



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00320

(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:
• TELEHOIU (BORDEI) ALEXANDRA
TEORDORA, STR.ARDEALULUI, NR.10,
BL.L32, SC.C, ET.1, AP.42, CONSTANȚA,
CT, 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;
• NUȚĂ DIANA CAMELIA,
ȘOS.ANTIAERIANĂ 6A24, BL.C3, AP.19,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• BĂDICEANU CARMELLINA DANIELA,
STR. CAMIL RESSU, NR.46, BL.A13, SC.1,
ET.4, AP.17, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DUMITRAȘCU FLOREA,
ALEEA ȘCOLARILOR NR.10, BL.S24, ET.9,
AP.47, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• CĂPROIU MIRON TEODOR,
ALEEA BĂIUȚ NR.13, BL.A 34, SC.A, ET.3,
AP.12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DELCARU CRISTINA,
STR.GURA VADULUI NR.3, BL.G 23, ET.2,
AP.38, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ZARAFU IRINA, CALEA FERENTARI,
NR.3, BL.75, SC.A, ET.4, AP.17,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• IONIȚĂ PETRE, STR.NOVACI, NR.12,
BL.P 61, SC.1, ET.2, AP.8, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• AVRAM SPERANȚA,
ALEEA OBCINA MARE NR.9, BL.Z26, ET.3,
AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• BLEOTU CORALIA,
ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5,
SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• COSTEA TEODORA, ȘOS.VIILOR, NR.95,
BL.102, SC.3, ET.3, AP.79, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GÎRD ELENA CERASELA,
STR.PODARULUI NR.6, BL.F 3, AP.13,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• ANUCEANU VIOREL ROBERT,
STR.MOȚOC NR.2, BL.P3, SC.3, ET.4,
AP.72, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• DINU PÎRVU CRISTINA ELENA,
STR.GH.LAZĂR, NR.10, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) DERIVAȚII AI CARBAZOLULUI, COMPOZIȚIE
FARMACEUTICĂ CE II CONȚINE ȘI UTILIZAREA ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la derivații ai carbazolului utilizați pentru prepararea compozițiilor farmaceutice destinate tratamentului antimicrobian și combaterii biofilmelor microbiene nedorite. Derivații, conform invenției, au următoarele formule generale: 1a-c și 2a-d care conțin

nucleul carbazolic provenit din carprofen, fiind substituit cu gruparea farmacoforă acil-hidrazino, sau cu nucleul 1,3,4-oxadiazolic.

Revendicări: 6

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 carbazolului, compoziție farmaceutică ce îi conține și utilizarea acestora

Invenția se referă la N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R-substituite și la derivații (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului, precum și la procedeele de preparare și de caracterizare ale acestora, compuși având activitate inhibitorie față de creșterea celulelor microbiene în suspensie și aderate.

Pe plan mondial, una dintre provocările pentru obținerea de noi medicamente antimicrobiene este descoperirea de noi substanțe medicamentoase, cu un mecanism de acțiune cu adevărat nou, ce pot fi formulate în sisteme farmaceutice care să asigure stabilitate și activitate antimicrobiană și antibiofilm, dar și diminuarea fenomenelor de rezistență și de multirezistență la antibioterapia clasică.

Modelele structurale dezvoltate în această invenție prin farmacomodulări, conțin nucleul carbazolic, provenit din carprofen, substituit cu grupa farmacoforă acil-hidrazino, sau cu nucleul 1,3,4-oxadiazolic, substituția fiind generată de potențialele acțiuni farmacologice asociate, descrise în literatura de specialitate.

Carbazolul și derivații săi reprezintă un grup important de compuși heterociclici aromatici care conțin un atom de azot și care au proprietăți electronice importante, precum electronii p implicați în conjugare, substituția pe inelul carbazolic cu diferite grupe funcționale realizându-se ușor [Salih N., Salimon J., Yousif E. Synthesis and antimicrobial activities of 9H-carbazole derivatives. Arab. J. Chem., 2016, 9, S781-S786].

Aceste proprietăți au ca rezultat potențiale aplicații extinse ale derivaților carbazolici în domeniul medicinei, fiind de interes proprietățile lor antimicrobiene, antitumorale, antihistaminice, antioxidante, antiinflamatoare, psihotrope etc. [Knölker H.J., Reddy K.R. Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. Chem. Rev., 2002, 102, 4303].

Nucleul carbazolic se întâlnește în structura unor medicamente cum sunt: olivacina (antimalaric), rimcazolul (antipsihotic și anticonvulsivant), carvedilolul (antihipertensiv), ondansetronul (antiemetic). El se regăsește în natură în unii alcaloizi ca ellipticina [Montoia A., Rocha E Silva L.F., Torres Z.E., Costa D.S., Henrique M.C., Lima E.S., Vasconcellos M.C., Souza R.C., Costa M.R., Grafov A., Grafova I., Eberlin M.N., Tadei W.P., Amorim R.C., Pohlit A.M. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2014, 24(12), 2631-2634] cu proprietăți antimalarice și koenidina, cu potențial efect antidiabetic [Patel O. P. S., Mishra A., Maurya R., Saini D., Pandey J., Taneja I., Raju K. S. R., Kanojiya S., Shukla S. K., Srivastava M.N.,

Wahajuddin M., Tamrakar A. K., Srivastava A. K., Yadav P. P. Naturally occurring carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* as potential antidiabetic agents. *J. Nat. Prod.*, 2016, 79(5), 1276-1284].

Nucleul este prezent și în structura unor compuși naturali activi [Knölker H.J., Reddy K.R. Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem. Rev.*, 2002, 102, 4303], cum este staurosporina cu proprietăți antibacteriene, antifungice, antitumorale [Ruegg U. T., Burgess G. M. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1989, 10, 218-220]. Carbazomicinele reprezintă o clasă de antibiotice cu un heterociclu carbazolic [Hagiwara H., Choshi T., Fujimoto H., Sugino E., Hibino S. A novel total synthesis of antibiotic carbazole alkaloid carbazomycin G. *Tetrahedron*, 2000, 56, 5807-5811], carbazomicinele A și B inhibând creșterea fungilor fitopatogeni, având activitate antibacteriană și antifungică, iar murrayafolin A, izolat din *Murraya euchrestifolia Hayata* [Cuong N.M., Wilhelm H., Porzel A., Arnold N., Wessjohann L. 1-O-Substituted derivatives of murrayafoline A and their antifungal properties. *Prod. Res.*, 2008, 22, 1428-1432], a demonstrat o puternică activitate fungicidă împotriva *Cladosporium cucumerinum*.

Un nou alcaloid derivat de carbazol a fost izolat din frunzele de *Clausena heptaphylla* și a fost stabilită structura acestuia ca fiind 1,8-dimetoxi-3-formilcarbazol. Alcaloidul s-a dovedit a fi activ pe bacterii Gram-pozitive, Gram-negative și pe ciuperci [Chakraborty A., Saha C., Podder G., Chowdhury B.K., Bhattacharyya P. Carbazole alkaloid with antimicrobial activity from *Clausena heptaphylla*. *Phytochemistry*. 1995, 38(3), 787-789].

Noi derivați ai N-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-2-(fenoxi)acetamidei, obținuți prin reacția 2-cloro-N-(9-etil-9H-carbazol-3-il)acetamidei cu fenoli substituiți, au fost testați pentru activitatea lor antimicrobiană și pentru citotoxicitate [Kaplancikli Z.A., Yurttas L., Turan-Zitouni G., Özdemir A., Özic R., Ulusoylar-Yildirim Ş. Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity of some new carbazole derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 2012, 27(6), 868-874].

Alți derivați ai carbazolului au fost identificați ca inhibitori puternici ai H⁺-ATP-azei membranei plasmatică, având un spectru larg antifungic [Clausen J. D., Kjellerup L., O'Hanlon Cohrt K., Hansen J. B., Dalby-Brown W., Winther A.-M. L.. Elucidation of antimicrobial activity and mechanism of action by N-substituted carbazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, 27, 4564-4570].

Noi 5-[(9H-carbazol-9-il)metil]-N-[(fenil)(piperazin-1-il)metil]-1,3,4-oxadiazol-2-amine au fost sintetizate și evaluate pentru activitățile antibacteriană, antifungică și anticanceroasă [Sharma D., Kumar N., Pathak D. Synthesis, characterization and biological evaluation of some newer carbazole derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2014, 79(2), 125-132], unii derivați remarcându-se pentru activitatea antimicrobiană și pentru acțiunea pe liniile celulare de cancer de sân MCF7.

Carprofenul (acidul 2-(6-clor-9H-carbazol-2-il)propanoic) este un medicament antiinflamator nesteroidian, inhibitor COX-1 și COX-2, din clasa derivaților de acid propionic, utilizat pentru a combate inflamația și durerea la animalele cu osteoartrită sau alte

boli inflamatorii. Carprofenul este utilizat de medicii veterinari ca un tratament de susținere pentru ameliorarea simptomelor artritice la câinii seniori.

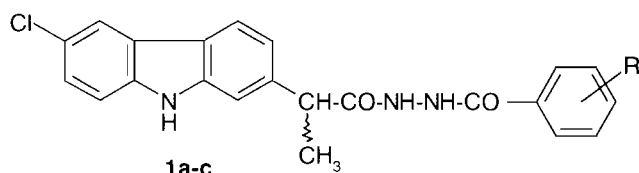
Carprofenul a fost utilizat și în medicina umană aproximativ 10 ani (1985-1995), fiind în general bine tolerat, majoritatea efectelor adverse, cum ar fi durerea gastrointestinală și greața, fiind ușoare. Nu mai este comercializat pentru uz uman, după ce a fost retras din motive comerciale.

1,3,4-Oxadiazolii sunt compuși heterociclici care au o diversitate de efecte biologice utile, incluzând proprietăți antibacteriene [Desai N.C., Dodiya A. M., Rajpara K. M., Rupala Y. M. Synthesis and antimicrobial screening of 1,3,4-oxadiazole and clubbed thiophene derivatives. *J. Saudi Chem.Soc.*, 2014, 18, 255-261], antifungice [Wani M.Y., Ahmad A., Shiekh R.A., Al-Ghamdi K.J., Sobral A.J. Imidazole clubbed 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antifungal agents. *Bioorg Med Chem.*, 2015, 23(15), 4172-4180], analgezice [Dewangan D., Nakhate K.T., Tripathi D.K., Kashyap P., Dhongde H. Synthesis, Characterization and Screening for Analgesic and Anti-inflammatory activities of 2, 5-disubstituted 1, 3, 4-oxadiazole derivatives. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.*, 2015, 14(2), 138-145], antiinflamatoare [Singh A. K., Lohani M., Parthasarthy R. Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of some 1, 3,4-oxadiazole derivatives. *Iran J Pharm Res.*, 2013,12(2), 319-323], antivirale [Gan X., Hu D., Chen Z., Wang Y., Song B. Synthesis and antiviral evaluation of novel 1,3,4-oxadiazole/thiadiazolechalcone conjugates. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2017, 27, 4298-4301], anticanceroase [Abdo N. Y. M., Kamel M. M. Synthesis and anticancer evaluation of 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles, 1,2,4-triazoles and Mannich bases. *Chem. Pharm. Bull.*, 2015, 63(5), 369-376], antihipertensive [Schlecker R., Thieme P. C. The synthesis of antihypertensive 3-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenoxypropanolamines. *Tetrahedron*, 1988, 44(11), 3289-3294], anticonvulsivante [Tabatabai S.A., Barghi Lashkari S., Zarrindast M.R., Gholibeikian M., Shafiee A. Design, synthesis and anticonvulsant activity of 2-(2-phenoxy)phenyl- 1,3,4-oxadiazole derivatives. *Iran. J. Pharm. Res.*, 2013, 12, 105-111] și antidiabetice [Shyma P. C., Kalluraya B., Peethambar S. K., Vijesh A. M. Synthesis, characterization, antidiabetic and antioxidant activity of 1,3,4-oxadiazole derivatives bearing 6-methyl pyridine moiety. *Der Pharma Chem.*, 2015, 7(12), 137-145].

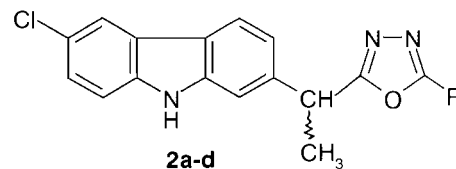
Nucleul 1,3,4-oxadiazolic este prezent în moleculele unor medicamente cum sunt: furamizol (cu activitate antibacteriană), tiodazosin (un antagonist alfa-1 adrenergic), nesapidil (compus antihipertensiv), raltegravir (agent antiretroviral), zibotentan (medicament anticanceros) [Musmade D., Pattan S., Yalgatti M. Oxadiazole a nucleus with versatile biological behaviour. *Int. J. Pharm. Chem.*, 2015, 5(1), 11-20]

Problema pe care invenția de față o rezolvă, constă în prepararea unor noi compuși cu efect bactericid, fungicid și antibiofilm.

Invenția de față se referă la N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R-substituite și la derivați ai (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului, cu următoarele formule generale, compuși selectați dintre **1a-c** și respectiv, **2a-d**:



R= -H, 4-Cl, 3-CF₃



R= -C₆H₅, -C₆H₄(Cl)(4), -C₆H₄(CF₃)(3), -C₅H₄N

1a (R= -H): N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazina

1b (R= 4-Cl): N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-(4-clorobenzoil)hidrazina

1c (R= 3-CF₃): N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-(3-trifluorometilbenzoil)hidrazina

2a (R= -C₆H₅): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan

2b (R= -C₆H₄(Cl)(4)): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-(4-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan

2c (R= -C₆H₄(CF₃)(3)): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-(3-trifluorometilfenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan

2d (R= -C₅H₄N): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-[5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-il] etan

Un alt obiect al invenției constă într-un procedeu de obținere a compușilor definiți ca mai sus, care cuprinde:

a. prepararea (2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoatului de metil (esterul metilic al carprofenului) (**4**) prin reacția acidului (*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoic (carprofen) (**3**) cu metanol absolut în exces, în prezența acidului sulfuric concentrat.

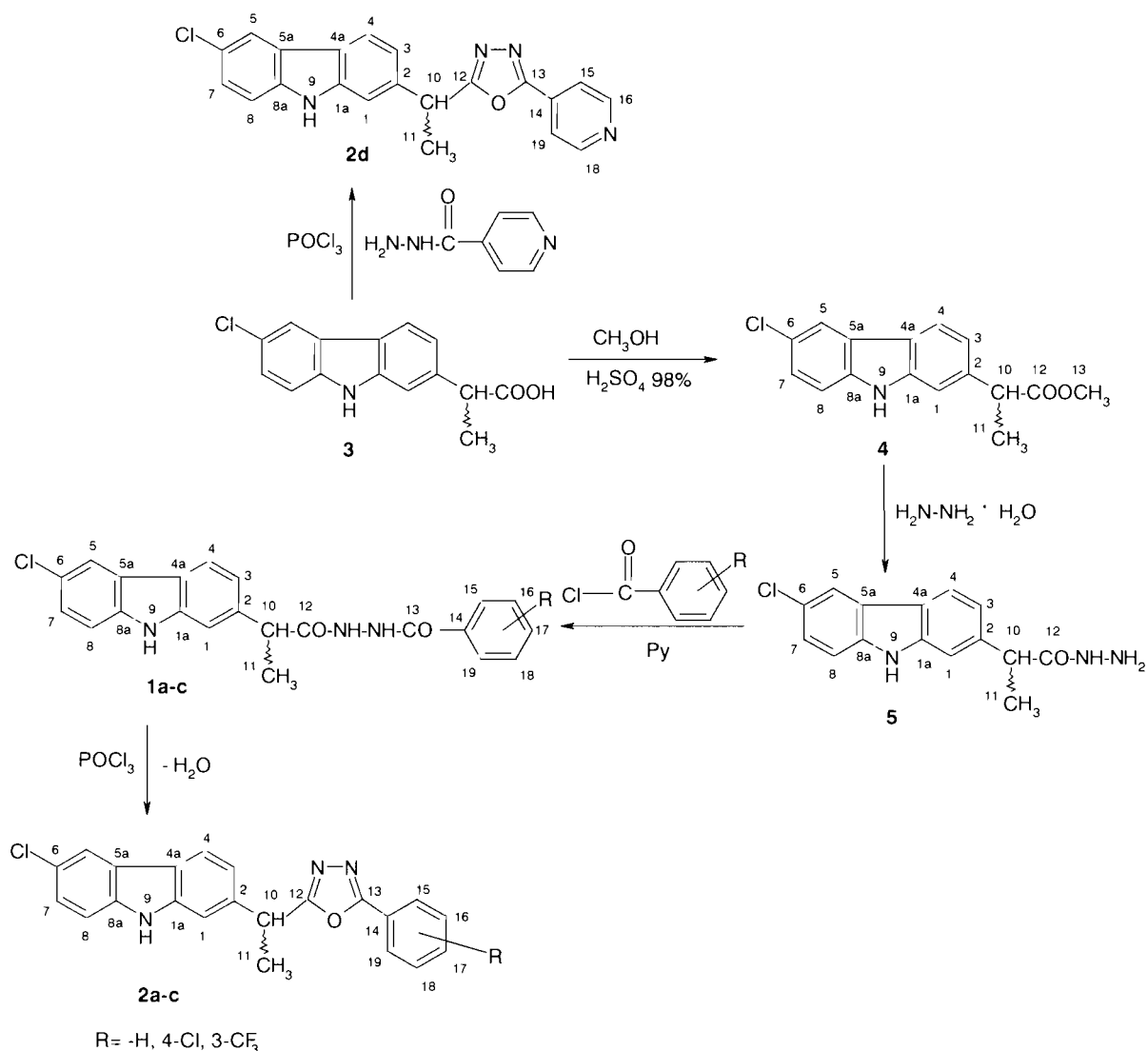
b. prepararea (2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propano-hidrazidei (hidrazida carprofenului) (**5**) prin refluxarea esterului metilic al carprofenului (**4**) (solubilizat în alcool etilic) cu hidrat de hidrazină 100% la un raport molar de 1: 7.

c. prepararea N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazinelor R-substituite (**1a-c**) prin reacția hidrazidei carprofenului (**5**) cu cloruri ale acizilor, în piridină anhidră, la un raport molar de 1: 1, prin agitare la temperature camerei.

d. prepararea noilor derivați ai (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului fenil-substituiți (**2a-c**), care s-au obținut prin ciclizarea la încălzire a hidrazinelor N,N'-disubstituite (**1a-c**) cu exces de oxiclură de fosfor.

e. prepararea (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-[5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]etanului (**2d**) prin reacția carprofenului (**3**) cu izoniazida, în prezența oxiclururii de fosfor, la un raport molar de 1: 1, prin agitare la reflux timp de 2 ore și jumătate.

Reacțiile de obținere ale noilor compuși sunt prezentate în Schema 1.



Schema 1. Schema de sinteză a N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzohidrazinelor R-substituite, a derivaților (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului fenil-substituiți și a (RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-[5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]etanului

Avantajul compușilor conform invenției, constă în faptul că cei mai mulți dintre aceștia exercită o excelentă activitate antibiofilm, față de tulpini bacteriene Gram-negative (în special față de biofilmul de *Pseudomonas aeruginosa*) și Gram-pozitive și tulpini levurice, având o valoare a concentrației minime de eradicare a biofilmului (CMEB) cuprinsă între 0,009 și 2,5 mg/ mL.

Toate substanțele chimice și solvenții au fost procurate de la companiile Merck sau Aldrich (Darmstadt și Steinheim, Germania).

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

Noii compuși **1a-c**, **2a-d** și **5** au fost caracterizați prin constantele lor fizice (temperatură de topire, solubilitate).

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

Structurile compușilor originali și ale compușilor intermediari au fost stabilite cu ajutorul spectrelor IR, ^1H -RMN și ^{13}C -RMN.

Spectrele IR au fost înregistrate pe un spectrometru FT-IR Bruker Vertex 70 (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Acestea au fost obținute folosind tehnica ATR și sunt redată ca: w - bandă slabă; m - banda medie; s - bandă intensă; vs - bandă foarte intensă.

Spectrele ^1H -RMN și ^{13}C -RMN au fost înregistrate în dimetilsulfoxid deuterat (dmsod6) sau cloroform deuterat (CDCl_3) de puritate izotopică 99,9%, 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 ^{13}C -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 , exprimate 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 (doublet), t (triplet), q (cvartet), m (multiplet), dd (dublu doublet) și l (semnal lățit). Datele ^1H -RMN sunt raportate în următoarea ordine: deplasări chimice, multiplicitate, constantele de cuplare, numărul de protoni și atribuirea semnal/ atom.

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

Deplasările chimice pentru atomii de hidrogen și carbon, au fost confirmate, de asemenea, prin experimente 2D-RMN.

Spectrul de masă al compusului **2d** a fost înregistrat la un spectrometru Maxis Bruker 4G (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) cu o sursă de ionizare electrospray (ESI). Probele au fost dizolvate în DMSO 1mg/ 1mL și apoi soluția a fost diluată cu metanol până la o concentrație finală de 1 μg / 1mL. Intervalul de scanare a ionilor moleculari (m/z) a fost de 50–1250.

Rezultatele obținute cu ajutorul analizelor spectrale confirmă structura noilor compuși și a intermediarilor utilizați și implicit sintezele efectuate.

În cele ce urmează vor fi prezentate **14 exemple** de realizare a invenției.

EXEMPLUL 1

(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoat de metil (esterul metilic al carprofenului)(4)

10 g de acid (RS)-2-(6-clor-9H-carbazol-2-il)propanoic (carprofen) (**3**) (Mr 273,71; 0,037 moli) se dizolvă sub agitare în 400 mL metanol absolut. După ce amestecul a devenit omogen, se adaugă prin picurare 1,2 mL de acid sulfuric concentrat (98%) drept catalizator și agitarea se continuă la temperatura camerei timp de 8 ore. După acest timp, se prelevează o probă și se verifică mersul reacției prin analiză RMN de proton și carbon. Din datele RMN se constată că după 8 ore, reacția este practic finalizată. Amestecul de reacție se lasă peste noapte la temperatura camerei, apoi metanolul se evaporă la presiune scăzută până când apare un precipitat. Peste amestecul de reacție se adaugă 200 mL de apă și precipitatul se filtrează la presiune scăzută și se spală bine cu apă, pe filtru, pentru a elimina urmele de acid. Precipitatul alb sau ușor galben se usucă la aer timp de 24 de ore.

Se obțin 10 g (randament 95%) de ester metilic al carprofenului (Mr 287,71) cu T.t. 107- 110 °C, solubil la rece în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, xilen, cloroform, acetat de etil, DMSO, DMF, piridină, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid in ATR, ν cm^{-1}): 3450w; 3405vs; 2983w; 2944w; 2875w; 1729vs; 1697m; 1624m; 1448m; 1429m; 1325w; 1269w; 1236w; 1193m; 1172m; 1093w; 1059m; 873w; 806m; 731w; 695w.

¹H-RMN (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8,26 (sl, 1H, H-9); 7,96 (sl, 1H, H-5); 7,92 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-4); 7,33 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-8); 7,31 (sl, 1H, H-1); 7,25 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-3); 7,17 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-7); 3,90 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H, H-10); 3,71 (s, 3H, H-13); 1,60 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H, H-11);

¹³C-RMN (CDCl_3 , δ ppm): 175,49 (C-12); 140,29 (C-8a); 139,01 (C-1a); 138,00 (C-2); 125,70 (C-7); 124,74 (C-5a); 124,11 (C-4a); 121,53 (C-6); 120,54 (C-4); 119,84 (C-5); 119,47 (C-3); 111,54 (C-8); 109,49 (C-1); 52,17 (C-13); 45,74 (C-10); 18,86 (C-11).

EXEMPLUL 2

(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propano hidrazida (hidrazida carprofenului) (5)

Într-un balon cu fund rotund de 100 mL prevăzut cu refrigerant ascendent, se introduce 6 g de ester metilic al carprofenului (Mr 287,71; 0,021 moli) și 40 mL de alcool etilic (96% sau absolut). Sub agitare magnetică, se adaugă 7,36g (7,15 mL; d_4^{25} 1,03) hidrat de hidrazină 100%

(Mr 50,06; 0,147 moli). Amestecul de reacție este refluxat timp de 8 ore cu agitare continuă. După câteva ore de refluxare, hidrazida poate precipita sub formă de cristale albe. După terminarea timpului de reacție, amestecul este răcit și hidrazida este filtrată la presiune scăzută și apoi spălată cu alcool rece pe filtru. După uscare, se obțin cu un randament de 70%, 4,2 grame de hidrazidă (Mr 287,75), compus cristalizat, alb cu temperatura de topire 241- 243 °C, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, solubil la cald în izobutanol, greu solubil la cald în acetat de etil, metanol, etanol, insolubil în clorură de metilen, cloroform, izopropanol, xilen, acetonitril, hexan și apă.

Se poate întâmpla să rămână ester metilic nereacționat și să co-precipite cu hidrazida, prezența acestuia în hidrazidă fiind ușor observată în spectrele $^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$ ale hidrazidei. Atunci când se constată că esterul este prezent în produsul final, acesta poate fi îndepărtat cu ușurință prin agitarea suspensiei de hidrazidă într-un solvent în care aceasta nu se dizolvă (clorură de metilen, cloroform, acetonitril etc.), dar în care esterul este ușor solubil. Prin filtrarea suspensiei se obține hidrazidă care poate fi folosită în continuare în reacții.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid în ATR, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 3347s; 3260m; 2979w; 2873w; 1632vs; 1517m; 1462s; 1428m; 1379w; 1338m; 1269m; 1238s; 1120w; 1061m; 988m; 926w; 885m; 828w; 800m; 733w; 690w.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, dms -d_6 , δ ppm, J Hz): 11,36 (s, 1H, H-9); 9,24 (s, 1H, HN); 8,15 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-5); 8,05 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-4); 7,48 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-8); 7,47 (sl, 1H, H-1); 7,35 (dd, $J = 2,2$ Hz, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-7); 7,16 (dd, $J = 1,4$ Hz, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-3); 4,21 (sl, 2H, H-N); 3,70 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H, H-10); 1,42 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-11);

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, dms -d_6 , δ ppm): 173,05 (C-12); 140,67 (C-8a); 140,56 (C-1a); 138,36 (C-2); 123,71 (C-5a); 123,56 (C-4a); 122,85 (C-6); 125,02 (C-7); 120,34 (C-4); 119,64 (C-5); 118,90 (C-3); 112,34 (C-8); 109,71 (C-1); 43,81 (C-10); 18,79 (C-11).

EXEMPLUL 3

N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazina (1a)

Într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu agitator, se introduc 0,86 g hidrazidă a carprofenului (Mr 287,737; 0,003 moli), 0,42 g clorură de benzoil (Mr 140,567; 0,003 moli) și 20 mL piridină anhidră. Amestecul se agită la temperatura camerei timp de 4 ore. După expirarea timpului de reacție, amestecul se toarnă într-o soluție rece, diluată de acid clorhidric (40 mL soluție 10% HCl). Se obține un precipitat care se izolează prin filtrare și se spală pe filtru cu apă.

După purificare din metanol și uscare, se obțin 1,02 grame de hidrazină N, N'-disubstituită (Mr 391,837) cu temperatura de topire de 262- 263 °C, cu un randament de 87,1% față de hidrazidă, solubilă la rece în piridină, DMF, DMSO, solubilă la cald în metanol, etanol, izobutanol, greu solubilă la cald în izopropanol, xilen, insolubilă în acetat de etil, hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid în ATR, ν cm^{-1}): 3356s; 3215m; 3084w; 3024w; 2974w; 2934w; 1706vs; 1651vs; 1576m; 1466s; 1367w; 1273m; 1241m; 1180w; 1144w; 1066w; 947w; 890w; 804w; 739w; 705m; 647w; 601m.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, dms o-d_6 , δ ppm, J Hz): 11,38 (sl, 1H, H-9); 10,34 (s, 1H, HN); 10,15 (s, 1H, NH); 8,17 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H-5); 8,09 (dd, $J = 1,5$ Hz, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-7); 7,86 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-15, H-19); 7,58- 7,44 (m, 4H, H-4, H-16, H-17, H-18); 7,53 (sl, 1H, H-1); 7,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-8); 7,23 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-3); 3,92 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H, H-10); 1,50 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-11);

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, dms o-d_6 , δ ppm): 172,74 (C-12); 165,93 (C-13); 140,28 (C-8a); 138,91 (C-1a); 138,11 (C-2); 132,32 (C-14); 131,70 (C-17); 128,35 (C-16, C-18); 127,30 (C-15, C-19); 124,93 (C-7); 123,53 (C-5a); 122,72 (C-4a); 120,30 (C-4); 120,26 (C-6); 119,56 (C-5); 118,89 (C-3); 112,20 (C-8); 109,72 (C-1); 43,56 (C-10); 18,85 (C-11).

EXEMPLUL 4

N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-(4-clorobenzoil)hidrazina (1b)

Compusul a fost preparat prin metoda de mai sus, necesitând 0,525 g clorură de *p*-clorobenzoil (Mr 175,012; 0,003 moli).

După purificare din izobutanol, s-a obținut 1,04 g de compus (Mr 426,29) (randament 81,6% față de hidrazidă), cu T.t. 268- 270 °C, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, solubil la cald în izobutanol, greu solubil la cald în metanol, etanol, izopropanol, acetat de etil, insolubil în xilen, hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid în ATR, ν cm^{-1}): 3414w; 3201m; 1599vs; 1567m; 1454m; 1273w; 1221w; 1152w; 1093w; 848w; 802w; 754w; 730w; 659w.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, dms o-d_6 , δ ppm, J Hz): 11,41 (sl, 1H, H-9); 10,46 (s, 1H, HN); 10,21 (s, 1H, NH); 8,17 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-5); 8,09 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-4); 7,87 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-15, H-19); 7,56 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H-16, H-18); 7,52 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, H-1); 7,48 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H-8); 7,36 (dd, $J = 2,1$ Hz, $J = 8,7$ Hz, 1H, H-7); 7,22 (dd, $J = 1,3$ Hz, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-3); 3,93 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H, H-10); 1,49 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-11);

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, dms o-d_6 , δ ppm): 172,90 (C-12); 164,49 (C-13); 140,55 (C-8a); 139,98 (C-1a); 138,38 (C-2); 136,69 (C-17); 131,16 (C-14); 129,35 (C-15, C-19); 128,63 (C-16, C-18); 125,06 (C-7); 123,62 (C-4a); 122,83 (C-5a); 120,43 (C-4); 120,37 (C-6); 119,67 (C-5); 118,97 (C-3); 112,31 (C-8); 109,81 (C-1); 43,57 (C-10); 18,83 (C-11).

EXEMPLUL 5

N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]-N'-(3-trifluorometilbenzoil)

hidrazina (1c)

Sinteza urmează procedura descrisă pentru prepararea compusului **1a** utilizând 0,625 g clorură de 3-trifluorometilbenzoil (Mr 208,56; 0,003 moli).

Au rezultat 1,06 g de compus (Mr 459,847) după recristalizare din izopropanol: apă 1: 3, cu randament 77,12 % față de hidrazidă, T.t. 216- 219 °C, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, acetat de etil, metanol, etanol, solubil la cald în izopropanol, izobutanol, xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid in ATR, ν cm^{-1}): 3405m; 3357vs; 3209m; 3079w; 3023w; 2967w; 2932w; 1708vs; 1649vs; 1550w; 1474m; 1449m; 1331s; 1273m; 1225m; 1174s; 1125s; 1071m; 923w; 880w; 818w; 742w; 693m; 603m;

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, dms o-d_6 , δ ppm, J Hz): 11,38 (s, 1H, NH-9); 10,66 (sl, 1H, HN); 10,29 (s, 1H, NH); 8,20 (sl, 1H, H-15); 8,17 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-5); 8,16 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-19); 8,09 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-4); 7,95 (dl, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-17); 7,75 (tl, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-18); 7,53 (sl, 1H, H-1); 7,48 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-8); 7,36 (dd, $J = 1,9$ Hz, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-7); 7,22 (dd, $J = 1,3$ Hz, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-3); 3,94 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H, H-10); 1,49 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, H-11);

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, dms o-d_6 , δ ppm): 172,82 (C-12); 164,00 (C-13); 140,53 (C-8a); 139,94 (C-1a); 138,36 (C-2); 133,29 (C-14); 131,53 (C-19); 130,06 (C-18); 129,52 (q, $J(3\text{F-C}^{16})=31,7$ Hz, C-16); 128,43 (q, $J(\text{F-C}^{17})=3,8$ Hz, C-17); 125,02 (C-7); 124,05 (q, $J(\text{F-C}^{15})=3,8$ Hz, C-15); 123,88 (C-4a); 123,70 (q, $J(3\text{F-C})=267,8$ Hz, $-\text{CF}_3$); 123,63 (C-5a); 120,40 (C-6); 120,45 (C-4); 119,65 (C-5); 118,91 (C-3); 112,33 (C-8); 109,83 (C-1); 43,56 (C-10); 18,78 (C-11).

EXEMPLUL 6

(RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan (2a)

Într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu un refrigerant ascendent la care este atașat un tub cu clorură de calciu, se introduc 0,784 g de N-[(2RS)-2-(6-cloro-9H-carbazol-2-

il)propanoil]-N¹-benzoilhidrazină (Mr 391,837; 0,002 moli) și 8 mL oxiclrorură de fosfor (Mr 153,33). Amestecul se încălzește în baia de apă timp de 9 ore, apoi se răcește și se toarnă, sub agitare, peste apă cu gheață. Precipitatul rezultat se filtrează, se spală cu apă și se recristalizează din izopropanol apă 1: 2,5.

Se obțin 0,48 g de compus (Mr 373,827), randament 64,2% față de acil-hidrazidă, cu T.t. 185- 186,5 °C, solubil la rece în piridină, acetat de etil, DMF, DMSO, solubil la cald în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid in ATR, ν cm^{-1}): 3238s; 2979w; 2940w; 2780w; 1609m; 1551s; 1454vs; 1375w; 1330w; 1268s; 1244m; 1210m; 1062m; 1017w; 925w; 887w; 816m; 775w; 752m; 685s; 649w; 621m.

¹H- RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8,70 (sl, 1H, H-9, deuterabil); 8,01- 7,94 (m, 4H, H-4, H-7, H-15, H-19); 7,52 - 7,39 (m, 4H, H-3, H-16, H-17, H-18); 7,33 (sl, 2H, H-1, H-5); 7,26 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-8); 4,58 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-10); 1,90 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, H-11);

¹³C- RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 169,17 (C-12); 165,10 (C-13); 140,51 (C-8a); 138,77 (C-2); 138,24 (C-1a); 131,71 (C-17); 129,00 (C-16, C-18); 126,87 (C-15, C-19); 125,96 (C-7); 124,90 (C-14); 124,10 (C-5a); 123,82 (C-4a); 121,91 (C-6); 120,89 (C-4); 119,98 (C-5); 119,18 (C-3); 111,75 (C-8); 109,58 (C-1); 38,01 (C-10); 20,04 (C-11).

EXEMPLUL 7

(RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(5-(4-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan (2b)

Sinteza urmează procedura descrisă pentru prepararea compusului **2a**, utilizând 0,819 g acil-hidrazidă corespunzătoare (Mr 409,837; 0,002 moli). Purificarea se face din izopropanol.

Se obțin 0,56 g de compus (Mr 405,27), randament 69,1 % față de acil-hidrazidă, cu T.t. 200- 204 °C, solubil la rece în piridină, DMF, DMSO, acetat de etil, solubil la cald în etanol, izopropanol, izobutanol, xilen, greu solubil la cald în metanol, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid in ATR, ν cm^{-1}): 3268m; 3088w; 2978w; 1606s; 1563m; 1481vs; 1462s; 1432m; 1408w; 1338w; 1274s; 1246m; 1095m; 1063m; 1013m; 873w; 834m; 817s; 792m; 627w;

¹H- RMN (300 MHz, dmsO-d_6 , δ ppm, J Hz): 11,41 (s, 1H, H-9); 8,18 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-5); 8,13 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-4); 7,93 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-15, H-19); 7,61 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-16, H-18); 7,48 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-8); 7,46 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, H-1); 7,36 (dd, $J = 2,2$ Hz, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-7); 7,18 (dd, $J = 1,6$ Hz, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-3); 4,73 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-10); 1,79 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, H-11);

¹³C- RMN (75 MHz, dms_o-d₆, δ ppm): 169,18 (C-12); 163,39 (C-13); 140,57 (C-8a); 138,98 (C-1a); 138,42 (C-2); 136,61 (C-14); 129,56 (C-15, C-19); 128,22 (C-16, C-18); 125,33 (C-7); 123,46 (C-4a); 122,99 (C-5a); 122,21 (C-17); 121,14 (C-4); 120,82 (C-6); 119,77 (C-5); 118,38 (C-3); 112,44 (C-8); 109,83 (C-1); 36,95 (C-10); 19,91 (C-11).

EXEMPLUL 8

(RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-(5-(3-trifluorometilfenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan (2c)

Sinteza urmează procedura descrisă pentru prepararea compusului **2a**, utilizând 0,919 g acil-hidrazidă corespunzătoare (Mr 459,847; 0,002 moli). Purificarea se face din izopropanol.

Se obțin 0,55 g compus (Mr 441,827), randament 62,3% față de acil-hidrazidă, cu T.t. 169- 172 °C, solubil la rece în piridină, acetat de etil, DMF, DMSO, solubil la cald în metanol, etanol, izopropanol, izobutanol, xilen, insolubil în hexan și apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid in ATR, ν cm⁻¹): 3416w; 3239w; 3083w; 2984w; 1616w; 1559m; 1469m; 1428m; 1378w; 1328s; 1272m; 1244m; 1170m; 1131vs; 1068m; 1014w; 971w; 927w; 869w; 811m; 752w; 732w; 697m.

¹H- RMN (500 MHz, dms_o-d₆, δ ppm, J Hz): 11,40 (sl, 1H, H-9); 8,22 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-19); 8,18 (sl, 1H, H-15); 8,17 (s, 1H, H-5); 8,13 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-8); 7,96 (dl, J = 7,9 Hz, 1H, H-17); 7,79 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H-18); 7,48 (s, 1H, H-1); 7,48 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-4); 7,36 (dd, J = 2,1 Hz, J = 8,5 Hz, 1H, H-7); 7,19 (dd, J = 1,3 Hz, J = 8,1 Hz, 1H, H-3); 4,76 (q, J = 7,2 Hz, 1H, H-10); 1,80 (d, J = 7,2 Hz, 3H, H-11);

¹³C-RMN (125 MHz, dms_o-d₆, δ ppm): 169,54 (C-12); 163,08 (C-13); 140,43 (C-8a); 138,94 (C-1a); 138,29 (C-2); 130,85 (C-18); 130,44 (C-19); 130,08 (q, J(3F-C¹⁶)=32,5 Hz, C-16); 128,37 (q, J(3F-C¹⁷)=3,8 Hz, C-17); 125,35 (C-7); 124,45 (C-14); 123,60 (q, J(3F-C)=212,5 Hz, -CF₃); 123,47 (C-4a); 123,43 (C-5a); 122,73 (q, J(3F-C¹⁵)=3,8 Hz, C-15); 121,14 (C-4); 120,84 (C-6); 119,78 (C-5); 118,42 (C-3); 112,41 (C-8); 109,82 (C-1); 36,98(C-10); 19,99 (C-11).

EXEMPLUL 9

(RS)-1-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-1-[5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]etan (2d)

Într-o instalație prevăzută cu refrigerent ascendent, încălzire și agitare magnetică, se introduc 0,273g acid (RS)-2-(6-clor-9H-carbazol-2-il)propanoic (carprofen)(**3**) (Mr 273,71; 0,001 moli), 0,14 g izoniazidă (Mr 137,139; 0,001 moli) și 2 mL POCl₃. Se agită magnetic câteva minute și apoi se refluxează sub agitare timp de 2h30'. După expirarea timpului, se

concentrează la rotavapor, când se elimină excesul de POCl_3 , apoi peste amestecul obținut se toarnă 10 mL apă, când precipită un produs roșu cărămiziu. Precipitatul format se filtrează la vid și se spală de câteva ori cu apă rece (apă cu gheață), apoi produsul cristalin, orange-cărămiziu este uscat. Purificarea se face din apă: etanol (2: 1).

Se obțin 0,34 g compus ($\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ON}_4\text{Cl}$) (Mr 374,5), randament 91% față de carprofen, cu T.t.173- 175 °C, solubil la rece în acetonă, DMSO, DMF și metanol: diclorometan 1: 1, solubil la cald în metanol, benzen, hexan, diclorometan, dimetilsulfoxid, greu solubil la cald în etanol, cloroform, toluen, eter de petrol, insolubil în apă, xilen, eter etilic și acetat de etil.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

FT-IR (solid in ATR, ν cm^{-1}): 3241m; 3104w; 2979w; 2934w; 1691m; 1610w; 1551m; 1473vs; 1461vs; 1432m; 1358w; 1337w; 1273vs; 1217m; 1173m; 1065s; 928w; 871w; 817m; 753w; 699w; 584w.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 11,41 (s, 1H, H-9); 8,80 (dd, $J = 1,6$ Hz, $J = 8,2$ Hz, 2H, H-16, H-18); 8,19 (s, 1H, H-5); 8,13- 8,19 (m, 2H, H-15, H-19); 7,90 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-8); 7,49 (s, 1H, H-1); 7,48 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-4); 7,36 (dd, $J = 1,8$ Hz, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-7); 7,18 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-3); 4,80 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-10); 1,80 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, H-11);

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 170,03 (C-12); 162,65 (C-13); 150,74 (C-16, C-18); 140,56 (C-8a); 138,79 (C-1a); 130,65 (C-2); 125,86 (C-7); 125,36 (C-14); 123,45 (C-4a); 123,0 (C-5a); 122,99 (C-4); 120,86 (C-6); 120,28 (C-15, C-19), 120,20 (C-5); 118,41 (C-3); 112,47 (C-8); 109,90 (C-1); 36,98 (C-10); 19,50 (C-11).

Pentru confirmarea structurii, **2d** a fost analizat și prin spectroscopie de masă, fiind observată apariția unui pic corespunzător ionului molecular 375,1 [M^+H], ceea ce confirmă masa moleculară a acestui compus.

EXEMPLUL 10

Studiul biofarmaceutic *in silico* al compușilor **1a-c** și **2a-c** permite evaluarea proprietăților farmacocinetice și farmacodinamice precum și predicția unor mecanisme de acțiune ale compușilor nou sintetizați și caracterizați, prin aplicarea metodelor bioinformatică, cheminformatică și de farmacologie computațională. Studiile bioinformatică și cheminformatică pentru compușii **1a-c** și **2a-c** au inclus următoarele etape: modelarea moleculară a compușilor, minimizarea energetică a compușilor pentru obținerea stabilității moleculare maxime, stabilirea profilului drug-like și a biodisponibilității, predicția mecanismului de acțiune prin evaluarea gradului inhibitor pe ținte moleculare, evaluarea

similarității moleculare cu alte structuri antimicrobiene precum și identificarea profilului ADME-Tox pentru acești compuși.

Modelarea moleculară a compușilor

Seria de molecule **1a-c** și **2a-c** a fost modelată în soft-ul Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016), pornind de la compusul template carprofen. Aceasta a constat în modelarea structurilor 2D, cu adăugarea substituenților specifici și completarea valențelor cu atomi de hidrogen și trecerea acestor structuri în spațiu tridimensional (obținerea structurilor spațiale 3D).

Minimizarea energetică

Minimizarea acestor molecule s-a făcut utilizând metoda Hamiltonian: Forcefield MMFF94x, la un gradient de 0,05. După calcularea energiei minime, s-au aplicat sarcinile parțiale Gasteiger (PEOE).

Determinarea caracterului drug-like și a biodisponibilității pentru compușii 1a-c și 2a-c

O primă etapă în stabilirea caracterului farmacologic al compușilor nou sintetizați, este ca structura acestora să respecte cel puțin două reguli- regula Lipinski și regula Veber [Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. J. Med. Chem., 2002, 45 (12), 2615-2623].

Caracterul drug-like al acestor molecule a fost determinat aplicând regula lui Lipinski, iar biodisponibilitatea compușilor **1a-c** și **2a-c** a fost testată cu ajutorul regulii lui Veber. Regula Lipinski menționează că, pentru a avea o posibilă acțiune medicamentoasă, un compus trebuie să respecte cel puțin 3 dintre următoarele caracteristici: o masă moleculară mai mică de 500 g/ mol, coeficientul de partiție dintre apă și octanol (LogP (o/w)) mai mic de 5, numărul de legături de hidrogen donoare de maxim 5, numărul de legături de hidrogen acceptoare de maxim 10. Regula Veber menționează că un compus cu o bună biodisponibilitate trebuie să aibă maxim 10 legături rotabile, iar suprafața polară totală trebuie să fie de maxim 140 Å².

În ceea ce privește identificarea caracterului de agent farmacologic pentru compușii **1a-c** și **2a-c** prin respectarea regulii Lipinski, putem menționa că toți compușii studiați respectă această regulă. (Tabelul 1). Toate moleculele testate prezintă o bună biodisponibilitate, conform regulii Veber (Tabelul 1).

Tabelul 1. Validarea regulilor Lipinski și Veber, scor de biodisponibilitate și masă moleculară

Compus	Regula Lipinski	Regula Veber	Scor de biodisponibilitate	MW (g/mol)
1a	DA	DA	0.55	391.85
1b	DA*	DA	0.55	459.85
1c	DA*	DA	0.55	426.30
2a	DA	DA	0.55	373.83
2b	DA*	DA	0.55	408.28
2c	DA	DA	0.55	441.83
carprofen	DA	DA	0.56	273.71

Compușii **1b**, **1c** și **2b** nu respectă criteriul Log P fiind mai mare de 5, respectând celelalte criterii ale regulii Lipinski.

Identificarea mecanismului de acțiune

Prin aplicarea tehnicilor bioinformaticice (www.expasy.com, <https://www.molinspiration.com/>), a fost evaluat predictiv procentul de legare al compușilor **1a-c** și **2a-c** de diverse ținte moleculare, precum receptori metabotropi, canale ionice, proteaze, tirozinkinaze, etc. Am utilizat metode bioinformaticice variate, în scopul de a identifica mecanismul de acțiune al acestor compuși cât mai exact.

Mecanismul de acțiune al compușilor **1a-c** și **2a-c** a fost evaluat prin metode bioinformaticice (<http://www.swisstargetprediction.ch>) și cheminformaticice (www.molinspiration.com), comparând rezultatele cu mecanismele de acțiune al carprofenului.

Pentru aceasta, am încărcat structurile smiles descriind compușii studiați în baza de date SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) (Tabelul 2b), precum și în softul de modelare Molinspiration (www.molinspiration.com) (Tabelul 2a).

Tabel 2a. Predicția mecanismului de acțiune la nivelul receptorilor metabotropi, canalelor ionice, kinazelor, receptorului nuclear, proteazelor (www.molinspiration.com)

Compus	Ligand GPCR (probabilitate)	Mediator canale ionice (probabilitate)	Ligand al receptorului nuclear (probabilitate)	Inhibitor al proteazelor (probabilitate)
1a	-0.07	-0.18	-0.50	-0.13
1b	-0.00	-0.09	-0.32	-0.09
1c	-0.07	-0.17	-0.48	-0.13
2a	0.17	-0.05	0.10	-0.10
2b	0.11	-0.14	-0.10	-0.15
2c	0.17	-0.05	0.10	-0.10
carprofen	0.12	0.21	0.20	-0.15

Valorile predictive ale mecanismelor de acțiune ale compușilor **2a** și **2c** sunt apropiate carprofenului pentru receptorii metabotropi. Compușii par mai activi în inhibarea kinazelor, mai puțin activi la nivelul receptorilor nucleari și inactivi la nivelul canalelor ionice.

Tabel 2b. Structurile țintă pentru compușii **1a-c** și **2a-c** (exprimat procentual) (<http://www.swisstargetprediction.ch>)

Compus	Inhibitor al kinazei	Proteaze	Fosfataze	Receptori metabotropi
1a	60%	13%	-	
1b	60%	-	-	13%
1c	53%	13%	-	-
2a	-	-	-	53%
2b	7%	-	-	27%
2c	33%			27%
carprofen	47%	-	13%	-

Carprofenul este inhibitor al enzimelor Prostaglandin G/H synthase 1 și Prostaglandin G/H synthase 2 Fatty-acid amide hydrolase 1. Compusul **1a** inhibă tirozinkinazele și anume- Insulin receptor, Tyrosine-protein kinase Fyn, Tyrosine-protein kinase, Insulin-like growth factor 1 receptor, Tyrosine-protein kinase Fgr, Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, Insulin receptor-related protein alpha chain, Tyrosine-protein kinase FRK. Compusul **1b** inhibă tirozinkinazele și anume- Insulin receptor, Tyrosine-protein kinase Fyn, Tyrosine-protein kinase, Insulin-like growth factor 1 receptor, Tyrosine-protein kinase Fgr, Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, Insulin receptor-related protein alpha chain, Tyrosine-protein kinase FRK. Compusul **1c** inhibă tirozinkinazele (într-un procent mai redus decât **1a** și **1b**), Tyrosine-protein kinase Fyn, Tyrosine-protein kinase Fgr, Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, Tyrosine-protein kinase FRK, Insulin receptor, Insulin-like growth factor 1 receptor, Kinase Insulin receptor-related protein alpha chain. Compușii **2a** și **2b** sunt liganzi pentru: Microtubule-associated protein tau, Muscleblind-like protein 1, Muscleblind-like protein 3. Compusul **2c** este ligand pentru serin-tirozin kinaze într-un procent redus.

Ca o trăsătură comună, carprofenul, **1a**, **1b**, **1c**, **2b** și **2c** sunt liganzi pentru kinaze, iar **2b** și **2c** sunt liganzi și pentru receptorii metabotropi, în timp ce **2a** este ligand numai pentru receptorii metabotropi.

Similarități structurale compuși analizați- compuși chimici baze de date

Considerând principiul că similarități structurale pot induce similarități funcționale, prin accesarea bazei de date Exspasy/medicinal chemistry, am identificat posibilele similarități structurale ale compușilor analizați. Rezultatul similarității este prezentat în Tabelul 3.

Tabelul 3. Similarități structurale

Compus	Compus similar	procent	Structura chimică	Structura țintă
1a	CHEMBL2171276*	0.602	2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-N-fenilpropanamida*	inhibarea Faah - fatty acid amide hydrolase (șobolan Norway)
	CHEMBL2171249	0.585		
	CHEMBL1316	0.585		
1b	CHEMBL2171276	0.557	2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-N-fenilpropanamida	inhibarea Faah - fatty acid amide hydrolase (șobolan Norway)
1c	CHEMBL2171276*	0.590	2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)-N-fenilpropanamida	inhibarea Faah - fatty acid amide hydrolase (șobolan Norway)
	CHEMBL2171249	0.573		
	CHEMBL1316	0.573		
2a	CHEMBL380021*	0.595	2-[2-[5-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4-oxadiazol-2-il]-1~{H}-indol-4-il]-~{N},~{N}-dimetiletanamina*	ligand al receptorului nociceptiv
	CHEMBL2418797	0.588		
	CHEMBL197502	0.557		
2b	CHEMBL380021*	0.594	2-[2-[5-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4-oxadiazol-2-il]-1~{H}-indol-4-il]-~{N},~{N}-dimetiletanamina*	ligand al receptorului nociceptiv
	CHEMBL2418797	0.576		
2c	CHEMBL2418770	0.587	2-(3~{H}-benzimidazol-5-il)-5-[2-[4-(trifluorometil)fenil]etil]-1,3,4-oxadiazol*	inhibarea QPCT - glutaminyl-peptide cyclotransferase (umană)
	CHEMBL380021	0.565		

Identificarea profilului farmacocinetic al compușilor 1a-c și 2a-c

În ceea ce privește predicția Absorbției, Distribuției, Metabolizării, Excreției și Toxicității (ADMET) compușilor **1a-c** și **2a-c**, am utilizat platforma pkCSM [Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.*, 2015, 58(9), 4066- 4072], iar în ceea ce privește toxicitatea acestora, am comparat rezultatele obținute din mai multe baze de date [Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Lee P. W., Tang Y. AdmetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 52(11), 3099-3105, www.exPASy.com, http://tox.charite.de/prottox_II].

Din seria de proprietăți ADMET oferite de aceste baze de date, am selectat pentru compușii studiați: 1. absorbția intestinală, 2. permeabilitatea la nivelul barierei hematoencefalice (BBB), 3. permeabilitatea la nivelul sistemului nervos central (CNS), 4. toxicitatea AMES, 5. doza maximă tolerată la om, capacitatea de a inhiba gena human ether-a-go-go (hERG I și hERG II), 6. doza letală 50 (șobolan) (DL50), 7. hepatotoxicitatea, 8. capacitatea substanței de a genera efecte cancerigene.

Predicțiile ADMET sugerează că, în ceea ce privește absorbția intestinală, toate moleculele prezintă o bună absorbție. Valorile sunt precise numeric, iar o valoare a absorbției intestinale mai mare de 30% a unei molecule, reprezintă o bună absorbție a acesteia la nivelul intestinului subțire [Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.*, 2015, 58(9), 4066-4072] (Tabelul 4).

Permeabilitatea unui compus pentru linia celulară Caco2, ne ajută să prezicem dacă acest compus este absorbit când este administrat pe cale orală. O permeabilitate mai mare de 0,9 este considerată o permeabilitate ridicată. Toate moleculele testate prezintă o bună

permeabilitate a liniei celulare Caco2, prin urmare o bună absorbție pe cale orală [Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. J. Med. Chem., 58(9), 2015, 4066-4072], (Tabelul 4). Moleculele **2a**, **2b** și **2c** prezintă o permeabilitate a barierei hematoencefalice medie.

Tabelul 4. Predicția absorbției intestinale, permeabilității Caco2, BBB, Renal OCT2

Molecula	1a	1b	1c	2a	2b	2c	carprofen	Unitate de măsură
Absorbția intestinală	91	89	90	94	92	91	94	% Absorbit
Permeabilitatea Caco-2 pkCSM	0.919	0.944	0.934	1.021	1.01	1.016	1.301	log Papp in ^{10⁻⁶} cm/s
Permeabilitatea BBB	-0.635	-0.942	-0.816	0.428	0.383	0.342	0.191	log BB
Substrat renal OCT2	NU	NU	NU	NU	NU	NU	NU	

Toxicitatea AMES prezice potențialul mutagen al unui compus, testul pozitiv indicând un compus mutagen [Pires D. E. V., Blundell T. L., Ascher D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. J. Med. Chem., 2015, 58(9), 4066-4072] (Tabelul 5). Doza maximă tolerată prezisă pentru om este considerată mică pentru toate moleculele testate (Tabelul 5). Inhibarea canalelor de potasiu codificate de gena hERG, reprezintă principala cauză a dezvoltării sindromului de prelungire a intervalului QT pe electrocardiogramă. Predicțiile din baza de date pkCSM, sugerează faptul că toate moleculele inhibă hERG II, iar cele din baza de date admetSAR sugerează faptul că toate moleculele au activitate inhibitorie slabă asupra hERG I (Tabelul 5). În ceea ce privește hepatotoxicitatea, predicțiile sugerează faptul că moleculele studiate prezintă hepatotoxicitate (Tabelul 5).

Tabelul 5. Descriptorii pentru toxicitate

Molecula	1a	1b	1c	2a	2b	2c	Unitate de măsură
Tox. AMES	da	da	da	da	da	da	DA/NU
DMT(om)	0.19	0.13	0.16	0.41	0.36	0.33	log mg/kg/zi
I. hERGI	nu	nu	nu	nu	nu	nu	DA/NU
I. hERGII	da	da	da	da	da	da	DA/NU
DL50	2.46	2.46	2.50	2.30	2.33	2.34	mol/kg
Hepatotoxicitate	da	da	da	da	da	da	DA/NU

Tox- toxicitate, I- inhibitor, DMT- doza maximă tolerată

EXEMPLUL 11

Activitatea antimicrobiană a noilor compuși a fost determinată față de tulpini bacteriene Gram- negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) și fungice (*Candida albicans* ATCC 90029), utilizând 3 abordări experimentale.

a. Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării concentrației minime inhibitorii (CMI)

Determinarea valorii CMI, respectiv concentrația minimă de compus care determină inhibarea creșterii vizibile a unei tulpini microbiene, s-a realizat prin metoda microdiluțiilor binare seriale în mediu Mueller Hinton lichid, în microplăci cu 96 de godeuri. Diluțiile de compus s-au realizat într-un volum final de 100 μ L de mediu, în primele 10 godeuri ale unui șir de 12 godeuri, pornind de la o concentrație de 10 mg/ mL, realizată în DMSO (dimetil sulfoxid). Ulterior, godeurile au fost însămânțate cu câte 20 μ L suspensie microbiană cu densitate corespunzătoare standardului nefelometric 0,5 MacFarland. Ultimele două godeuri au fost utilizate pentru realizarea controalelor (pozitiv - reprezentat de cultura microbiană cultivată în absența compusului de testat și negativ - reprezentat de mediul de cultură steril). Microplăcile au fost incubate la 37 °C timp de 24 de ore, după care godeurile au fost inspectate vizual, pentru stabilirea CMI, corespunzătoare godeului în care nu s-a mai observat creștere microbiană, conținutul acestuia rămânând clar, transparent, cu aspect similar controlului negativ.

Compușii testați au prezentat activitate antimicrobiană cu valori CMI cuprinse între 0,625 și 10 mg/ mL (Tabelul 6), cele mai sensibile tulpini microbiene fiind cele Gram-negative, urmate de tulpina de *C. albicans*. Se remarcă eficiența crescută a compusului **1a** față tulpina de *E. coli* (CMI 1,25 mg/mL) și a compusului **2c** față de tulpina de *C. albicans* (0,625 mg/mL).

Tabelul 6. Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene și valorile corespunzătoare CMI (mg/ mL)

Compus chimic	1a	1b	1c	2a	2b	2c	2d
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10	5	10	5	5	2,5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	5	2,5	2,5	5	5	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5	5	2,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	5	2,5	5	2,5	2,5	0,625	5

b. Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării concentrației minime bactericide (CMB)

După citirea valorilor CMI, un volum de 10 μ L din godeul corespunzător valorii CMI și din toate godeurile anterioare a fost însămânțat 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 0,625 și 10 mg/mL. Se remarcă faptul că valorile CMB au fost în multe cazuri similare cu valorile CMI, ceea ce sugerează un mecanism de acțiune antimicrobiană de tip microbicid (Tabelul 7).

Tabelul 7. Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene și valorile corespunzătoare CMB (mg/ mL)

Compus chimic Tulpină microbiană	1a	1b	1c	2a	2b	2c	2d
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10	10	10	10	10	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	5	5	5	5	5	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,25	5	5	5	5	5	5
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	10	5	10	5	5	0,625	10

c. Studiul activității anti-biofilm a compușilor testați

Microplăcile utilizate pentru determinarea valorilor CMI și CMB au fost golite, godeurile au fost spălate de două- trei ori cu ser fiziologic steril pentru îndepărtarea celulelor slab aderente, după care biofilmele formate pe pereții godeurilor au fost fixate timp de 5 minute cu 100 μ L metanol rece, colorate cu soluție alcalină 1% de cristal violet, timp de 15 minute și apoi repuse în suspensie cu acid acetic 33%. După omogenizarea suspensiei colorate, densitatea optică a acestora a fost măsurată la 490 nm. Concentrația minimă de eradicare a biofilmelor (CMEB) a fost stabilită ca fiind concentrația cea mai mică de compus la care se observă diminuarea valorii absorbanței la 490 nm, comparativ cu controlul pozitiv.

Toți compușii testați au manifestat excelente proprietăți anti-biofilm față de tulpinile microbiene bacteriene și fungice, valorile CMEB fiind cuprinse, cu două excepții, între 0,009 și 2,5 mg/ mL. Valorile CMEB au fost în unele cazuri de până la 256 de ori mai mici decât valorile CMI sau CMB (Tabelul 8). Este de remarcat sensibilitatea foarte ridicată a biofilmului de *P. aeruginosa* la toți compușii testați.

Tabelul 8. Rezultatele testării activității anti- biofilm și valorile corespunzătoare CMEB (mg/ mL)

Compus chimic	1a	1b	1c	2a	2b	2c	2d
Tulpină microbiană							
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2,5	0,009	2,5	1,25	0,078	10	0,625
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,25	0,625	1,25	0,312	0,039	1,25	0,312
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,625
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,25	1,25	1,25	10	1,25	2,5	1,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	0,312	0,039	0,625	0,078	1,25	0,312	0,156

EXEMPLUL 12

Compușii sintetizați au fost evaluați din punct de vedere al citotoxicității.

Materiale

Culturile de celule utilizate în experimente au fost HeLa (ATCC® CCL-2™) și linia de keratinocite imortalizate HaCaT. Acestea au fost menținute în mediu DMEM : F12 suplimentat cu 10% ser fetal bovin.

Compușii **1a-c**, **2a-d** au fost diluați în DMSO la o concentrație de 20mg/ mL și aduși la o concentrație de 2 mg/ mL în DMEM : F12. Soluțiile au fost sterilizate prin filtrare cu filtru de 0,22μm.

Evaluarea citotoxicității utilizând kitul CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

Celulele au fost însămânțate la o concentrație de $7,5 \times 10^4$ /godeu în plăci de 96 godeuri, în mediu conținând substanța testată în concentrații cuprinse între 500μg/ mL și 15,75μg/ mL. La 48 de ore efectul compușilor a fost evaluat prin adăugarea sării de tetrazoliu, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu.

Evaluarea toxicității s-a realizat la 2h prin citire la lungimea de unda 490 nm, utilizând spectrofotometrul Tristar Berthold Technologies (Berthold Technologies, Germany).

Evaluarea toxicității utilizând colorația fluorescein diacetat (FDA) –iodura de propidium (PI)

Celulele au fost însămânțate la o concentrație de $7,5 \times 10^5$ /godeu în plăci de 24 godeuri în mediu conținând 1mg/ mL compus. La 24h viabilitatea celulară a fost evaluată prin colorare cu FDA (10μg/ mL) și PI (20 μg/ mL). Celulele au fost observate la microscopul cu fluorescență Observer Zeiss.

Celulele viabile convertesc FDA non-fluorescent printr-o reacție dependent de esterază în metabolitul fluorescein observat în verde. În contrast, PI intră în celulele moarte și se intercalează în dublul helix ADN colorând celulele în roșu.

Evaluarea ciclului celular

Celulele au fost însămânțate la o concentrație de $7,5 \times 10^5$ /godeu în plăci de 24 godeuri și au fost menținute într-un mediu conținând $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ compus pentru 48h. Celulele au fost tripsinizate, spălate în tampon fosfat salin, fixate în etanol 70% rece și colorate cu soluție $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ iodură de propidiu. Evaluarea s-a realizat utilizând citometrul în flux Beckman Coulter XLM și software Flow Jo7.

Rezultate

Concentrații mai mari de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ sunt toxice, viabilitatea scăzând gradual la 48h în funcție de concentrație (Figura 1). Toți compușii la concentrații de $1 \text{ mg}/\text{mL}$ sunt foarte toxici, viabilitatea celulară scăzând dramatic în 24 de ore, așa cum se observă în Figura 2. La 48h, la concentrații de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, compușii nu modifică fazele ciclului celular în celulele HeLa, dar se observă o fluctuație a fazei de sinteză în cazul celulelor HaCaT (Figura 3).

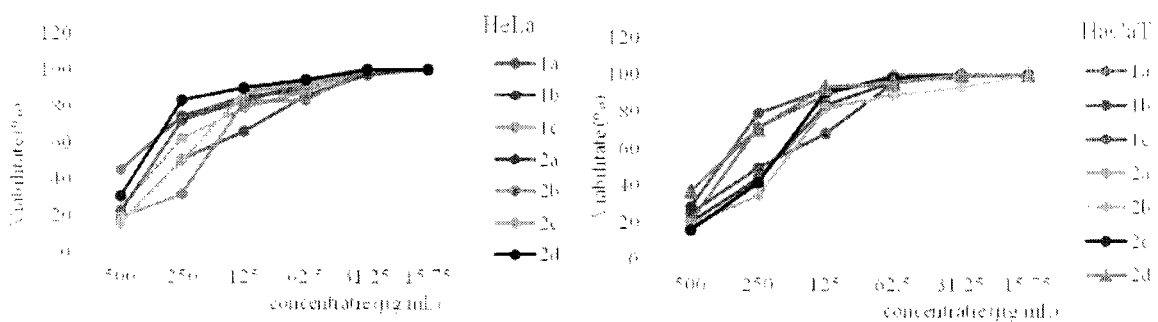


Figura 1. Citotoxicitatea compușilor **1a-c**, **2a-d** asupra celulelor HeLa și HaCaT (evaluare la 48 h utilizând kitul CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation).

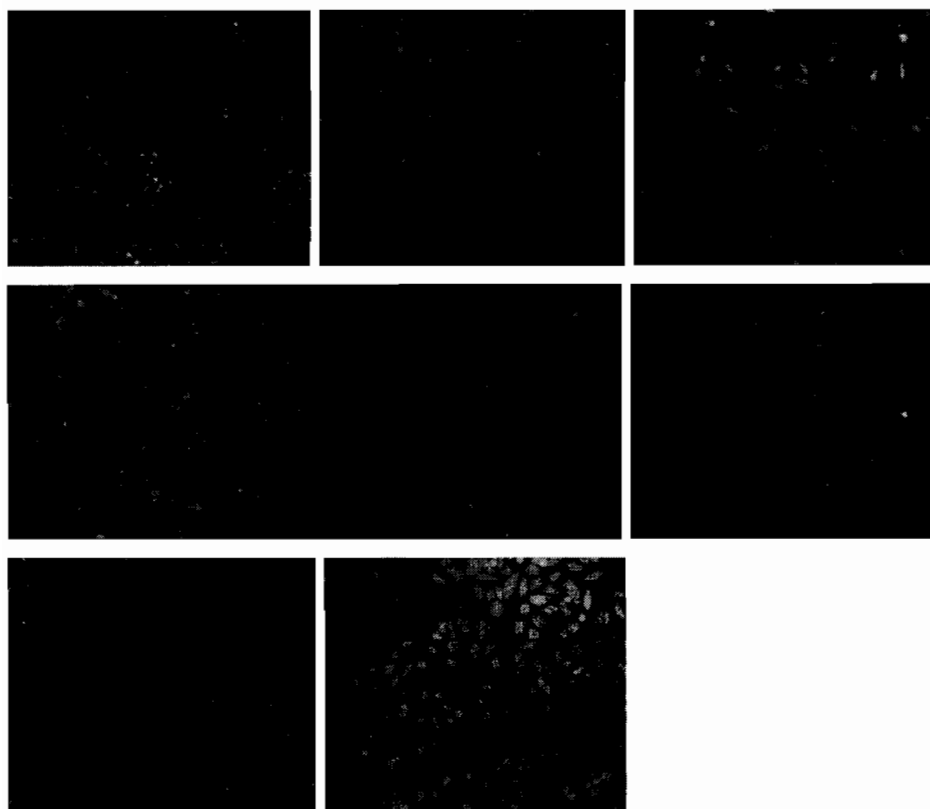
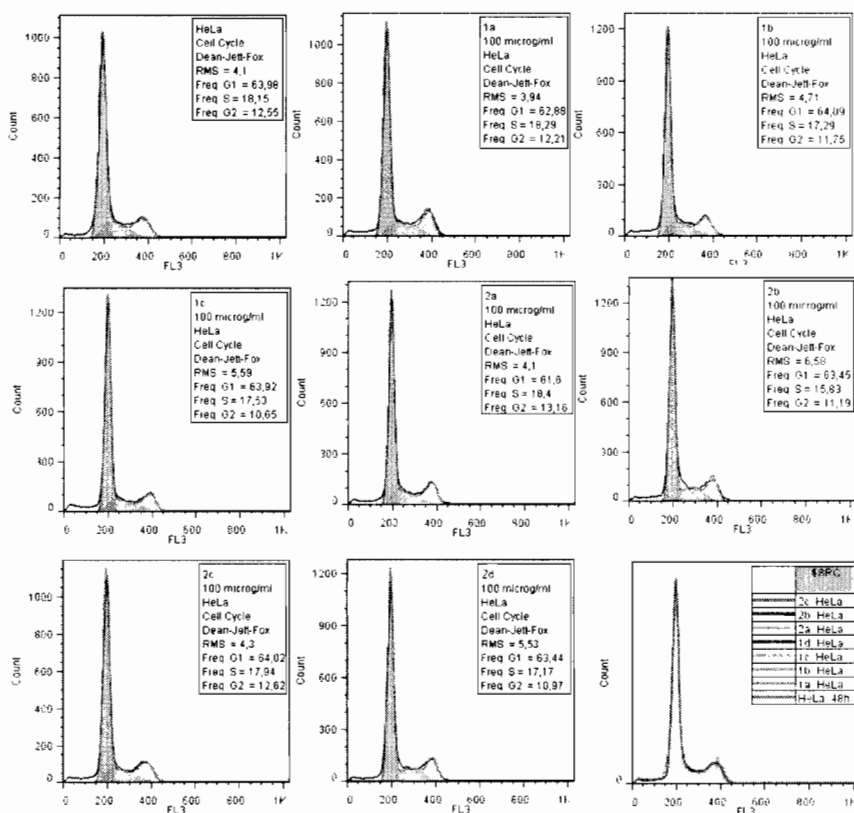


Figura 2. Viabilitatea celulelor HeLa tratate cu 1mg/ mL compuși **1a-c**, **2a-d** pentru 24 h. Colorație FDA/PI, 200x



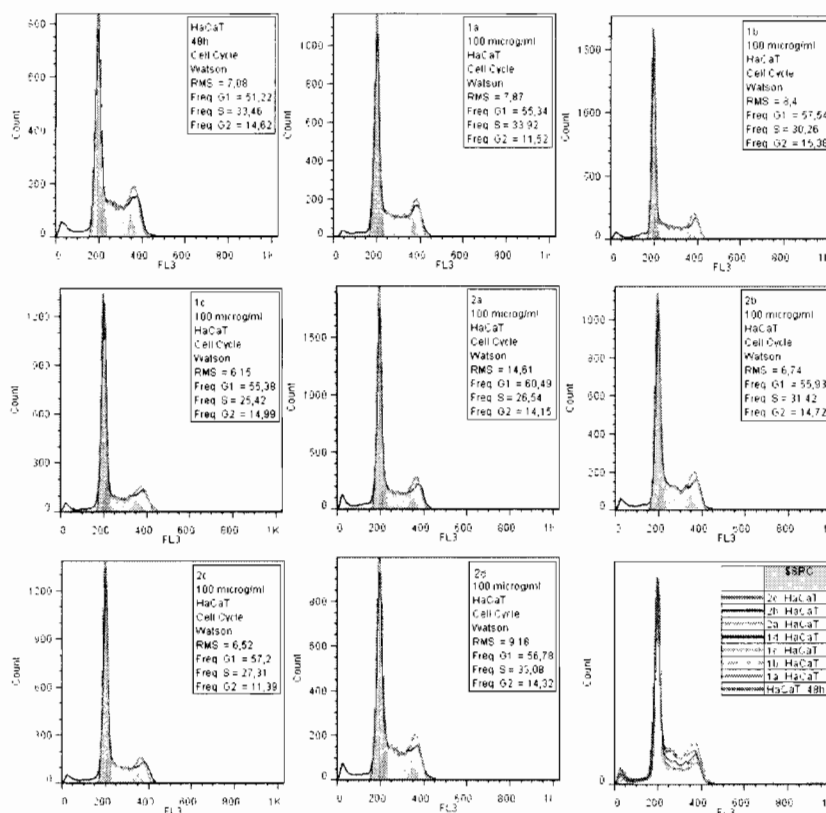


Figura 3. Efectul compușilor **1a-c**, **2a-d** asupra ciclului celular al celulelor HeLa și HaCaT. Pe abscisa histogramelor este reprezentată intensitatea fluorescenței, iar pe ordonată numărul relativ de celule (au fost investigate 15000 de evenimente).

EXEMPLUL 13

Evaluarea toxicității asupra speciei *Artemia franciscana* Kellog, a fost realizată 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 adaptări minore sugerate de surse bibliografice 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), 166–71] [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), 208–18] [Artoxkit M. *Artemia* Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Waters. Standard Operational Procedure. Microbiotests, Mariakerke-Gent.; 2014].

Materiale și metode

Oochiști au fost achiziționați de la S.K. Trading, având originea declarată ca 100% din Great Salt Lake (USA). Ca mediu s-a utilizat apă marină artificială obținută dintr-un mix de săruri disponibil comercial (Coral Marine, Grotech). Sărurile au fost dizolvate în apă distilată cu ajutorul ultrasunetelor timp de 10 minute, la o concentrație de 30 g/ L, conform recomandărilor furnizorului oochiștilor. Eclozarea s-a efectuat la o temperatură medie de 26 °C, utilizând o pompă cu aer pentru aerarea adecvată a mediului și a fost inițiată cu 48 de ore înainte de efectuarea testării propriu-zise. Testul s-a efectuat într-o placă de 24 godeuri (6 x 4), în triplicat (câte trei godeuri pentru fiecare concentrație evaluată). Având în vedere solubilitatea limitată a substanțelor de testat (**1a**, **2a**, **2b** și **2c**), acestea au fost suspendate în apă marină artificială, utilizând alginat de sodiu (0,045%) pentru asigurarea stabilității, testarea realizându-se astfel la nivelul limitei de solubilitate. Pentru fiecare substanță s-au utilizat următoarele concentrații: 100, 50, 25, 12.5 și 6,2 μg/ mL. Suspensiile au fost preparate prin diluții succesive din cea inițială (de concentrație 100 μg/ mL). O soluție de alginat de sodiu în apă marină artificială (0,045%) s-a utilizat ca martor negativ. Naupliii eclozați s-au separat de resturile de oochiști și s-au concentrat într-un godeu cu ajutorul luminii artificiale, apoi s-au transferat în godeuri cu o micropipetă. Au fost transferați în fiecare godeu între 10 și 15 nauplii, fiind introduși în suspensiile de testat (1,5 mL de suspensie de testat per godeu). S-au numărat toți naupliii, morți și vii, la 24h de la plasarea în contact cu suspensiile de testat. Relația concentrație-letalitate a fost modelată logistic cu patru parametri (4PL), utilizând o implementare cu 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**, **2a** și **2b**) nu au prezentat toxicitate la concentrațiile evaluate (la limita de solubilitate, în suspensie), la 24 de ore toți naupliii fiind vii și prezentând mișcări normale. La compusul **2c** s-a observat o ușoară toxicitate la concentrația maximă evaluată (100 μg/ mL), evidențiată printr-o letalitate de 16,67% (10% la una din cele trei replici și 20% la celelalte două replici). Datele au fost insuficiente pentru a calcula IC50 (posibilă doar prin extrapolare), însă se poate conchide că această substanță are o toxicitate ușor mai ridicată decât celelalte trei, la care nu s-a înregistrat niciun caz de letalitate. În literatura de specialitate s-a sugerat că o valoare CI50 în testul de toxicitate pe *Artemia sp.* cuprinsă 30 și 100 μg/ mL corespunde unei toxicități modeste, limitate [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), 63–7]

[Hamidi M.R., Jovanova B., Panovska T.K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Maced. Pharm. Bull. 2014, 60(1), 9–18].

EXEMPLUL 14

Determinarea activității antioxidante a compușilor **1a-c** și **2a-c** s-a realizat prin determinarea capacității de scavenger a radicalului DPPH și a capacității de scavenger a radicalului ABTS^{•+}.

a. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH

Principiul metodei constă în reducerea radicalului liber DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de culoare violet, la hidrazina corespunzătoare, de culoare galbenă, în prezența unui agent antioxidant. Modificarea culorii este însoțită de reducerea 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 a fost descrisă de Brand-Williams W. și colab. (1995) [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] și este mult întrebuințată datorită simplității echipamentului și a corelației bune cu rezultatele obținute prin alte metode antioxidante (de ex. ABTS) [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 DPPH este o metodă bazată pe transfer de electroni [Deepshikha G, Methods for determination of antioxidant capacity: a review. IJPSR, 2015, 6(2), 546-566], deși unii autori consideră că metoda ar avea un mecanism mixt (bazat atât pe transfer de electroni, cât și de protoni); totuși transferul de protoni nu reprezintă mecanismul dominant [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].

Determinările au fost efectuate la $\lambda = 515$ nm; în literatura de specialitate fiind prevăzute maxime de absorbție cuprinse între 515-520 nm [Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J.Sci.Technol., 2004, 26(2), 212-219].

Metoda nu este standardizată până în prezent, de aceea în literatura de specialitate există numeroase variante de lucru. În determinările noastre, am ales etanolul absolut pentru solubilizarea radicalului liber, deși conform datelor din literatură se pot utiliza și metanolul absolut sau amestecuri hidroetanolice de concentrație > 50% [Sharma O.P., Bhat T.K. DPPH antioxidant assay revisited, Food Chem., 2009, 113(4), 1202-1205]. Alegerea etanolului absolut s-a bazat

pe solubilizarea compușilor testați într-un amestec de etanol: DMSO = 1: 1 (vezi prepararea soluțiilor de analizat).

Conform datelor din literatură, timpul de reacție dintre radicalul liber și substrat poate fi de 5 min. [Robu S., Aprotosoiaie A.C., Miron A., Cioancă O., Stănescu U., Hăncianu M. *In vitro* antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species, cultivated in Romania, Farmacia, 2012, 60(3), 394-401], 15 min. [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], 30 min. [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], 90 min. [Lobo A.P., García-Diñeiro Y., Mangas-Sanchez J., Madrera-Rodríguez R., Valles-Suárez B. Phenolic and antioxidant composition of cider, J. Food Compos. Anal., 2009, 22(7-8), 644-648] sau urmărit până la atingerea stării de platou [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]. Pentru determinările noastre am utilizat un timp de reacție radical- substrat de 30 min. Activitatea antioxidantă a fost evaluată conform metodei descrise de Ohnishi M. și col. (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 col. (2012) [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: DPPH (Sigma-Aldrich, Germania), acid ascorbic (Roth, Germania), etanol, dimetilsulfoxid (DMSO).

Prepararea soluției de DPPH

0,0039 g Reactiv au fost solubilizați în 100 mL etanol absolut (la balon cotat). Soluția obținută are concentrația 0,1 mM. Pentru determinările experimentale reactivul a fost preparat zilnic și a fost menținut ferit de lumină.

Prepararea soluțiilor de analizat

Compușii au fost solubilizați la balon cotat de 25 mL într-un amestec de etanol absolut: DMSO = 99: 1 (v/ v). Concentrația soluției stoc a fost de 1000 μ M. Prin diluție cu solvent (la balon cotat de 10 mL) 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-au solubilizat în 100 mL etanol absolut. Curba a fost construită pe domeniul de concentrații 0,005-0,04 mg/mL.

Tehnică de lucru

Pentru determinare, câte 0,5 mL din soluțiile de concentrație 25-1000 μM s-au tratat cu 3 mL soluție etanolică 0,1 mM DPPH, agitate și 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]. 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:

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

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

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

Activitatea antioxidantă a fost exprimată în echivalenți de acid ascorbic (mM acid ascorbic/ g substanță). Echivalenții de acid ascorbic au fost calculați prin interpolarea valorilor absorbanței soluției de DPPH în prezența compușilor analizați, în ecuația dreptei curbei etalon de acid ascorbic (concentrație vs. absorbanță), 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 9, respectiv figura 4.

Tabelul 9. Curba etalon de acid ascorbic (metoda DPPH)

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

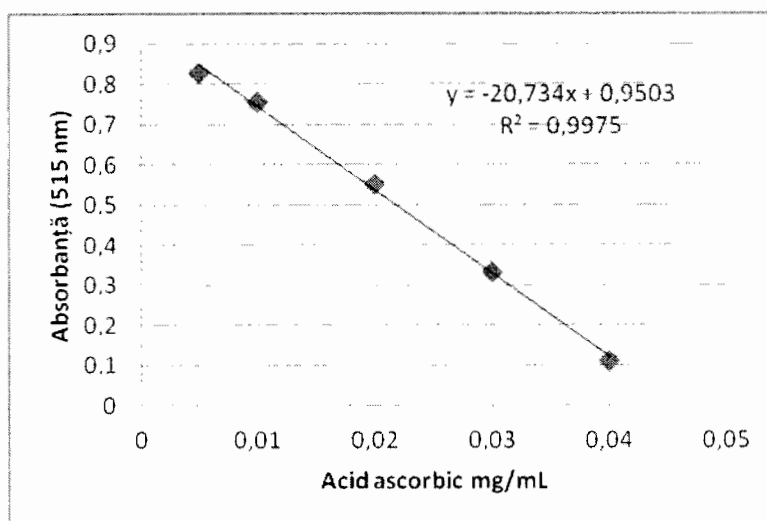


Figura 4. Curba etalon de acid ascorbic

Analiza statistică

Toate determinările au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele reprezintă media a trei determinări independente \pm deviația standard (SD). Interpretarea statistică a datelor s-a realizat utilizând programul Microsoft Office (Excell 2007) și softul GraphPad Prism v.5 (GraphPad, SUA). Pentru comparația activității antioxidante s-a utilizat testul ANOVA urmat de post test Tukey. Rezultatele au fost considerate semnificativ statistic dacă $p < 0,05$.

Rezultate și discuții

Rezultatele privind activitatea antioxidantă sunt prezentate în Tabelele 10-12 și Figura 5.

Rezultatele obținute (Tabelele 10, 11) au arătat că valorile absorbantei și ale inhibiției (%) activității radicalului scad, respectiv cresc, odată cu creșterea concentrației, independent de compusul analizat. Inhibiția radicalului liber DPPH variază între 9,95% (**1a** – 25 μ M) și 17,71% (**1c** – 1000 μ M), remarcând și compusul **1b** care a inhibat cu 16,19% activitatea radicalului liber DPPH, la concentrația maximă.

În general, capacitatea de scavenger a radicalului DPPH pe domeniul de concentrații folosit, este modestă, probabil datorită mecanismului de acțiune al radicalului și caracterului hidrofob al compușilor testați. Cele mai mici valori ale inhibiției activității radicalului liber s-au obținut pentru compusul **1a**, independent de concentrația testată. În ceea ce privește valoarea echivalenților de acid ascorbic (Tabelul 12) se poate observa că activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a** < **1c** < **2c** < **2a**. Pentru compușii **1b** și **2b** nu s-au putut determina echivalenții de acid ascorbic, deoarece valorile absorbanțelor nu s-au încadrat în curba etalon de acid ascorbic.

Tabelul 10. Valorile absorbantei soluțiilor de analizat în prezența radicalului DPPH

Compus	Concentrația (mM)						
	25μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1a	0,6600±0,0083	0,6179±0,0398	0,6155±0,0426	0,6115±0,0370	0,6092±0,0376	0,6050±0,0350	0,5927±0,0378
1b	0,5035±0,0073	0,4842±0,0022	0,4611±0,0153	0,4510±0,0132	0,4001±0,0165	0,3834±0,0123	0,3435±0,0163
1c	0,4752±0,0053	0,4134±0,0132	0,3943±0,0051	0,3745±0,0060	0,2902±0,0019	0,2252±0,0079	0,2083±0,0078
2a	0,5326±0,0026	0,5318±0,0018	0,5246±0,0079	0,5202±0,0125	0,5138±0,0037	0,5086±0,0014	0,4856±0,0024
2b	0,566±0,01202	0,5582±0,0045	0,5562±0,0031	0,5452±0,0005	0,5058±0,0019	0,4685±0,0026	0,4096±0,0121
2c	0,5664±0,0106	0,5526±0,0088	0,5444±0,0080	0,5407±0,0052	0,5129±0,0025	0,4671±0,0072	0,4173±0,0144

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

Tabelul 11. Inhibiția (%) radicalului DPPH de către compușii analizați

Compus	Concentrația (mM)						
	25μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1a	9,95±0,2828	10,39± 0,1060	11,20±0,8485	11,88 ±1,440	11,95±1,4790	12,29±1,6687	12,44±1,7041
1b	11,57±0,3676	11,98±0,2474	12,78±0,4737	13,06±0,8485	14,30±1,2445	15,72±2,8799	16,19±3,1819
1c	15,54±0,1414	16,32±0,4171	16,56±0,3535	16,66±1,5344	17,27±1,6475	17,44±1,7041	17,71±2,022
2a	11,74±0,8980	12,11±0,544	12,24±0,6717	12,92±0,2192	13,32±0,1414	13,52±0,1414	15,88±1,1030
2b	10,98±0,4596	11,44±0,0919	11,53±0,0494	11,92±0,1838	11,99±0,1555	12,36±0,2687	13,15±0,5586
2c	11,02±0,1626	11,25±0,0141	11,47±0,2899	11,69±0,5798	11,93±0,3252	12,21±0,3040	14,5±0,5091

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

Tabel 12. Echivalenții de acid ascorbic – metoda DPPH

Compus	Echivalenți de acid ascorbic (mM acid ascorbic/g substanță)
1a	0,7609 ± 0,6415
1b	nd
1c	1,3593 ± 1,4007
2a	1,7568 ± 1,826
2b	nd
2c	1,4260 ± 9,9823

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3), nd - nedeterminat

Testul ANOVA nu a evidențiat diferențe semnificative statistic pentru compușii **1a**, **1c**, **2a** și **2c** ($p = 0,6640 > 0,05$).

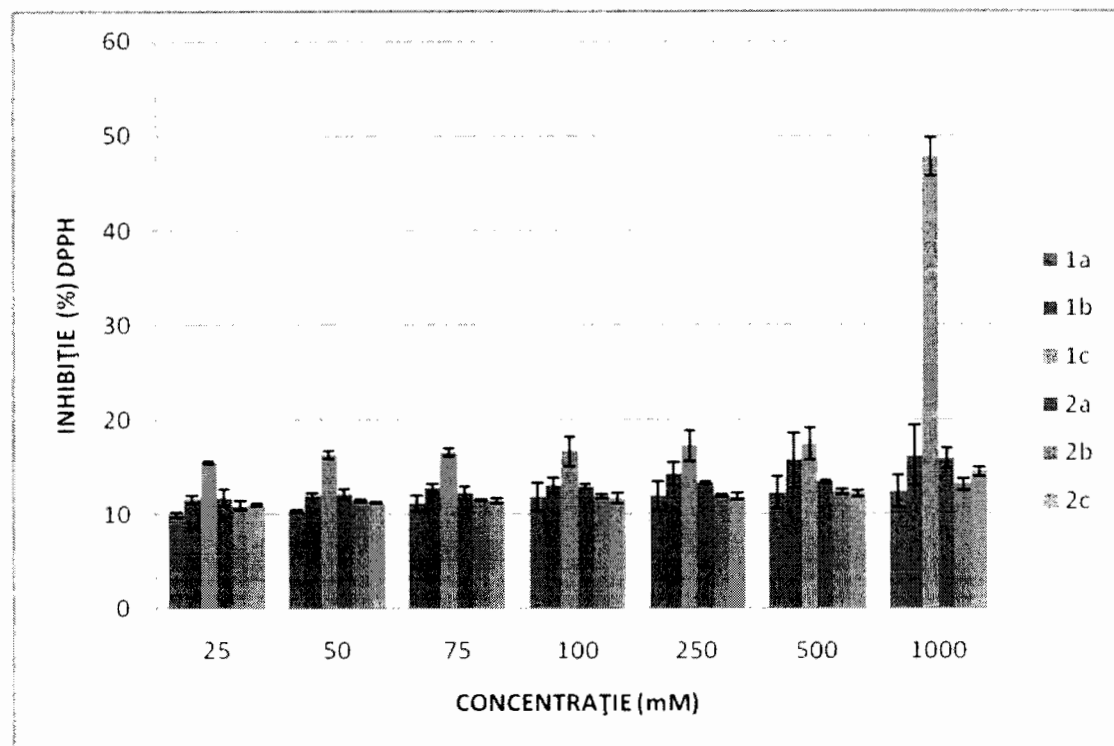


Figura 5. Reprezentarea grafică a inhibiției radicalului liber DPPH de către compușii analizați

Concluzii

Compușii testați prezintă capacitate de scavenger a radicalului liber DPPH pe domeniul de concentrație analizat.

Valori crescute ale inhibiției (%) s-au înregistrat pentru compușii **1c** și **1b**. Pe baza echivalenților de acid ascorbic s-a observat că activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a** < **1c** < **2c** < **2a**. Rezultatele obținute nu au evidențiat diferențe semnificative statistic între compușii analizați.

b. Capacitatea de scavenger asupra radicalului ABTS^{•+}

Metoda ABTS utilizează ca agent de reacție radicalul liber ABTS^{•+}, obținut în urma reacției sării de amoniu a acidului 2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonic) cu 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], 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], 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].

Radicalul obținut are o colorație albastră.

Principiul metodei

Radicalul ABTS^{•+}, în prezența unui substrat antioxidant pierde colorația albastră, modificările de culoare fiind însoțite de scăderea 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 ABTS este simplă, reproductibilă, independentă de pH și se aplică pentru determinarea capacității antioxidante a compușilor hidrofili și lipofili [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].

De asemenea, literatura de specialitate prevede timpi de reacție diferiți între radical și substrat (care variază de la 4-6 min. 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 Compost. Anal., 2006, 19 (6-7), 669-675]. Pentru determinările noastre am ales un timp de reacție de 6 min., acesta fiind frecvent utilizat.

Activitatea antioxidantă a fost evaluată conform metodei descrisă de Re R. și col. (1999).

Reactivi și solvenți utilizați: sare 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 aduși la balon cotat de 100 mL și solubilizați în 50 mL apă distilată. Concentrația soluției obținute este de 7,4 mM (soluția 1).

- *Obținerea soluției de persulfat de potasiu:* 0,0707 g persulfat de potasiu au fost solubilizați în 100 mL apă distilată (balon cotat de 100 mL). Concentrația soluției rezultate este 2,6 mM (soluția 2).

Pentru obținerea radicalului liber, soluțiile 1 și 2 au fost amestecate în raport 1: 1 (v/ v) și menținute în contact timp de 16 ore.

Soluția obținută a fost păstrată ferit de lumină; 1 mL din soluția obținută a fost diluată la balon cotat de 50 mL, cu etanol absolut, astfel încât absorbanta la $\lambda = 734$ nm să fie $0,700 \pm 0,02$ (soluție reactiv).

Prepararea soluțiilor de analizat

Substanțele au fost solubilizate la balon cotat de 25 mL într-un amestec de etanol absolut: DMSO = 99: 1 (v/v). Concentrația soluției stoc a fost de 1000 μ M. Prin diluție cu solvent (la balon cotat de 10 mL) 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

Pentru determinare, câte 0,5 mL din soluțiile de concentrație 25-1000 μ M se tratează cu 3 mL soluție etanolică ABTS⁺⁺ se agită și se menține la întuneric timp de 6 minute. Absorbanta probelor se măsoară la absorbanta maximă a soluției de ABTS⁺⁺ ($\lambda = 734$ nm), față de etanol absolut. Citirile se realizează la spectrofotometrul Jasco V-530 (Jasco, Japonia).

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 min. de incubare cu compușii de analizat.

Activitatea antioxidantă a fost exprimată în echivalenți de acid ascorbic (mM acid ascorbic/ g substanță). Echivalenții de acid ascorbic au fost calculați prin interpolarea valorilor absorbantei soluției de ABTS⁺⁺ în prezența compușilor analizați, 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 13, respectiv Figura 6.

Tabelul 13. 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

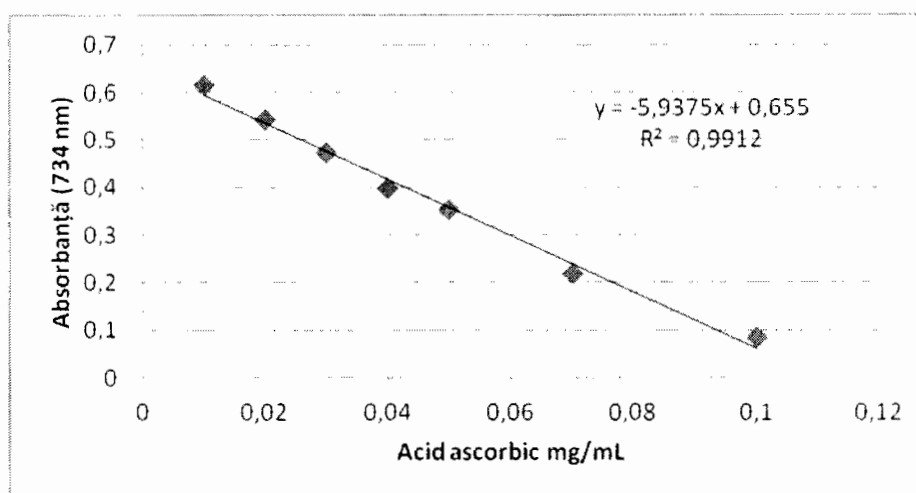


Figura 6. Curba etalon de acid ascorbic

Analiza statistică

Toate determinările au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele reprezintă media a trei determinări independente \pm deviația standard (SD). Interpretarea statistică a datelor s-a realizat utilizând programul Microsoft Office (Excell 2007) și softul GraphPad Prism v.5 (GraphPad, SUA). Pentru comparația activității antioxidante s-a utilizat testul ANOVA urmat de post- test Tukey. Corelația între metodele antioxidante utilizate s-a realizat pe baza coeficientului Pearson. Rezultatele au fost considerate semnificativ statistic dacă $p < 0,05$.

Rezultate și discuții

Rezultatele privind activitatea antioxidantă a compușilor **1a-c** și **2a-c** sunt prezentate în Tabelele 14- 16 și Figura 7.

Conform rezultatelor obținute, activitatea de scavenger a radicalului liber ABTS⁺⁺ crește odată cu concentrația, independent de compusul analizat (Tabelul 15).

Tabelul 14. Valorile absorbanței soluțiilor de analizat în prezența radicalului ABTS^{•+}

Compus	Concentrația (mM)						
	25μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1a	0,66±0,0083	0,6179±0,0398	0,6155±0,0426	0,6115±0,0370	0,6092±0,0376	0,6050±0,0350	0,5927±0,0378
1b	0,5035±0,0073	0,4842±0,0022	0,4611±0,0153	0,4580±0,0132	0,4001±0,0165	0,3834±0,0123	0,3435±0,0163
1c	0,4752±0,0053	0,4134±0,0132	0,3943±0,0051	0,3745±0,0060	0,2902±0,0019	0,2252±0,0079	0,2083±0,0078
2a	0,5326±0,0026	0,5318±0,0018	0,5246±0,0079	0,5202±0,0125	0,5138±0,0037	0,5086±0,0014	0,4856±0,0024
2b	0,5605±0,0101	0,5582±0,0045	0,5562±0,0031	0,5452±0,0056	0,5058±0,0019	0,4685±0,0026	0,4096±0,0121
2c	0,566±0,0106	0,5526±0,0088	0,5444±0,0080	0,5407±0,0052	0,5129±0,0025	0,4671±0,0072	0,4173±0,0144

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

Tabelul 15. Inhibiția (%) radicalului ABTS^{•+} de către compușii analizați

Compus	Concentrația (mM)						
	25μM	50 μM	75 μM	100 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
1a	2,13±1,3081	8,39±5,9114	8,73±6,3215	9,33±5,4942	9,67±5,5790	10,29±5,1901	14,10±2,800
1b	27,13±2,0011	29,29±0,3323	32,66±2,2415	33,11±1,9304	41,58±2,4183	44,01±1,8101	49,70±2,1920
1c	31,19±0,7636	40,14±1,9233	42,90±0,7495	45,76±0,8697	57,97±0,2757	67,39±1,1455	69,83±1,1313
2a	22,09±0,3889	22,21±0,2687	23,26±1,1525	23,90±1,8314	24,84±0,5515	25,59±0,2192	28,59±0,1697
2b	17,34±1,4778	18,48±0,6717	18,78±0,4596	20,39±0,0848	26,13±0,2757	39,58±0,3818	40,19±1,7819
2c	17,15±1,5556	19,16±1,2940	20,37±1,1737	20,91±0,7636	24,98±0,3747	31,68±1,0535	38,96±2,1071

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

Tabel 16. Echivalenții de acid ascorbic – metoda ABTS^{•+}

Compus	Echivalenți de acid ascorbic (mM acid ascorbic/g substanță)
1a	0,4778 ± 0,4102
1b	5,1100 ± 4,5307
1c	6,2838 ± 5,0393
2a	3,3145 ± 2,5135
2b	3,0826 ± 2,7378
2c	4,6844 ± 4,0188

Rezultatele reprezintă media ± SD (n=3)

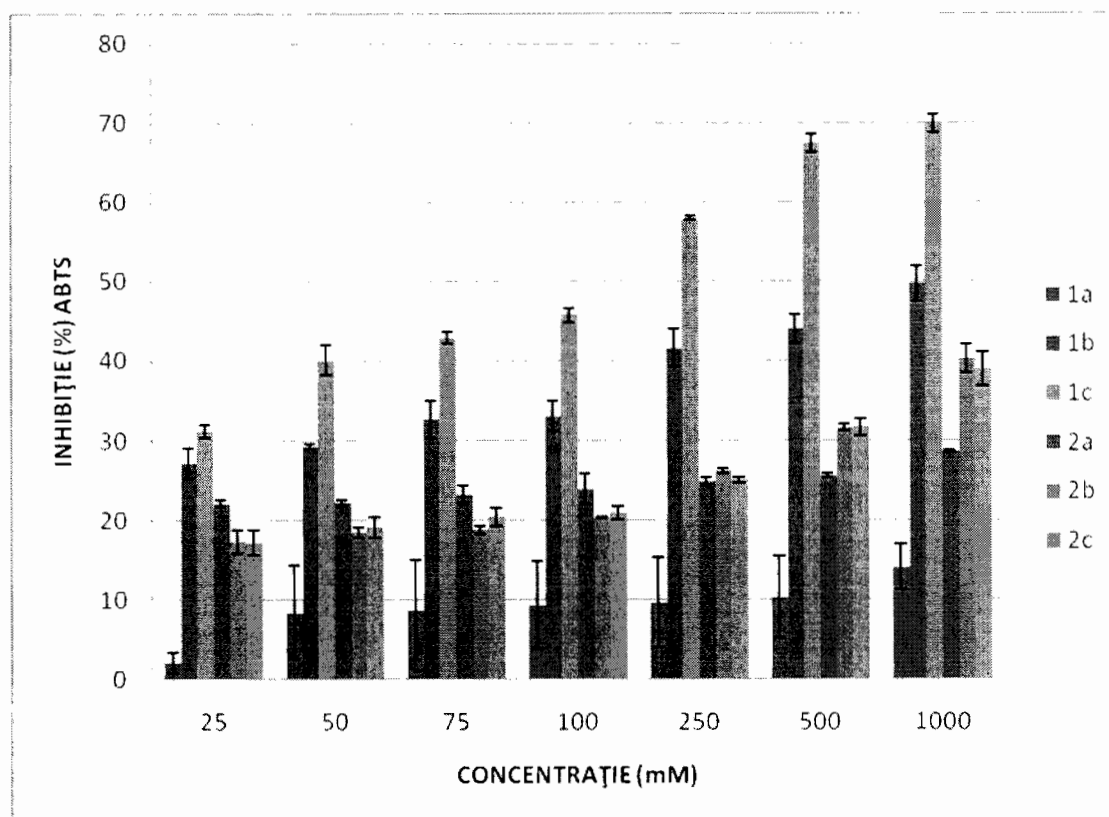


Figura 7. Reprezentarea grafică a inhibiției radicalului liber ABTS^{•+} de către compuși analizați

Valorile inhibiției variază între 2,13% (**1a** – 25 μ M) și 69,83 % (**1c** – 1000 μ M). Cele mai mari valori ale inhibiției s-au obținut pentru compusul **1c**, urmat de compușii **1b** și **2b**. Similar metodei DPPH, pentru compusul **1a** s-a obținut capacitatea de scavenger a radicalului liber cea mai mică.

În general, comparativ cu metoda DPPH, prin metoda ABTS^{•+} s-au înregistrat procente de inhibiție ale activității radicalului liber mai mari. Diferențele observate se datorează cel mai probabil mecanismului diferit de acțiune a radicalilor (comparativ cu metoda DPPH, metoda ABTS^{•+} se bazează preponderant pe transfer de protoni) și polarității compușilor.

În ceea ce privește echivalenții de acid ascorbic, activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a** < **2b** < **2a** < **2c** < **1b** < **1c**.

Testul ANOVA nu a evidențiat diferențe semnificative statistic între toți compușii ($p = 0,2020 > 0,05$).

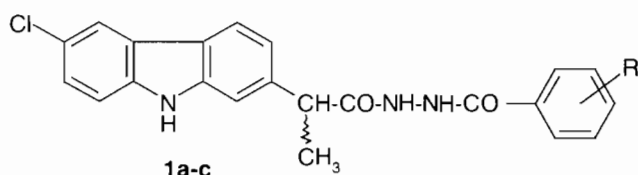
În ceea ce privește corelația metodelor, coeficientul Pearson (-0,0625) a arătat o corelație negativă, însă ne semnificativă statistic ($p = 0,7565$). Aceasta se datorează cel mai probabil mecanismului diferit de acțiune al radicalilor și polarității compușilor.

Concluzii

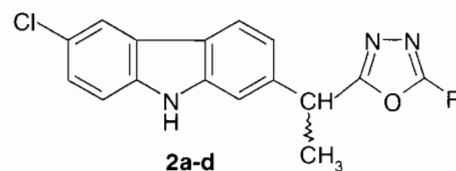
Compușii testați prezintă capacitate de scavenger a radicalului liber $ABTS^{*+}$ pe domeniul de concentrație analizat. Valori crescute ale inhibiției (%) s-au înregistrat pentru compușii **1b**, **1c** și **2c**. Pe baza echivalențelor de acid ascorbic s-a observat că activitatea antioxidantă crește în ordinea **1a < 2b < 2a < 2c < 1b < 1c**. Rezultatele obținute nu au evidențiat diferențe semnificative statistic între compușii analizați.

Revendicări

1. N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazine R-substituite (**1a-c**) și derivați ai (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului (**2a-d**), compuși caracterizați prin aceea că au următoarele formule generale:



R= -H, 4-Cl, 3-CF₃



R= -C₆H₅, -C₆H₄(Cl)(4), -C₆H₄(CF₃)(3), -C₅H₄N

1a (R= -H): N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazina

1b (R= 4-Cl): N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-(4-clorobenzoil)hidrazina

1c (R= 3-CF₃): N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-(3-trifluorometilbenzoil)hidrazina

2a (R= -C₆H₅): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan

2b (R= -C₆H₄(Cl)(4)): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-(4-clorofenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan

2c (R= -C₆H₄(CF₃)(3)): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-(3-trifluorometilfenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)etan

2d (R= -C₅H₄N): (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-[5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-il] etan

2. Procedeu de obținere a N-[(2*RS*)-2-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)propanoil]-N'-benzoilhidrazinelor R-substituite, **1a-c**, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că are loc prin agitare la temperatura camerei a hidrazidei carprofenului cu cloruri de acil, mediul de reacție fiind piridina anhidră.

3. Procedeu de prepararea a derivaților (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)etanului fenil-substituiți, **2a-c**, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că are loc prin ciclizarea la încălzire a hidrazinelor N,N'-disubstituite (**1a-c**) cu exces de oxiclorură de fosfor.

4. Procedeu de obținere a (*RS*)-1-(6-cloro-9*H*-carbazol-2-il)-1-[5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]etanului, **2d**, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că are loc în reacția carprofenului cu izoniazida, prin agitare la reflux în prezența oxiclorurii de fosfor.

5. Compoziții farmaceutice, caracterizate prin aceea că acestea conțin ca unic principiu activ, cu activitate inhibitorie față de creșterea celulelor microbiene în suspensie și aderate, derivați ai carbazolului, definiți ca în revendicarea 1.

6. Utilizarea derivaților de carbazol, definiți în revendicarea 1, pentru prepararea compozițiilor farmaceutice, destinate tratamentului antimicrobian și combaterii biofilmelor microbiene nedorite.