



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00319

(22) Data de depozit: 30/05/2019

(41) Data publicării cererii:
30/09/2020 BOPI nr. 9/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN
BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR.37,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VLAD ILINCA MARGARETA,
CALEA DOROBANȚILOR NR.74, BL.13,
SC.3, ET.8, AP.75, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• LIMBAN CARMEN, STR. RĂSCOALA DIN
1907 NR.11, BL.16, SC.5, ET.2, AP.178,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MISSIR ALEXANDRU VASILE,
STR.TURDA NR.106, BL.32, SC.2, ET.6,
AP.78, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• MORUSCIAG LAURENȚIU,
BDUL.ION MIHALACHE, NR.115, BL.10A2,
SC.A, ET.3, AP.8, SECTOR 1, BUCUREȘTI,
B, RO;
• NUȚĂ DIANA CAMELIA,
ȘOS.ANTIAERIANĂ 6A24, BL.C3, AP.19,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• DUMITRAȘCU FLOREA,
ALEEA ȘCOLARILOR NR.10, BL.S24, ET.9,
AP.47, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• POPA MARCELA, STR. VLĂDEASA
NR. 8, BL. C48, SC. A, ET. 4, AP. 57,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MĂRUȚESCU LUMINIȚA GABRIELA,
ALEEA LT. GHEORGHE STĂLPEANU,
NR.2, BL.2, SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CĂPROIU MIRON TEODOR,
ALEEA BĂIUȚ NR.13, BL.A 34, SC.A, ET.3,
AP.12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• DINU PÎRVU CRISTINA ELENA,
STR.GH.LAZĂR, NR.10, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• COSTEA TEODORA, ȘOS.VIILOR, NR.95,
BL.102, SC.3, ET.3, AP.79, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ANCUCEANU VIOREL ROBERT,
STR.MOȚOC NR.2, BL.P3, SC.3, ET.4,
AP.72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• GÎRD CERASELA ELENA, STR.
PODARULUI NR. 6 BL. F3 SC. 1 AP. 13
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• ANUȚA VALENTINA, STR. ROTUNDĂ
NR.4, BL.Y1, SC.Z, ET.1, AP.10,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• VELESCU BRUNO ȘTEFAN,
STR.NEAGOE VODĂ NR.53, BACĂU, BC,
RO

(54) DERIVATI AI O - ARIL- CARBAMOIL - OXIMINO -
FLUORENULUI, COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ
CE ÎI CONȚINE ȘI UTILIZAREA ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor compuși derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui utilizați în compoziții farmaceutice. Procedeu, conform invenției, constă în refluxarea 9-fluorenonei cu clorhidrat de hidroxilamină în raport molar 1:1, 3, în mediu de reacție metanol, rezultând fluoren-9-on-oximă care este refluxată cu arilizocianați, în raport 1:1 în mediu de

reacție tetrahidrofuran anhidru, rezultând derivați cu formula 1a-d, în care R= fenil mono -sau disubstituit, compușii având toxicitate scăzută, fiind destinați tratamentului bactericid, fungicid și antibiofilm.

Revendicări: 5

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui, compoziție farmaceutică ce îi conține și utilizarea acestora

Invenția se referă la noi compuși din clasa O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui și la un procedeu de preparare a acestora, compuși cu efect bactericid, fungicid și antibiofilm.

În ultimii ani, emergența fenomenelor de rezistență și de multirezistență la substanțele antimicrobiene cunoscute și apariția de noi agenți etiologici, au determinat intensificarea preocupărilor pentru găsirea de noi agenți antimicrobieni, aceasta reprezentând și o provocare pentru a identifica noi strategii de tratament al bolilor infecțioase, cum ar fi inhibarea expresiei factorilor de virulență.

Rezistența la antibiotice nu poate fi eliminată prin introducerea pe piață de noi analogi ai antibioticelor existente, ci este necesară găsirea unor antibiotice cu structuri noi. Ca urmare, dezvoltarea unor molecule prototip, cu structură originală, care să contribuie la diminuarea riscului permanent al apariției rezistenței microbiene, constituie, la nivel mondial, o direcție prioritară a cercetării de noi chimioterapice antimicrobiene cu eficacitate maximă și toxicitate scăzută, care să reprezinte soluții terapeutice eficiente în cazul infecțiilor cu microorganisme MDR (*multidrug-resistant*), XDR (*extensively drug-resistant*) și PDR (*pandrug-resistant*) și, în același timp, să prevină riscul permanent de urgență a noi mecanisme de rezistență.

Necesitatea stringentă a descoperirii unor noi compuși cu eficiență antimicrobiană ridicată derivă și din faptul că studii recente apreciază că în curând omenirea ar putea rămâne fără antibiotice eficiente, întrucât acestea nu sunt folosite judicios.

Rezultatele încurajatoare ale cercetărilor efectuate pe compuși cu nucleu fluorenic, precum și faptul că grupele farmacofore carbamoil și oximinică sunt prezentate în literatura de specialitate, ca având certe calități farmacologice, ne-au determinat să reunim aceste fragmente biologic active într-o singură moleculă originală.

Fluorenil, o hidrocarbură aromatică tricyclică, se întâlnește în structura unor medicamente cum ar fi lumefantrinul (antimalaric), imirestatul (inhibitor al aldozreductazei), cicloprofenul (analgezic, antiinflamator), renitolinul (analgezic, antiinflamator), aminocarbofluorenil (spasmolitic), indecainida (antiaritmie), bromura de hexafluroniu (miorelaxant).

Pe plan mondial, se cunosc studii întreprinse în domeniul obținerii unor noi agenți antimicrobieni din clasa derivaților cu nucleu fluorenic.

O serie de noi derivați ai fluorenilui au fost obținuți folosind ca intermediar de bază N-octadecil-9-oxo-9H-fluorenil-4-carboxamida. Derivații sintetizați reacționează cu oxid de propilenă rezultând compuși cu bune proprietăți de suprafață. Degradarea biologică a acestor

agenți tensioactivi bazați pe fluoren a fost mai mare de 96%, după 7 zile. Majoritatea compușilor prezintă efecte inhibitorii variabile pe tulpini bacteriene Gram- pozitive (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) și Gram- negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*), precum și față de tulpini fungice (*Aspergillus niger*, *Candida albicans* și *Curvularia sp.*). Prin urmare, acești compuși pot fi considerați agenți cu funcții multiple, cu aplicații potențiale ca agenți de umectare, vopseluri, medicamente, emulsifianți moderați, detergenți de uz casnic, în industria cosmetică și textilă [El-Sayed R., Althagafi I. I., Ahmed S.A. Fluorene derivatives with multi-addressable properties: synthesis, characterization, and reactivity. J Surfact Deterg., 2017, 20(3), DOI 10.1007/s11743-017-1958-4].

Derivați ai (fluoren-2-il)(3-fenilbicio[2.2.1]hept-5-en-2-il)metanonei, care au radicalul fenil substituit cu diverși atomi sau grupe funcționale, au fost obținuți prin reacția Diels-Alder și au prezentat proprietăți antimicrobiene și antioxidante evaluate *in vitro* [Thirunarayanan G. The *in-vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some Diels-Alder diaryl methanone adducts. J. Pharm. Appl. Chem., 2017, 3(1), 19-26].

Dintre derivații 2-(9*H*-fluoren-9-il-metoxicarbonilamino)-propionatului de 3-(2-clorochinolin-3-il)-izoxazol-5-il-metil, având nucleul chinolinic 2-substituit cu diverși radicali, compușii cu grupe -SH și -SeH au prezentat o bună activitate antibacteriană față de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Bacillus subtilis*), în comparație cu standardul de ciprofloxacina [Sharath N., Halehatty S. Bhojya Naik, Vinay Kumar B., Hoskeri J. Synthesis, antibacterial, molecular docking, DNA binding and photonuclease activity of quinoline isoxazoles. Der Pharmacia Sinica, 2012, 3 (2), 254-265].

Fluorenonele au diverse aplicații terapeutice. Astfel, tilorona și fluorenalul au proprietăți antivirale, benfluronul este antineoplazic, iar fluodipinul este cardiodepresiv. Clasa 9-fluorenonelor conține numeroase substanțe potențial active, care pot fi studiate pentru optimizarea unor molecule lider.

Studiul influenței tiloronei (2,7-bis(2-dietilaminoetoxi)fluoren-9-ona) asupra activității DnaG primazei de *Staphylococcus aureus* a arătat că aceasta este inhibată de tiloronă, deși nu s-a observat inhibarea creșterii agentului patogen menționat în prezența acestui compus. Au fost efectuate modulări structurale, cu scopul de a facilita difuzia compusului în celula bacteriană, pentru a inhiba creșterea bacteriană și, de asemenea, pentru a identifica un compus lider promițător. Astfel, au fost sintetizați diferiți derivați ai 9-fluorenonei, folosind ca model structural tilorona, adăugându-se lanțuri hidrocarbonate cu lungimi și cu grupe terminale diferite. Acești compuși au fost testați față de bacterii Gram-pozitive și negative, iar unii dintre ei au prezentat o concentrație minimă inhibitorie relativ scăzută pe *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA), *Burkholderia*

thailandensis și *Francisella tularensis*. Rezultatele demonstrează, de asemenea, că distribuția tiloronei poate fi îmbunătățită modificând suplimentar lungimea lanțului, compușii rezultați putând fi utilizați ca molecule prototip pentru a proiecta și dezvolta în viitor, inhibitori mai puternici și mai eficienți ai acestor agenți patogeni [Choi S., Larson M. A., Hinrichs S. H., Narayanasamy P. Development of potential broad spectrum antimicrobials using C2-symmetric 9-fluorenone alkyl amine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, 26, 1997-1999].

Pornind de la 9-fluorenonă, s-au sintetizat baze Schiff care au fost investigate pentru activitatea lor biologică și au fost efectuate studii *in silico* de andocare moleculară cu proteina țintă, reprezentată de catalaza din *Proteus mirabilis*. Dintre compuși, N, N'-bis-fluoren-9-iliden-etan-1,2-diamina prezintă cel mai mare scor de andocare (81,947). Unii dintre compuși au prezentat activitate antimicrobiană față de tulpinile de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* și *Klebsiella pneumoniae* comparabilă cu antibioticul standard, streptomycină, la o concentrație de 100 μg/ mL [Venkatesan K., Dhivya S., Rethavathi J., Narasimhan S. Preparation of various Schiff's bases of 9-fluorenone and its biological application. *J.Chem. Pharm.Res.*, 2012, 4(10), 4477-4483].

A fost sintetizată o serie nouă de 2,7-diamidofluorenone, studiul arătând că unii compuși prezintă o bună activitate antiproliferativă, fiind inhibitori de topoizomerază de tip I. S-a constatat că introducerea grupei alchil liniare în lanțurile laterale a determinat o mai bună activitate antiproliferativă, în comparație cu introducerea unei grupe alchil ramificată sau a unei grupe voluminoase. Comparativ cu grupele amino terțiare, prezența grupelor amino secundare în lanțurile laterale a crescut activitatea antiproliferativă. Rezultatele au indicat faptul că fragmentul de fluorenonă ar putea fi un potențial farmacofor pentru proiectarea de compuși antitumorali, din clasa inhibitorilor de topoizomerază IB [Lee C.-C., Chang D.-M., Huang K.-F., Chen C.-L., Chen T.-C., Lo Y., Guh J.-H., Huang H.-S. Design, synthesis and antiproliferative evaluation of fluorenone analogs with DNA topoisomerase I inhibitory properties. *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 7125- 7133].

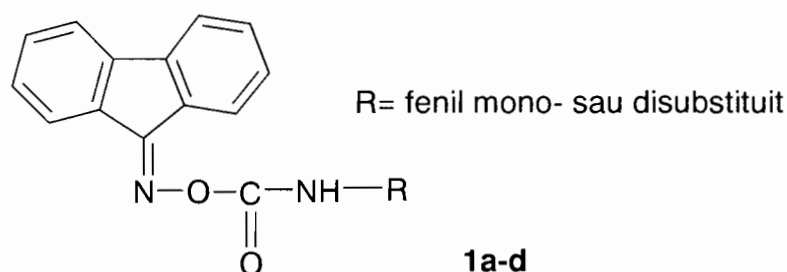
Alegerea fragmentului carbamoiloximinic în structura compușilor care fac obiectul acestui brevet, se bazează și pe faptul că acest fragment se regăsește în structura altor compuși cu acțiune antibacteriană și antifungică, cum ar fi N-R-carbamoil-2-adamantanoxime [Georgiev V. S., Saeva G. A. 2-Adamantanone oxide carbamate derivatives; brevet SUA 4652680, 1987, 24 martie] sau antimicobacteriană, N,N-dimetilcarbamoiloxima 2-bromo-6-R-indeno[2,1-c]chinolin-7-unei [Upadhayaya R. S., Lahore S. V., Sayyed A. Y., Dixit S. S., Shinde P. D., Chattopadhyay J. Conformationally-constrained indeno[2,1-c]quinolines – a new class of anti-mycobacterial agents. *Org. Biomol. Chem.*, 8 (2010), 2180- 2197] sau se întâlnește și în structura unor compuși consacrați ca acaricide, insecticide și/ sau nematocide (alanicarb, aldicarb, aldoxicarb, tirpate, oxamil), precum și la pesticide,

cum sunt derivații N-metil-N-[(*tert*-butilfenil)sulfenil]carbamoiloximelor [Durdin Jr. J. A., Sousa A. A. Tertiary butyl substituted carbamoyl oxime pesticides, US Patent 3998963, 1976, 21 december].

Această caracteristică structurală de oximă carbamat, prezentă în molecula unor compuși, contribuie la îmbunătățirea proprietăților lor farmacologice și farmacocinetice [Ray S., Pathak S. R., Chaturvedi D. Organic carbamates in drug development. Part II: antimicrobial agents - recent reports. *Drugs. Fut.* 2005, 30, 161].

Problema pe care invenția de față o rezolvă, constă în sintetizarea unor noi compuși din clasa O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui cu efect bactericid, fungicid și antibiofilm.

Invenția de față se referă la derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui cu următoarea formulă generală, selectați dintre **1a-d**, în care sunt asociate într-o singură moleculă mai multe fragmente farmacofore (sistemul triciclic fluorenic, grupele carbamoil și oximinică):



1a (R= -C₆H₅): 9-(fenilcarbamoiloximino)fluoren

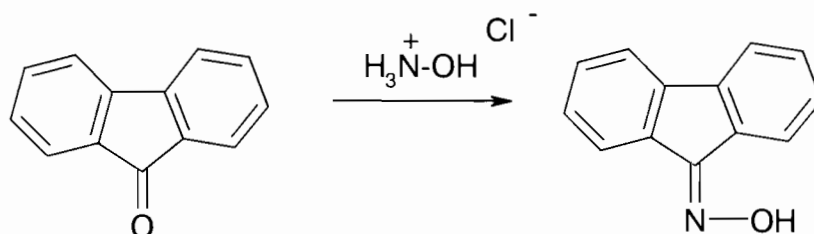
1b (R= -C₆H₄(CH₃)(3)): 9-((3-metil-fenil)carbamoiloximino)fluoren

1c (R= -C₆H₄(Cl)(3)): 9-((3-cloro-fenil)carbamoiloximino)fluoren

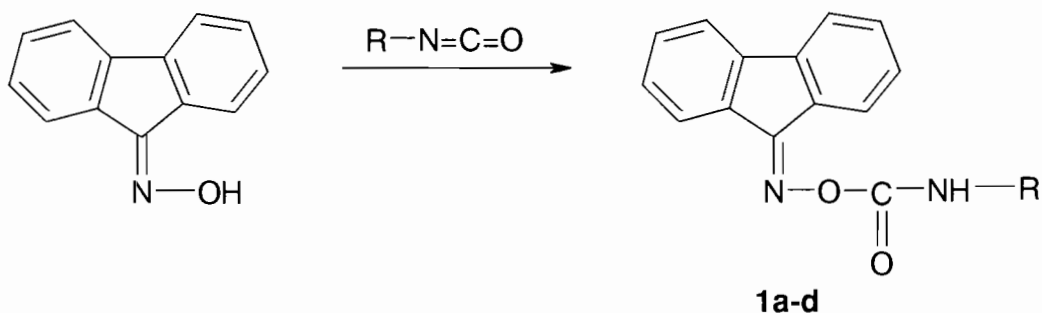
1d (R= -C₆H₄(Cl)₂(3,4)): 9-((3,4-dicloro-fenil)carbamoiloximino)fluoren

Un alt obiect al invenției constă într-un procedeu de obținere a derivaților O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui definiți ca mai sus, care cuprinde următoarele etape:

a. prepararea fluoren-9-on-oximei, prin refluxarea 9-fluorenonei cu clorhidrat de hidroxilamină, în raport molar de 1: 1,3, mediul de reacție fiind metanolul:



b. prepararea noilor derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilului prin refluxarea fluoren-9-on-oximei cu arilizocianați, în raport molar de 1: 1, mediul de reacție fiind tetrahidrofuranul anhidru:



R= -C₆H₅ (**1a**), -C₆H₄(CH₃)(3) (**1b**), R= -C₆H₄(Cl)(3)(**1c**), -C₆H₄(Cl)₂(3,4)(**1d**)

Avantajul compușilor conform invenției, constă în faptul că cei mai mulți dintre aceștia exercită o activitate antibiofilm pe bacterii și pe levuri, având o valoare a concentrației minime de eradicare a biofilmului (CMEB) cuprinsă între 0,09- 5 mg/ mL.

S-au stabilit condițiile optime de reacție pentru a obține noii compuși cu puritate ridicată și cu randamente bune.

Noii compuși **1a-d** au fost caracterizați prin constantele lor fizice (temperatură de topire, solubilitate).

Punctele de topire au fost determinate pe un aparat Electrothermal 9100 (Bibby Scientific Ltd., Stone, Marea Britanie), în capilare deschise.

Structurile compușilor originali și ale compușilor intermediari au fost stabilite prin analize spectrale IR, ¹H-RMN și ¹³C-RMN. Deplasările chimice pentru atomii de hidrogen și carbon, au fost confirmate, de asemenea, prin experimente 2D-RMN.

Spectrele IR au fost înregistrate pe un spectrometru FT-IR Bruker Vertex 70 (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA).

Spectrele ¹H-RMN și ¹³C-RMN au fost înregistrate în cloroform deuterat (CDCl₃) sau DMSO-d₆, pe un instrument Bruker FOURIER 300 MHz (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), operând la 300,0 MHz pentru ¹H-RMN și la 75,0 MHz pentru ¹³C-RMN și pe un instrument Bruker AvanceIII 500 MHz (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), ce operează la 500 MHz pentru proton și 125 MHz pentru carbon).

În spectrele RMN, deplasările chimice au fost înregistrate ca valori δ, în părți per milion (ppm), față de tetrametilsilan ca standard intern, iar constantele de cuplare (J) în Hertz. Sunt utilizate abrevierile standard care indică multiplicitatea semnalelor, după cum urmează: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet), dd (dublu dublet), td (triplu dublet) și l (semnal

lățit). Datele $^1\text{H-RMN}$ sunt raportate în următoarea ordine: deplasări chimice, multiplicitate, constantele de cuplare, numărul de protoni și atribuirea semnalului/ atom.

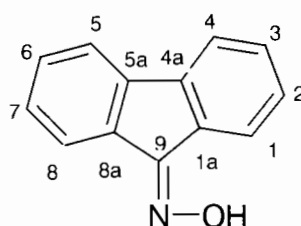
Pentru datele $^{13}\text{C-RMN}$ ordinea este următoarea: deplasări chimice și atribuirea semnal/ atom.

Rezultatele obținute cu ajutorul analizei spectrale confirmă atât structura noilor compuși și a intermediarilor utilizați, cât și sintezele efectuate.

În cele ce urmează vor fi prezentate 8 exemple de realizare a invenției.

EXEMPLUL 1

Fluoren-9-on-oxima (N-fluoren-9-ilidenhidroxilamina)



Într-un balon cu fund rotund și 4 găuri, prevăzut cu agitator, termometru, refrigerent ascendent și pâlnie de picurare, se introduc 5g de 9-fluorenonă (Mr 180,19)(0,028 moli) dizolvate în 20 mL metanol, peste care se adaugă treptat, sub agitare, 5,5 g de hidroxid de sodiu (Mr 39,99). Peste acest amestec se aduce treptat, în picătură, sub agitare și la 75- 80 $^{\circ}\text{C}$, 2,5g de clorhidrat de hidroxilamină (Mr 69,49)(0,036 moli), dizolvat în 10 mL metanol. După ce s-a adăugat hidroxilamina în metanol, amestecul de reacție se refluxează timp de 5 ore. După răcirea acestuia la temperatura camerei se adaugă treptat, până la pH 8, un amestec format din 12,5 mL acid clorhidric și 27 mL apă, când precipită oxima. Se agită o oră la temperatura camerei, apoi se filtrează oxima la presiune scăzută și se spală bine pe filtru cu apă. După izolarea precipitatului acesta se usucă și apoi se purifică din xilen.

Rezultă 4,80 g compus (Mr 195,22), cristalizat, galben, cu randament 88,5% față de 9-fluorenonă, T.t. 194,3- 195,2 $^{\circ}\text{C}$, solubil la rece în acetat de etil, DMF, DMSO, piridină și la cald în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, cloroform și xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii compusului conform invenției

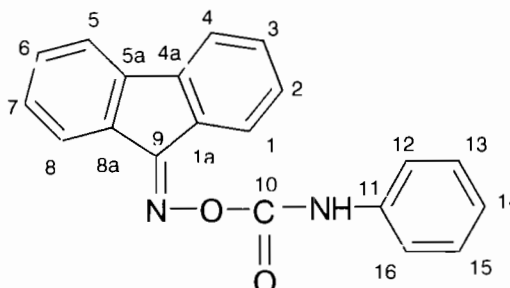
$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 12,58 (s, N-OH); 8,37 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H-1); 7,90 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H-4); 7, 85 (d, $J = 7,6$, Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,73 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,32-7,54 (m, 4H, H-2, H-3, H-6, H-7)

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 150,96 (C-9); 140,13 (C-4a); 139,25 (C-5a); 135,28 (C-8a); 130,73 (C-1a); 129,65 (C-6 sau C-7); 129,60 (C-6 sau C-7); 128,48 (C-1); 128,35 (C-2); 127,98 (C-3); 120,80 (C-4); 120,38 (C-5 sau C-8); 120,31 (C-5 sau C-8)

FT-IR (solid in ATR, ν cm^{-1}): 3166w; 3039w; 2617m; 1642m; 1603m; 1588vs; 1485s; 1433m; 1319m; 1167s; 1090m; 1001s; 947s; 873s; 737w; 676vs; 621vs.

EXEMPLUL 2

9-(fenilcarbamoiloximino)fluoren (1a)



Într-un balon cu fund rotund se introduc 0,59 g de fluoren-9-on-oxima (Mr 195,22) (0,003 moli) solubilizată în 10 mL tetrahidrofuran anhidru. Peste această soluție se adaugă o soluție formată din 0,36 g izocianat de fenil (Mr 119,12) (0,003 moli) în 10 mL tetrahidrofuran anhidru. Amestecul de reacție se refluxează pe baia de apă timp de 52 ore. După expirarea timpului se răcește și se evaporă solventul la presiune scăzută. Produsul obținut se purifică din acetat de etil.

Rezultă 0,60 g compus (Mr 314,33) cristalizat, galben, cu randament 63,2% față de oximă, T.t. 156,9- 159 $^{\circ}\text{C}$, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, cloroform și la cald în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, acetat de etil, xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

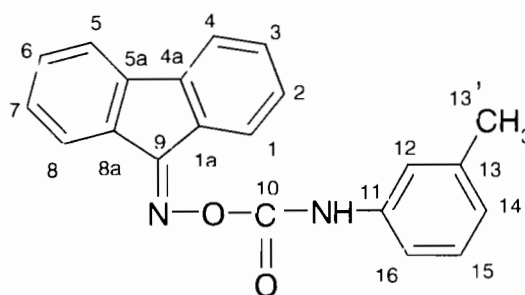
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8,56 (sl, 1H, NH); 8,46 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-1); 7,79 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-4); 7,61- 7,56 (m, 4H, H-5, H-8, H-12, H-16); 7,45 (td, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,0$ Hz, 1H, H-6 sau H-7); 7,44 (td, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,1$ Hz, 1H, H-7 sau H-6); 7,41 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, H-13, H-15); 7,32 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-2); 7,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-3); 7,16 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-14).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm): 155,97 (C-9); 151,75 (C-10); 142,31 (C-4a); 141,47 (C-5a); 136,80 (C-8a); 133,93 (C-1a); 132,84 (C-6 sau C-7); 131,82 (C-6 sau C-7); 130,99 (C-1); 129,72 (C-11); 129,17 (C-13, C-15); 128,83 (C-2); 128,23 (C-3); 124,48 (C-14); 122,55 (C-4); 120,33 (C-5 sau C-8); 120,16 (C-5 sau C-8); 119,79 (C-12, C-16).

FT-IR (solid in ATR, ν cm^{-1}): 3267m; 3138w; 3064w; 2962w; 1724vs; 1603s; 1543vs; 1501m; 1446s; 1315m; 1208vs; 1017m; 952vs; 837w; 809w; 788w; 749m; 729m; 688m; 646w.

EXEMPLUL 3

9-((3-metil-fenil)carbamoiloximino)fluoren (1b)



Compusul a fost preparat prin metoda de mai sus, necesitând 0,399 g izocianat de 3-metilfenil (Mr 133,15, $d_4^{20} = 1,033$; 0,003 moli).

S-au obținut 0,56 g de compus (Mr 328,36) după recristalizare din acetat de etil, cu randament 56,4% față de oximă, T.t. 171,2- 174,3 °C, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, cloroform și la cald în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, acetat de etil, xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

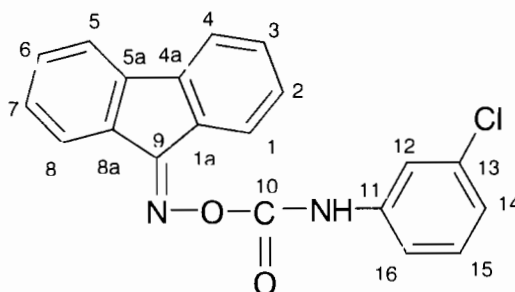
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8,51 (sl, 1H, NH); 8,48 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-1); 7,81 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-4); 7,60 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,59 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,48 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-6 or H-7); 7,45 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-6 sau H-7); 7,41 (sl, 1H, H-12); 7,40 (d, 1H, H-16); 7,34 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-2 sau H-3); 7,31 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-2 sau H-3); 7,28 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-15); 6,99 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-14); 2,40 (s, 3H, H-13').

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm): 155,92 (C-9); 151,72 (C-10); 142,34 (C-4a); 141,51 (C-5a); 139,14 (C-13); 136,71 (C-8a); 134,00 (C-1a); 132,85 (C-6 sau C-7); 131,92 (C-11); 131,80 (C-6 sau C-7); 131,08 (C-1); 129,00 (C-2); 128,86 (C-15); 128,25 (C-3); 125,32 (C-14); 122,58 (C-4); 120,43 (C-16); 120,34 (C-5 sau C-8); 120,17 (C-5 sau C-8); 116,91 (C-12); 21,50 (C-13').

FT-IR (ATR in solid, ν cm^{-1}): 3259m; 3149w; 3084w; 3054w; 3022w; 2920w; 1729vs; 1613s; 1555s; 1491m; 1449m; 1316m; 1211vs; 1169m; 1155m; 1028m; 968s; 900s; 780m; 728m; 690m.

EXEMPLUL 4

9-((3-cloro-fenil)carbamoiloximino)fluoren (1c)



Sinteza urmează procedura descrisă pentru prepararea compusului de la exemplul 2, utilizând 0,46 g izocianat de 3-clorofenil ($M_r = 153,57$, $d_4^{20} = 1,269$; 0,003 moli).

Au rezultat 0,7 g de compus ($M_r 348,77$), după recristalizare din acetat de etil, cu randament 66,4% față de hidrazidă, T.t. 155,7- 158,3 °C, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, cloroform și la cald în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, acetat de etil, xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

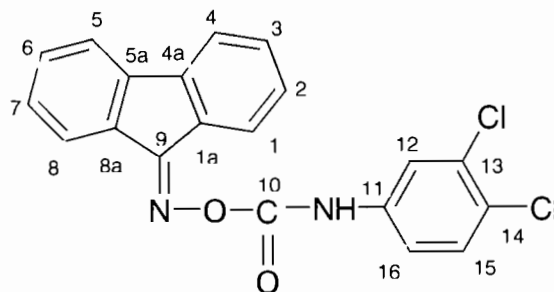
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8,59 (sl, 1H, NH, deuterabile); 8,60 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-1); 7,82 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-4); 7,66 (t, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-12); 7,59 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,58 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,56 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-6 sau H-7); 7,54 (m, 1H, H-14); 7,50 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-6 sau H-7); 7,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-2 sau H-3); 7,37 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-2 sau H-3); 7,36 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-15); 7,19 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-16).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm): 156,31 (C-9); 151,16 (C-10); 142,45 (C-4a); 141,60 (C-5a); 138,02 (C-8a); 134,88 (C-13); 133,83 (C-1a); 133,08 (C-6 sau C-7); 132,04 (C-6 sau C-7); 131,13 (C-1); 130,30 (C-15); 129,73 (C-11); 128,96 (C-2); 128,34 (C-3); 124,57 (C-16); 122,64 (C-4); 120,45 (C-5 sau C-8); 120,28 (C-5 sau C-8); 119,80 (C-12); 117,74 (C-14).

FT-IR (ATR in solid, ν cm^{-1}): 3251w; 3189w; 3125w; 3081w; 2962w; 1728vs; 1596vs; 1545s; 1481m; 1450m; 1415w; 1306m; 1204vs; 1022m; 968vs; 874s; 812w; 779m; 726m; 682m.

EXEMPLUL 5

9-((3,4-dicloro-fenil)carbamoiloximino)fluoren (1d)



S-a urmat aceeași procedură de sinteză ca în cazul compusului de la exemplul 2, folosind 0,564 g izocianat de 3,4-diclorofenil (Mr 188,01; 0,003 moli).

Se obțin 0,75 g de compus (Mr 383,23), după purificare din acetat de etil, cu randament de 64,8% față de oximă, T.t. 157,9- 161,2 °C, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, cloroform și la cald în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, acetat de etil, xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

¹H-RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8,60 (sl, 1H, NH, deuterabile); 8,53 (d, J = 7,7 Hz, 1H, H-1); 7,80 (d, J = 7,7 Hz, 1H, H-4); 7,78 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-12); 7,62 (d, J = 7,2 Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,61 (d, J = 7,2 Hz, 1H, H-5 sau H-8); 7,43- 7,51 (m, 4H, H-6, H-7, H-15, H-16); 7,35 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H-2); 7,32 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H-3).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ ppm): 156,53 (C-9); 151,45 (C-10); 142,48 (C-4a); 141,63 (C-5a); 136,37 (C-8a); 133,74 (C-1a); 133,05 (C-14); 133,16 (C-6 sau C-7); 132,13 (C-6 sau C-7); 131,11 (C-1); 130,73 (C-16); 129,69 (C-11); 128,97 (C-2); 128,35 (C-3); 127,86 (C-13); 122,66 (C-4); 121,41 (C-12); 120,48 (C-5 sau C-8); 128,32 (C-5 sau C-8); 118,37 (C-15).

FT-IR (ATR in solid, ν cm⁻¹): 3366m; 1768m; 1597w; 1574w; 1504vs; 1477m; 1450w; 1380w; 1320w; 1287w; 1235w; 1185w; 1025m; 956m; 920w; 848w; 781w; 724m; 685w.

EXEMPLUL 6

Activitatea antimicrobiană a compușilor nou-sintetizați a fost evaluată față de 5 tulpini microbiene, respectiv: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 și *Candida albicans* ATCC 90029, în suspensie și aderente, sub forma biofilmelor dezvoltate pe substrat inert.

a. Determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI)

Determinarea CMI s-a realizat prin metoda microdiluțiilor binare seriale în bulion Mueller Hinton, repartizat în microplăci cu 96 de godeuri. Au fost testate 10 concentrații din fiecare compus (cu valori între 5- 0,009 mg/ mL) obținute în urma realizării unor diluții serial binare într-un volum final de 100 μ L de mediu, dintr-o soluție stoc de 10 mg/ mL, realizată în DMSO (dimetil sulfoxid). Ulterior godeurile au fost însămânțate cu câte 20 μ L suspensie microbiană cu densitate 0,5 MacFarland. Controlul pozitiv a fost reprezentat de cultura microbiană cultivată în absența compusului de testat, iar cel negativ de mediul de cultură steril. Microplăcile au fost incubate la 37 °C timp de 24 de ore, valoarea CMI fiind stabilită la nivelul ultimului godeu cu conținut clar, transparent, cu aspect similar controlului negativ.

Compușii testați au prezentat activitate antimicrobiană cu valori CMI cuprinse între 0,156 și 10 mg/ mL (Tabelul 1), cele mai sensibile tulpini fiind tulpina de *S. aureus*, urmată de cea de *P. aeruginosa*. Se remarcă eficiența crescută a compusului **1d** față tulpina de *S. aureus* (CMI 0,156 mg/mL).

Tabelul 1. Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene și valorile corespunzătoare CMI (mg /mL)

Compus chimic	1a	1b	1c	1d
	<i>b</i> Tulpină microbiană			
<i>c</i> <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2,5	10	5	5
<i>d</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,5	2,5	2,5	0,156
<i>e</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>f</i> <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,5	5	2,5	5
<i>g</i> <i>Candida albicans</i> ATCC 90029	2,5	5	5	5

b. Determinarea concentrației minime bactericide (CMB)

După citirea valorilor CMI, volume de 10 μ L din cultura lichidă dezvoltată în godeul corespunzător valorii CMI și din toate godeurile anterioare au fost însămânțate pe mediu PCA (*plate count agar*) solid, în scopul determinării valorii CMB (corespunzătoare concentrației la care s-a obținut inhibarea totală a creșterii microbiene pe mediul solid).

Rezultatele obținute au evidențiat valori CMB cuprinse între 0,312 și 10 mg/ mL. Se remarcă faptul că valorile CMB au fost similare sau de două ori mai mari decât valorile CMI (Tabelul 2).

Tabelul 2. Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene și valorile corespunzătoare CMB (mg/ mL)

Compus chimic	1a	1b	1c	1d
	Tulpină microbiană			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	5	10	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	5	5	0,312
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,5	5	5	5
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	5	10	10	10

c. Determinarea activității anti-biofilm a compușilor testați

S-a realizat prin metoda microtitrării, utilizându-se microplăcile folosite pentru determinarea valorilor CMI și CMB. În acest scop, godeurile au fost spălate de două- trei ori cu ser fiziologic steril, după care, biofilmele aderate la pereții godeurilor au fost fixate cu 100μL metanol rece timp de 5 minute, colorate cu soluție alcalină 1% de cristal violet, timp de 15 minute, și apoi repuse în suspensie cu acid acetic 33%. Concentrația minimă de eradicare a biofilmelor (CMEB) a fost stabilită ca fiind ultima concentrație de compus la care se observă diminuarea valorii absorbanței la 490 nm, comparativ cu controlul pozitiv.

Toți compușii testați au inhibat dezvoltarea biofilmelor bacteriene și fungice testate, valorile CMEB fiind cuprinse între 0,009 și 1,25 mg/mL, de până la sute de ori mai mici decât valorile CMI și CMB corespunzătoare (Tabelul 3).

Este de remarcat sensibilitatea foarte ridicată a biofilmului de *E. faecalis* la compusul **1c**, de *S. aureus* la compusul **1d**, de *P. aeruginosa* la **1a** și **1b** și de *C. aobicans* la toți compușii testați, dar mai ales la **1b**.

Tabelul 3. Rezultatele testării activității antibiofilm și valorile corespunzătoare CMEB (mg/ mL)

Compus chimic	1a	1b	1c	1d
	Tulpină microbiană			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1,25	1,25	0,312	1,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	2,5	5	0,019
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,009	0,156	1,25	1,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,625	0,078	1,25	0,625
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	0,312	0,078	0,312	0,312

d. Investigarea potențialelor mecanisme ale acțiunii antimicrobiene prin citometrie în flux

Citometria în flux (CF) s-a efectuat pe culturi microbiene obținute după 18-24 de ore de incubare a celulelor microbiene în prezență de concentrații subinhibitorii ale compușilor analizați. Astfel, suspensii microbiene cu o densitate de aproximativ 10^6 UFC/ mL au fost pregătite în tampon fosfat salin steril din culturi microbiene în fază de creștere exponențială, obținute pe mediu agarizat. Concentrații subinhibitorii ale compușilor realizate în mediu de cultură lichid Muller-Hinton au fost inoculate cu o cantitate egală de suspensie microbiană și incubate timp de 18-24 de ore la 37 °C. Suspensii microbiene inoculate în mediu lichid au fost utilizate drept control de creștere. După incubare, s-a adăugat soluția de fluorocrom DiBAC4 (3) [bis-(acid 1,3-dibutilbarbituric)trimetinoxonol] Invitrogen / Life Technologies, Carlsbad, pentru a obține o concentrație finală de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Nuding S., Zabel L.T. Detection, identification, and susceptibility testing of bacteria by flow cytometry. J. Bacteriol. Parasitol. S5-005, 2013, doi:10.4172/2155-9597.S5-005). Intensitatea fluorescenței (IF) a fost măsurată cu un citometru de flux Accuri C6 plus în canalul de fluorescență FITC. Controlul de creștere a fost utilizat pentru localizarea populației de celule microbiene și pentru excluderea debriurilor celulare. Măsurătorile de fluorescență au fost efectuate numai pentru celulele din această poartă. Colorantul DiBAC4 (3) a fost folosit pentru detectarea modificărilor potențialului membranelor microbian, produse de tratamentul cu compușii analizați. Frația de celule microbiene din populația analizată care a prezentat o fluorescență verde crescută (corespunzătoare depolarizării membranei) a fost calculată pe baza excluderii evenimentelor de fluorescență corespunzătoare controlului de creștere netratat. O intensitate crescută a fluorescenței (mediana intensității fluorescenței = MIF) de cel puțin două ori, a fost considerată a corespunde celulelor microbiene depolarizate. Pentru fiecare concentrație subinhibitorie, s-a calculat un indice de colorare (IC) ce reprezintă raportul dintre intensitatea fluorescenței (IF) celulelor microbiene tratate și a celulelor netratate.

Analiza efectelor compușilor asupra potențialului membranelor al tulpinilor microbiene testate a arătat că la concentrații subinhibitorii, aceștia produc o *depolarizare a membranei plasmatică*, sugerând faptul că membrana plasmatică constituie una dintre țintele activității antimicrobiene a acestor compuși. Analizele au arătat că compusul **1c** nu a determinat modificări ale potențialului de membrană în cazul tulpinilor de *E. faecalis* ATCC 29212 și *S. aureus* ATCC 25923.

Tabelul 4. Valorile indicelui de colorare la concentrații subinhibitorii ale compușilor analizați

Compus chimic		1a	1b	1c	1d
Tulpini microbiene					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Concentrații subinhibitorii testate	1,25 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL	1,25 mg/mL
	Valoare indice de colorare	80,7	10,2	3,2	173,3
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Concentrații subinhibitorii testate	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL	1,25 mg/mL
	Valoare indice de colorare	2,21	3,99	0,32	44,54
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27892	Concentrații subinhibitorii testate	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL
	Valoare indice de colorare	6,68	6,5	2,38	20,45
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Concentrații subinhibitorii testate	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL
	Valoare indice de colorare	3,5	8,17	0,19	4,2
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	Concentrații subinhibitorii testate	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	-	2,5 mg/mL
	Valoare indice de colorare	4,94	2,82	-	20,21

EXEMPLUL 7

Toxicitatea asupra crustaceului *Artemia franciscana* Kellog, a fost evaluată pe baza metodelor lui B. M. Meyer și col. (Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.*, 1982, 45(5), 31–4) și T. W. Sam (Sam T.W. Toxicity testing using the brine shrimp *Artemia salina*. In: *Bioactive natural products detection, isolation, and structural determination*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1993. p. 441–56), cu mici adaptări sugerate de surse mai recente (Cock I.E., Kalt F.R. Toxicity evaluation of *Xanthorrhoea johnsonii* leaf methanolic extract using the *Artemia franciscana* bioassay. *Pharmacogn Mag.* 2010, 6(23), 166- 171)(Cock I.E., Van Vuuren S.F. A comparison of the antimicrobial activity and toxicity of six combretum and two terminalia species from southern Africa. *Pharmacogn. Mag.* 2015, 11(41), 208- 218)(Artoxkit M. *Artemia* toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Microbiotests, Mariakerke-Gent., 2014).

Materiale și metode

Oochiștii au fost obținuți dintr-o sursă comercială (S.K. Trading), cu originea declarată ca 100% din Great Salt Lake (SUA). Ca mediu, s-a utilizat apă marină artificială obținută dintr-un amestec de săruri disponibile comercial (Coral Marine, Grotech) dizolvate în apă distilată, cu câteva minute de sonicare, la o concentrație de 30 g/ L, conform recomandărilor furnizorului oochiștilor. Eclozarea a fost realizată la o temperatură medie de 26 °C, utilizând o pompă cu aer pentru asigurarea unei aerări adecvate a mediului și a fost inițiată cu 48 de ore înainte de efectuarea testării. Testul a fost realizat într-o placă de 24 godeuri (6 x 4), în triplicate (câte trei godeuri pentru fiecare concentrație evaluată). Din cauza solubilității limitate, substanțele **1a- d** au fost suspendate în apă marină artificială cu ajutorul alginatului de sodiu (0,045%), testarea realizându-se la nivelul limitei de solubilitate. Concentrațiile

utilizate au fost de 100, 50, 25, 12,5 și 6,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pentru fiecare substanță, fiind obținute prin diluții succesive din suspensia inițială. Ca martor negativ s-a utilizat o soluție de alginat de sodiu în apă marină artificială (0,045%). Naupliii eclozați au fost separați de resturile de oochiști și transferați în godeuri cu ajutorul unei micropipete, după o prealabilă concentrare într-un godeu cu ajutorul luminii artificiale. S-au colectat între 10 și 15 nauplii per godeu, care au fost plasați în contact cu suspensiile de testat (1,5 mL de suspensie de testat per godeu) (Libralato G., Prato E., Migliore L., Cicero A.M., Manfra L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. Ecol Indic., 2016, 69, 35- 49). Toți naupliii, morți sau vii, au fost numărați și înregistrați la 24h de la plasarea în contact cu suspensiile de testat. Modelarea nelineară a relației concentrație- letalitate s-a realizat printr-un model logistic cu patru parametri (4PL), implementat în mai multe variante robuste de estimare a parametrilor în pachetul R „dr4pl” (Landis J.T., An H., Bailey A.G., Dittmer D.P., Marron J.S. dr4pl: Dose Response Data Analysis using the 4 Parameter Logistic (4pl) Model [Internet]. 2019. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=dr4pl>).

Rezultate și discuții

Dintre cele patru substanțe testate, trei (**1a**, **1b** și **1c**) nu au prezentat niciun fel de toxicitate la concentrațiile evaluate (în suspensie, așadar la limita de solubilitate), toți naupliii fiind vii și prezentând mișcări normale. Substanța **1d** însă, a prezentat o toxicitate pronunțată, evidențiată pe curba de letalitate (concentrație- răspuns) și din valoarea CI_{50} (14,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $CI_{95\%}$ 11,80 – 18,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(Figura 1). Utilizarea altor metode robuste de modelare a relației concentrație- răspuns a condus la rezultate foarte asemănătoare, atât în privința valorii CI_{50} , cât și a $CI_{95\%}$ a acesteia. În literatura de specialitate s-a sugerat că o valoare CI_{50} în testul de toxicitate pe *Artemia sp.* cuprinsă între 10 și 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ corespunde unei toxicități moderate, similare celei a ciclofosfamidei, pentru care CI_{50} raportată în literatură pentru *Artemia sp.* este de 16,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Moshi M.J., Innocent E., Magadula J.J., Otieno D.F., Weisheit A., Mbabazi P.K., et al. Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in Kagera Region, north western Tanzania. Tanzan. J. Health Res., 2010, 12(1), 63- 67). Toxicitatea acută a compusului **1d** este apropiată ca valoare de cea a ciclofosfamidei. Ceilalți compuși evaluați (**1a**, **1b** și **1c**), nu au demonstrat niciun fel de toxicitate la concentrații de până la 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, astfel încât toxicitatea acestora poate fi considerată modestă (dar trebuie avute în vedere limitele de solubilitate care nu au permis evaluarea toxicității la aplicarea sub formă de soluție).

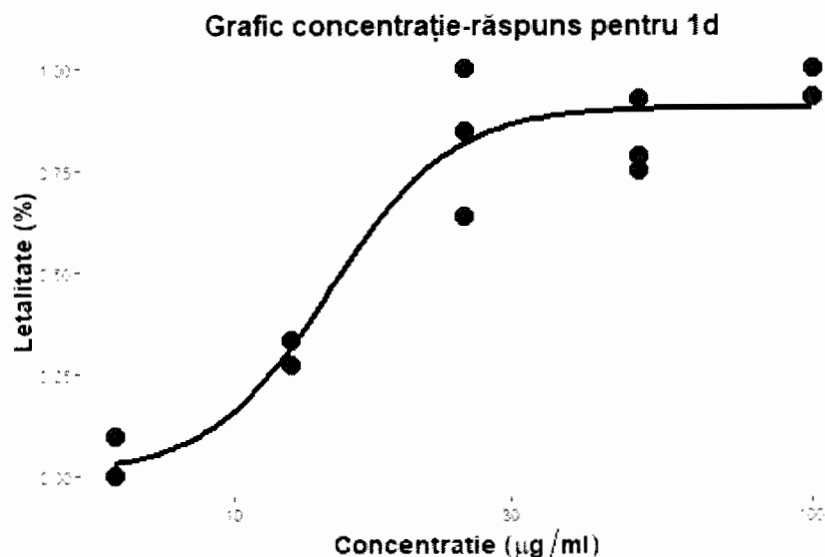


Figura 1. Curba concentrație-răspuns pentru letalitatea substanței **1d** asupra naupliilor de *Artemia franciscana* Kellog, construită pe baza unui model logistic cu patru parametri (axa x corespunde unei scale logaritmice).

EXEMPLUL 8

Cercetările privind activitatea antioxidantă a compușilor **1a**, **1b** și **1c** au cuprins:

a. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH

Principiul metodei

Radicalul liber DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de culoare violet se reduce în prezența unor antioxidanți naturali/ de sinteză la hidrazina corespunzătoare, de culoare galbenă. Această modificare este însoțită de o scădere a valorilor absorbantei [Dudonné S., Vitrac X., Coutierré P., Woillez M., Mérillon J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. J. Agric. Food. Chem., 2009, 57(5), 1764-1778] [Brand - Williams W., Cuvelier ME., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT-Food Sci. Technol., 1995, 28(1), 25-30].

Din punct de vedere al mecanismului de acțiune, metoda se bazează preponderent pe transfer de electroni și este utilizată pe scară largă datorită simplității și corelației cu alte metode [Dudonné S., Vitrac X., Coutierré P., Woillez M., Mérillon J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. J. Agric. Food. Chem., 2009, 57(5), 1764-1778] [Deepshikha G, Methods for determination of antioxidant capacity: a review. IJPSR, 2015, 6(2), 546-566] [Prior RL, Wu X, Schaich K, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. J. Agric. Food. Chem., 2005, 53, 4290-4302].

Metoda nu este standardizată până în prezent, de aceea în literatura de specialitate există diverse variente de lucru. Pentru solubilizarea radicalului liber se pot folosi metanolul absolut sau amestecuri hidroalcoolice (> 50%) [Sharma O.P., Bhat T.K. DPPH antioxidant assay revisited, Food Chem., 2009, 113(4), 1202-1205]; timpul de contact între radicalul liber și substrat variază între 5 - 90 min. sau până la atingerea stării de platou [Robu S., Aprotosoia A.C., Miron A., Cioancă O., Stănescu U., Hâncianu M. *In vitro* antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species, cultivated in Romania, Farmacia, 2012, 60(3), 394-401] [Yuan Y.V., Bone D.E., Carrington M.F. Antioxidant activity of dulce (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*, Food Chem., 2005, 91(3), 485-494] [Brand - Williams W., Cuvelier ME., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT-Food Sci. Technol., 1995, 28(1), 25-30] [Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2), 212-219], iar determinările sunt efectuate la o lungime de undă cuprinsă între 515-520 nm [Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2), 212-219] [Molyneux P., 2004].

Determinările noastre au avut la bază metoda descrisă de Ohnishi M. și colab. (1994) [Ohnishi M., Morishita H., Toda S., Shirataki Y., Kimura M. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis, Phytochemistry, 1994, 36(3), 579-583], citat de Germanò M.P. și colab. [Germanò M.P., Cacciola F., Donato P., Dugo P., Certo G., D'Angelo V., Mondello L., Rapisarda A. *Betula pendula* leaves: polyphenolic characterization and potential innovative use in skin whitening products, Fitoterapia, 2012, 83(5), 877-882].

Reactivi și solvenți necesari

S-au folosit DPPH (Sigma-Aldrich, Germania), acid ascorbic (Roth, Germania), etanol, dimetilsulfoxid (DMSO).

Prepararea soluției de DPPH

0,0039 g Radical liber DPPH au fost solubiliizați într-un balon cotate în 100 mL etanol absolut, obținându-se o soluție de concentrație 0,1 mM. Pentru determinări, s-a utilizat întotdeauna soluție proaspăt preparată, ferită de lumină. Etanolul absolut a fost ales pentru solubilizarea radicalului liber, întrucât compușii testați, respectiv substanța de referință (acidul ascorbic), au fost ulterior solubiliizați într-un amestec de etanol absolut : DMSO = 99 : 1 (v/v), respectiv etanol absolut.

Prepararea soluțiilor de analizat

Compușii au fost solubiliizați la balon cotate de 25 mL într-un amestec de etanol absolut : DMSO = 99 : 1 (v/v), obținându-se o soluție stoc cu concentrație 1000 μ M. Prin diluție cu amestecul de solvenți, s-au obținut soluții de concentrație 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, 75 μ M, 50 μ M și 25 μ M.

Prepararea soluției pentru obținerea curbei etalon de acid ascorbic

0,1 g Acid ascorbic s-a solubilizat la balon cotat de 100 mL în etanol absolut. Curba a fost construită pe domeniul de concentrații 0,005- 0,04 mg/ mL.

Tehnică de lucru

Câte 0,5 mL din soluțiile de concentrație 25- 1000 μ M au fost tratate cu 3 mL soluție 0,1 mM DPPH. Probele au fost menținute în repaus, la întuneric timp de 30 minute [Costea T., Lupu A-R, Vlase L., Nencu I., Gîrd C.E. Phenolic content and antioxidant activity of a raspberry leaf dry extract. Rom. Biotech. Lett., 2016, 21(2), 11345-11356] [Ohnishi M., Morishita H., Toda S., Shirataki Y., Kimura M. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis, Phytochemistry, 1994, 36(3), 579-583]. Ulterior, absorbanțele au fost măsurate la $\lambda = 515$ nm, la un spectrofotometru Jasco V-530 (Jasco, Japonia), față de etanol absolut, utilizat ca blank.

Inhibiția (%) activității radicalului DPPH a fost calculată conform formulei [Brand - Williams W., Cuvelier ME., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT-Food Sci. Technol., 1995, 28(1), 25-30]:

$$I\% = \frac{A_{control} - A_{probă}}{A_{control}} \times 100 \quad \text{unde:}$$

$A_{control}$ = absorbanta soluției de DPPH 0,1 mM în absența compușilor ($1,000 \pm 0,02$).

$A_{probă}$ = absorbanta soluției de DPPH în prezența compușilor după 30 min.

Activitatea antioxidantă a fost exprimată în *echivalenți de acid ascorbic* (mM acid ascorbic/ g substanță). Aceștia au fost calculați prin interpolarea valorilor absorbantei soluției de DPPH în prezența compușilor, în ecuația dreptei curbei etalon (concentrație vs. absorbantă). Curba etalon a fost construită în prealabil, în aceleași condiții, în intervalul 0,005-0,04 mg/mL ($n = 5$, $R^2 = 0,997$).

Curba etalon de acid ascorbic este prezentată în Tabelul 5 și Figura 2.

Tabelul 5. Curba etalon de acid ascorbic (metoda DPPH)

Concentrație (mg/mL)	Absorbantă
0,005	0,8276
0,01	0,7533
0,02	0,5511
0,03	0,3332
0,04	0,1094

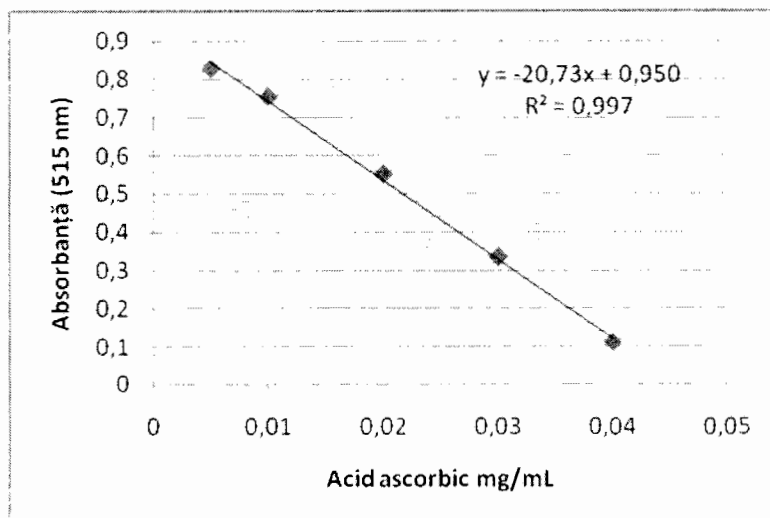


Figura 2. Curba etalon de acid ascorbic

Analiza statistică

Pentru fiecare concentrație testată, determinările au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele reprezintă media a trei determinări independente \pm deviația standard (SD). Pentru interpretarea statistică a datelor s-au utilizat programul Microsoft Office (Excell 2007) și softul GraphPad Prism v.5 (GraphPad, SUA). Compararea activității antioxidante a compușilor analizați s-a efectuat utilizând testul ANOVA urmat de post-testul Tukey. Rezultatele au fost considerate semnificative statistic dacă $p < 0.05$.

Rezultate și discuții

Rezultatele privind capacitatea de scavenger a radicalului DPPH sunt prezentate în Tabelele 6- 8 și Figura 3.

Rezultatele obținute (Tabele 6, 7) au arătat că valorile absorbantei scad, odată cu creșterea concentrației, independent de compusul analizat. Inhibiția radicalului liber DPPH variază între 12,66% (**1a** la concentrația de 25 μ M) și 24,64 % (**1c** la concentrația de 1000 μ M). De asemenea, compusul **1a** a inhibat cu 19,81% activitatea radicalului liber DPPH, la concentrația maximă, de 1000 μ M. Cea mai mică valoare a inhibiției radicalului DPPH, la concentrația maximă, s-a înregistrat pentru compusul **1b** (16,29 %).

În general, capacitatea de scavenger a radicalului DPPH pe domeniul de concentrații folosit, este scăzută (sub 30%), probabil datorită caracterului apolar al compușilor testați și al mecanismului de acțiune al metodei utilizate, bazat preponderent pe transfer de electroni. Pentru niciunul dintre compușii analizați nu s-au putut determina echivalenții de acid ascorbic (Tabelul 8), deoarece valorile absorbanțelor nu s-au încadrat în curba etalon de acid ascorbic.

Tabelul 6. Valorile absorbanței soluțiilor de analizat în prezența radicalului DPPH

Compus	Concentrația (μM)						
	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1a	0,9310 \pm 0,0078	0,9252 \pm 0,0061	0,9234 \pm 0,0048	0,9171 \pm 0,00014	0,9117 \pm 0,0033	0,9102 \pm 0,0051	0,8547 \pm 0,059
1b	0,9269 \pm 0,0016	0,9260 \pm 0,00084	0,9205 \pm 0,0028	0,9175 \pm 0,0029	0,9161 \pm 0,0016	0,9134 \pm 0,0009	0,8923 \pm 0,000
1c	0,8770 \pm 0,0031	0,8698 \pm 0,0006	0,8624 \pm 0,0042	0,8584 \pm 0,00063	0,8552 \pm 0,00084	0,8486 \pm 0,0065	0,8026 \pm 0,002

Rezultatele reprezintă media \pm SD (n=3)**Tabelul 7.** Inhibiția (%) radicalului DPPH de către compușii analizați

Compus	Concentrația (μM)						
	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1a	12,66 \pm 0,7353	13,20 \pm 0,5798	13,36 \pm 0,4596	13,96 \pm 0,0141	14,46 \pm 0,3181	14,61 \pm 0,4808	19,81 \pm 5,6144
1b	13,04 \pm 0,1626	13,13 \pm 0,0848	13,64 \pm 0,2687	13,93 \pm 0,2828	14,05 \pm 0,1626	14,31 \pm 0,0989	16,29 \pm 0,0494
1c	17,72 \pm 0,2969	18,39 \pm 0,063	19,09 \pm 0,4030	19,47 \pm 0,0565	20,17 \pm 0,6434	20,39 \pm 0,6081	24,64 \pm 0,2192

Rezultatele reprezintă media \pm SD (n=3)**Tabel 8.** Echivalenții de acid ascorbic – metoda DPPH

Compus	Echivalenți de acid ascorbic (mM acid ascorbic/g substanță)
1a	nd
1b	nd
1c	nd

nd - nedeterminat

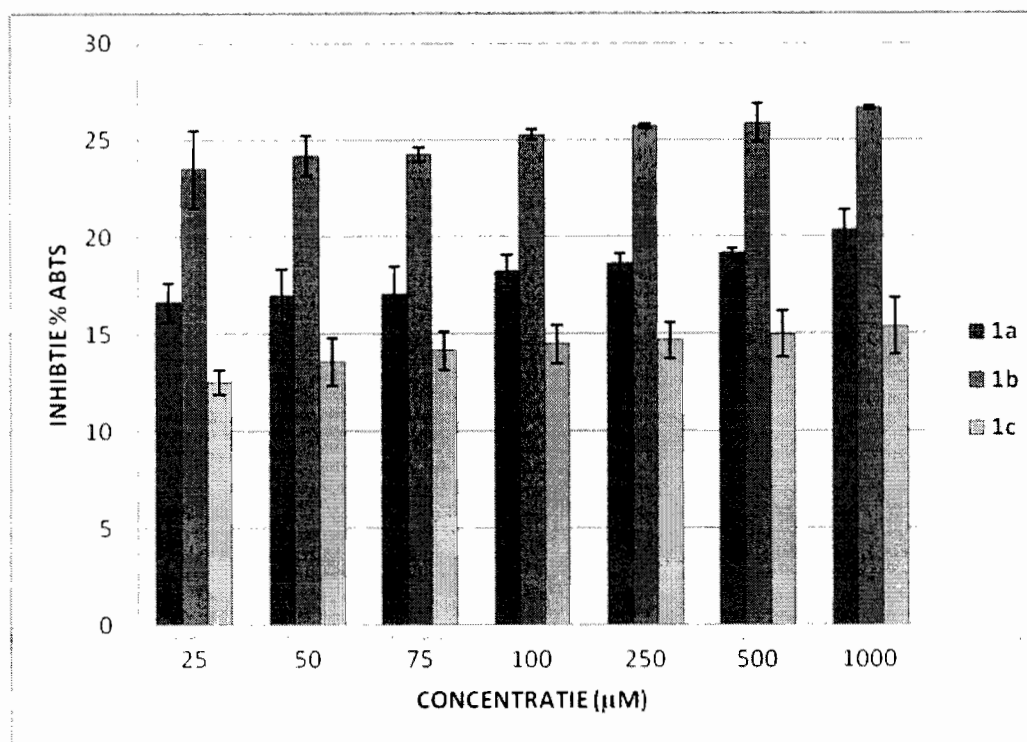


Figura 3. Reprezentarea grafică a inhibiției radicalului liber DPPH de către compușii analizați

Concluzii

Compușii testați prezintă capacitate modestă (< 30%) de scavenger a radicalului DPPH pe domeniul de concentrație analizat.

Cele mai mari valori ale inhibiției (%), la concentrația maximă de 1000 µM, s-au înregistrat pentru compușii **1a** și **1c**. Echivalenții de acid ascorbic nu au fost determinați, deoarece absorbanțele nu s-au încadrat în curba etalon de acid ascorbic.

b. Capacitatea de scavenger a radicalului ABTS

Metoda ABTS utilizează ca agent de reacție radicalul liber ABTS^{•+}.

Radicalul poate fi obținut în urma reacției sării de amoniu a acidului 2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic) cu persulfat de potasiu [Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(9-10): 1231-1237], dioxid de mangan [Miller J.N., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. Antioxidant activities of carotens and xanthophylls, *FEBS Letters*, 1996, 384(3), 240-242], diclorură de 2,2'-azobis-(2-amidinopropan) [Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chem. Acta*, 2008, 613(1), 1-19] sau cu enzime (peroxidază) [Prior R.L., Wu X., Schaich K., Standardized

methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 2005, 53, 4290-4302].

Principiul metodei

Radicalul ABTS^{•+} (de culoare albastră) în prezența unui antioxidant natural/ de sinteză se decolorează; modificările de culoare fiind însoțite de scăderea valorilor absorbantei [Dudonné S., Vitrac X., Coutierré P., Woillez M., Mérillon J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food. Chem.*, 2009, 57(5), 1764-1778].

Metoda prezintă multiple avantaje: este simplă, reproductibilă, independentă de pH și se poate aplica atât pentru antioxidanții lipofili cât și pentru cei hidrofilii. Din punct de vedere al mecanismului de acțiune, metoda se bazează preponderent pe transfer de protoni [Prior R.L., Wu X., Schaich K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 2005; 53: 4290-4302].

Similar metodei DPPH, metoda nu este standardizată; în literatura de specialitate există numeroase variante de lucru, iar timpul de reacție dintre radical și substrat variază de la 4-6 min. până la 60 min. [Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(9-10): 1231-1237] [Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating activity from guava fruits, *J. Food Compos. Anal.*, 2006, 19 (6-7), 669-675].

Pentru evaluarea capacității de scavenger a radicalului liber s-a utilizat metoda descrisă de Re R. și col. [Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(9-10): 1231-1237].

Reactivi și solvenți utilizați

S-au utilizat sarea de amoniu a ABTS (Sigma-Aldrich, Germania), persulfat de potasiu (Merck, Germania), acid ascorbic (Roth, Germania), dimetilsulfoxid (DMSO), etanol.

Prepararea reactivului

Radicalul ABTS^{•+} a fost obținut în urma reacției dintre sarea de amoniu a acidului 2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic) (soluție 7,4 mM) și persulfat de potasiu (soluție 2,6 mM) [Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(9-10): 1231-1237].

- *Obținerea soluției sării de amoniu a acidului 2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic):* 0,3808 g sare de amoniu au fost solubilizați în 100 mL apă distilată (la balon cotat). S-a obținut o soluție de concentrație 7,4 mM (*soluția A*).

- *Obținerea soluției de persulfat de potasiu:* 0,0707 g persulfat de potasiu au fost solubilizate în 100 mL apă distilată (balon cotate de 100 mL), obținând o soluție de concentrație 2,6 mM (*soluția B*).

Radicalul liber ABTS^{•+} s-a obținut în urma amestecării *soluțiilor A și B* în raport 1:1 (v/v) și menținerea în contact timp de 16 ore.

Soluția obținută a fost păstrată ferită de lumină. 1 mL din soluția obținută a fost diluat cu 50 mL etanol absolut, astfel încât absorbanta la $\lambda = 734$ nm să fie $0,700 \pm 0,02$.

Prepararea soluțiilor de analizat

Compușii au fost solubiliizați la balon cotate de 25 mL într-un amestec de etanol absolut : DMSO = 99 : 1 (v/ v), obținându-se o soluție stoc cu concentrație 1000 μ M. Prin diluție cu amestecul de solvenți, s-au obținut soluții de concentrație 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, 75 μ M, 50 μ M și 25 μ M.

Prepararea soluției pentru obținerea curbei etalon de acid ascorbic

0,1 g acid ascorbic au fost solubilizate în 100 mL etanol absolut. Curba a fost construită pe domeniul de concentrații de 0,01-0,1 mg/mL.

Tehnică de lucru

Câte 0,5 mL din soluțiile de concentrație 25-1000 μ M au fost tratate cu 3 mL soluție etanolică ABTS^{•+}, agitând și menținând la întuneric timp de 6 minute. Absorbanta probelor a fost măsurată la un spectrofotometru Jasco V-530, la $\lambda = 734$ nm, față de etanol absolut, utilizat ca blank. Reducerea valorilor absorbantei reprezintă inhibiția soluției de ABTS^{•+} și se calculează conform ecuației:

$$\% \text{ Inhibiție} = \frac{Abs_{(t = 0 \text{ min})} - Abs_{(t = 6 \text{ min})}}{Abs_{(t = 0)}} \times 100, \text{ unde:}$$

$Abs_{t = 0 \text{ min}}$ = valoarea extincției soluției de ABTS^{•+} în absența compușilor testați ($0,700 \pm 0,02$),

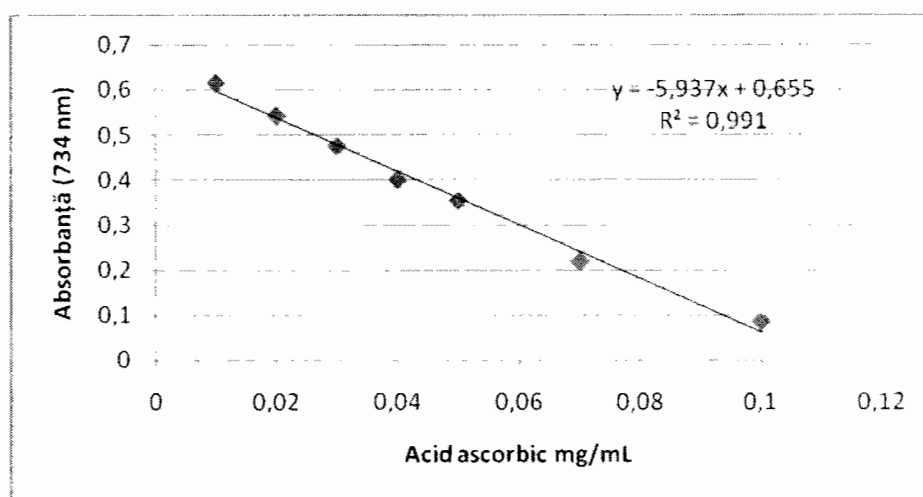
$Abs_{t = 6 \text{ min}}$ = valoarea extincției soluției ABTS^{•+} după 6 minute de incubare cu compușii de analizat.

Activitatea antioxidantă a fost exprimată în *echivalenți de acid ascorbic* (mM acid ascorbic/g substanță). Aceștia au fost calculați prin interpolarea valorilor absorbantei soluției de ABTS^{•+} în prezența compușilor, în ecuația dreptei curbei etalon de acid ascorbic (concentrație vs. absorbantă), Curba etalon a fost construită în prealabil, în aceleași condiții, în intervalul 0,01-0,01 mg/mL ($n = 7, R^2 = 0,9912$).

Curba etalon de acid ascorbic este prezentată în Tabelul 9 și Figura 4.

Tabelul 9. Curba etalon de acid ascorbic (metoda ABTS⁺⁺)

Concentrație (mg/ mL) acid ascorbic	Absorbanță
0,01	0,6151
0,02	0,5425
0,04	0,3989
0,05	0,3528
0,07	0,2176
0,1	0,0844

**Figura 4.** Curba etalon de acid ascorbic*Analiza statistică*

Pentru fiecare concentrație testată, determinările au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele reprezintă media a trei determinări independente \pm deviația standard (SD). Pentru interpretarea statistică a datelor s-a utilizat programul Microsoft Office (Excell 2007) și softul GraphPad Prism v.5 (GraphPad, SUA). Compararea activității antioxidante a compușilor analizați s-a efectuat utilizând testul ANOVA urmat de post- testul Tukey. Rezultatele au fost considerate semnificativ statistic dacă $p < 0.05$.

Rezultate și discuții

Rezultatele privind capacitatea de scavenger a radicalului ABTS⁺⁺ sunt prezentate în Tabelele 10- 12 și Figura 5.

Rezultatele noastre au arătat că activitatea de scavenger a radicalului liber ABTS⁺⁺ crește odată cu concentrația, independent de compusul analizat (Tabelul 10).

Tabelul 10. Valorile absorbanței soluțiilor de analizat în prezența radicalului ABTS^{•+}

Compus	Concentrația (μM)						
	25μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
Ia	0,5002±0,007	0,5780±0,0094	0,5773±0,0099	0,5690±0,0055	0,5663±0,0033	0,5626±0,0014	0,5546±0,0074
Ib	0,5322±0,01364	0,5278±0,0071	0,5256±0,0049	0,5203±0,0018	0,5172±0,0007	0,5161±0,0068	0,5109±0,0063
Ic	0,5848±0,0040	0,5780±0,0081	0,5741±0,0067	0,5717±0,0065	0,5705±0,0063	0,5685±0,0080	0,5658±0,0091

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

Tabelul 11. Inhibiția (%) radicalului ABTS^{•+} de către compușii analizați

Compus	Concentrația (μM)						
	25μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
IF1	16,65±1,0040	16,99±1,3364	17,07±1,4283	18,26±0,8061	18,65±0,4879	19,18±0,2121	20,33±1,0818
IF4	23,50±1,9586	24,17±1,025	24,25±0,3535	25,26±0,2687	25,71±0,098	25,85±0,9828	26,60±0,091
IF5	12,53±0,6010	13,55±1,2162	14,14±1,011	14,49±0,9828	14,67±0,9405	14,98±1,2020	15,38±1,4354

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

Tabel 12. Echivalenții de acid ascorbic – metoda ABTS^{•+}

Compus	Echivalenți de acid ascorbic (mM acid ascorbic/ g substanță)
Ia	3,0624±3,0629
Ib	4,7816 ± 4,8765
Ic	2,7217 ± 2,7262

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

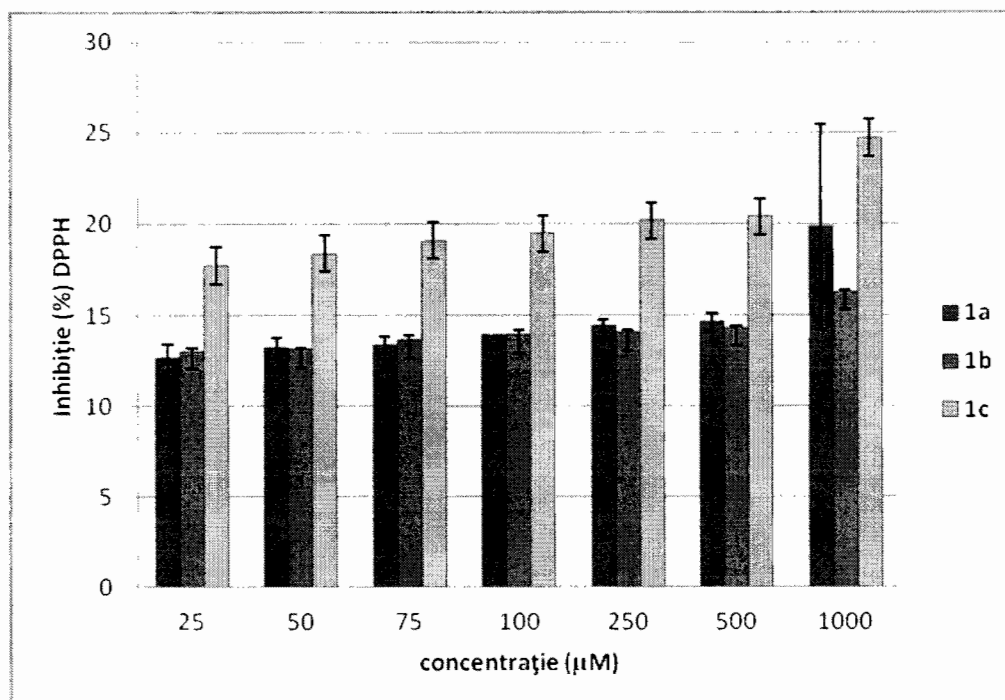


Figura 5. Reprezentarea grafică a inhibiției radicalului liber $ABTS^{++}$ de către compușii analizați

Valorile inhibiției variază între 12,53% (**1c** la concentrația de 25 μM) și 26,60 % (**1b** la concentrația de 1000 μM). Indiferent de concentrația utilizată, cele mai mari valori ale inhibiției radicalului $ABTS^{++}$ s-au obținut pentru compusul **1b**, în timp ce compusul **1c** a manifestat cea mai slabă capacitate de scavenger a radicalului liber.

Comparativ cu metoda DPPH, valorile inhibiției pe domeniul de concentrații utilizat, au fost mai mari în cazul metodei ABTS, pentru compușii **1a** și **1b**, în timp ce pentru compusul **1c** procente au fost mai mici. Considerăm că diferențele observate se datorează mecanismului diferit de acțiune a radicalilor și polarității compușilor.

Activitatea antioxidantă a compușilor crește în ordinea: **1c** < **1a** < **1b** (Tabelul 12); rezultatele fiind strâns corelate și cu procentul de inhibiție al radicalului liber, pe domeniul de concentrații utilizat.

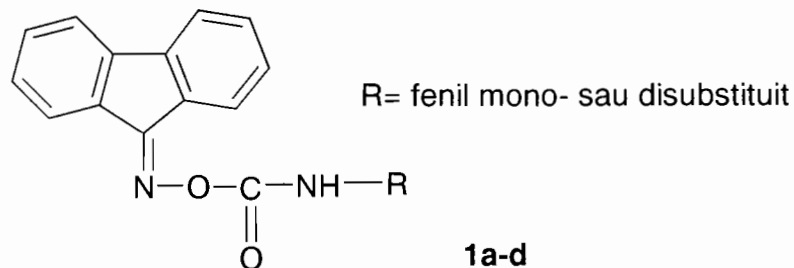
Testul ANOVA nu a evidențiat diferențe semnificative statistice pentru compușii testați ($p > 0.05$).

Concluzii

Compușii testați prezintă capacitate de scavenger a radicalului liber $ABTS^{++}$ pe domeniul de concentrație analizat. Cele mai mari valori ale inhibiției radicalului liber s-au obținut pentru compusul **1b**, în strânsă corelație cu valorile echivalențelor de acid ascorbic. Activitatea antioxidantă crește în ordinea **1c** < **1a** < **1b**. Rezultatele obținute nu au evidențiat diferențe semnificative statistice între compușii analizați.

Revendicări

1. O-aril-carbamoil-oximino-fluorene, compuși caracterizați prin aceea că au următoarea formulă generală:



1a (R= -C₆H₅): 9-(fenilcarbamoiloximino)fluoren

1b (R= -C₆H₄(CH₃)(3)): 9-((3-metil-fenil)carbamoiloximino)fluoren

1c (R= -C₆H₄(Cl)(3)): 9-((3-cloro-fenil)carbamoiloximino)fluoren

1d (R= -C₆H₄(Cl)₂(3,4)): 9-((3,4-dicloro-fenil)carbamoiloximino)fluoren

2. Procedeu de obținere a derivaților O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui, **1a-d**, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că are loc prin refluxarea fluoren-9-on-oximei cu arilizocianați, mediul de reacție fiind tetrahidrofuranul anhidru.

3. Compoziții farmaceutice, caracterizate prin aceea că acestea conțin ca unic principiu activ bactericid, fungicid și antibiofilm derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui, definiți ca în revendicarea 1.

4. Compozițiile farmaceutice își exercită efectul bactericid și fungicid prin depolarizarea membranei plasmatică, sugerând faptul că membrana plasmatică constituie una dintre țintele activității antimicrobiene ale acestor compuși.

5. Utilizarea derivaților de O-aril-carbamoil-oximino-fluoren, definiți în revendicarea 1, pentru prepararea compozițiilor farmaceutice cu toxicitate scăzută, destinate tratamentului bactericid, fungicid și antibiofilm.