

Universitatea de Medicină și Farmacie

“Carol Davila”, București

Facultatea de Farmacie

TEZĂ DE DOCTORAT

(rezumat)

**“Noi combinații complexe biologic active ale
5-hidroxi flavonei cu ioni metalici:
Sinteza și caracterizare”**

Conducător științific

Prof. Dr. ADRIAN ANDRIEȘ

Doctorand

MUNTEANU (TICEA)

ALEXANDRA-CRISTINA

București

2017

CUPRINS

Introducere	2
I. PARTEA TEORETICĂ	3
I.1. Proprietățile flavonoidelor și complexilor metalici ai acestora	3
I.2. Complecși ai lantanidelor. Aplicații	4
I.3. Complecși ai Al(III), Ga(III), In(III). Aplicații	4
II. PARTEA EXPERIMENTALĂ	5
Obiectivele studiului	5
II.1. Combinații complexe ale ai unor ioni trivalenți de lantanide cu 5-hidroxi flavonă în raport molar 1:2	5
Introducere	5
Sinteza combinațiilor complexe	6
Caracterizarea fizico-chimică a complexilor	6
Calculul DFT	9
Studii de interacțiune <i>in vitro</i> cu ADN	10
a intensității fluorescenței resturilor Trp din structura proteinelor	13
Testarea preliminară a activității biologice a combinațiilor complexe sintetizate. Screening-ul calitativ al acțiunii antimicrobiene	17
II.2. Combinații complexe ale unor ioni trivalenți de lantanide cu liganzii 5-hidroxi flavonă și 1,10 – fenantrolină în raport molar 1:1:1	18
Introducere	18
Sinteza combinațiilor complexe	18
Caracterizarea fizico-chimică a complexilor	18
Calculul DFT	21
Studii de interacțiune <i>in vitro</i> cu ADN	22
Studii de interacțiune <i>in vitro</i> cu albumina serică umană și transferina. Studii de stingere a intensității fluorescenței resturilor Trp din structura proteinelor	23
Testarea preliminară a activității biologice a combinațiilor complexe sintetizate	27
Screening-ul calitativ al acțiunii antimicrobiene	27
Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității complexilor sintetizați	27
II.4. Combinații complexe ale unor ioni trivalenți de Al(III), Ga(III), In(III) cu 5-hidroxi flavonă în raport molar 1:3	29
Introducere	29
Sinteza combinațiilor complexe	29
Caracterizarea fizico-chimică a complexilor	29
Calculul DFT	31
Studii de interacțiune <i>in vitro</i> cu ADN	32
Studii de interacțiune <i>in vitro</i> cu albumina serică umană și transferina. Studii de stingere a intensității fluorescenței resturilor Trp din structura proteinelor	34
Testarea preliminară a activității biologice a combinațiilor complexe sintetizate	36
Screening-ul toxicologic asupra crustaceului <i>Daphnia magna</i> Straus	36
Screening-ul calitativ al acțiunii antimicrobiene	36
Evaluarea <i>in vitro</i> a citotoxicității complexilor sintetizați	36
Evaluarea activității antivirale. Inhibarea integrazei HIV.....	38
CONCLUZII FINALE	39
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	41

INTRODUCERE

Chimia anorganică cu aplicații medicale este un domeniu multidisciplinar care combină elemente de chimie, farmacologie, toxicologie, biochimie, biofizică și chimie farmaceutică. Efectele biologice ale ionilor metalici și implicit ale complexșilor acestora pot fi foarte specifice și pot fi modulate prin recrutarea de procese celulare capabile să recunoască anumite tipuri de interacțiuni metal-macromoleculă. Înțelegerea acestor interacțiuni deschide calea spre design-ul rațional al metalofarmaceuticelor și punerea în aplicare a unor noi strategii terapeutice. Substanțele medicamentoase pe bază de metale pot modifica structura ADN și/sau ARN la nivel secvențial și conformațional cu un grad ridicat de specificitate. Mai mult, ionii metalici au capacitatea de recunoaștere a situs-ului activ al enzimelor și de creștere a afinității inhibitorilor enzimatici în cazul agenților bifuncționali.

Complexșii de coordinare metalici prezintă unele proprietăți ce pot constitui un avantaj în context biologic: proprietăți redox, electrofilicitate, geometrii unice, proprietăți magnetice și spectroscopice distincte, capacitatea de a interacționa cu specii diverse: cationi, anioni, radicali liberi etc. Mai mult, diversitatea structurală și funcțională a complexșilor unor metale cu liganzi adecvați practic nu cunoaște limite. În jurul ionilor metalici, atomii grupărilor chelatoare se pot plasa în variate modalități, unele dintre ele fiind greu de realizat fără implicarea unui metal. În consecință, complexșii pot interacționa puternic și selectiv cu receptorii celulari superficiali, ceea ce poate oferi perspective pentru potențiale abordări terapeutice.

Mai mult, complexarea ionilor metalici cu diferiți liganzi organici cu structură adecvată poate conduce la limitarea efectelor toxice generate de administrarea ionului metalic sub formă de sare. Utilizarea metalelor în tratamentul diferitelor forme de cancer oferă o serie de avantaje terapeutice. Cu toate acestea, toxicitatea acestora reprezintă un important factor limitant în privința abordării terapeutice. Aceasta poate fi minimizată prin complexarea cu agenți chelatori organici.

În contextul creșterii impactului chimiei bioanorganice în domeniul farmaceutic, teza de doctorat prezintă are ca scop sinteza și caracterizarea prin metode fizico-chimice moderne a unor noi combinații complexe ale unui derivat flavonic, 5-hidroxiavononă, cu ioni metalici trivalenți, optimizarea structurii complexșilor prin studii DFT (density functional theory) studiul interacțiunii complexșilor obținuți cu macromolecule de interes biologic (ADN, proteine serice) și un screening preliminar al acțiunii biologice a compușilor.

Teza de doctorat este alcătuită din două părți principale:

- partea generală, cu trei capitole care prezintă date din literatură actualizate privind combinațiile complexe ale flavonelor și combinațiile complexe ale ionilor metalici trivalenți utilizați pentru sinteza complexșilor obținute în cadrul tezei, astfel încât să se constituie o bază de date pentru proiectarea cercetărilor personale
- partea experimentală, care cuprinde cercetările personale, structurată pe patru capitole, un capitol în care sunt descrise materialele utilizate și metodele de sinteză și caracterizare aplicate și trei capitole de rezultate și discuții corespunzător celor trei serii de complexși metalici obținuți.

La cele două părți principale ale tezei se adaugă concluziile, bibliografia studiată și articolele publicate în timpul studiilor de doctorat.

Prin cercetările realizate, considerăm că am adus o contribuție la domeniul combinațiilor complexe cu acțiune biologică, având în vedere acțiunea antitumorală și antimicrobiană a unora dintre compușii obținuți, evidențiată într-o serie de studii *in vitro*. Pentru complexșii de interes biologic sunt justificate studiile ulterioare privind stabilitatea și cinetica proceselor de schimb în context fiziologic, profilurile biofarmaceutic, farmacocinetic și farmacologic.

I. Partea teoretică

I.1. Proprietățile flavonoidelor și complexelor metalici ai acestora

Flavonoidele (flavonoizii) reprezintă o clasă de compuși ubiquitari în organismele vegetale care în ultimele 2-3 decenii au fost subiectul a numeroase studii. Din punct de vedere al structurii chimice, flavonoidele conțin nucleul comun 2-fenilcromen-4-onă (2-fenil-1-benzopiran-4-onă). Sunt compuși polifenolici și în funcție de gradul de oxidare al nucleului γ -pironic, de poziționarea grupelor hidroxil și de poziționarea atomului de carbon de care se leagă nucleul benzenic lateral, pot fi clasificate în diferite subclase, cum ar fi flavone, flavonoli și flavanone.

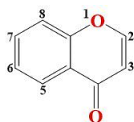


Fig.1. Nucleul de bază al flavonoidelor (nucleu cromonic; nucleu de benzo- γ -pironă)

Datorită prezenței în structura flavonoidelor a grupărilor oxo și hidroxil, acestea pot funcționa ca liganzi organici, permițând legarea unor ioni metalici. Numeroase cercetări au fost orientate către studiul formării combinațiilor complexe ale flavonoidelor, cu scopul obținerii de compuși cu biodisponibilitate îmbunătățită, acțiune terapeutică superioară și toxicitate inferioară liganzilor liberi, ori în scop analitic [1]. În acest context se înscriu și cercetările efectuate în prezenta lucrare.

În cuprinsul acestui capitol sunt discutate cu rigurozitate aspecte legate de proprietățile fizico-chimice ale flavonoidelor și complexelor acestora (și aplicații) și de numeroasele activități biologice: antioxidantă și prooxidantă, antitumorală, antimicrobiană; sunt incluse și discuții asupra interacțiunilor cu acizi nucleici și proteine. Sunt prezentate și date din literatură cu referire la biotransformarea flavonoidelor în organism și la studiile de formulare a flavonoidelor și complexelor acestora în scopul creșterii biodisponibilității.

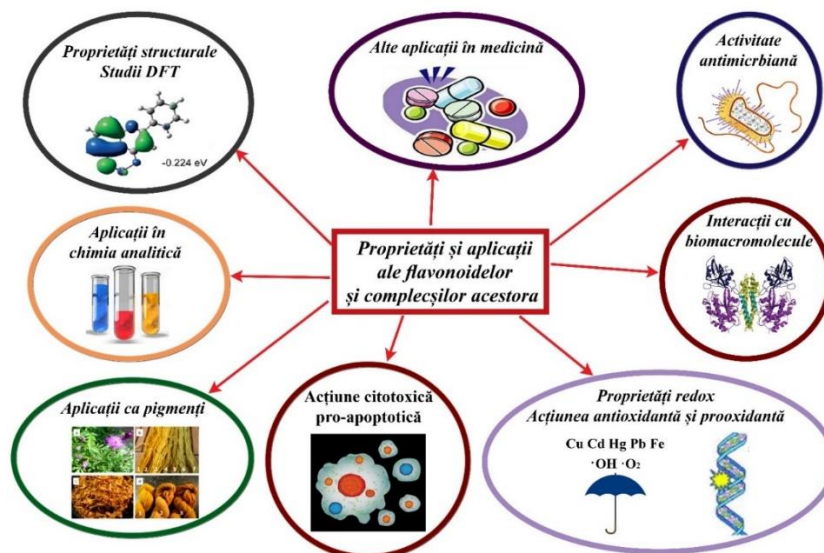


Fig.2. Reprezentare schematică a proprietăților și aplicațiilor flavonoidelor și complexelor metalici ai acestora

I.2. Complecși ai lantanidelor. Aplicații

Metalele din seria lantanidelor prezintă reactivitate crescută, într-un mod analog aluminiului și galiului, făcând abstracție de volumul foarte diferit al acestor metale. Sunt puternic electropozitive, având de cele mai multe ori numărul de oxidare +3 (dar și +4 pentru ceriu, praseodimiu și terbiu, și +2 pentru samariu, europiu și yterbiu). Ionii Ln^{3+} sunt oxofili și au sarcină pozitivă mare, așadar vor interacționa puternic cu molecule anionice (în special liganzi organici ce au O și N ca atomi donori). De exemplu, Ln(III) pot lega cu ușurință liganzi care conțin grupări carboxil, amino sau iminice. În general, complecșii Ln(III) prezintă un număr mare de coordinare, care poate varia între 8 - 12 în soluție și 6 - 12 în stare solidă. Repulsiile de tip ligand-ligand și cele sterice sunt principalii factori care influențează geometria și numărul de coordinare pentru complecșii lantanidelor. Aceștia prezintă proprietăți optice remarcabile, cum ar fi: deplasări Stokes mari, viață de luminiscentă lungă și picuri de emisie intense [2,3]. Combinațiile complexe ale lantanidelor sunt candidați promițători pentru aplicații biomedicale, de diagnostic și imagistică celulară [4,5]. În plus, mulți complecși ai lantanidelor acționează eficient ca nucleaze chimice, cu rol în hidroliza catalitică a ADN sau ARN fără implicații redox [6,7].

Combinațiile complexe ale lantanidelor sunt des utilizate pentru proprietățile luminescente ale acestora și ca reactivi pentru analize de rezonanță magnetică nucleară (datorită proprietăților paramagnetice ale acestora). Primele aplicații medicale în acest domeniu au apărut după dezvoltarea imagisticii prin rezonanță magnetică (IRM) și introducerea acestei tehnici în diagnosticul medical. Radioizotopii lantanidelor prezintă aplicații în diverse domenii, de la metode de diagnostic ce utilizează tomografia cu emisie de pozitroni (PET), la radioterapie. Complecșii lantanidelor, datorită proprietăților lor unice, sunt utilizați pe scară largă ca sonde luminescente pentru bioteste și ca reactivi în imagistica prin rezonanță magnetică și optică. În plus, ca nucleaze chimice, prezintă o eficiență ridicată în hidroliza ADN și ARN [8].

În cuprinsul acestui capitol sunt prezentate și discutate date din literatură privind proprietățile fizico-chimice ale ionilor lantanidelor (paramagnetice, luminescente) și aplicațiile corespunzătoare acestora, interacțiunile cu acizi nucleici, proteine, activitatea antitumorală, aplicații ale nanocompozitelor dopate cu lantanide și aplicații ale lantanidelor în terapia antitumorală modernă.

I.3. Complecși ai Al(III), Ga(III), In(III). Aplicații

Ionii Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} nu sunt esențiali pentru organismul uman, dar formează combinații complexe de interes biologic. Comportamentul chimic al majorității sărurilor ionilor metalici trivalenți în soluție apoasă este puternic influențată de reacția de hidroliză. Pentru a diminua efectul hidrolizei în mediu apos, și deci pentru a crește stabilitatea sărurilor în condiții fiziologice, legarea ionilor metalici de Al(III) , Ga(III) , In(III) de liganzi organici reprezintă o strategie eficientă.

Complecșii neutri ai Al(III) sunt utilizați ca acizi Lewis și catalizatori [9]. Aluminiul este neurotoxic, poate provoca tulburări de creștere și poate afecta funcțiile sistemului imunitar, echilibrul hormonal, funcția cognitivă și comportamentul [10]. Coordinarea acestuia în cadrul unei biomolecule poate avea ca rezultat un efect biologic și este o bază pentru examinarea chimiei de coordinare a aluminiului în context biologic, cu implicații majore în cazul bolilor neurodegenerative.

Galiul prezintă un interes deosebit datorită disponibilității radioizotopilor ^{67}Ga , ^{68}Ga , utilizați în domeniul medicinei nucleare (în cazul tomografiei cu emisie de pozitroni și tomografiei de emisie cu foton unic). Compușii galiului s-au dovedit a fi utili pentru tratarea bolilor infecțioase, autoimune, a resorbției osoase accelerate și împotriva carcinoamelor de la nivelul vezicii urinare, uroteliale, de col uterin cu celule de tip histologic nonscuamos și a unor tipuri de limfoame [11-14]. Azotatul de galiu(III) a fost aprobat pentru tratamentul hipercalemiei maligne și bolii osoase Paget, dar farmacocinetica nefavorabilă a împiedicat utilizarea sa pe scară largă în chimioterapie [15]. Este necesară așadar îmbunătățirea proprietăților farmacocinetice ale compușilor Ga(III) . Una dintre metode este coordonarea cu liganzi organici, cu o serie de avantaje comparativ cu sărurile Ga(III) în ceea ce privește biodisponibilitatea orală, stabilitatea hidrolitică și capacitatea de penetrare a membranelor [16]. În ultimele decenii, literatura înregistrează un interes deosebit pentru proprietățile antitumorale și antimicrobiene ale complecșilor Ga(III) .

Radionuclizii de indiu (^{111}In , ^{113}In), sub formă de chelați cu liganzi adecvați, au aplicații importante ca radiofarmaceutice pentru diagnostic, datorită proprietăților emițătoare (radiații gama sau pozitroni) și datorită timpilor de înjumătățire optimi.

II. Partea experimentală

Obiectivele studiului

În derularea studiilor efectuate în cadrul tezei de doctorat, am avut în vedere următoarele criterii pe care ar trebui să le îndeplinească un nou compus pe bază de metal cu activitate antitumorală și eficacitate clinică:

(1) proprietăți intrinsece bune, stabilitate moleculară, permițând medicamentului să ajungă la celulele țintă;

(2) interacțiune eficientă cu proteinele de transport în sânge și membranele celulare;

(3) proprietăți bune de legare de ADN;

(4) activitate selectivă împotriva celulelor canceroase și nu asupra celulelor normale și

(5) preferabil, activitate împotriva celulelor tumorale care sunt rezistente la cisplatină și derivați.

Urmărind criteriile amintite mai sus, cercetările personale efectuate în cadrul prezentei tezei de doctorat au avut ca principale obiective:

- Sinteza unor combinații complexe ale unor ioni trivalenți de lantanide și, respectiv, de Al(III), Ga(III), In(III) având ca ligand comun 5-hidroxi-flavona;
- Caracterizarea prin metode fizico-chimice a combinațiilor complexe obținute: analiză chimică elementală, conductivitate molară, analiză termogravimetrică, spectroscopie UV-Vis, FT-IR, de fluorescență, spectrometrie de masă, rezonanță electronică de spin, studii DFT (density functional theory);
- Testarea interacțiunii complexelor sintetizați cu ADN dublu catenar;
- Testarea interacțiunii complexelor sintetizați cu proteine serice: transferină, albumină serică prin studii spectroscopice;
- Testarea preliminară a activității biologice a combinațiilor complexe în vederea evidențierii acțiunii antitumorale, antibacteriene și/sau antivirale a complexelor testați.

Rezultatele experimentale obținute și discuțiile aferente vor fi prezentate în detaliu în următoarele trei capitole ale părții experimentale a tezei de doctorat.

II.1. Combinații complexe ale unor ioni trivalenți de lantanide cu 5-hidroxi-flavonă în raport molar 1:2

Introducere

Primuletina (5-hidroxi-flavona; 5-hidroxi-2-fenil-4H-1-benzopiran-4-onă, **Fig.3.**) este o flavonă naturală, extrasă din *Primula sp.* [17] și *Dionisya sp.* [18]. În comparație cu alte flavonoide, activitatea acesteia este încă mai puțin explorată. Până în acest moment, au fost raportate acțiunile de agonist al canalelor de calciu și potasiu [19], vasorelaxante și de antagonist al receptorilor androgenici [20].

Datorită prezenței grupărilor chelatoare 5-hidroxi-4-ceto, care îndeplinesc criteriul de proximitate necesar formării de complecși de coordonare, 5-hidroxi-flavona poate acționa ca un ligand bidentat față de ionii metalici *p*-, *d*- și *f*-.

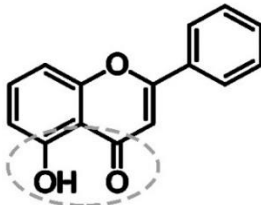
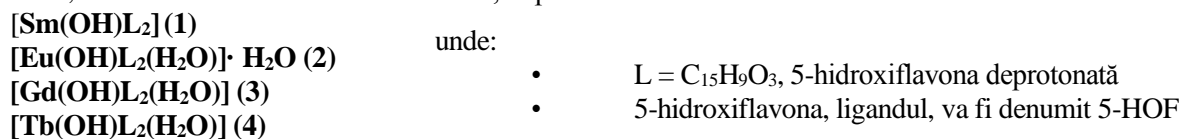


Fig.3. Structura 5-hidroxi-flavonei; în imagine sunt evidențiate grupările chelatoformatoare 5-hidroxi și 4-ceto

Sinteza combinațiilor complexe

Reacțiile de sinteză s-au desfășurat în mediu alcoolic, între ligandul deprotonat și clorura de lantanid (raport molar de 2:1), sub controlul atent al pH-ului, la pH = 5,5 - 6. Pentru deprotonarea 5-hidroxi flavonei s-a utilizat trietilamină (TEA). Am atribuit celor patru complecși izolați următoarele formule abreviate și coduri, care vor fi utilizate în această lucrare, după cum urmează:



Caracterizarea fizico-chimică a complecșilor

Spectrele în infraroșu cu transformată Fourier

Diferențele între spectrul IR al ligandului și cele ale complecșilor confirmă legarea ionului metalic la grupările chelatoare ale 5-hidroxi flavonei. Spectrele IR ale combinațiilor complexe (2) – (4) conțin o bandă intensă, largă, între 2600 – 3600 cm⁻¹, atribuită prezenței unor molecule de apă de cristalizare și/sau coordinare în structura complecșilor. Această bandă lipsește din spectrul complexului (1), indicând absența moleculelor de apă din structura acestuia.

Benzile de absorbție intense datorate modurilor de vibrație $\nu(\text{C}=\text{O})$, apar în spectrul ligandului la 1654 și 1615 cm⁻¹. Acestea sunt deplasate cu ~ 20 cm⁻¹ poate fi explicată prin implicarea oxigenului carbonilic în legarea ionului metalic. Semnalul puternic, care apare la 1587 cm⁻¹ în spectrul IR al ligandului a fost atribuit modurilor de vibrație $\nu(\text{C}=\text{C})$; în spectrele IR ale complecșilor, această bandă este foarte puțin deplasată (~ 5 cm⁻¹).

Vibrațiile de deformare în plan a grupării OH apar în spectrul IR al 5-HOF ca benzi puternice la 1475 cm⁻¹, însă nu apar în spectrele complecșilor, ca dovadă a implicării grupării fenolice în coordinare. În spectrul IR al ligandului apare o bandă puternică la 1298 cm⁻¹, atribuită vibrațiilor $\nu(\text{C}-\text{O}) + \delta(\text{O}-\text{H})$. Această bandă apare foarte atenuată în spectrele complecșilor, ceea ce indică faptul că 5-hidroxi flavona se leagă de ionul metalic în forma sa deprotonată. Modurile de vibrație $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ apar foarte puțin deplasate în spectrele complecșilor (~ 3 cm⁻¹), ceea ce confirmă prezumția că oxigenul din nucleul aromatic C nu este implicat în coordinare. Mai mult decât atât, în spectrele complecșilor, prezența vibrațiilor de întindere $\nu(\text{M}-\text{O})$ la ~ 505 cm⁻¹ indică legarea ionului metalic, deoarece spectrul ligandului nu prezintă această bandă [21,22].

În tabelul II.1 sunt enumerate cele mai importante benzi din spectrele IR ale flavonoidului și complecșilor acestuia. În concluzie, spectrele IR indică o coordinare bidentată a ligandului în complecși, în care sunt implicate grupările 5-hidroxi și 4-ceto ale 5-hidroxi flavonei.

Tabel II.1. Benzile spectrale majore în IR (cm⁻¹) ale complecșilor și atribuirile corespunzătoare

Compus	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}-\text{O}) + \delta(\text{O}-\text{H})$	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	$\nu(\text{M}-\text{O})$
5-HOF	3200-2600(l,m)	1654(i) 1615(i)	1587(i)	1357(m) 1298(i)	1255(i)	absent
(1)	-	1636(i) 1594(i)	-	1343(m)	1251(i)	560(s) 505 (s)
(2)	3600-2600(l,m)	1637(i) 1594(i)	1581(i)	1357(m)	1252(i)	562(s) 505(s)
(3)	3600-2600(l,m)	1637(i) 1595(i)	1582(i)	1358(m)	1252(i)	562(s) 505(s)
(4)	3600-2600(l,m)	1637(i) 1594(i)	1581(i)	1357(m)	1252(i)	563(s) 506(s)

i = intens; m = mediu; l = larg; s = slab

Spectrele UV-Vis-NIR

Spectrele electronice au fost înregistrate prin tehnica spectrală de reflectanță difuză, în domeniul 200 - 2000 nm. Aspectul spectrelor electronice ale flavonoidelor depinde de numărul de grupe hidroxil și de poziția acestora în moleculă. Se remarcă apariția a două benzi caracteristice în spectrele UV-Vis, și anume: banda situată între 300-400 nm (banda I), caracteristică nucleului B conjugat cu nucleul C (sistemul cinamoil) și cea de a doua bandă situată între 240-300 nm (banda II), datorată sistemului conjugat între nucleul A și C (sistemul benzoil) [23,24]. Ligandul, 5-hidroxi flavona, prezintă două maxime de absorbție datorate tranzițiilor $\pi-\pi^*$ la 385 nm (banda I) și 255 nm (banda II).

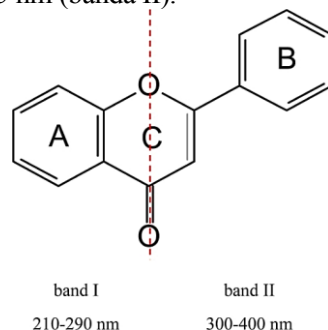


Fig.4. Reprezentare schematică a scheletului flavonoidelor și a benzilor corespunzătoare în spectrele electronice

Nucleele A și B sunt reprezentate schematic în **Fig.4.**

În spectrele complexilor se observă deplasări batocrome ale benzilor de absorbție I ($\Delta\lambda \sim 10 - 20$ nm) și II ($\Delta\lambda \sim 10 - 15$ nm), care pot fi legate de extinderea sistemului conjugat al ligandului în urma coordinării ionului metallic. Umărul care apare la 340 nm în spectrul electronic al ligandului, este prezent și în spectrele complexilor ca umăr sau maxim de absorbție, însoțit de o deplasare hipsocromă ($\Delta\lambda \sim 20 - 25$ nm). Se observă o lărgire a benzii spectrale I ca urmare a suprapunerii acesteia cu banda de transfer de sarcină metal-ligand (LMCT). În regiunea spectrală de infraroșu apropiat (NIR), se pot observa tranziții $f-f$ de pe termenul fundamental ${}^6H_{5/2}$ pe termenul 6F multiplu al ionului Sm^{3+} ($4f^5$) [25].

În concluzie, la formarea complexilor sunt implicate atât sistemul cinamoil, cât și cel benzoil din structura ligandului. Legarea ionului metallic se realizează așadar prin implicarea grupărilor 5-OH și 4-C=O, fapt confirmat prin prezența deplasărilor benzilor I și II ale ligandului în spectrele electronice ale complexilor. Datele din spectrele UV-Vis ale ligandului și complexilor sunt prezentate în **tabelul II.2.**

Tabel II.2. Atribuirea benzilor din spectrele UV-Vis-NIR pentru ligand și complexi

Compus	λ_{max} (nm)		
	Banda I		Banda II
5-HOF	385	340	255
(1)	405	320	265
(2)	395	315	270
(3)	395	315	270
(4)	395	320	270

Spectrele de fluorescență

Spectrele de emisie fluorescentă au fost înregistrate în cloroform la o concentrație de 5 $\mu\text{g/ml}$ la lungimile de undă de excitație de 360 nm și 440 nm, pentru ligand și complexi. Rezultatele permit formularea următoarelor concluzii:

- (i) 5-hidroxi flavona nu prezintă fluorescență în condițiile testate;
- (ii) În urma excitării la 360 nm, în spectrele de emisie ale complexilor **(1)** și **(2)**, apar două benzi, la lungimile de undă de 411 nm și 436 nm;
- (iii) În urma excitării la 440 nm, în spectrul de emisie al complexului **(1)**, apare o bandă nouă, la 461 nm.

Intensitatea fluorescenței crește în urma complexării, fapt atribuit inhibării transferului intramolecular de protoni între grupările hidroxil și cetonă din structura ligandului, în urma formării unui inel chelat între atomii de O ai grupărilor chelatoformatoare și ionul metalic. Așadar, apariția noilor benzi de emisie în spectrele de fluorescență ale complexelor poate fi considerată o dovadă a coordinării ionului metalic la 5-hidroxi flavonă.

Spectrele de masă

Au fost analizate spectrele de masă obținute prin tehnica ionizării de tip electrospray (ESI-MS) în mod pozitiv. Semnalele intense corespunzătoare ionilor pseudomoleculari rezultați prin protonare sau prin formare de aducți cu una sau două molecule de apă obținuți pentru combinațiile complexe sunt prezentate în **tabelul II.3**, coloanele 3 - 4 - 5. Pentru toți complexii spectrele au fost în acord cu abundența izotopică naturală corespunzătoare lantanidelor implicate. Pe lângă ionii pseudomoleculari, în spectrele de masă apar specii obținute prin eliminarea unei molecule de ligand (**Tabel II.3.**, coloana 2).

Formulele complexelor (1) – (4) au fost atribuite prin compararea maselor moleculare ale complexelor pe baza datelor analizei elementale cu valorile m/z identificate în spectrul de masă. Toate datele obținute prin spectrometrie de masă confirmă faptul că acești compuși au un raport molar ioni metalic : ligand de 1:2.

Tabel II.3. Valori nominale m/z ale fragmentelor ionice observate în spectrele de masă ale complexelor – coloana 2 conține speciile obținute prin fragmentarea ionului molecular, coloanele 3, 4 conțin ioni pseudomoleculari, coloana 5 conține principalele fragmente ale ionilor pseudomoleculari protonați rezultați prin tehnica MS/MS

Complex	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic
(1)	-	626 $^{152}\text{SmL}_2^+$	644 $^{152}\text{SmL}_2(\text{H}_2\text{O})^+$	662 $^{152}\text{SmL}_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$
	406	625	643	661
(2)	$^{151}\text{Eu}(\text{OH})\text{L}^+$	$^{151}\text{EuL}_2^+$	$^{151}\text{EuL}_2(\text{H}_2\text{O})^+$	$^{151}\text{EuL}_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$
	408	627	645	663
(3)	$^{153}\text{Eu}(\text{OH})\text{L}^+$	$^{153}\text{EuL}_2^+$	$^{153}\text{EuL}_2(\text{H}_2\text{O})^+$	$^{153}\text{EuL}_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$
	414	634	652	670
(4)	$^{160}\text{Gd}(\text{OH})\text{L}^+$	$^{160}\text{GdL}_2^+$	$^{160}\text{GdL}_2(\text{H}_2\text{O})^+$	$^{160}\text{GdL}_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$
	413	633	651	669
	$^{159}\text{Tb}(\text{OH})\text{L}^+$	$^{159}\text{TbL}_2^+$	$^{159}\text{TbL}_2(\text{H}_2\text{O})^+$	$^{159}\text{TbL}_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$

Spectroscopie de rezonanță electronică de spin

Spectrele de rezonanță electronică de spin (RES), în cazul moleculelor paramagnetice, dau informații cu privire la înconjurarea moleculară și gradul de ordonare a particulelor complexului. Complecșii (1) – (4) prezintă caracter paramagnetic, conferit de ionii lantanidelor, care conțin electroni neîmperecheați în substratul 4 *f*.

Ionii Tb(III) și Eu(III), din cauza timpilor scurți de relaxare ($\sim 10^{-13}$ s), nu prezintă în mod normal semnale RES la temperatura camerei. Ionii Gd^{3+} , cu o configurație electronică $4f^7$, au un timp de relaxare mai mare (10^{-9} - 10^{-10} s) [26,27], prezentând semnale RES detectabile la temperatura camerei. Ca urmare a fenomenului de câmp cristalin nul (*engl.* zero-field-splitting, prescurtat ZFS) al Gd(III), și formării unor legături de hidrogen între moleculele de apă și complex (care induce unele distorsiuni) se observă extinderea benzilor până la apariția unei linii RES asimetrică, largă.

Această linie foarte largă, ușor asimetrică prezintă un factor g efectiv de 1,99 și o lățime a benzii (ΔB_{pp}) de aproximativ 175,5 mT. Această rezonanță la $g \sim 2.0$ este tipică pentru ionii Gd(III) situați în aranjamente structurale cu simetrie redusă [28]. În plus, o rezonanță slabă, nerezolvată (g_2) poate fi observată la $g = 3,47$, cu un $\Delta B_{pp} \sim 29.17$ mT. Valorile $g \sim 2.0$ pot fi atribuite ionilor Gd(III) cu numere de coordonare mai mari sau egale cu șase, în timp ce valorile g de aproximativ 3,5 ar putea fi asociate unor ioni Gd(III) cu numere de coordonare mai mici decât șase [29]. Picurile generale obținute indică faptul că (3) este situat într-un mediu

dezordonat. În spectrul înregistrat în soluție, liniile de rezonanță localizate la $g \sim 5,42; 3,56; 2,46$ și $2,07$ descriu așa numitul spectru în formă de „U”. În cazul complexului **(3)**, spectrul în formă de „U” apare ușor distorsionat și asimetric datorită ionilor Gd^{3+} situați în vecinătăți de diferite simetrii, cu distorsiuni moderate [29].

Analiza termică (TG, DTG, DTA)

Profilul termic al combinațiilor complexe 1:2 a fost investigat prin analiză termică, în aer. Curbele termogravimetrice (TG, DTG) și de analiză termică diferențială (DTA) ale complexelor **(1) – (4)** au fost înregistrate pe intervalul de temperatură 30 - 1000°C. Datele obținute sunt prezentate în **tabelul II.4.** în conformitate cu rezultatele analizei termice, transformările termice sunt procese complexe, care constau în eliminarea apei (de cristalizare sau coordinare), termoliză și degradarea oxidativă a 5-hidroxi flavonei. Curbele TG, DTG și DTA indică faptul că **(1)** este o specie anhidră.

Tabel II.4. Rezultatele analizei termice (în aer) pentru complexii **(1) – (4)**

Complex	Etapă	Efect termic	Interval de temperatură (°C)	Δm_{exp} (%)	Δm_{calc} (%)
(1)	1	Exotermic	320-1000	72,5	72,8
		Reziduu (Sm_2O_3)		27,5	27,2
(2)	1	Endotermic	170-300	5,0	5,3
	2	Exotermic	320-1000	72,2	72,3
		Reziduu (Eu_2O_3)		22,8	22,4
(3)	1	Endotermic	240-315	2,6	2,7
	2	Exotermic	325-1000	69,9	70,1
		Reziduu (Gd_2O_3)		27,5	27,2
(4)	1	Endotermic	210-310	2,5	2,7
	2	Exotermic	320-1000	69,6	69,9
		Reziduu (Tb_2O_3)		27,9	27,4

Calculul DFT

Difracția cu raze X este fără îndoială cea mai bună metodă pentru stabilirea structurii unui compus. Deși au fost făcute încercări repetate de a obține monocristale din diverși solvenți și amestecuri de solvenți prin diverse metode, obținerea acestora nu a fost posibilă în cazul complexelor sintetizați în cadrul acestei teze.

Din aceste motive, am utilizat calcule teoretice prin teoria funcționalei de densitate DFT pentru optimizarea structurii complexelor. Setul de bază split-valență cu funcții de polarizare 6-31G(d) a fost aplicat pentru atomii de carbon și hidrogen. Pentru a oferi o descriere mai bună a interacțiunilor ligand-metal, s-au adăugat seturi de bază cu funcții difuze suplimentare pentru atomii de oxigen (6-31 G+(d, p)). Pentru ionii Ln^{3+} au fost utilizate pseudopotențialele cvasi-relativiste Stuttgart-Köln ECP28MWB [30,31]. Funcționala B3LYP este utilizată des pentru optimizarea complexelor metalici, iar rezultatele sunt în bună concordanță cu cele obținute experimental. Geometriile optimizate ale ligandului (**Fig.5.**) și complexelor **(1), (2)** sunt prezentate în **Fig.6.**

Sfera de coordinare din jurul centrului metalic în complexul **(1)** (**Fig.6.**) este alcătuită din următorii atomi: O7, O27 și O29, O30 (aparținând 5-hidroxi flavonei) și O31 (aparținând grupei hidroxil). Sferile de coordinare din jurul centrului metalic în complexii **(2) - (4)** conțin un atom de O suplimentar, aparținând unei molecule de apă.

În complexii **(2) - (4)**, unghiurile O-M-O variază între $46^\circ - 106^\circ$, ceea ce indică o geometrie octaedrică distorsionată. Unghiurilor diedre în jurul ionilor lantanidelor în complexii **(2) - (4)**, au valori foarte diferite de 0° sau 180° , indicând faptul că ionul de lantanid și atomii donori nu se află în același plan. În cazul complexului **(1)**, unghiurile diedre corespunzătoare au valori apropiate de 0° (-1.366°) și, respectiv 180° (179.599°), indicând faptul că Sm^{3+} este situat în același plan cu grupările implicate în coordinare [32].

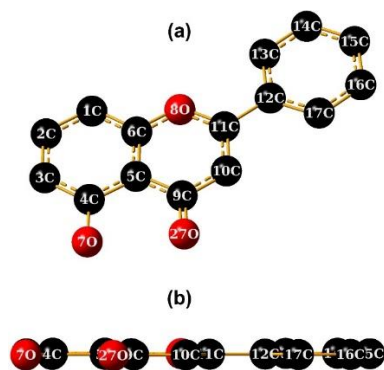


Fig.5. (a) Structura optimizată a 5-hidroxi flavonei în stare electronică fundamentală la nivelul de teorie B3LYP, folosind setul de funcții 6-31G(d); (b) conformația planară a 5-hidroxi flavonei conform calculului DFT

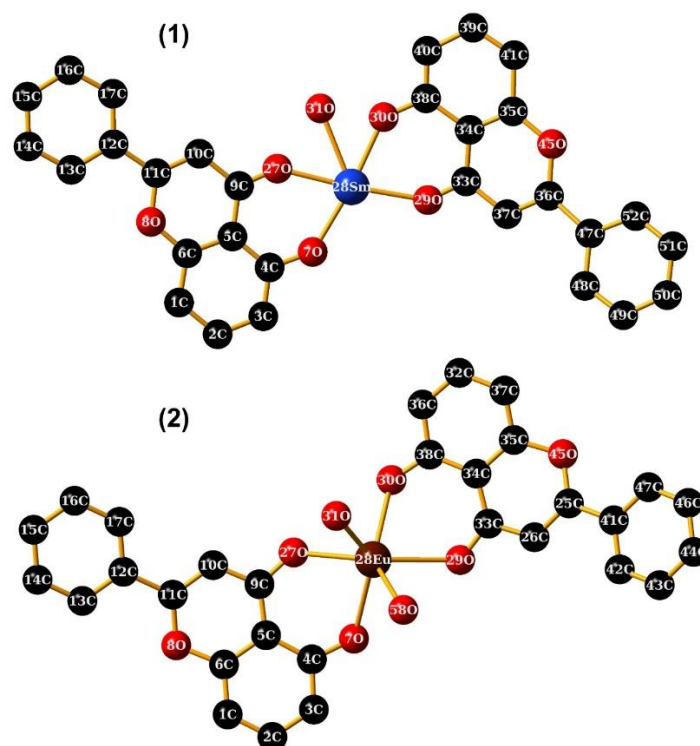


Fig.6. Structurile optimizate ale complexelor (1) și (2) în stare electronică fundamentală la nivelul de teorie B3LYP, folosind seturile de funcții 6-31G(d) pentru atomii de C și H, 6-31G+(d,p) pentru atomii de O, respectiv MWB28 pentru Sm și Eu)

Studii de interacțiune *in vitro* cu ADN

Spectroscopie UV-Vis

Pentru a explora mecanismul de interacțiune a complexelor Ln(III) cu ADN-ul dublu catenar, a fost efectuată titrarea spectrofotometrică a acestora în prezența ADN extras din timus de vițel (CT-ADN). Am urmărit modificările apărute în spectrele înregistrate în urma adăugării compușilor în mediul de reacție, cum ar fi deplasările hipso-, bato-, hipo- sau hiper- crome. Aceste deplasări sunt considerate în mod obișnuit dovezi ale interacțiunilor compușilor testați cu ADN [27].

Legarea într-o manieră neintercalantă duce, în general, la deplasări hiperchrome datorate perturbațiilor majore induse în structura ADN-ului dublu catenar. Dimpotrivă, în cazul unui mecanism de intercalare se

observă, în general, deplasări hipocrome și batocrome, datorită interacțiunilor π - π^* stacking puternice între un fragment aromatic al ligandului și perechile de nucleotide ADN.

După adăugarea unor concentrații crescătoare de ADN, în spectrele UV ale complexelor (2) – (4), banda centrată la ~ 273 nm prezintă un efect hipocrom semnificativ de $\sim 40\%$ (Fig.7.), ceea ce sugerează legarea puternică de CT-ADN, posibil prin intercalare [28]. Mai mult, în ceea ce privește caracteristicile spectrale generale, se remarcă un comportament omogen pentru complexii (2) – (4). Sunt de așteptat, prin urmare, moduri de legare similare cu CT-ADN.

Pentru cuantificarea interacțiunii complexelor cu ADN, a fost calculată constanta intrinsecă de legare. În acest sens, a fost folosită următoarea ecuație [33]:

$$\frac{[DNA]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[DNA]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b} \times \frac{1}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} \quad \text{Ecuția I}$$

unde: [ADN] este concentrația de ADN în perechi de baze și ε_a , ε_f , ε_b corespund, respectiv, coeficienților de absorbție aparentă $A_{obs}/[M]$ ([M] se referă la concentrația compusului), coeficientul de extincție pentru complexul liber și coeficientul de extincție al complexului atunci când este complet legat de ADN. Datele obținute prin plotarea datelor și prelucrarea ecuațiilor dreptelor rezultate sunt incluse în tabelul 5.

Tabel II.5. Constantele de legare de CT-DNA pentru complexii (2), (3), (4)

Compus	K_b (M^{-1})	R^2
(2)	$3,63 \times 10^4$	0,9919
(3)	$3,92 \times 10^4$	0,9908
(4)	$7,79 \times 10^4$	0,9955

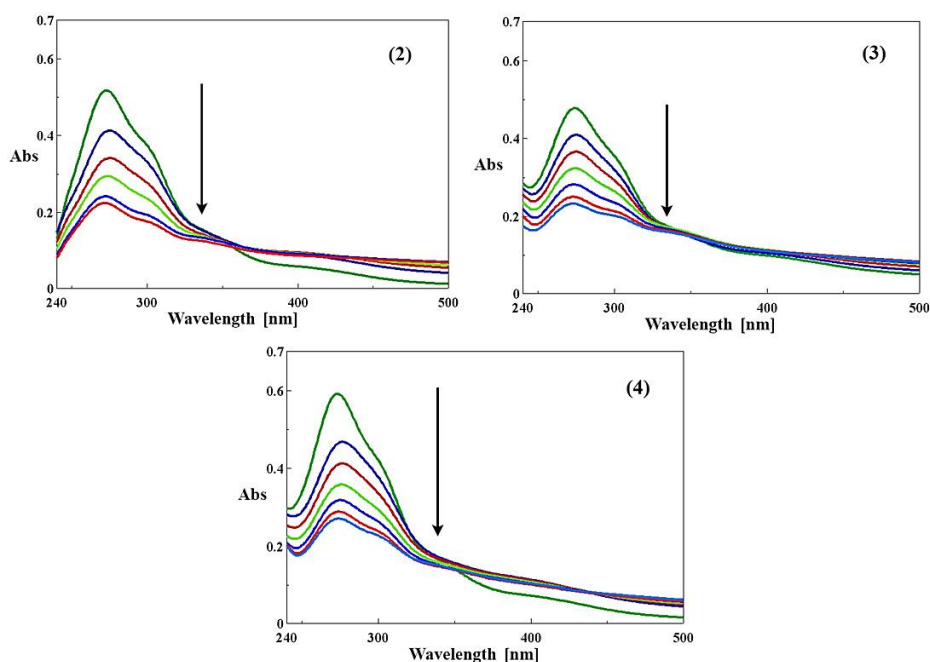


Fig.7. Spectrele de absorbție ale complexelor (2), (3), (4) în absența și prezența unor concentrații crescătoare de ADN [complex] = 15 μ M; [ADN] = 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 μ M. În spectrul complexului (2) nu a fost introdusă concentrația de 20 μ M, care a fost scoasă și din calcule. Săgețile indică scăderea absorbăanței, odată cu creșterea concentrației de ADN

Interacția ligandului și a complexelor cu ADN a fost testată și în condițiile în care a fost păstrată constantă concentrația de ADN (15 μ M), iar concentrația compușilor a variat în intervalul 0 – 30 μ M. Se observă deplasări hiperocrome și batocrome ale maximumului de absorbție al ADN la 260 nm.

Pentru cuantificarea rezultatelor obținute în cadrul acestui experiment am folosit următoarea ecuație:

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\varepsilon_c}{\varepsilon_{DNA-c} - \varepsilon_c} - \frac{\varepsilon_c}{\varepsilon_{DNA-c} - \varepsilon_c} \times \frac{1}{K[Q]}, \quad \text{Ecuția II}$$

unde A_0 și A reprezintă absorbanțele înregistrate pentru o soluție de CT-ADN în absența și, respectiv, prezența ligandului și complexilor (2), (3), (4) la diferite concentrații, la $\lambda_{\max} = 258$ nm; ϵ_c și ϵ_{DNA-c} sunt coeficienții de absorbție pentru compușii testați și, respective pentru sistemele ADN - compus. Din ecuația dreptei au fost calculate constantele de legare (ca raport a/b) pentru 5-HOF și complexii (2), (3), (4) sunt prezentate în **Tabel II.6**.

Tabel II.6. Constantele de legare pentru 5-HOF și complexii (2), (3), (4) de CT-DNA

Compus	K_b (M^{-1})	R^2
5-HOF	$1,47 \times 10^4$	0,9999
(2)	$2,73 \times 10^4$	0,9940
(3)	$2,93 \times 10^4$	0,9934
(4)	$3,85 \times 10^4$	0,9981

Se remarcă afinitățile de legare ale complexilor de CT-ADN mai mari decât cea a ligandului, în ordinea: **5-HOF** < (2) < (3) < (4). De asemenea, se observă valorile apropiate ale constantelor de legare, ceea ce indică pentru cei trei complecși un comportament omogen și probabil același mecanism de interacțiune cu ADN.

Spectroscopie de fluorescență; studii de legare competitivă cu bromura de etidiu

Bromura de etidiu (bromură de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridină, EB) este un colorant cu proprietăți fluorescente, care conține un rest fenantridinic, planar. Datorită intercalării acestui inel planar între perechile de baze adiacente din structura ADN-ului dublu elicoidal, EB are o emisie fluorescentă intensă, după formarea unui complex EB - ADN. De aceea, o soluție CT-ADN la care a fost adăugată EB (2 μ M EB + 10 μ M DNA) a fost utilizat ca probă spectrală.

Când complexii metalici se leagă de sistemul EB - ADN, se înregistrează o scădere a intensității emisiei fluorescente (un efect de stingere a fluorescenței). Variația intensității emisiei de fluorescență oferă unele informații cu privire la afinitatea de legare a compușilor de ADN. De obicei, indică existența unor interacțiuni de tip intercalare între perechile de baze azotate din structura ADN-ului.

Datele obținute din studiile de legare competitivă au fost reprezentate grafic după ecuația Stern-Volmer clasică [34]:

$$I_0/I = 1 + K_{sv} \cdot [Q] \quad \text{Ecuația III}$$

unde I_0 și I reprezintă intensitățile fluorescenței în absența și prezența compușilor testați la diferite concentrații; $[Q]$ este concentrația compusului. K_{sv} este constanta Stern-Volmer.

Valoarea K_{sv} este calculată ca pantă a dreptei de regresie rezultate în urma reprezentării grafice a I_0/I (axa y) versus $[Q]$ (axa x) (**Tabel II.7**). Întrucât valorile K_{sv} obținute pentru 5-HOF și complecși sunt relativ mari, se confirmă presupunerea unui mecanism de intercalare între bazele azotate din structura ADN-ului dublu catenar.

Spectrele de emisie ale complexului EB - ADN în absența și în prezența unor concentrații crescătoare de ligand și complex (2) sunt prezentate în **Fig.8**. Curbele de stingere a fluorescenței indică legarea complexilor cu afinități mai mari decât ligandul, în ordinea: **5-HOF** < (4) < (2) < (3).

Tabel II.7. Valorile constantelor Stern-Volmer calculate în urma interacției între compușii testați și complexul CT-ADN-EB

Compus	K_{sv} (M^{-1})	R^2
5-HOF	$2,89 \times 10^4$	0,9928
(2)	$1,73 \times 10^5$	0,9959
(3)	$4,13 \times 10^5$	0,9941
(4)	$1,39 \times 10^5$	0,9902

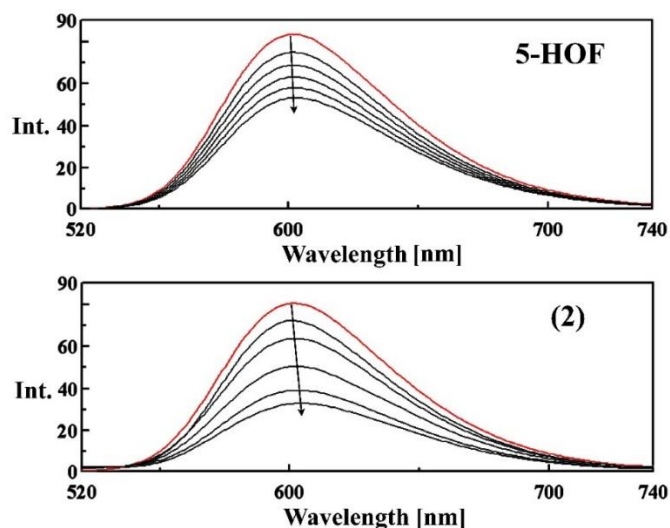


Fig.8. Spectrele de fluorescență ale complexului EB-ADN în absența (linia roșie) și în prezența (liniile negre) unor concentrații crescătoare de 5-HOF și, respectiv, complecși (2) – (4). $\lambda_{\text{exc}} = 500$ nm, $[\text{EB}] = 2 \mu\text{M}$, $[\text{ADN}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{compus}] = 10, 15, 20, 25, 30 \mu\text{M}$. Săgețile indică scăderea intensității fluorescenței, odată cu creșterea concentrației de compus

Studii de interacțiune *in vitro* cu albumina serică umană și transferina. Studii de stingere a intensității fluorescenței resturilor Trp din structura proteinelor

În cazul Tf, resturile de aminoacizi Trp, tirozină (Tyr) și fenilalanină (Phe), prezintă fluorescență intrinsecă, în funcție de lungimea de undă de excitație. Atunci când $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm, emisia fluorescență a triptofanului este dominantă [35]. Spectrele de emisie pentru sistemele HSA și Tf în absența și în prezența 5-HOF și a complecșilor (1) - (4) sunt prezentate în **Fig.II.2.26-28.** (pentru HSA) și, respectiv, în **Fig.II.2.29-31.** (pentru Tf). Experimentele au fost efectuate la pH = 7,4 în amestec tampon Tris-HCl la 3 temperaturi diferite, și anume: 299, 308, 318 K, pentru a putea calcula parametrii termodinamici (ΔH , ΔS , ΔG). Intensitatea benzii largi de emisie scade după adăugarea celor cinci compuși testați în concentrații crescătoare; lungimea de undă maximă de emisie a HSA prezintă o deplasare hipsocromă de până la 9 nm. Acest efect hipsocrom indică faptul că micromediul în jurul Trp a fost perturbat, că acesta este situat într-un mediu mai hidrofob, devenind mai puțin expus la solvent [36].

O ecuație Stern-Volmer modificată a fost utilizată pentru analiza rezultatelor obținute în urma experimentelor efectuate [37]:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_{sv} [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad \text{Ecuația IV}$$

unde F_0 și F sunt intensitățile relative de fluorescență pentru HSA și Tf, în absența și în prezența compușilor testați, respectiv, f_a este fracția de fluorofor accesibilă agentului de stingere a fluorescenței, $[Q]$ este concentrația compusului testat și K_{sv} este constanta Stern-Volmer. Curbele rezultate, reprezentate în **Fig.II.9.** (pentru HSA) prezintă relații liniare bune. Prin urmare, parametrul K_{sv} a fost calculat ca raport între pantă și intersecția cu axa y, în graficul $F_0/(F_0 - F)$ (axa y) versus $1/[Q]$ (axa x).

$$K_{sv} = K_q \tau_0 \quad \text{Ecuația V}$$

unde K_q este constanta bimoleculară de stingere a fluorescenței și τ_0 este timpul de viață al fluoroforului în absența unui agent de stingere a fluorescenței.

Valorile constantelor Stern-Volmer (K_{sv} , M^{-1}) și ale constantelor bimoleculare de stingere a fluorescenței (K_q , $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) pentru ligand și complecși sunt prezentate în **Tabelul II.8.** (HSA) și **Tabelul II.10.** (Tf). Aceste valori sugerează o bună afinitate de legare a compușilor testați de HSA și Tf. Valorile K_q ($> 10^{11} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) indică existența unui mecanism de stingere a fluorescenței static [38].

Următoarea ecuație a fost utilizată pentru a determina K_a și n , unde K_a este constanta de legare și n reprezintă numărul de situsuri de legare [39]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg [Q] \quad \text{Ecuția VI}$$

Valorile K_a și n obținute pe baza ecuației VI sunt prezentate în **tabelele II.8 și II.10.**, coloanele 7,8. Pentru confirmarea mecanismului static de stingere a fluorescenței a fost utilizată ecuația Scatchard [40]:

$$\frac{\Delta I/I_0}{[Q]} = nK - K \left(\frac{\Delta I}{I_0} \right) \quad \text{Ecuția VII}$$

unde n este numărul de situsuri de legare per moleculă de proteină și K este constanta de afinitate (M^{-1}), calculată ca panta dreptei $(\Delta I/I_0)/[Q]$ (axa y) versus $(\Delta I/I_0)$ (axa x) și n este calculat ca raport între intersecția cu axa y și panta dreptei.

Valorile K și n obținute pe baza ecuației VII sunt incluse în **tabelele II.8. și II.10.**, coloanele 3,4.

Temperatura nu a variat într-un interval larg, deci variația entalpiei poate fi considerată ca fiind constantă și ecuația van't Hoff poate fi folosită pentru a estima parametrii termodinamici:

$$\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad \text{Ecuția VIII}$$

unde K_a este constanta de legare la temperatura corespunzătoare, ΔH este variația entalpiei, R este constanta gazelor și ΔS este variația de entropie. Valorile ΔS și ΔH au fost obținute din panta și intersecția cu axa y din ecuația dreptei corespunzătoare reprezentării grafice a $\ln K$ (axa y) versus $1/T$ (axa x). Variația energiei libere (ΔG) poate fi calculată din următoarea relație:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad \text{Ecuția IX}$$

Valorile negative ale ΔG (**Tabel II.9, Tabel II.11.**) indică faptul că procesele de legare ale compușilor de HSA și Tf decurg în mod spontan. Mai mult, din moment ce atât valorile ΔH și ΔS sunt negative pentru toți compușii testați, legăturile de hidrogen sau forțele van der Waals joacă, cel mai probabil, un rol important în interacțiunile dintre compuși și proteine [41].

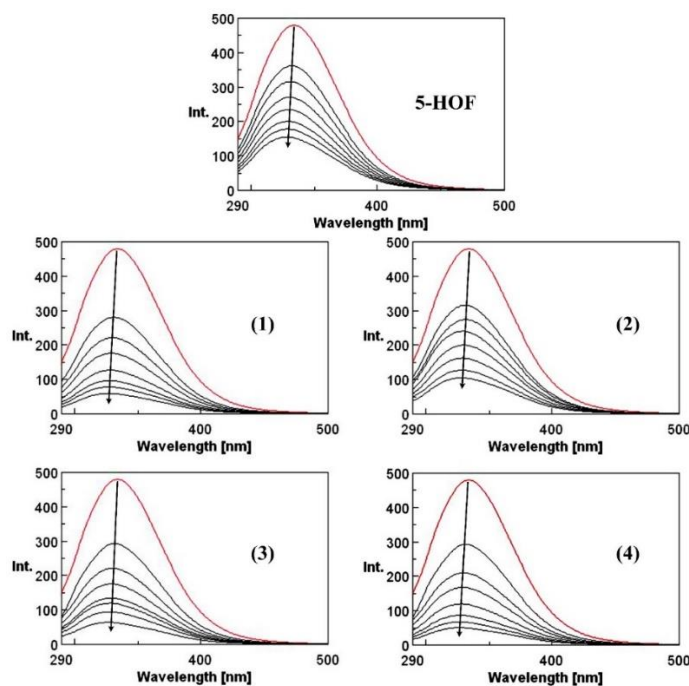


Fig.9. Spectrele de fluorescență ale HSA în prezența unor concentrații crescătoare de 5-hidroxi flavonă și, respectiv, complecși (1) – (4) la 299 K

Tabel II.8. Constantele și numărul situsurilor de legare ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu HSA

Compus	T (K)	K (M ⁻¹)	n	K _{sv} (M ⁻¹)	K _q (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	K _a (M ⁻¹)	n
5-HOF	299	2,61×10 ⁴	1,31	4,64×10 ³	4,64×10 ¹¹	1,51×10 ⁶	1,32
	308	4,42×10 ⁴	1,19	8,30×10 ³	8,30×10 ¹¹	9,18×10 ⁵	1,27
	318	6,12×10 ⁴	1,15	1,50×10 ⁴	1,50×10 ¹²	4,84×10 ⁵	1,20
(1)	299	6,86×10 ⁴	1,50	8,32×10 ⁴	8,32×10 ¹²	5,93×10 ⁵	1,16
	308	7,32×10 ⁴	1,39	8,82×10 ⁴	8,82×10 ¹²	3,01×10 ⁵	1,09
	318	1,29×10 ⁵	1,28	9,31×10 ⁴	9,31×10 ¹²	1,70×10 ⁵	1,04
(2)	299	5,56×10 ⁴	1,51	3,02×10 ⁴	3,02×10 ¹²	9,75×10 ⁵	1,25
	308	8,25×10 ⁴	1,31	3,58×10 ⁴	3,58×10 ¹²	6,29×10 ⁵	1,21
	318	9,86×10 ⁴	1,24	3,96×10 ⁴	3,93×10 ¹²	3,59×10 ⁵	0,14
(3)	299	5,29×10 ⁴	1,42	3,84×10 ⁴	3,84×10 ¹²	3,82×10 ⁵	1,14
	308	8,66×10 ⁴	1,38	9,05×10 ⁴	9,05×10 ¹²	2,53×10 ⁵	1,09
	318	1,35×10 ⁵	1,26	1,08×10 ⁵	1,08×10 ¹³	1,37×10 ⁵	1,01
(4)	299	6,36×10 ⁴	1,59	7,29×10 ⁴	7,29×10 ¹²	1,29×10 ⁶	1,23
	308	7,22×10 ⁴	1,42	8,19×10 ⁴	8,19×10 ¹²	5,21×10 ⁵	1,14
	318	1,76×10 ⁵	1,19	1,01×10 ⁵	1,01×10 ¹³	1,59×10 ⁵	1,02

Tabel II.9. Parametrii termodinamici ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu HSA

Compus	T (K)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)
5-HOF	299			-35,42
	308	-47,51	-40,44	-35,05
	318			-34,65
(1)	299			-32,99
	308	-51,81	-62,94	-32,42
	318			-31,80
(2)	299			-34,33
	308	-41,62	-24,39	-34,11
	318			-33,86
(3)	299			-32,03
	308	-42,80	-36,02	-31,71
	318			-31,35
(4)	299			-35,08
	308	-87,29	-174,60	-33,51
	318			-31,77

Tabel II.10. Constantele și numărul situsurilor de legare ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu Tf

Compus	T (K)	K (M ⁻¹)	n	K _{sv} (M ⁻¹)	K _q (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	K _a (M ⁻¹)	n
5-HOF	299	2,30×10 ⁴	1,35	6,57×10 ³	2,63×10 ¹²	2,53×10 ⁵	1,21
	308	4,49×10 ⁴	1,21	3,16×10 ⁴	1,26×10 ¹³	8,91×10 ⁴	1,09
	318	5,35×10 ⁴	1,18	6,22×10 ⁴	2,49×10 ¹³	3,17×10 ⁴	0,99
(1)	299	2,72×10 ⁴	1,77	8,93×10 ²	3,57×10 ¹¹	1,65×10 ⁷	1,51
	308	3,66×10 ⁴	1,52	5,43×10 ³	2,17×10 ¹²	8,16×10 ⁶	1,44
	318	4,59×10 ⁴	1,39	2,8 × 10 ⁴	1,12×10 ¹³	3,53×10 ⁶	1,35
(2)	299	3,61×10 ³	1,45	4,76×10 ³	1,90×10 ¹²	9,73×10 ⁷	1,63
	308	5,71×10 ³	1,26	7,49×10 ³	2,99×10 ¹²	5,41×10 ⁷	1,58
	318	2,93×10 ⁴	1,13	1,84×10 ⁴	7,36×10 ¹²	2,71×10 ⁷	1,51
(3)	299	1,46×10 ³	1,48	1,08×10 ³	3,60×10 ¹¹	1,42×10 ⁷	1,52
	308	8,71×10 ³	1,36	7,15×10 ³	2,86×10 ¹²	5,38×10 ⁶	1,42
	318	3,15×10 ⁴	1,20	1,51×10 ⁴	6,04×10 ¹²	2,10×10 ⁶	1,33
(4)	299	1,46×10 ⁴	1,77	1,10×10 ²	4,40×10 ¹⁰	6,30×10 ⁷	1,61
	308	1,53×10 ⁴	1,68	1,35×10 ³	5,40×10 ¹¹	3,47×10 ⁷	1,55
	318	1,65×10 ⁴	1,46	1,56×10 ⁴	6,25×10 ¹²	1,66×10 ⁷	1,47

Tabel II.11. Parametrii termodinamici ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu Tf

Compus	T (K)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)
5-HOF	299			-30,89
	308	-86,36	-185,46	-30,29
	318			-29,62
(1)	299			-41,35
	308	-64,16	-76,29	-40,66
	318			-39,90
(2)	299			-45,76
	308	-53,12	-24,39	-45,54
	318			-45,29
(3)	299			-40,91
	308	-79,45	-128,91	-39,75
	318			-38,46
(4)	299			-44,68
	308	-55,53	-36,26	-44,36
	318			-43,99

Modificări conformaționale ale Tf induse de interacțiunea cu compușii testați

Conformația unei proteine, în ceea ce privește structurile secundare sau terțiare poate fi modificată în urma interacțiunii cu unele molecule de dimensiuni mici. Spectrele sincron de fluorescență aduc informații despre împrejurimile moleculare ale proteinelor. Un avantaj major al acestei metode, comparativ cu spectrele convenționale de emisie constă în sensibilitatea crescută a metodei de detecție a celor mai mici variații ale benzilor de absorbție și/sau emisie. Acest lucru îmbunătățește rezoluția spectrală, facilitând astfel analiza perturbațiilor structurale minore [41-43].

Spectrele sincron urmăresc modificările apărute în cazul emisiilor datorate resturilor de tirozină și triptofan din structura transferinei, atunci când intervalul de lungimi de undă ($\Delta\lambda$) între excitație și emisie este setat la 15 nm sau 60 nm. **Fig.10.** prezintă spectrele sincron ale Tf în absența și prezența unor concentrații

diferite ale compușilor testați. S-a observat că λ_{max} a tirozinei nu se deplasează, în timp ce maximul emisiei triptofanului înregistrează deplasări batocrome de până la 12 nm după adăugarea compușilor. Acest lucru indică apariția unor modificări conformaționale ale Tf în jurul resturilor triptofan, creșterea polarității în jurul acestei regiuni și scăderea caracterului hidrofob (restul Trp devine mai expus la moleculele de solvent) [42].

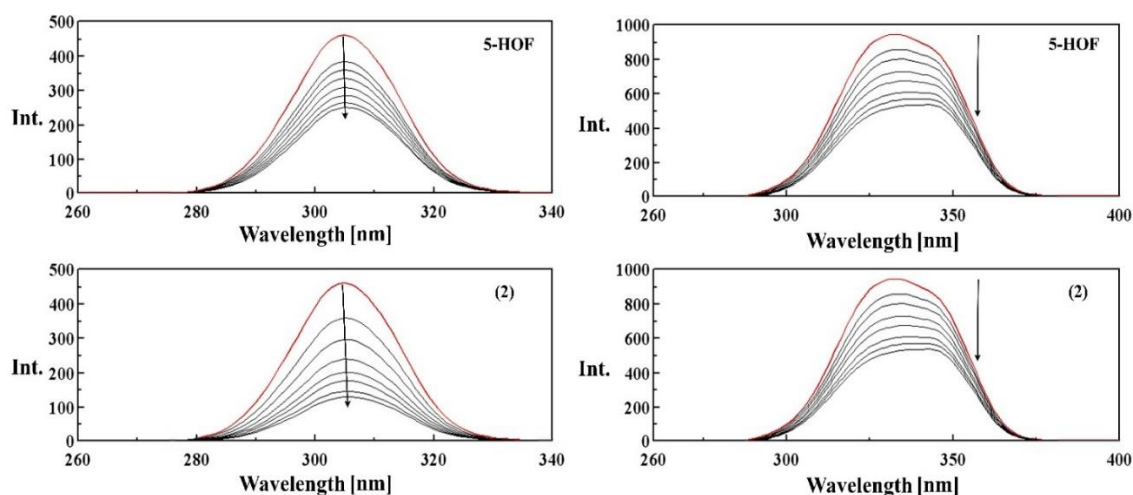


Fig.10. Spectrele sincron de fluorescență pentru 5-HOF și complexul (2), la $\Delta\lambda = 15$ nm (stânga) și 60 nm (dreapta). [Tf] = 10 μM , pH = 7,4; [Compus] = 0; 5; 7.5; 10; 12.5; 15; 17,5; 20 μM . Săgețile indică scăderea intensității fluorescenței odată cu creșterea concentrației compușilor

Testarea preliminară a activității biologice a combinațiilor complexe sintetizate. Screening-ul calitativ al acțiunii antimicrobiene

În etapa de screening au fost testate prin metoda disc-difuzimetrică cele patru noi combinații complexe asupra unor tulpini bacteriene Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Pentru aceasta, a fost utilizată metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, pe mediu de agar Muller-Hinton. Testele au fost efectuate în plăci Petri. Combinațiile complexe au fost dizolvate în DMSO (10 mg/mL), iar din soluția stoc s-au preparat diluții, utilizate apoi pentru testele ulterioare. Complecșii nu prezintă activitate antimicrobiană asupra tulpinilor bacteriene testate.

II.2. Combinații complexe ale unor ioni trivalenți de lantanide cu liganzii 5-hidroxi flavonă și 1,10 – fenantrolină în raport molar 1:1:1

Introducere

Complexarea cu liganzi care conțin azot, cum ar fi fenantrolina și tetraciclina îmbunătățește fluorescența ionilor lantanidelor, cu accent pe Tb^{3+} sau Eu^{3+} prin creșterea rigidității și stabilității combinațiilor complexe [44]. Mai mult, 1,10-fenantrolina (**Fig.11.**) a fost aleasă pentru seria de complecși micști ca al doilea ligand, deoarece studiile anterioare au raportat creșterea activității antitumorale sau a afinității pentru ADN în complecșii care conțin 1,10-fenantrolină ca ligand [44-46].

Complecșii cu liganzi micști ai lantanidelor Sm(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III) au fost proiectați pentru a asigura livrarea țintită și stabilitatea în organism până la penetrarea celulelor țintă, afinitate față de acizii nucleici, interacțiunea minimă cu celulele normale și efecte secundare minime.

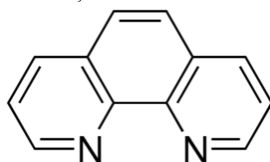
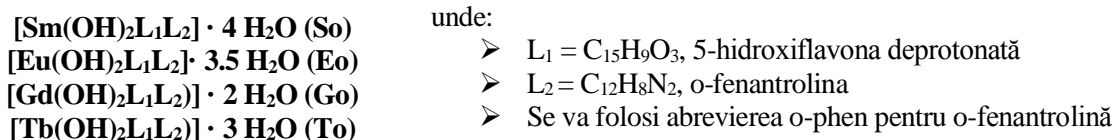


Fig.11. Structura 1,10-fenantrolinei (o-fenantrolina)

Sinteza combinațiilor complexe

Pentru deprotonarea ligandului 5-hidroxi flavonă s-a folosit trietilamină (TEA). Sinteza a fost efectuată în mediu etanolic, în prezența 5-hidroxi flavonei deprotonate, a 1,10-fenantrolinei și a sării de lantanid prin încălzire la reflux. pH-ul a fost menținut la 6-7 pe durata întregii sinteze. Raportul molar utilizat în cazul sintezei complecșilor micști cu ionii lantanidelor Sm(III), Eu(III), Gd(III) și Tb(III) a fost de 1:1:1 (ion metallic: 5-hidroxi flavonă:o-fenantrolină).

Am atribuit celor patru complecși următoarele formule abreviate și coduri, care vor fi utilizate în această lucrare, după cum urmează:



Caracterizarea fizico-chimică a complecșilor

Spectrele în infraroșu cu transformată Fourier

Benzile spectrale majore în IR ale complecșilor sunt prezentate în **tabelul II.12**. Diferențele între spectrele IR ale liganzilor și cele ale complecșilor confirmă legarea ionului metallic la grupările chelatoare ale 1,10-fenantrolinei și 5-hidroxi flavonei (discuțiile au fost prezentate în capitolul anterior și nu vor fi reluate). Spectrele IR ale combinațiilor complexe (**2**) – (**4**) conțin o bandă intensă, largă, între 2600 – 3600 cm^{-1} , atribuită prezenței unor molecule de apă de hidratare și/sau coordinare în structura complecșilor. În spectrele complecșilor, prezența vibrațiilor de întindere $\nu(M-O)$ la ~ 500 , respectiv 417 cm^{-1} indică legarea ionului metallic, deoarece spectrele liganzilor nu prezintă această bandă [21,22].

Spectrele IR ale complecșilor confirmă prezența fenantrolinei coordonate; se observă deplasări în spectrul ligandului, în special în cazul benzilor puternice din regiunea 1400-1650 cm^{-1} (corespunzătoare vibrațiilor de întindere $\nu(C=C) + \nu(C-N)$) și vibrațiilor de deformare în afara planului ale hidrogenului fenantrolinei libere la 730 cm^{-1} sunt modificate în urma coordonării. O bandă în spectrul o-phen libere la cca. 413 \pm 2 cm^{-1} este deplasată la frecvențe mai mari (~ 417 cm^{-1}) în urma complexării, ceea ce sugerează că ambii atomi de azot sunt legați de ionii lantanidelor [47].

Tabel II.12. Benzile spectrale majore în IR (cm⁻¹) ale complexelor și atribuirile corespunzătoare

Compus Bandă	Compus			
	So	Eo	Go	To
$\nu(\text{OH})$	3600-2600(l,m)	3600-2600(l,m)	3600-2600(l,m)	3600-2600(l,m)
$\nu(\text{C=O})$	1630(i)	1630(i)	1637(i)	1632(i)
$\nu(\text{C=C})$	1578(i)	1578(i)	1578(i)	1578(i)
$\nu(\text{C-O}) + \delta(\text{O-H})$	1345(m)	1346(m)	1347(m)	1347(m)
$\nu(\text{C-O-C})$	1253(m)	1253(m)	1253(m)	1253(m)
$\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C-N})$	1540(i)	1541(i)	1541(i)	1541(i)
$\nu(\text{C-N})$	1518(m)	1518(m)	1518(m)	1517(m)
$\nu(\text{C-N})$	1495(m)	1496(m)	1496(m)	1496(m)
$\rho(\text{C-H})$	729(m)	731(m)	728(m)	735(m)
$\nu(\text{M-O})$	506(m)	508(m)	509(m)	509(m)
$\nu(\text{M-N})$	418(s)	417(s)	418(s)	418(s)

i = intens; m = mediu; l = larg; s = slab

Spectre electronice

Spectrele electronice au fost înregistrate prin tehnica spectrală de reflectanță difuză, în domeniul 200 - 900 nm. Au fost apoi interpretate pe baza informațiilor din literatură. A fost realizată o comparație a spectrelor combinațiilor complexe **So**, **Eo**, **Go**, **To** cu spectrele liganzilor pentru a confirma legarea ionilor metalici de 5-hidroxi flavonă, respectiv o-fenantrolină.

În spectrele complexelor se observă deplasări batocrome ale benzilor de absorbție I ($\Delta\lambda \sim 20 - 25$ nm) și II ($\Delta\lambda \sim 6 - 7$ nm), care pot fi legate de extinderea sistemului conjugat al 5-HOF în urma coordonării ionului metallic [32]. Deplasarea mai pronunțată a benzii I în comparație cu seria de complecși 1:2 este probabil datorată prezenței o-phen. Umărul care apare la 340 nm în spectrul electronic al 5-HOF, este însoțit de o deplasare hipsocromă ($\Delta\lambda \sim 10 - 13$ nm). Se observă o lărgire a benzii spectrale I ca urmare a suprapunerii acesteia cu banda de transfer de sarcină metal-ligand (LMCT).

Datele din spectrele UV-Vis ale ligandului și complexelor sunt prezentate în **tabelul II.13**.

Tabel II.13. Atribuirea benzilor din spectrele UV-Vis pentru liganzi și complecși

Compus	λ_{max} (nm)		Banda II
	Banda I		
5-HOF	385	340	255
o-phen		330	256
So	405	330	261
Eo	408	327	261
Go	410	330	262

Spectre de fluorescență

Spectrele de emisie fluorescentă (**Fig.12.**) au fost înregistrate pe probe solide. Intensitatea fluorescenței crește considerabil în urma complexării, fapt atribuit inhibării transferului intramolecular de protoni între grupările hidroxil și cetonă din structura ligandului, în urma formării unui inel chelat între atomii de O ai grupărilor chelatoformatoare și ionii metalici. Complexul Go prezintă proprietăți fluorescente remarcabile la $\lambda_{\text{em}}=554$ nm ($\lambda_{\text{ex}}=430$ nm). 5-HOF nu prezintă emisie fluorescentă în aceste condiții, iar în cazul o-phen, emisia fluorescentă depășește limita maximă de înregistrare a aparatului.

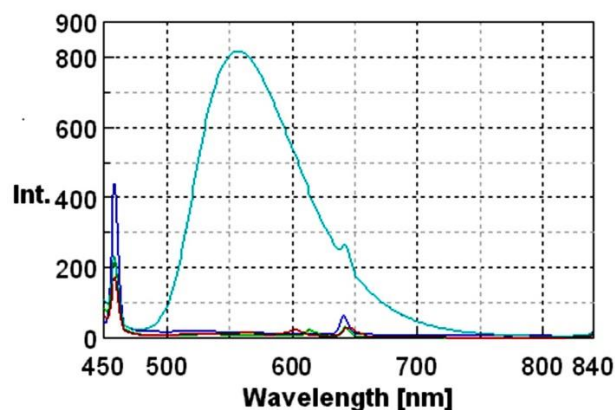


Fig.12. Spectrele de fluorescență ale complexelor So, Eo, Go, To la $\lambda_{ex}=430$ nm

Spectrele de masă

Pentru toți complexii spectrele au fost în acord cu abundența izotopică naturală corespunzătoare lantanidelor implicate. Semnalele corespunzătoare ionilor pseudomoleculari rezultați prin protonare, obținuți pentru combinațiile complexe, sunt prezentate în **tabelul II.14.**, coloana 6. Pe lângă ionii pseudomoleculari, în spectrele de masă apar specii obținute prin eliminarea unei molecule de 5-HOF, respectiv o-phen (**Tabel II.14.**, coloanele 4, 5). Acestea se formează în urma coliziunii cu particulele de azot a ionilor pseudomoleculari protonați și dau semnale intense în spectrele de masă. Prezența 5-HOF este confirmată prin picul $m/z = 239$ (corespunzător ligandului protonat), prezent în spectrele de masă ale tuturor celor trei complexe. Picul corespunzător la $m/z = 181$ apare în spectrele tuturor complexelor și aparține ligandului o-phen protonat. Formulele fragmentelor ionice au fost atribuite prin compararea maselor moleculare ale complexelor cu valorile m/z identificate în spectrul de masă. Toate datele obținute prin spectrometrie de masă confirmă faptul că acești compuși au un raport molar ion metalic : 5-HOF : o-phen de 1:1:1.

Tabel II.14. Valori nominale m/z ale fragmentelor ionice observate în spectrele de masă ale complexelor

Complex	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic
So	181 [L ₂ +H] ⁺	239 [L ₁ +H] ⁺	366 [¹⁵² SmL ₂ (OH) ₂] ⁺	424 [¹⁵² SmL ₁ (OH)] ⁺	606 [¹⁵⁴ SmL ₁ L ₂ (OH)(H ₂ O)] ⁺
Eo	181 [L ₂ +H] ⁺	239 [L ₁ +H] ⁺	367 [¹⁵³ EuL ₂ (OH) ₂] ⁺	425 [¹⁵³ EuL ₁ (OH)] ⁺	605 [¹⁵³ EuL ₁ L ₂ (OH)(H ₂ O)] ⁺
Go	181 [L ₂ +H] ⁺	239 [L ₁ +H] ⁺	-	431 [¹⁶⁰ GdL ₁ (OH)] ⁺	609 [¹⁵⁷ GdL ₁ L ₂ (OH)(H ₂ O)] ⁺ 610 [¹⁵⁸ GdL ₁ L ₂ (OH)(H ₂ O)] ⁺ 612 [¹⁶⁰ GdL ₁ L ₂ (OH)(H ₂ O)] ⁺
To	181 [L ₂ +H] ⁺	239 [L ₁ +H] ⁺	372 [¹⁵⁹ TbL ₂ (OH) ₂] ⁺	430 [¹⁵⁹ TbL ₁ (OH)] ⁺	611 [¹⁵⁹ TbL ₁ L ₂ (OH)(H ₂ O)] ⁺

Analiza termogravimetrică

Comportamentul termic al celor trei noi complexe a fost investigat prin analiză simultană TG/DTA. Datele obținute sunt prezentate pe scurt în **tabelul II.15.** și vor fi discutate în cele ce urmează.

Toți compușii pierd moleculele de apă într-o primă etapă endotermă neunitară. Dată fiind temperatura finală a acestei etape (<170°C), cel mai probabil, moleculele de apă nu sunt coordonate. Urmează o a doua etapă, nu foarte bine delimitată, în care are loc pierderea moleculei de fenantrolină coordinată. Și această etapă este endotermă, fapt ce arată că procesul constă mai degrabă în ruperea de legături chimice decât în degradare oxidativă. Ultimele etape sunt exoterme, constând în arderea restului organic, reziduul final fiind oxidul metalic cel mai stabil: Ln₂O₃ pentru Sm, Eu și Gd sau Tb₄O₇.

Tabel II.15. Rezultatele analizei termice (în aer) pentru complexii So – To

Complex	Etapă	Efect termic	Interval de temperatură (°C)	$\Delta m_{\text{exp}} (\%)$	$\Delta m_{\text{calc}} (\%)$	Procesul chimic
So	1	Endoterm	65-160	10,72	10,69	- 4 H ₂ O
	2	Exoterm	160-445	26,59	26,74	- o-phen
	3	Exoterm	445-900	36,78	36,70	Degradare oxidativă
			Reziduu (Sm ₂ O ₃)	25,91	25,87	
Eo	1	Endoterm	60-165	9,58	9,46	- 3,5 H ₂ O
	2	Endoterm	165-430	26,95	27,04	- o-phen
	3	Exoterm	430-900	36,91	37,10	Degradare oxidativă
			Reziduu (Eu ₂ O ₃)	26,56	26,40	
Go	1	Endoterm	65-155	5,10	5,59	- 2 H ₂ O
	2	Exoterm	155-410	27,76	27,95	- o-phen
	3	Exoterm	410-900	38,82	38,35	Degradare oxidativă
			Reziduu (Gd ₂ O ₃)	28,32	28,11	
To	1	Endoterm	70-170	8,53	8,13	- 3 H ₂ O
	2	Exoterm	170-430	27,05	27,12	- o-phen
	3	Exoterm	430-900	36,21	36,62	Degradare oxidativă
			Reziduu (Tb ₄ O ₇)	28,21	28,13	

Calculul DFT

Setul de baze split-valență cu funcții de polarizare 6-31G(d) a fost aplicat pentru atomii de carbon și hidrogen. Pentru a oferi o descriere mai bună a interacțiunilor ligand-lantanide, s-au adăugat seturi de bază cu funcții difuze suplimentare pentru atomii de oxigen (6-31 G+(d, p)). Pentru ionii Ln³⁺ au fost utilizate pseudopotențialele cvasi-relativiste Stuttgart-Köln ECP28MWB [30,31].

Geometria complet optimizată a complexului (1) sunt prezentate în **Fig.13**. Sferile de coordonare în jurul centrului metalic în complecși implică următorii atomi: O39, O40, (aparținând 5-hidroxi flavonei deprotonate), N13, N14 (aparținând o-fenantrolinei) și O42, O44 (provenite de la două grupări OH).

O atenție specială a fost acordată conformației ligandului în complecși, aspect relevant pentru proprietățile antioxidante, interacțiunile cu biomacromolecule (de exemplu intercalare între perechile de baze azotate din structura ADN), sau potențialul redox al complecșilor metalici. Rezultatele indică o conformație cvasi-planară a liganzilor în complecși, datorată sistemului conjugat de legături π . Se explică astfel interacțiunea puternică a complecșilor cu ADN, descrisă în continuare.

Unghiurile de legătură O-M-O în complecși sunt ~ 90°, ceea ce indică o geometrie octaedrică a complecșilor. Valorile unghiurilor diedre în jurul ionilor metalici din complecși sunt depărtate de 0° sau 180°, indicând faptul că ionii metalici și atomii de oxigen donori nu se află în același plan.

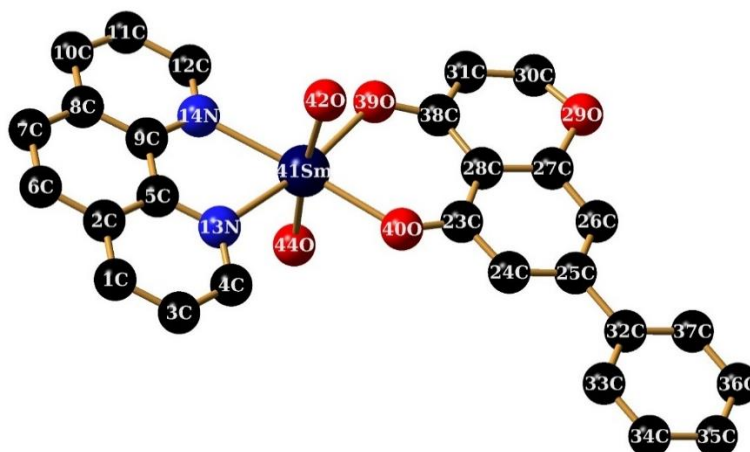


Fig.13. Structura optimizată a complexului **So** în stare electronică fundamentală la nivelul de teorie B3LYP, folosind seturile de funcții 6-31G(d) pentru atomii de C și H, 6-31G+(d,p) pentru atomii de O, respectiv MWB28 pentru Sm

Studii de interacțiune *in vitro* cu ADN

Spectroscopie UV-Vis

După adăugarea unor concentrații crescătoare de ADN, în spectrele UV ale celor trei complecși, banda centrată la ~ 275 nm prezintă un efect hipocrom semnificativ de $\sim 40\%$ (**Fig.14.**), ceea ce sugerează legarea puternică de CT-ADN, posibil prin intercalare [28]. În ceea ce privește caracteristicile spectrale generale, se remarcă un comportament omogen pentru toți cei patru complecși. Sunt de așteptat, prin urmare, moduri de legare similare cu CT-ADN. Ecuația **I** a fost utilizată pentru calculul constantelor de legare de ADN (K_b), prezentate în **tabelul II.16**. Se observă că valorile constantelor de legătură calculate pe baza ecuației **I** pentru cei patru complecși au același ordin de mărime cu 5-HOF (10^4), fiind de altfel foarte apropiate. Afinitățile de legare ale complecșilor în comparație cu ligandul variază în ordinea: **To** < **Eo** < **So** < **5-HOF** < **Go**. De asemenea, se observă valorile apropiate ale constantelor de legare, ceea ce indică pentru cei trei compuși un comportament omogen și probabil același mecanism de interacție cu ADN.

Tabel II.16. Constantele de legare de CT-DNA pentru complecși

Compus	K_b (M^{-1})	R^2
So	$1,37 \times 10^4$	0,9934
Eo	$1,17 \times 10^4$	0,9964
Go	$1,97 \times 10^4$	0,9973
To	$1,05 \times 10^4$	0,9954

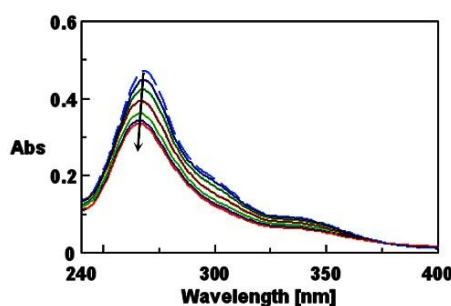


Fig.14. Spectrele de absorbție ale complexului **So** în absența (linia întreruptă) și prezența (liniile continue) unor concentrații crescătoare de ADN; [complex] = 10 μ M; [ADN] = 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 μ M. Săgețile indică scăderea absorbției, odată cu creșterea concentrației de ADN

Spectroscopie de fluorescență; studii de legare competitivă cu bromura de etidiu

Constanta Stern-Volmer, K_{sv} , a fost calculată conform ecuației III ca pantă a dreptei de regresie rezultate în urma reprezentării grafice a I_0/I (axa y) versus $[Q]$ (axa x) (Tabel II.17). Spectrul de emisie al complexului EB - ADN în absența și în prezența unor concentrații crescătoare de complex So este prezentat în Fig.15. Curbele de stingere a fluorescenței indică legarea complexelor de CT-ADN-EB cu afinități mai mari decât ligandul, în ordinea: 5-HOF < To < So < Eo < Go.

Tabel II.17. Valorile constantelor Stern-Volmer calculate în urma interacției între compușii testați și complexul CT-ADN-EB

Complex	K_{sv} (M^{-1})	R^2
So	$1,35 \times 10^4$	0,9902
Eo	$2,01 \times 10^4$	0,9912
Go	$3,38 \times 10^4$	0,9959
To	$1,21 \times 10^4$	0,9962

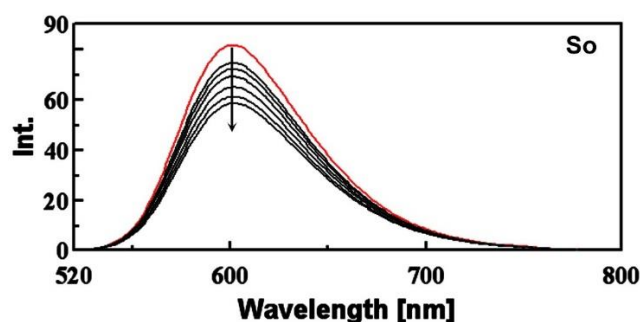


Fig.15. Spectrele de fluorescență ale complexului EB-ADN în absența (linia roșie) și în prezența (liniile negre) unor concentrații crescătoare de complex So. $\lambda_{ex} = 500$ nm, $[EB] = 2 \mu M$, $[ADN] = 10 \mu M$, $[compus] = 5, 10, 15, 20, 25, 30 \mu M$. Săgețile indică scăderea intensității fluorescenței, odată cu creșterea concentrației de compus.

Studii de interacțiune *in vitro* cu albumina serică umană și transferina. Studii de stingere a intensității fluorescenței resturilor Trp din structura proteinelor

Intensitatea benzii largi de emisie scade după adăugarea compușilor testați în concentrații crescătoare. Se observă un efect de stingere a fluorescenței de până la 75% (pentru HSA), respectiv de până la 60% (pentru Tf), ceea ce indică o legare puternică a compușilor de cele două proteine. Nu se observă deplasări ale lungimii de undă de emisie maximă a Tf (~ 330 nm) după adăugarea în sistem a complexelor. Pe de altă parte, lungimea de undă maximă de emisie a HSA prezintă o deplasare hipsocromă de până la 8 nm. Deplasarea hipsocromă indică faptul că restul Trp este situat într-un mediu mai hidrofob, devenind mai puțin expus la moleculele solventului.

În continuare, au fost calculate constantele Stern-Volmer (K_{sv}), constantele bimoleculare de stingere a fluorescenței (K_d), constantele de legare corespunzătoare complexelor (K_a), numărul de situsuri de legare (n) pe baza ecuațiilor IV, V, VI și VII. Valorile pentru variația entalpiei (ΔH), entropiei (ΔS), energiei libere Gibbs (ΔG) pe baza ecuațiilor VIII și IX.

Tabel II.18. Constantele și numărul situsurilor de legare ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu HSA

Compus	T(K)	K _{sv} (M ⁻¹)	K _q (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	K _a (M ⁻¹)	n
So	298	2,39×10 ⁵	2,39×10 ¹³	1,39×10 ⁶	1,13
	308	1,41×10 ⁵	1,41×10 ¹³	3,65×10 ⁶	1,22
	318	0,81×10 ⁵	0,81×10 ¹³	1,51×10 ⁷	1,35
Eo	298	1,76×10 ⁵	1,76×10 ¹³	3,03×10 ⁶	1,20
	308	1,07×10 ⁵	1,07×10 ¹³	7,40×10 ⁶	1,29
	318	1,01×10 ⁵	1,01×10 ¹³	1,48×10 ⁷	1,36
Go	298	2,24×10 ⁵	2,24×10 ¹³	7,94×10 ⁵	1,09
	308	1,95×10 ⁵	1,95×10 ¹³	1,66×10 ⁶	1,16
	318	0,86×10 ⁵	0,86×10 ¹³	4,65×10 ⁶	1,26
To	298	1,79×10 ⁵	1,79×10 ¹³	2,46×10 ⁶	1,18
	308	0,52×10 ⁵	0,52×10 ¹³	1,07×10 ⁷	1,32
	318	0,34×10 ⁵	0,34×10 ¹³	7,38×10 ⁷	1,48

Tabel II.3.11. Parametrii termodinamici ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu HSA

Compus	T(K)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)
So	298			-34,86
	308	93,63	431,16	-39,17
	318			-43,48
Eo	298			-37,05
	308	62,43	333,81	-40,38
	318			-43,72
Go	298			-33,53
	308	69,44	345,53	-36,98
	318			-40,44
To	298			-36,24
	308	133,70	570,26	-41,94
	318			-47,64

În cazul HSA, valorile calculate pentru n cresc cu temperatura, situându-se în intervalul 1 – 1,5 (**Tabel II.18.**). În cazul Tf, valorile lui n scad cu temperatura, situându-se în intervalul 0,5 – 1 (**Tabel II.20.**). Aceste valori indică o afinitate crescută a complexilor față de HSA, în comparație cu Tf.

La 25°C, K_a calculate cresc în ordinea: **5-HOF** > **Go** > **Eo** > **So** > **To** (pentru Tf), respectiv **Eo** > **To** > **So** > **5-HOF** > **Go** (pentru HSA). Valorile negative ale ΔG indică faptul ca procesele de legare ale compușilor testați cu HSA și Tf sunt spontane. Datele obținute indică o afinitate a complexilor mai puternică pentru HSA decât pentru Tf. Acest lucru se poate datora faptului că ligandul, 5-hidroxiflavona, prezintă un rol important în legarea complexilor de proteine.

Tabel II.20. Constantele și numărul situsurilor de legare ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu Tf

Compus	T(K)	K _{sv} (M ⁻¹)	K _q (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	K _a (M ⁻¹)	n
So	298	0,81×10 ⁵	0,81×10 ¹³	5,33×10 ³	0,81
	308	1,16×10 ⁵	1,16×10 ¹³	3,24×10 ³	0,75
	318	1,36×10 ⁵	1,36×10 ¹³	2,28×10 ³	0,71
Eo	298	0,73×10 ⁵	0,73×10 ¹³	6,47×10 ³	0,82
	308	0,93×10 ⁵	0,93×10 ¹³	3,20×10 ³	0,75
	318	0,99×10 ⁵	0,99×10 ¹³	1,41×10 ³	0,67
Go	298	0,59×10 ⁵	2,24×10 ¹³	3,27×10 ⁴	0,97
	308	0,90×10 ⁵	0,91×10 ¹³	6,31×10 ³	0,82
	318	1,33×10 ⁵	1,33×10 ¹³	2,09×10 ³	0,71
To	298	0,09×10 ⁵	0,09×10 ¹³	1,01×10 ³	0,70
	308	1,03×10 ⁵	1,03×10 ¹³	7,05×10 ²	0,62
	318	1,95×10 ⁵	1,95×10 ¹³	4,07×10 ²	0,54

Tabel II.21. Parametrii termodinamici ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu Tf

Compus	T(K)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)
So	298			-21,21
	308	33,62	41,63	-20,80
	318			-20,38
Eo	298			-21,80
	308	60,08	128,45	-20,52
	318			-19,23
Go	298			-25,55
	308	108,43	278,10	-22,78
	318			-19,99
To	298			-17,22
	308	35,74	62,14	-16,60
	318			-15,98

Modificări conformaționale ale Tf induse de interacțiunea cu compușii testați

În spectrele Tf la Δλ=60 nm, s-a observat că λ_{max} a tirozinei (~ 350 nm) nu se deplasează, în timp ce maximul emisiei triptofanului (~ 330 nm) înregistrează deplasări hipsocrome de până la 10 nm după adăugarea compușilor testați. Acest lucru indică prezența unor modificări conformaționale ale Tf în jurul resturilor de triptofan, scăderea polarității în jurul acestei regiuni și creșterea caracterului hidrofob (restul Trp devine mai puțin expus la moleculele de solvent) [42]. Se observă însă stingerea pronunțată a intensității fluorescenței datorate Trp în comparație cu cea datorată Tyr. Acest aspect indică legarea complexelor cu precădere de resturile de Trp din structura proteinei.

În spectrele sincron ale HSA nu s-au observat deplasări considerabile ale maximelor de emisie după adăugarea complexelor.

Spectre de fluorescență 3D

Pentru a urmări în continuare modificările conformaționale ale proteinelor induse de prezența complexșilor, a fost utilizată tehnica spectroscopică de fluorescență 3D. Modificările conformaționale ale Tf și HSA pot fi monitorizate prin compararea spectrelor 3D ale proteinelor în absența și în prezența complexșilor. Spectrele de fluorescență 3D și hărțile de contur corespunzătoare pentru Tf și HSA sunt prezentate în **Fig.16**. Pentru ambele proteine, s-a observat scăderea semnificativă a intensității fluorescenței picului b în prezența combinațiilor complexe, ceea ce demonstrează că prezența acestora a indus unele modificări conformaționale în structura lanțurilor peptidice ale proteinelor, legate de micromediul hidrofob din jurul resturilor Trp și Tyr.

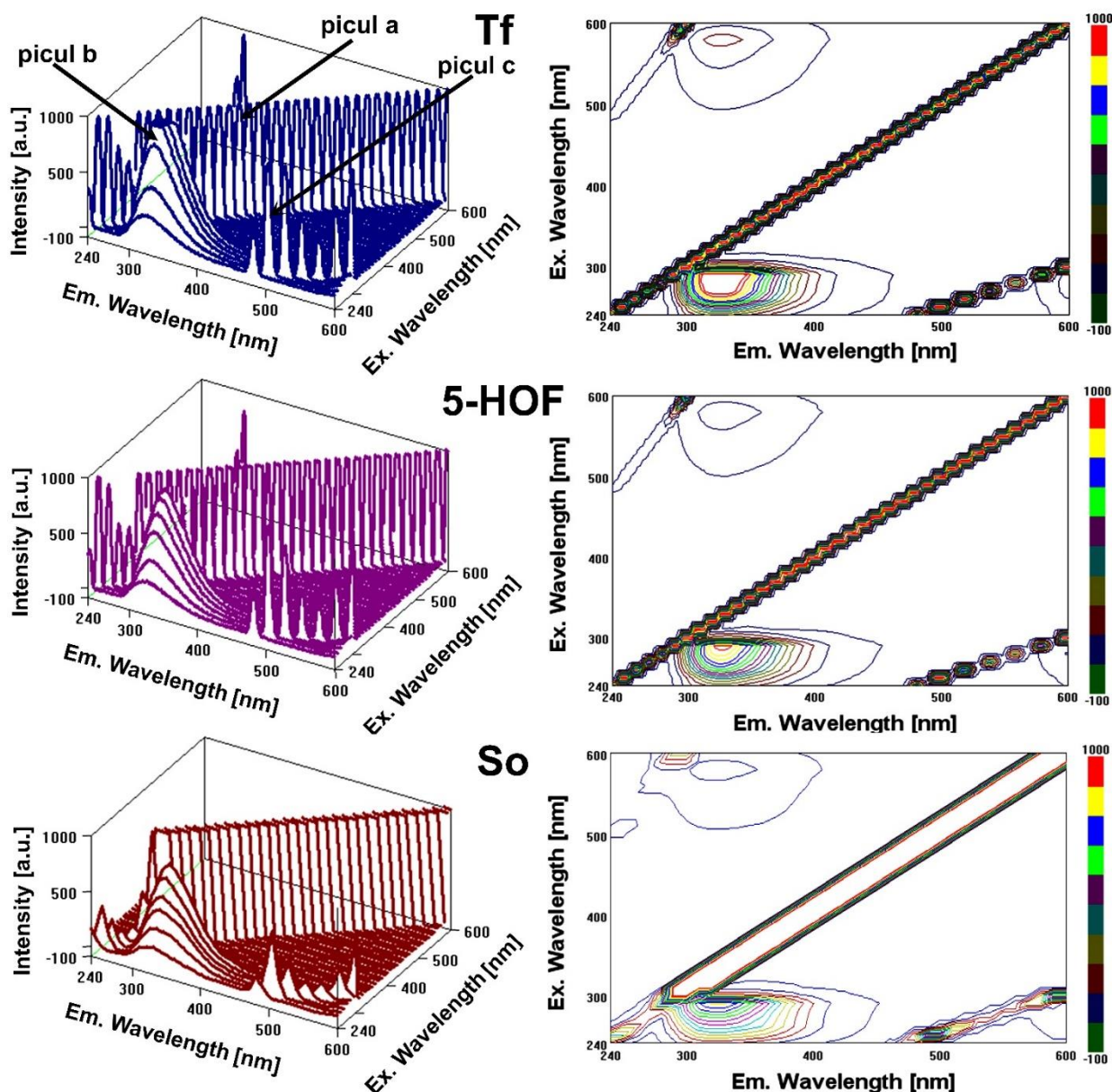


Fig.16. Spectrele de fluorescență 3D (în stânga imaginii) și hărțile de contur corespunzătoare (în dreapta imaginii) ale transferinei (Tf) (10 μ M Tf) în absența și prezența compușilor **5-HOF** și, respectiv **So** (10 μ M Tf/ 10 μ M compus). **Picul a** se datorează fenomenului de difuzie Rayleigh ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$). **Picul b** reflectă comportamentul spectral al resturilor de Trp și Tyr. **Picul c** corespunde picului de ordinul doi datorat difuziei Rayleigh ($\lambda_{em} = 2\lambda_{ex}$)

Testarea preliminară a activității biologice a combinațiilor complexe sintetizate

Screening-ul calitativ al acțiunii antimicrobiene

În etapa de evaluare calitativă a activității antimicrobiene, au fost testate cele patru noi combinații complexe asupra unor tulpini bacteriene Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Pentru aceasta, a fost utilizată metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, pe mediu de agar Muller-Hinton. Rezultatele obținute pentru complexii **So**, **Eo**, **Go**, **To** sunt prezentate în **Fig.17,18**. Complexii prezintă activitate antimicrobiană moderată asupra tulpinilor bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și, respectiv, comparabilă cu martorul pozitiv asupra tulpinii *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

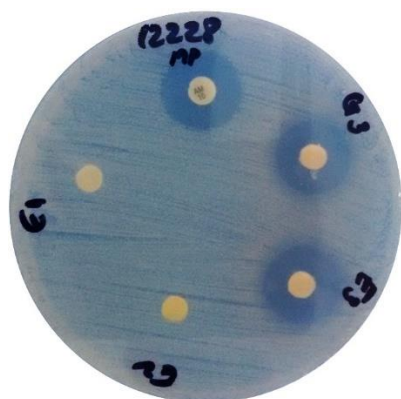


Fig.17. Screening calitativ al acțiunii antimicrobiene pe tulpini bacteriene de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; MP = martor pozitiv; G3 = **Go**; E3 = **Eo**; E1 = (2)



Fig.18. Screening calitativ al acțiunii antimicrobiene pe tulpini bacteriene de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; MP = martor pozitiv; T3 = **To**; G1 = (3)

Evaluarea in vitro a citotoxicității complexelor sintetizate

În acest scop s-au utilizat două linii de celule tumorale diferite: HT-29 (linie umană de celule de cancer de colon) și MCF-7 (linie umană de celule de cancer de sân). Efectele ligandului și complexelor au fost investigate, iar viabilitatea celulelor este prezentată în **Fig.19-21**. Pentru linia HT-29, rezultatele indică o eficiență superioară a complexelor față de cisplatină (**Fig.19**). Pentru testele pe celule MCF-7, au fost utilizate diluții seriale 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, pornind de la o soluție stoc de concentrație 200 μ M pentru 5-HOF și complexi, respectiv 20 μ M pentru doxorubicină (adriamicină). Rezultatele obținute pentru această linie sunt mai slabe decât în cazul HT-29, însă încurajează testarea complexelor pe alte linii celulare (în special complexul **To**).

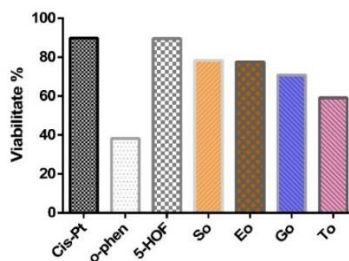


Fig.19. Reprezentare grafică ce ilustrează activitatea (% viabilitate) compuşilor testați în comparație cu cisplatină la 200 μ M.

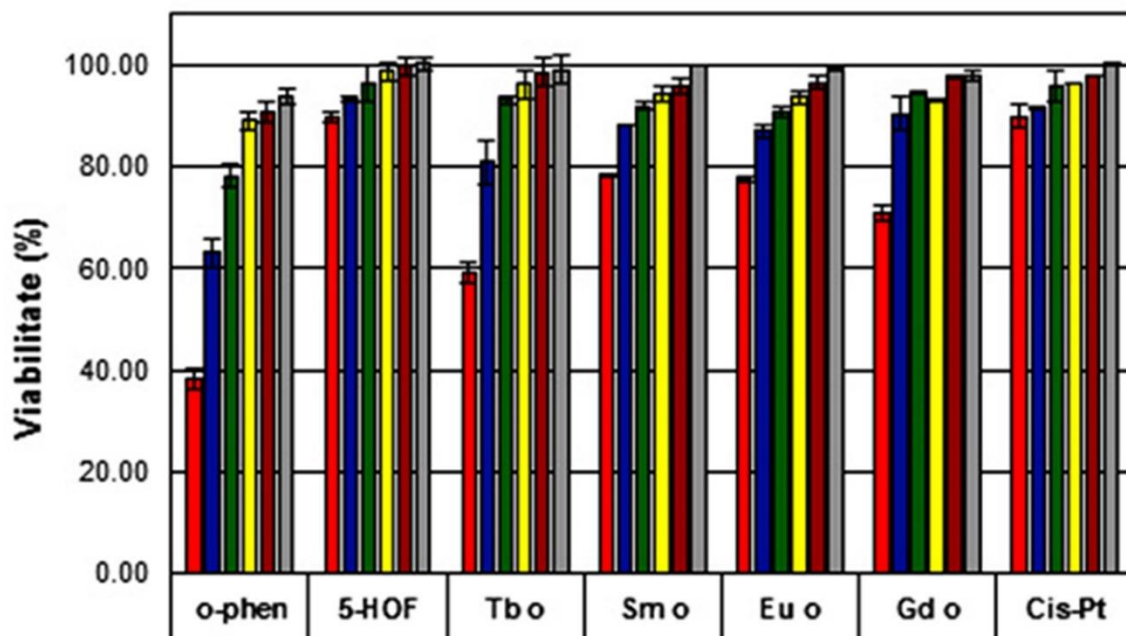


Fig.20. Efectele citotoxice, exprimate ca % viabilitate ale o-phen, 5-HOF și complecșilor So (Sm o), Eo (Eu o), Go (Gd o), To (Tb o) asupra liniei celulare HT-29, în comparație cu cisplatina (Cis-Pt)

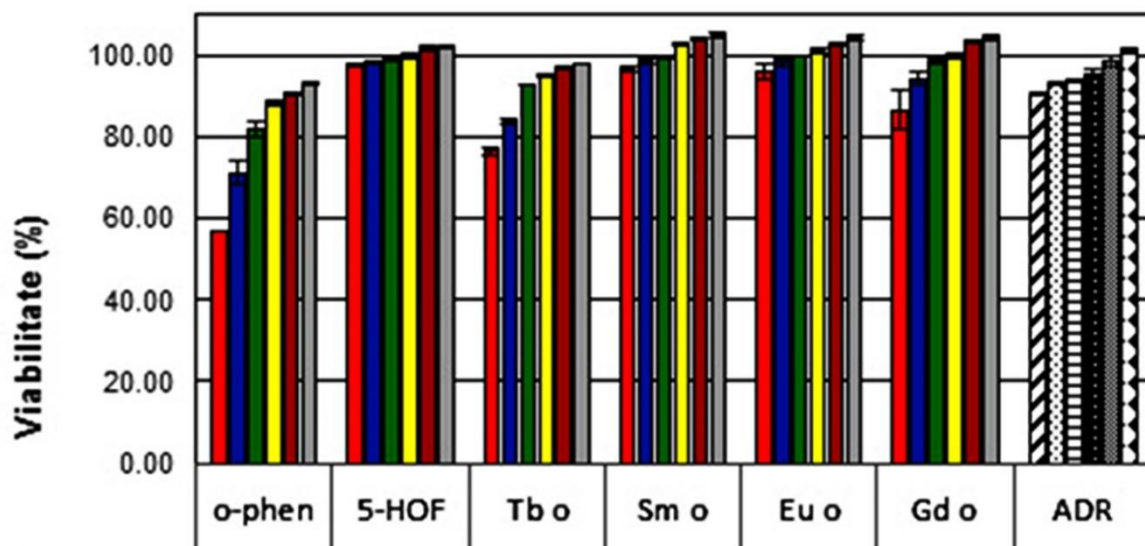


Fig.21. Efectele citotoxice, exprimate ca % viabilitate ale o-phen, 5-HOF și complecșilor So (Sm o), Eo (Eu o), Go (Gd o), To (Tb o) asupra liniei celulare MCF-7, în comparație cu adriamicina (ADR)

II.3. Combinații complexe ale ionilor trivalenți de Al(III), Ga(III), In(III) cu 5-hidroxi flavonă în raport molar 1:3

Introducere

În scopul creșterii stabilității la hidroliză, ionii metalici trivalenți ai grupeii 13 trebuie să lege liganzi voluminoși [48,49], așa cum este, de exemplu, 8-hidroxicinolina în complexul Al(III) cu 8-hidroxicinolină, sau în complexul Ga(III) cu 8-hidroxicinolină, utilizate în sisteme de tip OLED. Luând în calcul acest lucru, am considerat că 5-hidroxi flavona este o alegere adecvată a ligandului pentru sinteza unor complecși cu ionii de Al(III), Ga(III), In(III) activi din punct de vedere biologic.

Complecșii maltolului cu Al(III), Ga(III), In(III) prezintă eficiență terapeutică și stabilitate crescută în medii biologice. Pornind de la asemănarea structurală dintre maltol și 5-hidroxi flavonă (**Fig.II.4.1.**), ne-am propus sinteza unor noi combinații complexe ale flavonei anterior menționate cu ionii de Al³⁺, Ga³⁺, In³⁺, complecși cu potențială acțiune biologică.

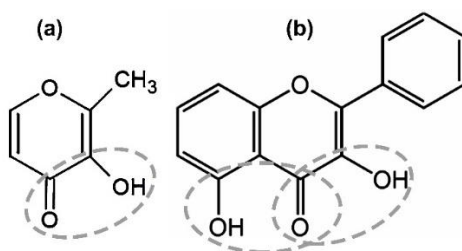
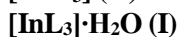
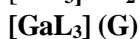
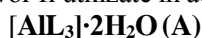


Fig.22. Structurile maltolului (3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-onă; 3-hidroxi-2-metil-4-pironă) (a) și derivaților flavonoidici (b). Elipsele punctate evidențiază grupările chelatoformatoare

Sinteza complecșilor

Pentru deprotonarea ligandului 5-hidroxi flavonă s-a folosit trietilamină (TEA). Sinteza a fost efectuată în mediu etanolic, în prezența 5-hidroxi flavonei deprotonate și a clorurilor metalice corespunzătoare, prin încălzire la reflux. pH-ul a fost menținut la 5,5-6 pe durata întregii sinteze. Raportul molar utilizat pentru sinteza complecșilor 5-hidroxi flavonei cu ionii Al(III), Ga(III), In(III) a fost de 1:3 (ion metalic:ligand).

Am atribuit celor trei complecși obținuți în urma sintezei următoarele formule abreviate și coduri, care vor fi utilizate în această lucrare, după cum urmează:



unde L = C₁₅H₉O₃, 5-hidroxi flavona deprotonată

Caracterizarea fizico-chimică a complecșilor

Spectrele în infraroșu cu transformată Fourier

Spectrele IR ale complecșilor prezintă o serie de modificări de formă, poziție și/sau intensitate ale benzilor de absorbție (**Tabel II.22.**) corespunzătoare grupelor funcționale ale ligandului implicate în procesul de complexare. Spectrele IR ale combinațiilor complexe **A** și **I** conțin o bandă intensă, largă, între 2600 – 3600 cm⁻¹, atribuită prezenței unor molecule de apă de hidratare și/sau coordinare în structura complecșilor. Această bandă este mult diminuată ca intensitate în spectrul complexului **G** indicând absența moleculelor de apă din structura acestuia. Aceste detalii sugerează că flavona se leagă de ionul metalic atât prin O corespunzător grupeii hidroxil deprotonat, cât și prin O grupării cetonice, funcționând ca un ligand bidentat.

Tabel II.22. Benzile spectrale majore în IR (cm⁻¹) ale ligandului și complexilor și atribuirile corespunzătoare

Compound	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O}) + \delta(\text{O}-\text{H})$	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	$\nu(\text{M}-\text{O})$
5-HOF	3200-2600(b,m)	1654(s) 1615(s)	1357(m) 1298(s)	1226(s)	-
(1)	-	1630(s)	1343(m)	1228(m)	438
(2)	3600-2600(b,m)	1642(s)	1357(m)	1219(m)	428
(3)	3600-2600(b,m)	1641(s)	1358(m)	1221(m)	428

Spectre UV-Vis

În spectrele complexilor se observă deplasări batocrome ale benzilor de absorbție I ($\Delta\lambda \sim 45 - 57$ nm) și II ($\Delta\lambda \sim 11 - 15$ nm), care confirm implicarea sistemului cinamoil (banda I) și benzoil (banda II) din structura ligandului în formarea complexilor. Datele din spectrele UV-Vis ale ligandului și complexilor sunt prezentate în **tabelul II.23**.

Tabel II.23. Atribuirea benzilor din spectrele UV-Vis pentru ligand și complecși

Compound	λ_{max} (nm)		
	Band I		Band II
5-HOF	345	316 (umăr)	253
(1)	402	322	268
(2)	390	-	264
(3)	392	307	264

Spectre de fluorescență

Spectrele de emisie fluorescentă (**Fig.23.**) au fost înregistrate pe probe solide. Intensitatea fluorescenței crește considerabil în urma complexării. Coordinarea ionului metalic crește rigiditatea moleculei ligandului și îmbunătățește randamentul cuantic al fluorescenței prin reducerea probabilității procesului de disipare neradiativă. Se observă deplasări hipsocrome ale λ_{em} (între 25 – 122 nm), datorate cel mai probabil împiedicării transferului intramolecular de protoni în stare excitată [50].

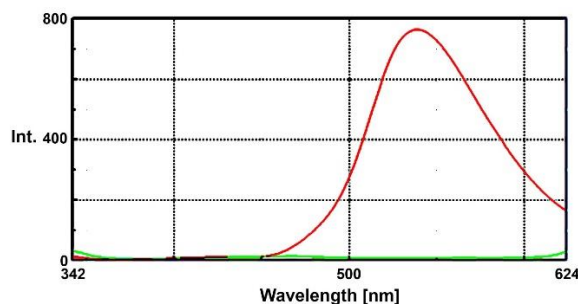


Fig.23. Spectrul de fluorescență al complexului A (roșu) în comparație cu 5-HOF (verde) la $\lambda_{\text{ex}}=322$ nm; $\lambda_{\text{em}}=539$ nm

Spectrele de masă

Semnalele corespunzătoare ionilor pseudomoleculari rezultați prin protonare sau prin formare de aducți cu o moleculă de apă obținuți pentru combinațiile complexe sunt prezentate în **tabelul II.24.**, coloanele 5, 6. Pe lângă ionii pseudomoleculari, în spectrele de masă apar specii obținute prin eliminarea unei sau a

două molecule de ligand (**Tabel II.24.**, coloanele 3, 4). Acestea se formează în urma coliziunii cu particulele de azot a ionilor pseudomoleculari protonați și dau semnale intense în spectrele de masă. Prezența 5-HOF este confirmată prin picul $m/z = 239$ (corespunzător ligandului protonat), prezent în spectrele de masă ale tuturor celor trei complecși. Formulele fragmentelor ionice au fost atribuite prin compararea maselor moleculare ale complecșilor cu valorile m/z identificate în spectrul de masă. Toate datele obținute prin spectrometrie de masă confirmă faptul că acești compuși au un raport molar ioni metallic : ligand de 1:3.

Tabel II.24. Valori nominale m/z ale fragmentelor ionice observate în spectrele de masă ale complecșilor

Complex	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic	m/z Fragment ionic
(1)	239 [L+H] ⁺	281 [²⁷ AlL(OH)] ⁺	500 [²⁷ AlL ₂] ⁺	739 [²⁷ AlL ₃ +H] ⁺	-
(2)	239 [L+H] ⁺	307 [⁶⁹ GaL+H] ⁺	542 [⁶⁹ GaL ₂] ⁺	781 [⁶⁹ GaL ₃ +H] ⁺	802 [⁶⁹ GaL ₃ (H ₂ O)+H] ⁺
(3)	239 [L+H] ⁺	352 [¹¹⁵ InL+H] ⁺	588 [¹¹⁵ InL ₂] ⁺	825 [¹¹⁵ InL ₃ +H] ⁺	-

Analiza termogravimetrică

Comportamentul termic al celor trei noi complecși a fost investigat prin analiză simultană TG/DTA. Datele obținute sunt prezentate pe scurt în **tabelul II.25.** și vor fi discutate în cele ce urmează.

Conform curbelor TG, DTG și DTA, complexul de aluminiu este stabil la încălzire până la 180°C (prin comparație, 5-hidroxi flavona are un p.t. de 158-161°C) atunci când pierde moleculele de apă. Compusul anhidru rămas este stabil până la 352°C, când începe să se topească. Procesul de topire este urmat imediat de degradarea oxidativă a părții organice. Complexul galiului este anhidru, deci stabil până la 250°C. Descompunerea începe cu procese endoterme urmate de mai multe etape exoterme, corespunzătoare termolizei și degradării oxidative a ligandului, așa cum reiese din curbele TG și DTA. Pentru complexul indiului, descompunerea termică începe la 190°C, cu pierderea moleculelor de apă printr-un proces endoterm. Următoarele etape exoterme corespund degradării oxidative a 5-hidroxi flavonei. Pentru toți complecșii, produsul final al descompunerii termice este specia cea mai stabilă, M₂O₃.

Tabel II.25. Rezultatele analizei termice (în aer) pentru complecșii A, G, I

Complex	Etapă	Efect termic	Interval de temperatură (°C)	Δm_{exp} (%)	Δm_{calc} (%)
A	1	Endotermic	180-240	4,32	4,65
	2	Endotermic*	352	-	-
	3	Exotermic	352-900	88,86	88,77
	Reziduu (Al ₂ O ₃)			6,82	6,58
G	1	Mixt	250-900	87,46	88,01
	Reziduu (Ga ₂ O ₃)			12,54	11,99
I	1	Endotermic	190-240	2,16	2,13
	2	Exotermic	240-880	81,19	81,43
	Reziduu (In ₂ O ₃)			16,65	16,44

* topire

Calculul DFT

Metoda DFT/B3LYP/(LANL2DZ pentru ionul metallic) s-a dovedit a da rezultate bune pentru predicția parametrilor geometrici ai complecșilor metalici în alte studii [51,52].

Geometriile complet optimizate de complecșilor **A**, **G**, **I**, sunt prezentate în **Fig.24**. Sferele de coordinare în jurul centrului metalic în complecși implică următorii atomi: O2, O3, O4, O5, O6, O7 (aparținând 5-hidroxi flavonei deprotonate). O atenție specială a fost acordată conformației ligandului în complecși, aspect relevant pentru proprietățile antioxidante, interacțiunile cu biomacromolecule (de exemplu intercalare între perechile de baze azotate din structura ADN), sau potențialul redox al complecșilor metalici. Rezultatele indică o conformație cvasi-planară a ligandului în complecși, datorată sistemului conjugat de legături π . Se explică astfel interacțiunea puternică a compușilor cu ADN. Unghiurile de legătură O-M-O în complecși sunt $\sim 90^\circ$, ceea ce indică o geometrie octaedrică a complecșilor. Valorile unghiurilor diedre în jurul ionilor metalici din complecși sunt depărtate de 0° sau 180° , indicând faptul că ionii metalici și atomii de oxigen donori nu se află în același plan.

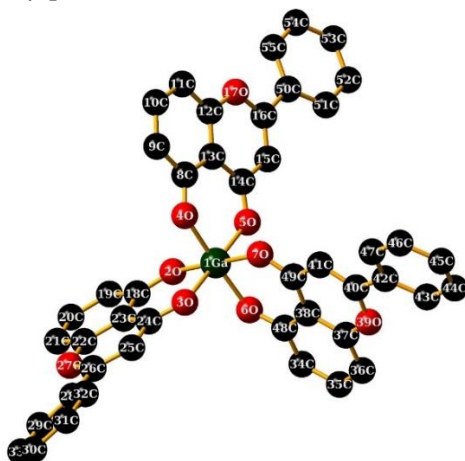


Fig.24. Structura optimizată a complexului **G** în stare electronică fundamentală la nivelul de teorie B3LYP, folosind seturile de funcții 6-31G(d) pentru atomii de H, C, O respectiv LANL2DZ pentru metal.

Studii de interacțiune *in vitro* cu ADN

Spectroscopie UV-Vis

Mecanismul de interacțiune a complecșilor **A**, **G**, **I** cu ADN-ul dublu catenar, a fost determinat prin titrare spectrofotometrică a acestora în prezența ADN extras din timus de vițel (CT-ADN). După adăugarea unor concentrații crescătoare de ADN, în spectrele UV ale celor trei complecși, banda centrată la ~ 275 nm prezintă un efect hipocrom semnificativ de $\sim 50\%$ (**Fig.25.**), ceea ce sugerează legarea puternică de CT-ADN, posibil prin intercalare [28]. Complexul **A** a fost testat în aceleași condiții, dar rezultatele nu au putut fi cuantificate (legarea de ADN este foarte puternică și chiar după adăugarea unor concentrații mici de ADN, absorbanta scade foarte mult, fiind urmată de o etapă de saturare).

În ceea ce privește caracteristicile spectrale generale, se remarcă un comportament omogen pentru complecșii **G** și **I**. Sunt de așteptat, prin urmare, moduri de legare similare cu CT-ADN.

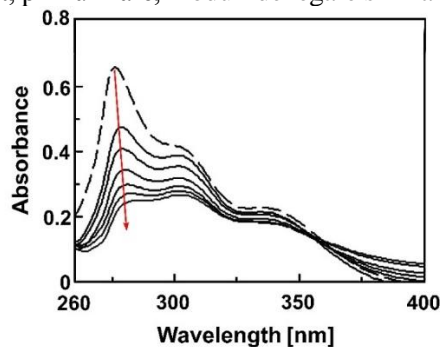


Fig.25. Spectrele de absorbție pentru complexul **G** în absența (linia punctată) și în prezența unor concentrații crescătoare de CT-ADN; [complex] = $10 \mu\text{M}$, [ADN] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, $30 \mu\text{M}$. Săgeata indică scăderea absorbantei, odată cu creșterea concentrației de ADN

Ecuția I a fost utilizată pentru calculul constantelor de legare de ADN (K_b), prezentate în **tabelul II.26**.

Tabel II.26. Constantele de legare de CT-DNA pentru complexii G și I

Compus	K_b (M^{-1})	R^2
G	$1,12 \times 10^4$	0,9936
I	$2,17 \times 10^4$	0,9977

Se observă că valorile constantelor de legătură calculate pe baza ecuației I pentru cei doi complecși au același ordin de mărime cu 5-HOF (10^4). Afinitățile de legare ale complecșilor în comparație cu ligandul variază în ordinea: **G < 5-HOF < I**. De asemenea, se observă valorile apropiate ale constantelor de legare, ceea ce indică pentru cei trei compuși un comportament omogen și probabil același mecanism de interacție cu ADN.

Spectroscopie de fluorescență; studii de legare competitivă cu bromura de etidiu

O soluție de CT-ADN la care a fost adăugată EB ($2\mu M$ EB + $10\mu M$ DNA) a fost utilizat ca probă spectrală. Complecșii au fost adăgați în concentrații crescătoare, observându-se după fiecare concentrație efectul asupra emisiei fluorescente a complexului ADN-EB.

Constanta Stern-Volmer, K_{sv} , a fost calculată conform ecuației III ca pantă a dreptei de regresie rezultate în urma reprezentării grafice a I_0/I (axa y) versus $[Q]$ (axa x) (**Tabel II.27.**). Spectrele de emisie ale complexului EB - ADN în absența și în prezența unor concentrații crescătoare de ligand și complecși sunt prezentate în **Fig.26**. Curbele de stingere a fluorescenței indică legarea complecșilor de CT-ADN-EB cu afinități mai mari decât ligandul, în ordinea: **5-HOF < I < G < A**.

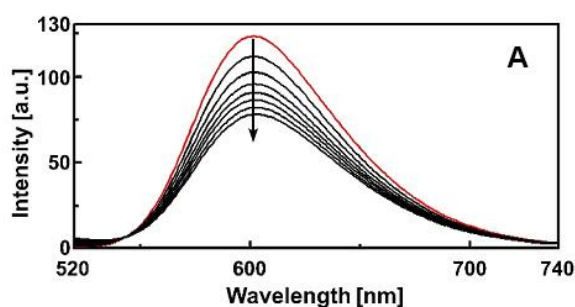


Fig.26. Spectrele de fluorescență ale complexului EB-ADN în absența (linia roșie) și în prezența (liniile negre) unor concentrații crescătoare de complecși A, G, I. $\lambda_{ex} = 500$ nm, $[EB] = 2 \mu M$, $[ADN] = 10 \mu M$, $[compus] = 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 \mu M$. Săgețile indică scăderea intensității fluorescenței, odată cu creșterea concentrației de compus.

Tabel II.27. Valorile constantelor Stern-Volmer calculate în urma interacției între compușii testați și complexul CT-ADN-EB

Complex	K_{sv} (M^{-1})	R^2
A	$1,55 \times 10^5$	0,9968
G	$1,14 \times 10^5$	0,9957
I	$1,17 \times 10^5$	0,9949

Studii de interacțiune cu albumină serică umană și transferină. Studii de stingere a intensității fluorescenței resturilor Trp din structura proteinelor

Interacțiunea complexelor cu HSA și Tf a fost studiată prin intermediul spectrelor de fluorescență. Intensitatea benzii largi de emisie scade după adăugarea compușilor testați în concentrații crescătoare. Se observă un efect de stingere a fluorescenței de până la 80% atât pentru HSA, cât și pentru Tf, ceea ce indică o legare puternică a compușilor de cele două proteine. Lungimea de undă de emisie maximă a Tf (~ 330 nm) nu este deplasată pentru complexii **G** și **I**, însă în cazul complexului **A** apare o mică deplasare batocromă (~ 5 nm). Acest efect indică faptul că micromediul în jurul restului Trp a fost perturbat, că acesta este situat într-un mediu mai puțin hidrofob, devenind mai expus la moleculele solventului. Pe de altă parte, lungimea de undă maximă de emisie a HSA prezintă o deplasare hipsocromă de până la 6 nm pentru complexii **G** și **I**, dar nicio schimbare nu se observă pentru complexul **A**. Deplasarea hipsocromă indică faptul că restul Trp este situat într-un mediu mai hidrofob, devenind mai puțin expus la moleculele solventului.

În continuare au fost calculate constantele Stern-Volmer (K_{sv}), constantele bimoleculare de stingere a fluorescenței (K_q), constantele de legare corespunzătoare complexelor (K_a), numărul de situsuri de legare (n) (**Tabel II.28,30.**) pe baza ecuațiilor **IV**, **V**, **VI** și **VII**. Valorile variației entalpiei (ΔH), entropiei (ΔS), energiei libere Gibbs (ΔG) (**Tabel II.29,31.**) au fost calculate utilizând ecuațiile **VIII** și **IX**.

În cazul Tf, valorile calculate pentru n variază cu temperatura și sunt diferite pentru complexii **A**, **G**, **I**. Astfel, la 25°C, **A** se leagă de Tf în raport molar de 1:1,45 (proteină : complex), **G** se leagă în raport de ~ 1:0,85, iar **I** de 1:0,67. În cazul HSA, valorile lui n sunt apropiate de 1, indicând un raport de legare proteină:complex pentru toți complexii testați de ~ 1:1.

Tabel II.28. Constantele și numărul situsurilor de legare ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu Tf

Compus	T(K)	K_{sv} (M^{-1})	K_q ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	K_a (M^{-1})	n
A	298	$4,76 \times 10^4$	$1,94 \times 10^{13}$	$2,26 \times 10^7$	1,45
	308	$1,00 \times 10^5$	$4,00 \times 10^{13}$	$3,24 \times 10^6$	1,26
	318	$1,50 \times 10^5$	$6,00 \times 10^{13}$	$9,42 \times 10^5$	1,14
G	298	$1,47 \times 10^5$	$5,88 \times 10^{13}$	$1,13 \times 10^4$	0,85
	308	$1,42 \times 10^5$	$5,68 \times 10^{13}$	$6,08 \times 10^3$	0,80
	318	$1,38 \times 10^5$	$5,52 \times 10^{13}$	$3,73 \times 10^3$	0,75
I	298	$1,39 \times 10^5$	$5,56 \times 10^{13}$	$1,57 \times 10^3$	0,67
	308	$1,36 \times 10^5$	$5,44 \times 10^{13}$	$9,75 \times 10^2$	0,65
	318	$1,28 \times 10^5$	$5,12 \times 10^{13}$	$6,44 \times 10^2$	0,62

Tabel II.29. Parametrii termodinamici ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu Tf

Compus	T(K)	ΔH ($kJ\cdot mol^{-1}$)	ΔS ($J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1}$)	ΔG ($kJ\cdot mol^{-1}$)
A	298			-41,70
	308	-125,47	-281,10	-38,89
	318			-36,08
G	298			-23,76
	308	-43,59	-68,84	-22,39
	318			-21,70
I	298			-18,22
	308	-35,04	-56,45	-17,65
	318			-17,09

Tabel II.30. Constantele și numărul situsurilor de legare ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu HSA

Compound	T(K)	K _{sv} (M ⁻¹)	K _q (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	K _a (M ⁻¹)	n
A	298	3,75×10 ⁵	3,75×10 ¹³	4,98×10 ⁶	1,22
	308	0,95×10 ⁵	0,95×10 ¹³	8,15×10 ⁶	1,27
	318	0,57×10 ⁵	0,57×10 ¹³	1,82×10 ⁷	1,35
G	298	4,68×10 ⁵	4,68×10 ¹³	1,32×10 ⁵	0,92
	308	3,84×10 ⁵	3,84×10 ¹³	4,17×10 ⁵	1,02
	318	2,18×10 ⁵	2,18×10 ¹³	7,74×10 ⁵	1,07
I	298	6,75×10 ⁵	6,75×10 ¹³	7,03×10 ⁵	1,02
	308	2,26×10 ⁵	2,26×10 ¹³	3,17×10 ⁶	1,17
	318	1,13×10 ⁵	1,13×10 ¹³	7,21×10 ⁶	1,25

Tabel II.31. Parametrii termodinamici ce caracterizează interacțiunea compușilor testați cu HSA

Compus	T(K)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)
A	298			-38,06
	308	50,84	298,31	-41,04
	318			-44,02
G	298			-29,40
	308	69,80	332,89	-32,73
	318			-36,06
I	298			-33,60
	308	91,99	421,44	-37,81
	318			-42,03

La 25° C, K_a calculate scad în ordinea: **A > G > I** (pentru Tf), respectiv **A > I > G** (pentru HSA).

Valorile negative ale ΔG indică faptul ca procesele de legare ale compușilor testați cu HSA și Tf sunt spontane. Mai mult, valorile negative calculate pentru ΔH și ΔS indică implicarea unor legături de hidrogen și/sau forte van der Waals în interacțiunea complexilor cu transferina. Acest lucru nu este valabil în cazul interacțiunii cu HSA, unde am obținut valori pozitive pentru ΔH și ΔS.

Datele din literatură indică o afinitate crescută a complexilor de Al(III), Ga(III) și In(III) pentru Tf. Datele experimentale obținute și prezentate în cele ce urmează, demonstrează legarea mai puternică a complexilor **G**, **I** de HSA decât de Tf, contrar rezultatelor așteptate. Acest lucru se poate datora faptului că ligandul, 5-hidroxi flavona, prezintă un rol important în legarea complexilor de proteine.

Modificări conformaționale ale Tf induse de interacțiunea cu compușii testați

În spectrele Tf la Δλ=60 nm, s-a observat că λ_{max} a tirozinei (~ 350 nm) nu se deplasează, în timp ce maximul emisiei triptofanului (~ 340 nm) înregistrează deplasări hipsocrome de până la 10 nm după adăugarea compușilor testați. Deplasările cele mai pronunțate ale maximelor de emisie s-au înregistrat pentru complexul **A**. Acest lucru indică prezența unor modificări conformaționale ale Tf în jurul resturilor de triptofan, scăderea polarității în jurul acestei regiuni și creșterea caracterului hidrofob (restul Trp devine mai puțin expus la moleculele de solvent) [42].

În spectrele sincron ale HSA nu s-au observat deplasări considerabile ale maximelor de emisie după adăugarea complexilor **A**, **G**, **I**.

Spectre de fluorescență 3D

Pentru a urmări în continuare modificările conformaționale ale proteinelor induse de prezența complexelor, a fost utilizată tehnica spectroscopică de fluorescență 3D. Modificările conformaționale ale Tf și HSA pot fi monitorizate prin compararea spectrelor 3D ale proteinelor în absența și în prezența complexelor. Pentru ambele proteine, s-a observat scăderea semnificativă a intensității fluorescenței picului b în prezența combinațiilor complexe, ceea ce demonstrează că prezența acestora a indus unele modificări conformaționale în structura lanțurilor peptidice ale proteinelor, legate de micromediul hidrofob din jurul resturilor Trp și Tyr.

Testarea preliminară a activității biologice a combinațiilor complexe sintetizate

Screening-ul toxicologic asupra crustaceului *Daphnia magna* Straus

Screening-ul toxicologic a fost efectuat asupra organismelor tinere de *Daphnia magna* Straus. În urma testelor efectuate, a fost evidențiată toxicitatea redusă (sau chiar absentă) a complexelor sintetizați la concentrațiile testate după 24, respectiv 48 ore după tratament. La 72 ore după tratament, atât combinațiile complexe, cât și ligandul au prezentat toxicitate crescută la concentrații mari, de 50 μ M. Menționăm că testarea la concentrații mai mari a fost împiedicată de tendința complexelor de a precipita în sistemul apă/DMSO utilizat. Rezultatele sunt prezentate în Fig.27.

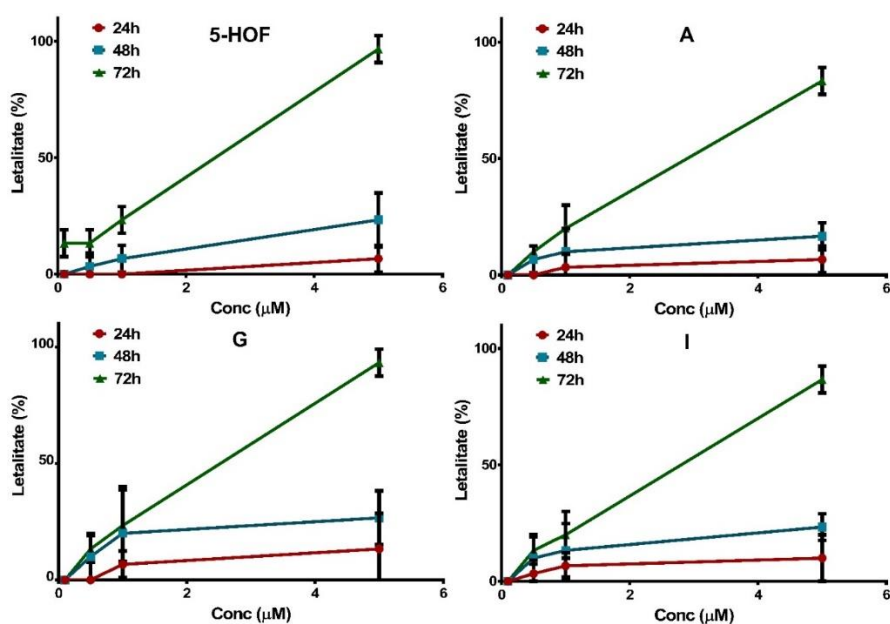


Fig.27. Reprezentare grafică (Letalitate/% vs. Conc/ μ M) a toxicității 5-hidroxi flavonei și complexelor asupra crustaceului *Daphnia magna* la 24, 48, 72 ore după tratament

Screening-ul calitativ al acțiunii antimicrobiene

În etapa de evaluare calitativă a activității antimicrobiene, au fost testate cele patru noi combinații complexe asupra unor tulpini bacteriene Gram-pozitive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 și *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Pentru aceasta, a fost utilizată metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer, pe mediu de agar Muller-Hinton. Rezultatele indică însă faptul că niciuna dintre combinațiile complexe nu prezintă activitate antimicrobiană asupra tulpinilor bacteriene testate.

Evaluarea *in vitro* a citotoxicității complexelor sintetizați

Pentru evaluarea citotoxicității compușilor, s-au utilizat două linii de celule tumorale diferite: HT-29 (linie umană de celule de cancer de colon) și MCF-7 (linie umană de celule de cancer de sân). Efectele

ligandului și complecșilor **A**, **G**, **I** au fost investigate, iar viabilitatea celulelor este prezentată în **Fig.28-30**. Pentru linia de celule HT-29, rezultatele sunt comparabile cu cele obținute pentru cisplatină (**Fig.29**).

Pentru testele pe celule MCF-7, au fost utilizate diluții seriile 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, pornind de la o soluție stoc de concentrație 200 μM pentru 5-HOF și complecși, respectiv 20 μM pentru doxorubicină. Rezultatele în cazul complecșilor indică lipsa activității citotoxice pe această linie celulară. Testarea ulterioară, pe diferite linii celulare, este necesară.

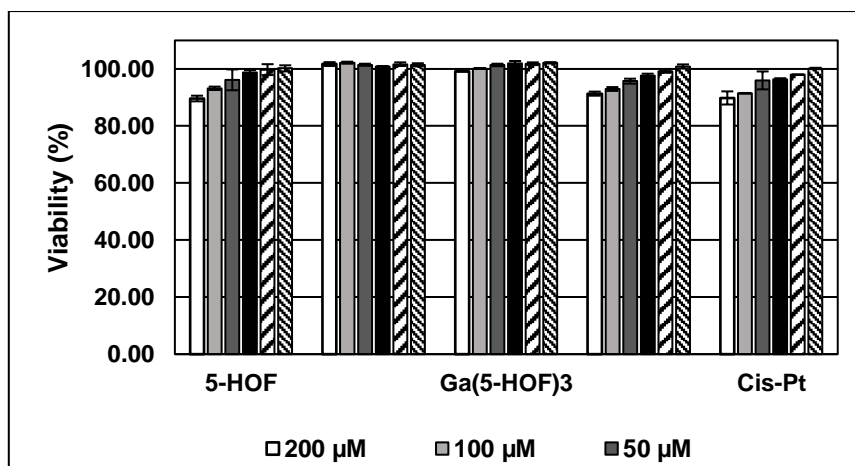


Fig.28. Efectele citotoxice, exprimate ca % viabilitate ale 5-HOF și complecșilor **A**, **G**, **I** asupra liniei celulare HT-29, în comparație cu cisplatin (Cis-Pt)

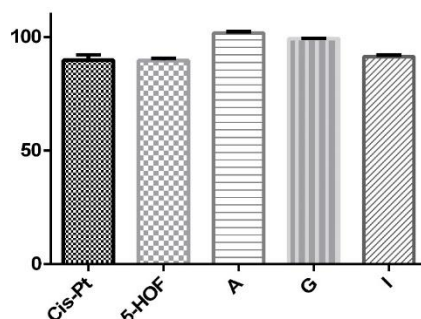


Fig.29. Reprezentare grafice ce ilustrează activitatea (% viabilitate) compușilor testați în comparație cu cisplatină la 200 μM .

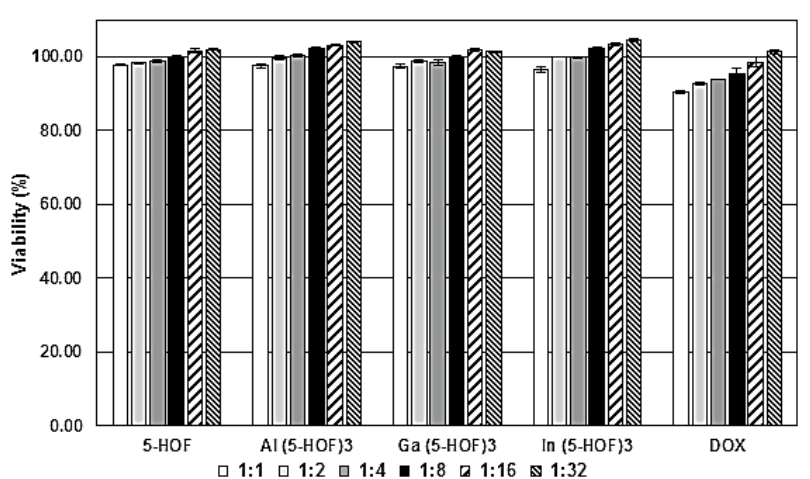


Fig.30. Efectele citotoxice, exprimate ca % viabilitate ale 5-HOF și complecșilor **A**, **G**, **I** asupra liniei celulare MCF-7, în comparație cu doxorubicina (DOX)

Evaluarea activității antivirale. Inhibarea integrezei HIV

Testarea reacției de procesare a capătului 3' al ADN-ului viral catalizată de IN

Pentru aceasta, s-a folosit integreza HIV1 recombinantă purificată și un ADN dublu catenar sintetic de 27 perechi de baze, conținând secvențele corespunzătoare LTR virale. Secvențele de ADN dublu catenar (LTR) au fost marcate fie cu un fluorofor *donor* - la capătul 5' (Alexa 488), fie cu un fluorofor *acceptor* - la capătul 3' (Alexa 594), fie cu ambele, la capătul 5' și, respectiv, 3'. Fenomenul **FRET** are loc în cazul ultimei LTR (marcată fluorescent la ambele capete), ca urmare a apropierii fluoroforilor. Astfel, emisia donorului este stinsă, iar fluorescența acceptorului crește (**Fig.II.4.42-43.**). Atunci când IN elimină nucleotidele aflate la capătul 3', împreună cu acceptorul, transferul de energie este anulat și emisia fluorescentă a donorului crește. Rezultatele sunt cuantificate ca diferență în eficiența FRET, în prezența integrezei (ΔE):

$$\Delta E(\%) = \left(\frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \right)_{no\ integrase} - \left(\frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \right)_{+ integrase}$$

unde I_0 = intensitatea fluorescenței donorului în absența acceptorului, și I = intensitatea fluorescenței donorului în prezența acceptorului.

Experimentele au fost efectuate în prezența unui control negativ și, respectiv, pozitiv. Compusul **L708,906** (Merck®) a fost utilizat drept control pozitiv, întrucât prezintă activitate de inhibare a integrezei foarte pronunțată (96,69%) în condițiile testate [53].

Formula utilizată pentru calculul % inhibare a fost următoarea:

$$\% \text{ inhibare} = 100 \times (\Delta E_{ctrl.} - \Delta E_{compus}) / \Delta E_{ctrl.}$$

unde $\Delta E_{ctrl.}$ = eficiența FRET pentru controlul negativ, ΔE_{compus} = eficiența FRET pentru compusul testat.

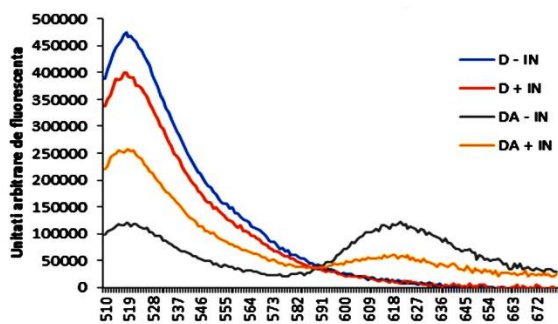


Fig.31. Spectrele de emisie fluorescentă ale donorului (D), respectiv ale cuplului donor - acceptor (DA) în prezența sau absența integrezei (IN)

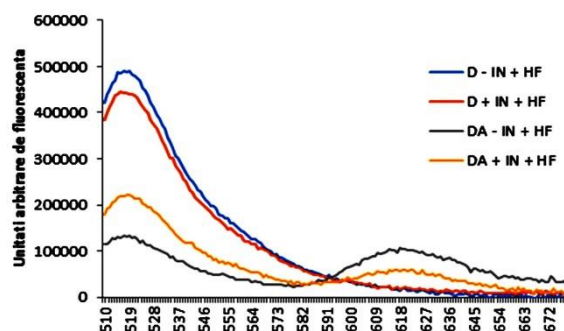


Fig.32. Spectrele de emisie fluorescentă ale donorului (D), respectiv ale cuplului donor - acceptor (DA) în prezența sau absența integrezei (IN) și a 5-hidroxi flavonei (HF)

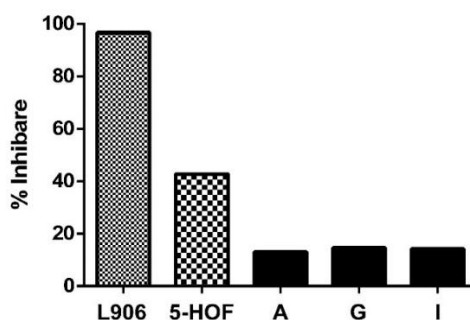


Fig.33. Activitatea de inhibare a activității integrezei pentru compușii testați în comparație cu L906 (controlul pozitiv), exprimată ca procent de inhibare

CONCLUZII

Rezultatele originale prezentate în cadrul acestei lucrări sunt cuprinse în **Capitolele II.2., II.3. și II.4.** ale părții experimentale. Acestea s-au concretizat prin sinteza și caracterizarea fizico-chimică a 11 combinații complexe noi ale 5-hidroxi flavonei cu ioni metalici trivalenți. Complecșii chelați au fost obținuți din următoarele amestecuri de reacție:

- Ln^{3+} : 5-hidroxi flavonă (raport molar 1:2), unde Ln^{3+} - Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} ; codurile atribuite sunt **(1) – (4)**;
- Ln^{3+} : 5-hidroxi flavonă : 1,10-fenantrolină (raport molar 1:1:1), unde Ln^{3+} - Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} ; codurile atribuite sunt **So, Eo, Go, To**;
- M^{3+} : 5-hidroxi flavonă (raport molar 1:3), unde M^{3+} - Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} ; codurile atribuite sunt **A, G, I**.

În vederea unei **caracterizări fizico-chimice** complete a combinațiilor complexe obținute au fost utilizate diverse metode: analiză chimică elementală, analiză termogravimetrică, spectroscopie FT-IR, UV-Vis, de fluorescență, spectrometrie de masă și spectroscopie de rezonanță electronică de spin (RES) (pentru complexul **(1)**). Au fost efectuate unele teste preliminare în vederea evaluării activității biologice, incluzând:

- Testarea toxicității pe crustaceul *Daphnia magna*;
- Testarea acțiunii antimicrobiene;
- Testarea citotoxicității pe liniile celulare HT-29 (cancer de colon) și MCF-7 (cancer de sân);
- Testarea activității de inhibare a integrazei HIV (acțiunea antivirală).

Toți complecșii obținuți sunt de tip chelat, unde 5-hidroxi flavona se comportă, în urma deprotonării, ca un ligand bidentat. Ionul metalic este hexacoordinat, singura excepție fiind complexul **(1)**, unde ionul de Sm(III) este pentacoordinat. Formulele propuse pe baza rezultatelor experimentale pentru toate cele 11 combinații complexe au fost optimizate prin studii DFT. Astfel, complecșii prezintă geometrie octaedrică, conferită de înconjurarea ionului metalic de moleculele ligandului/liganzilor și/sau a grupărilor –OH, respectiv a moleculelor de H_2O . Complecșii **(2) – (4)** prezintă structură de octaedru distorsionat, la fel ca și complecșii micști **So, Eo, Go, To**. Excepție face complexul **(1)**, pentacoordinat. Complecșii 5-hidroxi flavonei cu Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} prezintă geometrie octaedrică, cu unghiuri de legătură O-M-O de $\sim 90^\circ$. Rezultatele indică o conformație cvasi-planară a ligandului/liganzilor în complecși, datorată sistemului conjugat de legături π . Se explică astfel interacțiunea puternică a complecșilor cu ADN.

Interacțiunea dintre complecși și CT-ADN a fost explorată prin tehnici spectroscopice UV-Vis și prin studii de legare competitivă cu bromura de etidiu. Constantele de legare (K_b) sunt pentru toți complecșii de ordinul 10^4 . Valorile obținute pentru K_{sv} variază în următoarea ordine: **(3) > (2) > A > (4) > I > G > Go > 5-HOF > Eo > So > To**. Majoritatea complecșilor prezintă deci afinitate pentru CT-ADN mai mare decât ligandul comun, 5-hidroxi flavona. Pe baza valorile obținute pentru K_{sv} , mecanismul interacțiunii compușilor testați se presupune a fi de intercalare.

Studiile de legare de HSA și Tf au fost efectuate prin tehnici de titrare fluorescentă (studii de stingere a fluorescenței, spectre sincron, spectre 3D). Constantele Stern-Volmer (K_{sv}), constantele aparente de asociere (K_a) și parametrii termodinamici au fost calculați din rezultatele experimentelor de stingere a fluorescenței la temperaturile: 299 K, 308 K și 318 K. Complecșii și ligandul interacționează cu transferina și albumina serică umană cu afinități de legare diferite, care variază în ordinea: **(2) > (4) > A > (1) > (3) > 5-HOF > G > Eo > So > Go > I > To** (pentru Tf) și **A > Eo > To > 5-HOF > So > (4) > (2) > Go > I > (1) > (3) > G** (HSA). Complexul Al(III) cu 5-hidroxi flavona se remarcă prin afinitatea crescută de legare atât pentru CT-ADN, cât și pentru proteine.

Valorile constantelor de legare ale complecșilor (mai puțin **A**) indică o afinitate optimă a acestora pentru proteinele serice. Astfel că acestea indică o stabilitate suficient de mare a sistemului format de compuși cu proteinele serice, dar în același timp posibilitatea eliberării substanțelor la contactul cu celulele sau

moleculele țintă. Întrucât receptorii pentru transferină sunt upreglați la suprafața membranelor celulelor tumorale, studiile *in vitro* de interacțiune cu transferina aduc în atenție potențiala utilizare a acestor complecși în terapia antitumorală țintită. Așadar, studiile de interacțiune cu biomacromolecule (ADN, transferină și albumină serică umană) susțin potențiala utilitate terapeutică a acestor complecși.

Studiile de toxicitate acută a complecșilor **A, G, I** pe crustaceul *Daphnia magna* au evidențiat toxicitatea redusă a acestora.

Activitatea antimicrobiană a compușilor sintetizați a fost testată asupra unor tulpini bacteriene Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 și *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Rezultatele nu au evidențiat o acțiune antibacteriană pe tulpinile testate pentru complecșii **A, G, I**. Complecșii **So – To** prezintă activitate antimicrobiană moderată asupra tulpinilor bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și acțiune bună asupra tulpinii *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Activitatea citotoxică a complecșilor **A, G, I, So, Eo, Go, To** și a liganzilor 5-hidroxi flavonă și 1,10-fenantrolină a fost evaluată pe două linii celulare: HT-29 și MCF-7. Rezultatele obținute pentru **A, G, I** sunt modeste, însă rezultatele obținute pentru seria de complecși **So, Eo, Go, To** sunt bune și evidențiază potențiala acțiune antitumorală a acestora. Sunt însă necesare studii de citotoxicitate pe alte tipuri de linii celulare.

Testele efectuate asupra **reacției de procesare a capătului 3' al ADN-ului viral catalizată de integrază** utilizând complecșii **A, G, I** și 5-hidroxi flavonă au evidențiat o potențială acțiune antivirală a celor patru compuși. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru ligand. Menționez că literatura citează un număr mic de studii efectuate în privința proprietăților antivirale ale flavonoidelor și complecșilor acestora. Acest aspect va fi investigat în continuare în cadrul unor studii viitoare, întrucât poate oferi noi direcții de cercetare, cu impact major în ceea ce privește interesul științific.

În concluzie, complecșii prezintă potențială acțiune biologică, în această privință remarcându-se complecșii micști ai lantanidelor cu 5-hidroxi flavonă și 1,10-fenantrolină. Având în vedere proprietățile fluorescente ale complecșilor **A, G, I** și a seriei **So – To** și afinitatea crescută pentru ADN, se remarcă posibilitatea utilizării acestora ca biosenzori de recunoașterea acizilor nucleici. Complecșii lantanidelor pot fi utilizați în imagistica medicală pe baza proprietăților paramagnetice ale ionilor metalici.

Mai mult, datorită afinității optime pentru proteinele serice (transferină și albumina serică umană), complecșii obținuți în cadrul tezei de doctorat pot fi utilizați pentru studiul biodistribuției și eficienței terapeutice a unor sisteme de transport la țintă în terapia antitumorală.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S, Krishnan UM. Flavonoid-metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews*. 2014;34:677–702.
2. Bunzli JC. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chemical Reviews*. 2010;110:2729-2755.
3. Heffern MC, Matosziuk LM, Meade TJ. Lanthanide probes for bioresponsive imaging. *Chemical Reviews*. 2014;114:4496-4539.
4. Amoroso AJ, Pope SJA. Using lanthanide ions in molecular bioimaging. *Chemical Society Reviews*. 2015;44:4723-4742.
5. dos Santos CMG, Harte AJ, Quinn SJ, Gunnlaugsson T. Recent developments in the field of supramolecular lanthanide luminescent sensors and self-assemblies. *Coordination Chemistry Reviews*. 2008;252:2512-2527.
6. Komiyama M, Aiba Y, Yamamoto Y, Sumaoka J. Solid-phase synthesis of pseudo-complementary peptide nucleic acids. *Nature Protocols*. 2008;3:646-654.
7. Miyajima Y, Ishizuka T, Yamamoto Y, Sumaoka J, Komiyama M. Origin of High Fidelity in Target-Sequence Recognition by PNA–Ce(IV)/EDTA Combinations as Site-Selective DNA Cutters. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131:2657-2662.
8. Zhao C, Sun Y, Ren J, Qu X. Recent progress in lanthanide complexes for DNA sensing and targeting specific DNA structures. *Inorganica Chimica Acta*. 2016;452:50-61.
9. Asadi M, Savaripoor N, Asadi Z, Ghatee MH, Moosavi F, Yousefi R, Jamshidi M. Synthesis and characterization of some new Schiff base complexes of group 13 elements, ab initio studies, cytotoxicity and reaction with hydrogen peroxide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013;101:394-399.
10. Strunecka A, Blaylock RL, Strunecky O. Fluoride, aluminum, and aluminofluoride complexes in pathogenesis of the autism spectrum disorders : A possible role of immunoexcitotoxicity. *Journal of Applied Biomedicine*. 2016;14:171–176.
11. Jakupec MA, Keppler BK. Gallium in cancer treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2004;4:1575–1583.
12. Jakupec MA, Keppler BK. Gallium and other main group metal compounds as antitumor agents. *Metal Ions in Biological Systems*. 2004;42:425–462.
13. Apseloff G. Therapeutic uses of gallium nitrate: Past, present, and future. *American Journal of Therapeutics*, 1999;6:327–339.
14. Bockman R. The effects of gallium nitrate on bone resorption. *Seminars in Oncology*. 2003;30:5–12.
15. Mendes IC, Soares MA, dos Santos RG, Pinheiro C, Beraldo H. Gallium (III) complexes of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma. *European journal of medicinal chemistry*. 2009;44:1870-1877.
16. Rudnev AV, Foteeva LS, Kowol C, Berger R, Jakupec MA, Arion VB, Keppler BK. Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: Solubility, stability, lipophilicity and binding to serum proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2006;100:1819–1826.
17. Valant-Vetschera KM, Bhutia TD, Wollenweber E. Exudate flavonoids of *Primula* spp: Structural and biogenetic chemodiversity. *Natural Product Communications*. 2009;4:365-370.
18. Valant-Vetschera KM, Bhutia TD, Wollenweber E. Chemodiversity of exudate flavonoids in *Dionysia* (Primulaceae): A comparative study. *Phytochemistry*. 2010;71:937-947.
19. Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, Breschi MC, Martinotti E. Vasorelaxing effects of flavonoids: Investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2004;370:290-298.
20. Nishizaki Y, Ishimoto Y, Hotta Y, Hosoda A, Yoshikawa H, Akamatsu M, Tamura H. Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on in vitro reporter gene assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009;19:4706-4710.
21. Uivarosi V, Barbuceanu SF, Aldea V, Arama CC, Badea M, Olar R, Marinescu D. Synthesis, Spectral and Thermal Studies of New Rutin Vanadyl Complexes. *Molecules*. 2010;15:1578-1589.
22. Uivarosi V, Badea M, Olar R, Draghici C, Barbuceanu SF. Synthesis and Characterization of Some New Complexes of Magnesium (II) and Zinc (II) with the Natural Flavonoid Primuletin. *Molecules*. 2013;18:7631-7645.
23. Vijayaraghavan K, Iyyam Pillai S, Subramanian SP. Design, synthesis and characterization of zinc-3 hydroxy flavone, a novel zinc metallo complex for the treatment of experimental diabetes in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2012;680:122-129.

24. Iyyam Pillai S, Subramanian SP, Kandaswamy MA. Novel insulin mimetic vanadium flavonol complex: synthesis, characterization and in vivo evaluation in STZ-induced rats. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;63:109-117.
25. Sastri VS, Bünzli JC, Rao VR, Rayudu GVS, Perumareddi JR. Modern aspects of rare earths and their complexes. Eds. Sastri VS, Bünzli JC, Rao VR, Rayudu GVS, Perumareddi JR. Elsevier, Amsterdam, 2003, p. 619.
26. Henmi K, Hinatsu Y, Masaki NM. Crystal Structures and Magnetic Properties of Ordered Perovskites Ba₂LnNbO₆ (Ln=Lanthanide Elements). *Journal of Solid State Chemistry*. 1999;148:353-360.
27. Szyzewski A, Lis S, Krzystek J, Staninski K, Klonkowski A, Kruczynski Z, Pietraszkiewicz M. Gadolinium(III) cryptates investigated by multifrequency EPR. *Journal of Alloys and Compounds*. 2008;451:182-185.
28. Gudasi KB, Shenoy RV, Vadavi RS, Patil MS, Patil SA, Hanchinal RR, Desai SA, Lohithaswa H. Lanthanide(III) and Yttrium(III) Complexes of Benzimidazole-2-Acetic Acid: Synthesis, Characterisation and Effect of La(III) Complex on Germination of Wheat. *Bioinorganic Chemistry & Applications*. 2006;2006:1-8.
29. Mazur M, Poprac P, Valko M, Rhodes C. 'U-spectrum' type of Gd(III) EPR spectra recorded at various stages of TEOS-based sol-gel process. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2016;79:220-227.
30. Dolg M, Stoll H, Savin A, Preuss H. Energy-adjusted pseudopotentials for the rare earth elements. *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling*. 1989;75:173-194.
31. Alkauskas A, Baratoff A, Bruder C. Gaussian Form of Effective Core Potential and Response Function Basis Set Derived from Troullier-Martins Pseudopotential: Results for Ag and Au. *Journal of Physical Chemistry A*. 2004;108:6863-6868.
32. de Souza RFV, De Giovanni WF. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005;61:1985-1990.
33. Wolfe A, Shimer GH, Meehan T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry*. 1987;26:6392-6396.
34. Essawy AA, Afifi MA, Moustafa H, El-Medani SM. DFT calculations, spectroscopic, thermal analysis and biological activity of Sm(III) and Tb(III) complexes with 2-aminobenzoic and 2-amino-5-chloro-benzoic acids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014;131:388-397.
35. Tan J, Wang B, Zhu L. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper (II) complex. *Journal of Biological and Inorganic Chemistry*. 2009;14:727-739.
36. Rusak G, Piantanida I, Masic L, Kapuralin K, Durgo K, Kopjar N. Spectrophotometric analysis of flavonoids-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions*. 2010;188:181-189.
37. Wang BD, Yang ZY, Wang Q, Cai TK, Crewdson P. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding properties of the La(III) complex with Naringenin Schiff-base. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006;14:1880-1888.
38. Buchtík R, Trávníček Z, Vančo J, Herchel R, Dvořák Z. Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(II) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone. *Dalton Transactions*. 2011;40:9404-9412.
39. Navarra M, Hernandez C, Colmenares I, Hernandez P, Fernandez M, Sierraalta A, Marchan E. Synthesis and characterization of [Au(dppz)₂]Cl₃. DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2007;101:111-116.
40. Dimiza F, Papadopoulos AN, Tangoulis V, Psycharis V, Raptopoulou CP, Kessissoglou DP, Psomas G. Biological evaluation of non-steroidal anti-inflammatory drugs cobalt(II) complexes. *Dalton Transactions*. 2010;39:4517-4528.
41. Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*. 1973;12:4161-4170.
42. Sarzehi S, Chamani J. Investigation on the interaction between tamoxifen and human holo-transferrin: Determination of the binding mechanism by fluorescence quenching, resonance light scattering and circular dichroism methods. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47:558-569.
43. Varlan A, Hillebrand M. Bovine and Human Serum Albumin Interactions with 3-Carboxyphenoxathiin Studied by Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy. *Molecules*. 2010;15:3905-3919.
44. Li Y, Yang ZY, Wang MF. Synthesis, characterization, DNA binding properties and antioxidant activity of Ln(III) complexes with hesperetin-4-one-(benzoyl) hydrazone. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009;44(11):4585-4595.

45. Wang ZM, Lin HK, Zhu SR, Liu TF, Zhou ZF, Chen RT. Synthesis, characterization and cytotoxicity of lanthanum(III) complexes with novel 1,10-phenanthroline-2,9-bis- α -amino acid conjugates. *Anti-cancer Drug Design*. 2000;15:405–411.
46. Biba F, Grossl M, Egger A, Roller A, Hartinger CG, Keppler BK. New Insights into the Chemistry of the Antineoplastic Lanthanum Complex Tris(1,10-phenanthroline)tris(thiocyanato- κ N)lanthanum(III) (KP772) and Its Interaction with Biomolecules. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2009;2009:4282–4287.
47. Khan AA, Saxena AK, Iftikhar K. Mixed-ligand lanthanide complexes—X. Interaction of trivalent lanthanides with 1,10-phenanthroline and thiocyanate in alcohol. *Polyhedron*. 1997;16:4143–4151.
48. Lin ZZ, Jiang FL, Chen L, Yue CY, Yuan DQ, Lan AJ, Hong MC. A highly symmetric porous framework with multi-intersecting open channels. *Crystal Growth Design*. 2007;7:1712–1715.
49. Lee T, Liu ZX, Lee HL. A biomimetic nose by microcrystals and oriented films of luminescent porous metal-organic frameworks. *Crystal Growth Design*. 2011;11:4146–4154.
50. Jana A, Das B, Mandal SK, Mabhai S, Khuda-Bukhsh AR, Dey S. Deciphering the CHEF-PET-ESIPT liaison mechanism in a Zn^{2+} chemosensor and its applications in cell imaging study. *New Journal of Chemistry*. 2016;40:5976–5984.
51. Seitz M, Moore EG, Raymond KN. Highly fluorescent group 13 metal complexes with cyclic, aromatic hydroxamic acid ligands. *Inorganic Chemistry*. 2008;47:8665–8673.
52. Sun YG, Sun D, Yu W, Zhu MC, Ding F, Liu YN, Gao EJ, Wang SJ, Xiong G, Dragutan I, Dragutan V. Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity of Pd(II) and Pt(II) complexes containing pyridine carboxylic acid ligands. *Dalton Transactions*. 2013;42:3957–3967.
53. Pluymers W, Pais G, Van Maele B, Pannecouque C, Fikkert V, Burke TR Jr, De Clercq E, Witvrouw M, Neamati N, Debyser Z. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integration by diketo derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46:3292–3297.