.K. Unusual salt-induced color modulation through aggregation-induced emission switching of a bis-cationic phenylenedivynylene-based pi hydrogelator. *Chemistry* **2012**, *18*, 16632–16641, doi:10.1002/chem.201201940.
34. Dey, N.; Samanta, S.K.; Bhattacharya, S. Heparin triggered dose dependent multi-color emission switching in water: A convenient protocol for heparinase I estimation in real-life biological fluids. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1486–1489, doi:10.1039/C6CC08657H.
35. A Bell, N.; Bradley, C.S.; Broughton, R.A.; Coles, S.J.; Hibbs, D.E.; Hursthouse, M.B.; Ray, A.K.; Simmonds, D.J.; Thorpe, S.C. Comparison of the structure property relationships in LB films of zwitterionic TCNQ adducts. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 1437–1445, doi:10.1039/b414325f.
36. Mayorga, B.J.L.; Sandoval-Chavez, C.I.; Carreon-Castro, P.; Ugalde-Saldivar, V.M.; Cortez-Guzman, F.; Lopez-Cortes, J.G.; Ortega-Alfaro, M.C.; Sandoval-Chavez, C.I.; Carreon-Castro, M.D.P. Ferrocene amphiphilic D- $\pi$ -A dyes: Synthesis, redox behavior and determination of band gaps. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 6101–6113, doi:10.1039/c8nj00787j.
37. Würthner, F.; Yao, S.; Debaerdemaeker, T.; Wortmann, R. Dimerization of Merocyanine Dyes. Structural and Energetic Characterization of Dipolar Dye Aggregates and Implications for Nonlinear Optical Materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9431–9447, doi:10.1021/ja020168f.
38. Weir, C.A.; Hadizad, T.; Beaudin, A.M.; Wang, Z.Y. Efficient synthesis and decomposition study of optically nonlinear adducts of tetracyanoquinodimethane. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4697–4700, doi:10.1016/s0040-4039(03)01054-2.
39. Adderson, J.E.; Taylor, H. The effects of temperature on the critical micelle concentrations of alkyl  $\alpha$ -picolinium bromides. *J. Pharm. Pharmacol.* **1970**, *22*, 523–530, doi:10.1111/j.2042-7158.1970.tb10557.x.
40. Fu, D.; Gao, X.; Huang, B.; Wang, J.; Sun, Y.; Zhang, W.; Kan, K.; Zhang, X.; Xie, Y.; Sui, X. Micellization, surface activities and thermodynamics study of pyridinium-based ionic liquid surfactants in aqueous solution. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 28799–28807, doi:10.1039/c9ra04226a.
41. Tiwari, A.; Sahoo, M.; Soreng, P.; Mishra, B.K. Synthesis, Characterization, Solution Behavior, and Density Functional Theory Analysis of Some Pyridinium-Based Ionic Liquids. *J. Surfactants Deterg.* **2018**, *21*, 367–373, doi:10.1002/jsde.12034.
42. Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Barolo, C.; Savarino, P.; Barni, E.; Fiscaro, E. Synthesis and surface and antimicrobial properties of novel cationic surfactants. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8197–8203, doi:10.1021/jo0006425.
43. Akhter, K.; Ullah, K.; Talat, R.; Haider, A.; Khalid, N.; Ullah, F.; Ali, S. Synthesis and characterization of cationic surfactants and their interactions with drug and metal complexes. *Heliyon* **2019**, *5*, e01885, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01885.
44. Shashkov, M.V.; Sidelnikov, V.N.; Zaikin, P. Selectivity of stationary phases based on pyridinium ionic liquids for capillary gas chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2014**, *88*, 717–721, doi:10.1134/s0036024414040268.
45. Crooks, P.; Ravard, A.; Wilkins, L.H.; Teng, L.-H.; Buxton, S.T.; Dwsoskin, L.P. Inhibition of nicotine-evoked [3H] dopamine release by pyridino N-substituted nicotine analogues: A new class of nicotinic antagonist. *Drug Dev. Res.* **1995**, *36*, 91–102, doi:10.1002/ddr.430360204.
46. Dwsoskin, L.P.; Sumithran, S.P.; Zhu, J.; Deaciuc, A.; Ayers, J.T.; A Crooks, P. Subtype-selective nicotinic receptor antagonists: Potential as tobacco use cessation agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1863–1867, doi:10.1016/j.bmcl.2003.10.073.
47. Zheng, F.; Bayram, E.; Sumithran, S.P.; Ayers, J.T.; Zhan, C.-G.; Schmitt, J.D.; Dwsoskin, L.P.; Crooks, P. QSAR modeling of mono- and bis-quaternary ammonium salts that act as antagonists at neuronal nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14*, 3017–3037, doi:10.1016/j.bmc.2005.12.036.
48. Zheng, G.; Sumithran, S.P.; Deaciuc, A.G.; Dwsoskin, L.P.; Crooks, P. Tris-azaaromatic quaternary ammonium salts: Novel templates as antagonists at nicotinic receptors mediating nicotine-evoked dopamine release. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6701–6706, doi:10.1016/j.bmcl.2007.10.062.
49. Zheng, F.; McConnell, M.; Zhan, C.-G.; Dwsoskin, L.P.; Crooks, P. QSAR study on maximal inhibition ( $I_{max}$ ) of quaternary ammonium antagonists for S(-)-nicotine-evoked dopamine release from dopaminergic nerve terminals in rat striatum. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17*, 4477–4485, doi:10.1016/j.bmc.2009.05.010.

50. Madaan, P.; Tyagi, V.K. Quaternary pyridinium salts: A review. *J. Oleo Sci.* **2008**, *57*, 197–215, doi:10.5650/jos.57.197.
51. Mivehi, L.; Bordes, R.; Holmberg, K. Adsorption of cationic gemini surfactants at solid surfaces studied by QCM-D and SPR—Effect of the presence of hydroxyl groups in the spacer. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *419*, 21–27, doi:10.1016/j.colsurfa.2012.11.044.
52. Łuczak, J.; Jungnickel, C.; Łącka, I.; Stolte, S.; Hupka, J. Antimicrobial and surface activity of 1-alkyl-3-methylimidazolium derivatives. *Green Chem.* **2010**, *12*, 593, doi:10.1039/b921805j.
53. Pernak, J.; Skrzypczak, A.; Bogacki, M. Quantitative Relation between Surface Active Properties and Antibiotic Activity of 1-Alkyl-3-alkylthiomethylimidazolium Chlorides. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 2019–2020, doi:10.1248/cpb.43.2019.
54. Zhou, C.; Wang, F.; Chen, H.; Li, M.; Qiao, F.; Liu, Z.; Hou, Y.; Wu, C.; Fan, Y.; Liu, L.; et al. Selective Antimicrobial Activities and Action Mechanism of Micelles Self-Assembled by Cationic Oligomeric Surfactants. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 4242–4249, doi:10.1021/acsami.5b12688.
55. Laatiris, A.; El Achouri, M.; Infante, M.R.; Bensouda, Y. Antibacterial activity, structure and CMC relationships of alkanediyl  $\alpha,\omega$ -bis(dimethylammonium bromide) surfactants. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 645–650, doi:10.1016/j.micres.2006.09.006.
56. Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. A novel approach to mode of action of cationic biocides morphological effect on antibacterial activity. *J. Appl. Bacteriol.* **1995**, *78*, 55–60, doi:10.1111/j.1365-2672.1995.tb01673.x.
57. Tawfik, S.M. Synthesis, surface, biological activity and mixed micellar phase properties of some biodegradable gemini cationic surfactants containing oxycarbonyl groups in the lipophilic part. *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *28*, 171–183, doi:10.1016/j.jiec.2015.02.011.
58. CLSI; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th ed.; CLSI standard M07; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
59. Zovko, A.; Gabric, M.V.; Sepcic, K.; Pohleven, F.; Jaklic, D.; Cimerman, N.G.; Lu, Z.; Edrada-Ebel, R.; Houssen, W.E.; Mancini, I.; et al. Antifungal and antibacterial activity of 3-alkylpyridinium polymeric analogs of marine toxins. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2012**, *68*, 71–77, doi:10.1016/j.ibiod.2011.10.014.
60. Spearman, C. The Method of “Right and Wrong Cases” (Constant Stimuli) without Gauss’s Formula. *Br. J. Psychol.* **1908**, *2*, 227–242, doi:10.1111/j.2044-8295.1908.tb00176.x.
61. EN 14476 Chemical Disinfectants and Antiseptics—Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Virucidal Activity in the Medical Area—Test Method and Requirements (Phase 2, Step 1).

**Sample Availability:** Samples of all compounds (**4a–6c**, **4B–6B**) are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Z Medicinal Chemistry &amp; Drug Discovery

Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained *N*-Alkylammonium Salts

Marketa Benkova,<sup>[a, b]</sup> Ondrej Soukup,<sup>[b]</sup> Lukas Prchal,<sup>[b]</sup> Radek Sleha,<sup>[a]</sup> Tina Eleršek,<sup>[c]</sup> Martin Novak,<sup>[b]</sup> Kristina Sepčić,<sup>[d]</sup> Nina Gunde-Cimerman,<sup>[d]</sup> Rafael Dolezal,<sup>[b]</sup> Vanda Bostik,<sup>[a]</sup> Pavel Bostik,<sup>[a]</sup> and Jan Marek\*<sup>[a, b]</sup>

Quaternary ammonium salts belong to the group of cationic lipophilicity and cytotoxicity were likewise performed to assess surfactants and their structure, especially the length of the alkyl potential lipophilicity-activity dependence. Almost all compounds showed a high efficacy against bacterial and fungal microorganisms. Globally, there is a growing need to develop strains. Significant effects against Varicella zoster virus and novel compounds due to the increasing resistance of microalgae were also noticed. Some of novel drugs outperformed organisms to antimicrobial agents. Three series of quaternary standard benzalkonium salts. The expected trend of the ammonium compounds based on dichained *N*-alkylammonium correlation of an increase of cytotoxicity with the length of salts were synthesized with different carbon chain lengths (C<sub>8</sub>, carbon chain was confirmed. These compounds show a higher C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>). These compounds were characterized with potential as disinfectants rather than antiseptics due to their analytical methods and tested in vitro for antibacterial, anti-cytotoxic potential and low selectivity for microbes over fungal, antiviral and anti-algal activities. In addition, the mammalian cells.

determination of their critical micelle concentrations, lipophi-

## Introduction

Quaternary ammonium compounds (QACs) belong to the group of cationic surfactants used in many applications in different fields, e. g. medicine, food and textile industry or cosmetic products.<sup>[1–3]</sup> Since 1930s, QACs have been well-known for their antimicrobial activity<sup>[4]</sup> and characteristic low price, easy preparation and high efficacy.<sup>[5]</sup> Quaternary ammonium salts consist of a positively charged nitrogen atom incorporated into an aromatic ring (e. g. pyridinium, imidazolium, quinolinium, and isoquinolinium) or occurring as a non-cyclic atom (e. g. benzalkonium or cetrimonium)<sup>[2,6,7]</sup> covalently bound to four carbon atoms,<sup>[8]</sup> where at least one substituent (R) is an *n*-alkyl chain with different carbon lengths (C<sub>8</sub>–C<sub>18</sub>) and,

typically, chloride (Cl<sup>−</sup>) or bromide (Br<sup>−</sup>) counter anion.<sup>[9,10]</sup> This quaternary nitrogen constitutes the hydrophilic (polar) part capable of interactions with polar environments and responsible for water solubility, whereas the long alkyl chain forms the hydrophobic (non-polar) part capable of penetrating non-polar agglomerates and interacting with cell components such as membranes, receptors and lipids.<sup>[11,12]</sup>

The structure of the QAC, especially the length of the alkyl chain, plays a significant role in its activity against various microorganisms.<sup>[13]</sup> The maximal effect of these compounds against Gram-positive bacteria and yeasts has been observed in the presence of a carbon chain lengths of *n* = 12–14, whereas, in the case of Gram-negative bacteria, the maximum activity has been accomplished with alkyl lengths of *n* = 14–16. The

compounds with chain lengths *n* = 4 and *n* = 18 are practically inactive.<sup>[3]</sup> QACs display an activity against a broad spectrum of pathogens (i. e. bacteriostatic, sporistatic, tuberculostatic, algistatic) at very low concentrations.<sup>[5]</sup> However, Gram-positive bacteria are more sensitive to quaternary ammonium compounds when compared to Gram-negative bacteria, mainly due to the differences between Gram-positive and Gram-negative bacterial cell walls and the inability of QACs to penetrate the outer-membrane layer of Gram-negative bacteria and the underlying cytoplasmic membrane causing its disruption and leakage.<sup>[14]</sup>

The antimicrobial activity of QACs stems from the fact, that the negatively charged bacterial membrane surface is stabilized by divalent cations, i. e. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. In this regard, Ca<sup>2+</sup> cations are replaced by a positive charge of cationic antimicro-

[a] M. Benkova, Dr. R. Sleha, Prof. V. Bostik, Prof. P. Bostik, Dr. J. Marek  
Department of Epidemiology, University of Defence in Brno, Třebešská  
1575, 500 05 Hradec Králové (Czech Republic)  
E-mail: jan.marek@unob.cz

[b] M. Benkova, Prof. O. Soukup, Dr. L. Prchal, M. Novak, Dr. R. Dolezal,  
Dr. J. Marek  
University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
(Czech Republic)

[c] Prof. T. Eleršek  
Department for Genetic Toxicology and Cancer Biology, National Institute  
of Biology, Večna pot 111, 1111 Ljubljana (Slovenia)

[d] Prof. K. Sepčić, Prof. N. Gunde-Cimerman  
Department of Biology, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000  
Ljubljana (Slovenia)

Supporting information for this article is available on the WWW under  
<https://doi.org/10.1002/slct.201902357>

bials upon their application resulting in the embedding of the hydrophobic alkyl chain into the phospholipid layer. This leads to the loss of membrane fluidity and to the segmentation of the membrane into clusters, which are then pulled out of the phospholipid bilayer into the aqueous environment resulting in the cell death.<sup>[3]</sup> Dichained didecyldimethylammonium chloride also causes a degradation of the membrane structure resulting in the leakage of intracellular molecules to the environment and subsequent cell death.<sup>[15]</sup> However, the mechanism of action is seemingly more complex than the simple disruption of the membrane as interaction of QACs with intracellular proteins and nucleic acids have also been reported.<sup>[4]</sup> In this regard, resistance mechanisms resembling the hyperexpression of a multi-drug efflux pump may take place.<sup>[3]</sup> Furthermore, dichained QAS were found in mitochondria what is likely associated with the increased hydrophobic content to allow for penetrating through the less fluid mitochondrial inner membrane.<sup>[4]</sup> Such variety of specific interactions is in accordance with the observation that different compounds of the QAC family exhibit their own antimicrobial spectrum of action.<sup>[16]</sup>

Benzalkonium chloride (BAC), stearylalkonium chloride, cetrimonium chloride/bromide (cetrimide) and cetylpyridinium chloride are among the most frequently used QACs. BACs are commonly used in eye drops, facial moisturizers and cleansers, sun protection creams and lotions, and hand sanitizers.<sup>[1,17]</sup> QACs are also widely used for both the water purification and food processing, because of their low toxicity in humans and high antimicrobial efficacy.<sup>[18]</sup> Furthermore, cationic surfactants are often used as topical disinfectants (*i. e.* pre-surgical skin and non-critical surfaces disinfection, applicable to intact mucous membranes, etc.) and detergents.<sup>[19]</sup> Due to their toxic effect against algae, they can also be used on surfaces of swimming pools, fountains, and wooden boats.<sup>[20]</sup> The antimalarial effect is also known.<sup>[21]</sup> Moreover, above a particular minimum concentration, called the critical micellar concentration (CMC), these surfactant monomers form thermodynamically stable spherical aggregates in aqueous solutions known as micelles.<sup>[22]</sup> Micelles are useful catalysts that accelerate the decomposition of chemicals and, thus, these compounds can also serve as decontaminants.<sup>[23]</sup>

Nevertheless, there is a growing need to develop novel compounds with antimicrobial effects due to the increasing resistance of microorganisms to antibiotics and antimicrobial agents. This is a global problem associated with the misuse of antibiotics, the increasing use of antibiotics in the food industry and the lack of specific drugs in the treatment of risk patients suffering from multiple co-morbidities.<sup>[24]</sup>

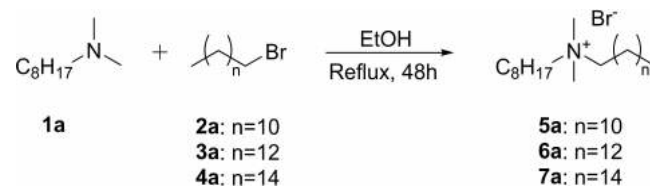
The results obtained by Peetla and Labhasetwar<sup>[25]</sup> and confirmed by Botequim et al.<sup>[26]</sup> have shown, that dichained cationic surfactants have a higher capacity to penetrate through the cell membrane models compared to monochained or trichained surfactants. Following these steps, we have synthesized novel dichained cationic surfactants and evaluated their efficacy against bacteria, fungi, algae and viruses. In addition, we have determined the critical micelle concentrations, lipophilicity, and cytotoxicity of these compounds to

elucidate the potential lipophilicity-activity dependence of their antimicrobial properties.

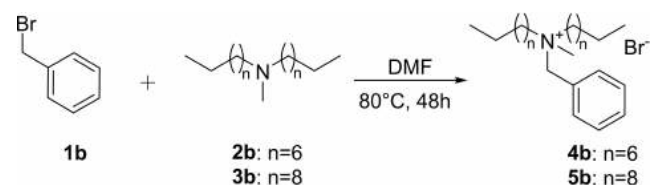
## Results and Discussion

### Synthesis

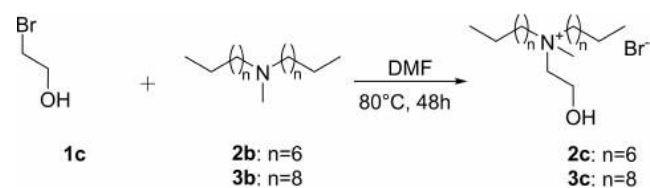
Three series of compounds (**5 a-7 a**, **4 b-5b** and **2 c-3 c**) were synthesized by nucleophilic substitution reactions (Scheme 1, 2 and 3). In the first subset (Scheme 1), *N, N*-dimethyl-*N*-octylamine (**1 a**) reacted with the appropriate 1-bromoalkane (**2 a-4 a**) in ethanol under reflux. In the preparation of the second and third families of compounds (Scheme 2 and 3), double long chained tertiary amines (**2 b**, **3 b**) dissolved in *N, N*-dimethylformamide were substituted by either benzylbromide (**1 b**) or 1-bromoethanol (**1 c**) to obtain the quaternary nitrogen of general formulas **4 b**, **5b** and **2 c**, **3 c**, respectively. Crude products were recrystallized from methanol : ethyl acetate or diethylether (1 : 20). All products were characterized by the <sup>1</sup>HNMR (nuclear magnetic resonance), <sup>13</sup>CNMR, high-resolution mass spectrometry (HRMS) and elemental analysis (EA) to confirm their purity. Yields, melting points, calculated log *P* (Clog *P*), and logarithms of capacity factor *k* (see section on chromatographic analysis) are summarized in Table 1. It is evident that the yields for all series were as satisfying as we expected according to our previous experience with the



**Scheme 1.** Preparation of *N*-alkyl-*N, N*-dimethyl-*N*-octylammonium salts (**5a-7a**).



**Scheme 2.** Preparation of *N, N*-dialkyl-*N*-benzyl-*N*-methylammonium salts (**4b, 5b**).



**Scheme 3.** Preparation of *N, N*-dialkyl-*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-methylammonium salts (**2c, 3c**).



**Table 1.** Yields, melting points, critical micelle concentrations (CMC), Clog *P* and capacity factor *k* of three prepared series of dichained *N*-alkylammonium salts (**a**, **b**, **c**), and standard benzalkonium salts (**B**<sub>12-16</sub>).

Compound	Alkyl chain	Yield (%)	m.p. (°C)	CMC (μM)	Clog <i>P</i> <sup>[a]</sup>	Log <i>k</i> <sup>[b]</sup>
5a	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	68	27-28	1370	4.01	0.39
6a	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	37	46-47	500	4.90	0.74
7a	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	88	97-98	200	5.79	1.08
4b	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	94	93-94	1080	3.96	0.04
5b	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	83	94-95	680	5.73	0.68
2c	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	82	54-55	1520	1.54	-0.50
3c	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	44	72-73	1240	3.32	0.27
B <sub>12</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>			11400	2.63	0,02
B <sub>14</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>			2500	3.52	0,35
B <sub>16</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>			800	4.41	0,66

[a] Clog *P* values were calculated in MarvinSketch 14.9.8.0 (ChemAxon Ltd., 1998–2014) according to the method of Viswanadhan et al.<sup>[29]</sup> [b] Capacity factor *k* was determined by an isocratic LC–MS analysis. The values were measured as mean and standard deviation of 6 measurements.

synthesis of similar structures.<sup>[2,11]</sup> On the other hand, the lower yields of **6a** and **3c** were probably due to the repeated purification. Melting points of the individual substances increased slightly with the elongation of alkyl side chains.

### Chromatographic analysis

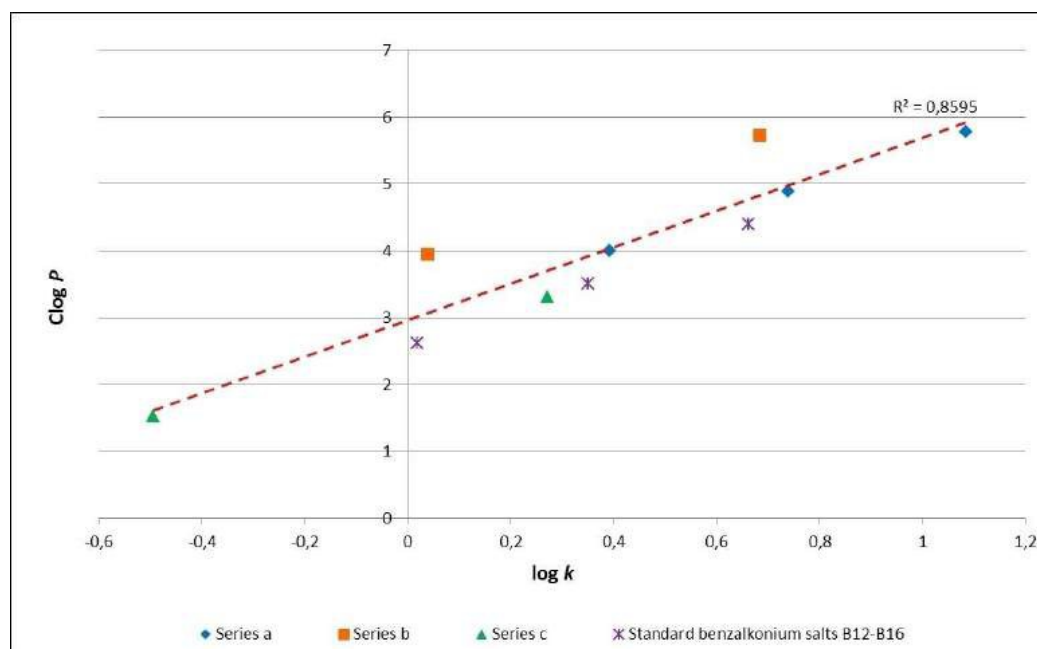
Capacity factor *k* and calculated log *P* (Clog *P*) of the prepared compounds were determined using LC–MS method, calculated with the MarvinSketch software, and the results along with yields, melting points and CMC are summarized in Table 1. The

capacity factor *k* was calculated from the means of retention times as described above and expressed as log *k*. Clog *P* values were calculated using the MarvinSketch 14.9.8.0 software and depicted as a dependence of Clog *P* on log *k* (Figure 1). The physicochemical theory, *i. e.* Collander equation<sup>[27]</sup> based on the relationship between log *k* and Clog *P*, was confirmed by linear regression and higher overall correlation of determination ( $R^2 = 0.8786$ ) with the small deviation of the set of all series tested. As expected, the increase of length of the alkyl chain resulted in increased Clog *P* values. Similarly, the Traube rule, which claims that the elongation of the carbon chain results in decreased CMC values, was confirmed.<sup>[28]</sup> Interestingly, even though the formation of micelles has been shown to ensure high bactericidal effects, QACs monomers are effective as well.<sup>[3]</sup> Therefore, CMC does not need to be reached for the anticipated disinfection effect.

### Antibacterial activity

The antibacterial activity of novel compounds was tested *in vitro* against three Gram-positive and seven Gram-negative strains using a microdilution broth method. The MIC values were obtained after 24 h and 48 h, whereas the MBC was obtained after 48 h (Table 2). For comparisons of the antibacterial activity, commercially used benzalkonium salts with C12, C14 and C16 long alkyl chains (**B**<sub>12-16</sub>) were included as reference compounds.

Overall, all of the tested compounds, excluding **2c**, showed high efficacy against Gram-positive and slightly weaker efficacy against Gram-negative bacterial strains. Notably, none of the tested compounds had any effect against multidrug-resistant



**Figure 1.** Correlation between log *k* and Clog *P* for *N*-alkyl-*N*, *N*-dimethyl-*N*-oktylammonium-bromid (blue mark - series a), *N*-benzyl-*N*, *N*-dialkyl-*N*-methylammonium (orange mark - series b) and *N*, *N*-dialkyl-*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-methylammonium (green mark - series c) salts. Total relationship for the all tested compounds and standard benzalkonium salts is depicted by a red dashed line.

**Table 2.** Minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations of the prepared compounds (series **a**, **b**, **c**) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (**B**<sub>12</sub>–**B**<sub>16</sub>).<sup>[a]</sup> The activity in vitro was determined on a panel of ten bacterial strains.

Microorganisms	5a	6a	7a	4b	5b	2c	3c	B <sub>12</sub>	B <sub>14</sub>	B <sub>16</sub>
<i>S. aureus</i>	1.47/1.47	0.98/0.98	1.95/1.95	1.95/2.93	1.47/1.47	3.91/3.91	1.47/1.47	1.63/3.26	0.98/1.14	0.98/1.13
C1947 (STAU)	1.47	0.98	1.95	2.93	1.47	3.91	1.47	15.03	1.46	1.3
<i>S. aureus</i>	1.95/1.95	1.95/1.95	3.91/19.53	3.91/3.91	1.95/1.95	15.36/31.25	1.47/1.95	3.91/5.37	0.98/0.98	0.98/1.47
C1923 (MRSA)	1.95	1.47	17.58	9.77	1.95	31.25	1.95	7.81	1.95	1.47
<i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	2.93/4.88	1.95/1.95	1.95/16.6	5.86/7.81	1.95/1.95	31.25/46.88	2.93/2.93	13.68/13.68	1.95/2.93	1.47/2.44
<i>E. coli</i>	5.86	16.6	32.23	7.81	1.95	46.88	3.91	15.63	2.93	2.44
<i>A.1235</i> (ESCO)	7.81/7.81	7.81/7.81	62.5/62.5	46.88/62.5	5.86/7.81	93.75/125	7.81/7.81	15.63/15.63	3.91/3.91	3.91/3.91
<i>K. pneumoniae</i>	7.81	7.81	62.5	62.5	7.81	125	7.81	15.63	7.81	3.91
C1950 (KLPN)	11.72/11.72	7.81/19.53	187.5/312.5	125/125	7.81/7.81	125/125	7.81/7.81	31.25/31.25	7.81/7.81	7.81/3.91
<i>K. pneumoniae</i>	15.63	35.16	312.5	125	11.72	125	7.81	31.25	7.81	7.81
C1934 (KLPN-E)	15.63	15.63/15.63	500/500	250/250	11.72/11.72	375/375	15.63/15.63	62.5/78.13	13.68/15.63	11.72/11.72
<i>P. aeruginosa</i>	> 500/> 500	253.91	500	250	11.72	375	39.07	93.75	15.63	11.72
A1245 (PSAE MR)	> 500	> 500/> 500	> 500/> 500	> 500/> 500	> 500/> 500	> 500/> 500	> 500/> 500	> 500/> 500	250/250	250/375
<i>Y. bercovieri</i>	1.95/375	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	500	250	500
CNCTC 6230 (YEBE)	500	1.95/250	4.88/500	15.63/23.44	1.95/1.95	46.88/46.88	2.93/46.88	15.63/15.63	1.95/1.95	1.95/1.95
<i>A. baumannii</i>	3.91/3.91	500	500	31.25	3.91	62.5	156.25	15.63	1.95	1.95
J3474 (ACBA)	3.91	3.91/3.91	11.72/11.72	11.72/11.72	3.91/3.91	93.75/93.75	7.81/7.81	23.44/23.44	3.91/3.91	3.91/3.91
<i>S. maltophilia</i>	7.81/7.81	7.81/7.81	11.72	11.72	7.81	93.75	7.81	23.44	5.86	3.91
J3552 (STMA)	7.81	7.81	7.81	46.88/62.5	7.81/7.81	187.5/250	11.72/11.72	31.25/62.5	3.91/3.91	3.91/3.91
				62.5	7.81	375	15.63	62.5	9.77	3.91

[a] B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N*,*N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N*,*N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N*,*N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation of B<sub>12</sub>–B<sub>16</sub> has been published elsewhere.<sup>[30]</sup>

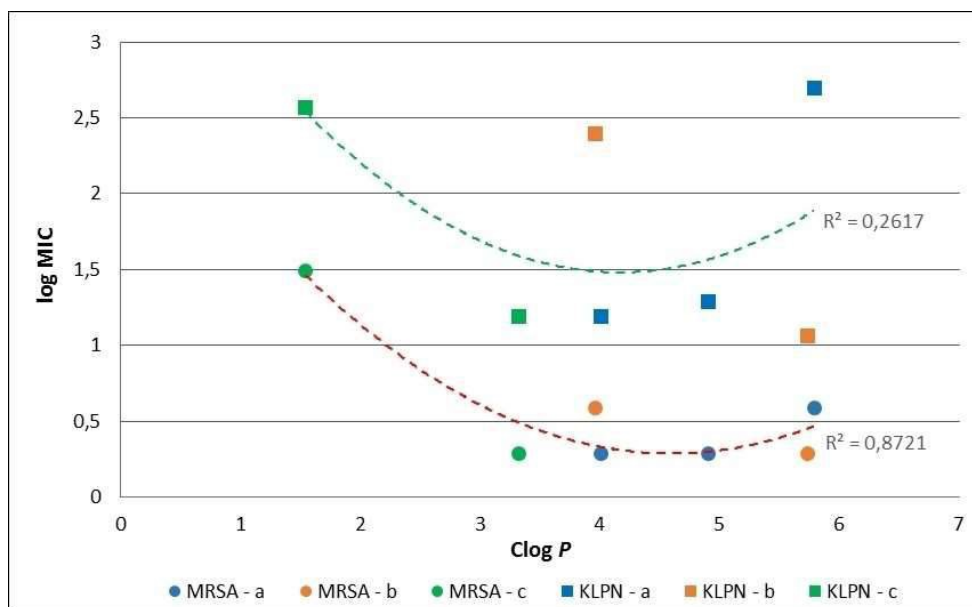
*Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR). Similarly, the standard **B**<sub>12</sub> showed no effect against this strain either, whereas **B**<sub>14</sub> and **B**<sub>16</sub> showed only a weak effect.

Considering the Clog *P* values of the compounds (Figure 2), lipophilicity seems to be a key factor for the antibacterial activity. Therefore, the least lipophilic compound (**2 c**) showed the lowest efficacy, whereas compounds with Clog *P* values above 3.5 (**6 a**, **5 b**, **B**<sub>14</sub>, **B**<sub>16</sub>) showed the best efficacy. On the other hand, **4 b** (Clog *P* = 3.96) showed low efficacy, especially against Gram-negative strains. Furthermore, the comparison of the most lipophilic compounds, **7 a** and **5 b** (Clog *P* = 5.79 and 5.73, respectively), showed a similar efficacy against Gram-positive strains, but **5 b** was much more effective against Gram-negative strains. These observations suggest that the antibacterial efficacy is co-determined by other structural features. In summary, the aliphatic **6 a** and aromatic **5 b** compounds showed a high potency, similar to that of the standard benzalkonium **B**<sub>14</sub>. However, because the higher lipophilicity of the compound **5 b** resulted in solubility problems (data not shown), the aliphatic **6 a** compound is thus highlighted as the appropriate candidate for further development of disinfectants.

### Antifungal activity

Three novel compound series were tested against four yeasts and four filamentous fungi by the agar well diffusion method. The MIC for yeasts after 72 h and for filamentous fungi after 168 h together with the MIC of reference compounds **B**<sub>12</sub>–**B**<sub>16</sub> are summarized in Table 3.

Overall, all the tested compounds exhibited moderate efficacy against the tested fungal strains, again with the exception of **2 c**, which was completely ineffective against all strains. The efficacy of these compounds was at least one order of magnitude lower than the efficacy observed against bacterial strains. Furthermore, none of the tested compounds, including the benzalkonium standard, was able to inhibit the growth of *Aspergillus niger* (EXF-10185). Compounds **5 a**, **5 b** and **3 c** displayed the most significant activity against both yeasts and filamentous fungi and outperformed standard benzalkonium salts. Similar to the data of the antibacterial efficacy, the Clog *P* value cannot serve as a predictor for efficacy, although the most hydrophilic compound (**2 c**) showed no effect whatsoever. In similar manner to the data obtained with Gram-negative bacterial strains, the compound **5 b** (Clog *P* = 5.73) was rather effective, whereas **7 a** (Clog *P* = 5.79) was practically ineffective. Due to their solubility, the compounds **5 a** and **3 c** likely represent good candidates for further use, as the concentra-



**Figure 2.** Effect of the various number of carbon atoms expressed as Clog *P* (series **a** - blue, series **b** - orange, series **c** - green) on the efficacy against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase - producing *Klebsiella pneumoniae* (KLPN+ ; squares) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA; spots). Dashed lines symbolize Clog *P* effect of all tested compounds on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase - producing *Klebsiella pneumoniae* as a Gram-negative strain (green dashed line) and on MRSA as a Gram-positive strain (red dashed line). Against Gram-positive strain, the compounds showed higher efficacy using lower inhibitory concentrations than against Gram-negative strain.  $R^2$  represents coefficient of determination.

**Table 3.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of the prepared compounds (series **a**, **b**, **c**) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (**B**<sub>12</sub>-**B**<sub>16</sub>).<sup>[a]</sup> The activity in vitro was determined in a panel of eight fungal strains.

Microorganisms	MIC ( $\mu$ M); 72 <sup>[b]</sup> / 168 <sup>[c]</sup> h incubation									
	5a	6a	7a	4b	5b	2c	3c	B <sub>12</sub>	B <sub>14</sub>	B <sub>16</sub>
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i> , EXF-8411 <sup>[b]</sup>	200	750	> 1000	500	30	> 1000	100	1000	300	1000
<i>R. mucilaginosa</i> , EXF-8417 <sup>[b]</sup>	100	750	> 1000	1000	30	> 1000	100	500	100	500
<i>E. dermatitidis</i> , EXF-8470 <sup>[b]</sup>	100	100	> 1000	500	100	> 1000	100	500	100	200
<i>A. melanogenum</i> , EXF-8432 <sup>[b]</sup>	30	65	400	255	100	> 1000	65	200	100	65
<i>B. dimerum</i> , EXF-8427 <sup>[c]</sup>	300	1000	> 1000	> 1000	500	> 1000	300	> 1000	1000	1000
<i>P. chrysogenum</i> , EXF-1818 <sup>[c]</sup>	200	200	> 1000	500	300	> 1000	100	650	650	650
<i>A. versicolor</i> , EXF-8692 <sup>[c]</sup>	200	300	400	650	500	> 1000	300	> 1000	650	1000
<i>A. niger</i> , EXF-10185 <sup>[c]</sup>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

[a] **B**<sub>12</sub>, **B**<sub>14</sub>, **B**<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation of **B**<sub>12-16</sub> has been published elsewhere.<sup>[30]</sup> [b] Antifungal activity against yeasts *C. parapsilosis sensu stricto* EXF-8411, *R. mucilaginosa* EXF-8417, *E. dermatitidis* EXF-8470, *A. melanogenum* EXF-8432 was determined after 72 h of incubation. [c] Antifungal activity against filamentous fungi *B. dimerum* EXF-8427, *P. chrysogenum* EXF-1818, *A. versicolor* EXF-8692, *A. niger* EXF-10185 was determined after 168 h of incubation.

tions commonly used in practical settings (0.1% v/v) can be reached without problem. Such concentration exceeds the observed MIC against all fungal strains, with the exception of *Aspergillus niger* (EXF-10185).

### Antiviral activity

QACs are generally considered to be effective against enveloped viruses when used in high doses. Therefore, the antiviral activity of the **a**, **b** and **c** series against the VZV was also determined in the present study. The values of TCID<sub>50</sub> of viral titre before and after exposition (5 min) to the tested compounds are summarized in Table 4. Again, for comparison,

standard benzalkonium salts (**B**<sub>12-16</sub>) with C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> long alkyl chains were used.

The efficacy of the antiviral activity is represented by the log<sub>10</sub> reduction factor of TCID<sub>50</sub>. As a general rule, virucidal compounds should exhibit at least a 4log<sub>10</sub> reduction factor in viral titre. In this study however, none of our compounds or standards achieved this goal. The compound **4b** showed the highest effect against VZV with a log<sub>10</sub> reduction factor of 3.84, thus surpassing standard benzalkonium salts. The series **c**, on the other hand, showed almost no efficacy. No correlation between Clog *P* value and antiviral activity was observed (Table 1).

**Table 4.** Virucidal efficacy of potential disinfectants (series a, b, c) against Varicella zoster virus using suspension tests. Standards B<sub>12</sub>-B<sub>16</sub> mean derivatives of *N*-benzalkonium.

Compound	Concentration	lg <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> Before exposition	lg <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> After exposition	Reduction factor
5a	0.01%	5	2.49	2.51
6a	0.01%	5.16	2.66	2.5
7a	0.005%	7.83	5.83	2
4b	0.01%	6	2.16	3.84
5b <sup>[a]</sup>	-	-	-	-
2c	0.01%	6	6	0
3c	0.01%	6	5	1
B <sub>12</sub>	0.01%	7.49	3.83	3.66
B <sub>14</sub>	0.01%	7.49	5.83	1.66
B <sub>16</sub>	0.005%	5	3.49	1.51

[a] - not evaluated; the compound was insoluble in the assay medium.

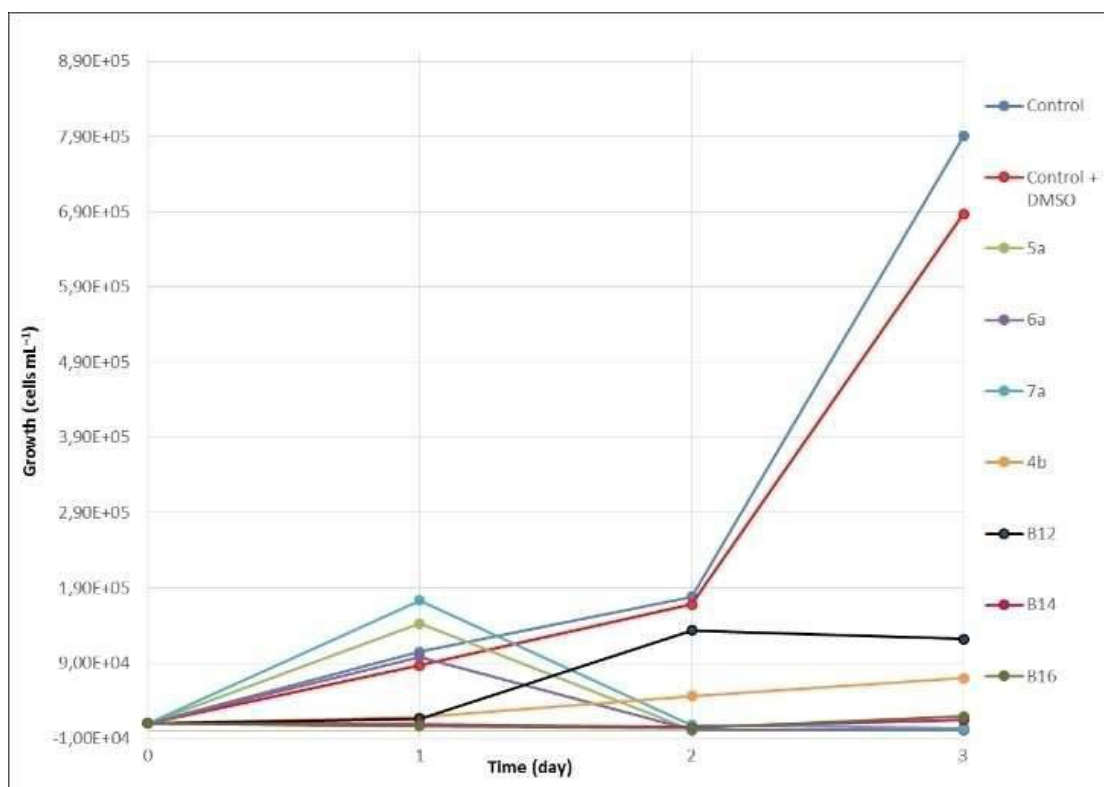
### Antialgal activity

Only the most promising agents chosen on the basis of previous biological experiments (5 a, 6 a, 7 a, 4 b) were tested for the antialgal activity. All of the tested compounds and standards (B<sub>12-16</sub>) inhibited algal growth after 72 h (Figure 3). Agents 5 a, 6 a and 7 a were determined as compounds with the highest growth inhibitory values for *Pseudokirchneriella subcapitata* (120-180% inhibition in comparison to the control

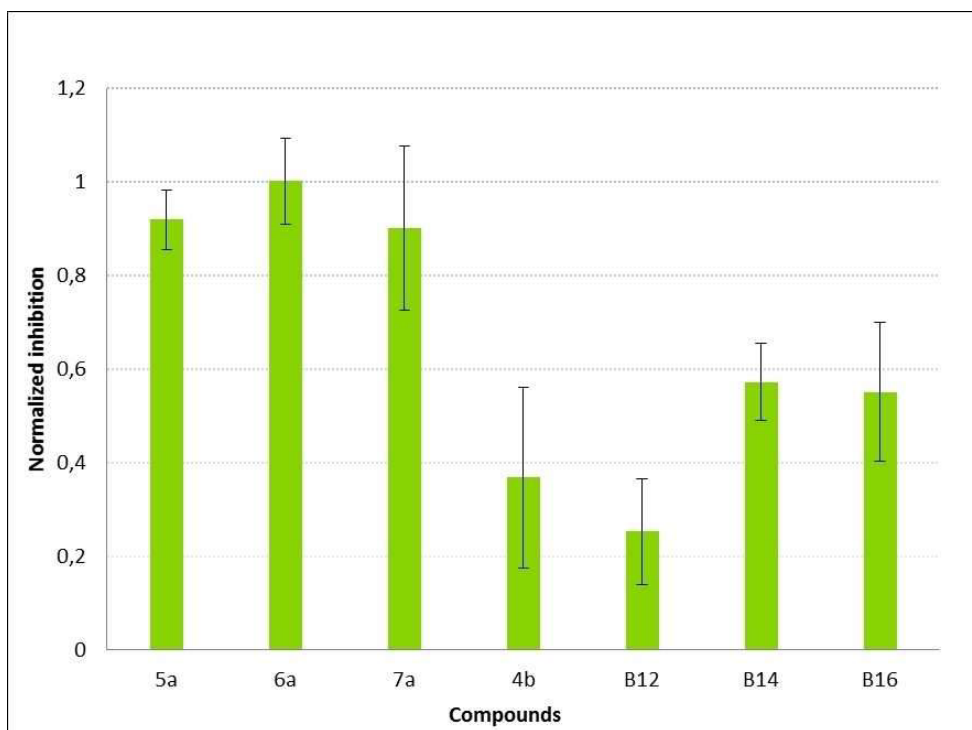
culture) exceeding the efficacy of standard benzalkonium salts (Figure 4). In contrast, 4b showed the lowest inhibitory potential from novel compounds, however still comparable with standard benzalkonium salts.

### Cell viability assay

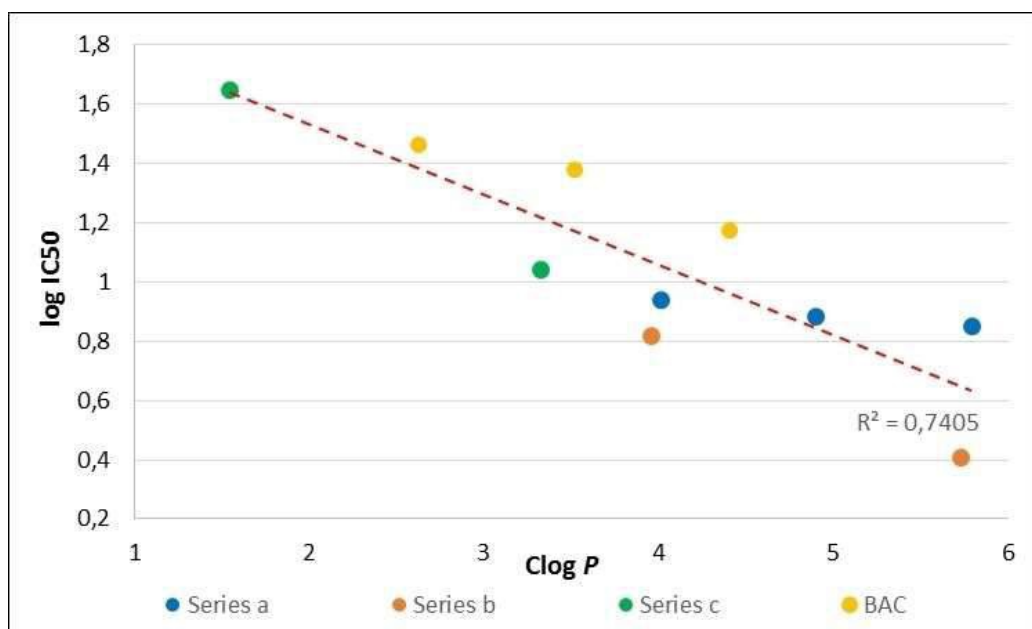
The present study confirmed the expected trend of the correlation of an increase of cytotoxicity with the length of carbon chain (Figure 5). Such effect is probably caused by the higher lipophilicity characteristics of the drugs with a longer alkyl chain and their capacity to penetrate into cells more easily. This is in contrast to the observed antimicrobial effects where the correlation to Clog *P* values resulted in a parabolic curve (the "U" shape, Figure 6). Although such findings have been reported previously,<sup>[7,9]</sup> our study describes for the first time such effects induced by QACs bearing two alkyl chains. Such discrepancy can be explained by the organization of the outer layers of bacterial and mammalian cells. The former is characterized by the presence of a peptidoglycan layer within the cell wall as compared to the presence of cholesterol and unbranched phospholipid chains in the membrane of eukaryotic cells. The integrity of the bacterial plasma membrane is ensured by hydrophobic and electrostatic interactions, whereas mammalian cells take advantage of membrane phase separation and hydrophobic interactions.<sup>[31]</sup> The eukaryotic cell membrane is also less positively charged due to the relatively



**Figure 3.** Growth rate of alga *Pseudokirchneriella subcapitata* during the treatment with selected agents and standard benzalkonium salts compared to untreated or DMSO treated control in OECD medium after 24, 48 and 72 hours, using flow cytometry. B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide.



**Figure 4.** Growth inhibition of green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* after 72 hours. The maximum inhibition value is normalized to 1 (derived from the compound with the highest inhibition effect) and the minimum inhibition is normalized to 0 (algal control in OECD medium with dimethyl sulfoxide as a solvent). Standard deviations are presented as error bars.



**Figure 5.** Influence of the Clog *P* value on the viability of mammalian cells (CHO-K1). An increasing carbon chain length results in higher cytotoxicity.

low percentage of negatively charged lipids.<sup>[32]</sup> Therefore, the higher affinity of cationic surfactants to prokaryotic membranes can be expected and the selectivity towards some microbes can be explained by these properties. We have found the reference studies where the correlation between lipophilicity/

hydrophobic content and bacteriostatic activity was shown for antimicrobial peptides and peptidomimetics with and without quaternary nitrogen. Similar to non-peptide QAC, the antimicrobial property is the function of their hydrophobicity resulting in a trend curve with the peak maximum, determined

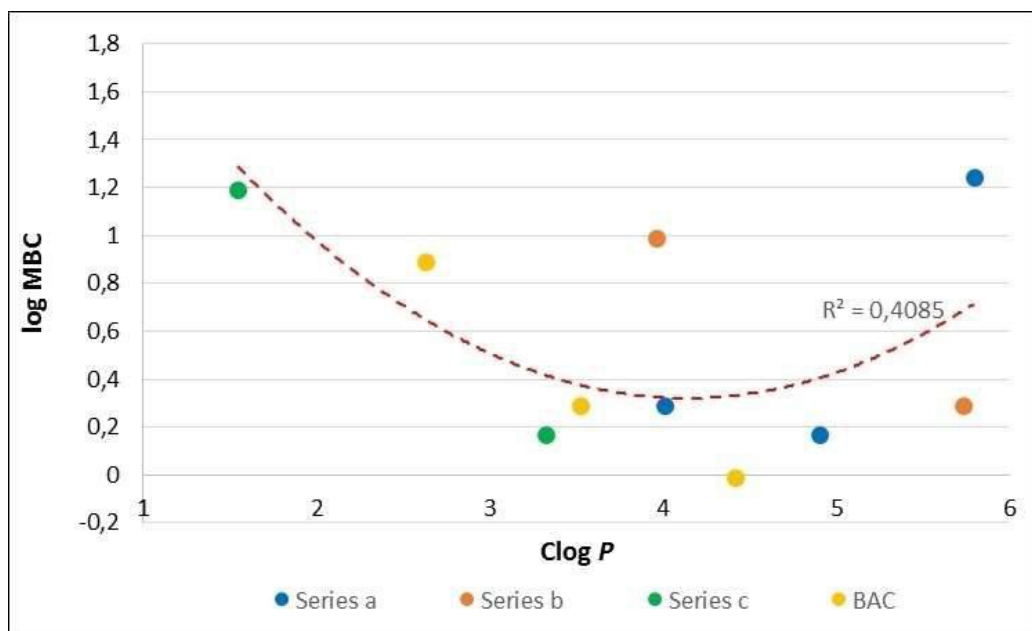


Figure 6. Clog *P* influence on the minimum bactericidal concentrations (MBC) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

by the interaction with lipid membranes.<sup>[33]</sup> Regarding the cytotoxicity of individual QACs, the compound **2c** showed better values than all of the included reference benzalkonium salts **B<sub>12</sub>–B<sub>16</sub>**.<sup>[34]</sup> However, the remaining novel compounds showed higher cytotoxicity levels and did not surpass their benzalkonium analogues concerning their safety potential (Table 5).

## Conclusions

Three series of cationic surfactants based on dichained *N*-alkylammonium salts with different alkyl chain lengths (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>) were synthesized. The in vitro antibacterial, antifungal, antiviral and antialgal activity evaluations showed that, with the exception of **2c**, all compounds exhibited high efficacy against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, excluding multidrug-resistant *P. aeruginosa*. Compound **6a** appeared to be very effective, with a similar or better activity than the benzalkonium standards included in this

study. The efficacy of these novel compounds against fungi was at least one order of magnitude lower when compared to the effects observed against bacteria. Notably, novel drugs **5a**, **5b** and **3c** showed the most significant activity against both yeasts and filamentous fungi, outperforming the included standards. However, none of the tested compounds was able to inhibit *Aspergillus niger*. Further evaluation revealed potent antiviral activity against Varicella zoster virus by **4b**, surpassing the included benzalkonium standards. High antialgal efficacy was reported for the entire **a** series of compounds, with **6a** being the most effective. The correlation of lipophilicity, represented by Clog *P* values, to the antibacterial, antifungal and antiviral efficacy showed no clear dependency. Notably, the most hydrophilic compound (**2c**), with a Clog *P* value of 1.54, showed no antimicrobial and antiviral effect at all. These results show that the Clog *P* value must be within the range of 3.5–4.5 to be effective as a water-soluble disinfectant. Cell viability assays confirmed an expected trend of a higher cytotoxicity in correlation to an increasing carbon chain length of the compounds. This is in contrast to the antimicrobial effect, where the correlation with the Clog *P* value resulted in a parabolic “U” curve. This is the first time that this behaviour has been observed for QACs bearing two alkyl chains.

To summarize, the compound **6a** is promising for its high antibacterial and antialgal efficacy, compound **4b** shows antiviral effects and **5a**, **5b**, **3c** exhibit a notable antifungal efficiency. Therefore, these newly synthesized compounds have a potential to be implemented as effective antimicrobial agents or disinfectants. However, due to their cytotoxic potential and low selectivity for microbes over mammalian cells, these novel compounds will likely be more useful as surface disinfectants rather than antiseptics.

Table 5. Cytotoxic potential of the prepared compounds (**5a–7a**, **4b–5b**, **2c–3c**) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (**B<sub>12</sub>–B<sub>16</sub>**). The activity in vitro is expressed as IC<sub>50</sub> (μmol L<sup>-1</sup>) ± SEM (*n* = 3).

Cell line	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ); 24 h incubation ± SEM									
	5a	6a	7a	4b	5b	2c	3c	B <sub>12</sub> <sup>[a]</sup>	B <sub>14</sub> <sup>[a]</sup>	B <sub>16</sub> <sup>[a]</sup>
CHO–K1	8.7	7.7	7.1	6.6	2.6	44.5	11	29	24	15
	0.3	0.2	0.7	0.1	0.7	1.7	3.4	3	4	1

[a] **B<sub>12</sub>**, **B<sub>14</sub>**, **B<sub>16</sub>** mean *N*-benzyl-*N*,*N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N*,*N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N*,*N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively (IC<sub>50</sub> values of **B<sub>12</sub>**, **B<sub>14</sub>**, **B<sub>16</sub>** were published before<sup>[34]</sup>).

## Supporting Information Summary

Supporting information contains details of the experimental procedures and characterization data for all tested compounds **5-7 a**, **4-5b** and **2-3 c**, lipophilicity, conductivity and biological testing methods.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic [NV18-09-00181]; and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic [SV/FVZ201607].

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** antimicrobial activity · cytotoxicity · *N*-alkylammonium salts · quaternary ammonium salts · surfactants

- [1] K. Hegstad, S. Langsrud, B. T. Lunestad, A. A. Scheie, M. Sunde, S. P. Yazdankhah, *Microb. Drug Resist.* **2010**, *16*, 91–104.
- [2] J. Marek, V. Joskova, R. Dolezal, O. Soukup, M. Benkova, A. Fucikova, D. Malinak, V. Bostikova, K. Kuca, *Lett. Drug Des. Discovery* **2017**, *14*, 1–15.
- [3] P. Gilbert, L. E. Moore, *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 703–715.
- [4] M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen, U. Holzgrabe, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 22–31.
- [5] G. McDonnell, A. D. Russell, *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 147–179.
- [6] a) A. Aupoix, B. Pégot, G. Vo-Thanh, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 1352–1356; b) J. Haldar, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3823–3831; c) J. Marek, V. Buchta, O. Soukup, P. Stodulka, J. Cabal, K. K. Ghosh, K. Musilek, K. Kuca, *Molecules* **2012**, *17*, 6386–6394; d) T. Sandle, R. Vijayakumar, M. Saleh Al Aboody, S. Saravanakumar, *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 1267–1273.
- [7] O. Soukup, R. Dolezal, D. Malinak, J. Marek, S. Salajkova, M. Pasdiorova, J. Honegr, J. Korabecny, P. Nachtigal, F. Nachon, D. Jun, K. Kuca, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 841–848.
- [8] E. B. Walker, in *Handbook of topical antimicrobial antimicrobials: Industrial applications in consumer products and pharmaceuticals* (Ed.: P. D.), Marcel Dekker, New York, **2002**, pp. 99–116.
- [9] J. Marek, D. Malinak, R. Dolezal, O. Soukup, M. Benkova, P. Nachtigal, P. Vavral, K. Kuca, *Lett. Org. Chem.* **2018**, *15*, 3–9.
- [10] O. Rahn, W. P. V. Eseltine, *Annu. Rev. Microbiol.* **1947**, *1*, 173–192.
- [11] J. Marek, D. Malinak, R. Dolezal, O. Soukup, M. Pasdiorova, M. Dolezal, K. Kuca, *Molecules* **2015**, *20*, 3681–3696.
- [12] P. Bajpai, in *Recycling and Deinking of Recovered Paper* (Ed.: P. Bajpai), Elsevier, Oxford, **2014**, pp. 121–137.
- [13] C. J. Ioannou, G. W. Hanlon, S. P. Denyer, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 296–306.
- [14] A. D. Russell, G. W. Gould, *J. Appl. Bacteriol.* **1988**, *65*, 167 S–195 S.
- [15] T. Yoshimatsu, K. Hiyama, *Biocontrol Sci.* **2007**, *12*, 93–99.
- [16] N. N. Daoud, N. A. Dickinson, P. Gilbert, *Microbios* **1983**, *37*, 73–85.
- [17] S. A. Schallenger, S. M. Duggan, K. R. Morrison, B. S. Bentley, W. M. Wuest, K. P. C. Minbiole, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 1931–1934.
- [18] D. Campoccia, L. Montanaro, C. R. Arciola, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2331–2339.
- [19] E. A. Chugunova, N. I. Akylbekov, E. M. Mahrous, A. D. Voloshina, N. V. Kulik, V. V. Zobov, A. G. Strelnik, T. P. Gerasimova, A. B. Dobrynin, A. R. Burilov, *Monatshefte Fur Chemie* **2018**, *149*, 119–126.
- [20] a) T. Elersek, G. Kosi, T. Turk, F. Pohleven, K. Sepcic, *Biofouling* **2008**, *24*, 137–143; b) S. Berne, M. Kalauz, M. Lapat, L. Savin, D. Janussen, D. Kersken, J. Ambrožič Avguštin, Š. Zemljič Jokhadar, D. Jaklič, N. Gunde-Cimerman, M. Lunder, I. Roškar, T. Eleršek, T. Turk, K. Sepčić, *Polar Biol.* **2016**, *39*, 947–959.
- [21] N. Basilico, M. Migotto, D. P. Ilboudo, D. Taramelli, R. Stradi, E. Pini, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 4681–4687.
- [22] S. Chauhan, M. Kaur, D. S. Rana, M. S. Chauhan, *J. Chem. Eng. Data* **2016**, *61*, 3770–3778.
- [23] A. Shah, S. Shahzad, A. Munir, M. N. Nadagouda, G. S. Khan, D. F. Shams, D. D. Dionysiou, U. A. Rana, *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 6042–6074.
- [24] a) S. Buffet-Bataillon, P. Tattevin, M. Bonnaure-Mallet, A. Jolivet-Gougeon, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *39*, 381–389; b) M. L. Cohen, *Ciba Found. Symp.* **1997**, *207*, 223–231; discussion 231–227.
- [25] C. Peetla, V. Labhasetwar, *Langmuir* **2009**, *25*, 2369–2377.
- [26] D. Botequim, J. Maia, M. M. Lino, L. M. Lopes, P. N. Simoes, L. M. Ilharco, L. Ferreira, *Langmuir* **2012**, *28*, 7646–7656.
- [27] R. Collander, M. Lindholm, C. M. Haug, J. Stene, N. A. Sorensen, *Acta Chem. Scand.* **1951**, *5*, 774–780.
- [28] J. Traube, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1891**, *265*, 27–55.
- [29] V. N. Viswanadhan, A. K. Ghose, G. R. Revankar, R. K. Robins, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1989**, *29*, 163–172.
- [30] K. Kuca, J. Marek, P. Stodulka, K. Musilek, P. Hanusova, M. Hrabanova, D. Jun, *Molecules* **2007**, *12*, 2341.
- [31] J. R. Brender, A. J. McHenry, A. Ramamoorthy, *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 195.
- [32] I. M. Herzog, M. Fridman, *MedChemComm* **2014**, *5*, 1014–1026.
- [33] a) K. Andreev, M. W. Martynowycz, M. L. Huang, I. Kuzmenko, W. Bu, K. Kirshenbaum, D. Gidalevitz, *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* **2018**, *1860*, 1414–1423; b) E. Glukhov, L. L. Burrows, C. M. Deber, *Biopolymers* **2008**, *89*, 360–371.
- [34] D. Malinak, R. Dolezal, J. Marek, S. Salajkova, O. Soukup, M. Vejsova, J. Korabecny, J. Honegr, M. Penhaker, K. Musilek, K. Kuca, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5238–5241.

Submitted: June 26, 2019

Accepted: October 14, 2019

## RESEARCH ARTICLE

# Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethyl-substituted Pyridinium Salts

Jan Marek<sup>1,2</sup>, Vera Joskova<sup>4</sup>, Rafael Dolezal<sup>2</sup>, Ondrej Soukup<sup>2,3</sup>, Marketa Benkova<sup>1,2</sup>, Alena Fucikova<sup>5</sup>, David Malinak<sup>2,6</sup>, Vanda Bostikova<sup>1</sup> and Kamil Kuca<sup>2,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic;

<sup>2</sup>Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>4</sup>Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>5</sup>Department of Biology; <sup>6</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

**Abstract: Background:** The cationic surfactants are a huge group of compounds with thousands of applications. Quaternary Ammonium Salts (QAS) make up the majority of this group. Their countless applications in chemistry, the food industry and textile industry are indubitable. The antibacterial and antifungal effect of the various novel QAS is usually referred to in comparison with commercially used benzalkonium and pyridinium salts, since such compounds have found widespread use as common disinfectants *e.g.* in hospitals as prevention against nosocomial infections.

**Methods:** Three series of *N*-alkylpyridinium salts with a hydroxymethyl group in positions 2, 3 and 4 were synthesized as novel potential antimicrobial agents. The nucleophilic substitution-type reaction has been used. The novel compounds have been tested as a disinfection agents against bacteria and fungi. The microdilution broth method was utilized for antimicrobial evaluation. Conductivity measurement method has been used for the determination of Critical Micelle Concentration (CMC). Standard MTT test was used for cytotoxic evaluation.

**Results:** We have prepared 15 new compounds based on hydroxymethylpyridine in different positions (2, 3, 4) and the different length of lipophilic alkyl chain on the quaternary nitrogen (C<sub>10-18</sub>). The compounds were characterized with analytical data (NMR, HRMS) and tested for *in vitro* antimicrobial activity. The highest, and submicromolar antimicrobial activity was achieved for the 3-hydroxymethylpyridinium salts substituted with longer alkyl chains (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub>). *N*-hexadecyl-3-hydroxymethylpyridinium bromide (**10b**) showed even better performance than standard benzalkonium salts. Conductometric analysis confirmed the trend of decreasing CMC with elongation of the alkyl side chain. Generally, the location of the hydroxymethyl function on the pyridinium scaffold induced only negligible changes in antimicrobial efficacy. Finally, potential use of the *N*-alkylhydroxymethylpyridinium salts in practice was supported by MMT tests which proved relatively low cytotoxicity of the compounds.

**Conclusion:** We have designed, synthesized and characterized three series of cationic surfactants based on 2-, 3- and 4-hydroxymethylpyridine. The cationic surfactants differ in the length of alkyl side-chain (C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>). The antimicrobial effect was evaluated against four groups of microorganisms (gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts, and filamentous fungi). The Critical Micelle Concentrations (CMC) were measured by conductivity method, and finally cytotoxicity tests were performed.

**Keywords:** Hydroxymethylpyridinium salts, antimicrobial activity, synthesis, quaternary ammonium salts, critical micelle concentration, conductivity, cytotoxicity.

## 1. INTRODUCTION

The cationic surfactants are a huge group of compounds with thousands of applications. Quaternary Ammonium Salts

(QAS) make up the majority of this group. Their countless applications in chemistry, the food industry and textile industry are indubitable [1-4]. There have been numerous publications during the last decades regarding their synthesis and investigation as fabric softeners, pharmaceuticals, cosmetics, antimicrobial agents, anti-biofilm agents, part of nanorods, and excipients in dentistry and food products [5-9]. The structural feature of cationic surfactant with the quaternary

\*Address correspondence to this author at the Biomedical Research Center, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic; Tel: +420-603-289-166; E-mails: [kamil.kuca@fhk.cz](mailto:kamil.kuca@fhk.cz); [kucakam@gmail.com](mailto:kucakam@gmail.com)



nitrogen is responsible for their useful properties. The quaternary nitrogen moiety forms the polar part of the molecule which is responsible for the solubility in water. The long lipophilic alkyl chain forms the non-polar part of the molecule and is responsible for its interaction with many biological structures (membranes, lipids, receptors) [10, 11].

The quaternary nitrogen can be incorporated as a heteroatom in a ring (e.g. pyridinium, imidazolium, quinolinium, isoquinolinium) as well as being part of a non-cyclic system (e.g. benzalkonium, cetrimonium) [12-17]. The antibacterial and antifungal effect of the various novel QAS is usually referred to in comparison with commercially used benzalkonium and pyridinium salts [5, 8, 10, 17], since such compounds have found widespread use as common disinfectants e.g. in hospitals as prevention against nosocomial infections [18, 19]. The activity against microorganisms is reported to be widely influenced by the length of the alkyl side-chain. *N*-dodecylbenzalkonium salts have a proven fungicidal effect, while tetradecyl- and hexadecylbenzalkonium homologues have exhibited increased activity against both G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> groups of bacteria [20, 21]. The necessity for expansion of the group of cationic surfactant as disinfectants and antiseptics is obvious, since many strains of bacteria and fungi have become resistant to currently available preparations [22]. Several studies have acquired information on toxicity and biodegradability, which are important parameters for suitable selection of disinfectants or antiseptics [23-25].

Furthermore, as mentioned above these compounds are surface-active, so they are able to form micelles. Recently, there have been publications highlighting the micelle micro-environment and its use for acceleration of chemical processes, and application of cationic surfactants as micellar catalysts for specific reactions [26-28]. Additionally though, these properties are suitable in decontamination procedures. A micellar medium has been used as an efficient phase modulator within chemical degradation of toxic compounds such as organophosphates (i.e. nerve agents, pesticides, etc.) [29-31].

The effect against microorganisms as well as the decontamination potential for chemicals can advantageously be used for military purposes or in emergency situations applying integrated rescue systems.

In this paper, we report the synthesis of hydroxymethylpyridinium based salts differing: i) in the position of the hydroxymethyl group on the pyridine ring (2, 3, 4); and, ii) in the alkyl chain length attached to the pyridinium nitrogen (C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>). Several of these compounds have been prepared before by other groups [32, 33], albeit not the whole sets. We have prepared three series of quaternary ammonium compounds, and confirmed the structure by NMR, HRMS and EA. The series were tested as disinfectants against Gram-positive and Gram-negative strains of bacteria, as well as against yeast and filamentous fungi, and compared against standard benzalkonium salts. Moreover, cytotoxic evaluation and the critical micelle concentration measurement have been carried out. The knowledge of micellar behavior is essential for maximizing the application of its wide range of potential [28, 30], and for the correlation of MIC and CMC. The effect of the hydroxymethyl group posi-

tion and the differences in hydrophobic side-chain length are discussed.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

The reagents were purchased as at least reagent grade from Sigma-Aldrich (Czech Republic) unless otherwise specified, and used without further purification. The solvents for synthesis were purchased from Penta chemicals Co. Acetonitrile, methanol and formic acid of LC-MS purity grade used in LC-UV-MS analyses were obtained from Sigma-Aldrich (Czech Republic). Ultrapure water for LC-UV-MS analyses was prepared by Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF apparatus (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Thin layer chromatography was run on Merck silica gel 60 F254 analytical plates (mobile phase: ethyl acetate); detection was carried out with ultraviolet light (254 nm). Melting points were recorded on a Melting Point Apparatus Stuart SMP 30 and were uncorrected. The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of new compounds were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at ambient temperature on a Varian S500 spectrometer (499.87 MHz for <sup>1</sup>H and 125.71 MHz for <sup>13</sup>C) or on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer (300.07 MHz for <sup>1</sup>H and 75.46 MHz for <sup>13</sup>C). For <sup>1</sup>H  $\delta$  are given in parts per million (ppm) relative to CD<sub>3</sub>OD ( $\delta$  = 3.31) and for <sup>13</sup>C relative to CD<sub>3</sub>OD ( $\delta$  = 49.05). The coupling constants (*J*) are expressed in Hertz. Elemental analyses were measured with EA 1110 CHNS Analyzer (Fisons Instruments S. p. A., Carlo Erba, Milano, Italy).

### 2.2. LC-UV-MS Analysis

Capacity factors *k* of **7a-11a**, **7b-11b** and **7c-11c** were determined by a Dionex UltiMate 3000 analytical system produced by ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany. The analytical system was composed of the following parts: binary pump HPG-3400RS connected to vacuum degasser; heated column compartment TCC-3000; auto-sampler WTS-3000 equipped with a 25  $\mu$ L loop; and VWD-3000 ultraviolet detector. A Waters Atlantis dC18 (2.1 x 100mm/3  $\mu$ m) column was chosen as the stationary phase. The studied compounds were grouped into three series **a**, **b**, and **c**, and dissolved in methanol as mixture samples. Lipophilicity of the compounds was estimated from the capacity factors *k* which were determined by isocratic elution with acetonitrile - water (55:45(v/v)) acidified with 0.1% (v) formic acid (FA). The flow-rate was set to 0.4 mL/min. The UV-chromatograms recorded at a wavelength of 210 nm were processed in the Chromeleon 6.80 program.

HRMS of **7a-11a**, **7b-11b** and **7c-11c** were recorded by a Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap spectrometer (produced by ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) which was coupled with the above-mentioned LC system. In MS heated electro-spray ionization (HESI) the settings used were: sheath gas flow rate 40, aux gas flow rate 10, sweep gas flow rate 2, spray voltage 3.2 kV, capillary temperature 350°C, aux gas temperature 300°C, S-lens RF level 50. Ions were monitored in the range of 100 - 1500 m/z with the reso-

lution set to 140 000. The HRMS spectra were processed on Xcalibur 3.0.63 software.

### 2.3. Synthesis and Analysis

The hydroxymethylpyridines (0,010 mol) (**1a**, **1b**, **1c**) dissolved in ethanol and an excess of either 1-bromodecane (**2**), 1-bromododecane (**3**), 1-bromotetradecane (**4**), 1-bromohexadecane (**5**) or 1-bromooctadecane (**6**) (0,013 mol) were stirred under reflux for 72 hours. The solvent was evaporated and the crude products were dissolved in methanol and precipitated *via* dropwise addition of ethyl acetate or ether. Precipitation was accelerated by cooling the mixture to -8°C. The crystals were filtered afterwards and allowed to dry on the lab bench at ambient temperature.

#### 2.3.1. 1-decyl-4-hydroxymethylpyridinium bromide (7a)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NOBr: 58,18 % C; 8,54 % H; 4,24 % N; found: 58,37 % C; 8,68 % H; 4,41 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 250.2165; found: 250.2156. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.05 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 8.03 (d, J = 6.3 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 6.18 (t, J = 5.6 Hz, 1H, -OH), 4.83 - 4.77 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.59 (t, J = 7.3 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.96 - 1.83 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.37 - 1.16 (m, 14H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 162.79, 144.18, 124.48, 61.29, 60.12, 31.43, 30.85, 29.05, 28.97, 28.81, 28.52, 25.57, 22.24, 14.10.

#### 2.3.2. 1-dodecyl-4-hydroxymethylpyridinium bromide (8a)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NOBr: 60,33 % C; 9,00 % H; 3,91 % N; found: 60,28 % C; 9,06 % H; 4,08 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 278.2478; found: 278.2471. 1H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.03 (d, J = 6.3 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 8.03 (d, J = 6.2 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 6.06 (t, J = 5.8 Hz, 1H, -OH), 4.79-4.65 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.93 - 1.81 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.34 - 1.13 (m, 18H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.89 (t, J = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 162.90, 144.21, 124.52, 61.31, 60.16, 31.46, 30.81, 29.17, 29.09, 28.97, 28.88, 28.56, 25.56, 22.27, 14.13.

#### 2.3.3. 4-hydroxymethyl-1-tetradecylpyridinium bromide (9a)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NOBr: 62,17 % C; 9,39 % H; 3,62 % N; found: 62,38 % C; 9,45 % H; 3,68 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 306.2791; found: 306.2784. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.16 (d, J = 6.3 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 8.32 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 4.82 (d, J = 5.7 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.63 (t, J = 7.6 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.95 - 1.81 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.37 - 1.11 (m, 22H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.96, 145.52, 126.97, 61.37, 60.69, 31.45, 29.21, 29.16, 29.07, 28.94, 28.86, 28.55, 25.54, 22.25, 14.12.

#### 2.3.4. 1-hexadecyl-4-hydroxymethylpyridinium bromide (10a)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NOBr: 63,75 % C; 9,73 % H; 3,38 % N; found: 63,89 % C; 9,85 % H; 3,30 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NO<sup>+</sup> (m/z):

334.3104; found: 334.3103. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.03 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 8.03 (d, J = 6.4 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 6.19 - 6.14 (m, 1H, -OH), 4.81 - 4.76 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.94 - 1.81 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.29 - 1.16 (m, 26H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 162.96, 144.18, 124.53, 61.30, 60.14, 31.45, 30.81, 29.21, 29.16, 29.09, 28.96, 28.86, 28.55, 25.56, 22.25, 14.11.

#### 2.3.5. 4-hydroxymethyl-1-octadecylpyridinium bromide (11a)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NOBr: 65,14 % C; 10,02 % H; 3,17 % N; found: 65,27 % C; 9,95 % H; 3,15 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 362.3417; found: 362.3416. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.00 (d, J = 6.2 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 8.02 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 2 x Ar-H), 4.79 (d, J = 5.8 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.55 (t, J = 7.4 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.92 - 1.84 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.31 - 1.17 (m, 30H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 162.78, 144.19, 124.49, 61.33, 60.19, 31.45, 30.78, 29.20, 29.16, 29.08, 28.96, 28.86, 28.54, 25.55, 22.25, 14.11.

#### 2.3.6. 1-decyl-3-hydroxymethylpyridinium bromide (7b)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NOBr: 58,18 % C; 8,54 % H; 4,24 % N; found: 58,09 % C; 8,70 % H; 4,94 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 250.2165; found: 250.2162. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.06 (s, 1H, Ar-H), 9.03 (d, J = 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (dd, J = 8.0, 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.73 - 4.66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.62 (t, J = 7.5 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.93 - 1.84 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.31 - 1.07 (m, 14H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.8 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 143.49, 143.21, 143.08, 142.42, 127.62, 60.86, 59.53, 31.42, 30.95, 29.02, 28.93, 28.79, 28.54, 25.55, 22.24, 14.11.

#### 2.3.7. 1-dodecyl-3-hydroxymethylpyridinium bromide (8b)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NOBr: 60,33 % C; 9,00 % H; 3,91 % N; found: 60,12 % C; 9,20 % H; 4,04 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 278.2478; found: 278.2470. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.06 (s, 1H, Ar-H), 9.03 (d, J = 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (dd, J = 8.0, 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.71 - 4.68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.94 - 1.84 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.33 - 1.16 (m, 18H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 143.50, 143.22, 143.08, 142.41, 127.63, 60.86, 59.54, 31.43, 30.93, 29.14, 29.06, 28.85, 28.76, 28.54, 25.55, 22.23, 14.10.

#### 2.3.8. 3-hydroxymethyl-1-tetradecylpyridinium bromide (9b)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NOBr: 62,17 % C; 9,39 % H; 3,62 % N; found: 63,77 % C; 9,53 % H; 3,68 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 306.2791; found: 306.2786. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.05 (s, 1H, Ar-H), 9.01 (d, J = 6.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (dd, J = 8.0, 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.74 - 4.69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-), 1.93 - 1.85 (m, 2H, N+-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.32-1.18

(m, 22H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.6 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>);  
13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 143.50, 143.22, 143.07,  
142.42, 127.63, 60.87, 59.54, 31.43, 30.95, 29.20, 29.18,  
29.14, 29.08, 28.93, 28.85, 28.53, 25.55, 22.23, 14.09.

### 2.3.9. 1-hexadecyl-3-hydroxymethylpyridinium bromide (10b)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NOBr: 63,75 % C; 9,73 % H; 3,38 % N; found: 62,84 % C; 9,77 % H; 3,50 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 334.3104; found: 334.3099. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.05 (s, 1H, Ar-H), 9.02 (d, J = 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (dd, J = 8.0, 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.70-4.68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 1.93 - 1.85 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.29 - 1.16 (m, 26H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 143.53, 143.24, 143.09, 142.43, 127.65, 60.89, 59.56, 31.45, 30.97, 29.20, 29.17, 29.10, 28.95, 28.86, 28.56, 25.57, 22.25, 14.11.

### 2.3.10. 3-hydroxymethyl-1-octadecylpyridinium bromide (11b)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NOBr: 65,14 % C; 10,02 % H; 3,17 % N; found: 64,39 % C; 9,87 % H; 3,20 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 362.3417; found: 362.3412. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.05 (s, 1H, Ar-H), 9.01 (d, J = 6.0, 1H, Ar-H), 8.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (dd, J = 8.0, 6.0 Hz, 1H, Ar-H), 4.73 - 4.70 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 1.93 - 1.86 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.29 - 1.17 (m, 30H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.8 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 143.53, 143.24, 143.09, 142.43, 127.65, 60.89, 59.56, 31.45, 30.97, 29.20, 29.17, 29.10, 28.96, 28.87, 28.57, 25.57, 22.25, 14.10.

### 2.3.11. 1-decyl-2-hydroxymethylpyridinium bromide (7c)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NOBr: 58,18 % C; 8,54 % H; 4,24 % N; found: 58,25 % C; 8,68 % H; 4,35 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 250.2165; found: 250.2165. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.09 - 8.97 (m, 1H, Ar-H), 8.58 - 8.42 (m, 1H, Ar-H), 8.19 - 8.05 (m, 1H, Ar-H), 8.09 - 7.99 (m, 1H, Ar-H), 6.55 (t, J = 5.8 Hz, 1H, -OH), 4.92 (d, J = 5.8 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.56 - 4.48 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 1.90 - 1.79 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.39 - 1.17 (m, 14H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.84 (t, J = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157.79, 145.69, 145.58, 126.78, 126.26, 58.89, 56.54, 31.43, 30.23, 29.04, 28.98, 28.82, 28.62, 25.85, 22.25, 14.11.

### 2.3.12. 1-dodecyl-2-hydroxymethylpyridinium bromide (8c)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NOBr: 60,33 % C; 9,00 % H; 3,91 % N; found: 61,07 % C; 8,79 % H; 4,02 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 278.2478; found: 278.2473. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.19 - 8.95 (m, 1H, Ar-H), 8.67 - 8.49 (m, 1H, Ar-H), 8.29 - 8.10 (m, 1H, Ar-H), 8.10 - 7.96 (m, 1H, Ar-H), 6.55 (t, J = 5.8 Hz, 1H, -OH), 5.08 - 4.72 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.60 - 4.30 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 2.01 - 1.67 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.50 - 1.01 (m, 18H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.95 - 0.67 (m, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157.82, 145.69, 145.59, 126.77, 126.27, 58.90, 56.54, 31.45, 30.22, 29.15, 29.09, 28.98, 28.87, 28.62, 25.86, 22.25, 14.11.

### 2.3.13. 2-hydroxymethyl-1-tetradecylpyridinium bromide (9c)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NOBr: 62,17 % C; 9,39 % H; 3,62 % N; found: 62,17 % C; 10,01 % H; 4,18 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 306.2791; found: 306.2781. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.11 - 8.80 (m, 1H, Ar-H), 8.58 - 8.37 (m, 1H, Ar-H), 8.19 - 8.10 (m, 1H, Ar-H), 8.03 - 7.95 (m, 1H, Ar-H), 6.64 (t, J = 5.9 Hz, 1H, -OH), 4.91 (d, J = 5.9 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.56 - 4.50 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 1.89 - 1.80 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.37 - 1.18 (m, 22H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157.85, 145.70, 145.56, 126.83, 126.25, 58.87, 56.54, 31.45, 30.26, 29.23, 29.21, 29.18, 29.11, 29.00, 28.87, 28.65, 25.87, 22.25, 14.11.

### 2.3.14. 1-hexadecyl-2-hydroxymethylpyridinium bromide (10c)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NOBr: 63,75 % C; 9,73 % H; 3,38 % N; found: 64,22 % C; 9,79 % H; 3,62 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 334.3104; found: 334.3101. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.07 - 8.95 (m, 1H, Ar-H), 8.57 - 8.32 (m, 1H, Ar-H), 8.19 - 8.10 (m, 1H, Ar-H), 8.03 - 7.84 (m, 1H, Ar-H), 6.55 (t, J = 5.8 Hz, 1H, -OH), 4.92 (d, J = 5.8 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.54 - 4.48 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 1.88 - 1.80 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.37 - 1.16 (m, 26H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157.80, 145.69, 145.59, 126.77, 126.27, 58.91, 56.55, 31.45, 30.23, 29.21, 29.17, 29.11, 29.00, 28.86, 28.64, 25.87, 22.25, 14.12.

### 2.3.15. 2-hydroxymethyl-1-octadecylpyridinium bromide (11c)

EA: Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NOBr: 65,14 % C; 10,02 % H; 3,17 % N; found: 64,94 % C; 10,34 % H; 3,53 % N. HRMS (HESI+): [M]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NO<sup>+</sup> (m/z): 362.3417; found: 362.3412. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.04 - 8.95 (m, 1H, Ar-H), 8.63 - 8.52 (m, 1H, Ar-H), 8.18 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 8.08 - 7.98 (m, 1H, Ar-H), 6.34 - 6.17 (m, 1H, -OH), 5.01 - 4.84 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-OH), 4.56 - 4.41 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 1.91 - 1.77 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.27 - 1.17 (m, 30H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 13C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157.62, 145.69, 145.59, 126.65, 126.33, 59.00, 56.57, 31.45, 30.18, 29.20, 29.10, 28.99, 28.86, 28.62, 25.86, 22.25, 14.12.

## 2.4. Evaluation of Antibacterial Activity

The antibacterial activities of the prepared compounds were determined by the microdilution broth method according to the previously published protocol [34]. Part of the panel of bacterial strains used for the activity testing was obtained from Czech Collection of Microorganisms (CCM, Brno, Czech Republic) and American Type Culture Collection (ATCC). The remaining bacteria used in the study (*i.e.* *Staphylococcus aureus* H 5996/08, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus* sp. J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08) were clinical isolates (Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic). Prior to biological testing, the strains suspended in 0.85% saline were cultivated on Mueller-Hinton agar (Difco, Benton Dickinson, Detroit, MI) at 35°C. The bacterial popu-

lations were controlled densitometrically to reach  $1.5 \times 10^8$  viable Colony Forming Units (CFU) per 1 mL.

The compounds were dissolved in DMSO and added into wells of a testing plate with Mueller-Hinton liquid broth (Difco, Benton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. A geometrical series of the compounds' concentrations was used to quantify the biological activities: 0.49, 0.98, 2, 3.90, 7.8, 16, 31, 63, 125, 250 and 500  $\mu\text{mol/L}$ . The MICs, defined as 95% inhibition of bacterial growth, were determined visually after 24 h and 48 h. Growth of PA was determined after 72 h and 120 h. Similarly, the MBCs were determined as the concentration of compound causing a decrease in the number of bacterial colonies by  $> 99.9\%$ .

## 2.5. Evaluation of Antifungal Activity

For assay of the antifungal activity of the studied compounds, eight clinical samples of fungi or yeast were utilized: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida krusei* E28, *Candida tropicalis* 156, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Ab-sidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic). The protocol published previously was used [35, 36]. The MICs and MFCs were determined by a modified standard M27-A2 (CSLI) using RPMI 1640 medium, buffered to pH 7.0 with 0.165M 2-morpholino-propane-sulfonic acid, and two-fold serial dilutions (500 – 0.49  $\mu\text{mol/L}$ ) of the prepared compounds. DMSO was used as a solvent for the tested compounds, and its final concentration in inoculated samples did not exceed 2% (v/v). After 24 h and 48 h (72 h and 120 h for TM) of incubation at 35°C, the growth of microbial colonies was visually as well as spectrophotometrically examined.

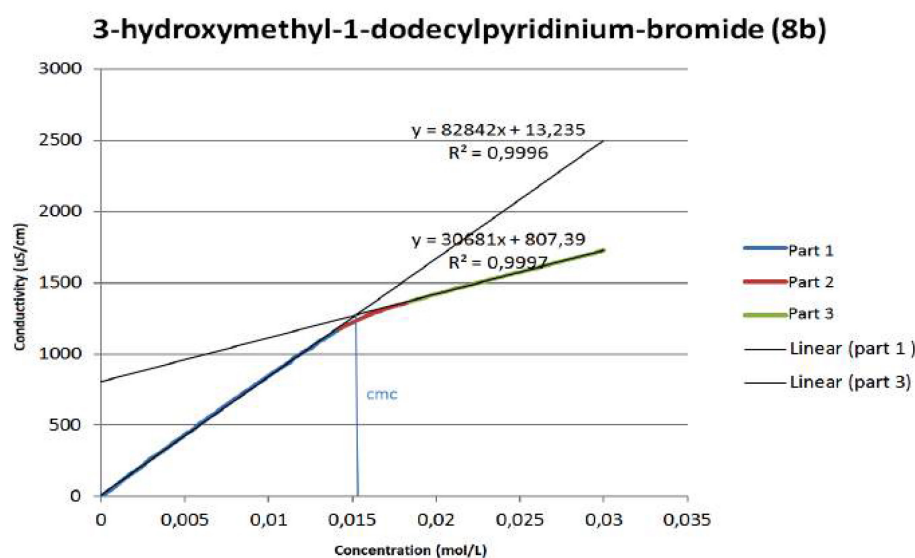
## 2.6. Cell Viability Assessment

Standard MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Sigma Aldrich) was used

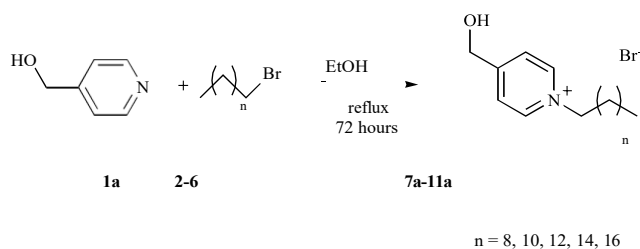
according to the manufacturer's protocol on the CHO-K1 (Chinese hamster ovary, ECACC, Salisbury, UK) in order to compare the cytotoxic effect of the studied compounds. The cells were cultured according to ECACC recommended conditions and seeded at a density of 8 000 per well. Briefly, the tested compounds were dissolved in DMSO and subsequently in the growth medium (F-12) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin so that the final concentration of DMSO did not exceed 0.5% (v/v). Cells were exposed to the tested compounds for 24 h. The medium was then replaced by a medium containing 10  $\mu\text{M}$  of MTT and the cells were allowed to produce formazan for approximately another 3 h under surveillance. Thereafter the medium with MTT was removed and crystals of formazan were dissolved in DMSO (100 $\mu\text{l}$ ). Cell viability was assessed spectrophotometrically by the amount of formazan produced. Absorbance was measured at 570 nm with 650 nm reference wavelength on Synergy HT (BioTek, USA).  $\text{IC}_{50}$  was then calculated from the control-subtracted triplicates using non-linear regression (four parameters) of GraphPad Prism 5 software. Final  $\text{IC}_{50}$  and SEM value were obtained as a mean of three independent measurements.

## 2.7. Conductivity Measurements

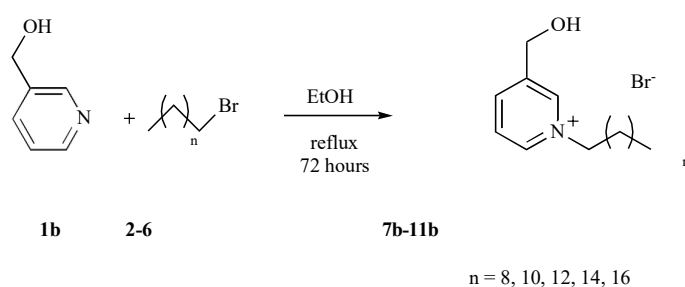
Conductivity measurements of aqueous solutions of prepared surfactants were carried out in triplicate on a Tristar Orion conductivity meter with conductivity cell 013005MD (Thermo Scientific, USA). The apparatus was controlled by software Navigator 21, using continuous data collection. The solutions were temperature-controlled at  $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Aqueous stock solutions of surfactants were made up to 0,2500 mol  $\text{L}^{-1}$  for  $\text{C}_{10}$  homologues, 0,1500 mol  $\text{L}^{-1}$  for  $\text{C}_{12}$  homologues, 0,0200 mol  $\text{L}^{-1}$  for  $\text{C}_{14}$  homologues and 0,0150 mol  $\text{L}^{-1}$  for  $\text{C}_{16}$  and  $\text{C}_{18}$  homologues. For the determination of CMC, the aqueous stock solutions of surfactants were further diluted. The linear pump Lineomat (VEB MLW Labortechnik Ilmenau, Germany) was used with a flow rate of 0.2 ml/min. An AREX stirrer (VELP Scientifica Srl, Italy) was used for continuous agitation, and conductivity was recorded



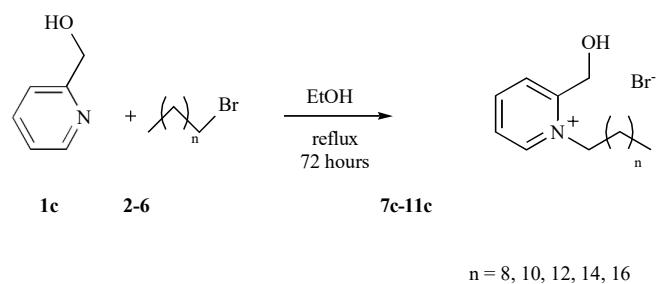
**Graph 1.** Determination of CMC-specific conductivity versus concentration plot of compound **8b**.



**Fig. (1).** Preparation of 4-hydroxymethylpyridinium salts (**7a-11a**).



**Fig. (2).** Preparation of 3-hydroxymethylpyridinium salts (**7b-11b**).



**Fig. (3).** Preparation of 2-hydroxymethylpyridinium salts (**7c-11c**).

every 3 seconds. The data was copied to MS Excel. The transformation of time axis to concentration axis was performed according to the parameters defining the measurement (starting volume of liquid in the titration vessel, the concentration of the surfactant solution in the syringe, solution feed rate). The curve (Graph 1) was divided into three parts, upper and lower linear parts and transition portion. It was obtained from 50-100 pairs of experimental concentration-conductivity data. The equation of the line and the coefficient of determination were calculated for both linear parts. The intersection of both axes was determined as the value of CMC (Graph 1).

### 3. RESULTS AND DISCUSSIONS

#### 3.1. Synthesis

The three series of compounds (**7a-11a**, **7b-11b** and **7c-11c**) were synthesized by nucleophilic substitution reaction as shown in Figs. (1, 2 and 3). The appropriate nitrogen containing substrates (**1a**, **1b**, **1c**) react with the appropriate 1-bromoalkane (**2-6**) in ethanol at reflux temperature. The compounds were obtained as yellow solids by a multi-solvent recrystallization from methanol:ethyl acetate (1:10). The process of recrystallization was repeated several times to obtain the required purity. All products were characterized by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, High Resolution Mass Spectrometry

points, calculated  $\log P$  (Clog  $P$ ), and logarithms of capacity factors  $k$  (see section on chromatographic analysis) are summarized in Table 1. It is evident that yields for the **a** and **b** series are a little bit different as would be expected, and the lower yields of **9a** and **10a** were probably due to repeated

purification. The lower yields of set **c** compared to those of sets **a** and **b** are due to steric hindrance by the 2-substituted hydroxymethyl group. The melting points increase slightly

with elongation of alkyl side chain. The steric hindrance effect of the different substituent positions on the pyridine ring is obvious for the **c** series only.

#### 3.2. Chromatographic Analysis

The mechanism of antibacterial action of QAS is very likely related to the interaction of the compounds with the bacterial cell membranes. Generally, the biological effect of QAS is elicited *via* corrupting the dynamic state of the phospholipidic bilayer, which finally leads to membrane leakages and bacterial cytolysis. From a physico-chemical point of

view, the impact of QAS on bacterial membranes may be philosophically split into electronic, steric and hydrophobic contributions. Of these three interacting components, we have focused in the present work particularly on the role of the lipophilic effect in evoking the antibacterial activity. Accordingly, the lipophilicity Clog  $P$  of the compounds under study was estimated using the program MarvinSketch 15.12.7.0, and compared to the experimental  $\log k$  values determined by high performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection (LC-UV) [20]. We were aiming for increased accuracy especially to differentiate the contribution to the lipophilicity due to the alternative attachment

(HRMS) and Elemental Analysis (EA). Yields, melting

positions of the hydroxymethylene group on the pyridinium scaffold. The  $\log k$  values and the correlation with Clog  $P$  are given in Table 1 and Fig. (4), respectively. The  $\log k$  values were calculated from retention times and expressed as arithmetic means of 6 measurements.

From Table 1 it is obvious that changing the position of the hydroxymethyl function on the *N*-alkylpyridinium scaffold caused only subtle changes in  $\log k$ . Although the correlation between  $\log k$  and Clog  $P$  is high when it is evaluated for the three separate compound series ( $R^2 = 0.9937, 0.9954, 0.9904$ ), from the overall correlation ( $R^2 = 0.9761$ ) it seems that the Clog  $P$  algorithm employed in this study somewhat underestimates the lipophilicity contribution of the 2-hydroxymethyl variant (Fig. 1). According to the chromatographic analysis, the average contribution of the hydroxymethyl group in different positions to  $\log k$  is basically the same (Fig. 5).

### 3.3. Antibacterial Activity

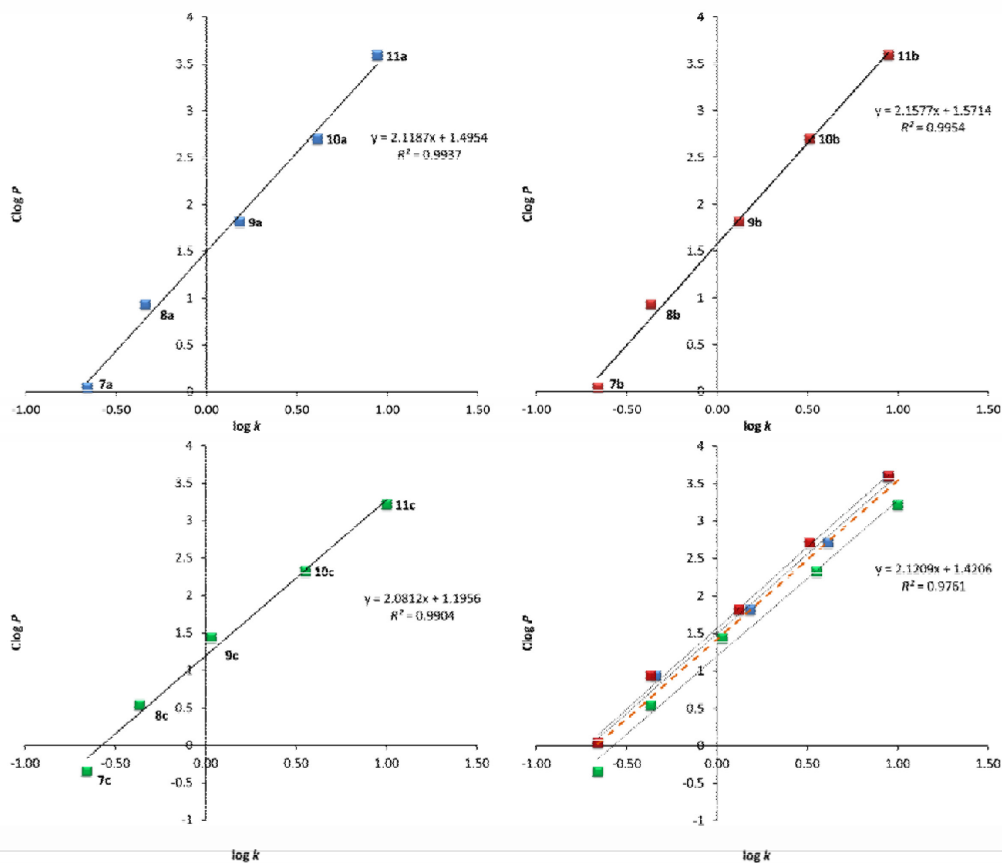
The *in vitro* antibacterial activity of the three sets of 2-, 3- and 4-hydroxymethyl substituted pyridinium salts was assayed for the following eight bacterial strains: *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (SA), *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* H 5996/08 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 (SE), *Enterococcus sp.* J 14365/08 (ES), *Escherichia coli* CCM4517 (EC), *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 (KP), extended spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 (KP-E), and *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (PA). Compounds **10a**,

Table 1. Yields, melting points, Clog P, and log k of prepared hydroxymethylpyridinium salts (7a–11a, 7b–11b, 7c–11c).

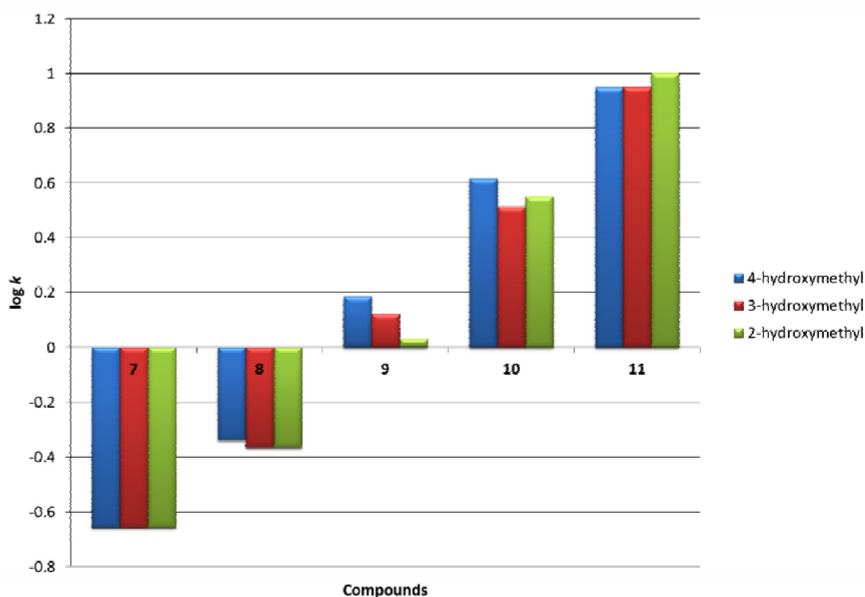
Compound	Alkyl Chain	Yield (%)	m.p. (°C)	Clog P <sup>a</sup>	log k <sup>b</sup>
7a	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	64	66-68	0.04	-0.66±0.018
8a	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	43	76-78	0.93	-0.34±0.000
9a	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	22	86-88	1.81	0.19±0.001
10a	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	30	87-89	2.70	0.61±0.001
11a	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	72	90-92	3.59	0.95±0.001
7b	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	83	52-54	0.04	-0.66±0.012
8b	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	83	62-64	0.93	-0.36±0.004
9b	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	82	69-71	1.81	0.12±0.003
10b	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	54	74-76	2.70	0.51±0.002
11b	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	62	78-80	3.59	0.95±0.002
7c	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	14	83-85	-0.35	-0.66±0.012
8c	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	8	86-88	0.54	-0.36±0.004
9c	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	18	97-99	1.43	0.03±0.002
10c	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	12	101-103	2.32	0.55±0.001
11c	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	10	102-104	3.21	1.00±0.002

<sup>a</sup>Clog P was calculated in MarvinSketch 15.12.7.0 (ChemAxon Ltd., 1998-2015) according to the method of Viswanadhan *et al.* [37].

<sup>b</sup>The mean values of log k and standard sample deviations were calculated from 6 measurements of the compounds' retention times.



**Fig. (4).** Relationships between Clog P and log k for *N*-alkyl 4-hydroxymethylpyridinium (blue squares), 3-hydroxymethylpyridinium (red squares), and 2-hydroxymethylpyridinium (green squares) salts. Overall correlation for the all tested compounds is depicted by an orange dashed line in the right bottom sub-plot. (The color version of the figure is available in the electronic copy of the article).



**Fig. (5).** Comparison of log  $k$  values for three series of  $N$ -alkylpyridinium salts substituted with 4-, 3-, and 2-hydroxymethyl groups (**7a**, **7b**, **7c-11a**, **11b**, **11c**). The log  $k$  values were determined experimentally by an isocratic high performance liquid chromatography method.

**11a** and **11c** were not evaluated due to their low solubility in the assay medium. Listed in Tables 2, 3 and 4 are the obtained minimum inhibitory concentrations (MICs) after 24h and 48h of incubation. For comparison, the MICs of standard  $N$ -benzalkonium ( $B_{12}$ - $B_{16}$ ) were added [20]. The synthesis and the antimicrobial activity have already been published

elsewhere for standard pyridinium salts without the substituents [20, 38].

From the newly-synthesized compounds in series **a**, only **8a** showed stronger antibacterial efficacy against gram-positive cocci (SA, MRSA, SE), but weak efficacy against gram-negative bacteria (EC, KP, KP-E, PA) was observed.

**Table 2.** Minimum inhibitory concentrations of the prepared compounds (**7a-11a**) and selected derivatives of  $N$ -benzalkonium ( $B_{12}$ - $B_{16}$ ). The *in vitro* activities were determined on a panel of eight bacterial strains.

Microorganisms	MIC ( $\mu\text{mol/L}$ ); 24 h / 48 h Incubation							
	7a	8a	9a	10a	11a	$B_{12}^a$	$B_{14}^a$	$B_{16}^a$
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 451608 (SA)	7.81/ 15.62	1.95/ 3.9	7.81/ 7.81	–	–	0.49/ 1.95	0.98/ 0.98	0.98/ 0.98
<i>Staphylococcus aureus</i> H 599608 (MRSA)	7.81/ 31.25	1.95/ 3.9	7.81/ 7.81	–	–	0.49/ 0.49	1.95/ 1.95	1.95/ 1.95
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 696608 (SE)	7.81/ 15.62	3.9/ 15.62	7.81/ 7.81	–	–	0.49/ 0.49	0.98/ 0.98	0.49/ 0.49
<i>Enterococcus sp.</i> J 1436508 (ES)	15.62/ 62.5	62.5/ 250	7.81/ 7.81	–	–	0.49/ 0.98	1.95/ 1.95	1.95/ 1.95
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517 (EC)	31.25/ 62.5	125/ 500	31.25/ 31.25	–	–	0.49/ 1.95	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 1175008 (KP)	125/ 125	31.25/ 250	62.5/ 125	–	–	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 1436808 (KP-E))	125/ 125	31.25/ 125	125/ 125	–	–	0.98/ 0.98	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961(PA) <sup>c</sup>	62.5/ 125	250/ 250	500/ 500	–	–	3.91/ 3.91	15.62/ 31.25	15.62 31.25

<sup>a</sup> $B_{12}$ ,  $B_{14}$ ,  $B_{16}$  mean  $N$ -benzyl- $N,N$ -dimethyl- $N$ -dodecylammonium bromide,  $N$ -benzyl- $N,N$ -dimethyl- $N$ -tetradecylammonium bromide,  $N$ -benzyl- $N,N$ -dimethyl- $N$ -hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation and antimicrobial efficacy of  $B_{12-16}$  have been published elsewhere [20].

<sup>c</sup>The antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 were determined after 72 h and 120 h of incubation. not evaluated; the compounds were insoluble in the assay medium.



**Table 3. Minimum inhibitory concentrations of the prepared compounds (7b-11b) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>-B<sub>16</sub>). The *in vitro* activities were determined on a panel of eight bacterial strains.**

Microorganisms	MIC (μmol/L); 24 h / 48 h incubation							
	7b	8b	9b	10b	11b	B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	B <sub>14</sub> <sup>a</sup>	B <sub>16</sub> <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 451608 (SA)	125/ 250	0.49/ 1.95	0.98/ 1.95	0.49/ 0.49	0.49/ 0.98	0.49/ 1.95	0.98/ 0.98	0.98/ 0.98
<i>Staphylococcus aureus</i> H 599608 (MRSA)	250/ 250	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81	0.98/ 0.98	0.98/ 0.98	0.49/ 0.49	1.95/ 1.95	1.95/ 1.95
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 696608 (SE)	250/ 250	15.62/ 62.5	3.9/ 15.62	1.95/ 1.95	1.95/ 1.95	0.49/ 0.49	0.98/ 0.98	0.49/ 0.49
<i>Enterococcus</i> sp. J 1436508 (ES)	250/ 250	15.62/ 15.62	3.9/ 7.81	0.98/ 0.98	3.9/ 15.62	0.49/ 0.98	1.95/ 1.95	1.95/ 1.95
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517 (EC)	250/ 500	31.25/ 31.25	15.62/ 15.62	3.9/ 3.9	62.5/ 62.5	0.49/ 1.95	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 1175008 (KP)	>500/ >500	125/ 125	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81	62.5/ 62.5	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 1436808 (KP-E))	>500/ >500	125/ 125	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81	62.5/ 125	0.98/ 0.98	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961(PA) <sup>c</sup>	>500/ >500	500/ 500	125/ 125	62.5/ 125	31.25/ 62.5	3.91/ 3.91	15.62/ 31.25	15.62/ 31.25

<sup>a</sup>B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation and antimicrobial efficacy of B<sub>12-16</sub> have been published elsewhere [20].

<sup>c</sup>The antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 were determined after 72 h and 120 h of incubation.

**Table 4. Minimum inhibitory concentrations of the prepared compounds (7c-11c) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>-B<sub>16</sub>). The *in vitro* activities were determined on a panel of eight bacterial strains.**

Microorganisms	MIC (μmol/L); 24 h / 48 h Incubation							
	7c	8c	9c	10c	11c	B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	B <sub>14</sub> <sup>a</sup>	B <sub>16</sub> <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 451608 (SA)	125/ 125	3.9/ 3.9	0.98/ 0.98	1.95/ 1.95	–	0.49/ 1.95	0.98/ 0.98	0.98/ 0.98
<i>Staphylococcus aureus</i> H 599608 (MRSA)	125/ 125	7.81/ 7.81	3.9/ 3.9	3.9/ 15.62	–	0.49/ 0.49	1.95/ 1.95	1.95/ 1.95
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 696608 (SE)	125/ 125	7.81/ 15.62	15.62/ 62.5	3.9/ 15.62	–	0.49/ 0.49	0.98/ 0.98	0.49/ 0.49
<i>Enterococcus</i> sp. J 1436508 (ES)	125/ 125	15.62/ 15.62	3.9/ 7.81	15.62/ 31.25	–	0.49/ 0.98	1.95/ 1.95	1.95/ 1.95
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517 (EC)	125/ 125	15.62/ 15.62	7.81/ 7.81	15.62/ 31.25	–	0.49/ 1.95	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 1175008 (KP)	>500/ >500	62.5/ 62.5	15.62/ 15.62	31.25/ 31.25	–	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 1436808 (KP-E))	>500/ >500	31.25/ 31.25	15.62/ 62.5	31.25/ 62.5	–	0.98/ 0.98	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961(PA) <sup>c</sup>	>500/ >500	125/ 125	125/ 500	>125/ >125	–	3.91/ 3.91	15.62/ 31.25	15.62/ 31.25

<sup>a</sup>B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation and antimicrobial efficacy of B<sub>12-16</sub> have been published elsewhere [20].

<sup>c</sup>The antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 were determined after 72 h and 120 h of incubation.

–not evaluated; the compounds were insoluble in the assay medium.

**Table 5.** Minimum inhibitory concentrations of the prepared compounds (7a-11a) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>-B<sub>16</sub>). The *in vitro* activities were determined on a panel of eight bacterial strains.

Microorganisms	MIC (μmol/L); 24 h / 48 h incubation							
	7a	8a	9a	10a	11a	B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	B <sub>14</sub> <sup>a</sup>	B <sub>16</sub> <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859 (CA)	31.25/ 31.25	31.25/ 62.5	15.62/ 15.62	–	–	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	3.91/ 7.81
<i>Candida tropicalis</i> 156 (CT)	7.81/ 15.62	7.81/ 15.62	3.9/ 15.62	–	–	0.49/ 0.49	3.91/ 3.91	3.91/ 7.81
<i>Candida krusei</i> E28 (CK)	7.81/ 15.62	7.81/ 31.25	3.9/ 3.9	–	–	0.49/ 0.49	3.91/ 3.91	1.95/ 1.95
<i>Candida glabrata</i> 20/I (CG)	15.62/ 31.25	7.81/ 15.62	3.9/ 7.81	–	–	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	1.95/ 3.91
<i>Trichosporon asahii</i> 1188 (TA)	31.25/ 62.5	31.25/ 62.5	62.5/ 62.5	–	–	0.49/ 1.95	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231 (AF)	125/ 250	125/ 250	31.25/ 62.5	–	–	0.98/ 3.91	7.81/ 15.62	7.81/ 7.81
<i>Absidia corymbifera</i> 272 (AC)	125/ 250	62.5/ 125	62.5/ 62.5	–	–	7.81/ 7.81	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445 (TM)	62.5/ 62.5	31.25/ 62.5	7.81/ 15.62	–	–	0.98/ 0.98	15.62/ 15.62	7.81/ 7.81

<sup>a</sup>B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation and antimicrobial efficacy of B<sub>12-16</sub> has been published elsewhere [20].

<sup>c</sup>The antifungal activities against *Trichophyton mentagrophytes* 445 were determined after 72 h and 120 h of incubation. –not evaluated; the compounds were insoluble in the assay medium.

In contrast, the other homologues of the **a** line showed only a weak activity against gram-positive bacteria and negligible activity against gram-negative. The **a** homologues C<sub>16</sub> (**10a**) and C<sub>18</sub> (**11a**) were not measured, because they were insoluble in media. Interestingly, the second series **b** with the hydroxymethyl substitution in position 3 on the pyridine ring is much more potent, as shown in Table 3. While compound **8b** possesses a strong activity only against SA, the longer homologue **9b** covers also the SE and ES strains. Even better efficiency has been obtained for **10b**. Its values of MICs are at least comparable with that of the benzalkonium salts (B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub>). Of interest is also the activity of **11b** against gram-positive bacteria. In recent papers the efficacy of compounds with an alkyl C<sub>18</sub> is quite rare [17]. Moreover these compounds are usually insoluble in hydrophilic media. The last series, compound **9c** is highlighted with the other C<sub>14</sub> analogues; however the **c** series is rather comparable with the **a** series when comes to overall efficacy. Again, the gram-negative bacteria were not very sensitive.

In general, the differences in antibacterial activities among the homologues with the different positions of the hydroxymethyl group on the pyridine ring are not very significant for any of the three sets. However, extraordinary efficiency was observed for compound **10b** in comparison to the homologues with the same length of alkyl side-chain and also to standard benzalkonium analogues. Figs. (6 and 7) show the effect of substituent position and the effect of alkyl side-chain length. There is no significant effect of the hydroxymethyl group position on the pyridinium ring, but the

difference in the sensitivity of G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> bacterial strains is apparent. All compounds are more effective against G<sup>+</sup> bacteria. The alkyl chain length (number of carbon atoms) influences the efficacy more significantly as shown in Fig. (7). Several compounds with longer alkyl chains (**10a**, **11a**, **11b**) were not evaluated, because they were insoluble in the assay medium.

### 3.4. Antifungal Activity

A set of eight microorganisms (yeasts: *i.e.* *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG); filamentous fungi: *Trichosporon asahii* 1188 (TA), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC) and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM) was used to evaluate the antifungal activity of the prepared compounds **7a-11a**, **7b-11b** and **7c-11c** (Tables 5-8). As mentioned above, compounds insoluble in the assay medium were not evaluated (**10a**, **11a** and **11c**). In the **a** series, low efficacy in general was observed. Interestingly, similarly to bacteria, **7a** showed the best potency among all C<sub>10</sub> homologues. The **b** series is more effective. Whereas the C<sub>12</sub> homologue (**8b**) has a weak antifungal effect against all strains except CK and CG, the efficacy of the other homologues increases with the alkyl chain length. As well as bacteria, also the fungi are more sensitive to homologues **10b** and **11b**. Again, the MICs of **10b** are comparable to or better than the values for the same benzalkonium homologue (B<sub>16</sub>). Surprisingly, the most versatile, covering the broad spectrum of fungi was compound **11b**

**Table 6. Minimum inhibitory concentrations of the prepared compounds (7b-11b) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>-B<sub>16</sub>). The *in vitro* activities were determined on a panel of eight bacterial strains.**

Microorganisms	MIC (μmol/L); 24 h / 48 h incubation							
	7b	8b	9b	10b	11b	B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	B <sub>14</sub> <sup>a</sup>	B <sub>16</sub> <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859 (CA)	500/ 500	125/ 125	31.25/ 31.25	3.9/ 7.81	3.9/ 3.9	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	3.91/ 7.81
<i>Candida tropicalis</i> 156 (CT)	62.5/ 500	7.81/ 7.81	3.9/ 15.62	1.95/ 7.81	3.9/ 3.9	0.49/ 0.49	3.91/ 3.91	3.91/ 7.81
<i>Candida krusei</i> E28 (CK)	15.62/ 125	1.95/ 3.9	3.9/ 7.81	0.98/ 3.9	3.9/ 3.9	0.49/ 0.49	3.91/ 3.91	1.95/ 1.95
<i>Candida glabrata</i> 20/I (CG)	31.25/ 125	1.95/ 3.9	3.9/ 3.9	0.98/ 1.95	3.9/ 3.9	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	1.95/ 3.91
<i>Trichosporon asahii</i> 1188 (TA)	>500/ >500	500/ 500	31.25/ 62.5	7.81/ 15.62	3.9/ 3.9	0.49/ 1.95	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231 (AF)	>500/ >500	250/ 500	31.25/ 31.25	7.81/ 31.25	3.9/ 3.9	0.98/ 3.91	7.81/ 15.62	7.81/ 7.81
<i>Absidia corymbifera</i> 272 (AC)	>500/ >500	>500/ >500	125/ 125	15.62/ 31.25	3.9/ 3.9	7.81/ 7.81	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445 (TM)	>500/ >500	500/ 500	31.25/ 62.5	3.9/ 15.62	3.9/ 3.9	0.98/ 0.98	15.62/ 15.62	7.81/ 7.81

<sup>a</sup>B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation and antimicrobial efficacy of B<sub>12-16</sub> has been published elsewhere [20].

<sup>c</sup>The antifungal activities against *Trichophyton mentagrophytes* 445 were determined after 72 h and 120 h of incubation.

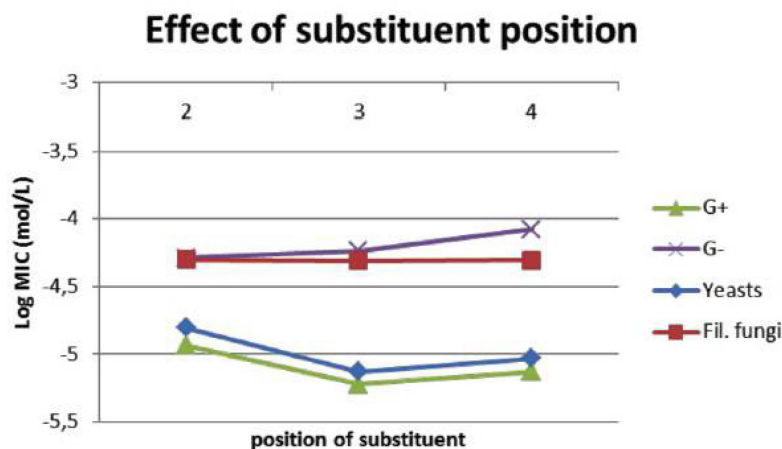
**Table 7. Minimum inhibitory concentrations of the prepared compounds (7c-11c) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>-B<sub>16</sub>). The *in vitro* activities were determined on a panel of eight bacterial strains.**

Microorganisms	MIC (μmol/L); 24 h / 48 h incubation							
	7c	8c	9c	10c	11c	B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	B <sub>14</sub> <sup>a</sup>	B <sub>16</sub> <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859 (CA)	500/ 500	15.62/ 15.62	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81	–	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	3.91/ 7.81
<i>Candida tropicalis</i> 156 (CT)	250/ 500	15.62/ 15.62	3.9/ 3.9	7.81/ 7.81	–	0.49/ 0.49	3.91/ 3.91	3.91/ 7.81
<i>Candida krusei</i> E28 (CK)	62.5/ 250	15.62/ 15.62	1.95/ 3.9	3.9/ 3.9	–	0.49/ 0.49	3.91/ 3.91	1.95/ 1.95
<i>Candida glabrata</i> 20/I (CG)	125/ 125	7.81/ 15.62	1.95/ 3.9	3.9/ 3.9	–	0.49/ 0.49	7.81/ 7.81	1.95/ 3.91
<i>Trichosporon asahii</i> 1188 (TA)	>125/ >125	62.5/ 125	15.62/ 62.5	15.62/ 15.62	–	0.49/ 1.95	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231 (AF)	>125/ >125	125/ >125	31.25/ 31.25	15.62/ 15.62	–	0.98/ 3.91	7.81/ 15.62	7.81/ 7.81
<i>Absidia corymbifera</i> 272 (AC)	>125/ >125	>125/ >125	62.5/ 62.5	31.25/ 31.25	–	7.81/ 7.81	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445 (TM)	>125/ >125	31.25/ 31.25	62.5/ 62.5	15.62/ 15.62	–	0.98/ 0.98	15.62/ 15.62	7.81/ 7.81

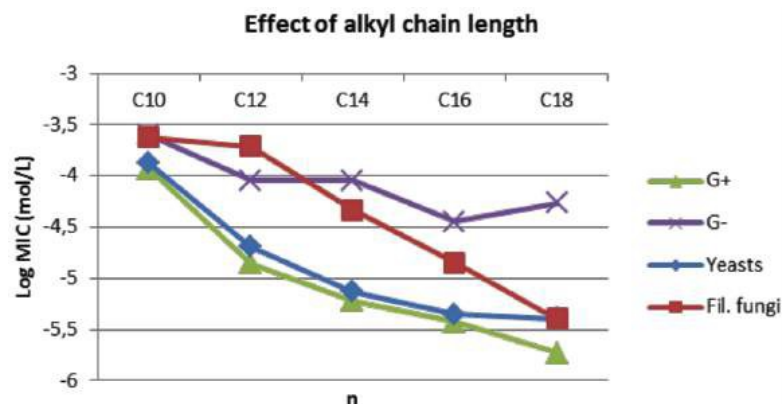
<sup>a</sup>B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation and antimicrobial efficacy of B<sub>12-16</sub> has been published elsewhere [20].

<sup>c</sup>The antifungal activities against *Trichophyton mentagrophytes* 445 were determined after 72 h and 120 h of incubation.

–not evaluated; the compounds were insoluble in the assay medium.



**Fig. (6).** Variation of log MIC (minimum inhibitory concentration for hydroxymethylpyridinium surfactants. 2, 3 and 4 are the position of the hydroxymethyl group on the pyridine ring. Efficacy is shown against microorganisms (gram-positive (G+) and gram-negative (G-) bacteria, yeasts and filamentous fungi). The values were obtained as the average MIC for the compound within the data series. Notably, the data for 10a, 11a and 11c were not considered due to low solubility of the compounds.



**Fig. (7).** Variation of log MIC (minimum inhibitory concentration for hydroxymethylpyridinium surfactants. Effect is shown of the number of carbon atoms in the long side chain (n) on the efficacy against microorganisms (gram-positive (G+) and gram-negative (G-) bacteria, yeasts and filamentous fungi). The values were obtained as the average MIC for the compound within the data series. Notably, the data for 10a, 11a and 11c were not considered due to low solubility of the compounds.

(C<sub>18</sub> alkyl). As shown in Table 7, the MIC values of the **b** series are also better in comparison with those of the benzalkonium salts, except for B<sub>12</sub>. The compounds **7c-11c** (**c** series) are similar to their antibacterial potencies, and hence there seems to be no groundbreaking effect.

It is evident that some of the novel compounds are endowed with significant activity against several microbial strains of fungi. The dependence of the length of alkyl side-chain as well as the position of the hydroxymethyl substituent is considerable. The antifungal activity increases with the longer alkyl chain, which is not usual for the homologues C<sub>18</sub>. Notably, compound **10b** was the only compound whose potency exceeded that of its benzalkonium analogue. Figs. (6 and 7) show the effect of substituent position and the effect of alkyl side-chain length. We cannot observe a significant effect of the hydroxymethyl group position on the pyridinium ring, but the difference in the sensitivity of yeasts and filamentous fungi is apparent. All compounds are more effective against yeasts, except compound **11b**, which is effective

against both groups. The alkyl chain length (number of carbon atoms) influences the efficacy more significantly as shown in Fig. (7). All strains are most sensitive to compound **11b**. Several compounds with longer alkyl chains (**10a**, **11a**, **11c**) were not evaluated, because they were insoluble in assay media.

### 3.5. Cytotoxicity

Cell viability assay confirmed an expected dependence that increasing length of alkyl side-chain results in higher cytotoxicity due to the higher lipophilicity of the compounds, which facilitates penetration into the cell (Table 9). Except for the C<sub>8</sub> homologues, the cytotoxic effect of the hydroxymethyl substituent on the pyridine ring seems to be insignificant as well as its position in the ring. The cytotoxic effect of the benzalkonium and pyridinium salts without any substituent has been published elsewhere [20]. Notably, the selectivity of the most effective QAS towards microbial cells compared with the mammalian CHO-K1 cell line is obvious.

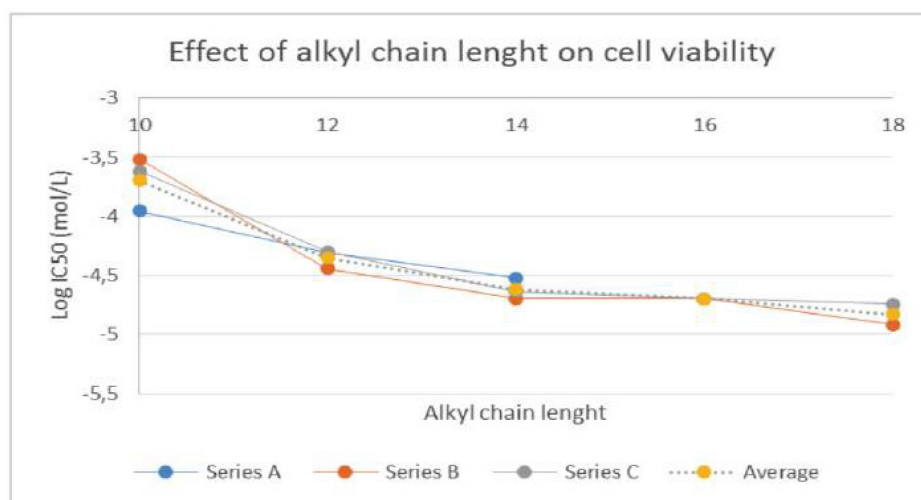


Fig. (8). Influence of the alkyl chain length on the mammalian cell (CHO-K1) viability.

Table 8. Cytotoxic potential of the prepared compounds (7a-11a, 7b-11b, 7c-11c) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>-B<sub>16</sub>). The *in vitro* activities are expressed as IC<sub>50</sub> (μmol/L) ± SEM (n=3).

Cell Line	IC <sub>50</sub> (μmol/L); 24 h Incubation ± SEM														
	7a	8a	9a	10a	11a	7b	8b	9b	10b	11b	7c	8c	9c	10c	11c
CHO-K1	111±3	49±2	30±2	-	-	304 ±3	36±2	20±2	20±2	12±2	240±15	50±2	23±2	20±1	18±2

-insoluble in the assay medium.

On contrary to antimicrobial efficacy, the cytotoxic effect tend to still increase with increasing chain length. Antimicrobial efficacy of QASs has the maximum between C12 and C16 linker [38, 39]. For Gram-positive bacteria and yeast, the activity maximizes with chain lengths of 12-14, whilst for Gram-negative bacteria, optimal activity is achieved with a chain length of 14-16. Compounds with *n*-alkyl chain lengths of < 4 or > 18 are considered to be inactive [39] (Fig. 8). Our results confirm such finding only partially, as the data for longer chains are missing due to low solubility, however, the similar trend of reported efficacy can be expected for longer chains.

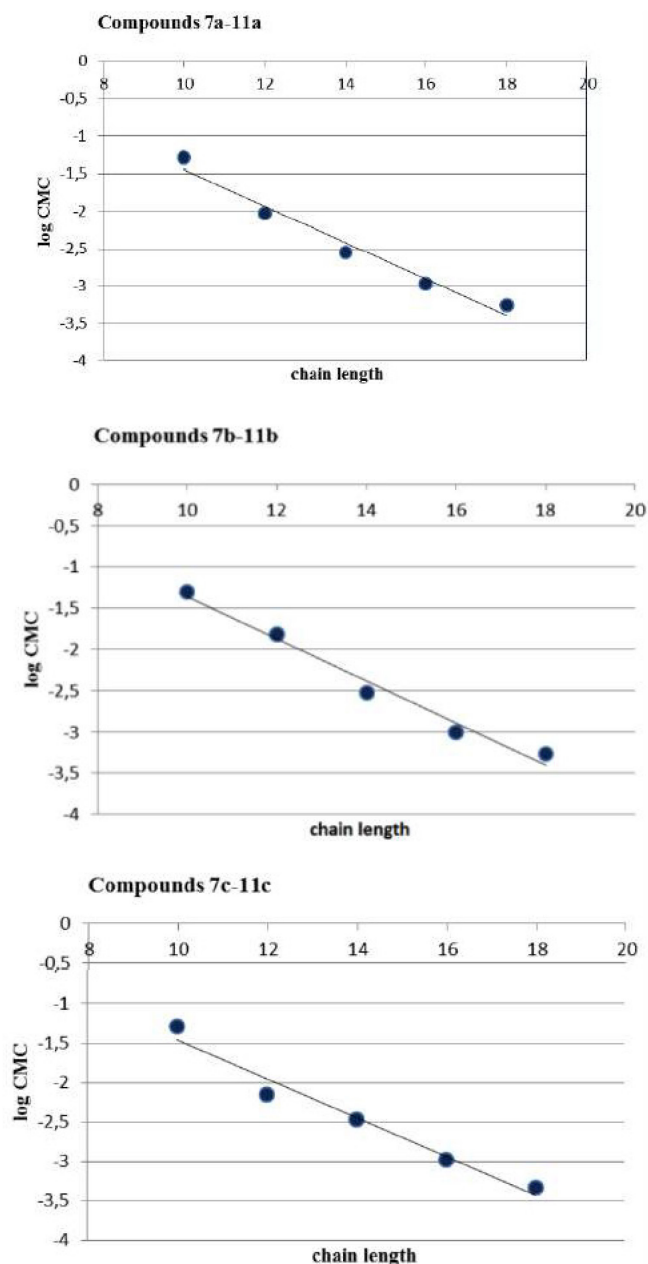
### 3.6. Critical Micelle Concentration-conductivity Measurements

The Critical Micellar Concentrations (CMC) were measured by a conductometric method. The temperature of measurement, chosen according to the Krafft temperature of the highest member of homologous series, was set at 45 °C (alkyl chain C18). The influence of the temperature on the CMC values has been measured previously [40], and it was not recognized as a decisive parameter in this case.

The values of CMC for all prepared compounds are summarized in Table 9. Values for several 4-hydroxymethylpyridinium homologues have been published before, and these were almost identical to those obtained in this study [32]. In Graph 1 the principle of determination of CMC is shown. The increase in concentration of cationic salt in the water results in an increase in the solution conductivity

Table 9. CMC/log(cmc) of prepared series of surfactants.

Series	CMC (mol/L)/log cmc	
 7a-11a	7a	0,05139/-1,28915
	8a	0,00945/-2,02448
	9a	0,00287/-2,54257
	10a	0,00107/-2,96966
	11a	0,00056/-3,26194
 7b-11b	7b	0,04978/-1,30291
	8b	0,01523/-1,81744
	9b	0,00295/-2,53037
	10b	0,00099/-3,00649
	11b	0,00055/-3,26194
 7c-11c	7c	0,05233/-1,28122
	8c	0,00707/-2,15032
	9c	0,00337/-2,47210
	10c	0,00104/-2,98122
	11c	0,00047/-3,33243



**Graph 2, 3, 4.** Dependence of the logCMC on the chain length on for 7a-11a, 7b-11b and 7c-11c series (Stauff-Klevens plots).

along a linear path (part 1). Part 2 is the section where the curve bends and where the CMC is determined. The curve then assumes linear progression again after exceeding the CMC (part 3). It is evident that the influence of the position of the hydroxymethyl group is negligible. On the other hand, we have proven the well-known correlation between alkyl chain length and CMC, and we have quantified it for the series of pyridinium QAS with the different positions of hydroxymethyl moiety. Graphs 2, 3 and 4 show confirmation of the Traube rule, which declares that elongation of an alkyl chain leads to decreased CMC value [41]. Notably to say, the values of CMC are not important for the determination of antimicrobial activities (MIC), The forming of the micelles is not demanded for the antimicrobial effect, as the monomers of this compounds are responsible for the negative in-

fluence to the bacterial and fungal cells, through its incorporation to the cell membrane [33]. From the Table 9, it is obvious that the MIC are well below the CMC values for novel surfactants.

## CONCLUSION

We have designed, synthesized and characterized three series of cationic surfactants based on 2-, 3- and 4-hydroxymethylpyridine. The cationic surfactants differ in the length of alkyl side-chain ( $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ). The antimicrobial effect was evaluated against four groups of microorganisms (gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts, and filamentous fungi). The critical micelle concentrations (CMC) were measured by conductivity method, and finally cytotoxicity tests were performed. We have investigated the effect of the substituent position (hydroxymethyl group) on the pyridine ring and the effect of a long alkyl chain attached to the quaternary nitrogen. The results of the antimicrobial testing showed that all surfactants have potent broad spectrum antimicrobial activity, especially against gram-positive bacteria and yeasts. The CMC values confirm the Traube rules and confirm a potential for use as antimicrobial agents in a formulation. The cytotoxicity risk was evaluated as low and towards microbes has been proved. Therefore, design and development of novel antimicrobial agents based on cationic surfactants provide an enlargement of the class of disinfection agents, helping to prevent the risk of development of resistance of nosocomial pathogens. The surface activity and cytotoxicity knowledge are important attributes for any potential active form of use in practice.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

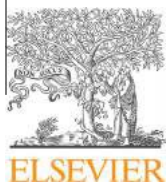
## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project NV15-31847A, by Long Term Development Plan - 1011, UHK and by student grant SVV/2016/260295. The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

## REFERENCES

- [1] McDonnell, G.; Russell, A.D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, *12*(1), 147-179.
- [2] Seddon, K.R. Ionic liquids for clean technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1997**, *68*(4), 351-356.
- [3] Plechkova, N.V.; Seddon, K.R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*(1), 123-150.
- [4] Kuca, K.; Marek, J.; Stodulka, P.; Musilek, K.; Hanusova, P.; Hrabanova, M.; Jun, D. Preparation of benzalkonium salts differing in the length of a side alkyl chain. *Molecules*, **2007**, *12*(10), 2341-2347.
- [5] Buseti, A.; Crawford, D.E.; Earle, M.J.; Gilea, M.A.; Gilmore, B.F.; Gorman, S.P.; Laverty, G.; Lowry, A.F.; McLaughlin, M.; Seddon, K.R. Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquolinium bromide ionic liquids. *Green Chem.*, **2010**, *12*(3), 420-425.
- [6] Petkovic, M.; Ferguson, J.L.; Gunaratne, H.; Ferreira, R.; Leitao, M.C.; Seddon, K.R.; Rebelo, L.P.; Pereira, C.S. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids-toxicity and biodegradability. *Green Chem.*, **2010**, *12*(4), 643-649.

- [7] Rodriguez-Morales, S.; Compadre, R.L.; Castillo, R.; Breen, P.J.; Compadre, C.M. 3D-QSAR, synthesis, and antimicrobial activity of 1-alkylpyridinium compounds as potential agents to improve food safety. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*(9), 840-849.
- [8] Cheng, L.; Weir, M.D.; Xu, H.H.; Antonucci, J.M.; Kraigsley, A.M.; Lin, N.J.; Lin-Gibson, S.; Zhou, X. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent. Mater.*, **2012**, *28*(5), 561-572.
- [9] Cheng, L.; Weir, M.D.; Zhang, K.; Arola, D.D.; Zhou, X.; Xu, H.H. Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. *J. Dent.*, **2013**, *41*(4), 345-355.
- [10] Tischer, M.; Pradel, G.; Ohlsen, K.; Holzgrabe, U. Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: Targets or non-specific interactions? *Chemmedchem*, **2012**, *7*(1), 22-31.
- [11] Menzel, T.M.; Tischer, M.; Francois, P.; Nickel, J.; Schrenzel, J.; Bruhn, H.; Albrecht, A.; Lehmann, L.; Holzgrabe, U.; Ohlsen, K. Mode-of-Action Studies of the Novel Bisquaternary Ammonium Bisnaphthalimide MT02 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*(1), 311-320.
- [12] Marek, J.; Buchta, V.; Soukup, O.; Stodulka, P.; Cabal, J.; Ghosh, K.K.; Musilek, K.; Kuca, K. Preparation of quaternary ammonium salts differing in the length of the alkyl side chain. *Molecules*, **2012**, *17*(6), 6386-6394.
- [13] Kuca, K.; Bielavska, M.; Cabal, J.; Dohnal, V. Determination of benzalkonium bromide homologues in disinfection products using high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.*, **2005**, *38*(4), 673-682.
- [14] Carson, L.; Chau, P.K.; Earle, M.J.; Gilea, M.A.; Gilmore, B.F.; Gorman, S.P.; McCann, M.T.; Seddon, K.R. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chem.*, **2009**, *11*(4), 492-497.
- [15] Aupoix, A.; Pegot, B.; Vo-Thanh, G. Synthesis of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids and application of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as pre-catalysts for the benzoin condensation using solvent-free and microwave activation. *Tetrahedron*, **2010**, *66*(6), 1352-1356.
- [16] Chauhan, V.; Singh, S.; Kamboj, R.; Mishra, R.; Kaur, G. Synthesis, micellization properties, and cytotoxicity trends of N-hydroxyethyl-3-alkyloxypyridinium surfactants. *Colloid. Polym. Sci.*, **2014**, *292*(2), 467-476.
- [17] Marek, J.; Malinak, D.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Pasdiorova, M.; Dolezal, M.; Kuca, K. Synthesis and disinfection effect of the pyridine-4-aldoxime based salts. *Molecules*, **2015**, *20*(3), 3681-3696.
- [18] Wong, Y.L.; Hubieki, M.P.; Curfman, C.L.; Doncel, G.F.; Dudding, T.C.; Savle, P.S.; Gandour, R.D. A structure-activity study of spermicidal and anti-HIV properties of hydroxylated cationic surfactants. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*(11), 3599-3608.
- [19] Tiller, J.C.; Liao, C.J.; Lewis, K.; Klivanov, A.M. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*(11), 5981-5985.
- [20] Malinak, D.; Dolezal, R.; Marek, J.; Salajkova, S.; Soukup, O.; Vejsova, M.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Penhaker, M.; Musilek, K.; Kuca, K. 6-Hydroxyquinolinium salts differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*(22), 5238-5241.
- [21] Madaan, P.; Tyagi, V.K. Quaternary pyridinium salts: A review. *J. Oleo. Sci.*, **2008**, *57*(4), 197-215.
- [22] Buffet-Bataillon, S.; Tattevin, P.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A. Emergence of resistance to antibacterial agents: The role of quaternary ammonium compounds-a critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2012**, *39*(5), 381-389.
- [23] Balmer, P. *Global Atlas of Wastewater Sludge and Biosolids Use and Disposal*; Matthews, P., Ed.; Bourne Press Ltd.: UK, **1996**; pp. 129-132.
- [24] Karsa, D.R.; Poeter, M.R. *Biodegradability of Surfactants*; Blackie and Sons: London, **1995**.
- [25] Nagamune, H.; Maeda, T.; Ohkura, K.; Yamamoto, K.; Nakajima, M.; Kourai, H. Evaluation of the cytotoxic effects of bis-quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells. *Toxicol. In Vitro*, **2000**, *14*(2), 139-147.
- [26] Dwars, T.; Paetzold, E.; Oehme, G. Reactions in micellar systems. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2005**, *44*(44), 7174-7199.
- [27] Singh, N.; Karpichev, Y.; Gupta, B.; Satnami, M.L.; Marek, J.; Kuca, K.; Ghosh, K.K. Physicochemical properties and supermuclophilicity of oxime-functionalized surfactants: Hydrolytic catalysts toward dephosphorylation of di- and triphosphate esters. *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*(14), 3806-3817.
- [28] Singh, N.; Ghosh, K.K.; Marek, J.; Kuca, K. Hydrolysis of carboxylate and phosphate esters using monopyridinium oximes in cationic micellar media. *Int. J. Chem. Kinet.*, **2011**, *43*(10), 569-578.
- [29] Tiwari, S.; Ghosh, K.K.; Marek, J.; Kuca, K. Comparative study of nucleophilic efficacy of pralidoxime towards phosphorus, sulfur and thiophosphorus based esters. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **2009**, *98*(1), 91-97.
- [30] Tiwari, S.; Kolay, S.; Ghosh, K.K.; Kuca, K.; Marek, J. Kinetic study of the reactions of p-nitrophenyl acetate and p-nitrophenyl benzoate with oximate nucleophiles. *Int. J. Chem. Kinet.*, **2009**, *41*(1), 57-64.
- [31] Tiwari, S.; Ghosh, K.K.; Marek, J.; Kuca, K. Cationic micellar-catalyzed hydrolysis of pesticide fenitrothion using alpha-nucleophiles. *Lett. Drug. Des. Discov.*, **2010**, *7*(3), 194-199.
- [32] Jordan, D.; Tan, E.; Hegh, D. Synthesis, characterization and conductivity of quaternary nitrogen surfactants modified by the addition of a hydroxymethyl substructure on the head group. *J. Surfactants. Deterg.*, **2012**, *15*(5), 587-592.
- [33] Corte, L.; Tiecco, M.; Roscini, L.; Germani, R.; Cardinali, G. FTIR analysis of the metabolomics stress response induced by N-alkylpyridinium surfactants in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida Albicans*. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *116*, 761-771.
- [34] Institute CaLS. CSLI document M07-A7, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 7<sup>th</sup> Ed., **2006**.
- [35] Institute CaLS. CSLI document M27-A3, *Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*; 3<sup>rd</sup> Ed., **2008**.
- [36] Institute CaLS. CSLI document M38-A2, *Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. 2<sup>nd</sup> Ed., **2008**.
- [37] Viswanadhan, V.N.; Ghose, A.K.; Revankar, G.R.; Robins, R.K. Atomic physicochemical parameters for 3 dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally-occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1989**, *29*(3), 163-172.
- [38] Dolezal, R.; Soukup, O.; Malinak, D.; Savedra R.M.L.; Marek, J.; Dolezalova, M.; Pasdiorova, M.; Salajkova, S.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Ramalho, T.C.; Kuca, K. Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *121*, 699-711.
- [39] Gilbert, P.; Moore, L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.*, **2005**, *99*, 703-715.
- [40] Fiscaro, E.; Biemmi, M.; Compari, C.; Duce, E.; Peroni, M. Thermodynamics of aqueous solutions of dodecyltrimethylammonium bromide. *J. Colloid. Interface. Sci.*, **2007**, *305*(2), 301-307.
- [41] Traube, I. Über die Kapillaritätskonstanten organischer Stoffe in wässriger Lösung. *Annu. Chem. Liebigs*, **1891**, *265*, 27-55.



# Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety



Ondrej Soukup <sup>a,b,†</sup>, Rafael Dolezal <sup>a,g</sup>, David Malinak <sup>a,c</sup>, Jan Marek <sup>d,e</sup>, Sarka Salajkova <sup>a,b</sup>, Marketa Pasdiorova <sup>a,d</sup>, Jan Honegr <sup>a</sup>, Jan Korabecny <sup>a,b</sup>, Petr Nachtigal <sup>f</sup>, Florian Nachon <sup>h</sup>, Daniel Jun <sup>b</sup>, Kamil Kuca <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Cybernetics and Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, VSB-Technical University of Ostrava, 17. Listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Surgical Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, 700 30 Ostrava, Czech Republic

<sup>f</sup> Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>g</sup> Center for Basic and Applied Research, Faculty of Informatics and Management, University of Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>h</sup> Departement de Toxicologie et Risque Chimique, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, BP73, F-91223 Brétigny-sur-Orge, France

## article info

### Article history:

Received 26 November 2015

Revised 4 January 2016

Accepted 5 January 2016

Available online 6 January 2016

### Keywords:

5-Hydroxyisoquinolinium salts

Synthesis

Antimicrobial activity

Lipophilicity

Isoquinolinium salts

## abstract

In the present paper, we describe the synthesis of a new group of 5-hydroxyisoquinolinium salts with different lengths of alkyl side-chain (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>), and their chromatographic analysis and biological assay for in vitro activity against bacterial and fungal strains. We compare the lipophilicity and efficacy of hydroxylated isoquinolinium salts with the previously published (non-hydroxylated) isoquinolinium salts from the point of view of antibacterial and antifungal versatility and cytotoxic safety. Compound 11 (C<sub>18</sub>) had to be excluded from the testing due to its low solubility. Compounds 9 and 10 (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>) showed only moderate efficacy against G<sup>+</sup> bacteria, notably with excellent potency against *Staphylococcus aureus*, but no effect against G<sup>–</sup> bacteria. In contrast, non-hydroxylated isoquinolinium salts showed excellent antimicrobial efficacy within the whole series, particularly 14 (C<sub>14</sub>) against G<sup>+</sup> strains and 15 (C<sub>16</sub>) against fungi. The electronic properties and desolvation energies of 5-hydroxyisoquinolinium and isoquinolinium salts were studied by quantum-chemistry calculations employing B3LYP/6-311++G(d,p) method and an implicit water-solvent simulation model (SCRF). Despite the positive mesomeric effect of the hydroxyl moiety reducing the electron density of the quaternary nitrogen, it is probably the higher lipophilicity and lower desolvation energy of isoquinolinium salts, which is responsible for enhanced antimicrobial versatility and efficacy.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The quaternary ammonium salts (QAS) belong to the group of cationic surfactants applicable in a broad range of fields. This subgroup of cationic surfactants, composed of a hydrophilic quaternary nitrogen moiety and a hydrophobic long alkyl chain, have found wide use in industry, and a number of such compounds such as *N*-alkylpyridinium and *N*-benzalkonium salts<sup>1</sup> have been frequently used in organic chemistry as catalysts,<sup>2–7</sup> in analytical chemistry,<sup>8</sup> and in dentistry.<sup>9,10</sup> In addition, QAS have even been

employed experimentally as competitive inhibitors of acetylcholinesterase<sup>11</sup> and as an antagonist on nicotinic receptors.<sup>12</sup>

However, QAS are compounds used mainly as disinfectants and antiseptics.<sup>13</sup> This group of compounds can be used in prevention of nosocomial infections that are conditioned mainly by the impaired immunity status of patients, absence of a strict glove-change regime, and the use of improperly or inadequately sterilized medical instruments.<sup>14</sup> Currently, the most problematic issue in the field is the incidence of bacterial strains which are resistant to antimicrobial agents, not only to antibiotics but also to commonly used disinfectants. This trend is the result of long-term use of antibiotics and disinfectants, especially in hospitals, where the bacteria are constantly exposed to the pressure of natural selection and are able

<sup>†</sup> Corresponding author. Tel.: +420 603 351 801; fax: +420 495 832 100.

E-mail address: [ondrej.soukup@fnhk.cz](mailto:ondrej.soukup@fnhk.cz) (O. Soukup).



to develop resistance to commonly used disinfectants. From this point of view, the use of QAS in a hospital environment represents a good approach, because the perceived mechanism of action of biological detergents minimizes the occurrence of microbial resistance.<sup>15</sup> However, this mechanism seems to be more complex than simple disruption of the membrane with subsequent cytoplasmic leakage and cell death. Interaction with intracellular proteins and nucleic acid has been reported to be also of importance,<sup>13</sup> and here a resistance mechanism resembling hyperexpression of a multi-drug efflux pump may take place.<sup>15</sup> Such specific interactions are also in line with the fact that different compounds of the QAS family exhibit their own antimicrobial spectrum.<sup>16</sup>

QAS show broad bacteriostatic, tuberculostatic, sporistatic and algistatic efficacy at very low concentrations. Higher concentrations are usually required for broad bactericidal, algicidal and fungicidal actions.<sup>17</sup> Gram negative (G<sup>-</sup>) bacteria are less sensitive than Gram positive (G<sup>+</sup>), probably due to failure of the compounds to penetrate the outer-membrane and reach the cytoplasmic membrane.<sup>18</sup> Although QAS are not considered sporicidal, some sporicidal activity has been observed at higher concentrations and temperatures.<sup>17</sup> The broad spectrum of efficacy is ensured mainly by a relatively unspecific mechanism since they serve as biological detergents perturbing the cytoplasmic membrane. The negatively charged outermost surface of bacterial cells is stabilized by the presence of divalent cations such as Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. The positive charge of cationic detergents attaches to the cell surface by replacing Ca<sup>2+</sup>, followed by the embedding of the hydrophobic alkyl chain into the lipid bi-layer.<sup>15</sup> Thus, positive charge is an important motif of QAS for their microbicidal activity, and the lower the electron density the better the expected effect.

In the present paper we outline the synthesis of a new group of QAS, 5-hydroxyisoquinolinium salts with varied length of alkyl side-chain (C<sub>10</sub>–C<sub>18</sub>), and their antibacterial and antifungal activities. We herein compare the antimicrobial efficacy of 5-OH-isoquinolinium QAS with that of isoquinolinium QAS, and also with the standard C<sub>12</sub>–C<sub>16</sub> alkyl homologues of *N*-benzalkonium QAS. Our previous study revealed the excellent antimicrobial activity of the 6-hydroxy substituted *N*-alkylquinolinium salt bearing a C<sub>12</sub> alkyl chain,<sup>19</sup> surpassing that of the *N*-alkylquinolinium salts.<sup>20</sup> Thus, the aim of this study is to evaluate whether introduction of a hydroxyl moiety reduces the electron density of the quaternary nitrogen and consequently improves the antimicrobial activity. We also report on the safety of all the compounds by means of cell-viability evaluation, and the basic synthetic and analytical indicators for both the isoquinolinium and hydroxyisoquinolinium series. The synthesis of the isoquinolinium QAS has been described previously by the same group elsewhere.<sup>21</sup>

## 2. Results and discussion

### 2.1. Chemistry

#### 2.1.1. Synthesis and LC–MS analysis

As shown in Figure 1, the new group of 5-hydroxyisoquinolinium salts 7–11 was prepared by reaction of 5-hydroxyisoquinoline

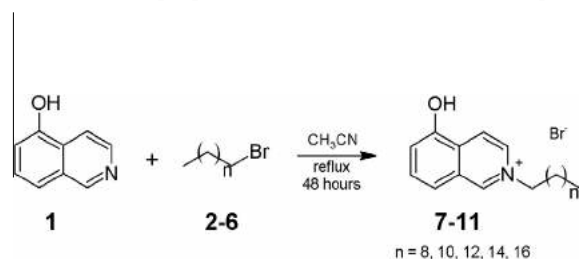


Figure 1. Preparation of 5-hydroxyisoquinolinium salts (7–11).

(1) with 1-bromoalkane (2–6) in acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN). The reaction mixture of 5-hydroxyisoquinoline and 1-bromoalkane was stirred under reflux for 48 h, and the prepared salts were obtained as brown crystals by crystallization from acetone. The length of alkyl chains bound to the isoquinoline scaffold ranged from C<sub>10</sub> to C<sub>18</sub>. The prepared products 7–11 were characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and high-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses. Based on LC with UV detection ( $k = 254$  nm), the purity of all prepared compounds was around 99%. Yields, melting points, capacity factors  $k$  and calculated  $\log P$  (C log  $P$ ) of the prepared salts 7–11 (MarvinSketch 14.9.8.0) are shown in Table 1.

In order to determine the lipophilicity of 7–11 and 12–16, we exploited the previously reported isocratic LC–MS method.<sup>19</sup> The retention times were transformed into capacity factors  $k$  and then correlated as  $\log k$  with C log  $P$  calculated in MarvinSketch 14.9.8.0 program. Conforming to physical chemistry theory on the relationship between  $\log k$  and  $\log P$  (i.e., Collander equation), a high correlation was observed for compounds 7–16 ( $R^2(7-16) = 0.9996$ ) (Fig. 2).

### 2.2. Biological evaluation

#### 2.2.1. Assessment of antibacterial activities

The in vitro antibacterial activity of hydroxylated 7–10 and non-hydroxylated isoquinolinium homologues 12–16 was assayed for the following eight bacterial strains: *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (SA), *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* H 5996/08 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 (SE), *Enterococcus* sp. J 14365/08 (ES), *Escherichia coli* CCM4517 (EC), *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 (KP), extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 (ESBL), and *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (PA). Compound 11 was not evaluated due to its low solubility. Listed in Table 2 are the obtained minimum inhibitory concentrations (MICs) after 24 h and 48 h of incubation, and the minimum bactericidal concentrations (MBCs) after 48 h of incubation. For the purpose of comparison *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>–B<sub>16</sub>) references were added.

From the newly synthesized compounds, 9 and 10 showed strong antibacterial efficacy against SA, whereas other derivatives showed only weak activity. Interestingly, introduction of the hydroxyl moiety to compounds bearing a longer alkyl chain (9 and 10) abolished the activity against G<sup>-</sup> strains. A similar pattern has been reported for 6-OH quinolinium analogues,<sup>19</sup> *N*-alkoxymethylpyridinium salts<sup>23</sup> and 3-OH pyridinium analogues (unpublished observations). In contrast, isoquinolinium QAS showed a wide spectrum of efficacy within the whole series, at least against G<sup>+</sup> strains. Compound 14 (C<sub>14</sub>) showed the same efficacy as the benzalkonium B<sub>12</sub> standard (and exceeded B<sub>14</sub>) at the G

Table 1

Yields, melting points, capacity factors  $k$  and C log  $P$  of prepared 5-hydroxyisoquinolinium salts (7–11) and isoquinolinium salts (12–16).<sup>21</sup>

Compound	Alkyl chain	Yield (%)	Mp (°C)	$k^a$	C log $P^b$
7	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	53	158–160	0.44 ± 0.01	1.49
8	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	64	172–174	1.1 ± 0.02	2.38
9	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	59	166–168	2.3 ± 0.03	3.27
10	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	52	167–168	5.1 ± 0.07	4.16
11	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	64	164–166	12 ± 0.15	5.05
12	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	78	40–42	0.61 ± 0.01	1.79
13	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	69	58–60	1.4 ± 0.01	2.68
14	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	87	60–62	3.0 ± 0.19	3.57
15	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	84	68–70	6.9 ± 0.06	4.46
16	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	84	76–78	15 ± 0.06	5.35

<sup>a</sup> Capacity factors  $k$  were determined by an isocratic LC–MS method. The values are given as mean and standard deviation of 6 measurements.

<sup>b</sup> C log  $P$  was calculated in MarvinSketch 14.9.8.0 (ChemAxon Ltd, 1998–2014) according to the method of Viswanadhan et al.<sup>22</sup>

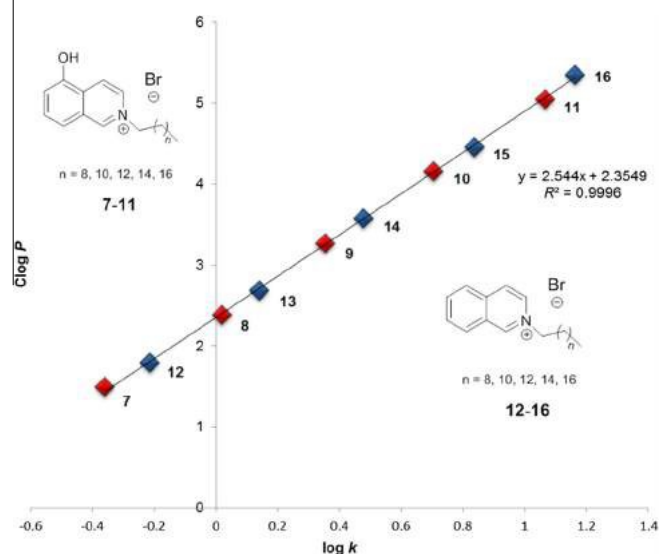


Figure 2. Correlation between  $C \log P$  and  $\log k$  of compounds 7–16. It is obvious that the hydroxyl function decreases the lipophilicity of the compounds by a constant  $D \log k(5\text{-OH}) \approx 0.12$ .

+ strains. Similarly, compound 15 ( $C_{16}$ ) surpassed the  $B_{16}$  analogue. The potency was lower for G-strains in comparison to the benzalkonium QAS, but clearly exceeded that of the 5-OH analogues (Fig. 3).

### 2.2.2. Assessment of antifungal activities

A set of eight microorganisms (i.e., *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20I (CG), *Trichosporon asahii* 1188 (TA), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC) and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM) was used to evaluate the antifungal activity of the prepared compounds 7–10. Again, compound 11 was not evaluated due to its low solubility in any growth medium.

A summary of the determined antifungal MICs after 24 h/48 h of incubation and the minimum fungicidal concentrations (MFC) is given in (Table 3). As in the case of the bacterial strains, the novel 5-OH isoquinolinium salts showed only weak-to-moderate activity for both yeasts (the first four strains) and filamentous fungi. The only compound that surpassed its non-hydroxylated analogues was compound 8 against filamentous fungi TA, AF and AC. Notably, isoquinolinium compounds 14 ( $C_{14}$ ) and 15 ( $C_{16}$ ) showed higher antifungal activity than their benzalkonium analogues  $B_{14}$  and  $B_{16}$ , but not however surpassing the gold standard  $B_{12}$  (Fig. 4).

### 2.2.3. Molecular modeling and SAR discussion

Steric properties, distribution of electron density and lipophilicity have been broadly accepted as crucial molecular descriptors of bioactive chemicals since the advent of the structure–activity relationship concept (SAR) in the second part of the 20th century.<sup>25–28</sup> From Figure 3 it is obvious that the biological activity generally worsens in the order from the most active *N*-alkylbenzalkonium salts, through *N*-alkylisoquinolinium salts to *N*-alkyl-5-hydroxyisoquinolinium salts as the least active. With reference to the structural changes, it is appropriate to suppose that this trend in the biological activities is caused by decreasing lipophilicity as a result of the structural variation in the aromatic moiety. Although being only slightly different, the benzyltrimethylammonium, 2-methylisoquinolinium and 5-hydroxy-2-methylisoquinolinium head groups have  $C \log P$  of 2.25, 2.20 and 2.50, respectively. The deteriorating effect is clearly demonstrated by the introduction of the 5-hydroxy group which is a single donor and simultaneously a double acceptor of hydrogen bonds. Due to the negative induction (I<sup>-</sup>) and positive mesomeric (M<sup>+</sup>) effect of the hydroxy group, the molecular system undergoes relatively greater polarization which gives rise to a stronger interaction with the aqueous environment. As a consequence, such molecules with more polarized parts require higher Gibbs desolvation energy to incorporate into the cell membrane or cell wall, which accords with weaker biological activity observed at the same thermodynamic setting. This mechanistic interpretation corresponds to physicochemical

Table 2

Minimum inhibitory/bactericidal concentrations of the compounds (7–16) and selected derivatives of *N*-benzalkonium ( $B_{12}$ – $B_{16}$ )

Microorganisms	MIC (1mol/L): 24 h/48 h incubation MBC (1mol/L): 48 h incubation											
	7	8	9	10	12	13	14	15	16	$B_{12}^a$	$B_{14}^a$	$B_{16}^a$
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 451608	16/16	1/1	0.5/0.5	0.5/0.5	16/16	0.5/0.5	0.5/0.5	1/1	0.5/0.5	0.5/2	1/1	1/1
<i>Staphylococcus aureus</i> H 599608 (MRSA)	63	2	1	0.5	31	1	1	2	2	2	3.9	3.9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 696608	31/31	3.9/3.9	2/2	0.5/0.5	31/31	0.5/0.5	0.5/0.5	1/1	0.5/0.5	0.5/0.5	2/2	2/2
<i>Enterococcus</i> sp. J 1436508	16	3.9	2	0.5	125	1	1	2	2	1	3.9	3.9
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	250/250	3.9/3.9	3.9/3.9	63/63	2/2	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	1/1	0.5/0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 1175008	250	3.9	7.8	63	16	1	1	2	2	0.5	1	3.9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 1436808 (ESBL)	500/500	63/63	63/63	63/63	63/63	7.8/7.8	0.5/0.5	1/1	2/2	0.5/1	2/2	2/2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961 <sup>b</sup>	500	63	63	63	125	63	3.9	3.9	2	1	7.8	3.9
	63/63	250/250	>500/	>500/	63/63	7.8/7.8	2/2	3.9/3.9	31/31	0.5/2	7.8/7.8	7.8/7.8
	63	250	>500	>500	125	31	3.9	3.9	31	2	7.8	7.8
	63/63	63/63	>500/	>500/	63/63	16/16	3.9/	3.9/3.9	63/63	0.5/	7.8/	7.8/
	500/	63/63	>500/	>500/	250/250	63/63	31/31	7.8/7.8	63/63	1/1	7.8/	7.8/
	500	63	>500	>500	500	125	31	31	250	1	7.8	7.8
	500	63	>500	>500	500	125	31	31	250	1	7.8	7.8
	250/	63/63	>500/	>500/	>500/	250/	63/63	125/	125/	3.9/	16/31	1631
	250	63	>500	>500	>500	250	250	125	125	3.9	63	125
	>500	63	>500	>500	>500	250	63	125	250	7.8	63	125

<sup>a</sup>  $B_{12}$ ,  $B_{14}$ ,  $B_{16}$  mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation<sup>24</sup> and antimicrobial efficacy<sup>19</sup> of  $B_{12}$ – $B_{16}$  has been published elsewhere.

<sup>b</sup> The antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 were determined after 72 h and 120 h of incubation.

Table 3  
Minimum inhibitory/fungicidal concentrations of the compounds (7–16) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>–B<sub>16</sub>)

Microorganisms	MIC (μmol/L); 24 h/48 h incubation MFC (μmol/L); 48 h incubation											
	7	8	9	10	12	13	14	15	16	B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	B <sub>14</sub> <sup>a</sup>	B <sub>16</sub> <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	250/250	63/63	63/63	16/16	16/16	0.5/0.5	0.5/0.5	2/2	2/2	0.5/0.5	7.8/7.8	3.9/7.8
<i>Candida tropicalis</i> 156	125/125	31/31	7.8/7.8	7.8/7.8	3.9/3.8	0.5/0.5	0.5/0.5	2/2	2/2	0.5/0.5	3.9/3.9	3.9/7.8
<i>Candida krusei</i> E28	31/31	7.8/7.8	3.9/3.9	7.8/7.8	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	2/2	2/2	0.5/0.5	3.9/3.9	2/2
<i>Candida glabrata</i> 20/I	16/16	3.9/3.9	3.9/3.9	3.9/3.9	7.8/7.8	0.5/0.5	0.5/0.5	2/2	1/1	0.5/0.5	7.8/7.8	2/3.9
<i>Trichosporon asahii</i> 1188	250/250	31/31	7.8/7.8	63/63	250/250	63/63	3.9/3.9	3.9/3.9	2/2	0.5/2	31/31	7.8/7.8
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	>500/>500	31/31	31/31	>500/>500	500/500	125/125	7.8/7.8	3.9/3.9	63/63	1/3.9	7.8/16	7.8/7.8
<i>Absidia corymbifera</i> 272	>500/>500	125/125	63/63	>500/>500	>500/>500	250/250	31/31	16/16	7.8/7.8	7.8/7.8	31/31	7.8/7.8
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445 <sup>b</sup>	31/31	31/31	16/16	16/16	63/63	7.8/7.8	3.9/3.9	2/2	2/2	1/1	16/16	7.8/7.8
	125	63	31	125	125	16	16	7.8	31	2	16	63

<sup>a</sup> B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The preparation<sup>24</sup> and antimicrobial efficacy<sup>19</sup> of B<sub>12–16</sub> has been published elsewhere.

<sup>b</sup> The antifungal activities against *Trichophyton mentagrophytes* 445 were determined after 72 h and 120 h of incubation.

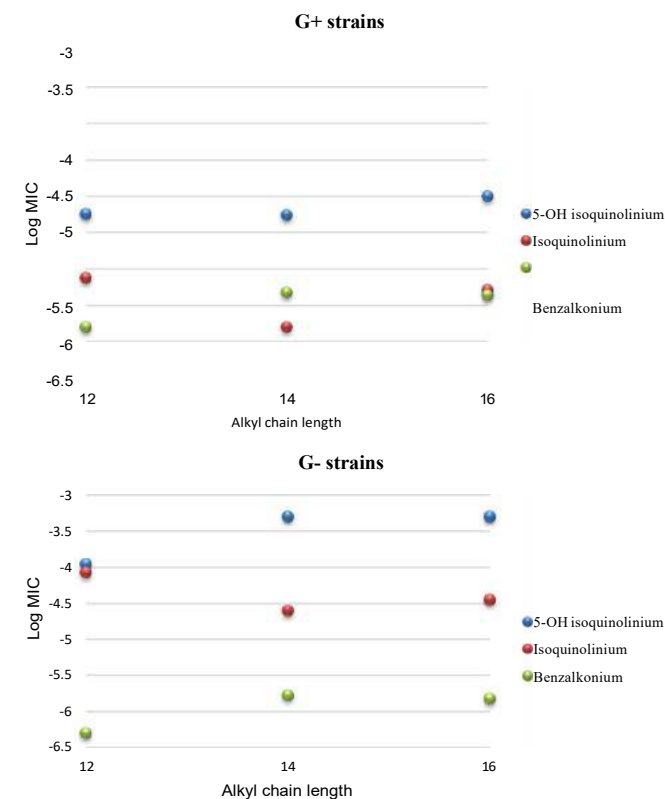


Figure 3. Antibacterial potency of 5-hydroxyisoquinolinium, isoquinolinium and benzalkonium quaternary salts with different alkyl chains against G+ and G– strains.

properties which were calculated in Gaussian 09 (Revision D.01) using a DFT B3LYP/6-311++G(d,p) method, with implicit simulation of an aqueous environment by the Self Consistent Reaction Field (SCRF) model at 323.15 K.<sup>29</sup> For 7–11 and 12–16, we per-

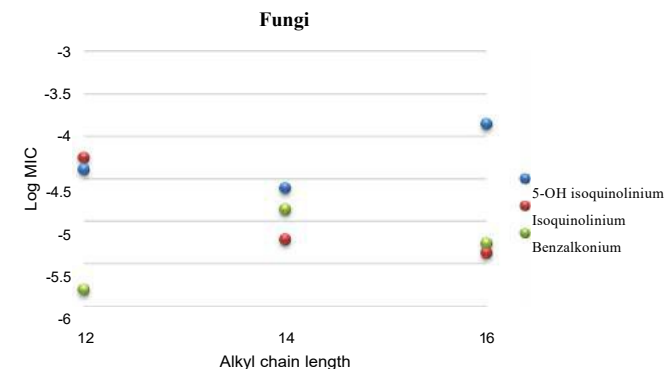
formed geometrical optimization both in vacuum and in water, employing this advanced quantum chemistry calculation method. As expected, the calculated energy of desolvation ( $DG_{\text{desolv}} = G_{\text{vacuum}} - G_{\text{water}}$ ) –for *N*-alkylisoquinolinium salts and *N*-alkyl-5-hydroxyisoquinolinium salts differ roughly by 6 kcal/mol, confirming the hypothesis that the 5-hydroxyisoquinolinium head group is harder to desolvate (Table 4).

Table 4

Desolvation energies of 7–16 calculated by DFT B3LYP/6-311++G(d,p) method with implicit simulation of aqueous environment by Self Consistent Reaction Field (SCRF) model at 323.15 K

Compound	Total energy in vacuum (Hartree)	Total energy in water (Hartree)	Desolvation energy (Hartree)	Desolvation energy (kcal/mol)	ESP charge on the nitrogen atom <sup>a</sup>
7	–870.9	–871.0	0.0830	52.06	0.391
8	–949.6	–949.6	0.0824	51.68	0.351
9	–1028.2	–1028.3	0.0819	51.36	0.351
10	–1106.9	–1107.0	0.0812	50.94	0.356
11	–1185.5	–1185.6	0.0806	50.54	0.366
12	–795.7	–795.7	0.0737	46.22	0.308
13	–874.3	–874.4	0.0732	45.89	0.305
14	–953.0	–953.0	0.0725	45.46	0.292
15	–1031.6	–1031.7	0.0720	45.13	0.293
16	–1110.3	–1110.3	0.0711	44.59	0.327

<sup>a</sup> The electrostatic potential charges (ESP) were extracted from the outputs of the quantum chemistry calculations in water.



The mechanism of QAS action has been proposed in the literature as a combination of (i) the destabilizing effect of the com-

Figure 4. Antifungal potency of 5-hydroxyisoquinolinium, isoquinolinium and benzalkonium quaternary salts with different alkyl chain.

pounds on the interaction between negatively charged teichoic acids and lipopolysaccharides on the bacterial surface and surrounding  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions; and (ii) incorporation of the hydrophobic chain of QAS into the cell wall or membrane. It has been believed that the greater the positive charge on the head

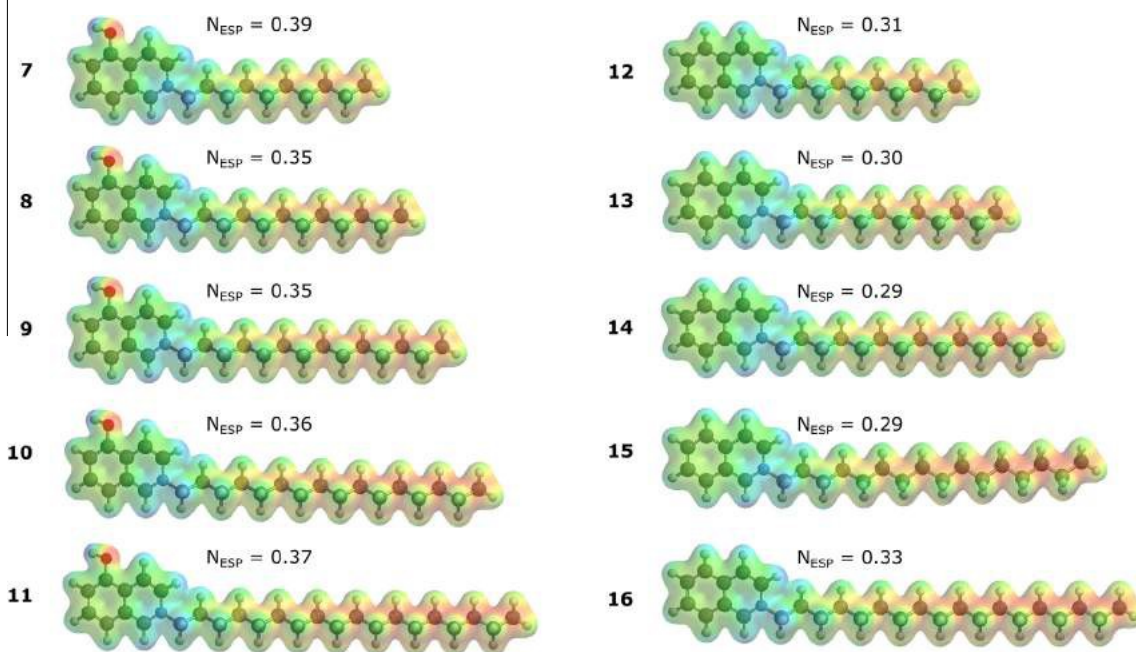


Figure 5. Computational chemistry models of *N*-alkyl derivatives of 5-hydroxyisoquinolinium (7–11) and isoquinolinium (12–16) salts. The models display electrostatic potential (ESP) mapped on the isosurface of electron density with  $q = 0.03e/\text{bohr}^3$ . Red regions denote lower ESP, whilst blue regions convey higher ESP.  $N_{\text{ESP}}$  means electrostatic potential charge on the nitrogen atom.

group of QAS, the stronger was the elicited biological effect. As a result, the membrane with embedded QAS molecules exhibits different dynamic behavior due to strong electric interactions with the negatively-charged head groups of phospholipids. According to observations obtained by electron microscopy, such chemically changed cell wall gradually segregates from the cell membrane, followed by cell leakage and discharge of the cell content into the surrounding medium.<sup>13</sup> In general, QAS exhibit a parabolic quantitative SAR (QSAR) having an optimal biological activity for G<sup>+</sup> bacteria at chain lengths of  $n = 12$ – $14$ , whilst the best activity for G<sup>-</sup> bacteria is somewhat shifted to compounds with chain length of  $n = 14$ – $16$ . Since the impact of QAS is not only bactericidal but also bacteriostatic, it has been proposed that numerous interactions with specific targets could interplay in the final multiple mode of action. Although the concept of an intracellular target remains elusive, it has been suggested for example that QAS very likely influence membrane proteins such as ATPase.<sup>13</sup>

In order to investigate the effect of the 5-hydroxy group on the biological activity of *N*-alkylisoquinolines from the point of view of their interaction with the membrane, we extracted also the Mulliken, Hirschfeld, and electrostatic charges on the nitrogen atom from the results of the abovementioned quantum chemistry calculations in the aqueous phase (Table S1, Supporting information). Due to theoretical differences or even arbitrariness in the derivation of the partial atomic charges, we decided to use the electrostatic potential charges (ESP) utilizing the Merz–Singh–Kollman scheme for correlating charges with the electrostatic potential as a reference (Fig. 5).

The ESP charges on the nitrogen atom in *N*-alkyl-5-hydroxyisoquinolinium salts are approximately greater by 0.06 than in *N*-alkylisoquinolinium salts, which corresponds well with mechanistic theory about the charge distribution in conjugated heteroaromatic systems (Fig. 6).

However, it can be clearly recognized from comparison of the biological activities that the increased positive charge on the nitrogen atom in 5-hydroxyisoquinolinium salts has an undoubtedly aggravating effect. Thus, it becomes necessary to question whether the hypothesis regarding the role of the positive charge on the

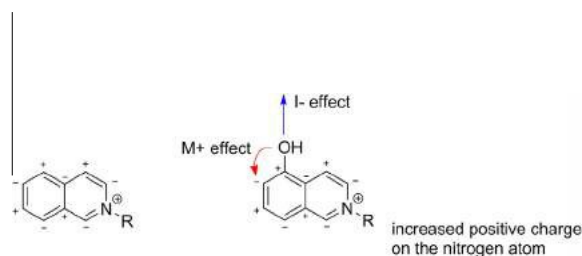


Figure 6. Mechanistic illustration of the overall electronic effect of the 5-hydroxy group on the isoquinoline scaffold. Due to simultaneous induction and mesomeric electron shifts the electronic charge on the nitrogen atom in isoquinoline becomes more positive after introduction of the 5-hydroxy group.

bioactivity of QAS is a favorable line of thinking when it comes to rational design of novel detergent-like antibacterials. The results obtained in the present work show that decreased lipophilicity and increased desolvation energy of 5-hydroxyisoquinolinium salts cannot be counterbalanced by increased positive charge on the nitrogen atom in order to design more efficient antibacterials.

Besides the electronic effects and lipophilicity of QAS, a crucial property which can shed new light on QSAR of these compounds is their molecular size and shape. Currently, our research group is conducting a molecular dynamics study with a model of the bacterial cell membrane that can help understand why the mathematical dependence of the antimicrobial activity on the length of the side alkyl chain assumes a parabolic character (unpublished data).

#### 2.2.4. Cell viability assessment

Cell viability assay confirmed an expected trend that an increasing length of carbon chain results in higher cytotoxicity, probably due to higher lipophilicity of the drug, which facilitates penetration into the cell (Table 5). Comparing the cytotoxic potential of isoquinolinium and 5-OH isoquinolinium analogues, a clear dependency can be observed on the achieved lipophilicity, that is, the more lipophilic isoquinolinium derivatives show higher cytotoxicity (Fig. 2). Moreover, we can build statistically significant QSAR models of cytotoxicity using  $\log k$  or  $C \log P$  as key molecular descriptors (Supporting information).

Table 5  
Cytotoxic potential of the studied compounds (7–16) and selected derivatives of *N*-benzalkonium (B<sub>12</sub>–B<sub>16</sub>). The in vitro activities are expressed as IC<sub>50</sub> (μmol/L) ± SEM (*n* = 3)

Cell line	IC <sub>50</sub> (μmol/L); 24 h incubation ± SEM												
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	B <sub>12</sub> <sup>a</sup>	B <sub>14</sub> <sup>a</sup>	B <sub>16</sub> <sup>a</sup>
CHO-K1	92 ± 10	36 ± 4	24 ± 2	16 ± 1	7 ± 3	41 ± 16	15 ± 1	9 ± 1	7 ± 1	6 ± 0.4	29 ± 3	24 ± 4	15 ± 1

<sup>a</sup> B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>16</sub> mean *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium bromide, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium bromide, respectively. The cytotoxic potential<sup>19</sup> of B<sub>12–16</sub> has been published elsewhere.

### 3. Conclusion

In the present study we investigate the effect of a hydroxyl moiety on the antimicrobial efficacy of isoquinolinium salts. Even though hydroxylated compounds 9 and 10 (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>) showed excellent potency against *Staphylococcus aureus*, no effect against *G* – bacteria was observed in this series. On the contrary, non-hydroxylated isoquinolinium salts showed excellent antimicrobial efficacy against *G*+ and good efficacy against *G*– within the whole series, particularly 14 (C<sub>14</sub>) against *G*+ strains and 15 (C<sub>16</sub>) against fungi. Further investigation of the electronic properties and desolvation energies revealed that despite the positive mesomeric effect of the hydroxyl moiety reducing the electron density of the quaternary nitrogen, it is probably the higher lipophilicity and lower desolvation energy of the non-hydroxylated isoquinolinium salts which are responsible for their enhanced antimicrobial versatility and efficacy.

### 4. Experimental section

The reagents were purchased as at least reagent grade from Sigma–Aldrich (Czech Republic) unless otherwise specified, and used without further purification. The solvents for synthesis were purchased from Penta chemicals Co. Acetonitrile, water and formic acid for LC–MS analyses were obtained from Sigma–Aldrich in LC–MS grade purity (Czech Republic). Thin layer chromatography was run on Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> analytical plates (mobile phase: dichloromethane/methanol/25% ammonia solution 100/10/2); detection was carried out with ultraviolet light (254 nm). Purity of all products was tested by determination of their uncorrected melting points (Melting Point Apparatus—Stuart SMP30). The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of new compounds were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at ambient temperature on a Varian S500 spectrometer (499.87 MHz for <sup>1</sup>H and 125.71 MHz for <sup>13</sup>C) or on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer (300.07 MHz for <sup>1</sup>H and 75.46 MHz for <sup>13</sup>C). For <sup>1</sup>H *d* are given in parts per million (ppm) relative to CD<sub>3</sub>OD (*d* = 3.31) and for <sup>13</sup>C relative to CD<sub>3</sub>OD (*d* = 49.05). The coupling constants (*J*) are expressed in Hertz. HRMS were determined by Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap spectrometer and interpreted in Xcalibur program.

#### 4.1. General procedure for synthesis of 5-hydroxyisoquinolinium salts 7–11

1-bromoalkane (2–6) (28.93 mmol) was added at room temperature to 5-hydroxyisoquinoline (1) (20.67 mmol) in acetonitrile (30 mL), and the resulting mixture was stirred under reflux for 48 h. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product purified by crystallization from acetone, filtered, washed with acetone and allowed to dry at room temperature.

##### 4.1.1. 2-Decyl-5-hydroxyisoquinolinium bromide (7)

Compound 7 was isolated as yellow crystals; Yield 53%; mp: 158.2–160.2 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21–1.35 (m, 10H, 5 × CH<sub>2</sub>), 1.37–1.47 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.09–2.15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.76–4.79 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.50

(d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 8.59–8.63 (m, 2H, 2 × ArH), 9.91 (s, 1H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 14.46, 23.71, 27.28, 30.14, 30.38, 30.50, 30.57, 32.42, 33.03, 62.81, 119.38, 121.63, 122.69, 130.00, 130.27, 133.80, 134.42, 150.31, 154.74 ppm. HRMS (HESI<sup>+</sup>): [M<sup>+</sup>]: calculated for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>NO<sup>+</sup> (*m/z*): 286.2165; found: 286.2164.

##### 4.1.2. 2-Dodecyl-5-hydroxyisoquinolinium bromide (8)

Compound 8 was isolated as yellow crystals; Yield 64%; mp: 172.1–174.1 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24–1.34 (m, 14H, 7 × CH<sub>2</sub>), 1.37–1.47 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.09–2.15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.75–4.78 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.87 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 8.60–8.62 (m, 2H, 2 × ArH), 9.89 (s, 1H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 14.47, 23.74, 27.30, 30.15, 30.46, 30.50, 30.62, 30.72, 30.74, 32.42, 33.07, 62.83, 119.38, 121.61, 122.72, 130.03, 130.30, 133.83, 134.40, 150.32, 154.80 ppm. HRMS (HESI<sup>+</sup>): [M<sup>+</sup>]: calculated for C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>NO<sup>+</sup> (*m/z*): 314.2478; found: 314.2474.

##### 4.1.3. 5-Hydroxy-2-tetradecylisoquinolinium bromide (9)

Compound 9 was isolated as brown crystals; Yield 59%; mp: 166.2–168.2 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24–1.32 (m, 18H, 9 × CH<sub>2</sub>), 1.39–1.47 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.07–2.17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.75–4.80 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.50 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.84–7.94 (m, 2H, 2 × ArH), 8.59–8.64 (m, 2H, 2 × ArH), 9.91 (s, 1H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 14.51, 23.77, 27.30, 30.17, 30.50, 30.64, 30.73, 30.79, 32.45, 33.10, 62.81, 119.35, 121.61, 122.70, 130.00, 130.28, 133.81, 134.42, 150.33, 154.78 ppm. HRMS (HESI<sup>+</sup>): [M<sup>+</sup>]: calculated for C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>NO<sup>+</sup> (*m/z*): 342.2791; found: 342.2790.

##### 4.1.4. 2-Hexadecyl-5-hydroxyisoquinolinium bromide (10)

Compound 10 was isolated as brown crystals; Yield 52%; mp: 167.1–168.5 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 0.89 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.21–1.33 (m, 22H, 11 × CH<sub>2</sub>), 1.39–1.46 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.07–2.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.74–4.79 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.50 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.84–7.94 (m, 2H, 2 × ArH), 8.59–8.63 (m, 2H, 2 × ArH), 9.89 (s, 1H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 14.50, 23.77, 27.30, 30.17, 30.51, 30.64, 30.73, 30.79, 32.43, 33.11, 62.81, 119.39, 121.51, 122.74, 130.07, 130.32, 133.84, 134.37, 150.33, 154.96 ppm. HRMS (HESI<sup>+</sup>): [M<sup>+</sup>]: calculated for C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>NO<sup>+</sup> (*m/z*): 370.3104; found: 370.3102.

##### 4.1.5. 5-Hydroxy-2-octadecylisoquinolinium bromide (11)

Compound 11 was isolated as brown crystals; Yield 64%; mp: 164.0–166.0 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 0.89 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.25–1.35 (m, 26H, 13 × CH<sub>2</sub>), 1.39–1.45 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.06–2.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.72–4.77 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 7.50 (dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.85–7.92 (m, 2H, 2 × ArH), 8.57–8.64 (m, 2H, 2 × ArH), 9.85 (s, 1H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) *d*: 14.50, 23.79, 27.32, 30.17, 30.52, 30.65, 30.74, 30.82, 32.41, 33.12, 62.83, 119.42, 121.44, 122.79, 130.13, 130.37, 133.89, 134.32, 150.35, 155.08 ppm. HRMS (HESI<sup>+</sup>): [M<sup>+</sup>]: calculated for C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>NO<sup>+</sup> (*m/z*): 398.3417; found: 398.3414.

## 4.2. Evaluation of antibacterial activity

The antibacterial activities of the prepared compounds were determined by the microdilution broth method according to the protocol published previously.<sup>30,31</sup> Part of the panel of bacterial strains used for the activity testing was obtained from Czech Collection of Microorganisms (CCM, Brno, Czech Republic) and American Type Culture Collection (ATCC). The remaining bacteria used in the study (i.e., *Staphylococcus aureus* H 5996/08, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus* sp. J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08) were clinical isolates (Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic). Prior to biological testing, the strains suspended in 0.85% saline were cultivated on Mueller–Hinton agar (Difco, Benton Dickinson, Detroit, MI) at 35°C. The bacterial populations were controlled densitometrically to reach  $1.5 \times 10^8$  viable colony forming units (CFU) per 1 mL.

The compounds were dissolved in DMSO and added into wells of a testing plate with Mueller–Hinton liquid broth (Difco, Benton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. A geometrical series of the compounds' concentrations was examined to quantify the biological activities: 0.49, 0.98, 2, 3.90, 7.8, 16, 31, 630, 125, 250 and 500  $\mu\text{mol/L}$ . The MICs, defined as 95% inhibition of bacterial growth, were determined visually after 24 h and 48 h. Growth of PA was determined after 72 h and 120 h. Similarly, the MBCs were determined as the concentration of compound causing a decrease in the number of bacterial colonies by >99.9%.

## 4.3. Evaluation of antifungal activity

For assay of the antifungal activity of the studied compounds, eight clinical samples of fungi or yeast were utilized: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida krusei* E28, *Candida tropicalis* 156, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic). The previously published protocol was used.<sup>30</sup> The MICs and MFCs were determined by a modified standard M27-A2 (CSLI) using RPMI 1640 medium, buffered to pH 7.0 with 0.165 M 2-morpholino-propane-sulfonic acid, and two-fold serial dilutions (500–0.49  $\mu\text{mol/L}$ ) of the prepared compounds. DMSO was used as a solvent for the tested compounds and its final concentration in inoculated samples did not exceed 2% (v/v). After 24 h and 48 h (72 h and 120 h for TM) of incubation at 35°C, the growth of microbial colonies was visually as well as spectrophotometrically examined.

## 4.4. Cell viability assessment

Standard MTT assay (Sigma Aldrich) was used according to the manufacturer's protocol on the CHO-K1 (Chinese hamster ovary, ECACC, Salisbury, UK) in order to compare the cytotoxic effect of the studied compounds. The cells were cultured according to ECACC recommended conditions and seeded at a density of 8000 per well. Briefly, the tested compounds were dissolved in DMSO and subsequently in the growth medium (F-12) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin so that the final concentration of DMSO did not exceed 0.5% (v/v). Cells were exposed to the tested compounds for 24 h. Then the medium was replaced by medium containing 10  $\mu\text{M}$  of MTT, and the cells were allowed to produce formazan for approximately another 3 h under surveillance. Thereafter, the medium with MTT was removed and the crystals of formazan were dissolved in DMSO (100  $\mu\text{L}$ ). Cell viability was assessed spectrophotometrically by the amount of formazan produced. Absorbance was measured at 570 nm with 650 nm ref-

erence wavelength on Synergy HT (BioTek, USA). IC<sub>50</sub> was then calculated from the control-subtracted triplicates using non-linear regression (four parameters) of GraphPad Prism 5 software. Final IC<sub>50</sub> and SEM value was obtained as a mean of three independent measurements.

## 4.5. Molecular modeling

Molecular models of 7–16 were prepared in the GaussView 3 program and submitted to advanced quantum-chemistry calculations in Gaussian 09 employing a DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) method. Geometrical optimization was performed in vacuum as well as in water environment using an implicit solvent model (SCRF,  $T = 323.15$  K). The calculations were performed in parallel in a powerful computer cluster of the Czech National Grid Infrastructure MetaCentrum. From the outputs, Mulliken, Hirschfeld, and electrostatic charges on the nitrogen atom were extracted. Desolvation energies were calculated as the difference between the total energy of the compounds in vacuum and in water.

## Acknowledgments

The work was supported by the project NV15-31847A, Long Term Development plan—1011 by MH CZ—DRO (University Hospital Hradec Kralove, No. 00179906), framework of the project Opportunity for young researchers, reg. no. CZ.1.07/2.3.00/30.0016, Grant IRP201554: Preparation and testing of disinfection agents against nosocomial infections, supported by Operational Programme Education for Competitiveness and co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic and by the project Excellence 2015 (University of Hradec Kralove, Faculty of Informatics and Management).

We wish to thank to Assoc. Prof. Jiri Kunes (Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Hradec Kralove) for measurement of NMR spectra. Access to computing and storage facilities owned by parties and projects contributing to the National Grid Infrastructure MetaCentrum, provided under the programme 'Projects of Large Infrastructure for Research, Development, and Innovations' (LM2010005), is greatly appreciated.

The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

## Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.006>.

## References and notes

- Kuča, K.; Bielavská, M.; Cabal, J.; Dohnal, V. *Anal. Lett.* 2005, 38, 673.
- Wang, H.-Y.; Zhang, J.-X.; Cao, D.-D.; Zhao, G. *ACS Catal.* 2013, 3, 2218.
- Yadav, G. D.; Kadam, A. A. *Org. Process Res. Dev.* 2012, 16, 755.
- Yao, H.; Lian, M.; Li, Z.; Wang, Y.; Meng, Q. *J. Org. Chem.* 2012, 77, 9601.
- Murakami, Y.; Takeda, Y.; Minakata, S. *J. Org. Chem.* 2011, 76, 6277.
- Kobbelgaard, S.; Bella, M.; Jørgensen, K. A. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 4980.
- Ooi, T.; Uematsu, Y.; Maruoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2548.
- Akbaş, H.; Kartal, Ç. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2006, 65, 95.
- Faraj, J. A.; Dorati, R.; Schoubben, A.; Worthen, D.; Selmin, F.; Capan, Y.; Leung, K.; DeLuca, P. P. *Aaps. PharmSciTech.* 2007, 8, E177.
- Tanzer, J. M.; Slee, A. M.; Kamay, B.; Scheer, E. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 408.
- Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 6093.
- Grinevich, V. P.; Crooks, P. A.; Sumithran, S. P.; Haubner, A. J.; Ayers, J. T.; Dwoskin, L. P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003, 306, 1011.
- Tischer, M.; Pradel, G.; Ohlsen, K.; Holzgrabe, U. *ChemMedChem* 2012, 7, 22.
- WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12, 2010.
- Gilbert, P.; Moore, L. J. *App. Microb.* 2005, 99, 703.
- Daoud, N. N.; Dickinson, N. A.; Gilbert, P. *Microbios* 1983, 37, 73.
- McDonnell, G. E. *In Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action and Resistance*; ASM press: Washington, DC, 2007.

18. Russell, A.; Gould, G. *J. Appl. Bacter.* 1988, 65, 167S.
19. Malinak, D.; Dolezal, R.; Marek, J.; Salajkova, S.; Soukup, O.; Vejsova, M.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Penhaker, M.; Musilek, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 5238.
20. Busetti, A.; Crawford, D. E.; Earle, M. J.; Gilea, M. A.; Gilmore, B. F.; Gorman, S. P.; Lavery, G.; Lowry, A. F.; McLaughlin, M.; Seddon, K. R. *Green Chem.* 2010, 12, 420.
21. Marek, J.; Stodulka, P.; Soukup, O.; Musilek, K.; Cabal, J.; Kuca, K. *Military Med. Sci. Lett.* 2012, 81, 76.
22. Pernak, J.; Branicka, M. *J. Surf. Detergents* 2003, 6, 119.
23. Hansch, C.; Muir, R. M.; Fujita, T.; Maloney, P. P.; Geiger, F.; Streich, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2817.
24. Hansch, C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 1616.
25. Dolezal, R.; Van Damme, S.; Bultinck, P.; Waisser, K. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 869.
26. Waisser, K.; Dolezal, R.; Palat, K.; Cizmarik, J.; Kaustova, J. *Folia Microb.* 2006, 51, 21.
27. Frisch, M. J. et al *Gaussian 09, Revision D.01*; Gaussian: Wallingford, CT, 2013.
28. Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 1989, 29, 163.
29. Kuca, K.; Marek, J.; Stodulka, P.; Musilek, K.; Hanusova, P.; Hrabanova, M.; Jun, D. *Molecules* 2007, 12, 2341.
30. Marek, J.; Stodulka, P.; Cabal, J.; Soukup, O.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. *Molecules* 2010, 15, 1967.
31. Marek, J.; Malinak, D.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Pasdiorova, M.; Dolezal, M.; Kuca, K. *Molecules* 2015, 20, 3681.





Contents lists available at ScienceDirect

## European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Short communication

Towards understanding the mechanism of action of antibacterial *N*-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies

Rafael Dolezal <sup>a, b</sup>, Ondrej Soukup <sup>a, c</sup>, David Malinak <sup>a, d</sup>, Ranylson M.L. Savedra <sup>g</sup>, Jan Marek <sup>a, e</sup>, Marie Dolezalova <sup>h</sup>, Marketa Pasdiorova <sup>a, e</sup>, Sarka Salajkova <sup>a, c</sup>, Jan Korabecny <sup>a, c</sup>, Jan Honegr <sup>a, f</sup>, Teodorico C. Ramalho <sup>b, g</sup>, Kamil Kuca <sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>b</sup> Center for Basic and Applied Research, Faculty of Informatics and Management, University of Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 500 03, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Physiology and Pathophysiology, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, 703 00, Ostrava, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>f</sup> Department of Cybernetics and Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, VSB-Technical University of Ostrava, 17. Listopadu 15, 708 33, Ostrava-Poruba, Czech Republic

<sup>g</sup> Laboratory of Molecular Modeling, Chemistry Department, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

<sup>h</sup> Institute of Applied Informatics, Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 1760, 370 05, Ceske Budejovice, Czech Republic

## a r t i c l e i n f o

## Article history:

Received 22 March 2016

Received in revised form

10 May 2016

Accepted 26 May 2016

Available online 30 May 2016

## Keywords:

Quaternary ammonium salts

Antimicrobials

Surfactants

Molecular modeling

Molecular dynamics

QSAR

## a b s t r a c t

In this study, we have carried out a combined experimental and computational investigation to elucidate several bred-in-the-bone ideas standing out in rational design of novel cationic surfactants as antibacterial agents. Five 3-hydroxypyridinium salts differing in the length of *N*-alkyl side chain have been synthesized, analyzed by high performance liquid chromatography, tested for *in vitro* activity against a panel of pathogenic bacterial and fungal strains, computationally modeled in water by a SCRFP B3LYP/6-311ppG(d,p) method, and evaluated by a systematic QSAR analysis. Given the results of this work, the hypothesis suggesting that higher positive charge of the quaternary nitrogen should increase antimicrobial efficacy can be rejected since 3-hydroxyl group does increase the positive charge on the nitrogen but, simultaneously, it significantly derogates the antimicrobial activity by lowering the lipophilicity and by escalating the desolvation energy of the compounds in comparison with non-hydroxylated analogues. Herein, the majority of the prepared 3-hydroxylated substances showed notably lower potency than the parent pyridinium structures, although compound **8** with C<sub>12</sub> alkyl chain proved a distinctly better antimicrobial activity in submicromolar range. Focusing on this anomaly, we have made an effort to reveal the reason of the observed activity through a molecular dynamics simulation of the interaction between the bacterial membrane and compound **8** in GROMACS software.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Disinfectants and antiseptics are extensively exploited in health care settings for a variety of topical and hard-surface applications. Presently, they constitute an essential part of infection control

practice, which aids particularly in the prevention of devastating nosocomial infections occurring within hospital facilities [1]. As a rule, such products are deliberately composed of wide range of potent chemical agents to tackle extremely vital pathogen strains, often endowed with resistance against common antiseptics. Thanks to many beneficial traits like easy preparation, biodegradability, low price, high efficiency, many of these primitive pharmaceuticals (e.g. alcohols, phenols, iodine, chlorine) have been used for antiseptics, disinfection, and preservation for hundreds of years [2,3].

\* Corresponding author. Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05, Hradec Kralove, Czech Republic.

E-mail address: [kamil.kuca@fnhk.cz](mailto:kamil.kuca@fnhk.cz) (K. Kuca).

Similar principles stand behind the application of the biocide cocktails formulated of cationic surfactants. A great class of this type of ionic detergents is represented by the family of quaternary ammonium salts (QAS), which are typically built of a hydrophilic quaternary nitrogen moiety and a long hydrophobic alkyl chain. These compounds exert potent antimicrobial properties and remain the mainstay of classical chemical disinfection and anti-sepsis [4,5]. They are also used as components in cosmetic formulations, as germicides or softeners [6], bio-based ionic liquids [7], catalysts in asymmetric catalysis [8e12], competitive inhibitors of acetylcholinesterase [13] and nicotinic receptors [14], and many others [15e19]. QAS have also been combined with anionic surfactants and metal ions (e.g. Zn<sup>2b</sup>, Cu<sup>2b</sup>) into mixed agents exhibiting relatively increased *in vitro* antimicrobial potency [20]. Nonetheless, the most common components of disinfection means are *N*-alkylpyridinium and *N*-benzalkonium salts with various alkyl length, showing potent effect on a wide spectrum of microorganism coupled with low skin irritability and systemic toxicity [6,21].

Besides being applied as disinfecting agents, QAS have also been reported as efficient bacteriostatics and tuberculostatics exerting the activity at very low concentrations [22,23]. Increasing the concentration of QAS generally develops to bactericidal and algicidal impact [24]. Further, QAS have proved a significant capacity against viruses, mainly the enveloped ones, but anti-non-enveloped strains efficacy has been described as well [24]. Comparing the antimicrobial spectrum of QAS, Gram positive (G<sup>+</sup>) bacteria are mostly more sensitive towards the effect of these substances than Gram negative (G<sup>-</sup>) ones. Since the primary difference between G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> consists in the framework of the bacterial cell wall, the increased resistance of G<sup>-</sup> is probably a consequence of the presence of the outer membrane layer which grants the cells stronger physicochemical protection (Fig. 1) [25].

Generally, the optimum antibacterial activity against G<sup>+</sup> bacteria is observed for QAS with C<sub>12-14</sub>, whilst against G<sup>-</sup> bacteria the best activity is exhibited by QAS with C<sub>14-16</sub> in the side alkyl chain (Fig. S1). Since the 1960s, several studies have suggested different modes of action pertaining to cationic antibacterials like cetrimeronium bromide, benzalkonium chloride, and chlorhexidine (Fig. S2) [26,27]. Actually, hypotheses on the QAS mechanism of action ranges from simple damaging the cell surface, through modulation of the membrane stored elastic stress and changing the cell surface potential to affecting nucleic acids, putative enzymes or receptors (e.g. ATPase) [28e33].

However, the prevailing theory on the broad spectrum activity of QAS supposes a relatively unspecific mechanism of action. All

positively charged surfactants strongly interact with the negative net charge present in the cell walls and membranes causing their clustering, ruptures and leakages. Basically, the negatively charged outermost surface of bacterial membrane is stabilized by the presence of divalent cations such as Mg<sup>2b</sup> and Ca<sup>2b</sup> wherefore the positive charge of cationic detergents may attach to the polar surface by replacing Mg<sup>2b</sup>/Ca<sup>2b</sup> and embed the hydrophobic alkyl chain into the phospholipid bilayer (Fig. 2) [26]. Such perturbation leads primarily to the loss of the frontier cell elements' fluidity and causes the cell to die. Thus, the positive charge is considered as a critical factor in the cidal activity of QAS. Accordingly, structural variation leading to decreased electron density in the cationic part of QAS molecules are supposed to elicit a stronger interaction with polarizable regions in the cell wall, particularly in phospholipid membranes, and consequently to evoke a stronger bactericidal effect [34,35].

In the current article, we present the synthesis, chromatographic analysis, molecular modeling and dynamics, antimicrobial activity, and quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis for a series of 3-hydroxypyridinium salts with different lengths of alkyl side-chain (from C<sub>10</sub> to C<sub>18</sub>). We also provide an account on the safety of all the compounds by means of eukaryotic cell viability evaluation. The compounds have been investigated from the point of view of antibacterial and antifungal activity, and the obtained data were subsequently compared to the biological activities of standard C<sub>12</sub>eC<sub>16</sub> alkyl homologs of *N*-benzalkonium and *N*-alkylpyridinium compounds.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Rationale, design and synthesis of 3-hydroxypyridinium salts

In the recent research, a hypothesis has been considered that the antimicrobial activity of QAS against various pathogenic strains is proportional to the increase in the positive electric charge localized at the head groups of the molecules [36]. Thus, five QAS were designed and synthesized employing a standard laboratory protocol for *N*-alkylation of 3-hydroxypyridine which had been reported previously in the literature [37]. These structural alterations were proposed to invoke higher positive charge on the quaternary nitrogen atom while preserving the classical architectonic principle of QAS to pursue a broad spectrum of antibacterial activities. According to the ideas of classical organic chemistry, the 3-hydroxy function should affect the pyridinium skeleton to detract the electron density from the nitrogen atom. Since the mechanism of QAS is likely dependent on the charge in the head groups, the aim

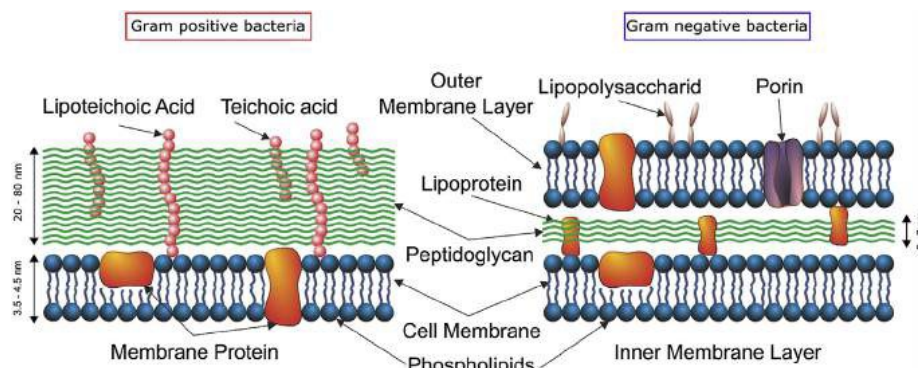


Fig. 1. Structures of Gram positive (G<sup>+</sup>) and Gram negative (G<sup>-</sup>) bacterial cell walls. In the case of G<sup>+</sup>, the peptidoglycan network forms a robust shield which provides the cells with increased mechanical strength protecting them from inner osmotic pressure, but it is freely permeable to particles with the diameter of up to approximately 2 nm. G<sup>-</sup> cells are equipped with a unique amphiphilic outer bilayer which is extraordinarily resistant to several antibiotics and detergents.

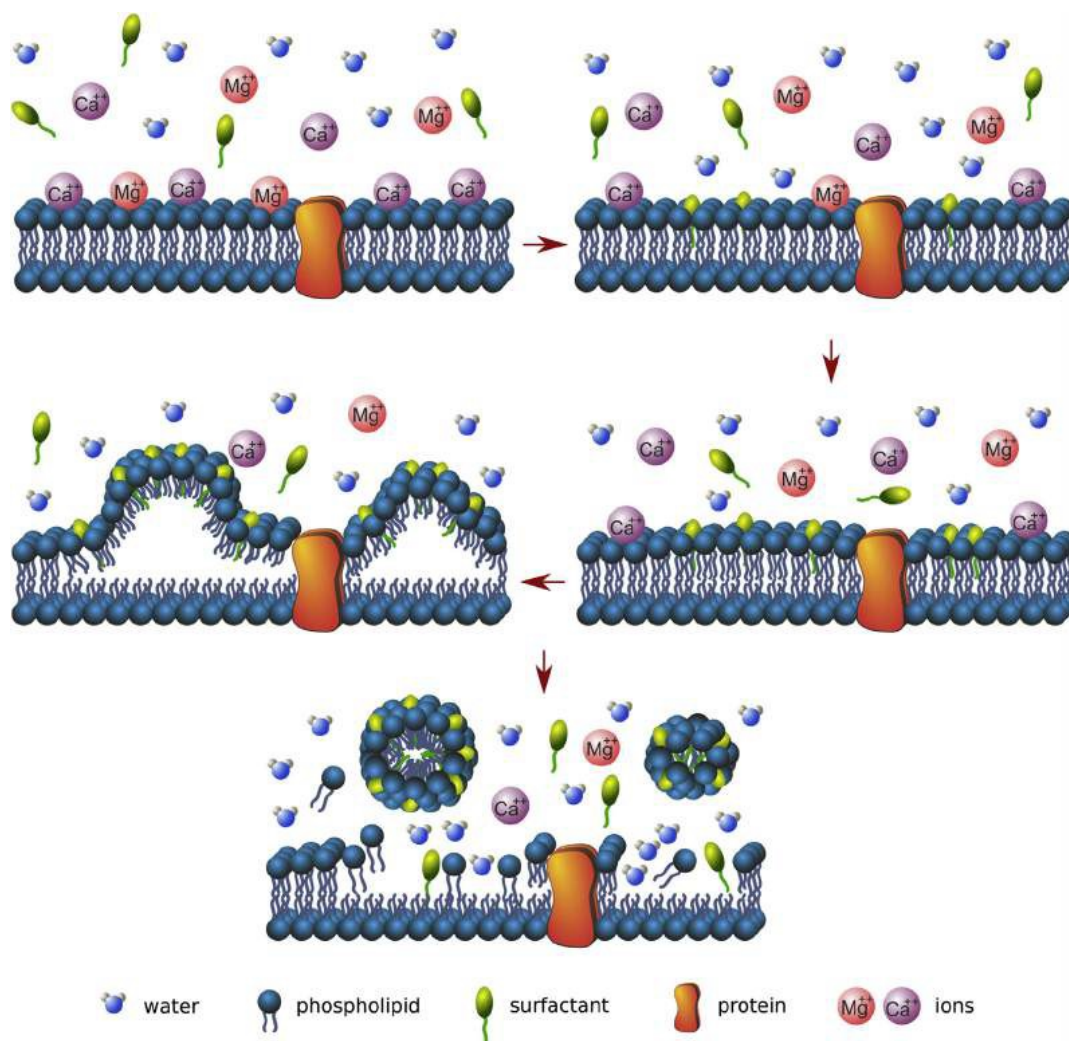


Fig. 2. Notional mechanism of disintegration of the bacterial membrane in the presence of QAS. Cationic surfactants penetrate into the membrane substituting the outer neutralizing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions and change the intermolecular dynamics of phospholipid molecules. As a result, the membrane loses fluidity and clusters into segments, which are pulled out of the phospholipid layer into aqueous environment. The remaining cell membrane parts are gradually decomposed in a similar manner by the effect of QAS and water molecules.

of this study is to authenticate the working hypothesis experimentally as well as computationally.

In the synthesis, which belongs to Mensutkin type reactions, the chemical conditions were optimized to support  $\text{S}_{\text{N}}2$  substitution of the bromine atom bound to the terminal  $\text{sp}^3$  carbon atom of homological series of bromoalkanes: 1-bromodecane, 1-bromododecane, 1-bromotetradecane, 1-bromohexadecane, and 1-bromooctadecane with the nitrogen atom in 3-hydroxypyridine as the nucleophile. In acetonitrile as a polar aprotic solvent, the synthesis provided the products in high yields (>90%). The reaction scheme and several physicochemical properties of the prepared

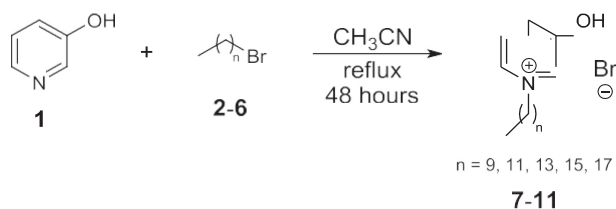


Fig. 3. Preparation of 3-hydroxypyridinium salts (7e11).

compounds 7e11 are given in Fig. 3 and Table S1, respectively.

## 2.2. Lipophilicity and chromatographic analysis

Lipophilicity is one of the most important molecular descriptors governing absorption, metabolism and elimination of drugs [38,39]. Due to its more or less constitutive character, it can be easily predicted by many free or commercial programs [40,41], although in several cases, the basic fragment-additive algorithms of  $\log P$  may be prone to serious predictive inaccuracy because of neglecting interaction terms [42,43]. Compounds with quaternary nitrogen may be such examples which demand for accurate  $\log P$  calculation a proper parameterization established using a sufficiently large training compound set [44]. In order to obtain a reliable measure of lipophilicity in this work, we performed a simple chromatographic study and compared the experimental results with calculated  $\log P$  ( $\text{Clog}P$ ) in MarvinSketch 14.9.8.0 program [45]. As an underlying physicochemical theory, we utilized the Collander equation which implicates a linear relationship between  $\log P$  in octanol-water system and capacity factors  $k$  obtained from column chromatography (Equation (1);  $a$ ,  $b$  empirical constants) [46,47].

$$\log P \approx \log k - \log t_0 \quad (1)$$

The lipophilicity of the compounds **7e11** was evaluated by a simple isocratic LC-MS method reported within our previous study on derivatives of 6-hydroxyquinolinium salts [48]. The LC-MS method utilized a reverse double end-capped C18 stationary phase and an isocratic elution program working in acidic polar organic mode (pH ~ 3.5). The resulted capacity factors  $k$  (Equation (2);  $t_1$  e retention time of the analyte,  $t_0$  e void time) were then correlated as  $\log k$  with  $\text{Clog } P$  calculated in MarvinSketch 14.9.8.0 program.

$$k \approx \frac{t_1 - t_0}{t_0} \quad (2)$$

Linear regression of  $\log k$  to  $\text{Clog } P$  confirmed high statistical correlation ( $R^2 0.9813$ ), although the compounds **7** and **8** exhibited somewhat larger deviation from the linear relationship. According to our experimental results, the compounds **7** and **8** showed a little higher affinity to the double end-capped C18 stationary phase in the chosen chromatographic system than suggested by the calculated  $\text{Clog } P$ . (Fig. S3).

### 2.3. Assessment of antibacterial activities

Antibacterial activity of the compounds **7e11** was assayed *in vitro* on both G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> bacterial strains within the present study. The antibacterial activities of non hydroxylated *N*-dodecyl-, *N*-tetradecyl- and *N*-hexadecyl-pyridinium salts (i.e. compounds **13**, **14**, and **15**; see Fig. S4) and *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-tetradecylammonium, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-hexadecylammonium salts (i.e. compounds **B12**, **B14**, **B16**) were taken from the literature [48e50]. As listed in Table S2, minimum inhibitory concentrations (MICs) after 24 h and 48 h of incubation, and the minimum bactericidal concentrations (MBCs) after 48 h of incubation were obtained. Subsequently, antimicrobial activity of C<sub>10</sub>eC<sub>18</sub> alkyl homologs of 3-hydroxypyridinium was compared to standard *N*-benzalkonium and *N*-pyridinium salts (Fig. 4). A generally accepted fact that QAS containing C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> are the most effective ones has been confirmed also in this study [26]. It was found that Gram-positive (G<sup>+</sup>) bacteria (first four strains from above in Table S2) are very sensitive to *N*-dodecyl-3-hydroxypyridinium derivative **8**, which showed the same efficacy against *Staphylococcus* sp. as the golden standard C<sub>12</sub>-benzalkonium **B12**.

The introduction of 3-hydroxyl moiety resulted in higher bioicidal effect against both G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> strains than reported efficacy for unsubstituted *N*-dodecylpyridinium salts [48] and pyridine-4-aldoxime based salts [51]. A partial explanation on the enhanced potency of **8** can tentatively be found in the positive mesomeric effect (M<sub>P</sub>) of the hydroxyl moiety, which in the position 3 of the conjugated system reduces the electron density of the nitrogen atom and thus favors the attack of bacterial membrane by the compound [26]. This is in agreement with similar studies investigating antibacterial activities of *N*-alkoxymethyl-3-(dimethylamino)pyridinium and *N*-alkoxymethyl-3-hydroxypyridinium salts which proved a stronger enhancing effect of 3-

dimethylamino group on the activity in comparison with that of 3-hydroxy group [52]. Since dimethylamino function exhibits a

more potent M<sub>P</sub> effect than hydroxy group, a 100-fold lower MIC observed for 3-(dimethylamino)-*N*-[dodecyloxy(methyl)]pyridinium salt compared with 3-hydroxy-*N*-[dodecyloxy(methyl)]pyridinium salt seems to be supported by the charge SAR hypothesis about the QAS antibacterial activity. However, the obvious parabolic QSAR between the number of carbon atoms in the alkyl side chain and the antibacterial activity has been explained neither for *N*-alkoxymethyl-3-(dimethylamino)pyridinium nor for *N*-alkoxymethyl-3-hydroxypyridinium salts in the mentioned work by Pernak and Branicka. Additionally, it has not been resolved whether the enhancement of the antibacterial activity of *N*-alkoxymethyl-3-(dimethylamino)pyridinium salts was caused rather by increasing the compounds' lipophilicity or by polar electronic substituent effects on the nitrogen charge. In our study, only compound **8** showed a remarkably strong potency compared with both benzalkonium and pyridinium salts, especially against G<sup>-</sup> strains. Other homologs of 3-hydroxylated pyridinium salts (**9**, **10**) were found relatively inefficient in comparison to other pyridinium analogues. In summary, the compound **8** showed a significantly good antibacterial potency, however not exceeding standard **B12**. Therefore, compound **8** could be an alternative to **B12** in targeting resistant strains such as MRSA and thanks to the wide-spectrum of efficacy, it seems to be a hot candidate for novel disinfectant mixtures.

### 2.4. Assessment of antifungal activities

A very similar bioactivity trend as in bacteria has been observed in experiments with fungi. A summary of the determined antifungal MICs after 24 h/48 h of incubation and minimum fungicidal concentrations (MFC) is given in Table S3. Compound **8** showed the

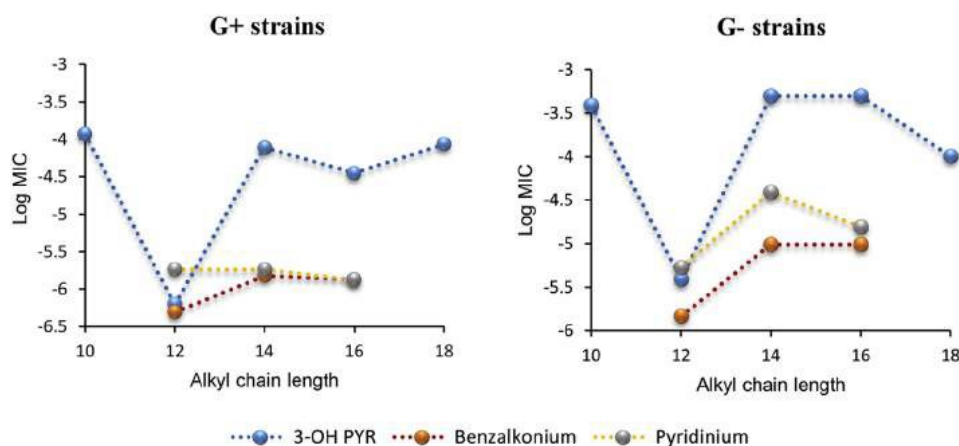


Fig. 4. Disinfectant potency shown as the mean of log MIC values after 24 h of incubation for 3-hydroxypyridinium (3-OH PYR), benzalkonium and pyridinium quaternary salts with different alkyl chain against G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> strains.

most versatile efficacy against both yeasts and filamentous fungi. Of note, compound **8** even exceeded B<sub>12</sub> against *Absidia corymbifera* and *Trichophyton mentagrophytes* although against other strains, it remained slightly less effective. While compound **9** preserved some efficacy, longer carbon chains (**10**, **11**) fully abolished the antifungal activity of 3-hydroxylated derivatives, which is in striking contrast to C<sub>14</sub>E<sub>18</sub> pyridinium analogues. As with the antibacterial assessment, a clear parabolic relationship between the alkyl chain length and the activity against fungal strains has been observed among the tested compounds (Fig. 5). Overall, compound **8** could be an alternative to B<sub>12</sub> in targeting both yeasts and filamentous fungi and, again, seems to be a good candidate for disinfectant mixtures.

### 2.5. Cell viability assessment

Cell viability assay showed the expected trend that increasing length of carbon chain results in higher cytotoxicity probably due to a higher lipophilicity of the drug, which likely facilitates passive penetration into the cells. Interestingly, the cytotoxicity of compound **8** surpassed all benzalkonium (B<sub>12</sub>E<sub>16</sub>) and unsubstituted N-alkylpyridinium analogues (13e15) involved in the present study [51]. The results of the cytotoxicity analysis are outlined in Table S4.

### 2.6. Partial atomic charges and desolvation energies calculations

Biological potential of QAS has repeatedly been proposed to depend significantly on the electron density distribution in the molecules, especially within the part of the cationic head groups [5]. However, there are several approaches for estimating partial atomic charges and actually it is not possible to canonize one partition scheme over the others [53,54]. Bearing in mind that partial atomic charges can be defined in several manners, we performed quantum-chemistry calculations to compare five partial atomic charge partitionings in Gaussian 09 (Revision D.01) [55]: 1) Mulliken population analysis, 2) natural population analysis (NPA), 3) derivation of Merz-Singh-Kollman electrostatic charges, 4) Hirshfeld charges, and 5) AIM charges. Since we cannot give a proper description of the differences in the atomic charge partition schemes here, the reader is kindly referred to Supporting Information and the referenced literature.

Besides the electron density distribution and lipophilicity of QAS, important biological consequences results from different desolvation energies of the compounds. Desolvation is a process which takes place where water molecules surrounding a ligand and

a receptor have to be displaced to enable their interactions. It is usually the case in enzyme-substrate complexes in which the desolvation energy significantly influences the binding affinity. On the other hand, water molecules released from the aqueous envelopes of the ligand and the receptor contribute to increasing the system entropy and thus thermodynamically support the complex formation. Since desolvation is necessary before QAS may incorporate into the cell membrane or cell wall, desolvation energies were calculated to gain a quantitative insight into this process.

Molecular modeling investigation of electronic charges and determination of desolvation energies were both performed in Gaussian 09. Using the quantum chemistry calculation method B3LYP/6-311++(d,p), geometrical optimization and calculation of electrostatic potential maps were carried out to reveal the electronic state of the compounds **7e11** and their non 3-hydroxylated analogues **12e16** (Fig. S4). The resulting Mulliken, Hirshfeld, electrostatic (MSK ESP), natural (NPA), and AIM electric charges on the nitrogen atoms in aquatic environment are given in Table S5. Based on the literature, the most reliable partition schemes of electronic charges are those exploiting the 3D electron density projected in Euclidean space (i.e. Hirshfeld charges) or charges derived from electrostatic potential like Merz-Singh-Kollman charges (i.e. ESP charges) [53,54].

Accordingly, we preferred the electrostatic charges (ESP) as electronic descriptors because they showed minimum variance and are well-known not to depend strongly on the basis set size like the molecular wave function based Mulliken charges. From the predicted values it is evident that Mulliken charges do not even provide meaningful information compared with mechanistic concepts on induction and mesomeric effects of 3-hydroxy group. As hydroxyl function exhibits negative induction (I<sup>-</sup>) and positive mesomeric effects (M<sup>+</sup>), the electron density on the nitrogen atom should be lower when comparing pyridinium and 3-hydroxypyridinium ions. The modeled electronic changes in N-methylpyridinium ring caused by 3-hydroxy function are illustrated in Fig. S5. Chemical intuition about substituent electronic effects has been confirmed only by ESP charges and more or less by Hirshfeld charges. Interestingly, NPA charges also exhibit a reliably low variance and suggest lowering the electron density on the nitrogen atom in the 3-hydroxypyridinium structure in accordance with our notion, but they attribute negative partial charges to the quaternary nitrogen atoms.

The quantum chemistry calculations were carried out in vacuum as well as in water using an implicit solvent model (Self Consistent Reaction Field, SCRF). The ESP charges on the quaternary nitrogen atoms were extracted from the outputs simulating the aquatic environment. Our findings point out that prolonging the length of the alkyl chain had only slight influence on the nitrogen charge, but introduction of the 3-hydroxyl group increased the ESP charge on the nitrogen atom approximately by 0.06. The results of molecular modeling are outlined in Fig. 6. The electrostatic potential maps were projected on electronic isodensity surface of  $r^{1/4} 0.07e/\text{bohr}^3$ .

Regarding desolvation energy, it can imply a considerable burden in the binding with a receptor especially when the ligand is able to form strong hydrogen bonds. As the 3-hydroxyl function is a hydrogen bond acceptor (HBA) as well as a hydrogen bond donor (HBD), its introduction into the pyridinium scaffold is likely to bring about a higher penalty of desolvation within embedding **7e11** into the cell wall or membrane. In order to predict *in silico* the desolvation energy of **7e16**, geometry optimization calculations were performed in vacuum and water using DFT B3LYP/6-311++(d,p) method with implicit simulation of aquatic environment by SCRF model at 323.15 K (in Gaussian 09). The resulting desolvation energy ( $\Delta G_{\text{desolv}} = \frac{1}{2}G_{\text{vacuum}} - G_{\text{water}}$ ) confirmed that 3-hydroxypyridinium salts need on average by 4.4 kcal/mol more

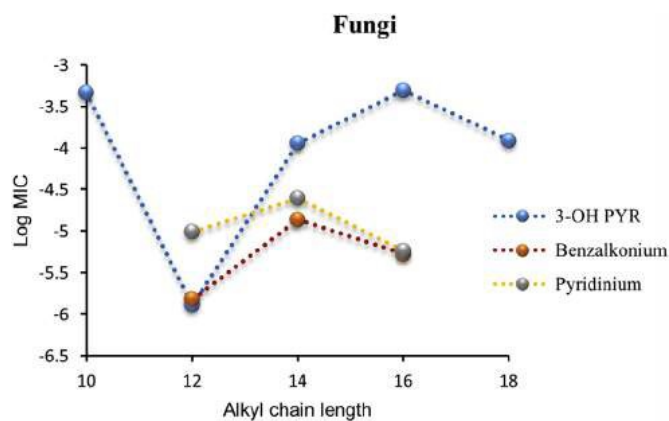


Fig. 5. Disinfectant potency shown as the mean of log MIC values after 24 h of incubation for 3-hydroxypyridinium, benzalkonium and pyridinium quaternary salts with different alkyl chain against fungal strains.

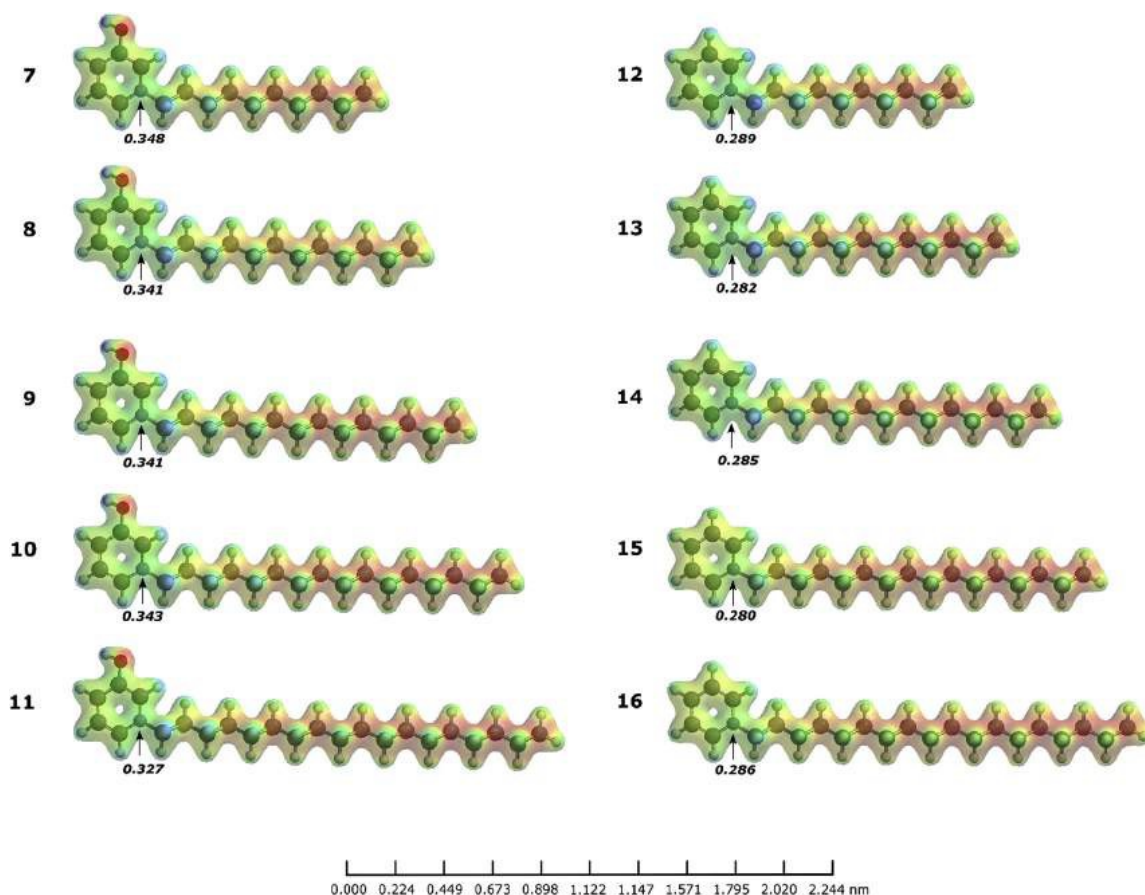


Fig. 6. Electrostatic potential maps and ESP charges determined by DFT B3LYP/6-311pG(d,p) method with implicit simulation of aquatic environment by Self Consistent Reaction Field (SCRF) model at 323.15 K. The 3-hydroxyl group increases the nitrogen charge roughly by 0.06.

energy to desolvate than pyridinium salts (Table S6.). Increasing, then, the length of the side *N*-alkyl chain nearly linearly decreases the desolvation energy of the compounds in water.

### 2.7. Molecular dynamic study

In order to reveal differences in the affinity of *N*-alkylpyridinium salts towards the bacterial membrane caused by the introduction of 3-hydroxy function, we designed a molecular dynamics (MD) study on two most active analogues found in this work: **8** (*N*-dodecyl-3-hydroxypyridinium) and **13** (*N*-dodecylpyridinium). Fig. 7 shows the final structures of the molecules **8** and **13** interacting with the 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC) bilayer in aqueous phase during 10 ns from the MD simulation. A plot displaying energy changes during the simulations is given in Fig. S7. These results indicate that the 3-hydroxy function in molecule **8** significantly favors the physical adsorption in the POPC bilayer. Note that molecule **8** with 3-hydroxy function is merged in the bilayer, while molecule **13** without this function remains after 10ns of simulation in aqueous phase bulk. It is important to report that the profile of interaction membrane/compound **8** shown in Fig. 7 was observed from the third nanosecond of simulation. Mechanistically, we observe the orientation of the molecule **8**'s tail in the direction of POPC, keeping it stabilized in the monolayer that adsorbed it at the end of MD simulation. On the other hand, molecule **13** remained mostly in horizontal direction with respect to the membrane/water interface, position which does not favor efficient interactions with the membrane. Keeping in mind that a membrane is a liquid-condensed surface (LC), addition of molecules to the

membrane leads to increased density of the monolayer membrane/water interface, which could promote a rise in surface pressure in the monolayer rendering it physically more rigid. This phenomenon could alter the membrane for important biological events such as endocytosis.

Regarding the potential of interaction between the molecules and the bilayer, the POPC bilayer has a higher relative affinity for the molecule **8** with 3-hydroxyl. Fig. 8 shows that during the simulation the Coulombic and non-Coulombic potential between the bilayer and molecule **8** with hydroxyl are significantly stabilized during the trajectory. We can also observe that the stabilization of the model is mainly due to the interactions of the non-Coulombic potential, indicating that non-polar characteristics of molecules are mainly responsible for the adsorption of molecule **8** with 3-hydroxyl. On the other hand, molecule **13** without 3-hydroxyl shows low affinity for the bilayer. Table S7 presents the average contributions of energy between the bilayer and the investigated organic molecules. It is interesting to note that the hydroxy function of **8** in position 3 on the aromatic ring enables the molecule to orient the hydrophobic tail towards the bilayer. Eventually, this initial interaction leads to introduction of the whole molecule into the bilayer. Molecule **13** without 3-hydroxyl does not display this feature to such an extent.

The results obtained from the molecular dynamics study reveal an interesting effect of 3-hydroxy group on *N*-alkylpyridinium scaffold. Although compound **8** is more hydrophilic and requires higher desolvation energy to be released from aqueous environment compared with **13**, it can interact more strongly with phosphatidylcholine head groups of POPC which trigger consequent

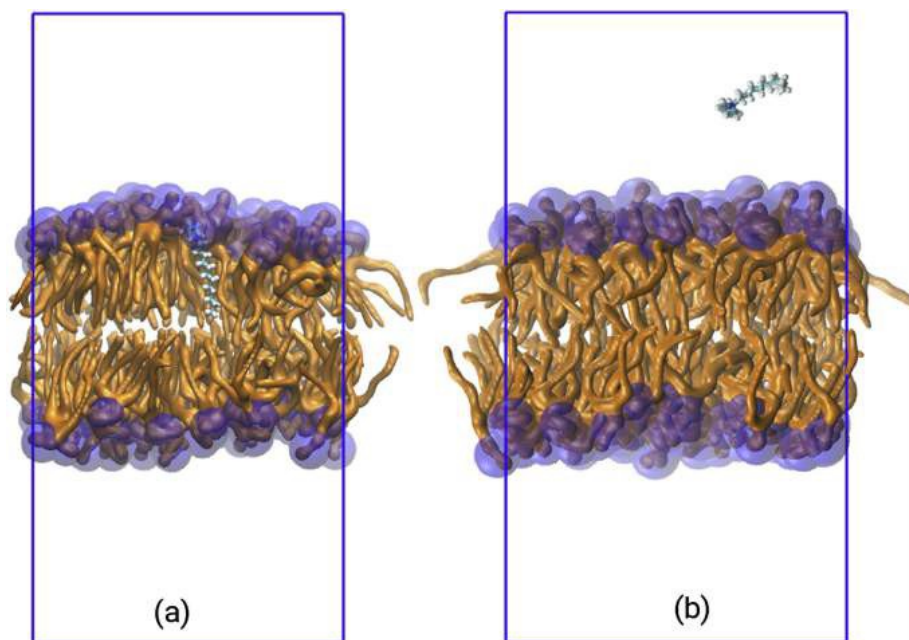


Fig. 7. Final configuration of the system model to study the spontaneous adsorption of compounds containing twelve carbons on POPC bilayer in aqueous phase, analogue structures **8** (a) containing 3-hydroxy function and **13** (b) without the 3-hydroxy function. Both representations depict the final configuration after 10 ns of MD simulation in NPT ensemble. For better clarity, water and chloride have been omitted in the Figure. Transparent blue balls and gold surface fibers represent respectively the head and tail of POPC. The stick models outline the studied compounds where the atoms colored in green, red, blue, and white are carbon, oxygen, nitrogen and hydrogen, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

embedding of the hydrophobic tail into the membrane. A similar mechanism can be observed *in silico* for all 7e16 compounds. Nevertheless, from the probabilistic point of view demonstrated in this study, **8** entails a better chance to penetrate from the aqueous solution into the membrane. Regardless of these findings, it should be kept in mind that the question why only compound **8** with *N*-dodecyl substituent exhibits significant antibacterial activity and the others (i.e. **7**, **9**, **10**, **11**) do not, remains unresolved after the molecular dynamics study.

### 2.8. Structure activity relationships

Since QSAR studies may be performed by many machine learning methods (e.g. regression methods, classification methods, support vector machines, decision trees, artificial neural networks,

etc.) using a huge number of molecular descriptors [56e58], it became necessary to choose a suitable approach for the present study which would evaluate our working hypotheses: 1) are lipophilicity, positive charge or desolvation energy significant predictors of antibacterial activity of *N*-alkyl-3-hydroxypyridinium salts?; 2) is it possible to build a robust linear QSAR model for the compounds by a stepwise variable selection from the pool of 2644 molecular descriptors generated by Dragon 6 [59]? Given the limited number of compounds involved in the study, we avoided the employment of more complicated statistical data-mining methods than multiple linear regression (MLR) in order to reduce the probability of resting with biased correlations due to the impossibility to properly control the training process [60]. The two working hypotheses were evaluated by our in-house program written in C employing a leave-one-out cross-validation method for testing the model robustness [61].

QAS are bioactive compounds whose potential against pathogenic strains is ruled by a combination of physicochemical properties but the principle of the structure-activity relationship is still not clear [62]. Recently, it has been hypothesized that optimal antibacterial activity of surfactants is a result of balanced hydrophobicity, aqueous solubility, adsorption efficiency, critical micellar concentration and transport in the medium [63]. If we accept that QAS act primarily as detergents disturbing the cell wall and membranes, it should not be surprising that embedding of the molecules into the frontier cell envelope is significantly dependent on lipophilicity and desolvation energy of QAS. Generally, the relationship between the number of alkyl carbons in QAS and antibacterial activity (pMIC) against various bacterial strains prioritize compounds endowed with a higher lipophilicity, but the optimal activity is restricted to compounds containing a flexible alkyl chain with C<sub>12</sub> e C<sub>16</sub> carbons. Unfortunately, this commonly known non-linear feature in the relationship between the number of carbons in the side alkyl chain and the activity demonstrated by QAS seems to be very hard to explain in terms of valid QSAR

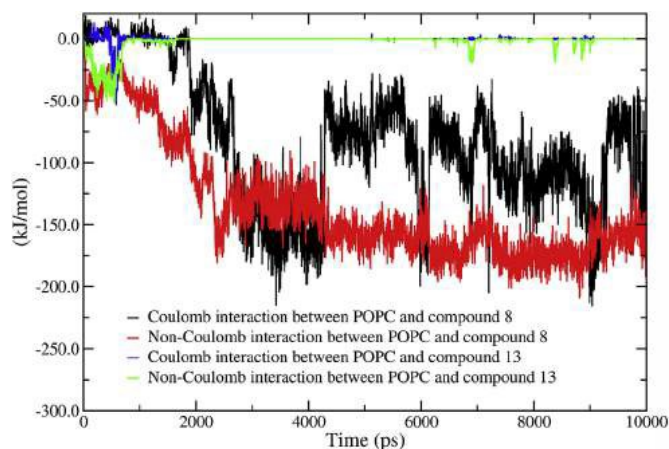


Fig. 8. Intermolecular interaction energies between POPC bilayer and the compounds **8** and **13** as a time function.

methodology. To shed light upon these hypotheses, we evaluated pair-wise inter-correlations between average pMIC against **GP**, G- and fungi determined for **7e11**, and desolvation energies, ESP charges on the quaternary nitrogen atom,  $\log k$  and ClogP. As could

be expected, none of these predictors by itself is able to explain the

observed antimicrobial activity of *N*-alkyl-3-hydroxypyridinium salts as a linear regression function characterized by statistically significant Pearson's correlation coefficient  $R^p$  and coefficient of determination  $R^2$  (Table S8). On the other hand, desolvation energies as well as ClogP and  $\log k$  can serve as significant predictors of pIC<sub>50</sub> determined in the cell viability tests on CHOeK1 (Table S8). Based on the results, the cytotoxicity of **7e11** is increased by higher compound lipophilicity ClogP and higher retention time (i.e.  $\log k$ ), and decreased by higher desolvation energies and higher charge on

the nitrogen atom.

If the set of compounds **7e11** is extended with **13e15**, only two separate point groups appears in the chemical space represented by pMIC and individual molecular descriptors from Table S8, with compound **8** having the nature of an outlier disturbing the perfect classification. The biological behavior of **8** in bacteria and fungi cannot be elucidated by any single physicochemical property listed in Table S8.

In the effort to reveal significant predictors of the antimicrobial activities of **7e11**, a set of 2644 various molecular descriptors calculated by Dragon 6 program using the structures and ESP charges derived by DFT B3LYP/6-311 G(d,p) optimization method in Gaussian 09 was statistically analyzed by program Stat too employing multiple linear regression [61]. The data input involved different types of molecular descriptors such as constitutional descriptors, information indices, WHIM and GETAWAY descriptors, charge descriptors, 2D binary fingerprints, topological descriptors, molecular properties, etc. As the dependent variables, average pMICs against G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup> and fungi (**GP**) determined after 24 h of incubation were used.

Because QSAR analysis of only five compounds (**7e11**) described by a pool of 2644 molecular descriptors heavily tends to biased statistical models, attention was devoted to designing reasonable model size and to final external QSAR model evaluation. Taking into consideration these alerts, we could afford to involve only two molecular descriptors into the models. Although this low compounds/descriptors ratio still significantly endangers the predictivity and robustness of the model, we tried to equilibrate the drawback by evaluation of the model's external predictivity by the prediction of the activities of compounds which had not been utilized in the training process. Thus, all the found two-parameter QSAR models were trained on **7e11** and tested externally by the prediction of pMIC(**GP**), pMIC(G<sup>-</sup>) and pMIC(F) for six other compounds **13**, **14**, **15**, **B<sub>12</sub>**, **B<sub>14</sub>**, and **B<sub>16</sub>**. Due to the same mechanism of action supposed for this type of QAS, we considered the compounds to belong into one QSAR domain of applicability which is a substantial condition for external biological activity predictions. Molecular descriptors for compounds **13**, **14**, **15**, **B<sub>12</sub>**, **B<sub>14</sub>**, and **B<sub>16</sub>** were obtained in the same way as those for **7e11**.

The found QSAR models for pMIC(**GP**), pMIC(G<sup>-</sup>) and pMIC(F) were described by: internal coefficient of determination  $R^2(\mathbf{7e11})$ , "leave one out" cross-validated coefficient of determination

$Q^2_{LOO}(\mathbf{7e11})$ , Fisher-Snedecor test  $F(\mathbf{7e11})$ , standard residual deviation  $s(\mathbf{7e11})$  and the number of samples  $n(\mathbf{7e11})$ . External predictivity of the QSAR models was evaluated by the coefficient of

determination  $R^2_{ext}$  and Pearson's correlation coefficient  $R^p$  for

$$R^2(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.9999 \\ Q^2_{LOO}(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.9999 F(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 609\ 210.8967 s(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.0016 \\ n(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 5$$

$$R^2_{ext}(\mathbf{13e15}, \mathbf{B}_{12} \mathbf{eB}_{16}) \frac{1}{4} -5202.836 R^p(\mathbf{13e15}, \\ \mathbf{B}_{12} \mathbf{eB}_{16}) \frac{1}{4} -0.7872 \quad (3)$$

$$pMIC(G^+:\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} -751.684 \pm 1.268 SpPosA\_B(p) \mathbf{e} 1.6009 \pm 0.003 \\ Mors18s \mathbf{e} 932.438 \pm 1.572$$

$$R^2(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.9999 \\ Q^2_{LOO}(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.9999 F(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 184\ 915.682 s(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.0030 \\ n(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 5$$

$$R^2_{ext}(\mathbf{13e15}, \mathbf{B}_{12} \mathbf{eB}_{16}) \frac{1}{4} -720.556 R^p_{ext}(\mathbf{13e15}, \\ \mathbf{B}_{12} \mathbf{eB}_{16}) \frac{1}{4} 0.9046 \quad (4)$$

$$pMIC(F:\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} -37.457 \pm 0.041 AMW \mathbf{e} 50.913 \pm 0.051 \\ SM04\_AEA(bo) \mathbf{p} 531.361 \pm 0.550$$

$$R^2(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.9999 \\ Q^2_{LOO}(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.9999 F(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 519\ 178.807 s(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 0.0021 \\ n(\mathbf{7e11}) \frac{1}{4} 5$$

$$R^2_{ext}(\mathbf{13e15}, \mathbf{B}_{12} \mathbf{eB}_{16}) \frac{1}{4} -931.484 R^p_{ext}(\mathbf{13e15}, \\ \mathbf{B}_{12} \mathbf{eB}_{16}) \frac{1}{4} -0.0947 \quad (5)$$

As can be seen in Equations (3)–(5), the three best QSAR models found exhibit extremely good internal predictivity and stability in LOO cross-validation ( $R^2 > 0.9999$ ,  $Q^2_{LOO} > 0.9999$ ), but they completely fail in the external predictivity tests on unseen compounds' activities ( $R^2_{ext}(\mathbf{13e15}, \mathbf{B}_{12} \mathbf{eB}_{16})$ , defined as  $1 - e$  (SSE/SST), is negative). Significant Pearson's correlation coefficients  $R^p_{ext}$  appearing in the cases of **GP** and G-bacteria only indicate that the predicted activities are scattered in such a way that a statistically significant linear regression function can fit the predicted and real values. However, a relationship between the predicted and real antibacterial activities cannot be considered as a measure of predictivity. Only  $R^2_{ext}$  which depends on the difference between the predicted and real values in absolute manner, can serve as a criterion of a model predictivity. Since many different QSAR models with 1e3 predictors were built from the pool of 2644 molecular descriptors in this study and analyzed according to the above-mentioned principles, we can conclude that the three QSAR models presented here demonstrate the optimal possible mathematical solution of the problem but they cannot be utilized for interpretation and prediction of antimicrobial activities of QAS. Thus, we have to admit that explaining the empirical fact of the best activity of compound **8** is not possible within this ligand based QSAR methodology. The principle of extraordinary antibacterial activity of **8** probably consists in a specific biological target in bacteria that prefers interaction with *N*-dodecyl side chain.

Lately, we have revealed that different lipophilicity of *N*-alkylquinolines and *N*-alkylisoquinolines homologs generally shifts the antibacterial activities more or less by a constant but homologs with C<sub>12</sub> side chain always retain the best activities within different

compound series [48,64]. This observation cannot be explained by

an optimal lipophilicity allowing for a passive penetration across the cell wall. If compound lipophilicity were the crucial factor in the

C<sub>12</sub> effect, compounds with more polar head group should have



the compounds 13, 14, 15, B<sub>12</sub>, B<sub>14</sub>, and B<sub>16</sub> (Equations (3)(5)).

pMIC(Gp:7e11)  $\frac{1}{4}$  e 23.229  $\pm$  0.022

SM06\_AEA(bo) e 32.609  $\pm$  0.041H1u p 266.723  $\pm$  0.265

had the optimal activity moved towards structures with longer alkyl side chains. But nothing like that has been observed. Taking into account that: 1) QAS shows bacteriostatic effect, and 2) bacteria can develop resistance against these pharmaceuticals, further research will have to be devoted to the evaluation of possible

biological targets and mechanisms of action of QAS. From the current investigation it can be deduced that QAS act as multi target directed ligands perturbing not only the bacterial cell walls and phospholipid bilayers but very likely some essential receptors and/or enzymes as well.

### 3. Conclusions

Within this work, five antibacterial compounds belonging to QAS were prepared and analyzed by several experimental and computational methods. The studied *N*-alkyl-3-hydroxypyridium salts were designed to evaluate the working hypothesis that increased positive charge on the nitrogen atom can induce stronger antibacterial activity. However, biological analyses of *N*-alkyl-3-hydroxypyridinium salts, which should have brought about such nitrogen charge modification compared with *N*-alkylpyridium salts, proved that 3-hydroxy function evidently suppressed the activity. Except for the compound **8** with *N*-dodecyl substituent, showing, for instance, MIC around 0.5 mM against *Staphylococcus aureus* (MRSA), all the prepared substances exhibited significantly worse antibacterial activities than the non-hydroxylated analogues. By HPLC, we proved that lipophilicity of *N*-alkyl-3-hydroxypyridium salts is well predictable by Clog *P* calculated by MarvinSketch 14.9.8.0. program. Along with increased desolvation energy calculated by SCRF/B3LYP/6-31+G(d,p) method, the decreased lipophilicity of *N*-alkyl-3-hydroxypyridium salts in comparison with *N*-alkylpyridium salts can serve to adumbrate worsened antibacterial activity of these compounds.

In order to give to traditional organic chemistry ideas on partial charges and substituent polar effects a quantitative aspect, we calculated five types of electronic charges on the nitrogen atom in *N*-alkyl-3-hydroxypyridium and *N*-alkylpyridium salts employing SCRF/B3LYP/6-31+G(d,p) method: Mulliken, NPA, ESP, Hirshfeld and AIM charges. Given several theoretical peculiarities involved in the different partition schemes, various values of partial electric charges resulted for the nitrogen atom. Based on the literature, we decided to analyze ESP charges since they are more robust with the respect to altering the basis set size. It was confirmed that 3-hydroxy function increases the positive charge on the nitrogen atom in *N*-alkyl-3-hydroxypyridium salts but, as mentioned above, this effect cannot be associated with enhancing the antibacterial activity but rather with a deteriorating influence on it.

On the other hand, molecular dynamics study on interactions of **8** and **13** with POPC bilayer showed that 3-hydroxy function has beneficial consequences on the process of surfactant incorporation into the cell membrane. Within the simulation, only compound **8** penetrated into the membrane while compound **13** remained in the aqueous surroundings after 10 ns of MD simulation. In the initial phase of the interaction with the membrane, increased polarity of the head groups generally supports stronger attraction towards the membrane surface, but the overall stability of the surfactant molecule in the membrane is maintained by hydrophobic interactions. Mechanistically, incorporation of **8** into the membrane may support disintegration of the cells or only increase the surface pressure of the membrane leading to alteration, for instance, of endo/exocytosis processes. However, these findings can only partially elucidate why *N*-alkyl-3-hydroxypyridium salts are mostly less active than *N*-alkylpyridinium salts and why **8** is the only exception in this trend. Since the membrane degradation process by QAS is likely to require tens to hundreds of nanoseconds, a molecular dynamics study of a greater extent might reveal further aspects of the possible disintegration mechanism.

Negative results obtained by QSAR analysis of the compounds involved in this study suggest that no SAR hypothesis can be validated thus far. Neither lipophilicity nor electronic charge on the

nitrogen atom is able to act as a predictor of antibacterial activity of *N*-alkyl-3-hydroxypyridium salts. Although decreased lipophilicity of the QAS studied can somewhat signify reduced antibacterial activity of the compounds, the deviation of **8** is unpredictable and as such it substantially perturbs ligand based QSAR analyses. On the other hand, versatility and antibacterial efficacy of compound **8** is very similar to golden benzalkonium standard B<sub>12</sub> and, considering the lower cytotoxic profile of **8**, its practical use in the mixtures could be appreciated in current medical care.

### 4. Experimental

#### 4.1. Materials

Reagents for organic synthesis were purchased as at least reagent grade from Sigma-Aldrich (Czech Republic) unless otherwise specified, and used without further purification. Solvents for synthesis were purchased from Penta chemicals Co. Acetonitrile, water and formic acid for LC-MS analyses were obtained from Sigma-Aldrich in LC-MS grade purity (Czech Republic). Thin layer chromatography was carried out on Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> analytical plates (mobile phase: dichloromethane/methanol/25% ammonia solution 100/10/2); detection was accomplished with ultraviolet light (λ 254 nm). Uncalibrated purity of all products reaching >97% was evaluated by LC-UV analysis at wavelength of 254 nm. Uncorrected melting points of **7e11** were determined with Melting Point Apparatus e Stuart SMP30. The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of the compounds were recorded in CD<sub>3</sub>OD solution at ambient temperature on a Varian S500 spectrometer (499.87 MHz for <sup>1</sup>H and 125.71 MHz for <sup>13</sup>C). For <sup>1</sup>H δ are given in parts per million (ppm) relative to CD<sub>3</sub>OD (δ ¼ 3.31) and for <sup>13</sup>C relative to CD<sub>3</sub>OD (δ ¼ 49.05). The coupling constants (*J*) are expressed in Hertz.

#### 4.2. Organic synthesis

The studied group of quaternary surfactants, *N*-alkyl-3-hydroxypyridinium salts **7e11**, was prepared by reaction of 3-hydroxypyridine (**1**) with appropriate 1-bromoalkane (**2e6**) in acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN). An appropriate 1-bromoalkane (**2e6**) (36.80 mmol) was added at room temperature to a solution of 3-hydroxypyridine (**1**) (26.29 mmol) in acetonitrile (38 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 48 h. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified by crystallization from diethyl ether, filtered, washed with diethyl ether and allowed to dry at ambient temperature. The synthesis of compounds **7** and **8** along with <sup>1</sup>H NMR spectra were published in a patent application registered in 1997 [37]. Analogical synthesis of 1-dodecyl-3-hydroxypyridinium hydroxide in ethanol was simply described in an article published in 1956 [65]. Compound **10** has also been reported in the literature but without providing NMR and HRMS spectra [66]. Compounds having the same cations as **10** and **11**, thus prepared and tested as appropriate chlorides, have been reported in the literature, but without providing NMR or HRMS spectra [67]. Compound **9** represents a new chemical entity and therefore its characterization by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) analyses is attached to the present work (Supporting Information). Since proper characterization of compounds **7**, **8**, **9**, **10**, and **11** by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and HRMS has not been published yet, where applicable, we have added the unpublished spectra into Supporting Information. Other chemical structures used in this study for *in silico* or QSAR investigations were taken from the literature (i.e. *N*-alkylpyridinium salts, benzalkonium salts).

#### 4.3. LC-MS analysis

In the chromatographic study, Dionex UltiMate 3000 analytical LC-MS system connected with a Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap spectrometer (both produced by ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) was used to determine HRMS and capacity factors  $k$  of the compounds **7e11**. A Waters Atlantis dC18 (2.1 100  $\mu\text{m}$   $\times$  3 mm) column along with a guard column (2.1 20 mm) with the same adsorbent were employed as the stationary phase. The mobile phase was prepared from acetonitrile and water acidified with 0.1% (v/v) of formic acid (FA) in ratio 66:34 (v/v). The compounds **7e11** were dissolved in methanol and then injected into the LC-MS system as a mixture. For HRMS measuring, heated electro-spray ionization (HESI) was set as follows: sheath gas flow rate 40, aux gas flow rate 10, sweep gas flow rate 2, spray voltage 3.2 kV, capillary temperature 350 °C, aux gas temperature 300 °C, S-lens RF level 50. Ions were monitored in the range of 100e1500  $m/z$  with the resolution set to 140 000. The flow-rate was set to 0.4 mL/min. The chromatograms and mass spectra were processed on Chromeleon 6.80 and Xcalibur 3.0.63 software, respectively.

#### 4.4. Evaluation of antibacterial activity

The antibacterial activities of the prepared compounds were determined by a microdilution broth method according to protocol published previously [48,51]. One part of the panel of bacterial strains used for the activity testing was obtained from Czech Collection of Microorganisms (CCM, Brno, Czech Republic) and American Type Culture Collection (ATCC). The remaining bacteria used in the study (i.e. *Staphylococcus aureus* H 5996/08, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus* sp. J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08) were clinical isolates. Prior to biological testing, the strains suspended in 0.85% saline were cultivated on Mueller-Hinton agar (Difco, Benton Dickinson, Detroit, MI) at 35 °C. The bacterial populations were controlled densitometrically to reach 1.5 10<sup>8</sup> viable colony forming units (CFU) per 1 mL.

The compounds were dissolved in DMSO and added into wells of a testing plate with Mueller-Hinton liquid broth (Difco, Benton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. A geometrical series of the compounds' concentrations was examined to quantify the biological activities: 0.5, 1, 2, 3.90, 7.8, 16, 31, 63, 125, 250 and 500 mmol L<sup>-1</sup>. The MICs, defined as 95% inhibition of bacterial growth, were determined visually after 24 h and 48 h. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* was determined after 72 h and 120 h. Similarly, the MBCs were determined as the concentration of compound causing a decrease in the number of bacterial colonies by > 99.9%.

#### 4.5. Evaluation of antifungal activity

For assay of the antifungal activity of the studied compounds, eight clinical samples of fungi or yeast were utilized: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida krusei* E28, *Candida tropicalis* 156, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic). For this purpose, a protocol published previously was used. The MICs and MFCs were determined by a modified standard M27-A2 (CSL) using RPMI 1640 medium, buffered to pH 7.0 with 0.165M 2-morpholino-propane-sulfonic acid, and two-fold serial dilutions (500e0.5 mmol L<sup>-1</sup>) of the prepared compounds. DMSO was used as solvent for the tested compounds and its final concentration in the inoculated samples did not exceed 2% (v/v). After

24 h and 48 h (72 h and 120 h for TM) of incubation at 35 °C, the growth of microbial colonies was examined visually as well as spectrophotometrically.

#### 4.6. Cell viability assessment

Standard MTT assay (Sigma Aldrich) was used according to the manufacturer's protocol on the CHOeK1 (Chinese hamster ovary, ECACC, Salisbury, UK) in order to compare cytotoxic effects of the studied compounds [64]. The cells were cultured according to ECACC recommended conditions and seeded in the density of 8000 per well. Briefly, the tested compounds were dissolved in DMSO and subsequently diluted in the growth medium (F-12) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin so that the final concentration of DMSO did not exceed 0.5% (v/v). The CHOeK1 cells were exposed to the tested compounds for 24 h. Then the medium was replaced by a medium containing 10 mmol L<sup>-1</sup> of MTT and the cells were allowed to produce formazan for another approximately 3 h under surveillance. Thereafter, the medium with MTT was removed and crystals of formazan were dissolved in DMSO (100 mL). Cell viability was assessed spectrophotometrically as function of the amount of formazan produced. Absorbance was measured at 570 nm with 650 nm reference wavelength on Synergy HT (BioTek, USA). IC<sub>50</sub> was then calculated from the control - subtracted triplicates using non-linear regression (four parameters) in GraphPad Prism 5 software. The final IC<sub>50</sub> and SEM values were obtained as the mean of 3 independent measurements.

#### 4.7. Partial atomic charge calculations

Models of the compounds **7e11** and their analogues **12e16** without the 3-hydroxyl function were first manually drawn in Spartan '14 program as free cations [68]. PM3 method was employed for determination of equilibrium geometry in vacuum. The resulting structures were exported by an in-house program to the format of Gaussian input files. Utilizing computer resources of the Czech National Grid Infrastructure MetaCentrum, we carried out geometrical optimization with DFT B3LYP/6-311++G(d,p) method for all 10 molecules (**7e16**) using 12 CPU in multi-threading. In Gaussian 09, the molecular geometry was optimized in vacuum and water environment using an implicit solvent model (Self Consistent Reaction Field, SCRF) [55]. Thermochemical calculation and frequency analysis was performed for 323.15 K. The optimized conformers represent chemical structures corresponding to a stationary point on the potential energy hypersurface with no imaginary frequencies. From the output files, total energies, the Mulliken, NPA, MSK ESP, Hirshfeld and AIM atomic charges were extracted.

#### 4.8. Desolvation energy calculations

In order to determine the desolvation energies of **7e16**, we carried out geometrical optimization of the molecules both in vacuum and in water using an advanced quantum chemistry DFT B3LYP/6-311++G(d,p) method in Gaussian 09. In the case of simulation of the solvation effect, we employed a geometrical optimization with implicit water by the Self Consistent Reaction Field (SCRF) model for 323.15 K. The energy of desolvation was calculated as  $\Delta G_{\text{desolv}} = G_{\text{vacuum}} - G_{\text{water}}$ .

#### 4.9. Molecular dynamics study

The spontaneous adsorption of target molecules on the membrane, that is without adding extra forces, were obtained by molecular dynamics simulation, similar to the protocol described by

Ferreira et al. [69]. Simulations were carried out using GROMACS version 4.5.12 and the Gromos53a6 force field [70] under periodic boundary conditions for molecules. The united atom lipid parameters were adapted from the work of Berger and coworkers [71]. Two models were built to evaluate the interactions between target molecules 8 and 13 and the bilayer. Each system was composed of 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC) bilayer with 128 molecules [72], the target molecule, a chloride and SPC/E (Single Point Charge) water in a triclinic box with edges 6.2 nm x 6.2 nm x 20 nm (Fig. S7). The initial model was built centering the membrane POPC, previously equilibrated as published in Refs. [72], in the box, subsequently the target molecules were randomly added in the vacant box region. As position criteria, the molecule is not inserted where the distance between any existing atom and any atom of the inserted molecule is less than the sum based on van der Waals radii of both atoms, which is the standard condition of GROMACS. Then water molecules were added to complete the box and simulated the aqueous phase, and finally a chloride ion was added to each model to neutralize the system. The energy was minimized using a steepest gradient method to remove any close contacts. Next, the system was allowed to evolve for 1.0 ns in a canonical NVT (N is the number of particles, V the system volume, and T the temperature) ensemble at 300 K. The production runs were conducted in an NPT (P is the system pressure) ensemble at 300 K and 1.0 bar for 10 ns with the step size of 1 fs, on the coordinates of the last frame generated from NVT equilibration. All bond lengths were constrained to their equilibrium values using the LINCS algorithm. The neighbor list for the calculation of non-bonded interactions was updated every five time steps with the cutoff of 1.2 nm. A twin range cutoff of 1.4 nm was used for both Coulomb and Lennard-Jones interactions. Particle Mesh Ewald (PME) method was used for the treatment of long-range electrostatic interactions. The system was split into four groups which were coupled separately to a temperature bath using Nose-Hoover algorithm with the time constant of 0.1 ps while the pressure coupling was conducted using a semi-isotropic Parrinello-Rahman barostat with the time constant of 2.0 ps and 1.0 bar reference pressure for coupling for all directions.

#### 4.10. QSAR studies

Molecular descriptors for QSAR analyses were calculated in Dragon 6 [59] using the chemical structures of 7e16, B<sub>12-16</sub> geometrically optimized by DFT B3LYP/6-311++G(d,p) method. For statistical analyses, an in-house program written in Python was used employing a step-wise forward variable selection algorithm and multiple linear regression. The found QSAR models were characterized by classical statistical criteria: coefficient of determination  $R^2$  for "leave one out" cross-validated coefficient of determination  $Q^2$

$^2_{LOO}$ , Fisher-Snedecor test  $F$ , standard residual deviation  $s$  and the

number of samples  $n$ . Predictivity of the QSAR models derived from 7e11 was evaluated by external prediction of antibacterial activities for the compounds 13e15 and B<sub>12-16</sub>. The QSAR analyses were performed with average pMICs (24 h incubation) of the compounds against the microbes separated into three groups: 1) Gram-positive bacteria; 2) Gram-negative bacteria; 3) yeasts and fungi. Finally, a similar QSAR analysis was conducted also for pIC<sub>50</sub> determined in the cell viability study with CHOeK1 cells.

#### Acknowledgements

Savedra, R. M. L. and Ramalho, T. C. thank the Brazilian funding agencies CNPq, FAPEMIG and CAPES for financial support and fellowship. The work was supported by the project NV15-31847A, Long Term Development plan e 1011 by MH CZ - DRO (University

Hospital Hradec Kralove, No. 00179906), Long Term Development of Faculty of Medicine, University of Ostrava. This paper has been elaborated in the framework of the project „Opportunity for young researchers, reg. no. CZ.1.07/2.3.00/30.0016“. Computational chemistry part of the study was supported by the project Excellence2015 (University of Hradec Kralove, Faculty of Informatics and Management). Access to computing and storage facilities owned by parties and projects contributing to the National Grid Infrastructure MetaCentrum, provided under the programme "Projects of Large Infrastructure for Research, Development, and Innovations" (LM2010005), is greatly appreciated. The authors are very grateful to Michaela Melikova for improving the English of the manuscript.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.058>.

These data include MOL files and InChiKeys of the most important compounds described in this article.

#### References

- [1] E. Novotna, K. Waisser, J. Kunes, K. Palat, V. Buchta, J. Stolarikova, R. Beckett, V. Wsol, Synthesis and biological activity of quaternary ammonium salt-type agents containing cholesterol and terpenes, Arch. Pharm. (Weinheim) 347 (2014) 381e386, <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201300407>.
- [2] G. McDonnell, A.D. Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance, Clin. Microbiol. Rev. 12 (1999) 147e179.
- [3] L. Wang, H. Qin, L. Wang, S. Huo, B. Zhao, B. Song, T. Yan, Synthesis and properties of 1-(2-(alkylamino)-2-oxoethyl) pyridinium chloride surfactants, J. Chem. Res. 37 (2013) 205e207, <http://dx.doi.org/10.3184/174751913X13626828214397>.
- [4] A.D. Russell, Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation, J. Antimicrob. Chemother. 49 (2002) 597e599.
- [5] M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen, U. Holzgrabe, Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: targets or nonspecific interactions? Chem-MedChem. 7 (2012) 22e31, <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201100404>.
- [6] P. Madaan, V.K. Tyagi, Quaternary pyridinium salts: a review, J. Oleo Sci. 57 (2008) 197e215.
- [7] R. Sasi, T.P. Rao, S.J. Devaki, Bio-based ionic liquid crystalline quaternary ammonium salts: properties and applications, ACS Appl. Mater. Interfaces 6 (2014) 4126e4133, <http://dx.doi.org/10.1021/am4057453>.
- [8] S. Kobbelaar, M. Bella, K.A. Jorgensen, Improved asymmetric S(N)Ar reaction of beta-dicarbonyl compounds catalyzed by quaternary ammonium salts derived from cinchona alkaloids, J. Org. Chem. 71 (2006) 4980e4987, <http://dx.doi.org/10.1021/jo060627l>.
- [9] Y. Murakami, Y. Takeda, S. Minakata, Diastereoselective aziridination of chiral electron-deficient olefins with N-chloro-N-sodiocarbamates catalyzed by chiral quaternary ammonium salts, J. Org. Chem. 76 (2011) 6277e6285, <http://dx.doi.org/10.1021/jo210632>.
- [10] T. Ooi, Y. Uematsu, K. Maruoka, Asymmetric strecker reaction of aldimines using aqueous potassium cyanide by phase-transfer catalysis of chiral quaternary ammonium salts with a tetranaphthyl backbone, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 2548e2549, <http://dx.doi.org/10.1021/ja058066n>.
- [11] H.-Y. Wang, J.-X. Zhang, D.-D. Cao, G. Zhao, Enantioselective addition of Thiols to imines catalyzed by Thioureaquaternary ammonium salts, ACS Catal. 3 (2013) 2218e2221, <http://dx.doi.org/10.1021/cs400594e>.
- [12] G.D. Yadav, A.A. Kadam, Atom-efficient benzoin condensation in liquid/liquid system using quaternary ammonium salts: pseudo-phase transfer catalysis, Org. Process Res. Dev. 16 (2012) 755e763, <http://dx.doi.org/10.1021/op300027j>.
- [13] J. Korabecny, K. Musilek, O. Holas, J. Binder, F. Zemek, J. Marek, M. Pohanka, V. Opletalova, V. Dohnal, K. Kuca, Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 6093e6095, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.044>.
- [14] V.P. Grinevich, P.A. Crooks, S.P. Sumithran, A.J. Haubner, J.T. Ayers, L.P. Dwozkin, N-n-Alkylpyridinium analogs, a novel class of nicotinic receptor antagonists: selective inhibition of nicotine-evoked [3H]Dopamine overflow from superfused rat striatal slices, J. Pharmacol. Exp. Ther. 306 (2003) 1011e1020, <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.051789>.
- [15] J.M. Tanzer, A.M. Slee, B. Kamay, E.R. Scheer, In vitro evaluation of seven cationic detergents as antiplaque agents, Antimicrob. Agents Chemother. 15 (1979) 408e414.
- [16] D. Song, J.S. Yang, C. Oh, S. Cui, B.-K. Kim, M. Won, J. Lee, H.M. Kim, G. Han, New synthetic aliphatic sulfonamido-quaternary ammonium salts as anti-cancer chemotherapeutic agents, Eur. J. Med. Chem. 69 (2013) 670e677.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.022>.
- [17] W. Wang, Z. Bai, F. Zhang, C. Wang, Y. Yuan, J. Shao, Synthesis and biological activity evaluation of emodin quaternary ammonium salt derivatives as potential anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 56 (2012) 320e331, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.07.051>.
- [18] O. Soukup, D. Jun, G. Tobin, K. Kuca, The summary on non-reactivation cholinergic properties of oxime reactivators: the interaction with muscarinic and nicotinic receptors, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 711e719, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-012-0977-1>.
- [19] N. Singh, K.K. Ghosh, J. Marek, K. Kuca, Effect of some pyridinium based compounds on the hydrolysis of carboxylate ester, *Indian J. Chem.* 51 (2012) 611e616.
- [20] S.M. Tawfik, M.F. Zaky, Synthesis, structure characterization and biological activity of Co (II), Cu (II), and Zn (II) complexes with (Z)-3-((3-hydroxybenzylidene)amino)pyridin-1-ium 4-(dodecan-4-yl)benzenesulfonate surfactant, *J. Surfactants Deterg.* 18 (2015) 863e871, <http://dx.doi.org/10.1007/s11743-015-1700-z>.
- [21] K. Kuča, M. Bielavska, J. Cabal, V. Dohnal, Determination of benzalkonium bromide homologues in disinfection products using high-performance liquid chromatography, *Anal. Lett.* 38 (2005) 673e682, <http://dx.doi.org/10.1081/AL-200050326>.
- [22] K. Waisser, R. Dolezal, K. Palat, J. Cizmarik, J. Kaustova, QSAR study of antimicrobial activity of quaternary ammonium salts of piperidylethyl esters of alkoxy-substituted phenylcarbamic acids, *Folia Microbiol. (Praha)* 51 (2006) 21e24, <http://dx.doi.org/10.1007/bf02931444>.
- [23] N.V. Shtyrlin, S.V. Sapozhnikov, S.A. Koshkin, A.G. Iksanova, A.H. Sabirov, A.R. Kayumov, A.A. Nureeva, M.I. Zeldi, Y.G. Shtyrlin, Synthesis and antibacterial activity of novel quaternary ammonium pyridoxine derivatives, *Med. Chem.* 11 (2015) 656e665.
- [24] G.E. McDonnell, Antiseptics, disinfection, and sterilization. Types, action, and resistance, *Inter. Microb.* 10 (2007) 295e298.
- [25] A.D. Russell, G.W. Gould, Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants, *J. Appl. Bacteriol.* 65 (1988) 167Se195S, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04651.x>.
- [26] P. Gilbert, L.E. Moore, Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet, *J. Appl. Microbiol.* 99 (2005) 703e715, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>.
- [27] L.E. Moore, R.G. Ledder, P. Gilbert, A.J. McBain, In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 4825e4834, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00573-08>.
- [28] M.K. Dymond, G.S. Attard, Cationic type I amphiphiles as modulators of membrane curvature elastic stress in vivo, *Langmuir* 24 (2008) 11743e11751, <http://dx.doi.org/10.1021/la8017612>.
- [29] T. Hamouda, J.R. Baker Jr., Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli, *J. Appl. Microbiol.* 89 (2000) 397e403, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01127.x>.
- [30] J. Hoque, P. Akkapeddi, V. Yarlagadda, D.S. Uppu, P. Kumar, J. Haldar, Cleavable cationic antibacterial amphiphiles: synthesis, mechanism of action, and cytotoxicities, *Langmuir* 28 (2012) 12225e12234, <http://dx.doi.org/10.1021/la302303d>.
- [31] S. Ishikawa, Y. Matsumura, K. Katoh-Kubo, T. Tsuchido, Antibacterial activity of surfactants against *Escherichia coli* cells is influenced by carbon source and anaerobiosis, *J. Appl. Microbiol.* 93 (2002) 302e309, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01690.x>.
- [32] A. Laatiris, M. El Achouri, M.R. Infante, Y. Bensouda, Antibacterial activity, structure and CMC relationships of alkanediyl alpha,omega-bis(dimethylammonium bromide) surfactants, *Microbiol. Res.* 163 (2008) 645e650, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.09.006>.
- [33] D.B. Vieira, A.M. Carmona-Ribeiro, Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action, *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2006) 760e767, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl312>.
- [34] M.J. Weiss, J.R. Wong, C.S. Ha, R. Bleday, R.R. Salem, G.D. Steele, L.B. Chen, Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective mitochondrial accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 5444e5448.
- [35] A.I. García-Pérez, E. Galeano, E. Nieto, P. Sancho, Dequalinium induces human leukemia cell death by affecting the redox balance, *Leuk. Res.* 35 (2011) 1395e1401, <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.03.012>.
- [36] W.S. Liu, C.H. Wang, J.F. Sun, G.G. Hou, Y.P. Wang, R.J. Qu, Synthesis, characterization and antibacterial properties of dihydroxy quaternary ammonium salts with long chain alkyl bromides, *Chem. Biol. Drug Des.* 85 (2015) 91e97, <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12427>.
- [37] E. Rachaman, E. Heldman, G. Amitai, R. Adani, Pyridinium Derivatives and Pharmaceutical Compositions Containing Them, World Intellectual Property Organization, 1997. [http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=QA&NR=2230578A1&KC=1/4A1&FT=D&ND=1&date=19970306&DB=&4class=en\\_1P](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=QA&NR=2230578A1&KC=1/4A1&FT=D&ND=1&date=19970306&DB=&4class=en_1P).
- [38] C.A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discov. Today Technol.* 1 (2004) 337e341, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- [39] H. Kalasz, R. Dolezal, K. Tekes, K. Magyar, T. Csermely, S. Hosztafi, Comparative lipophilicity of morphine derivatives, JPC-J. Planar Chromatogr. Mod. TLC 28 (2015) 126e132, <http://dx.doi.org/10.1556/JPC.28.2015.2.7>.
- [40] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 46 (2001) 3e26, [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- [41] D. Eros, I. Kovessdi, L. Orfi, K. Takacs-Novak, G. Acsady, G. Keri, Reliability of logP predictions based on calculated molecular descriptors: a critical review, *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 1819e1829, <http://dx.doi.org/10.2174/0929867023369042>.
- [42] R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I.V. Tetko, Calculation of molecular lipophilicity: state-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 861e893, <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21494>.
- [43] S. Martel, F. Gillerat, E. Carosati, D. Maiarelli, I.V. Tetko, R. Mannhold, P.A. Carrupt, Large, chemically diverse dataset of logP measurements for benchmarking studies, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2013) 21e29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.10.019>.
- [44] J.Z. Karasova, M. Pohanka, K. Musilek, F. Zemek, K. Kuca, Passive diffusion of acetylcholinesterase oxime reactivators through the blood-brain barrier: influence of molecular structure, *Toxicol. Vitro* 24 (2010) 1838e1844, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.009>.
- [45] MarvinSketch 14.9.8.0, ChemAxon, 2014. <http://www.chemaxon.com>.
- [46] R. Collander, The partition of organic compounds between higher alcohols and water, *Acta Chem. Scand.* 5 (1951) 774e780.
- [47] E. Tomlinson, Chromatographic hydrophobic parameters in correlation analysis of structure-activity relationships, *J. Chromatogr. A* 113 (1975) 1e45, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88797-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88797-X).
- [48] D. Malinak, R. Dolezal, J. Marek, S. Salajkova, O. Soukup, M. Vejsova, J. Korabecny, J. Honegr, M. Penhaker, K. Musilek, K. Kuca, 6-Hydroxyquinolinium salts differing in the length of alkyl side-chain: synthesis and antimicrobial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 5238e5241, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.060>.
- [49] K. Kuca, J. Marek, P. Stodulka, K. Musilek, P. Hanusova, M. Hrabivova, D. Jun, Preparation of benzalkonium salts differing in the length of a side alkyl chain, *Molecules* 12 (2007) 2341e2347, <http://dx.doi.org/10.3390/12102341>.
- [50] J. Marek, P. Stodulka, J. Cabal, O. Soukup, M. Pohanka, J. Korabecny, K. Musilek, K. Kuca, Preparation of the pyridinium salts differing in the length of the N-alkyl substituent, *Molecules* 15 (2010) 1967e1972, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15031967>.
- [51] J. Marek, D. Malinak, R. Dolezal, O. Soukup, M. Pasdiorova, M. Dolezal, K. Kuca, Synthesis and disinfection effect of the pyridine-4-aldoxime based salts, *Molecules* 20 (2015) 3681e3696, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20033681>.
- [52] J. Pernak, M. Branicka, The properties of 1-alkoxymethyl-3-hydroxypyridinium and 1-alkoxymethyl-3-dimethylaminopyridinium chlorides, *J. Surfactants Deterg.* 6 (2003) 119e123, <http://dx.doi.org/10.1007/s11743-003-0254-5>.
- [53] D. Jacquemin, T. Le Bahers, C. Adamo, I. Ciofini, What is the "best" atomic charge model to describe through-space charge-transfer excitations? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 5383e5388, <http://dx.doi.org/10.1039/c2cp40261k>.
- [54] T. Seidler, B. Champagne, Which charge definition for describing the crystal polarizing field and the chi(1) and chi(2) of organic crystals? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 19546e19556, <http://dx.doi.org/10.1039/c5cp03248b>.
- [55] G.W.T.M.J. Frisch, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, J.R.C.M.A. Robb, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, H.N.G.A. Petersson, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, J.B.A.F. Izmaylov, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, K.T.M. Ehara, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, O.K.Y. Honda, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., F.O.J.E. Peralta, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, V.N.S.K.N. Kudin, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, A.R.K. Raghavachari, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, N.R.M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, C.A.V. Bakken, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, A.J.A.O. Yazyev, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, K.M.R.L. Martin, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, J.J.D.P. Salvador, S. Dapprich, A.D. Daniels, J.B.F.O. Farkas, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
- [56] P. Gramatica, Principles of QSAR models validation: internal and external, *QSAR Comb. Sci.* 26 (2007) 694e701, <http://dx.doi.org/10.1002/qsar.200610151>.
- [57] P. Gramatica, E. Gianini, E. Papa, Statistical external validation and consensus modeling: a QSPR case study for  $K_{oc}$  prediction, *J. Mol. Graph. Model* 25 (2007) 755e766, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.06.005>.
- [58] A. Tropsha, Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation, *Mol. Inf.* 29 (2010) 476e488, <http://dx.doi.org/10.1002/minf.201000061>.
- [59] Talete srl, Dragon (Software for Molecular Descriptor Calculation), 2015. <http://www.talete.mi.it/>.
- [60] R. Dolezal, A. Bodnarova, R. Cimler, M. Husakova, L. Najman, V. Racakova, J. Krenek, J. Korabecny, K. Kuca, O. Krejcar, Variable elimination approaches for data-noise reduction in 3D QSAR calculations, in: F. Pereira, P. Machado, E. Costa, A. Cardoso (Eds.), *Prog. Artif. Intell. 17th Port. Conf. Artif. Intell. EPIA 2015 Coimbra Port. Sept. 8-11 2015 Proc.*, Springer International Publishing, 2015, pp. 313e325. *Cham*, 2015: pp. 313-325, [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23485-4\\_33](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23485-4_33).
- [61] R. Dolezal, K. Waisser, E. Petrilkova, J. Kunes, L. Kubickova, M. Machacek, J. Kaustova, H.M. Dahse, N-Benzylsalicylthioamides: highly active potential antituberculous, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 342 (2009) 113e119, <http://>

- [dx.doi.org/10.1002/ardp.200800032](http://dx.doi.org/10.1002/ardp.200800032).
- [62] P. Sahariah, V.S. Gaware, R. Lieder, S. Jonsdottir, M.A. Hjalmarsdottir, O.E. Sigurjonsson, M. Masson, The effect of substituent, degree of acetylation and positioning of the cationic charge on the antibacterial activity of quaternary chitosan derivatives, *Mar. Drugs* 12 (2014) 4635e4658, <http://dx.doi.org/10.3390/md12084635>.
- [63] M. Skořibušić, R. Odžak, Z. Štefanić, I. Križić, L. Krišto, O. Jović, T. Hrenar, I. Primožić, D. Jurasin, Structure-property relationship of quinuclidinium surfactants: Towards multifunctional biologically active molecules, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 140 (2016) 548e559, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.023>.
- [64] O. Soukup, R. Dolezal, D. Malinák, J. Marek, S. Salajkova, M. Pasdiorova, J. Honegr, J. Korabecny, P. Nachtigal, F. Nachon, D. Jun, K. Kuca, Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxy-isoquinolinium salt series: the effect of the hydroxyl moiety, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 841e848, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.006>.
- [65] H. Fürst, H.J. Dietz, Langkettige Pyridinderivate und ihre tertiären Imoniumsalze, *J. Für Prakt. Chem.* 4 (1956) 147e160, <http://dx.doi.org/10.1002/prac.19560040308>.
- [66] V. Gani, Inhibition de l'hydrolyse alcaline de l'acetate de p-nitrophenyle par des micelles hydroxylees derivees d'un sel de pyridinium, *Tetrahedron Lett.* 18 (1977) 2277e2280, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)83740-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(01)83740-0).
- [67] T. Asahara, M. Tomita, On the reaction between furfural and amines I, *J. Oil Chem. Soc.* 3 (1954) 216e219, <http://dx.doi.org/10.5650/jos1952.3.216>.
- [68] Spartan '14, Wavefunction Inc., Irwine, California, USA, 2014.
- [69] L.O. Ferreira, A.C.C. Lemos, F.G.E. Nogueira, I.R. Guimaraes, M.C. Guerreiro, M.V.J. Rocha, R.M.L. Savedra, P. Hammer, A.D.B. Brito, E.F.F. da Cunha, J.P. Silva, T.C. Ramalho, Degradation of organic compounds in a fenton system based on chitosan/Fe0/Fe2O3 composites: a theoretical and experimental study, *J. Iran. Chem. Soc.* 13 (2015) 377e386, <http://dx.doi.org/10.1007/s13738-015-0746-1>.
- [70] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: fast, flexible, and free, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1701e1718, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20291>.
- [71] O. Berger, O. Edholm, F. Jähnig, Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature, *Biophys. J.* 72 (1997) 2002, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78845-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78845-3).
- [72] D.P. Tieleman, M.S.P. Sansom, H.J.C. Berendsen, Alamethicin helices in a bilayer and in solution: molecular dynamics simulations, *Biophys. J.* 76 (1999) 40e49, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77176-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77176-6).