

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**



*Sinteza, caracterizarea și bioevaluarea unor noi derivați
dibenz[b,e]oxepin-oximinici și fluoren-oximinici*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. HABIL. LIMBAN CARMEN

Student-doctorand:

VLAD ILINCA-MARGARETA

2021

CUPRINS

Lucrări științifice publicate	6
Abrevieri și simboluri	8
Introducere	10
I. Stadiul cunoașterii	
Capitolul 1. Dibenz[b,e]oxepine cu potențial terapeutic	
1.1. Introducere	16
1.2. Substanțe cu nucleu dibenz[b,e]oxepinic utilizate în practica terapeutică	17
1.3. Cercetări în seria dibenz[b,e]oxepinelor	20
Capitolul 2. Derivați ai fluorenilui cu potențial terapeutic	
2.1. Introducere	57
2.2. Substanțe cu nucleu fluorenic utilizate în terapeutică	59
2.3. Cercetări în seria derivaților fluorenilui	62
2.4. Substanțe cu nucleu 9-fluorenonic utilizate în terapeutică	74
2.5. Cercetări în seria derivaților 9-fluorenonei	76
II. Contribuții personale	
Capitolul 3. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică, evaluarea biologică și studiul bioinformatic al unor noi O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine	
3.1. Introducere	84
3.2. Materiale și metode	
3.2.1. Sinteza și caracterizarea noilor O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine	86
3.2.2. Evaluarea activității antimicrobiene a noilor O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine	87
3.2.2.1. <i>Screening</i> -ul calitativ al efectului antimicrobian al dibenzoxepinelor nou sintetizate	88
3.2.2.2. Evaluarea cantitativă a acțiunii antimicrobiene în vederea determinării concentrației minime inhibitorii (CMI)	91
3.2.2.3. Evaluarea cantitativă a acțiunii antibiofilm în vederea determinării concentrației minime de eradicare a biofilmului (CMEB)	92

3.2.3. Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității noilor compuși	92
3.2.4. Evaluarea toxicității acute <i>in vivo</i>	93
3.2.5. Studii <i>in silico</i>	
3.2.5.1. Modelarea moleculară	94
3.2.5.2. Determinarea caracterului drug-like și a biodisponibilității	94
3.2.5.3. Predicția profilului farmacocinetic al compușilor Ia-j	95
3.3. Rezultate și discuții	
3.3.1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a noilor compuși din clasa O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinelor	95
3.3.2. Activitatea antimicrobiană a noilor compuși din clasa O-aril- carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinelor	119
3.3.3. Evaluarea <i>in vitro</i> a toxicității noilor compuși din clasa O-aril- carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinelor	122
3.3.4. Evaluarea toxicității <i>in vivo</i> a noilor compuși din clasa O-aril- carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinelor	124
3.3.5. Caracterizarea <i>in silico</i> a compușilor Ia-j	125
3.4. Discuții	129
3.5. Concluzii	132

**Capitolul 4. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea biologică a
unor derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui**

4.1. Introducere	134
4.2. Materiale și metode	
4.2.1. Sinteza și caracterizarea noilor derivați ai O-aril- carbamoil-oximino-fluorenilui	135
4.2.2. Evaluarea activității antimicrobiene a noilor derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui	137
4.2.2.1. Determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI)	137
4.2.2.2. Determinarea concentrației minime bactericide (CMB)	138
4.2.2.3. Determinarea activității antibiofilm a compușilor testați	138
4.2.3. Investigarea potențialelor mecanisme ale acțiunii antimicrobiene prin citometrie în flux	139
4.2.4. Evaluarea toxicității noilor derivați asupra crustaceului <i>Artemia franciscana</i> Kellog	143

4.2.5. Studiul efectului antioxidant	
4.2.5.1. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH	144
4.2.5.2. Capacitatea de scavenger a radicalului ABTS	147
4.3. Rezultate și discuții	150
4.3.1. Sinteza și caracterizarea noilor derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui	150
4.3.2. Activitatea antimicrobiană a compușilor nou sintetizați, derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui	155
4.3.3. Elucidarea potențialelor mecanisme de acțiune ale compușilor nou-sintetizați	158
4.3.4. Evaluarea toxicității noilor derivați	165
4.3.5. Studiul efectului antioxidant	
4.3.5.1. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH	166
4.3.5.2. Capacitatea de scavenger a radicalului ABTS	169
4.4. Concluzii	171

Capitolul 5. Noi derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui cu activitate microbicidă și antibiofilm îmbunătățită prin asociere cu nanoparticule de oxid de fier

5.1. Introducere	173
5.2. Materiale și metode	
5.2.1. Sinteza nanoparticulelor de Fe ₃ O ₄ și a nanoparticulelor magnetice încărcate cu compuși biologic activi	174
5.2.2. Caracterizarea nanocompozitelor obținute	175
5.2.3. Evaluarea activității antimicrobiene a nanosistemelor obținute față de tulpini microbiene în fază de creștere planctonică și aderată	175
5.3. Rezultate și discuții	
5.3.1. Caracterizarea nanosistemelor obținute cu ajutorul TEM	176
5.3.2. Caracterizarea nanosistemelor obținute prin magnetometrie	178
5.3.3. Caracterizarea nanosistemelor obținute prin spectroscopie FTIR	181
5.3.4. Activitatea antimicrobiană și antibiofilm a nanostructurilor hibride pe bază de magnetită funcționalizată cu compușii Ia-d	182
5.4. Discuții	184
5.5. Concluzii	186

Capitolul 6. Concluzii generale	188
Capitolul 7. Elemente de originalitate și perspective de cercetare	192
Bibliografie	195
Anexa 1. Articole publicate și brevete	223
Anexa 2. Spectre RMN și IR ale compușilor Ic, Ig, Ih, Il și 1a	267

INTRODUCERE

Una dintre cele mai importante descoperiri medicale a constituit-o descoperirea antibioticelor, cărora li se datorează o scădere remarcabilă a mortalității și morbidității cauzate de bolile infecțioase și care joacă un rol esențial în medicina modernă, făcând posibile proceduri precum transplantul, chimioterapia oncologică și intervențiile chirurgicale [1, 2]. În prezent însă, numeroși factori au condus la emergența și diseminarea rezistenței la antibiotice. Rezistența la antibiotice apare nu doar în mediul spitalicesc, ci și în cazul infecțiilor dobândite în comunitate și al tulpinilor izolate din mediul natural. Problema rezistenței la antibiotice este amplificată de biofilmele microbiene, definite ca fiind comunități sesile alcătuite din celule microbiene atașate ireversibil la un substrat, interfață sau între ele, protejate de o matrice de substanțe polimerice extracelulare, exprimând un fenotip modificat cu privire la rata de creștere și transcriere a genelor [3]. Microorganismele din biofilm sunt protejate de acțiunea agenților antimicrobieni, fiind de până la de 1000 de ori mai rezistente decât cele planctonice.

O abordare pasivă a problematicii rezistenței la antibiotice ar putea conduce la un scenariu sumbru și anume la o creștere de până la 10 milioane a deceselor până în anul 2050 datorată microorganismelor AR, însoțită de o pagubă economică asociată AR care s-ar putea ridica în jurul valorii de 100 trilioane USD [4, 5]. Se prevede apariția unei așa numite „ere post-antibiotice”, care ar face imposibil tratamentul infecțiilor cu tulpini multirezistente. Multe autorități internaționale pledează pentru identificarea unor stimulente pentru a încuraja cercetarea și dezvoltarea de noi antibiotice. Având în vedere că dezvoltarea de noi agenți antimicrobieni este un proces laborios, strategiile menite să îmbunătățească activitatea unor compuși cu efect antimicrobian reprezintă una dintre perspectivele cele mai promițătoare pentru combaterea și controlul infecțiilor persistente [6]. S-a demonstrat că fragmentul carbamoiloximinic, întâlnit și în structura unor compuși cu acțiune antiinfecțioasă, contribuie la îmbunătățirea proprietăților farmacocinetice și farmacologice ale acestor noi molecule [7]. Nanoparticulele metalice, inclusiv magnetita, s-au dovedit a avea proprietăți antimicrobiene [8], fiind active atât asupra speciilor bacteriene Gram-pozitive, cât și Gram-negative. Mai mult, nanofilmele pe bază de nanostructuri de Fe_3O_4 și compușii biologic activi s-au dovedit a fi eficiente față de biofilmele bacteriene monospecifice, formate de diferite tulpini bacteriene și fungice de importanță medicală [9, 10].

În acest context, scopul acestei lucrări a fost sinteza, caracterizarea structurală și evaluarea biologică a unor noi derivați dibenz[b,e]oxepin-oximinici (studiul bioinformatic, activitatea antimicrobiană, antibiofilm, citotoxicitatea și toxicitatea acută) și fluoren-oximinici (activitatea antimicrobiană și elucidarea mecanismelor de acțiune cu ajutorul citometriei în flux, antibiofilm, citotoxicitatea, toxicitatea *in vivo* și efectul antioxidant), precum și a unor nanosisteme pe bază de nanoparticule de magnetită și derivați fluoren-oximinici (activitatea antimicrobiană și antibiofilm).

Capitolul 1. DIBENZ[b,e]OXEPINE CU POTENȚIAL TERAPEUTIC

Clasa compușilor heterociclici cu oxigen este a doua clasă majoră de compuși heterociclici organici, în principal datorită abundenței lor în natură și proprietăților lor biologice diverse. Compușii naturali cu acest heterociclu servesc și drept compuși *lead* în dezvoltarea de noi medicamente [11].

În acest capitol sunt prezentați compușii care conțin heterociclu heptaatomic cu un atom de oxigen, numit oxepină, mai exact al compușilor care conțin acest nucleu heterociclic ortocondensat cu două inele benzenice, compuși cu structură triciclică [6.7.6], cu evidențierea aplicațiilor lor în terapeutică.

Nucleul dibenz[b,e]oxepinic se regăsește în structura chimică a unor medicamente consacrate, derivați ai amino-alchiliden-dibenz[b,e]oxepinei (doxepină, cidoxepină, utilizate în terapia psihotropă ca antidepresive) sau ai acizilor amino-alchiliden-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-alcanoici (olopatadină, un inhibitor al fosfolipazei A2).

Literatura de specialitate prezintă o serie de compuși dibenz[b,e]oxepinici cu diverse acțiuni farmacologice, cum sunt derivații amino-alchiliden-dibenz[b,e]oxepinei (pinoxepina), ai amino-alchil-dibenz[b,e]oxepinei (doxaminol), ai acizilor 6,11-dihidro-11-oxo-dibenz[b,e]oxepin-alcanoici (isoxepac, oxepinac) sau spiroderivați (spiroxepină). Studiile efectuate pe astfel de compuși au pus în evidență proprietăți sedative, simpatomimetice, antiinflamatoare, analgezice, antiflogistice și antidepresive. Derivații dibenz[b,e]oxepinici sunt inhibitori ai 5 alfa-reductazei, ai proteinei p38 kinaza activată de mitogen, ai poli(ADP-ribozo)polimerazei-1 sau ai histon deacetilazei, antagoniști ai receptorilor histaminici H1 sau ai receptorilor mineralocorticoizi. Nucleul dibenz[b,e]oxepinic a stat de asemenea la baza conceperii unor medicamente oncologice, activitatea antitumorală datorându-se hidroxiamidei acidului 8-(11-oxo-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-2-iloxi)-octanoic, care inhibă histon deacetilaza (HDA), conducând la

apoptoza celulelor canceroase [12]. De asemenea, acest nucleu se regăsește și în structura unor produși naturali cu proprietăți antifungice, antimicrobiene și antitumorale. Din aceste motive, nucleul dibenzoxepinic constituie subiectul unor cercetări cu privire la obținerea de noi compuși cu potențiale acțiuni farmacologice.

În acest capitol sunt prezentate substanțele cu nucleu dibenz[b,e]oxepinic utilizate în practica terapeutică, precum și cercetările recente în seria dibenz[b,e]oxepinelor.

Capitolul 2. DERIVAȚI AI FLUORENULUI CU POTENȚIAL TERAPEUTIC

Fluorenul este o hidrocarbură aromatică policiclică, formată din două inele benzenice unite printr-o legătură directă carbon-carbon și o punte metilenică adiacentă. Derivații fluorenelui au atras interesul chimiștilor sintetici datorită proprietăților și aplicațiilor lor biologice și farmaceutice remarcabile. Diferiți derivați sunt studiați sau chiar utilizați pentru tratamentul unor boli infecțioase, metabolice, cardiovasculare, tumorale și imunologice, cu componentă neuromusculară. Nucleul fluorenic se întâlnește în structura lumefantrinei, cu proprietăți antimalarice, bromurii de hexafluroniu, un relaxant muscular, sau indecainidei, un agent antiaritmie de clasă Ic [13]. Fragmentul fluorenic se regăsește și în numeroase produse naturale.

În cadrul acestui capitol sunt prezentate substanțele cu nucleu fluorenic utilizate în terapeutică și cercetări recente în seria derivaților fluorenelui și a derivaților 9-fluorenonei.

Capitolul 3. SINTEZA, CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ, EVALUAREA BIOLOGICĂ ȘI STUDIUL BIOINFORMATIC AL UNOR NOI O-ARIL-CARBAMOIL-OXIMINO- DIBENZ[B,E]OXEPINE

Pe plan mondial există puține studii întreprinse în scopul obținerii unor noi agenți antimicrobieni din clasa derivaților dibenz[b,e]oxepinei. Ca urmare a studiilor realizate anterior pe compuși dibenz[b,e]oxepinici [14, 15, 16] coroborate cu studiul informațiilor oferite de literatura de specialitate, s-a procedat la asocierea grupelor farmacofore cu activitate antiinfecțioasă, carbamoil și oximino într-o singură moleculă. Introducerea lanțului lateral arilcarbamoiloximinic a făcut posibilă modelarea chimică a poziției 11 a nucleului dibenz[b,e]oxepinic conducând la obținerea de molecule biofarmacofore noi. Lanțul lateral carbamoiloximinic prezintă proprietatea de a chelata

ionii metalici, compusul putând astfel bloca ionii metalici ai enzimelor bacteriene și forma holoenzime, aceasta putând fi o ipoteza teoretică care să demonstreze activitatea antiinfecțioasă [17, 18].

În cadrul acestui capitol al tezei de doctorat, prezentăm sinteza unor noi compuși cu biocompatibilitate ridicată, din clasa carbamoiloximino-dibenz[b,e]oxepinelor, caracterizarea fizico-chimică, evaluarea activității antimicrobiene și a toxicității acestora, cu ajutorul unor teste experimentale *in vitro* și *in vivo*, calitative și cantitative, completate de studii *in silico*.

Schema de sinteză a noilor O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine, necitate în literatura de specialitate, este prezentată în figura 3.1.

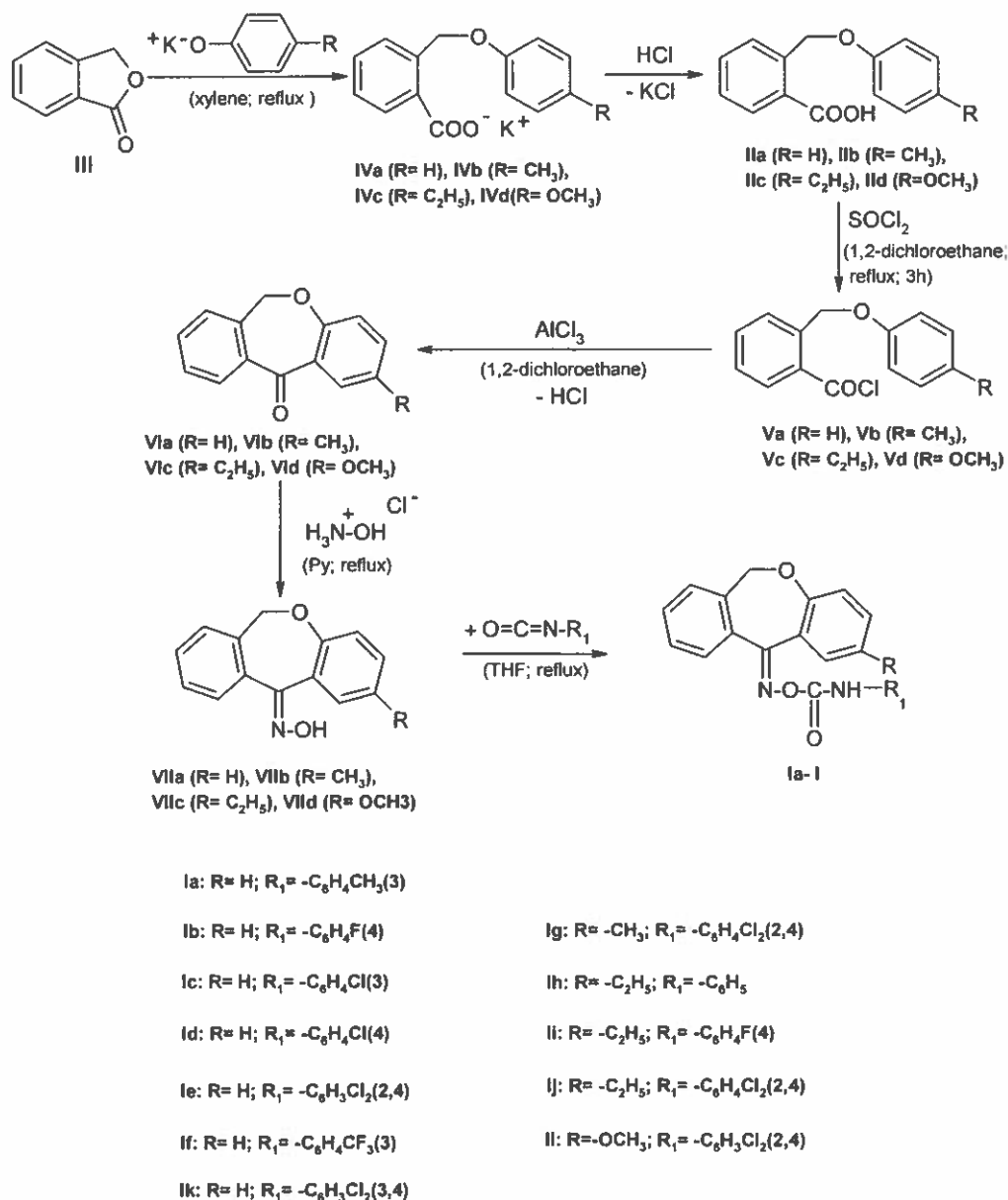
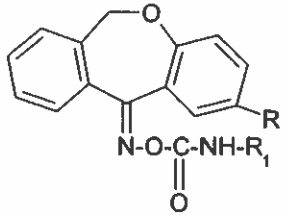
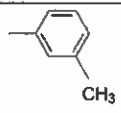
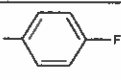
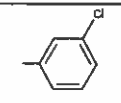
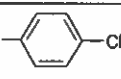
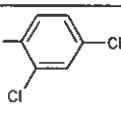
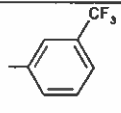
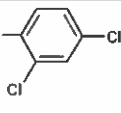
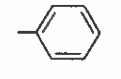


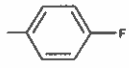
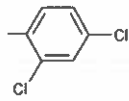
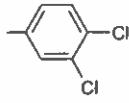
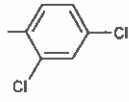
Figura 3.1. Schema de sinteză a noilor O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine

Noii compuși din clasa O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinelor (I), a căror structură reunește într-o singură moleculă mai multe fragmente biologice active, sistemul heterociclic dibenz[b,e]oxepinic, un sistem heterociclic condensat, cu oxigen în punte și grupele farmacofore carbamoil și oximinică, au formula generală prezentată în figura 3.1.

În Tabelul III.1. sunt sintetizate datele referitoare la structura, formula de structură, masa moleculară relativă, temperatura de topire și randamentul noilor O-arilcarbamoil-11-oximino-6,11-dihidro-dibenz[b, e]oxepine.

Tabel III.1. Rezultatele caracterizării noilor compuși Ia-l

						
	R	R ₁	Formula de structură	Mr	Temperatură de topire (°C)	Randament (%)
Ia	-H		C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₃	358,38	131,6- 132,9	76
Ib	-H		C ₂₁ H ₁₅ FN ₂ O ₃	362,35	189,5- 193,1	72
Ic	-H		C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ O ₃	378,81	175,3- 178,4	67
Id	-H		C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ O ₃	378,81	165,2- 167,4	64
Ie	-H		C ₂₁ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₃	413,25	181,2- 183,3	54
If	-H		C ₂₂ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₃	412,36	164,2- 165,8	79
Ig	-CH ₃		C ₂₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₃	427,28	150,4- 152,7	59
Ih	-C ₂ H ₅		C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₃	372,42	173,7- 175,9	71

Ii	-C ₂ H ₅		C ₂₃ H ₁₉ FN ₂ O ₃	390,4	178,2- 181	73
Ij	-C ₂ H ₅		C ₂₃ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	441,3	192- 194,1	69
Ik	-H		C ₂₁ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₃	413,25	158,2- 161,8	65
II	-OCH ₃		C ₂₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₄	443,28	179,2- 181,5	69

După caracterizarea fizico-chimică a derivaților O-(arilcarbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei obținuți, s-a realizat bioevaluarea acestora, printr-o abordare combinată, *in silico* și experimentală, pentru stabilirea spectrului de activitate antimicrobiană, antibiofilm, precum și a citotoxicității *in vitro* și a toxicității acute *in vivo* a noilor compuși.

Rezultatele testării calitative a sensibilității tulpinilor bacteriene la compușii studiați au evidențiat faptul că cel mai activ compus a fost compusul **If**, care inhibă creșterea tulpinilor bacteriene Gram-pozitive, Gram-negative și fungice, urmat de **Ia** și **Ic**.

În cazul testării cantitative a activității antimicrobiene cele mai mici valori CMI au fost evidențiate pentru compușii **Ia**, **Ib** și **If**, cu valori cuprinse între 4,8 și 78 μg/mL.

Atât screening-ul calitativ, cât și metoda cantitativă de determinare a valorii CMI indică faptul că cel mai activ compus este **If**, intensitatea efectului antimicrobian și spectrul larg de activitate corelându-se cu prezența substituentului -CF₃.

Compușii testați au prezentat de asemenea activitate antibiofilm, cel mai puternic efect inhibitor fiind obținut pentru derivații monosubstituiți la radicalul fenil al catenei laterale (compușii **Ic**, **Ib**, **Ia** și **If**).

Dintre toți compușii testați, doar **If** a prezentat valori ridicate ale citotoxicității față de celulele HCT8, la concentrația de 100 μg/mL. Citotoxicitatea scăzută a compușilor testați ar putea reprezenta un avantaj pentru dezvoltarea medicamentelor antimicrobiene cu efecte secundare minime asupra celulelor și țesuturilor umane. Mecanismul citotoxicității compușilor testați, evidențiat prin citometrie în flux, este inducerea apoptozei. Creșterea numărului de atomi de -F în moleculă este corelată cu creșterea rapidă a apoptozei secundare, sugerând potențialul ridicat antitumoral al compusului **If**.

Evaluarea toxicității *in vivo* a compușilor **Ii** și **Ij** după administrare *per os* a condus la concluzia că doza letală este mai mare de 2000 mg/kg corp *per os*.

Studiul bioinformatic al compușilor **Ia-j** a confirmat caracterul *drug-like* al compușilor **Ia-j**, care au respectat regulile lui Lipinski și Veber, profilul ADME-Tox a indicat un bun coeficient de absorbție intestinală și un nivel mediu de permeabilitate la nivelul barierei hematoencefalice și al SNC.

Potențialul mutagen prezis prin testul de toxicitate AMES a fost prezent doar la compusul **Ia**, însă niciunul dintre compușii testați nu au efect cancerigen.

Conform predicțiilor referitoare la hepatotoxicitate, compușii **Ia**, **Ic**, **Id** și **Ih** nu interferează cu funcția normală a ficatului, dar, în schimb, au toxicitate față de *Tetrahymena pyriformis*, iar compușii **Ia** și **Ih** prezintă toxicitate Minnow.

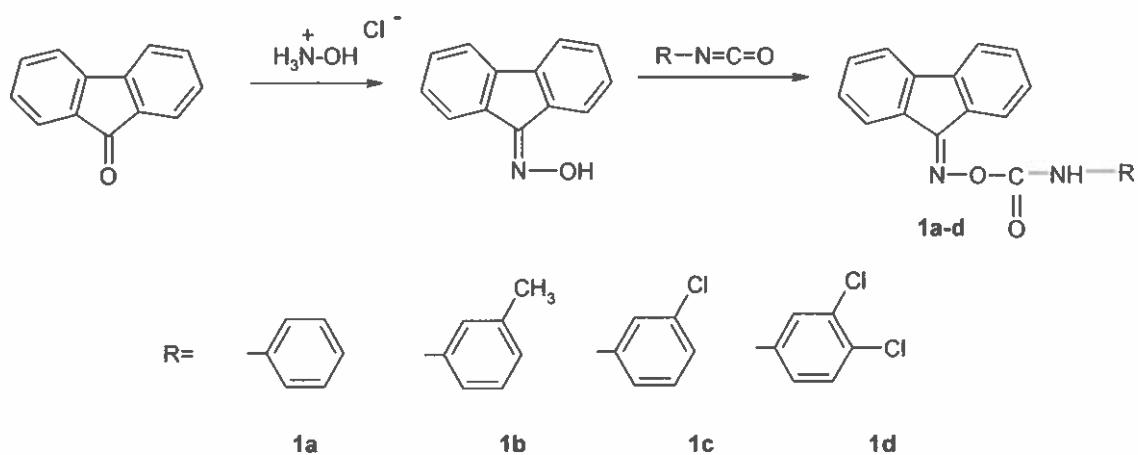
Rezultatele analizelor biologice susțin potențialul de utilizare a noilor O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine pentru prepararea compozițiilor farmaceutice cu toxicitate scăzută, destinate tratamentului antimicrobian și antibiofilm.

Capitolul 4. SINTEZA, CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI EVALUAREA BIOLOGICĂ A UNOR DERIVAȚI AI O-ARIL-CARBAMOIL-OXIMINO-FLUORENULUI

Cercetările întreprinse pe compușii cu nucleu fluorenic pot contribui la dezvoltarea de noi chimioterapice antimicrobiene cu eficacitate maximă și toxicitate scăzută, care să reprezinte soluții terapeutice eficiente în cazul infecțiilor cu microorganisme rezistente, care, în același timp, să prevină riscul permanent de urgență a noi mecanisme de rezistență. 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 biologice active într-o singură moleculă originală. Astfel, scopul acestui studiu a fost sintetiza unor noi compuși din clasa O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui (Fig. 4.1.) cu potențial efect bactericid, fungicid și antibiofilm, în care sunt asociate într-o singură moleculă mai multe fragmente farmacofore (sistemul triciclic fluorenic, grupele carbamoil și oximinică).

Compușii au fost sintetizați prin metoda refluxării fluoren-9-on-oximei cu arilizocianați, în mediul de reacție reprezentat de tetrahidrofuranul anhidru.

Schema de sinteză, structura compușilor și rezultatele caracterizării acestora sunt prezentate în Fig. 4.1. și Tabelul IV.1.



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

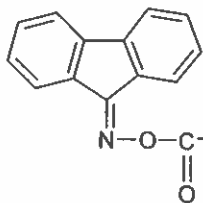
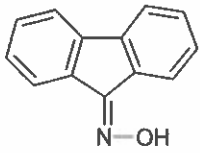
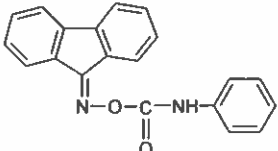
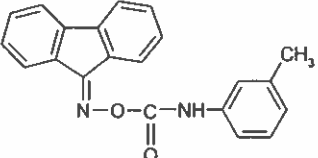
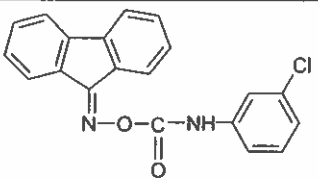
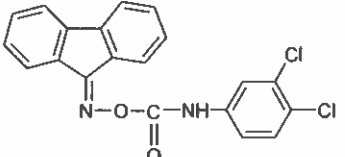
1b (R= -C₆H₄(CH₃)(3)): 9-((3-metil-fenil)carbamoiloximino)fluoren

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

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

Figura 4.1. Schema de sinteză și formula generală a unor noi compuși din clasa O-aryl-carbamoil-oximino-fluorenelui

Tabel IV.1. Rezultatele caracterizării noilor compuși 1a-d

 R= fenil mono- sau disubstituit 1a-d					
	R	Formula de structură	Mr	Temp. de topire	Randament față de 9-fluorenonă
<i>fluorene-9-on-oxima (N-fluorene-9-iliden hidroxilamina)</i>	-		195,22	194,3 - 195,2 °C	88,5%
1a <i>9-(fenilcarbamoil oximino) fluorene</i>	-C ₆ H ₅		314,33	156,9 - 159 °C	63,2%
1b <i>9-((3-metil-fenil) carbamoiloximino) fluorene</i>	-C ₆ H ₄ (CH ₃)(3)		328,36	171,2 - 174,3 °C	56,4%
1c <i>9-((3-cloro-fenil) carbamoiloximino) fluorene</i>	-C ₆ H ₄ (Cl)(3)		348,77	155,7 - 158,3 °C	66,4%
1d <i>9-((3,4-dicloro-fenil) carbamoil oximino)fluorene</i>	-C ₆ H ₄ (Cl) ₂ (3,4)		383,23	157,9 - 161,2 °C	64,8%

Pentru evaluarea compușilor sintetizați au fost propuse următoarele activități:

- evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene;
- determinarea influenței compușilor chimici nou sintetizați asupra dezvoltării biofilmelor microbiene la substrat inert;
- studiul unor potențiale mecanisme moleculare antimicrobiene ale compușilor chimici nou sintetizați;
- evaluarea toxicității noilor derivați asupra crustaceului *Artemia franciscana* Kellog;
- studiul efectului antioxidant prin capacitatea de scavenger a radicalilor DPPH și ABTS^{•+}.

Investigarea activității antimicrobiene a arătat faptul că acești compuși au prezentat o bună activitate antimicrobiană cu valori ale CMI cuprinse între 0,156 și 10 mg/mL, cele mai sensibile tulpini la acțiunea antimicrobiană fiind tulpina de *S. aureus*, urmată de cea de *P. aeruginosa*. Compusul **1d** a manifestat o bună activitate antimicrobiană față de tulpina bacteriană Gram-pozitivă *S. aureus* (CMI 0,156 mg/mL).

Testările privind activitatea microbicidă a compușilor chimici nou sintetizați au indicat valori ale concentrației minime microbicide cuprinse între 0,312 și 10 mg/mL, acestea fiind similare sau de două ori mai mari decât valorile CMI.

Investigarea influenței compușilor chimici nou sintetizați asupra capacității de formare a biofilmelor microbiene la substratul inert de către tulpinile testate a pus în evidență faptul că toți compușii testați au inhibat dezvoltarea biofilmelor, valorile CMEB fiind cuprinse între 0,009 și 1,25 mg/mL.

Analizele de citometrie în flux au arătat că, la concentrații subinhibitorii, compușii chimici nou sintetizați, derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui, determină o depolarizare a membranei plasmatică microbiene, sugerând faptul că membrana plasmatică constituie una dintre țintele activității antimicrobiene a acestor compuși.

Evaluarea toxicității asupra crustaceului *Artemia franciscana* Kellog a evidențiat faptul că dintre cei patru compuși testați, doar compusul **1d** a prezentat toxicitate moderată, similar ciclofosfamidei.

Compușii testați prezintă capacitate de scavenger a radicalului liber ABTS^{•+} la concentrațiile testate. 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 statistic între compușii analizați.

Capitolul 5. NOI DERIVAȚI AI O-ARIL-CARBAMOIL-OXIMINO-FLUORENULUI CU ACTIVITATE MICROBICIDĂ ȘI ANTIBIOFILM ÎMBUNĂȚĂȚITĂ PRIN ASOCIERE CU NANOPARTICULE DE OXID DE FIER

Abordările nanotehnologice sunt din ce în ce mai prezente în oricare dintre domeniile activității umane, oferind mari așteptări pentru controlul infecțiilor, prin crearea de noi strategii antimicrobiene, eficiente atât împotriva microorganismelor planctonice, cât și aderente, sub forma biofilmelor microbiene, sau prin îmbunătățirea celor deja existente [19]. Dintre nanostructuri, nanomaterialele pe bază de oxid de metal (de exemplu oxidul de zinc, oxidul de cupru, magnetita) au atras o atenție deosebită, datorită activității lor antimicrobiene intrinseci [20, 21], dar și datorită capacității lor de a fi utilizate ca sisteme de transport și eliberare controlată a compușilor antimicrobieni.

În acest capitol, derivații O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui care combină mai multe fragmente farmacofore, precum sistemul fluorenic triciclic, grupele carbamoil și oximinică au fost obținuți prin refluxarea oximei 9H-fluoren-9-onei cu arilizocianați, fiind mai departe caracterizați pe baza constantelor fizice și a datelor spectroscopice, conform rezultatelor prezentate în capitolul 4.

Ulterior, a fost investigat potențialul nanostructurilor de tip miez-coajă pe bază de magnetită@citrat pentru a îmbunătăți proprietățile antimicrobiene ale fluorenelor nou sintetizate. Aceste nanoparticule prezintă multiple avantaje pentru aplicațiile biomedicale, cum ar fi biocompatibilitatea crescută și capacitatea de a încorpora și elibera diverși compuși terapeutici, reducând astfel concentrația activă necesară și efectele toxice potențiale [22, 23, 24, 25]. Aceste nanostructuri magnetice ar trebui exploatate, deoarece dimensiunile reduse ale acestor sisteme pot asigura și un grad mai mare de internalizare celulară [26].

Activitatea antimicrobiană a nanosistemelor obținute a fost evaluată față de tulpini bacteriene și fungice, în fază de creștere planctonică și de biofilm, utilizând teste cantitative, pentru a determina concentrația minimă inhibitorie (CMI) și de eradicare a biofilmului (CMEB).

Bioactivitatea unor derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenelui sintetizați utilizând drept compus țintă oxima 9H-fluoren-9-onei față de celule planctonice a fost îmbunătățită semnificativ prin încorporarea compușilor sintetizați în magnetită@citrat. S-a

dovedit faptul că aceste sisteme au îmbunătățit valorile CMI, valorile CMEB fiind însă mai mari față de compușii activi puri.

Efectul inductiv respingător de electroni al atomilor de clor a îmbunătățit activitatea inhibitorie față de creșterea planctonică și sub formă de biofilm a celulelor de *Staphylococcus aureus*, în timp ce efectul +I al grupării metil a îmbunătățit activitatea antifungică față de tulpina de *Candida albicans*.

Nanoparticulele de magnetită au îmbunătățit considerabil activitatea antimicrobiană a noilor compuși împotriva microorganismelor planctonice.

Compușii obținuți, precum și nanostructurile magnetice încărcate cu acești compuși prezintă un potențial promițător pentru dezvoltarea de noi strategii antimicrobiene.

Capitolul 6. CONCLUZII GENERALE

➤ Această teză își propune să răspundă unei urgențe de sănătate publică și de mediu la nivel global, reprezentată de fenomenul rezistenței la antibiotice, prin dezvoltarea de noi substanțe de sinteză cu activitate antimicrobiană.

➤ Abordarea metodologică utilizată a avut la bază următoarele aspecte: proiectarea unor noi compuși și efectuarea unor modulări structurale pe nucleele dibenz[b,e]oxepinic și fluorenic care fac parte din structura unor substanțe cu activitate farmacologică dovedită, în scopul obținerii și caracterizării fizico-chimice a 12 noi derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinei și 4 noi derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui, cu potențială activitate antimicrobiană de spectru larg; extinderea evaluării biologice dincolo de testele antimicrobiene clasice, în scopul stabilirii activității antibiofilm a acestor compuși; pentru derivații dibenz[b,e]oxepinei: determinarea citotoxicității *in vitro*, a toxicității acute *in vivo* și efectuarea unui studiu bioinformatic *in silico*; pentru derivații fluorenilui: stabilirea mecanismelor de acțiune, investigate prin citometrie în flux, determinarea toxicității pe *Artemia franciscana* Kellog, studierea efectului antioxidant, utilizarea nanobiotehnologiilor pentru îmbunătățirea proprietăților antimicrobiene și antibiofilm, prin obținerea unor nanosisteme pe bază de nanoparticule de magnetită@citrăt și compuși fluorenici.

➤ Sinteza derivaților O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinici s-a realizat prin metode convenționale, parcurgând următoarele etape: i) obținerea acizilor 2-fenoximetilbenzoic, 2-(4-metil-fenoximetil)benzoic, 2-(4-etilfenoximetil)benzoic și 2-(4-metoxifenoximetil)benzoic, ii) obținerea clorurilor acestor acizi, iii) obținerea 6,11-dihidro-

dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei, a 2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei, a 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei și a 2-metoxi-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei, iv) obținerea 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei, a 11-hidroximino-2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei, a 11-hidroximino-2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei și a 11-hidroximino-2-metoxi-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei, v) prepararea noilor O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine prin refluxarea oximelor corespunzătoare cu arilizocianați, mediul de reacție fiind tetrahidrofuranul anhidru. Sintezele au decurs cu randamente bune.

➤ Noii compuși au fost caracterizați fizico-chimic, pe baza formulei de structură, masei moleculare relative, a temperaturii de topire și a solubilității în diferiți solvenți, precum și cu ajutorul spectrometriei în infraroșu, spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară (¹H-RMN, ¹³C-RMN, Gcosy, Ghmqc și Ghmbc) și al analizei elementale. Aceste metode au confirmat structura și puritatea noilor compuși și a intermediarilor, deci sintezele efectuate.

➤ Dintre derivații O-(arilcarbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei, testați pentru activitatea antimicrobiană, cel mai activ s-a dovedit a fi compusul **If**, respectiv O-(3-trifluorometilfenil-carbamoil)oxima 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei, care a avut cel mai intens efect antimicrobian și spectrul de activitate cel mai larg, corelat cu prezența substituentului -CF₃.

➤ În aceeași clasă de compuși, cea mai intensă activitate antibiofilm a fost observată pentru derivații monosubstituiți la radicalul fenil al catenei laterale.

➤ Derivații O-(arilcarbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6*H*)onei au prezentat toxicitate scăzută, după administrarea orală la șoareci, ceea ce reprezintă un avantaj pentru dezvoltarea medicamentelor antimicrobiene cu efecte secundare minime asupra celulelor și țesuturilor umane, corelat cu rezultatele studiilor bioinformatice care au confirmat caracterul *drug-like* al compușilor sintetizați, un bun coeficient de absorbție intestinală și un nivel mediu de permeabilitate la nivelul barierei hematoencefalice și al SNC, absența potențialului mutagen și a hepatotoxicității la majoritatea compușilor.

➤ Sinteza noilor derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui s-a realizat prin metode convenționale, în următoarele etape: i) prepararea fluoren-9-on-oximei, ii) prepararea noilor derivați prin refluxarea fluoren-9-on-oximei cu arilizocianați, mediul de reacție fiind tetrahidrofuranul anhidru. Au fost stabilite condițiile optime de reacție în scopul obținerii unor compuși cu puritate ridicată și cu randamente bune.

➤ Noii derivați ai fluorenilui au fost caracterizați prin constantele lor fizice, temperatură de topire, solubilitate, iar structurile compușilor intermediari și ale compușilor originali au fost stabilite prin analize spectrale IR, ¹H-RMN și ¹³C-RMN.

➤ Noii derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenei au prezentat activitate antimicrobiană, valorile CMI fiind cuprinse între 0,156 și 10 mg/mL, cele mai sensibile tulpini fiind tulpina de *S. aureus*, urmată de cea de *P. aeruginosa*. Compusul **1d** a avut o eficiență crescută față de tulpina de *S. aureus* (CMI=0,156 mg/mL).

➤ Testările privind activitatea microbicidă a compușilor chimici nou sintetizați au indicat valori ale CMB cuprinse între 0,312 și 10 mg/mL, acestea fiind similare sau de două ori mai mari decât valorile CMI.

➤ Toți compușii testați au inhibat dezvoltarea biofilmelor bacteriene și fungice testate, cu valori ale CMEB cuprinse între 0,009 și 1,25 mg/mL, de până la sute de ori mai mici decât valorile CMI și CMB corespunzătoare. Se remarcă 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. albicans* la toți compușii testați, dar mai ales la **1b**.

➤ Pentru elucidarea potențialelor mecanisme de acțiune ale compușilor fluorenici, studiul realizat pentru determinarea efectelor compușilor asupra potențialului membranelor tulpinilor microbiene testate a arătat faptul că depolarizarea membranei plasmatice constituie unul dintre mecanismele de acțiune ale acestora.

➤ În ceea ce privește toxicitatea asupra crustaceului *Artemia franciscana* Kellog, dintre cei patru derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenei care au fost testați, trei (**1a**, **1b** și **1c**) nu au prezentat toxicitate la concentrațiile evaluate, de până la 100 μg/mL. Toxicitatea acută a compusului **1d** (CI₅₀ 14,63 μg/mL) este moderată, apropiată ca valoare de cea a ciclofosfamidei (16,3 μg/mL).

➤ Activitatea antioxidantă a derivaților fluorenilui **1a**, **1b** și **1c** a cuprins determinarea capacității de scavenger a radicalilor DPPH și ABTS^{•+}. Capacitatea de scavenger a radicalului DPPH este scăzută (sub 30%), pentru concentrațiile testate. Cele mai mari valori ale inhibiției, la concentrația maximă de 1000 μM, s-au înregistrat pentru compușii **1a** și **1c**. Rezultatele privind capacitatea de scavenger a radicalului ABTS^{•+} au arătat faptul că această activitate crește odată cu concentrația, independent de compusul analizat. În acest caz, activitatea antioxidantă a compușilor crește în ordinea: **1c** < **1a** < **1b**. În comparație cu

metoda DPPH, valorile inhibiției au fost mai mari în cazul metodei ABTS, pentru compușii **1a** și **1b**, comparativ cu **1c**.

➤ Nanosistemele pe bază de nanoparticule de magnetită funcționalizate cu citrat trisodic au îmbunătățit activitatea derivaților O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui față de celulele planctonice, dar au diminuat efectul lor antibiofilm. Astfel, a fost evaluată activitatea antimicrobiană a acestora față de trei tulpini microbiene, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 1026 și *C. albicans* ATCC 10231, în suspensie și aderente ca biofilme dezvoltate pe un substrat inert. Compușii testați încorporați în nanoparticule au arătat o îmbunătățire a activității antibacteriene și antifungice în majoritatea cazurilor, valorile CMI variind între 0,156 și 4 mg/mL în cazul compușilor puri și între 0,0625 și 2 mg/mL pentru cei încorporați în nanoparticule. Toate complexe cu nanoparticule au dovedit aceeași eficiență împotriva tulpinii de *C. albicans*, în timp ce împotriva tulpinii de *S. aureus* cel mai activ a fost $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{citrat} @ \text{1d}$, cu cea mai mică valoare a CMI, de 0,0625 mg/mL. În schimb, nanosistemele au prezentat, în general, o eficiență antibiofilm scăzută, cu excepția celor care conțin compușii **1a**, **1b** și **1c** față de *Staphylococcus aureus* și **1c** față de *Escherichia coli*.

➤ Rezultatele obținute demonstrează potențialul compușilor nou sintetizați și al nanostructurilor magnetice încărcate cu acești compuși pentru dezvoltarea de noi strategii antimicrobiene, cu diverse aplicații, atât în combaterea infecțiilor, cât și a biofilmelor nedorite în diferite sectoare de activitate.

Capitolul 7. ELEMENTE DE ORIGINALITATE ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE

Originalitatea acestei teze de doctorat constă în proiectarea și sinteza unor compuși necitați în literatura de specialitate, derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinei și ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenilui. Prin modificări structurale aduse nucleelor dibenz[b,e]oxepinic și fluorenic, s-au introdus catene laterale în pozițiile 11, respectiv 9 ale nucleelor menționate, catene care conțin grupele farmacofore oximinică și carbamoil, grupe cu certe calități biologice și cu un rol important în îmbunătățirea proprietăților farmacologice și farmacocinetice.

Aceste activități au implicat realizarea unor modele conceptuale pentru proiectarea moleculelor originale ce aparțin celor două serii de compuși, completată de un studiu teoretic, după o documentație de specialitate, precum și pregătirea unei baze de date.

De asemenea, procedeele de sinteză organică au elemente de originalitate. Ele implică un număr mare de etape de sinteză, sunt laborioase, sigure și reproductibile.

Modelările chimice efectuate prin introducerea catenei laterale carbamoiloximinice substituită cu radicali aril și asocierea într-o singură moleculă a mai multor fragmente biologice active, reprezintă aspecte de originalitate, iar noii compuși, și activitățile lor biologice au făcut obiectul a două cereri de brevet de invenție.

Pentru dovedirea structurii și purității noilor compuși, precum și pentru caracterizarea lor, s-au dezvoltat metode fizico-chimice performante, moderne, caracterizate prin precizie, acuratețe, fiabilitate și reproductibilitate.

Studiul activității antimicrobiene a fost completat cu cel al evaluării influenței noilor compuși asupra capacității de aderență la substratul inert al tulpinilor microbiene, într-o abordare metodologică care urmărește dezvoltarea unei strategii antiinfecțioase noi, numită anti-patogenică, în care nu se țintește distrugerea celulelor microbiene sau stoparea creșterii acestora, ci inhibarea specifică a expresiei unor proprietăți implicate în patogenitatea tulpinii respective (de exemplu, producerea adezinelor, formarea biofilmelor, producerea toxinelor sau a altor factori de virulență solubili, reglarea coordonată a expresiei factorilor de virulență). O astfel de strategie prezintă un risc mai redus de selectare a rezistenței la antibiotice și de producere a disbiozelor, acționând specific asupra microorganismelor patogene, fără a afecta echilibrul microbiotei normale.

De asemenea, în această lucrare este utilizată o metodă nouă de determinare a potențialelor mecanisme de acțiune a substanțelor antimicrobiene nou sintetizate sau a sistemelor hibride nanostructurate, pe bază de magnetită, care le conțin și care utilizează citometria în flux.

Studiile de citotoxicitate *in vitro*, de evaluare a toxicității asupra crustaceului *Artemia franciscana* Kellog, a toxicității acute *in vivo*, studiile *in silico* ale derivaților dibenzoxepinonici, precum și cele de elucidare a potențialelor mecanisme de acțiune, de evaluare a efectului antioxidant și cel privind contribuția nanotehnologiei la dezvoltarea de noi biomateriale cu proprietăți antimicrobiene și antibiofilm, pentru derivații fluorenonici, efectuate pentru prima dată pe acești compuși, întregesc descrierea proprietăților biologice ale noilor compuși sintetizați și aduc elemente de originalitate prezentei lucrări.

Domeniile științifice abordate reprezintă domenii prioritare de top în cercetare, care se aliniază la prioritățile europene de cercetare și constau în descoperirea unor noi compuși cu eficacitate terapeutică.

Rezultatele obținute sunt promițătoare, iar studiile pot fi continuate și aprofundate, fie la nivel de sinteză, în scopul obținerii unor noi derivați, în scopul descoperirii unor noi sisteme de transport și eliberare a substanțelor nou-sintetizate, fie pentru determinarea foarte precisă a țintelor de acțiune ale compușilor obținuți.

Astfel, în perspectivă, se poate studia posibilitatea desfășurării reacțiilor chimice în câmp de microunde, în scopul reducerii timpului de reacție, creșterii randamentului de reacție și a purității produșilor finali, prin diminuarea reacțiilor secundare nedorite, în comparație cu metodele convenționale de încălzire. Această metodă se încadrează în principiile „chimiei verzi”, concept introdus în ultimii ani, reprezentând proiectarea, dezvoltarea și implementarea de procese chimice, cu scopul de a reduce sau elimina folosirea și generarea de substanțe periculoase atât pentru sănătatea umană cât și pentru mediu.

Dovedirea structurii chimice și a purității noilor compuși sintetizați, rămân scopuri majore ale viitoarelor cercetări, care pune un deosebit accent pe proiectarea și obținerea de molecule prototip cu structură originală, ce conțin cele două nuclee de bază, pe caracterizarea fizico-chimică și pe determinarea activităților biologice, în special a acțiunii antimicrobiene, în scopul identificării unor noi compuși cu potențial de aplicare în tratarea bolilor infecțioase de etiologie bacteriană și fungică, activi pe tulpini de referință, precum și pe tulpini microbiene recent izolate din clinică, care prezintă fenomene de rezistență sau multirezistență la principalele clase de agenți antimicrobieni cunoscuți.

Totodată, cunoscute fiind unele ținte comune în celula microbială și cea tumorală, compușii vor fi evaluați și pentru activitatea lor antiproliferativă, precum și pentru cea antivirală, această ultimă direcție fiind de foarte mare actualitate, în contextul pandemiei COVID-19 și al schimbărilor climatice globale care cresc riscul emergenței și reemergenței de noi și vechi agenți infecțioși cu potențial epidemic și chiar pandemic, coroborat cu expansiunea atitudinii anti-vacciniste a populației.

Cunoscându-se acțiunea antidepresivă a dibenzoxepinelor, va fi investigată și această acțiune pentru compușii ce fac obiectul acestei lucrări.

Vor continua, de asemenea, studiile privind contribuția nanotehnologiei la stabilizarea și eliberarea controlată a compușilor cu activitate antimicrobială sau antipatogenică, precum și la dezvoltarea de noi biomateriale cu proprietăți antibiofilm, folosind nanomateriale pe bază de magnetită funcționalizată cu alți agenți de acoperire, asociată cu noii compuși.

Prin aceste studii complexe pot fi identificate noi entități moleculare, cu un profil biologic adecvat, ca molecule *lead* cu potențial antiinfecțios ridicat, care vor fi utilizate

pentru obținerea unor materiale inovative, cu eliberarea prelungită a noilor agenți antimicrobieni de pe un suport nanostructurat.

Pe de altă parte, aceste nanosisteme pot depăși granița aplicațiilor biomedicale, putând fi utilizate pentru combaterea creșterii microbiene planctonice și sub formă de biofilme, în industria farmaceutică, cosmetică, alimentară sau în diferite ecosisteme naturale sau antropizate.

BIBLIOGRAFIE

- ¹ Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence* 2013, 4(2), pag. 185-191, 2013.
- ² Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Clin. Opin. Pharmacol.*, 18, 56-60, 2014.
- ³ Hamilton WA. Biofilms: microbial interactions and metabolic activities. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 41, 361-385, 1987.
- ⁴ de Kraker MEA, Stewardson AJ, Harbarth S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med*, 13(11): e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>, 2016.
- ⁵ O'Neill J. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, 5-17, London, UK, 2014.
- ⁶ Armstead AL, Li B. Nanomedicine as an emerging approach against intracellular pathogens. *Int. J. Nanomed.*, 6, 3281-3293, 2011.
- ⁷ Ray S, Pathak SR, Chaturvedi D. Organic carbamates in drug development. Part II: Antimicrobial agents - Recent reports. *Drugs Fut.*, 30:161, DOI: 10.1358/dof.2005.030.02.869228, 2005.
- ⁸ Taylor E, Webster TJ. Reducing infections through nanotechnology and nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, 6, 1463-1473, 2011.
- ⁹ Cristescu R, Popescu C, Socol G, Iordache I, Mihailescu IN, Mihaiescu DE, Grumezescu AM, Andronie A, Stamatina I, Chifiriuc C, Bleotu C, Saviuc C, Popa M, Chrisey DB. Magnetic Core/Shell Nanoparticle Thin Films Deposited By Maple: Investigation By Chemical, Morphological And In Vitro Biological Assays. *Appl. Surf. Sci.*, 258(23), 9250-9255, 2012.
- ¹⁰ Mihaiescu DE, Cristescu R, Dorcioman G, Popescu C, Nita C, Socol G, Mihailescu I, Grumezescu AM, Tamas D, Enculescu M, Negrea RF, Ghica C, Chifiriuc C, Bleotu C, Chrisey DB. Functionalized magnetite silica thin films fabricated by MAPLE with antibiofilm properties. *Biofabrication*, 5(1), DOI: 10.1088/1758-5082/5/1/015007, 2013.
- ¹¹ Parminderjit Kaur, Rashmi Arora, Gill NS. Review on Oxygen Heterocycles. *Indo American Journal of Pharm. Research*, 3(11), 2013.

- ¹² Grossmann A, von der Saal W, Sattelkan T, Tibes U. Tricyclic alkylhydroxamate Derivatives. *U.S. Patent*, 6,512,123 B2, 2003.
- ¹³ Anonymous. 9-Aminoalkylfluorenes and Their Salts. *Austrian Patent AT 368125*, 1982.
- ¹⁴ Limban C, Missir AV, Chiriță IC, Căproiu MT, Chifiriuc MC, Israil MA, Delcaru C. Derivați de O-acil-2-etil-11-oximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină, compoziție farmaceutică ce îi cuprinde și utilizarea lor. *RO Patent.*, 3-7, 2010.
- ¹⁵ Limban C, Chifiriuc MC. Antibacterial Activity of New Dibenzoxepinone Oximes with Fluorine and Trifluoromethyl Group Substituents. *Int. J. Mol. Sci.*, 12(10), 6432-6444, <https://doi.org/10.3390/ijms12106432>, 2011.
- ¹⁶ Limban C, Missir A, Chiriță IC. O-arylcarbamoyl- and O-arylthiocarbamoyl-11-oximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepins. *"Ovidius" University Annals of Medical Science- Pharmacy*, 3(1), 21-28, 2005.
- ¹⁷ Crovetti AJ, Stein RG. Certain O-substituted thiophene oxime carbamates used as antibacterial and antifungal agents. *US Patent* 4061764, 1977.
- ¹⁸ Georgiev VS, Saeva GA. 2-Adamantanone oxide carbamate derivatives. *US Patent* 4652680, 1987.
- ¹⁹ Pop CS, Hussien MD, Popa M, Mares A, Grumezescu AM, Grigore R, Lazar V, Chifiriuc MC, Sakizlian M, Bezirtzoglou E, Bertesteanu S. Metallic-based micro and nanostructures with antimicrobial activity. *Curr. Top Med. Chem.*, 15(16), 1577-1582, 2015.
- ²⁰ Bilcu M, Grumezescu AM, Oprea AE, Popescu RC, Mogosanu GD, Hristu R, Stanciu GA, Mihailescu DF, Lazar V, Bezirtzoglou E, Chifiriuc MC. Efficiency of vanilla, patchouli and ylang ylang essential oils stabilized by iron oxide@C14 nanostructures against bacterial adherence and biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Molecules*, 19(11), 17943-17956, 2014.
- ²¹ Bolocan A, Grumezescu AM, Chifiriuc MC, Mihaiescu DE, Fikai A, Andronesu E, Vasile BȘ, Pop CS. Biocompatible hydrodispersible magnetite nanoparticles used as antibiotic drug carriers. *Rom. J. Morphol. Embryo.*, 56(2), 365-370, 2015.
- ²² Grumezescu AM, Cristescu R, Chifiriuc MC, Dorcioman G, Socol G, Mihailescu IN, Mihaiescu DE, Fikai A, Vasile OR, Enculescu M, Chrisey DB. Fabrication of magnetite-based core-shell coated nanoparticles with antibacterial properties. *Biofabrication*, 7(1), 15014, 2015.
- ²³ Azhar SL, Lotfipour F. Magnetic nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Pharmazie.*, 67(10), 817-821, 2012.

²⁴ Grumezescu V, Andronescu E, Holban AM, Mogoantă L, Mogoșanu GD, Grumezescu AM, Stănculescu A, Socol G, Iordache F, Maniu H, Chifiriuc MC. MAPLE fabrication of thin films based on kanamycin functionalized magnetite nanoparticles with anti-pathogenic properties. *Appl. Surf. Sci.*, 336, 188-195, 2015.

²⁵ Prodan AM, Andronescu E, Trușcă R, Beuran M, Iconaru SL, Barna EȘ, Chifiriuc MC, Marutescu L. Antibiofilm activity of dextran coated iron oxide nanoparticles. *University POLITEHNICA of Bucharest. "The Scientific Bulletin"*, 76(4), 81-90, 2014.

²⁶ Ardelean IL, Ficai D, Sonmez M, Oprea O, Nechifor G, Andronescu E, Ficai A, Titu MA. Hybrid Magnetic Nanostructures For Cancer Diagnosis And Therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 19(1), 6-16, 2019.

Lucrări științifice publicate

Lucrări publicate în reviste indexate ISI:

1. **Ilinca Margareta Vlad**, Diana Camelia Nuță, Cornel Chiriță, Miron Teodor Căproiu, Constantin Drăghici, Florea Dumitrașcu, Coralia Bleotu, Speranța Avram, Ana Maria Udrea, Alexandru Vasile Missir, Luminița Gabriela Măruțescu, Carmen Limban. In Silico and In Vitro Experimental Studies of New Dibenz[b,e]oxepin-11(6H)one O-(arylcarbamoyl)-oximes Designed as Potential Antimicrobial Agents. *Molecules* **2020**, 25(2), 321; **Factor de impact 4.411**

<https://doi.org/10.3390/molecules25020321>

2. **Ilinca Margareta Vlad**, Diana Camelia Nuță, Carmen Limban, Robert Viorel Ancuceanu, Miron Teodor Căproiu, Florea Dumitrașcu, Ioana Cristina Marinas, Mariana Carmen Chifiriuc, Luminița Gabriela Măruțescu, Irina Zarafu, Ioana Raluca Papacoea, Bogdan Ștefan Vasile, Adrian Ionuț Nicoară, Cornelia-Ioana Ilie, Anton Fikai. New O-aryl-carbamoyl-oxymino-fluorene derivatives with microbicidal and antibiofilm activity enhanced by combination with iron oxide nanoparticles. *Molecules* **2021**, 26(10), 3002; **Factor de impact 4.411**

<https://doi.org/10.3390/molecules26103002>

3. Carmen Limban, Mariana Carmen Chifiriuc, Miron Teodor Căproiu, Florea Dumitrașcu, Marilena Ferbințeanu, Lucia Pintilie, Amalia Ștefaniu, **Ilinca Margareta Vlad**, Coralia Bleotu, Luminița Gabriela Măruțescu, Diana Camelia Nuță. New Substituted Benzoylthiourea Derivatives: From Design to Antimicrobial Applications. *Molecules* **2020**, 25(7), 1478; **Factor de impact 4.411**

<https://doi.org/10.3390/molecules25071478>

4. Corneliu Ovidiu Vrâncianu, Irina Gheorghe, Elena Georgiana Dobre, Ilda Czobor Barbu, Roxana Elena Cristian, Marcela Popa, Sang Hee Lee, Carmen Limban, **Ilinca Margareta Vlad**, Mariana Carmen Chifiriuc. Emerging Strategies to Combat β -Lactamase Producing ESKAPE Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21(22), 8527; **Factor de impact 5.923**

<https://doi.org/10.3390/ijms21228527>

Lucrări prezentate sub formă de poster și publicate sub formă de rezumat:

1. Carmen Limban, Diana Camelia Nuță, Miron Teodor Căproiu, Alexandru Vasile Missir, Mariana Carmen Chifiriuc, Carmellina Daniela Bădiceanu, **Ilinca Margareta Vlad**. Sinteza și caracterizarea unor noi 2-((4-clorofenoxi)metil)-N-(fenilcarbamoil)benzamide ca strategie de eradicare a biofilmelor microbiene, Congresul Național de Farmacie, ediția a XVII-a, 2018, ID 71, pg. 28, ISSN 2537-2823 / ISSN-L 2537-2823

Cereri obținere brevete de invenție:

1. **Vlad Ilinca Margareta**, Limban Carmen, Nuță Diana Camelia, Chiriță Cornel, Marineci Dana Cristina, Ștefănescu Emil, Căproiu Miron Teodor, Drăghici Constantin, Dumitrașcu Florea, Chifiriuc Mariana Carmen, Măruțescu Luminița, Avram Speranța, Dinu-Pârvu Cristina Elena, Missir Alexandru Vasile. *O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine, compoziție farmaceutică ce le conține și utilizarea acestora*. Cerere de brevet de invenție nr. A/00859 / 01.11.2018

2. **Vlad Ilinca Margareta**, Limban Carmen, Missir Alexandru Vasile, Morușciag Laurențiu, Nuță Diana Camelia, Dumitrașcu Florea, Căproiu Miron Teodor, Chifiriuc Mariana Carmen, Popa Marcela, Măruțescu Luminița-Gabriela, Dinu-Pârvu Cristina Elena, Costea Teodora, Ancuceanu Viorel Robert, Gîrd Cerasela Elena, Anuța Valentina, Velescu Bruno Ștefan. *Derivați ai O-aril-carbamoil-oximino-fluorenului, compoziție farmaceutică ce îi conține și utilizarea acestora*. Cerere de brevet de invenție nr. A/00319 / 30.05.2019