

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

– REZUMAT –

**OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA
UNOR COMPUȘI
HETEROAROMATICI CU
PROPRIETĂȚI BIOACTIVE
UTILIZÂND METODE CLASICE SAU
APARTINÂND CHIMIEI VERZI**

Doctorand,

Andreea Veronica DEDIU (BOTEZATU)

Conducător științific,

Prof. univ. dr. chim. habil. Rodica Mihaela DINICĂ

Seria C: Chimie Nr. 8

GALAȚI

2023

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

- REZUMAT -

OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR COMPUȘI
HETEROAROMATICI CU PROPRIETĂȚI BIOACTIVE UTILIZÂND
METODE CLASICE SAU APARTINÂND CHIMIEI VERZI

Doctorand

Andreea Veronica DEDIU (BOTEZATU)

Președinte

Prof. univ. dr. ing. Gabriela-Elena BAHRIM
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, România

Conducător științific,

Prof. univ. dr. chim. habil. Rodica Mihaela DINICĂ
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, România

Referenți științifici

Prof. univ. dr. chim. Sabine CHIERICI
Universitatea Grenoble Alpes, Grenoble, Franța

Prof. univ. dr. chim. habil Paizs CSABA
Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj, România

Prof. univ. dr. chim. Ionel MANGALAGIU,
Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași, România

Seria C: Chimie Nr. 8

GALAȚI

2023

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINERESTI

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria E 3: **Marketing**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**
- Seria SJ: **Drept**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE

- Seria U 1: **Filologie- Engleză**
- Seria U 2: **Filologie- Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: **Chimie**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**
- Seria F: **Farmacie**

MULȚUMIRI

**„Sunt printre cei care cred că știința are o mare frumusețe...
Am fost învățată că drumul progresului nu este nici rapid, nici ușor.” (Marie Curie)**

Fundamentarea științifică și elaborarea acestei teze de doctorat ar fi fost imposibilă fără ajutorul, sprijinul și îndrumarea unor persoane deosebite care, prin înalt grad profesional și dăruire, au contribuit la introducerea mea în lumea minunată a cercetării științifice în domeniul chimiei și formarea mea profesională.

În primul rând, sunt foarte recunoscătoare conducătorului științific și supervisorului meu, dna Prof. univ. dr. chim. habil. Rodica Mihaela Dinică, pentru îndrumarea, sprijinul, munca, dedicarea și încurajările din fiecare etapă a stagiului doctoral care au dus la atingerea acestui obiectiv important în activitatea mea profesională. Îi mulțumesc pentru oportunitatea oferită, împărtășirea cunoștințelor, sfaturile științifice valoroase, susținerea obiectivelor mele de cercetare, integrarea mea în diferite activități științifice dar și pentru deschiderea unor noi direcții de cercetare pentru viitor.

Cu deosebită considerație le mulțumesc membrilor comisiei de susținere publică, Prof. univ. dr. chim. Sabine Chierici, Prof. univ. dr. chim. habil. Paizs Csaba, Prof. univ. dr. chim. Ionel Mangalagiu, și președintelui comisiei de doctorat, Prof. dr. ing. Gabriela-Elena Bahrim, pentru onoarea de a recenza această teză de doctorat.

Aleasă considerație și mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare a tezei de doctorat, Prof. dr. habil. Geta Cârâc, Conf. univ. dr. Bianca Furdui și Prof. dr. ing. Gabriela-Elena Bahrim, pentru răbdarea, ajutorul, sfaturile oferite, evaluarea conținutului științific și realizarea acestei teze de doctorat.

Colegilor mei deosebiți din timpul doctoratului, Anna Busuioc, Mihaela Cudălbeanu, Maria Mihăilă și Fănică Bălănescu, le adresez sincere mulțumiri pentru încrederea, prietenia ajutorul și sprijinul de neprețuit. Recunoștință pentru grupul minunat de laborator, cu obiective mărețe în cercetare, susținerea reciprocă și experimentarea unei colaborări fructuoase.

Îmi exprim recunoștința întregului colectiv din cadrul Facultății de Științe și Mediu pentru tot ce m-au învățat și pentru sprijinul continuu în realizarea activităților experimentale. Mulțumiri alese colectivului din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor pentru sprijinul acordat în realizarea unor cercetări experimentale. Mulțumiri tuturor colectivelor din cadrul Universității „Dunărea de Jos” cu care am avut onoarea de a colabora.

De asemenea, mulțumiri tuturor cercetătorilor și doctoranzilor din țări francofone care au beneficiat de burse Eugen Ionescu (AUF) în cadrul Departamentului de Chimie, Fizică și Mediu, pentru colaborare și încrederea acordată.

Mulțumesc proiectului PN-III-P1-1.1-MC2019-1608 pentru finanțarea care a făcut posibilă efectuarea Stagiului de cercetare în cadrul Departamentului de Farmacochimie Moleculară (DPM), al Universității „Grenoble Alpes”, Grenoble, Franța. Alese mulțumiri colectivului DPM, în special dmei Prof. dr. chim. Martine Demeunynck, pentru oportunitatea de a efectua stagiul de mobilitate și împărtășirea cunoștințelor care mi-au fost de un real folos în cercetarea științifică. Deosebită recunoștință pentru ajutorul acordat în realizarea activităților biologice anticancer dmei. CS Fernanda Marques, „Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C2TN), Instituto Superior Técnico”, „Universidade de Lisboa”, Portugalia.

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această teză membrilor familiei care au fost alături de mine, m-au înconjurat cu afecțiune și m-au sprijinit din toate punctele de vedere. Le mulțumesc părinților și surorii care au fost foarte importanți pentru mine și m-au sprijinit necondiționat. Le mulțumesc soțului și fetei, Daria, cu care am împărțit fiecare moment de bucurie, de oboseală și de reușită din ultimii ani, care m-au sprijinit cu afecțiune și răbdare.

Mulțumiri sincere tuturor pentru susținerea din acești ani frumoși în vederea finalizării acestei teze de doctorat!

*Profesorilor și mentorilor mei, cu respect,
Familiei mele, cu dragoste,
Chim. Andreea Veronica DEDIU (BOTEZATU)*

Cuprins

INTRODUCERE	8
I. STUDIUL DOCUMENTAR	24
CAPITOLUL 1. Date din literatura de specialitate privind obținerea compușilor studiați	25
1.1. Metode convenționale de sinteză.....	25
1.1.1. Sinteza sărurilor cuaternare de piridiniu.....	25
1.1.2. Sinteza compușilor indoliziniici.....	28
1.2. Metode neconvenționale („metode verzi”)	37
1.2.1. Sinteza sărurilor cuaternare de piridiniu prin metode neconvenționale.....	39
1.2.2. Sinteza compușilor indoliziniici prin metode neconvenționale.....	43
1.3. Sinteza parțială a datelor prezentate în cadrul acestui capitol	53
CAPITOLUL 2. Aplicațiile practice ale claselor de compuși studiate	54
2.1. Implicațiile practice ale sărurilor cuaternare de piridiniu	54
2.2. Implicațiile practice ale compușilor indoliziniici	60
2.3. Sinteza parțială a datelor prezentate în cadrul acestui capitol	65
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	66
CAPITOLUL 3. Pregătirea compușilor N-heterociclici prin cataliză clasică	67
3.1. Introducere.....	67
3.2. Obiective științifice specifice.....	68
3.3. Sinteza de săruri cuaternare de piridiniu.....	68
3.4. Sinteza de compuși indoliziniici.....	72
3.5. Sinteza de compuși hibridi indoliziniil-piridiniu	78
3.6. Sinteza unui nou complex mixt de lantan (III) care încorporează o ilidă de bipyridiniu	81
3.7. Metode și tehnici de analiză structurală a compușilor organici N-heterociclici sintetizați	82
3.8. Rezultate și discuții.....	83
3.9. Sinteza parțială a rezultatelor obținute în acest capitol	97
CAPITOLUL 4. Generarea de săruri dicuaternare simetrice de bipyridiniu prin cataliză neconvențională	99
4.1. Introducere.....	99
4.2. Obiective științifice specifice.....	100
4.3. Sinteza de săruri dicuaternare de piridiniu.....	100
4.4. Rezultate și discuții.....	105
4.5. Sinteza parțială a datelor obținute.....	109
CAPITOLUL 5. Generarea de bis-indolizine simetrice prin cataliză neconvențională. 110	110

5.1. Introducere.....	110
5.2. Obiective științifice specifice.....	111
5.3. Sinteza de compuși indoliziniici prin biocataliză	111
5.3.1. Biocataliza cu enzime din surse vegetale aplicată în sinteza compușilor indoliziniici.....	111
5.3.2. Biocataliza enzimatică cu enzime pure în sinteza compușilor indoliziniici	113
5.4. Cataliza neconvențională cu sistemul catalitic I ₂ /H ₂ O ₂ aplicat în sinteza compușilor indoliziniici.....	114
5.5. Metode de analiză aplicate în purificarea și caracterizarea compușilor indoliziniici obținuți prin <i>metode verzi</i>	115
5.6. Procesarea statistică a rezultatelor obținute	116
5.7. Rezultate și discuții	116
5.8. Sinteza parțială a rezultatelor obținute.....	125
CAPITOLUL 6. Evaluarea citotoxicității unor săruri cuaternare de piridiniu și a unor indolizine studiate	126
6.1. Obiective științifice specifice.....	127
6.2. Evaluarea impactului unor săruri cuaternare de piridiniu și indolizine studiate asupra germinării semințelor de plante	127
6.3. Studii de evaluare a toxicității unor compuși indoliziniici asupra microorganismului <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	129
6.4. Procesarea statistică a rezultatelor obținute	131
6.5. Rezultate și discuții	132
6.5.1 Citotoxicitatea unor compuși studiați evaluată prin testul <i>Triticum aestivum</i>	132
6.5.2. Impactul unor compuși indoliziniici asupra creșterii drojdiei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	140
6.6. Sinteza parțială a rezultatelor prezentate în cadrul acestui capitol	146
CAPITOLUL 7. Evaluarea unor proprietăți biologice active.....	147
7.1. Introducere.....	147
7.2. Obiective științifice specifice.....	148
7.3. Determinarea proprietăților antimicrobiene.....	148
7.4. Determinarea proprietăților antioxidante	149
7.5. Determinarea proprietăților anticancer	150
7.6. Activitatea antineurodegenerativă	152
7.7. Evaluarea potențialului antiinflamator	154
7.8. Analize statistice ale rezultatelor obținute.....	155
7.9. Rezultate și discuții.....	155
7.9.1. Determinarea proprietăților antimicrobiene	155
7.9.2. Determinarea proprietăților antioxidante	158
7.9.3. Determinarea proprietăților anticancer	162

7.9.4. Evaluarea activității antineurodegenerative	169
7.9.5. Evaluarea potențialului antiinflamator	183
7.10. Sinteza parțială a datelor prezentate în acest capitol	183
CAPITOLUL 8. Analiza unor compuși sintetizați prin studii <i>in silico</i> (modelare moleculară)	185
8.1. Introducere	185
8.2. Obiective științifice specifice	186
8.3. Determinarea descriptorilor moleculari ADMET	187
8.4. Calcule de andocare moleculară	187
8.5. Rezultate și discuții	188
8.6. Sinteza parțială a datelor prezentate în acest capitol	193
CAPITOLUL 9. Concluzii generale și elemente de originalitate	194
9.1. Concluzii generale și elemente de originalitate	194
9.2. Perspective de cercetare viitoare	197
CAPITOLUL 10. Diseminarea rezultatelor	198
ANEXE	205
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	229

INTRODUCERE

Compușii cu nucleu piridinic au atras atenția pentru potențialele aplicații în diverse domenii precum biochimie, știința materialelor, medicină sau biologie moleculară, datorită diferitelor lor structuri chimice, proprietăților fizice și electrice precum electrocromice sau fluorescente [1,2].

Piridina și derivații acesteia prezintă o gamă largă de activități biologice, cum ar fi antitumorale, antiparazitare, antimicrobiene, antiinflamatorii, antidiabetice, antivirale și antipiretice [3,4].

Deși au fost dezvoltate mai multe căi de sinteză pentru obținerea acestor compuși importanți, cele mai multe dintre ele prezintă multe dezavantaje precum catalizatorii scumpi, reactivii și solvenții toxici, temperaturile ridicate, randamente scăzute de reacție sau etapele multiple ale procesului sintetic.

Prin urmare, datorită aplicațiilor compușilor cu nucleu piridinic, o direcție de cercetare de mare interes o reprezintă dezvoltarea unor metode de sinteză noi sau îmbunătățite pentru obținerea acestora, cu substraturi variate și cu randamente mai bune de reacții.

Atenția pentru problemele de mediu, cum ar fi problemele legate de poluare și nevoia de noi surse de energie și materii prime, a crescut semnificativ în ultimii ani. Procesele tradiționale de chimie industrială sunt de obicei concentrate pe optimizarea eficienței reacției și a randamentului chimic. Datorită reglementărilor legislative din ce în ce mai stricte și a conștientizării tot mai mari în comunitatea științifică a problemelor care apar din producerea intensivă a deșeurilor toxice și poluante, în prezent este binecunoscut faptul că producerea deșeurilor și/sau utilizarea de substanțe chimice periculoase trebuie luate în considerare la estimarea eficienței unui proces. În urmă cu aproximativ 30 de ani, a început să apară o nouă abordare a chimiei, care în prezent se numește „chimie verde” și care se remarcă prin proiectarea produșilor de reacție și a proceselor care reduc sau elimină utilizarea sau generarea de substanțe periculoase [5]. Această perspectivă presupune o previzionare a impactului asupra mediului înconjurător atunci când se proiectează un compus chimic sau procesul prin care va fi fabricat la scară largă. În contextul *chimiei verzi*, sunt dezvoltate noi instrumente care îmbină armonios considerente de design, proces, toxicologie și materiale finite cu exemple demonstrate experimental de implementare cu succes a unor procese în scop comercial.

Se încearcă dezvoltarea de metode care să producă cantități reduse de deșeuri, consum redus de energie și costuri reduse. Dezvoltarea unor sisteme catalitice eficiente și utilizarea unor medii alternative de reacție sunt instrumente puternice pentru a atinge ținta unei *chimii durabile* atât din punct de vedere economic, cât și din punct de vedere ecologic.

Această teză de doctorat descrie câteva exemple despre modul în care utilizarea unui sistem catalitic neconvențional cuplat cu medii de reacție adecvate pot oferi o îmbunătățire semnificativă a rezultatelor împreună cu o scădere a riscului de poluare a mediului.

Încorporarea *chimiei verzi* este esențială pentru implementarea unor procese sustenabile și prietenoase cu mediul înconjurător, iar această teză de doctorat reprezintă un pas important în catalizarea acestei viziuni.

În acest context, teza de doctorat a avut drept scop principal utilizarea unor metode neconvenționale pentru sinteza unor compuși heterociclici cu azot și compararea acestora cu metodele clasice, urmărind evaluarea unor proprietăți biologice active ale acestora.

Îndeplinirea scopului principal al tezei de doctorat s-a realizat prin urmărirea următoarelor obiective științifice specifice:

- dezvoltarea unor metode noi de sinteză, convenționale și neconvenționale, a compușilor heterociclici cu azot cu diversitate structurală (săruri cuaternare de piridiniu, indolizine, hibridi indolizininil-piridiniu, complecși metalici);
- caracterizarea structurii compușilor sintetizați prin metode clasice și neconvenționale;
- evaluarea toxicității unor compuși studiați, din clasa sărurilor cuaternare de piridiniu și din clasa indolizinelor, asupra germinării semințelor de grâu (*Triticum aestivum*);
- investigarea citotoxicității unor compuși indolizinicici pe microorganismul model, drojdia *Saccharomyces cerevisiae*, în timpul proceselor de multiplicare și fermentație alcoolică;
- investigarea unor proprietăți biologice active ale unor compuși heterociclici cu azot (săruri cuaternare de piridiniu, indolizine, hibridi de indolizininil-piridiniu, complecși metalici) precum antimicrobiene, antioxidante, anticancer, antineurodegenerative și antiinflamatorii;
- evaluarea *in silico* a unor compuși N-heterociclici împotriva maladiei Alzheimer prin determinarea interacțiunilor intra-moleculare precum și a afinității de legare de molecula țintă.

Teza de doctorat este împărțită în **două părți principale** care sunt structurate în **zece capitole**. Prima parte a tezei de doctorat, pune în evidență studiile recente din literatura de specialitate în dezvoltarea de noi derivați de săruri de piridiniu și indolizine prin reacții clasice sau neconvenționale.

Primul capitol oferă o introducere generală în dezvoltarea de noi derivați de săruri de piridiniu și indolizine prin reacții clasice sau neconvenționale. Capitolul este axat pe descrierea, conform datelor din literatură, a reacțiilor de obținere pentru aceste clase de compuși și a condițiilor catalitice utilizate, fiind concentrat pe aspecte generale, cele mai interesante și recente aplicații ale catalizei în medii clasice sau neconvenționale. „Chimia verde” a fost utilizată în ultimii ani pentru sinteza unei varietăți de heterocicluri cu azot și contribuțiile aduse în acest domeniu sunt tratate în acest capitol.

Al doilea capitol descrie o gamă largă de aplicații practice ale compușilor heterociclici cu azot care variază în funcție de structura chimică a acestora. Sunt evidențiate sărurile cuaternare de piridiniu și indolizinele ca molecule active farmaceutic și biologic dar care au aplicații și în știința materialelor, bioimagistică, chimie, industria alimentară și medicină.

Reacțiile clasice de sinteză sunt utilizate pe scară largă pentru diferite transformări organice, iar **Capitolul 3** tratează diferitele reacții clasice în solvenți organici aplicate în sinteza sărurilor cuaternare de piridiniu, derivaților indolizinicici și hibridilor indolizininil-piridiniu din această teză de doctorat. De asemenea, este prezentată o metodă nouă de sinteză a complecșilor metalici ce încorporează ilide N-heterociclice. Compușii obținuți prin sinteze clasice sunt caracterizați prin tehnici moderne de analiză, precum analiza elementală, analizele IR, RMN și MS.

Condițiile catalitice prezintă o importanță ridicată în multe reacții organice și, prin urmare, o descriere a efectului condițiilor de reacție neconvenționale, precum asistarea cu ultrasunete sau microunde în obținerea de săruri cuaternare de piridiniu, este prezentată în **Capitolul 4**. În **Capitolul 5** sunt prezentate metode de sinteză ale „chimiei verzi” care utilizează biocataliza cu enzime vegetale, enzime pure (comerciale) precum și sistemul catalitic neconvențional I_2/H_2O_2 . De asemenea, sunt prezentate metodele utilizate pentru purificarea și caracterizarea structurală a derivaților indolizinicici.

Sărurile cuaternare de piridiniu și compușii indolizinicici prezintă diverse aplicații medicale, biologice, farmaceutice și alimentare printre altele. Pentru a putea selecta un posibil medicament sau germicid, compușii țintă trebuie să fie lipsiți de toxicitate sau cu toxicitate redusă față de microorganismele benefice, plante, animale și oameni. În acest context, în **Capitolul 6**, sunt prezentate rezultatele originale obținute în urma evaluării toxicității acestor

compuși, în cazul potențialei utilizări ca medicamente, toxicitate care a fost evaluată pe plante și microorganisme model. Selectarea moleculelor prin tehnici moderne de analiză și evaluarea interacțiunilor medicament-moleculă țintă, pot să ofere avantaje importante în chimia farmaceutică și farmacoterapie. Prin urmare, în contextul dificultății de tratare a numeroaselor afecțiuni, **Capitolul 7** tratează diferite metode de evaluare a potențialului biologic activ al compușilor heterociclici cu azot și rezultatele originale obținute.

Luând în considerare potențialul sărurilor de biperidiniu, indolizinelor cât și al hibridilor indolizinin-piridiniu ca antioxidanți și inhibitori de colinesteraze, **Capitolul 8** descrie evaluarea factorilor implicați în inhibarea colinesterazei prin calcule de andocare moleculară cu cele mai relevante molecule hibride, precum și influența structurilor acestora asupra modurilor de legare de moleculele țintă.

Capitolul 9 dezvăluie concluziile generale și elementele de originalitate ale acestei teze de doctorat. Rezultatele obținute au condus la sinteza și caracterizarea structurală a unor compuși heterociclici cu azot cu diversitate structurală prin metode clasice și neconvenționale, care ar putea contribui la procesul complex de identificare a unor potențiale medicamente sau germicide pentru o gamă largă de aplicații practice. În final, **Capitolul 10** prezintă diseminarea rezultatelor obținute în această teză de doctorat.

CAPITOLUL 3. Pregătirea compușilor N-heterociclici prin cataliză clasică

3.1. Introducere

Sinteza compușilor studiați din această teză (săruri cuaternare de piridiniu, indolizine, complecși metalici) a fost realizată pornind de la trei compuși biperidिनici (Figura 3.1).

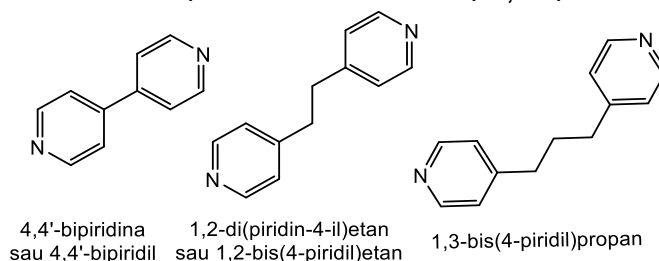


Figura 3.1. Structura chimică a compușilor biperidिनici utilizați ca reactanți de bază în reacțiile de sinteză

3.2. Obiective științifice specifice

Obiectivul științific specific al acestui capitol a constat în sintetiza de compuși heterociclici cu azot (săruri cuaternare de piridiniu, indolizine, hibridi indolizinin-piridiniu, complecși metalici) prin metode de obținere convenționale (clasice).

3.3. Sinteza de săruri cuaternare de piridiniu

Sărurile cuaternare de piridiniu au fost preparate convențional folosind metodologia selectată din literatura de specialitate, în acetonitril ca solvent, în condiții de reflux prin încălzire convențională și agitare continuă până la 48 h (Figura 3.3) [274,285]. Sărurile bis-cuaternare simetrice de dipiridiniu S1a–e au fost preparate folosind o metodologie convențională raportată în literatură [285], din 4,4'-bipiridil și derivați halogenați folosind un raport stoichiometric 1:2 (Figura 3.4), în acetonitril anhidru la reflux. Sărurile bis-cuaternare de biperidiniu S1a-e s-au obținut după 12-24 h de reacție, cu încălzire convențională la 80°C (Tabelul 3.1). ScPy obținute au fost uscate la etuvă, păstrate în flacoane la temperatura camerei și utilizate în analizele ulterioare. Compușii obținuți prin sinteză chimică au prezentat randamente ridicate (85-95% ± 1%) și puncte de topire înalte (>300°C). Sinteza sărurilor bis-cuaternare S2a–q a fost realizată prin alchilarea 1,2-di(piridin-4-il)etanului cu reactivi halogenați reactivi (Figura 3.5), în

acetonitril anhidru, printr-o metodă convențională raportată în literatura de specialitate [50,274].

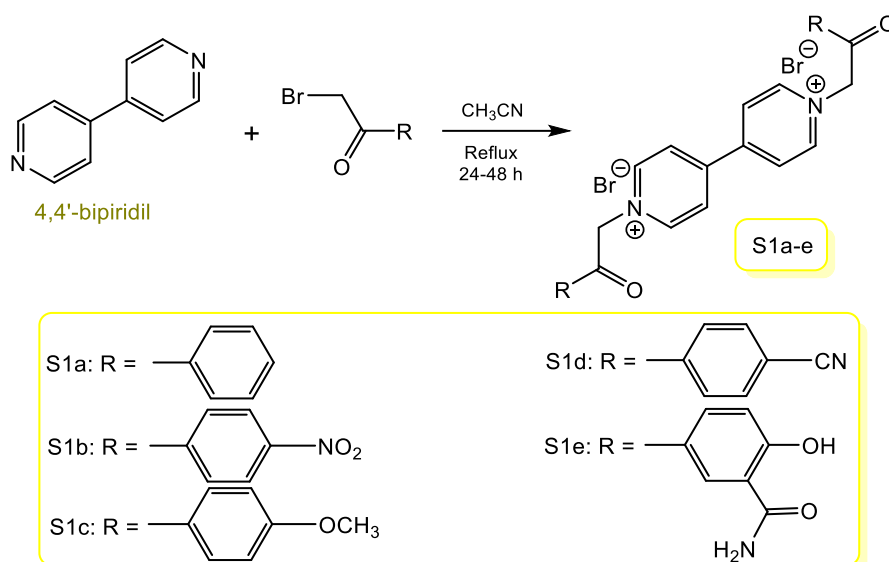


Figura 3.4. Sinteza convențională a sărurilor bis-cuaternare de bipiridiniu S1a-e

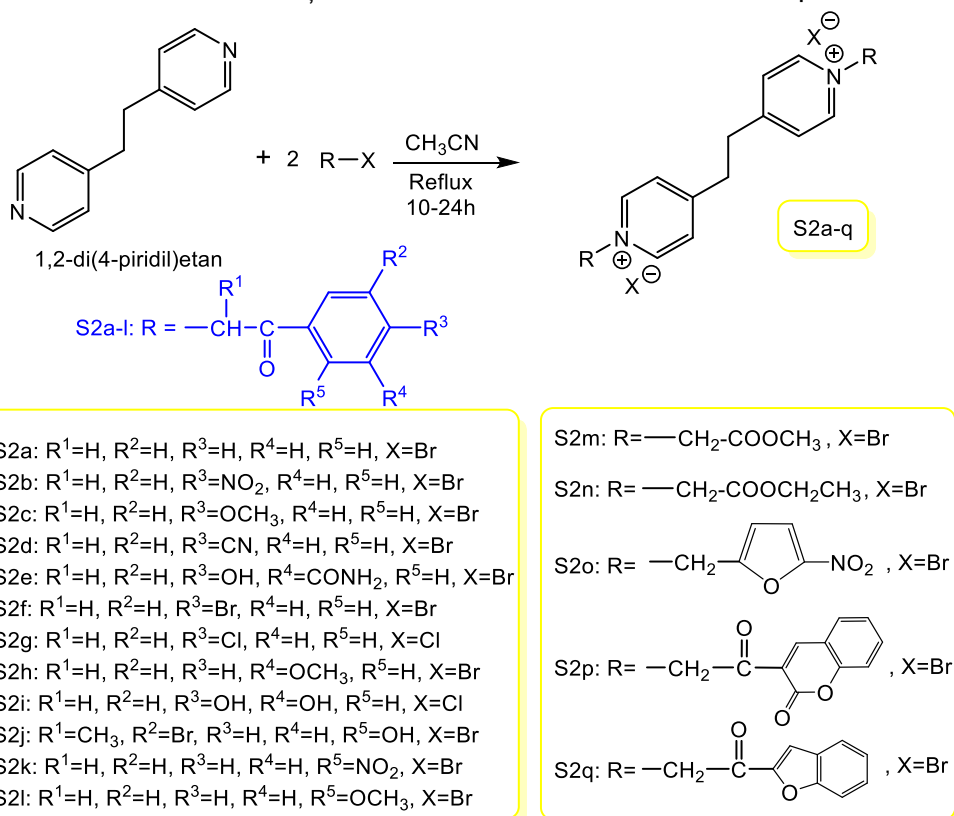


Figura 3.5. Sinteza convențională a sărurilor bis-cuaternare de bipiridiniu S2a-q derivate de la 1,2-di(piridin-4-il)etan

3.4. Sinteza de compuși indolizini

Sărurile de piridiniu au proprietatea de a forma ilide de piridiniu în mediu bazic, această proprietate fiind importantă în sinteza de alți compuși heterociclici prin reacții de cicloadiție dipolară [36]. Compușii indolizini au fost preparați folosind metodologia prezentată în Figura 3.6, conform metodologiei de sinteză clasică selectată din literatură [22,36,279].

O serie de compuși indoliziniici au fost preparați pornind de la 1 mmol de sare bis-cuaternară de bipiridiniu (S1a-e) și 2 mmoli de alchină activată (propiolat de etil). Amestecul de reacție a fost agitat continuu (500 rpm) și încălzit convențional (Figura 3.7).

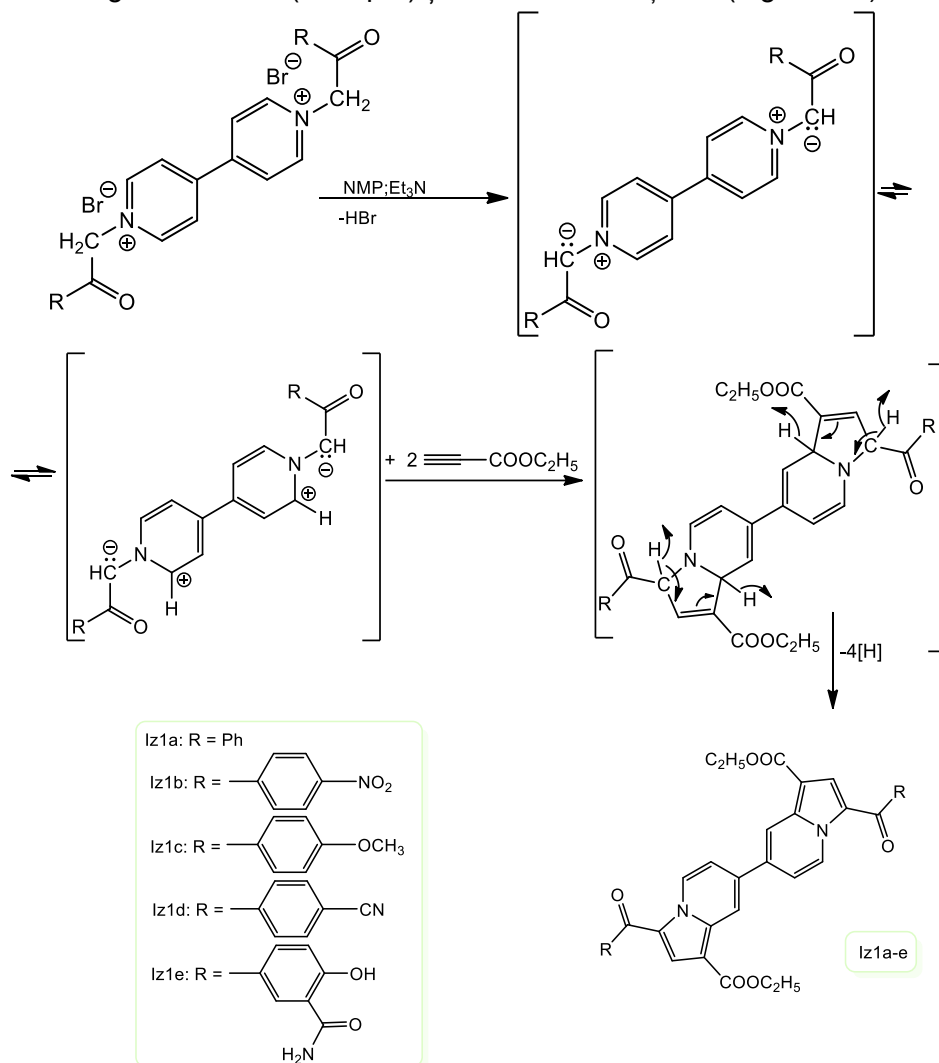


Figura 3.7. Calea generală de sinteză clasică a bis-indolizinelor Iz1a-e din săruri cuaternare de bipiridiniu și mecanismul de reacție implicat

O altă serie de derivați indoliziniici au fost generați din reacția a 1 mmol de sare bis-cuaternară de bipiridiniu (S2a-e) și 2 mmoli de alchină activată (propiolat de etil), amestecul de reacție a fost agitat continuu (500 rpm), până la 24 ore și cu încălzire convențională pe agitator magnetic (Figura 3.8). Compușii au fost precipitați din mediul de reacție cu metanol, eter etilic sau apă și apoi purificați prin recristalizare. S-au preparat o serie de monoindolizine nesimetrice bipiridinice prin metode deja raportate în literatură [287,351]. 4,4'-bipiridil, 1,2-di(4-piridil)etanul și 1,3-bis(4-piridil)propanul au fost utilizați drept substrat în obținerea indolizinelor Iz1-f, Iz2-f, Iz-2g, Iz3-a și Iz3-b (Figura 3.9, Tabelul 3.3). Pentru a prepara acești compuși, 4,4'-bipiridil a fost mai întâi monoalchilată înainte de ciclizare cu propiolat de etil.

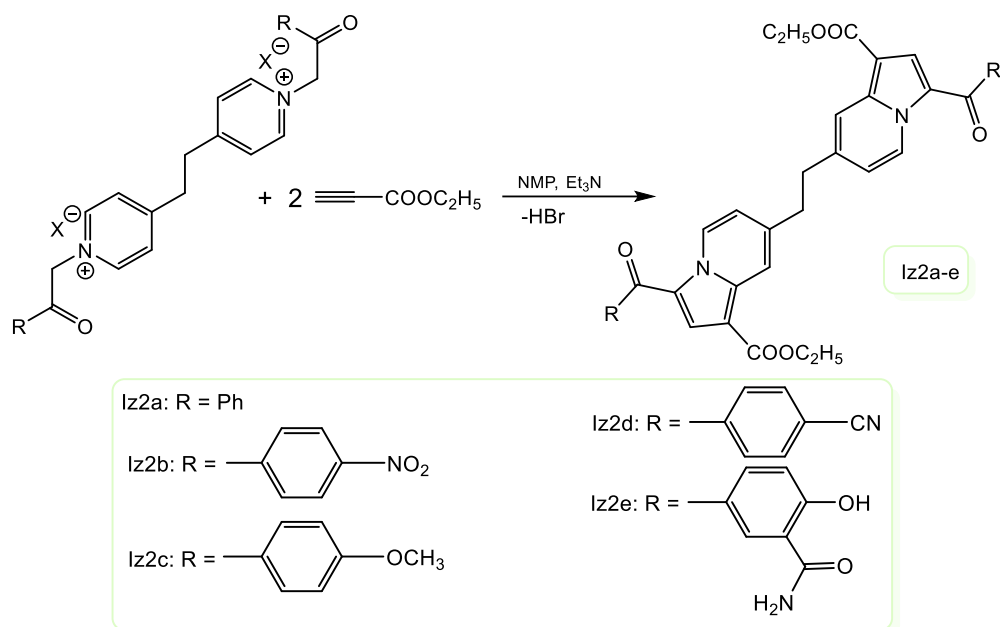


Figura 3.8. Calea generală de sinteză clasică a unor bis-indolizine din ScPy derivate de la 1,2-di(piridin-4-il)etan

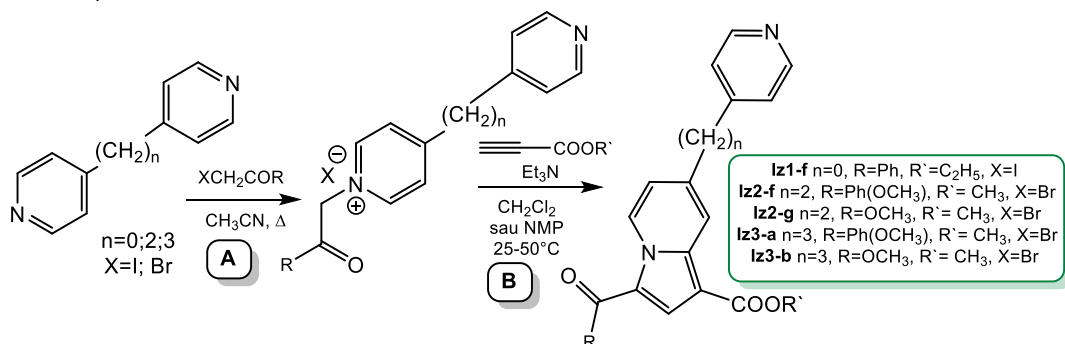


Figura 3.9. Calea generală de sinteză clasică a mono-indolizinelor

3.5. Sinteza de compuși hibridi indolizinin-piridiniu

Pentru a prepara o serie de hibridi N-indolizinin-alchilpiridiniu (Iz-Py) cu diversitate structurală, s-a variat atât natura bipiridinelor inițiale, cât și cea a substituenților N-alchilici. Au fost concepute două strategii, ambele bazate pe formarea nucleului de indolizină prin cicloadiția 1,3-dipolară a alchinelor cu ilide formate *in situ* din săruri de piridină substituite corespunzător (Figura 3.10). După cum s-a raportat deja [287,351] compușii Iz-Py-1, Iz-Py-2 și Iz-Py-3 au fost obținuți prin monometilarea controlată a 4,4'-bipiridilului în acetonă, urmată de o a doua etapă de alchilare cu iodoacetofenonă care a generat sărurile nesimetrice de bipiridiniu bis-alchilate și apoi au fost supuse monocicloadiției regioselective cu propiolat de etil pe fragmentul generator de ilidă (Figura 3.10.a). Pentru seria Iz-Py-1-Iz-Py-11, cu 2 sau respectiv 3 atomi de carbon între cele două inele piridinice, moleculele diferă în mare parte prin natura grupării N-alchil-piridiniu (Figura 3.10.b). S-a constatat experimental că protocolul optim de sinteză implică generarea mai întâi a nucleului de indolizină, și apoi cuaternizarea indolizinin-piridinelor rezultate prin utilizarea diversilor agenți de alchilare (Figura 3.11, Tabelul 3.4). După cum s-a raportat deja în literatura de specialitate [287], compușii Iz-Py-1, Iz-Py-2 și Iz-Py-3 au fost obținuți prin monometilarea controlată a 4,4'-bipiridilului, urmată de o a doua etapă de alchilare cu iodoacetofenonă care a generat sărurile de bipiridiniu bis-alchilate nesimetrice și apoi au fost supuși cicloadițiilor regioselective cu propiolat de etil pe fragmentul formator de ilide.

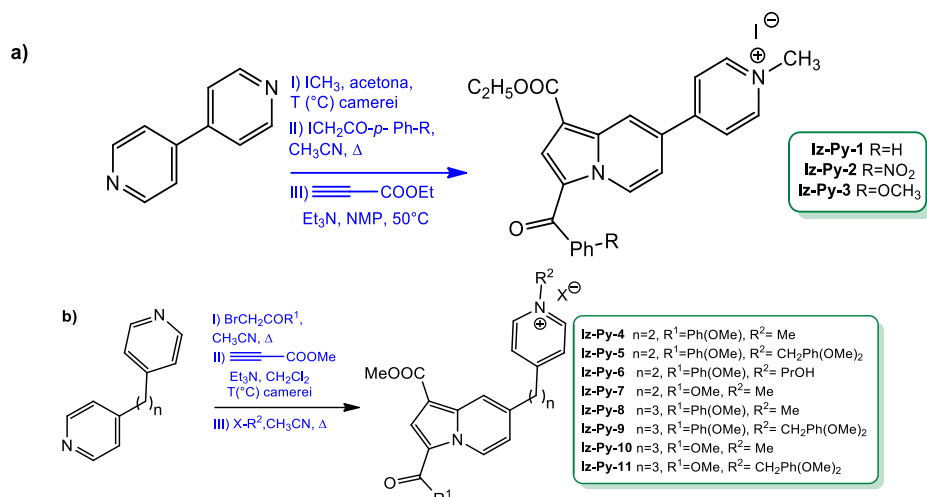


Figura 3.10. Căile generale de sinteză a unei serii de hibridi N-indolizininil-alkilpiridiniu (**Iz-Py**)

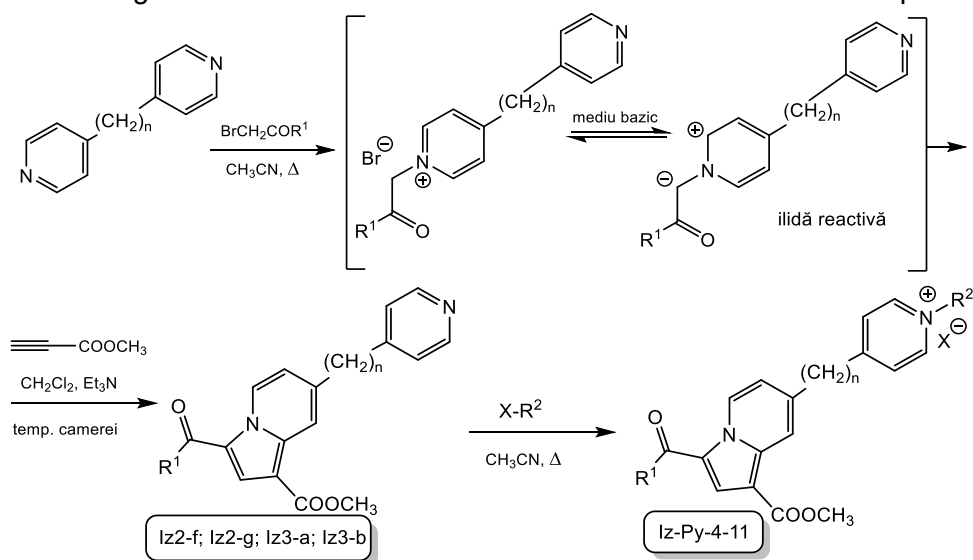


Figura 3.11. Căile generale de sinteză a unor hibridi N-indolizininil-alkilpiridiniu și mecanismul de reacție implicat

3.6. Sinteza unui nou complex mixt de lantan (III) care încorporează o ilidă de biperidiniu

Proligandul utilizat pentru sinteza unui complex mixt de lantan (III) a fost sarea bis-cuaternară de biperidiniu S1-a (Figura 3.12), care a fost preparat prin metoda descrisă în subcapitolul 3.2 [50].

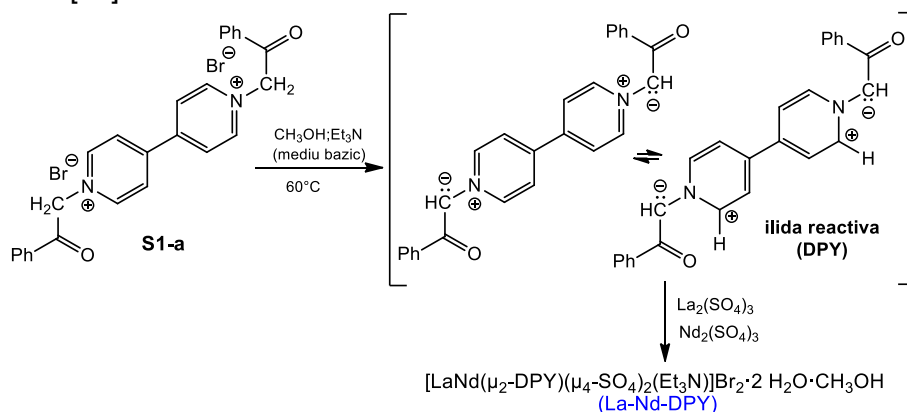


Figura 3.13. Sinteza complexului mixt Ln(III) – ilidă (La-Nd-DPY) din sarea cuaternară de biperidiniu S1-a și mecanismul de formare al ilidei reactive în mediul bazic

Un complex metalic mixt de La și Nd a fost sintetizat prin dizolvarea a 0,5 mmol S1-a într-un balon cu fund rotund, adăugarea a 0,33 mmoli sulfat de lantan(III) în 20 mL de metanol, sub încălzire la 60°C și agitare (300 rpm). S-a adăugat 1 mL de trietilamină (Et₃N) și s-a observat o schimbare de culoare de la galben deschis la violet, virajul de culoare fiind specific reacției de formare a ilidei corespunzătoare (Figura 3.13).

3.8. Rezultate și discuții

Caracterizarea sărurilor cuaternare de piridiniu

Sărurile bis-cuaternare de biperidiniu S1a-e și S2a-q au fost sintetizate după metodologia prezentată în literatura de specialitate [36,50,192,274], iar analizele experimentale efectuate au confirmat structura acestora. Acești compuși s-au sintetizat în acetonitril anhidru prin încălzire convențională la reflux, sub agitare continuă timp de 12-48 h.

Structura chimică a compușilor sintetizați și puritatea au fost demonstrate prin analize elementale, spectrofotometrice și cromatografice.

Spectrele FT-IR ale compușilor sintetizați au fost investigate în domeniul de frecvență 4.000–400 cm⁻¹, iar benzile observate confirmă structurile chimice propuse (Figura 3.14 și Anexele A1-A12). În spectrele FT-IR ale compușilor noi sintetizați S1d, S1e, S2d și S2e au fost, de asemenea, identificate benzile specifice legăturilor din structurile chimice propuse (Figura 3.14.a-d). Compușii sintetizați au fost caracterizați și prin spectrele RMN protonice și carbonice, semnalele specifice protonilor și atomilor de carbon din structurile chimice ale compușilor sintetizați fiind atribuite conform datelor din literatura de specialitate [354–357].

Sinteza compușilor indolizinic

Bis-indolizinele simetrice Iz1a-c și Iz2a-c au fost preparate din sărurile corespunzătoare de 4,4'-biperidiniu și de 1,2-di(4-piridiniu) etan. Reacțiile de sinteză au fost bazate pe formarea inelului de indolizină prin cicloadiția 1,3-dipolară a alchinelor cu ilide formate *in situ* din săruri de piridiniu substituite corespunzător.

Structura chimică a compușilor sintetizați și puritatea au fost demonstrate prin analize elementale, spectrofotometrice și cromatografice. Spectrele FT-IR ale compușilor sintetizați Iz1a-e și Iz2a-e au fost investigate în domeniul de frecvență 400–4.000 cm⁻¹, iar benzile din spectrele obținute confirmă structurile chimice propuse. Spectrele FTIR ale compușilor Iz1a-c sunt reprezentate în Figura 5.9 și pentru compușii Iz1d-e și Iz2a-e în Anexele A13-A19). Structurile indolizinelor au fost confirmate în continuare prin analiza ¹H-RMN.

Caracterizarea structurală a hibrizilor de indolizinin-piridiniu

În această teză, s-a preparat o serie de hibrizi N- indolizinin-piridiniu cu diversitate structurală variind atât natura bis-piridinelor inițiale, cât și pe cea a substituenților N-alchilici. Au fost concepute două strategii, ambele bazate pe formarea inelului de indolizină prin cicloadiția 1,3-dipolară a alchinelor cu ilidele formate *in situ* din săruri de piridiniu substituite corespunzător. După cum s-a raportat deja în literatura de specialitate, compușii Iz-Py-1, Iz-Py-2 și Iz-Py-3 au fost obținuți prin monometilarea controlată a 4,4'-biperidilului, urmată de o a doua etapă de alchilare cu iodoacetofenonă care a generat sărurile de biperidiniu bis-alchilate nesimetrice și apoi au fost supuse monocicloadiției regioselective cu propiolat de etil pe fragmentul formator de ilide. Pentru a prepara analogul de piridină Iz1-f, 4,4'-biperidilul a fost mai întâi alchilat cu iodoacetofenonă înainte de ciclizare cu propiolat de etil.

Monoindolizinele rezultate de tip indolizinin-piridine, Iz2-f, Iz2-g, Iz3-a și Iz3-b au fost izolate cu randamente de 12-51%. Etapa finală de reacție cu diverși agenți de alchilare a fost realizată în CH₃CN pentru a rezulta sărurile de indolizinin-piridiniu Iz-Py-4-Iz-Py11 cu randamente bune până la excelente (50-100%). Trei dintre intermediarii piridin-indolizine, Iz2-g, Iz3-a și Iz3-b, au fost selectați pentru evaluarea biologică ca analogi neutri. Compușii au prezentat o puritate ridicată, așa cum s-a evaluat prin analize spectrofotometrice,

cromatografice și elementale, și au fost utilizate fără purificare suplimentară. Spectrele ^1H și ^{13}C RMN sunt colectate în Anexele A47-A71.

Sinteza unui complex mixt de lantan (III) care încorporează o ilidă de biperidiniu

Într-un studiu recent, s-au utilizat sulfați de Ln(III) (Ln = La, Nd) pentru a sintetiza doi noi complecși homo-metalici dinucleari de Ln(III) care încorporează o ilidă de biperidiniu [374]. Pentru a oferi mai multe valențe aplicative unor liganzi N-heterociclici, s-a urmărit în această teză crearea de noi specii de coordinare care să conțină atât compuși viologeni, cât și lantanide, precum și evaluarea proprietăților biologice ale acestora. Sinteza, caracterizarea și proprietățile biologice ale noului complex mixt de Ln(III) au fost realizate cu scopul de a obține un complex cu potențial îmbunătățit ca agent anticancerigen.

Noul complex mixt de Ln (III) s-a obținut cu un randament de 60%. La-Nd-DPY a fost izolat sub forma unei pulberi violet, stabilă în prezența aerului și a umidității, fiind solubil în DMSO și DMF, slab solubil în alcoolii, acetonă, acetonitril și apă. Analiza prin difracție cu raze X pe pulbere (PXR- engl. „powder X-ray diffraction”) a relevat natura amorfă a complexului. Modelele experimentale PXR atât pentru compușii complecși, cât și pentru cei inițiali, înregistrate în scop comparativ în domeniul $2\theta = 15-90^\circ$, sunt prezentate în Figura 3.17. Cu toate acestea, diferite instrumente de caracterizare, cum ar fi spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), analiza elementală, spectrometria de masă cu ionizare electrospray (ESI-MS) spectroscopie UV-Vis și analiza termogravimetrică (TGA), au fost folosite pentru a propune structura pentru La-Nd-DPY. Analiza elementală a dus la ipoteza formulei stoichiometrice a complexului nou obținut, ca fiind de tipul $[\text{LaNd}(\mu_2\text{-DPY})(\mu_4\text{-SO}_4)_2(\text{Et}_3\text{N})]\text{Br}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{CH}_3\text{OH}$.

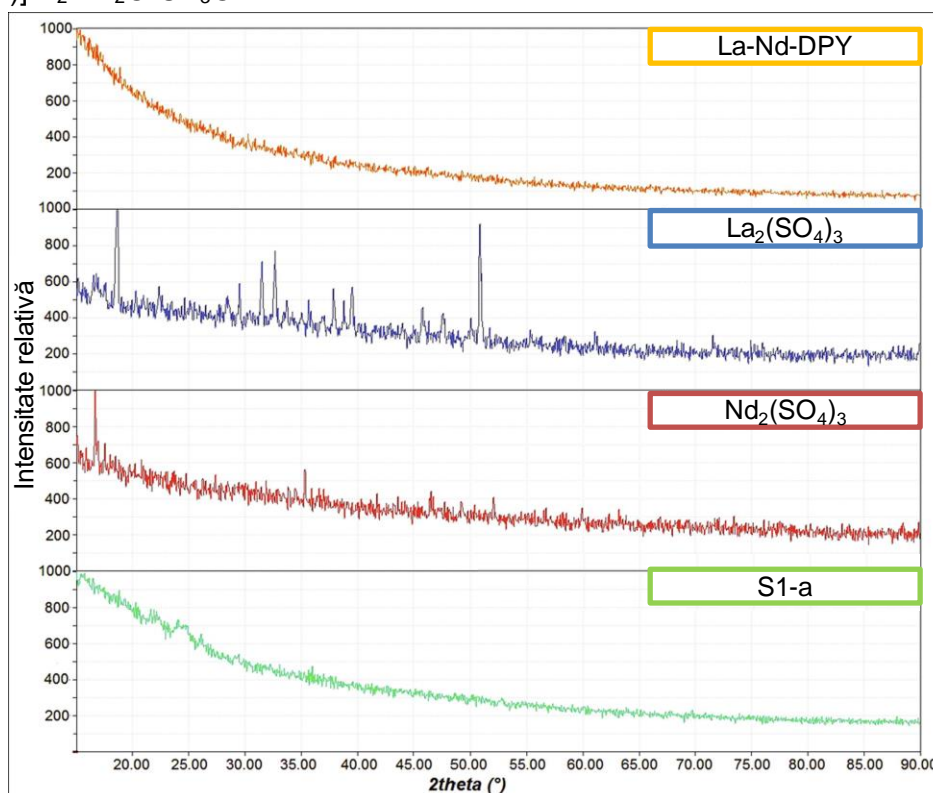


Figura 3.17. Difractograme de raze X pe pulbere pentru probele indicate în domeniul $2\theta=15-90^\circ$. La-Nd-DPY (portocaliu), sulfat de La(III) (albastru), sulfat de Nd(III) (roșu) și S1-a (verde)

Spectrul IR al complexului mixt La-Nd-DPY (Figura 3.18) prezintă benzi de absorbție slabe și medii în regiunea $1.640-1.440\text{ cm}^{-1}$, care sunt atribuite vibrațiilor de întindere ale legăturilor duble C=C și C=N din nucleele de fenil și respectiv de piridină din structura ilidei [41].

Analiza termogravimetrică (TGA) a fost utilizată pentru a evalua stabilitatea termică a complexului mixt Ln(III) obținut și principalele pierderi de masă înregistrate la încălzire.

Analiza prin cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS) a permis identificarea unor fragmente ale complexului analizat, cu apariția unor peak-uri caracteristice intense în intervalul 0–500 (m/z), corespunzătoare ilidei, și peak-uri mai puțin intense după m/z 500, corespunzătoare fragmentelor pe bază de lantanide (Figura 3.21, Tabelul 3.5).

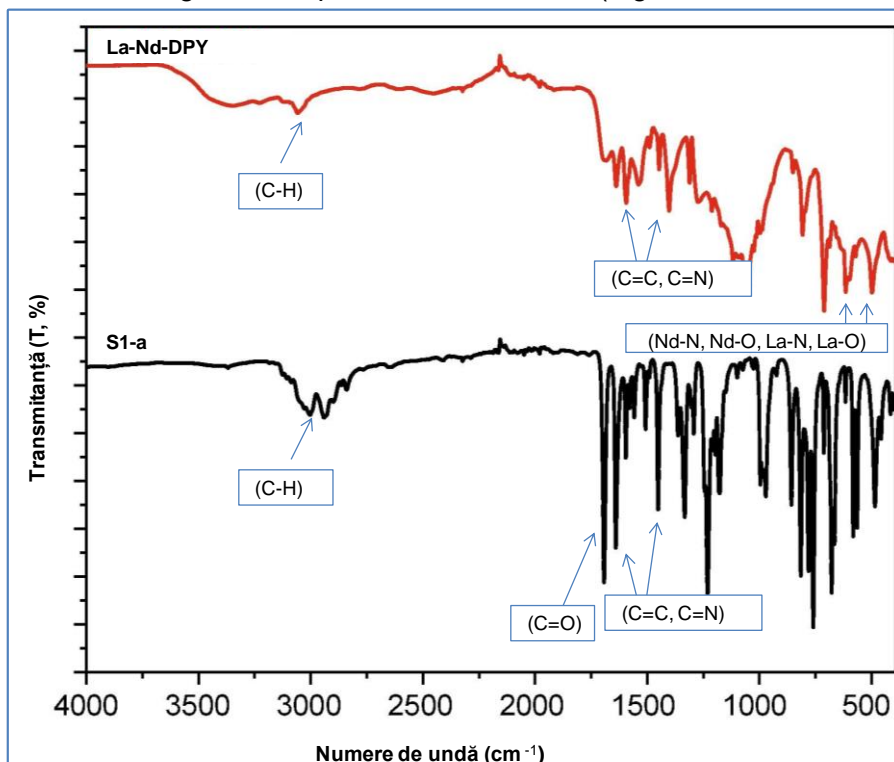


Figura 3.18. Suprapunere de spectre IR ale sării cuaternare de biperidiniu S1-a (negru) și complexului mixt La-Nd-DPY (roșu)

Toate rezultatele analizelor structurale descrise mai sus au permis propunerea unui model structural pentru complexul mixt La-Nd-DPY sub forma unui polimer de coordinare, ale cărui unități monomerice sunt constituite dintr-un ligand organic N-heterociclic DPY (ilida compusului S1-a), un ion La(III), un ion Nd(III), două grupări sulfat și o moleculă de trietilamină (Figura 3.22.).

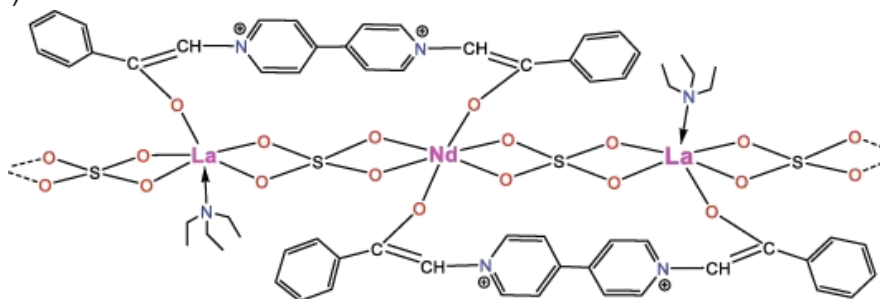


Figura 3.22. Structura polimerică 1-D propusă pentru La-Nd-DPY

Prin cercetarea literaturii de specialitate nu s-a identificat niciun alt studiu care să descrie un model de lanț liniar construit cu ioni alternativi de Ln(III) uniți de grupările sulfat printr-un mod bis-chelatizat. Pe de altă parte, cele șase coordineri ale unor astfel de ioni de Ln(III), deși încă sunt identificate relativ rar, se alătură grupului de complecși pe bază de lantanide prezentate până acum în literatură [374,384–387]. Cerințele mai mari de coordinare ale ionilor La(III) și Nd(III) pot constitui cauza probabilă pentru apariția complexului polimeric La-Nd-DPY.

Comportamentul redox al complexului La-Nd-DPY a fost evaluat prin experimente de voltametrie ciclică (CV), atât în metanol (pH = 7,3) cât și în DMSO (pH = 10,4), ceea ce relevă

că potențialele de oxidare/reducere ale complexului mixt sunt deplasate către valori pozitive sau negative, fiind atribuite ligandului corespunzător (Figura 3.23).

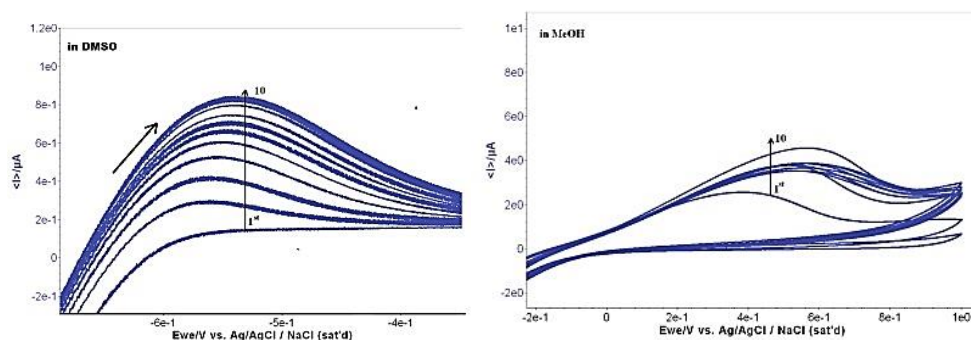


Figura 3.23. Voltamograme ciclice ale complexului mixt de Ln în soluții 10^{-6} M DMSO și MeOH, pe electrod de lucru din platină; $E = \pm 1$ V/ $E_{Ag/AgCl/sat}$; rata de scanare de 50 mVs $^{-1}$; 10 cicluri voltametrice consecutive.

Potențialele redox evaluate se încadrează în intervalul biologic relevant și accesibil. În celulele care se află în proces de proliferare, potențialul de reducere este aproximativ $-0,24$ V [53], în timp ce în interiorul tumorii poate fi cu până la 100 mV mai mic. Aceasta înseamnă că agenții de reducere biologică, de exemplu, grupul redox GSSG/2GSH sau acidul ascorbic, sunt capabili să reducă compușii sintetizați [54] și, conform rezultatelor obținute, procesul de reducere biologică a complexului mixt sintetizat poate fi realizat.

Microscopia electronică cu scanare (SEM) a arătat că noul complex mixt se dezvoltă într-o morfologie asemănătoare rețelei fibrilare destul de uniformă și omogenă, cu caracteristici poroase, așa cum se poate observa la mărimi mai mari (Figura 3.24 A, B, C și D). Acest tip de morfologie este astfel diferit de complexii homo-metalici La-DPY și Nd-DPY, care au prezentat structuri și morfologii cristaline multiforme (micro- și nanoparticule alungite, micro- și nanoparticule agregate) [27]. Analiza EDX, obținută într-un punct selectat din imaginea cu cea mai mare mărire, a confirmat prezența ambilor ioni de lantan (III) în complexul mixt.

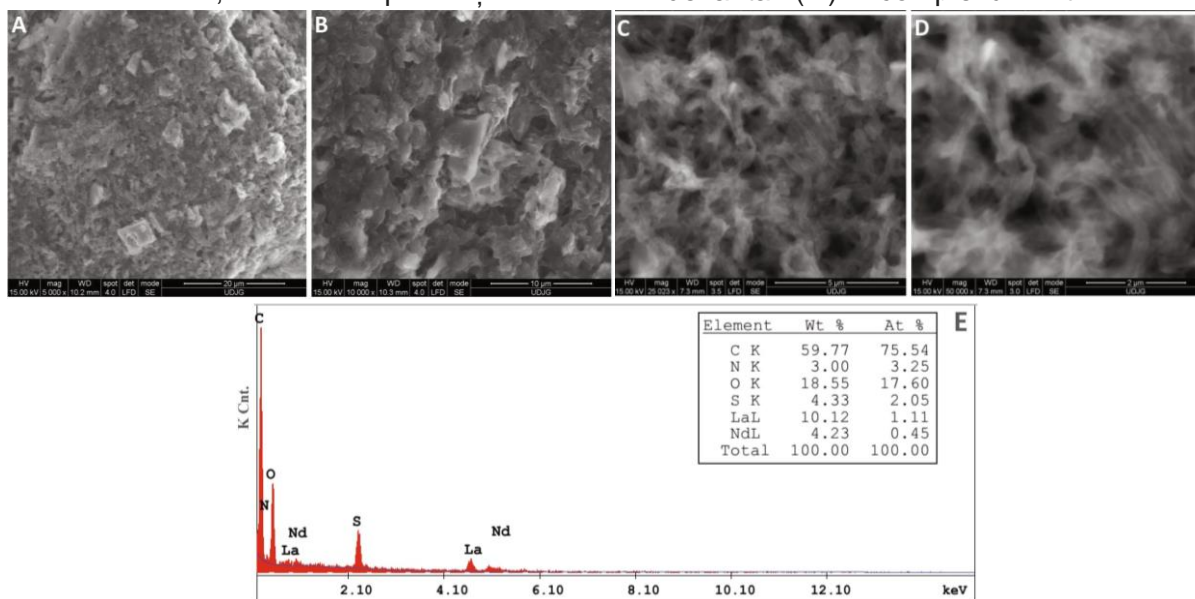


Figura 3.24. A-D: Imagini SEM ale complexului La-Nd-DPY; E: Spectrul EDX obținut într-un punct selectat din imaginea cu mărire de $50.000\times$, împreună cu compoziția elementală.

CAPITOLUL 4. Generarea de săruri dicuaternare simetrice de biperidiniu prin cataliză neconvențională

4.2. Obiective științifice specifice

Obiectivul științific specific al cercetărilor prezentate în acest capitol a constat în generarea de compuși heterociclici cu azot (săruri dicuaternare de bis-piridiniu) prin metode de obținere neconvenționale, aparținând chimiei verzi.

4.4. Rezultate și discuții

Prin metodele convenționale au fost necesare 12 până la 24 de ore pentru alchilarea completă a 1,2-di(4-piridil)etanului cu derivați halogenați reactivi în solvent anhidru și condiții de reflux. Iradierea cu MW sau US a redus timpul de reacție și produșii de reacție din clasa sărurilor cuaternare de piridiniu au fost obținuți într-un timp mult mai scurt (câteva minute).

În Tabelul 4.1, sunt prezentate comparativ rezultatele obținute în varianta de sinteză clasică și prin cele două metode verzi, randamentele obținute făcând astfel evident avantajul remarcabil al acestor alternative neconvenționale în ceea ce privește economisirea de timp, de solvenți și creșterea randamentului de reacție. Alternativele verzi de sinteză au dus la obținerea cu succes a sărurilor dicuaternare de bis-piridiniu cu randamente foarte bune, apropiate de cele ale metodei clasice. În metoda clasică de sinteză s-a utilizat un volum mult mai mare de solvent (150 echiv. acetonitril anhidru). În cazul reacțiilor cu randament de sinteză mai mic de 90%, s-au observat compuși de plecare nereacționați, identificați prin cromatografie în strat subțire, dar datorită solubilității lor în mediul de reacție aceștia au fost îndepărtați prin spălarea precipitatului obținut cu acetonitril anhidru fierbinte. Reacțiile asistate de MW sau US au fost monitorizate după 5, 10 și 15 minute.

Tabelul 4.1. Randamentele și condițiile de reacție comparative pentru sinteza clasică și, respectiv, neconvențională

ScPy	Încălzire clasică			Iradiere cu MW (300 W)			Iradiere cu US (35 Hz)		
	Timp (min)	T (°C)	η (%)	Timp (min)	T (°C)	η (%)	Timp (min)	T (°C)	η (%)
S2a	1.440	80,0	92	5-10	95,0	95	60	60,0	90
S2b	1.440	80,0	95	5-10	95,0	95	60	60,0	95
S2c	1.440	80,0	94	5-10	95,0	95	60	60,0	95
S2f	1.440	80,0	88	5-10	95,0	90	60	60,0	90
S2g	1.440	80,0	94	5-10	95,0	94	60	60,0	95
S2h	1.440	80,0	90	5-10	95,0	93	60	60,0	90
S2i	1.440	80,0	82	5-10	95,0	85	60	60,0	85
S2j	1.440	80,0	81	5-10	95,0	83	60	60,0	90
S2k	720	80,0	93	5-10	95,0	95	60	60,0	90
S2l	720	80,0	92	5-10	95,0	95	60	60,0	90
S2m	1.440	80,0	98	5-10	95,0	98	60	60,0	98
S2n	1.440	80,0	85	5-10	95,0	88	60	60,0	86
S2o	1.440	80,0	85	5-10	95,0	87	60	60,0	90
S2p	720	80,0	90	5-10	95,0	92	60	60,0	93
S2q	720	80,0	76	5-10	95,0	77	60	60,0	80

S-a constatat că o creștere a timpului de reacție pentru reacția asistată de MW sau US nu mai conduce la o creștere a randamentului reacției. Prin urmare, s-a considerat intervalul de timp optim de 5-10 minute, care a reprezentat cea mai bună abordare pentru sinteza unor astfel de ScPy. Este important de subliniat faptul că iradierea cu MW a fost deosebit de

eficientă, doar câteva minute fiind necesare pentru a obține produșii doriti cu randamente excelente, în timp ce mai multe ore de încălzire convențională în condiții de reflux ar fi necesare pentru a genera aceleași rezultate. De asemenea, iradierea cu US a fost eficientă, randamentele fiind excelente în toate cazurile analizate, iar timpii de reacție s-au redus de la 12-24 ore sub încălzire convențională la doar o oră de sinteză asistată de US, aceste rezultate fiind, de asemenea, similare cu cele raportate în literatură pentru alte clase de compuși [149,400].

Conform datelor din literatură, sintezele asistate de MW sau US din această teză sunt propuse pentru prima dată ca metode de obținere a sărurilor dicuaternare de bis-piridiniu S2a-c și S2f-q, deschizând astfel calea spre generarea de ScPy prin metode *verzi*, cu randamente ridicate. Spectrele în infraroșu (FT-IR) ale compușilor obținuți au fost analizate într-un domeniu al frecvenței cuprins între 4.000 și 400 cm^{-1} , iar benzile identificate au confirmat structurile chimice propuse prin comparație cu datele obținute pentru compușii martor obținuți prin sinteză clasică (Figura 4.3). Compușii sintetizați au prezentat în spectrele RMN semnale specifice protonilor și atomilor de carbon din structurile chimice ale compușilor propuși, atribuite conform datelor din literatura de specialitate [354–357] (Figura 4.4.a). Spectrele ^{13}C -RMN au confirmat, de asemenea, structurile chimice ale ScPy (Figura 4.4.b). Spectrele RMN corespunzătoare compușilor sunt colectate în Anexele A20-A46.

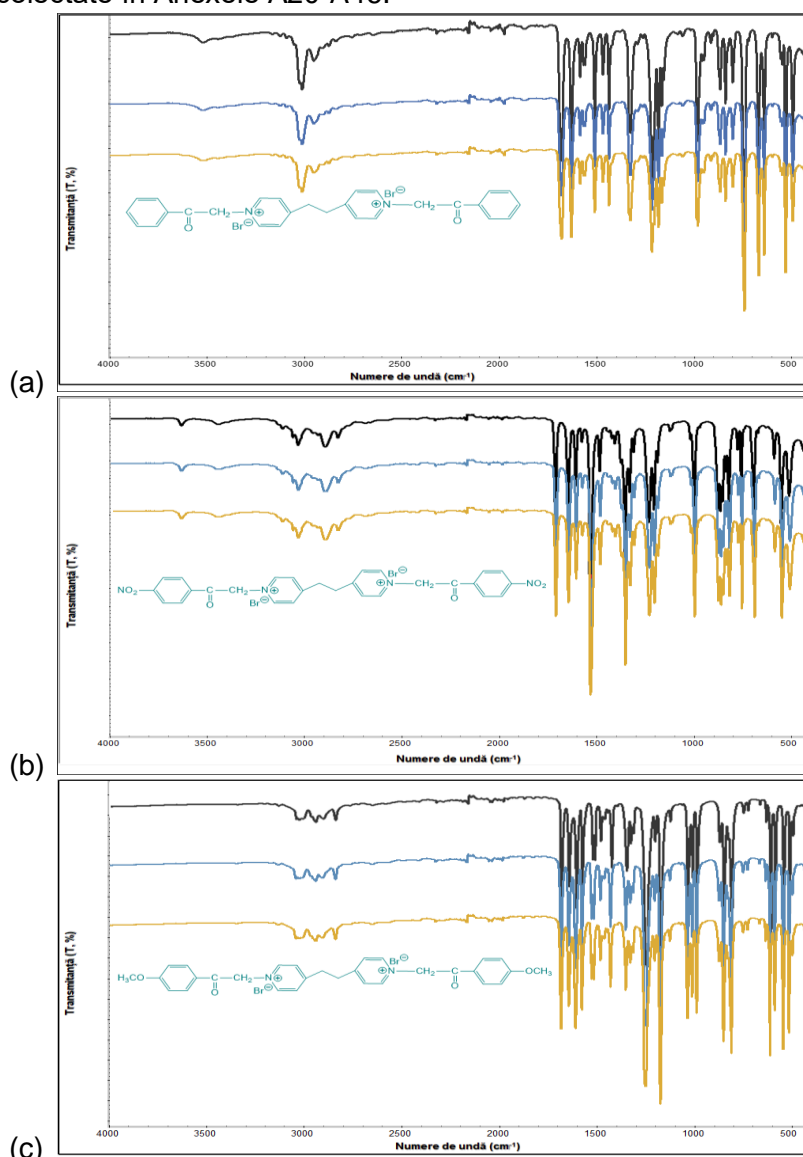


Figura 4.3. Suprapunere de spectre FTIR pentru a) S2a, b) S2b, c) S2c: negru-sinteza clasică, maro-sinteza cu US, albastru-sinteza cu MW

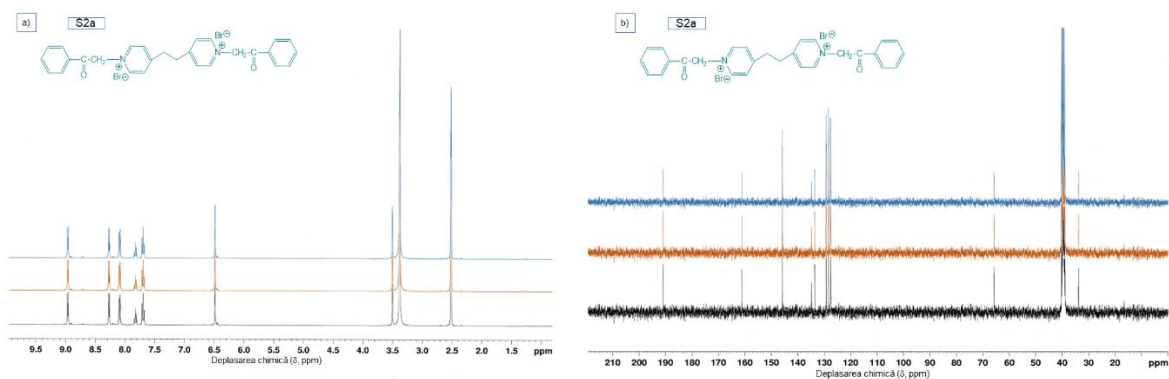


Figura 4.4. Suprapunere de spectre a) ^1H -RMN, b) ^{13}C -RMN pentru compusul S2a: negru-sinteza clasică, maro-sinteza asistată cu US, albastru-sinteza asistată cu MW

CAPITOLUL 5. Generarea de bis-indolizine simetrice prin cataliză neconvențională

5.2. Obiective științifice specifice

Obiectivul științific specific al cercetărilor prezentate în acest capitol a constat în generarea de compuși indolizini prin metode de obținere neconvenționale, aparținând „chimiei verzi”.

5.7. Rezultate și discuții

Optimizarea condițiilor de reacție pentru procesul de biocataliză

În scopul optimizării randamentului procesului de sinteză, au fost investigate influența mediului biocatalitic și a condițiilor experimentale în sinteza compușilor indolizini (Tabelul 5.1). Primele experimente au fost efectuate cu 1 g de rădăcini de hrean în soluție de tampon fosfat la pH = 6,0, cu agitare continuă, la temperatura camerei și un timp de 168 ore.

Tabelul 5.1. Optimizarea condițiilor de reacție pentru sinteza compusului Iz1a

Sursa vegetală de catalizator enzimatic	Masa vegetală (g)	pH-ul soluției tampon	20 ±3°C	25 ±3°C	37 ±3°C
			Timp (ore)		
Rădăcină de hrean	0,5	6,0	>120	>120	>120
	0,5	7,0	>120	>120	>120
	0,5	8,0	>120	>120	>120
	1,0	6,0	>120	>120	>120
	1,0	7,0	>120	>120	>120
	1,0	8,0	>120	>120	>120
	1,5	6,0	117	112	113
	1,5	7,0	114	106	109
	1,5	8,0	119	124	110
	2,0	6,0	96	88	94
	2,0	7,0	87	84	86
	2,0	8,0	93	87	88

Prin monitorizarea reacției prin cromatografie pe strat subțire s-a constatat că reactanții au fost consumați în timp și produsul final de reacție (Iz1a) a fost obținut într-un timp de reacție de peste 120 de ore. Au fost efectuate experimente suplimentare de optimizare pentru sinteza

compusului Iz1a, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5.1. Cele mai promițătoare rezultate au fost obținute la pH = 7,0 și cu 2 g de produs vegetal, când produsul de reacție a fost obținut cu randament de 84% la temperatura camerei.

Obținerea derivaților indoliziniici prin biocataliză enzimatică

Investigarea condițiilor catalitice a fost extinsă la 7 plante evaluate în această teză și la utilizarea diversilor derivați halogenați reactivi (Figura 5.6). Derivații indoliziniici s-au obținut și prin reacții multicomponente, într-o singură etapă, biocatalizate de peroxidaza pură din hrean (POD-HRP). Acest proces de sinteză a dus la sinteza compușilor doriți ca pulberi solide cu randamente de 40-76%.

În urma proceselor biocatalitice cu enzimele extrase din produse vegetale proaspete, precum și cu enzima pură POD-HRP, s-au obținut produșii de reacție corespunzători cu randamente moderate până la foarte bune (45%–86%). Mecanismul de reacție propus pentru sintezele catalizate de enzimele oxidante implică formarea intermediară a cationilor de piridiniu din derivați de piridină și derivați halogenați reactivi (Figura 5.7).

Produșii radicalilor liberi generați de oxidaze sunt specii foarte reactive care pot, în unele cazuri, să modifice gruparea hem a enzimei [421]. De exemplu, pentru peroxidaza din hrean (HRP), substraturile pentru care a fost observat acest tip de reacție conform datelor din literatură sunt alchil- și aril-hidrazinele, nitrometanul sau hidratul de ciclopropanonă. Radicalii cu reactivitate scăzută pot fi adăugați grupărilor vinilice din structura hemului peroxidazei, aceste modificări ale hemului proteic fiind generate și în unele cazuri de produșii de oxidare formați de peroxidaze atunci când oxidează ionii de halogenură. Prin urmare, oxidarea bromurii de către HRP ar putea implica formarea de HOBr și adăugarea acestuia sub formă de HOBr la grupările vinilice din hem-oxidaze [423].

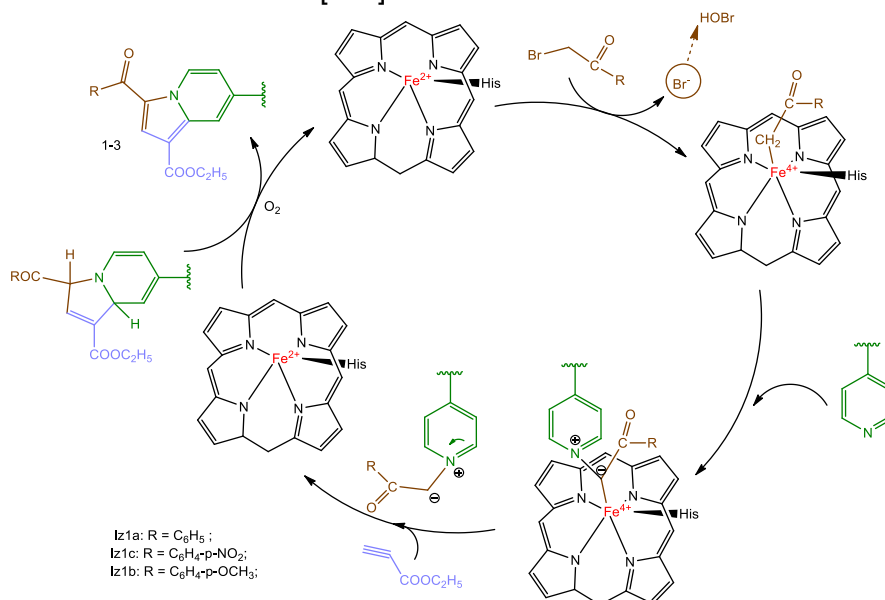


Figura 5.7. Mecanismul propus pentru conversia reactanților în compușii intermediari și apoi în derivații indoliziniici, promovată de catalizatori enzimatici din surse vegetale

Mai departe, cercetarea a fost extinsă prin testarea altor șase plante locale. Reacțiile au fost efectuate prin biocataliză în cascadă, cu un sistem enzimatic complex din țesuturile întregi ale plantelor proaspete și cu obținerea produșilor de reacție cu randamente bune (45-86%). Aceste metode au fost investigate pentru a minimiza numărul de subproduși nedorți și, de asemenea, pentru a evita utilizarea solvenților toxici. După separarea și purificarea produșilor de reacție, s-a constatat că bis-indolizinele sintetizate prezintă structurile așteptate (Figura 5.9, Figura 5.10), rezultatele obținute fiind în concordanță cu cele ale bis-indolizinelor martor obținute anterior prin sinteză chimică clasică [375], prezentate în Capitolul 3. Comparând condițiile de reacție în sinteza clasică și biocatalizată și randamentele în produsele

finale, s-a constatat că utilizarea sistemelor multi-enzimatice pentru catalizarea reacțiilor de obținere a bis-indolizinelor a fost cea mai eficientă dintre metodele studiate (Tabelul 5.2).

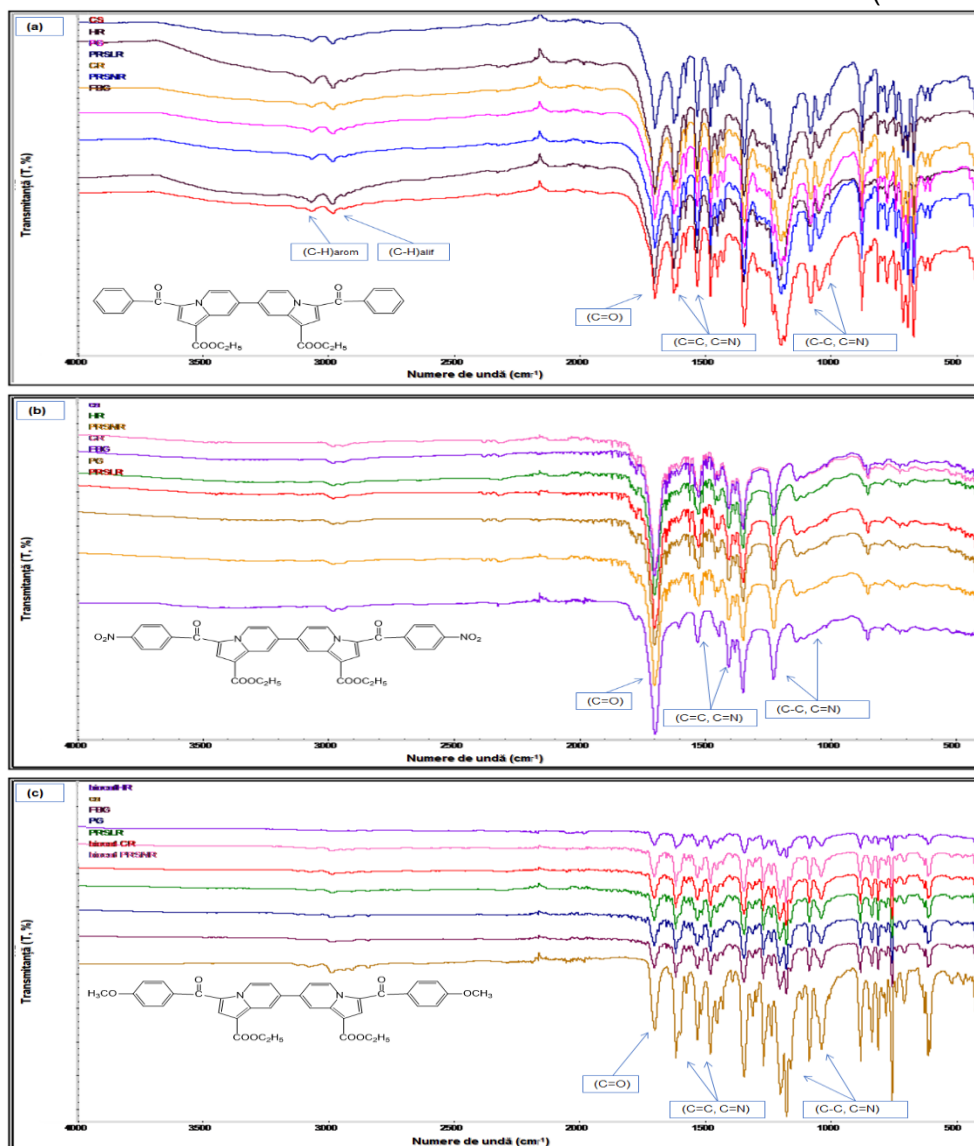


Figura 5.9. Analiza FT-IR a compușilor: a) Iz1a, b) Iz1b, c) Iz1c obținuți prin cataliză convențională (CS) și reacții biocatalizate de enzime din plante: HR-rădăcină de hrean, PRSNR- rădăcină de păstârnac, CR- rădăcină de țelină, FBG- germeni de bob , PG- germeni de dovleac, PRSLP- rădăcină de pătrunjel.

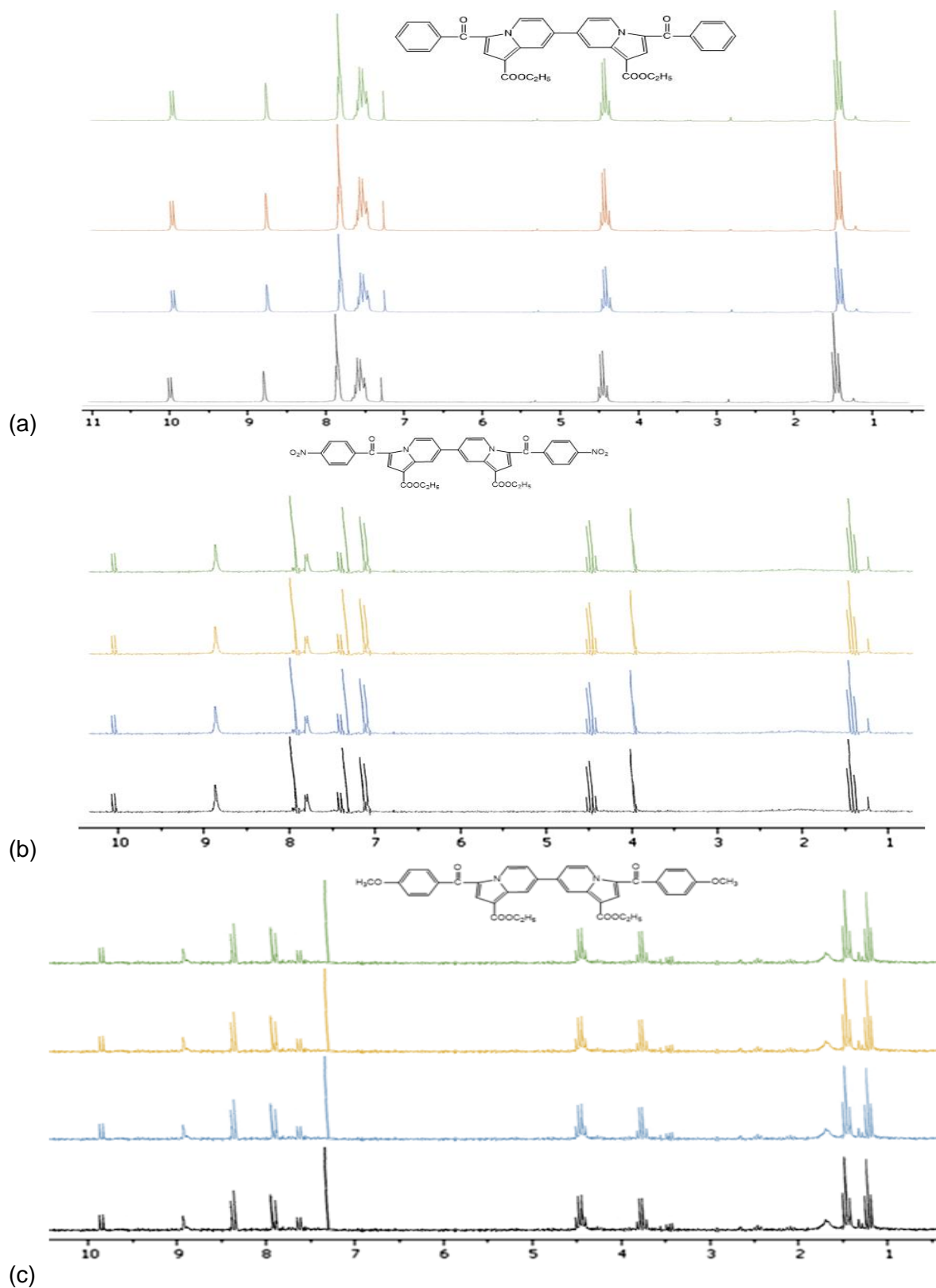


Figura 5.10. Analiza ^1H RMN a compușilor: a) Iz1a, b) Iz1b, c) Iz1c obținuți prin cataliză convențională (negru), reacții biocatalizate de enzime din plante (albastru), de peroxidaza pură (maro) și cu sistemul catalitic $\text{I}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (verde)

CAPITOLUL 6. Evaluarea citotoxicității unor săruri cuaternare de piridiniu și a unor indolizine studiate

6.1. Obiective științifice specifice

Obiectivul științific specific al acestui capitol a fost evaluarea toxicității compușilor sintetizați. Pentru realizarea acestui obiectiv s-au investigat efectele unor compuși studiați, din clasa sărurilor cuaternare de piridiniu și din clasa indolizinelor, asupra germinării semințelor de grâu (*Triticum aestivum*). Având în vedere creșterea considerabilă a importanței derivaților indolizinicici, s-a investigat citotoxicitatea unor compuși indolizinicici pe microorganismul eucariot model, drojdia *Saccharomyces cerevisiae*, în timpul proceselor de multiplicare și fermentație alcoolică.

6.5. Rezultate și discuții

6.5.1 Citotoxicitatea unor compuși studiați evaluată prin testul *Triticum aestivum*

Având în vedere spectrul larg de aplicații potențiale ale ScPy în diverse domenii, s-au investigat efectele a 11 ScPy selectate (S1a-e, S2a-e și S2i), cu efecte electronice diferite (atrăgător și respingător de electroni), asupra germinării semințelor de grâu, ca prim pas spre estimarea pericolului potențial al acestor substanțe chimice pentru mediul înconjurător. Compușii S1a-e, S2a-e și S2i au fost selectați, de asemenea, pentru a vedea dacă diferite grupări funcționale pot genera efecte toxice, având în vedere că, de exemplu, gruparea nitro din anumite molecule chimice s-a dovedit că poate induce toxicitate. Conform datelor din literatură, pe parcursul acestui test, s-au evaluat cei mai sensibili parametri fiziologici în germinarea și dezvoltarea plantelor pentru specia *T. aestivum*.

Valorile GS mai mari de 95% și apropiate de cele obținute pentru proba control (C) (Figura 6.5), precum și procentele relative de germinare a semințelor (GRS) cuprinse între 98,96% și 100,75% (Figura 6.6) pentru semințele tratate cu săruri cuaternare de piridiniu, au demonstrat că derivații de ScPy testați nu au avut influență negativă asupra germinării semințelor. Mai mult, valorile obținute pentru parametrul de creștere relativă a radicelelor (CRR) nu au fost influențate negativ de prezența compușilor testați (Figura 6.7). Pentru probele evaluate prin expunerea la ScPy la diverse concentrații s-au obținut valori mai mari de 100%, prin urmare s-a demonstrat că ScPy nu prezintă efect citotoxic asupra germinării semințelor [469]. Valorile indicelui de germinare (IG, %), mai mari de 95% și apropiate de cele obținute pentru proba control (Figura 6.8), confirmă că ScPy testate nu exercită fitotoxicitate [444]. Studiile de toxicitate efectuate prin testul *Triticum aestivum* pentru sărurile cuaternare de piridiniu S1a-e, S2a-e și S2-i la două concentrații diferite (10^{-5} M și 10^{-6} M), nu au prezentat efect inhibitor asupra germinării semințelor și creșterii timpurii a tulpiniței. Evaluarea celor mai sensibili indicatori de germinație pentru evaluarea fitotoxicității compușilor indolizinicici a fost efectuată, de asemenea, prin testul *Triticum aestivum*. Valorile parametrului GS (%), foarte asemănătoare cu cele ale probelor martor, conform datelor din literatura de specialitate [440,469], demonstrează că prezența compușilor testați nu a avut influență negativă asupra germinării semințelor de grâu (Figura 6.9).

Valorile parametrilor GRS (%) și CRR (%) mai mari de 100% pentru probele tratate cu compușii indolizinicici demonstrează că prezența compușilor testați nu a determinat efecte nocive asupra germinării semințelor de grâu (Figurile 6.10-6.11). Rezultatele obținute sunt similare cu alte date prezentate în literatura de specialitate pentru studii similare de evaluare a fitotoxicității prin metoda de germinare a semințelor de grâu [440,469]. Valorile obținute pentru indicele de vigoare (IV) cuprinse între $79,13 \pm 0,48\%$ și $96,83 \pm 0,95\%$, mai mari de 75% și apropiate de valoarea medie obținută pentru proba control ($85,80 \pm 0,52\%$) relevă lipsa efectelor nocive ale compușilor testați asupra germinării semințelor de grâu (Figura 6.12).

Rezultatele obținute sunt similare cu alte rezultate din literatura de specialitate prezentate pentru metoda *T. aestivum* în evaluarea fitotoxicității unor compuși chimici [440,459,460].

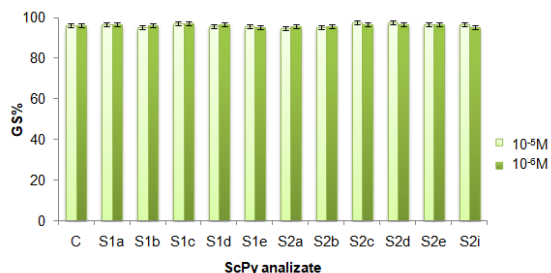


Figura 6.5. Germinarea semințelor (GS, %) de *Triticum aestivum* L. expuse la diferite concentrații de ScPy ($10^{-5}M$ - verde deschis și $10^{-6}M$ – verde închis). Valorile prezentate reprezintă media a patru replici pentru fiecare condiție experimentală și barele de eroare cu DS

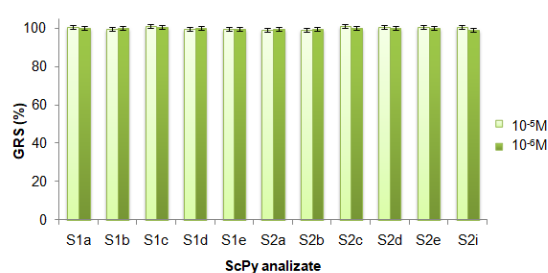


Figura 6.6. Germinarea relativă a semințelor (GRS, %) de *Triticum aestivum* L. expuse la diferite concentrații de ScPy ($10^{-5}M$ - verde deschis și $10^{-6}M$ – verde închis). Valorile reprezentate grafic reprezintă media a patru repetiții și barele de eroare cu DS

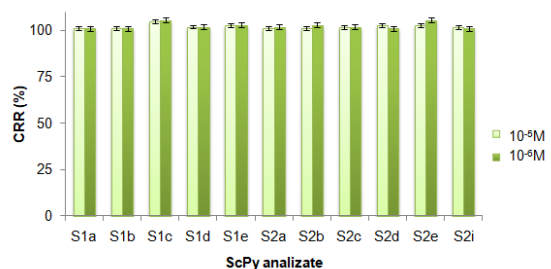


Figura 6.7. Creșterea relativă a radicelelor (CRR, %) de *T. aestivum* expuse la diferite concentrații de ScPy ($10^{-5}M$ - verde deschis și $10^{-6}M$ – verde închis). Datele reprezintă media a patru repetiții și barele de eroare cu DS

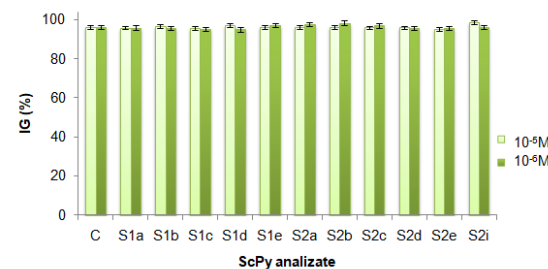


Figura 6.8. Indicele de germinare pentru semințele de *T. aestivum* tratate cu diferite concentrații de ScPy ($10^{-5}M$ - verde deschis și $10^{-6}M$ – verde închis). Datele reprezintă media a patru repetiții și barele de eroare cu deviația standard

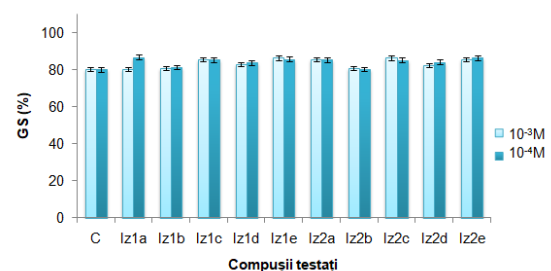


Figura 6.9. Germinarea semințelor (GS, %) de *Triticum aestivum* L. expuse la diferite concentrații de compuși indolizidici ($10^{-3}M$ - albastru deschis și $10^{-4}M$ – albastru închis). Valorile prezentate reprezintă media a patru replici pentru fiecare condiție experimentală și barele de eroare cu DS

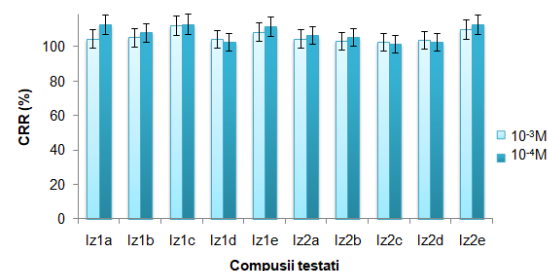


Figura 6.10. Creșterea relativă a radicelelor (CRR, %) de *T. aestivum* expuse la diferite concentrații de compuși indolizidici ($10^{-3}M$ - albastru deschis și $10^{-4}M$ – albastru închis). Datele reprezintă media a patru repetiții și barele de eroare cu deviația standard

În concluzie, parametrii fiziologici care descriu procesul de germinare au arătat că expunerea semințelor la compușii evaluați în mediul de germinare, nu au efecte toxicologice asupra dezvoltării și creșterii germenilor de grâu și a tulpinițelor, comparativ cu proba control tratată doar cu apă. Pentru a evalua la nivel celular impactul expunerii semințelor la diverși compuși indolizidici în procesul de germinare, s-au analizat germenii obținuți, prin selectarea unor germeni reprezentativi pentru fiecare condiție experimentală, prin microscopie confocală. Indolizinele Iz1a-e sau Iz2a-e la concentrațiile testate ($10^{-3}M$, $10^{-4}M$) nu au exercitat efect

citotoxic asupra organismelor vegetale, adsorbția lor nu a determinat afectarea structurii țesuturilor plantelor sau procesele fiziologice precum creșterea și diferențierea celulară.

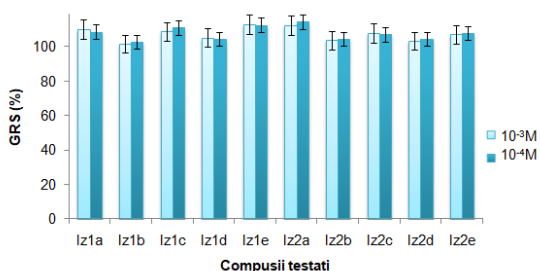


Figura 6.11. Germinarea relativă a semințelor (GRS, %) de *T. aestivum* expuse la diferite concentrații de compuși indolizini (10⁻³M - albastru deschis și 10⁻⁴M – albastru închis). Valorile reprezentate grafic reprezintă media a patru repetiții și barele de eroare cu DS

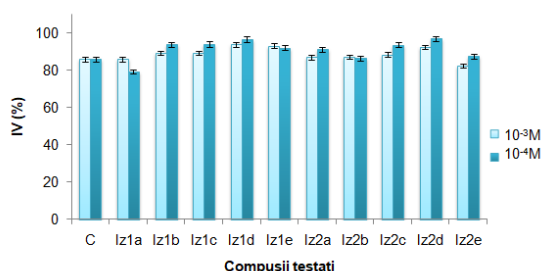


Figura 6.12. Indicii de vigoare (IV, %) pentru semințele de *T. aestivum* expuse la diferite concentrații de compuși indolizini (10⁻³M - albastru deschis și 10⁻⁴M – albastru închis). Valorile prezentate reprezintă media a patru replici pentru fiecare condiție experimentală și barele de eroare cu deviația standard

6.5.2. Impactul unor compuși indolizini asupra creșterii drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*

Având în vedere creșterea considerabilă a importanței derivaților indolizini, în această teză de doctorat s-a investigat citotoxicitatea acestor compuși pe celulele de drojdie model *Saccharomyces cerevisiae*, în timpul proceselor de multiplicare și fermentație alcoolică. În acest context, s-a urmărit aplicarea unor abordări alternative care prezintă o perspectivă de utilizare minimă a testelor pe animale în experimentele științifice și s-a urmărit evaluarea citotoxicității compușilor indolizini pe celulele de drojdie. Valorile parametrilor cinetici determinate după 48 de ore, pentru probele suplimentate cu compusul Iz1c au fost cele mai apropiate de cele ale probei control (Tabelul 6.1).

Randamentul de substanță uscată obținut pentru proba control (12,72% ± 0,16%) a prezentat valori similare cu probele la care au fost adăugați compușii analizați: Iz1a, Iz1b și Iz1c la concentrațiile de 1 μM și 10 μM (Figura 6.24). Cel mai bun randament de substanță uscată a fost obținut pentru mediul suplimentat cu compusul Iz1a la o concentrație de 10 μM (15,49% ± 0,13%), urmat de probele la care s-au adăugat compușii chimici analizați: 1 μM Iz1b (14,81% ± 0,08 %) și 10 μM Iz1c (14,05% ± 0,36%). Un randament de biomasă mai mic comparativ cu cel al probei control au prezentat probele la care au fost adăugați compușii Iz1c (12,68% ± 0,31%) și Iz1b (12,21% ± 0,17%) în concentrații de 1 μM și respectiv 10 μM (Figura 6.24).

Tabelul 6.1. Parametrii cinetici determinați după 48 de ore de cultivare în condiții submerse, cu agitare și aerare: n = numărul de generații; μ = viteza de creștere; tg = timpul de generație

Proba analizată	Concentrația	n	μ [h ⁻¹]	tg [h]
Control		18,6 ± 0,4	0,38 ± 0,06	2,58 ± 0,26
Iz1a	1 μM	15,4 ± 0,1	0,32 ± 0,12	3,12 ± 0,28
Iz1a	10 μM	13,2 ± 0,3	0,27 ± 0,14	3,63 ± 0,14
Iz1b	1 μM	11,4 ± 0,4	0,24 ± 0,13	4,21 ± 0,16
Iz1b	10 μM	11,8 ± 0,3	0,25 ± 0,17	4,07 ± 0,24
Iz1c	1 μM	19,4 ± 0,1	0,40 ± 0,08	2,47 ± 0,36
Iz1c	10 μM	21,4 ± 0,0	0,44 ± 0,04	2,24 ± 0,28

După primele 24 de ore de cultivare, gradul de înmugurire pentru proba control a prezentat o valoare de $17,5\% \pm 0,8\%$ apropiată de cea a probei suplimentate cu Iz1c la o concentrație de $10 \mu\text{M}$ ($18,08\% \pm 0,7\%$). După 48 de ore de cultivare, valoarea gradului de înmugurire în prezența aceleiași concentrații a compusului Iz1c ($19,90\% \pm 1,1\%$) a fost mai ridicată decât cea a probei control spre deosebire de concentrația de $1 \mu\text{M}$, la care valoarea gradului de înmugurire după 24 de ore a prezentat cea mai mare valoare de $21,3\% \pm 1,2\%$, iar după 48 de ore cea mai mică valoare de $16,24\% \pm 1,3\%$. În cazul indolizinei Iz1a, la concentrația minimă utilizată în cadrul acestui experiment s-a obținut un grad de înmugurire al celulelor mai mare comparativ cu proba control și cu aproximativ 20 % mai mic după 48 de ore de cultivare submersă. La concentrația maximă testată, prezența compusului Iz1b a produs înmugurirea a peste 20% din celulele de drojdie, în timp ce la concentrația minimă analizată s-au obținut valori comparabile cu cele ale probelor control, după 48 de ore de cultivare submersă (Figura 6.25).

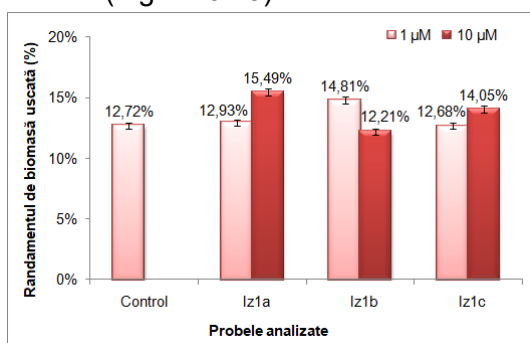


Figura 6.24. Randamentul de biomasă uscată pentru drojdia cultivată în mediu lichid suplimentat cu compușii testați. Proba control nu a fost suplimentată cu derivați indolizini în mediul de creștere al celulelor de drojdie. Valorile obținute reprezintă media a trei repetiții experimentale pentru fiecare probă \pm DS

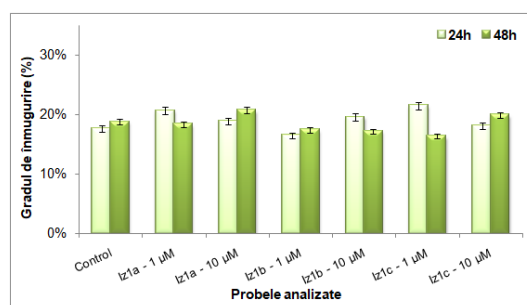


Figura 6.25. Gradul de înmugurire al celulelor de drojdie de *S. cerevisiae*, în prezența compușilor indolizini la diferite concentrații în mediul de cultură. Proba martor a fost considerată fără compușii indolizini în mediul de creștere al celulelor de drojdie. Valorile obținute reprezintă media a trei repetiții experimentale pentru fiecare probă \pm DS

Din Figura 6.26 (a) se poate observa că prezența compusului Iz1a la concentrația de $1 \mu\text{M}$ a determinat un grad mai scăzut de autoliză al celulelor de drojdie *S. cerevisiae* în procesul de multiplicare ($2,27\% \pm 0,08\%$, $0,87\% \pm 0,06\%$, $1,07\% \pm 0,07\%$) decât cel al probei control după 24, 48 și 120 de ore de cultivare ($1,60\% \pm 0,03\%$, $2,34\% \pm 0,05\%$, $2,68\% \pm 0,06\%$). De asemenea, prezența compusului Iz1a la concentrația de $10 \mu\text{M}$ a determinat un grad mai scăzut de autoliză după 24 și 48 de ore de cultivare ($0,82\% \pm 0,01\%$, $1,04\% \pm 0,02\%$) în comparație cu proba control, iar după 120 de ore de cultivare, s-a observat că gradul de autoliză a prezentat o valoare mai mare comparativ cu proba control. Prezența compusului Iz1b în mediul de creștere, la ambele concentrații testate, a determinat valori ale gradului de autoliză mai mari după 24 de ore cu aproximativ 0,6% față de proba control. După 48 și 120 de ore de cultivare, valorile gradului de autoliză pentru probele suplimentate cu compusul Iz1b la ambele concentrații testate au prezentat valori foarte apropiate de cele prezentate de proba control după 48 și 120 h de cultivare (Figura 6.26 b). Suplimentarea mediului de cultură al celulelor de drojdie *S. cerevisiae* cu Iz1c, la o concentrație de $1 \mu\text{M}$, a determinat valori mai mici ale gradului de autoliză decât cele prezentate de proba control după 24, 48 și 120 de ore de cultivare. De asemenea, prezența compusului Iz1c la o concentrație de $10 \mu\text{M}$ în mediul de cultură a determinat valori mai mici ale gradului de autoliză ($1,09\% \pm 0,03\%$, $1,36\% \pm 0,02\%$) decât cele ale probei control după 48 și 120 de ore de cultivare (Figura 6.26 c).

Dinamica de multiplicare a celulelor de drojdie pentru proba control a fost similară cu cea a probelor care au fost suplimentate cu compușii studiați (Figura 6.27), ceea ce denotă

faptul că acești compuși nu influențează în mod negativ procesul de creștere și multiplicare al celulelor de drojdie.

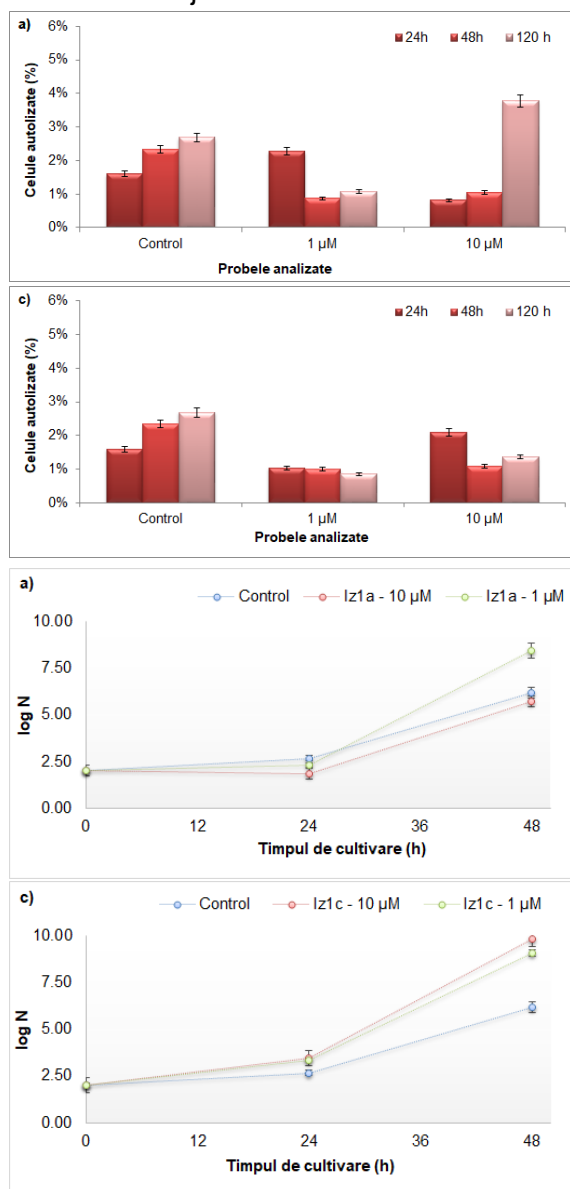


Figura 6.26. Gradul de autoliză al celulelor de drojdie pentru mediul de cultură suplimentat cu compușii a) Iz1a, b) Iz1b, c) Iz1c la diferite concentrații. Proba control nu a fost suplimentată cu compuși indoliziniici în mediul de creștere al celulelor de drojdie. Valorile obținute reprezintă media a trei repetiții experimentale pentru fiecare probă ± DS

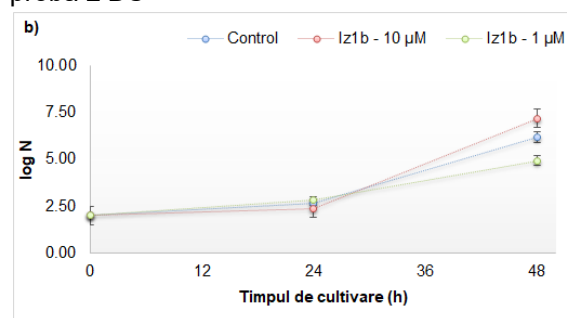


Figura 6.27. Dinamica de multiplicare a celulelor de drojdie în mediul de cultură suplimentat cu compuși a) Iz1a, b) Iz1b, c) Iz1c la diferite concentrații. Valorile obținute reprezintă media a trei replici experimentale pentru fiecare probă ± DS

CAPITOLUL 7. Evaluarea unor proprietăți biologice active

7.2. Obiective științifice specifice

Obiectivul științific specific al acestui capitol a constat în evaluarea unor proprietăți biologice active ale unor compuși heterociclici cu azot (săruri cuaternare de piridiniu, indolizine, hibridi de indolizinin-piridiniu, complecși metalici). Pentru realizarea acestui obiectiv, s-au determinat proprietățile antimicrobiene, antioxidante, anticancer, antineurodegenerative și antiinflamatorii ale unor compuși obținuți prin metode de sinteză clasice și neconvenționale.

7.9. Rezultate și discuții

7.9.1. Determinarea proprietăților antimicrobiene

Activitatea antimicrobiană a sărurilor cuaternare de piridiniu (ScPy) reprezintă un subiect de actualitate, această clasă de compuși având proprietăți germicide cunoscute [480,503]. Evaluarea activității antibacteriene a sărurilor S2a-c și S2f-q a fost realizată prin utilizarea testului TTC ca test calitativ și metoda microdiluțiilor ca metodă cantitativă. Clasa sărurilor de tetrazoliu care sunt utilizate pe scară largă în diferite aplicații chimice și biologice

[504,505], conține compuși organici care au capacitatea de a forma azoderivați intens colorați cunoscuți ca formazani [491,506,507]. Această proprietate poate fi utilizată pentru detectarea și măsurarea viabilității celulare [507–510].

În această teză s-au evaluat efectele antimicrobiene ale unor săruri cuaternare de piridiniu (ScPy) care conțin în structura lor diferiți substituenți, atrăgători sau respingători de electroni, care pot influența aceste proprietăți.

Evaluarea procentului de inhibare a creșterii microorganismelor prin testul TTC

Testul colorimetric TTC s-a dovedit a fi o metodă colorimetrică eficientă pentru evaluarea proprietăților antibacteriene [491,507]. Rezultatele obținute în această teză au demonstrat potențialul antibacterian al ScPy exprimate ca procente de inhibiție a creșterii celulelor bacteriene. După testarea ScPy împotriva microorganismului patogen *E. coli*, nouă compuși au demonstrat activitate antibacteriană. Prezența celulelor vitale ale bacteriilor a fost evidențiată de o culoare roșie intensă a formazanului obținut în mediul de creștere. După adăugarea de ScPy, a putut fi observată reducerea intensității culorii la incolor. Din Figura 7.3 se poate observa că procentul de inhibare al creșterii bacteriilor a variat de la 3% la 59%, în funcție de structura ScPy. Un efect inhibitor puternic (59%) împotriva *E. coli* a fost demonstrat de compusul S2c, urmat de S2q (50%), S2g (42%) și S2k (33%). De asemenea, s-a observat că celulele vitale ale bacteriilor au fost inhibitate de ScPy S2b, S2i și S2p, cu un procent mediu de inhibiție mai mic de 20%. Un potențial inhibitor redus împotriva tulpinii bacteriene testate a fost obținut pentru S2o, cu un procent de inhibiție de 10%, în timp ce S2l a avut cel mai scăzut efect inhibitor (3%). Acțiunea antibacteriană a ScPy se manifestă printr-un mecanism de distrugere a membranei lipidice prin interacții dipol-dipol ale azotului cuaternar încărcat pozitiv cu grupările capului polar ale fosfolipidelor acide [503,513]. De asemenea, s-a demonstrat anterior că există o relație bună între descriptorii structurali (LogP, polarizabilitate, suprafața polară (2D) și suprafața Van der Waals (3D)) și proprietățile antibacteriene ale acestor tipuri de ScPy [191].

Concentrații minime inhibitorii (CMI)

Valorile CMI ale ScPy S2a-c și S2f-q au fost determinate ca o evaluare cantitativă a activității lor antibacteriene înregistrându-se o sensibilitate diferită împotriva bacteriilor Gram negative. Valorile CMI au variat de la 0,312 la 2,5 mg/mL (Figura 7.4). Cea mai mică valoare CMI (0,312 mg/mL) a fost prezentată de compușii S2c, S2g și S2q împotriva *E. coli*. De asemenea, au fost observate pentru compuși testații, unele diferențe între activitățile antibacteriene. Astfel, compușii S2i, S2k și S2p au prezentat valori mai mari ale CMI, de 0,625 mg/mL, în timp ce S2l și S2o au prezentat cea mai mare valoare CMI (2,5 mg/mL).

Rezultatele obținute prin metoda microdiluției confirmă datele determinate prin testul TTC (Figura 7.3). Aceste rezultate au arătat un potențial antibacterian mai mare al ScPy studiate în această teză de doctorat în comparație cu alte ScPy împotriva tulpinii *E. coli* [515].

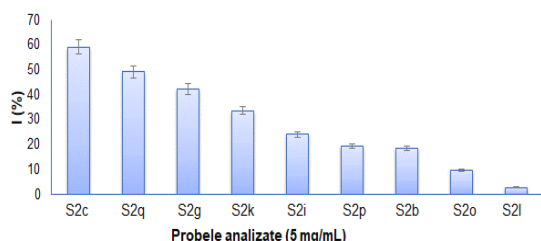


Figura 7.3. Procentele (%) de inhibare a creșterii bacteriei *E. coli* de către ScPy determinate prin Testul Tetrazoliu/Formazan

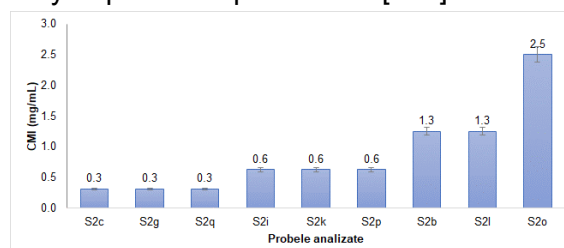


Figura 7.4. Activitatea antibacteriană a ScPy împotriva *E. coli*, exprimată în CMI (mg/mL) determinate prin metoda microdiluției

7.9.2. Determinarea proprietăților antioxidante

Stresul oxidativ este implicat în numeroase afecțiuni, precum cancerul, diabetul și bolile neurodegenerative [293,295,517,518]. Speciile reactive de oxigen pot provoca leziuni celulare și moartea ulterioară a celulei, deoarece oxidează componentele celulare vitale, cum ar fi lipidele, proteinele și ADN-ul (Figura 7.7). Mai mult, organismul uman este expus de-a lungul vieții la aminoacizi excitatori (cum ar fi glutamatul), al căror metabolism produce ROS, crescând astfel toxicitatea. Mecanismele de apărare antioxidante includ îndepărtarea O_2 , eliminarea speciilor reactive de oxigen/azot sau a precursorilor acestora, inhibarea formării ROS, chelarea ionilor metalici necesari pentru cataliza generării ROS și reglarea apărării antioxidante endogene [519–521]. Procentul de inhibare a radicalului DPPH care indică activitatea antioxidantă a fost calculat la concentrații de compus organic de 48 $\mu\text{g/mL}$, 188 $\mu\text{g/mL}$ și 750 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7.8). Deși s-a evaluat activitatea pentru mai multe molecule, așa cum este indicat în Tabelul 7.1, unii compuși au prezentat o abatere standard mare din cauza precipitării în amestecul de reacție.

Majoritatea moleculelor au prezentat activitate antioxidantă scăzută sau nulă atunci când au fost evaluate la o concentrație de 48 $\mu\text{g/mL}$. Creșterea concentrației compușilor analizați până la 750 $\mu\text{g/mL}$ a condus la o creștere semnificativă a procentului de inhibiție. Dintre compușii hibridi, compusul neutru Iz3-b a prezentat o activitate promițătoare, cu o inhibare de aproape 60% la concentrația de 188 $\mu\text{g/mL}$, dar problemele de solubilitate au împiedicat determinările corecte la concentrații mai mari. Compusul Iz-Py-7 a prezentat cele mai mari proprietăți antioxidante (aproximativ 90% inhibiție) la 750 $\mu\text{g/mL}$. Tendințe similare s-au observat pentru analogii simetrici, sărurile de bis-piridiniu prezentând o activitate mai bună în comparație cu bis-indolizinele (Tabelul 7.1).

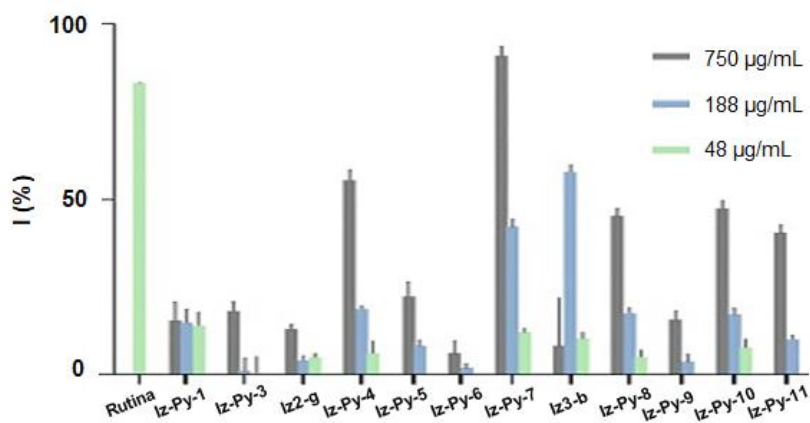


Figura 7.8. Activitatea antioxidantă (%) determinată utilizând metoda DPPH la concentrații de substanță testată de 48 $\mu\text{g/mL}$ (verde), 188 $\mu\text{g/mL}$ (albastru) sau 750 $\mu\text{g/mL}$ (gri), rutina a fost utilizată drept control pozitiv. Toate analizele au fost efectuate în trei exemplare și fiecare valoare corespunde valorii medii \pm DS.

7.9.3. Determinarea proprietăților anticancer

Activitatea citotoxică asupra liniilor de celule canceroase

Activitatea citotoxică a complexului La-Nd-DPY a fost evaluată pe diferite linii celulare reprezentative pentru diferite tipuri de cancer uman, cum ar fi A2780 și A2780cisR pentru cancerul ovarian, sensibile și, respectiv, rezistente la cisplatină, celulele PC3 pentru cancerul de prostată și celulele MCF7 în cazul cancerului de sân. Cisplatina a fost inclusă ca standard de referință pozitiv în determinările efectuate în scop comparativ, aceasta fiind un medicament ce conține în structura lui un metal (platina) și este aprobat clinic pentru chimioterapia cancerului [537,538]. Efectul compușilor asupra viabilității celulare a fost evaluat prin testul

MTT după incubare timp de 24 de ore și 48 de ore. La-Nd-DPY a demonstrat activitate citotoxică ridicată constantă pentru toate liniile celulare după 48 de ore de expunere. La timpuri de incubare mai scurte (24 h), profilul citotoxic a fost diferit în special pentru celulele canceroase ovariene A2780cisR și celulele canceroase de prostată (Figura 7.10).

Dintre ScPy și compușii indoliziniici simetrici, s-a remarcat citotoxicitatea mai ridicată a compușilor S2-e, Iz2-e și Iz1-c. Cisplatina, după ambele perioade de incubare s-a dovedit a fi mai puțin citotoxică asupra liniilor celulare decât complexul de Ln mixt (La-Nd-DPY) în toate tipurile de celule canceroase studiate (Figura 7.11). Complexul mixt de Ln a dovedit o acțiune citotoxică ridicată asupra celulelor rezistente la cisplatină și celulelor PC3, aceste celule fiind cunoscute pentru comportamentul lor extrem de agresiv [539]. Aceste rezultate au indicat că nici pro-ligandul S1-a și nici sărurile de lantanide nu sunt speciile active responsabile pentru citotoxicitatea observată a complexului mixt de lantanide.

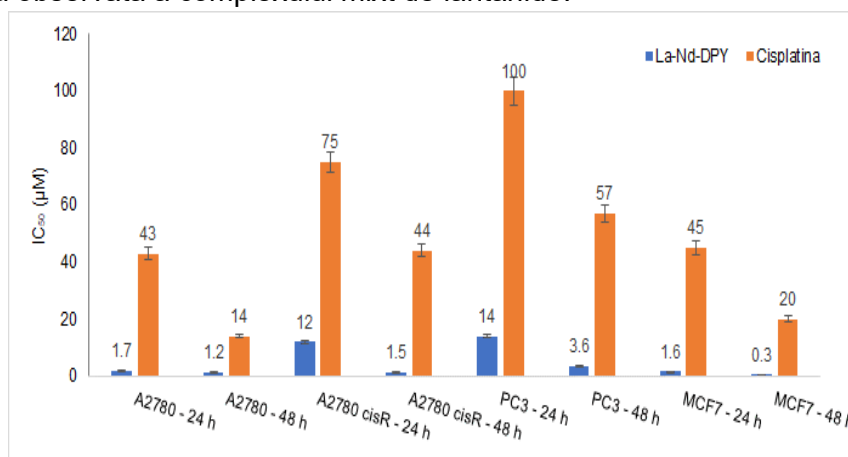


Figura 7.11. Valorile IC₅₀ (µM) obținute pentru complexul La-Nd-DPY și cisplatină asupra diferitelor tipuri de celule canceroase după 24 și 48 de ore de incubare. Datele sunt media a cel puțin două experimente independente în hexaplicat fiecare ± DS

Activitatea citotoxică asupra sferoizilor tumorali

În urma evaluării citotoxicității pe liniile de celule canceroase umane, s-a evaluat interacțiunea complexului mixt La-Nd-DPY pe un model avansat de celule canceroase tridimensionale de sferoizi tumorali multicelulari derivați din linia celulară de cancer de prostată PC3. Acest tip de metodă de cultură tridimensională pune în evidență micromediul *in vivo* al celulelor tumorale, celulele cultivate crescând sub formă de sfere care promovează interacțiunile celulă-celulă și celulă-ECM (matrice extracelulară), și care lipsesc în cultura 2D convențională. Sferoizii tumorali PC3 au fost cultivați și crescuți timp de 3 zile, după care s-au incubat în prezența complexului La-Nd-DPY timp de 48 de ore. Imaginile sferoizilor PC3 care au fost expuși la diferite concentrații ale complexului mixt de lantanide sunt reprezentate în Figura 7.13.

Dimensiunea și forma sferoizilor au fost afectate de expunerea la concentrații mai mari ale complexului analizat (La-Nd-DPY) conform imaginilor microscopice (Figura 7.13), acest rezultat fiind confirmat de scăderea creșterii sferoizilor PC3 prin expunerea la complexul mixt de Ln (Figura 7.14.a). S-a remarcat o scădere a dimensiunii sferoizilor incubați cu concentrația mai mare (50 µM) a compusului analizat, deși a existat deja o întârziere vizibilă în creșterea sferoizilor, comparativ cu probele martor, începând de la o concentrație de doar 5 µM. Rezultatele obținute la testele de viabilitate prezentate în Figura 7.14.b arată că, spre deosebire de cazul culturilor convenționale monostrat, în cazul sferoizilor 3D complexul prezintă o citotoxicitate mai scăzută (valori de ~80% din viabilitatea probei martor la concentrații mai mari). Acest lucru este similar cu alte date prezentate în studii din literatura de specialitate, sistemele de cultură 3D fiind frecvent mai refractare la tratamentele anticancer din

cauza penetrării limitate a medicamentelor și activării mai multor mecanisme de rezistență [540]. Modelele sferoide pot imita gradientii metabolici și proliferativi ai tumorilor *in vivo*, cu modificări ulterioare ale fenotipului și statutului celular, prezentând chimiorezistență multicelulară.

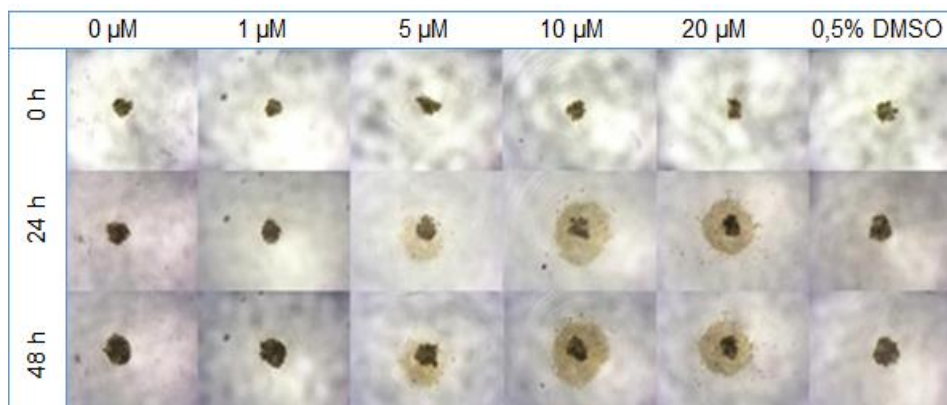


Figura 7.13. Imagini microscopice reprezentative ale sferoizilor PC3 înainte (0 h) și după (24 și 48 h) expunerea la diferite concentrații ale complexului mixt de Ln. Probele martor de referință sunt sferoizii incubați numai cu mediul de cultură (martor-0μM) sau cu 0,5% DMSO

Producția de ROS

Potențiala inducere a formării intracelulare de ROS de către La-Nd-DPY și cisplatină în celulele A2780 și PC3 a fost analizată folosind un compus fluorescent, H₂DCFDA, care poate detecta peroxidul de hidrogen, radicalii hidroxil sau peroxinitrit. Formarea ROS a fost prezentă pentru complexul mixt într-un mod direct proporțional cu concentrația pentru ambele linii celulare. În ceea ce privește cisplatină, citotoxicitatea acesteia a fost corelată cu generarea de ROS mitocondriale care pot genera procese dăunătoare și pot influența funcțiile metabolice, care în cele din urmă pot duce la moartea celulelor [530,540]. Cu toate acestea, în aceleași condiții experimentale, nu s-a observat producerea de ROS, detectabile în prezența cisplatină, probabil din cauza timpului scurt de expunere (3 ore) (Figura 7.15).

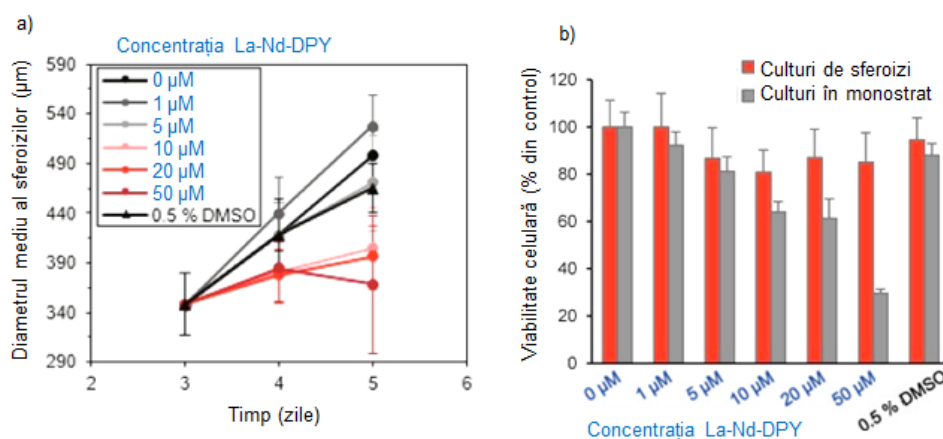


Figura 7.14. Efectul expunerii la complexul La-Nd-DPY asupra creșterii sferoizilor PC3 (a) reprezentat prin diametrul mediu al sferoizilor (în μm) în funcție de numărul de zile de cultivare și viabilitatea celulară după 48 de ore (b) evaluată prin testul APH, în paralel cu celulele cultivate în monostrat. Martorii sunt reprezentați de sferoizi sau celulele cultivate în monostrat prin incubare doar cu mediul de cultură sau cu 0,5% DMSO. Datele prezentate sunt media experimentelor realizate în hexaplicat ± DS

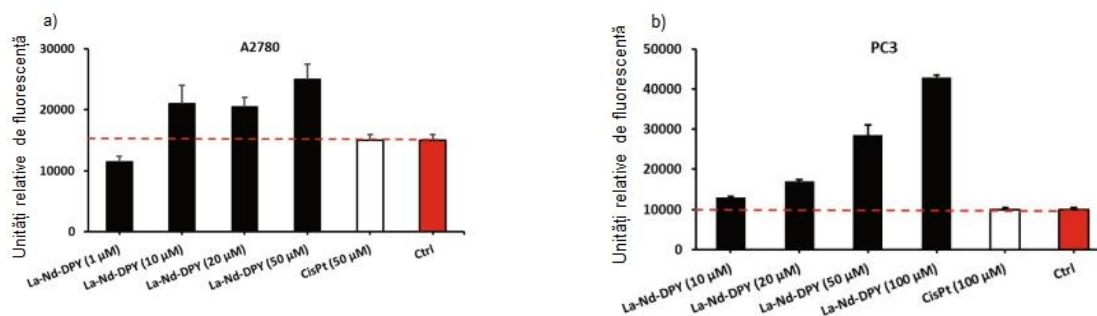


Figura 7.15. Producția de ROS de către celulele A2780 (a) și PC3 (b) după expunerea de 3 ore la La-Nd-DPY și cisplatină (cisPt) detectate cu H₂DCFDA. Rezultatele sunt exprimate în unități relative de fluorescență (media a patru replici ± DS). Probele control (Ctrl) constau din celule incubate numai în mediul de cultură

Evaluarea apoptozei

Activarea caspazei

Moartea celulelor apoptotice este mediată de caspaze, o familie de cistein proteaze importante pentru menținerea homeostaziei prin reglarea inflamației și lizei celulare [541]. Pentru a evalua influența complexul mixt de Ln asupra apoptozei celulare, forma activă a caspazelor 3 și 7 a fost cuantificată în liniile celulare A2780 și PC3 [542]. Complexul studiat, La-Nd-DPY, nu a putut activa caspaza-3/7 în aceste linii celulare, iar valorile detectate au fost similare cu cele obținute pentru celulele control incubate numai în mediul de cultură (Figura 7.16).

Fragmentarea ADN-ului

Pentru a confirma rezultatele obținute cu ajutorul metodei de activare a caspazei, s-a efectuat un test de colorare Hoechst a nucleelor pentru a determina procentul de celule apoptotice într-o populație de celule PC3 în prezența și absența complexului La-Nd-DPY. Semnele distinctive morfologice ale apoptozei includ condensarea ADN-ului, fragmentarea cromatinei sau formarea de fragmente apoptotice și s-a urmărit apariția unor markeri apoptotici în culturile evaluate.

Corelând incapacitatea acestei linii celulare de cancer de prostată de a activa caspaza-3/7 observată în metoda anterioară, nu s-a observat nici o creștere semnificativă statistic a nivelului de apoptoză pe o populație celulară după expunerea timp de 24 de ore sau 48 de ore la concentrațiile IC₅₀ ale compusului evaluat (Figura 7.17). Prin urmare, moartea celulară observată în testul de citotoxicitate nu este provocată de apoptoză și există în aceste condiții alte mecanisme de moarte celulară.

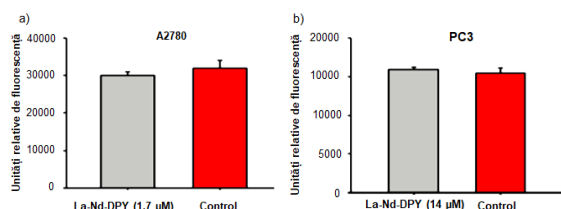


Figura 7.16. Activitatea caspazei 3/7 în celulele A2780 (a) și celulele PC3 (b), după expunerea timp de 24 de ore la o concentrație corespunzătoare valorii IC₅₀ obținute pentru aceeași linie celulară. Datele au fost obținute din trei exemplare per condiție și au fost exprimate ca medie ± DS din două teste independente, în unități relative de fluorescență

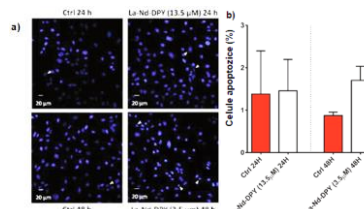


Figura 7.17. a) Analize microscopice reprezentative ale celulelor PC3 colorate cu Hoechst 33,342 (A) în absența (ctrl) sau în prezența complexului La-Nd-DPY timp de 24 de ore sau 48 de ore; b) Cuantificarea numărului de celule PC3 apoptotice (%) cultivate.

7.9.4. Evaluarea activității antineurodegenerative

Inhibarea colinesterazei

Activitatea colinesterazei a fost evaluată folosind metoda spectrofotometrică Ellman [543]. O serie de compuși au fost evaluați în această metodă împotriva acetilcolinesterazei (AChE) din pește (eeAChE) și butirilcolinesterazei cabaline (eqBChE), iar compușii care au prezentat o activitate remarcabilă asupra acestora au fost testați mai departe împotriva enzimelor umane (hAChE și hBChE). Obiectivul acestei metode a fost de a selecta molecule care ar putea inhiba semnificativ colinesterazele. Pentru a îndeplini acest obiectiv, a fost efectuată mai întâi o selecție a acțiunii compușilor la o concentrație de 4 μM împotriva eeAChE și eqBChE (Figura 7.18). Doar moleculele care au inhibat cel puțin 50% din activitatea ChE la această concentrație micromolară au fost apoi evaluate într-un interval de concentrație mai mare pentru a calcula cu precizie valorile IC_{50} . Datele obținute prin această metodă sunt colectate în Tabelul 7.2 (Figura 7.19 pentru curbele IC_{50}).

Absorbanța UV-Vis ridicată, deja menționată a moleculelor Iz1-f, Iz-Py-1, Iz-Py-2 și Iz-Py-3, împreună cu solubilitatea lor redusă în apă, au împiedicat studiul lor într-o gamă largă de concentrații, iar efectele promițătoare obținute pentru o concentrație selectată de 4 μM , în special pentru Iz-Py-1 și Iz-Py-2 împotriva eeAChE, nu a putut fi confirmată (Figura 7.18.a). În mod similar, indolizinin-piridinele neîncărcate (monoindolizinele: Iz2-g, Iz3-a și Iz3-b) sunt inactice împotriva ambelor enzime (Figura 7.18.b și c). Majoritatea hibridilor de indolizinin-piridiniu cationici simetrici corespunzători au fost activi la 4 μM , spre deosebire de ceea ce s-a observat în cazul majorității bis-indolizinelor (Tabelul 7.3) care formează cu ușurință agregate în soluții apoase. Solubilitatea în general mai bună a hibridilor de indolizinin-piridiniu a permis evaluarea lor într-un interval de concentrație mai mare. Hibridii cationici au prezentat IC_{50} cu valori din domeniul micromolar, cu o ușoară selectivitate pentru eeAChE comparativ cu eqBChE (Tabelul 7.2), cu excepția compusului Iz-Py-7 și a analogului său Iz-Py-10, care au prezentat cea mai mare selectivitate (fiind de 10 ori mai activ față de eeAChE comparativ cu eqBChE). Pentru comparație s-a efectuat evaluarea analogilor simetrici (Tabelul 7.3) utilizând eeAChE cu o activitate enzimatică de 0,5U. Compușii evaluați au prezentat valori IC_{50} din domeniul 2-5 μM . Seriile compușilor Iz3a-b și Iz-Py-8-11, care conțin ca substituent gruparea 3-p-metoxibenzoil, au demonstrat activitate mai ridicată împotriva celor două enzime, comparativ cu analogii lor Iz2-f, Iz-Py-4-7. Acest efect poate fi legat de o mai bună flexibilitate a punții de propilen comparativ cu puntea mai scurtă de etilen.

Tabelul 7.2. Valorile concentrațiilor IC_{50} (μM) pentru inhibarea ChE *

Probe analizate	Iz2-g	Iz-Py-4	Iz-Py-5	Iz-Py-6	Iz-Py-7	Iz3-a	Iz3-b
ee AChE	-	4,4 \pm 0,5	-	2,0 \pm 0,4	5,4 \pm 0,1	-	-
eq. BChE	-	17,5 \pm 8,2	-	8,8 \pm 3,5	55,4 \pm 2,3	-	-
hAChE	nd	6,6 \pm 1,1	nd	8,0 \pm 0,9	37,1 \pm 4,1	nd	nd
hBChE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Probe analizate	Iz-Py-8	Iz-Py-9	Iz-Py-10	Iz-Py-11	Donepezil		
ee AChE	2,6 \pm 0,6	> 10 μM **	7,9 \pm 0,6	2,7 \pm 0,6	0,052 \pm 0,007		
eq. BChE	7,5 \pm 3,4	4,8 \pm 1,3	72,1 \pm 15,9	7,3 \pm 1,2	6,0 \pm 1,7		
hAChE	3,3 \pm 0,7	nd	4,0 \pm 0,9	9,4 \pm 2,5	0,029 \pm 0,005		
hBChE	38,9 \pm 14,0	nd	> 100 μM	nd	9,2 \pm 5,6		

*Valorile IC_{50} (μM) sunt exprimate ca medie \pm abaterea standard a trei determinări independente per condiție; moleculele indicate ca inactice (-) nu au prezentat activități semnificative în timpul unei prime selecții la concentrația de 4 μM . Donepezilul a fost utilizat ca martor (Figura 7.19 și Figura 7.20 pentru curbele IC_{50}). ** Formarea de agregate la concentrații mai mari în prezența eeAChE.

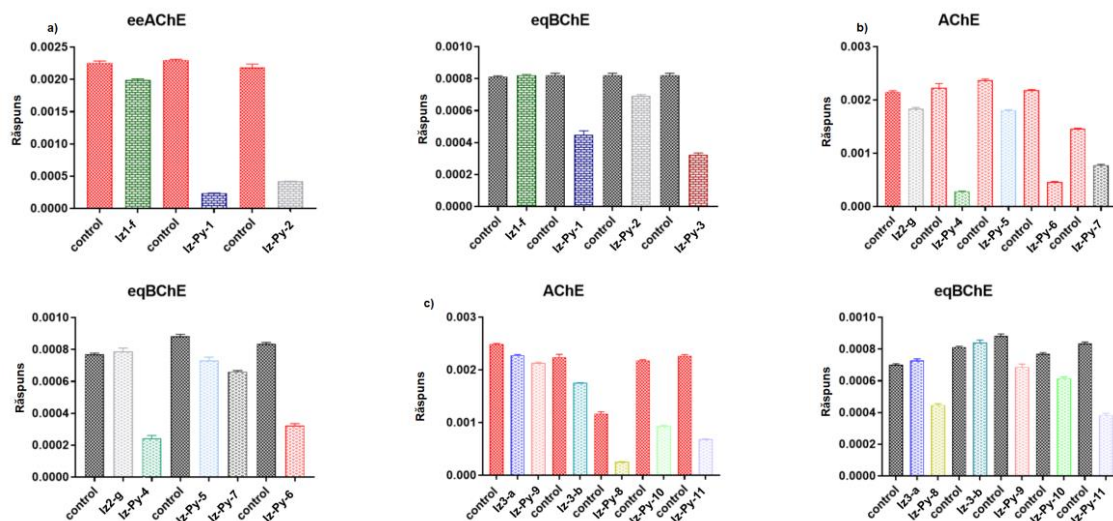


Figura 7.18. Evaluări preliminare ale activității compușilor studiați (4 μ M) pe eeAChE și eqBChE. Barele de eroare reprezintă deviația standard obținută din trei experimente independente efectuate în cel puțin trei exemplare.

Tabelul 7.3. Evaluarea potențialului de inhibare a activității AChE

Compusul analizat	IC ₅₀ AChE (μ M)	Structura chimică	Compusul analizat	IC ₅₀ AChE (μ M)	Structura chimică
S1a	4,4 \pm 0,4		Iz1a	3,7 \pm 0,9	
S1b	Inactiv (>20)		Iz1b	Inactiv (>20)	
S1c	2,0 \pm 0,3		Iz1c	2,4 \pm 0,3	
S2a	5,7 \pm 1,2		Iz2a	Inactiv (>20)	

Compusul analizat	IC ₅₀ AchE (μM)	Structura chimică	Compusul analizat	IC ₅₀ AchE (μM)	Structura chimică
S2b	5,3 ± 2,2		Iz2b	Inactiv (>50)	
S2c	Inactiv (>50)		Iz2c	Inactiv (>20)	

Seriile compușilor Iz3a-b și Iz-Py-8-11, care conțin ca substituent gruparea 3-p-metoxibenzoil, au demonstrat activitate mai ridicată împotriva celor două enzime, comparativ cu analogii lor Iz2-f, Iz-Py-4-7. Acest efect poate fi legat de o mai bună flexibilitate a punții de propilen comparativ cu puntea mai scurtă de etilen. În ceea ce privește inhibarea eeAChE, hibridul de indolizinin-piridiniu Iz-Py-5 a fost singurul compus hibrid inactiv. Acest hibrid are în structura sa gruparea voluminoasă lipofilă N-dimetoxibenzil împreună cu substituentul 3-p-metoxibenzoil. Analogul său Iz-Py-9 a demonstrat activități mai ridicate împotriva ambelor enzime, cu toate acestea, o analiză mai detaliată a curbelor și calculelor Prism (Figura 7.19) a arătat că solubilitatea sa limitată la concentrații mai mari de 10 μM în prezența eeAChE duce la o scădere a valorii coeficientului R² comparativ cu celelalte molecule testate. Compusul Iz-Py-11, analogul lui Iz-Py-9, în care 3-p-metoxibenzoilul a fost înlocuit cu gruparea metiloxycarbonil de dimensiune mai mică, a prezentat o activitate bună atât împotriva eeAChE (IC₅₀ = 2,7 μM) cât și împotriva eqBChE (IC₅₀ = 7,3 μM) fără nici o limitare aparentă a solubilității. Datorită costurilor ridicate ale colinesterazelor umane, doar câteva molecule active au fost selectate pentru evaluarea ulterioară (Tabelul 7.2 și Figura 7.20 pentru curbele IC₅₀).

Pentru majoritatea compușilor testați, valorile IC₅₀ împotriva hAChE au rămas în același interval micromolar, cu excepția compusului Iz-Py-7 care și-a pierdut activitatea de inhibare a colinesterazei în cazul celor umane, cu IC₅₀ > 30 μM pentru hAChE. Două molecule, Iz-Py-8 și Iz-Py-10, care diferă doar prin natura substituentului din poziția 3 a inelului indolizinic, au fost de asemenea testate împotriva hBChE. Eficiența compusului Iz-Py-8, care a arătat anterior o valoare IC₅₀ micromolară semnificativă față de eqBChE, în cazul enzimei umane valoarea a scăzut puternic (IC₅₀ / 5) față de hBChE. Compusul Iz-Py-10 nu a fost activ (IC₅₀ > 100 μM) confirmând selectivitatea observată anterior pentru AChE față de BChE.

Au fost apoi efectuate calcule de andocare pentru a compara posibilele mecanisme de legare ale compușilor Iz-Py-8 și Iz-Py-10 în situsurile active ale celor două ChE umane. În timp ce ambii sunt activi ca inhibitori ai AChE (din pește sau umană), acești compuși au prezentat un comportament diferit asupra BChE (cabalină sau umană) (**Capitolul 8**).

Inhibarea fibrilelor amiloidice

Pentru a monitoriza efectul moleculelor asupra procesului de formare a fibrilelor amiloidice se utilizează în general testul de fluorescență pe bază de tioflavină T (ThT), deoarece este foarte sensibil la structurile β-pliate ale fibrilelor [545]. Prin legarea de fibrile, ThT afișează o emisie deplasată spre roșu, permițând detectarea selectivă a structurilor

bogate în foi β , cum ar fi fibrilele. S-au utilizat două modele de peptide amiloidice, ambele derivate din secvența proteinei *tau* (Figura 7.22).

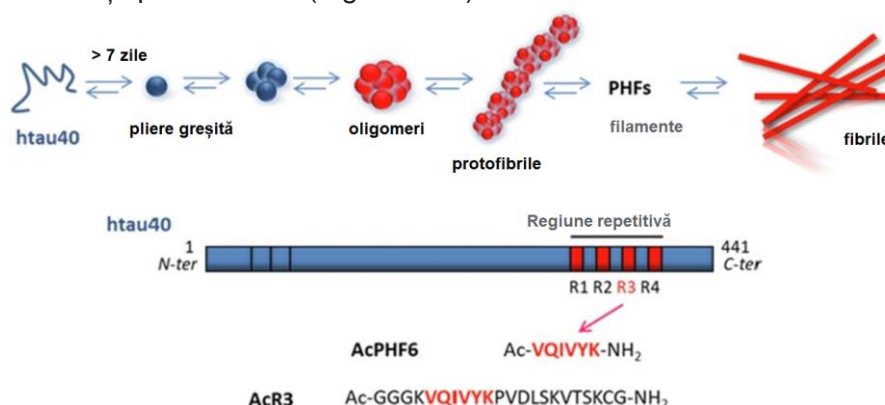


Figura 7.22. Procesul de formare de fibrile tau-t- (în structurile β -pliate: roșii) și secvențele celor două modele tau utilizate în acest studiu

Modelul AcPHF6 este o peptidă scurtă de 6 aminoacizi care corespunde nucleului fibrilelor tau [546]. Procesul său de formare a fibrilelor este mult mai rapid decât în cazul proteinei tau sau a peptidelor amiloidice, care poate dura zile și este bine adaptată pentru o primă selecție a unui set de molecule prin teste de fluorescență ThT [500]. Studiile au fost efectuate în tampon fosfat, iar semnalul de fluorescență ThT a fost înregistrat în absența și în prezența moleculelor Iz-Py și Iz la o concentrație de 100 μ M (corespunzând unui raport de 1/1 cu peptida amiloidică). Pentru modelul AcR3, s-a adăugat heparină ca inductor de fibrilație și s-a folosit 10 μ M heparină corespunzând unui raport de 0,1/1 cu această peptidă amiloidică. Rezultatele raportate în Figura 7.23 sunt exprimate ca procent de inhibare a fluorescenței ThT. Godeurile probelor martor au fost utilizate pentru a evalua orice emisie de fluorescență intrinsecă posibilă a hibridilor. Nu a fost detectată nici o fluorescență suplimentară față de cea a ThT liber pentru aceste probe control.

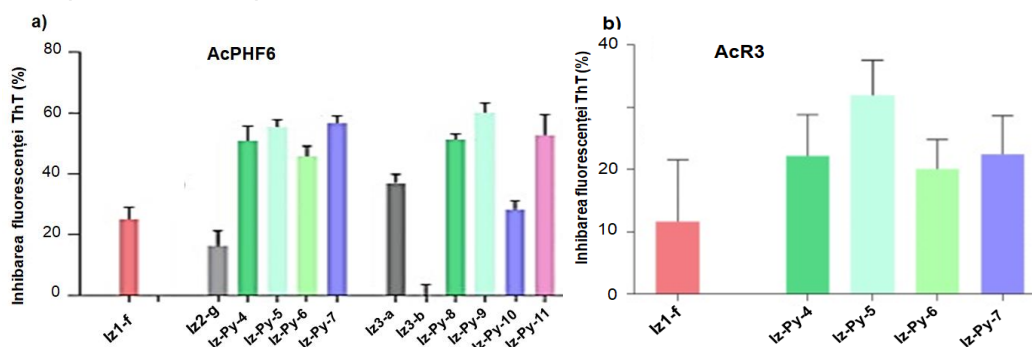


Figura 7.23. Teste ThT pe modele AcPHF6 (a) și AcR3 (b) ale fibrilelor amiloidice ($\lambda_{excitare} = 440$ nm, $\lambda_{emisie} = 480$ nm). Rezultatele sunt exprimate ca % de inhibare a fluorescenței ThT utilizând un raport compus/model de 1/1 (concentrație 100 μ M). Barele de eroare reprezintă media a trei experimente independente efectuate în triplicat

După cum se poate observa în Figura 7.23.a, majoritatea compușilor hibridi au prezentat activitate pe modelul AcPHF6. Compușii Iz2-g și Iz3-b au fost semnificativ mai puțin eficienți. Lungimea punții de legătură dintre nucleele piridinice nu par să joace un rol important, deoarece activități similare au fost observate atât pentru compușii analizați cu doi sau trei atomi de carbon, și nici natura substituenților din structura fiecărui hibrid nu părea să fie importantă. Pentru a investiga acest proces mai departe, s-au evaluat pe modelul de peptidă mai lung AcR3 cei mai activi patru compuși Iz-Py-4,5,6 și 7, precum și Iz1-f. S-a constatat că eficiența procesului de inhibare a fost împărțită cel puțin cu un factor doi (Figura 7.23).

S-a remarcat faptul că inhibarea fluorescenței în testele ThT nu reprezintă neapărat inhibarea formării fibrilelor amiloidice și poate apărea și deplasarea ThT legată de compușii testați. În consecință, s-a preparat o soluție de fibrile AcR3 în prezența ThT și s-au înregistrat semnalele ThT înainte și imediat după adăugarea compușilor din seria Iz-Py-4,5,6 și 7 (Figura 7.24.a, linii punctate). Nu a fost observată nici o scădere a semnalului ThT la 480 nm, ceea ce sugerează că compușii nu sunt capabili să înlocuiască colorantul legat. Aceeași observație a fost obținută pentru compusul Iz1-f. Pentru a verifica că semnalul înregistrat este încă de la ThT legat, s-a verificat că fluorescența compușilor nu a crescut semnificativ în prezența fibrilelor preformate la lungimile de undă de lucru (Figura 7.24.a, linii continue). Cu toate acestea, creșterea ușoară și deplasarea spre roșu a semnalului de fluorescență observate în Figura 7.24.a (linii punctate) la adăugarea moleculelor încărcate Iz-Py-4-6 se datorează probabil acestei fluorescențe suplimentare, chiar slabe, și sugerează că Iz-Py-4-6 interacționează puternic cu fibrilele. Acest lucru este confirmat de emisia de fluorescență ridicată în prezența fibrilelor atunci când sunt excitate la absorbanța maximă, în timp ce nu prezintă fluorescență în absența acestora (Figura 7.24.b). Compusul Iz1-f a fost evaluat prin testul ThT (Figura 7.24). Absorbția puternică a compușilor Iz-Py-1 și Iz-Py-2 în jurul a 415 nm și, în plus, fluorescența puternică a Iz-Py-1 și Iz-Py-3 în intervalul de lungimi de undă a emisiei de fluorescență ThT legat nu au permis evaluarea lor [547] (Figurile 7.21 și 7.26). Compusul Iz-Py-7, care are în structura sa două grupări esterice pe nucleul de indolizină, este excepția de la regulă. Analogii Iz-Py-9 și Iz-Py-11 au prezentat același comportament (Figura 7.25): Iz-Py-11 cu două grupări esterice nu a prezentat o emisie semnificativă în prezența fibrilelor AcR3, spre deosebire de Iz-Py-9, sugerând importanța substituentului benzoil pentru o interacțiune mai înaltă cu fibrilele.

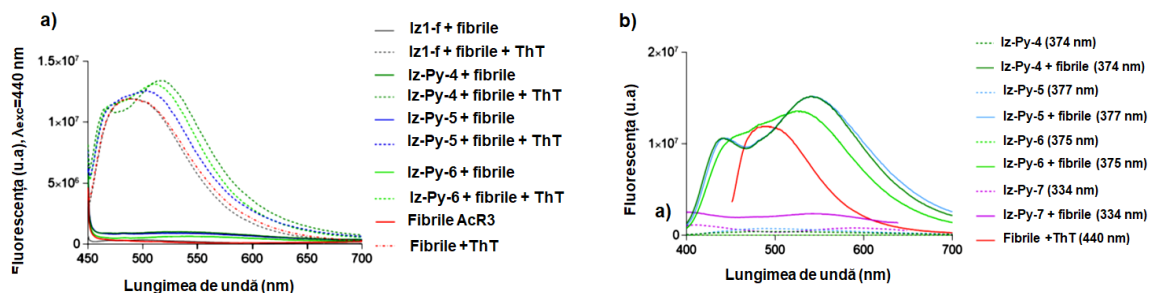


Figura 7.24. (a) Evaluarea deplasării maximului de fluorescență al ThT. Lungimea de undă de excitație a fost de $\lambda=440$ nm. Raportul compus/ThT a fost de 10/1 (100/10 μ M) iar fibrilele AcR3 au fost preparate din 100 μ M peptidă în absență (linii continue) sau în prezență de ThT (linii punctate). (b) Emisia de fluorescență a compușilor (100 μ M) individuali (linii punctate) sau în prezența a 100 μ M fibrile preformate (linii continue). Lungimea de undă de excitație corespunde cu absorbanța maximă a acestora (valoarea menționată în paranteze); ThT în prezența fibrilelor este utilizat pentru evaluarea comparativă

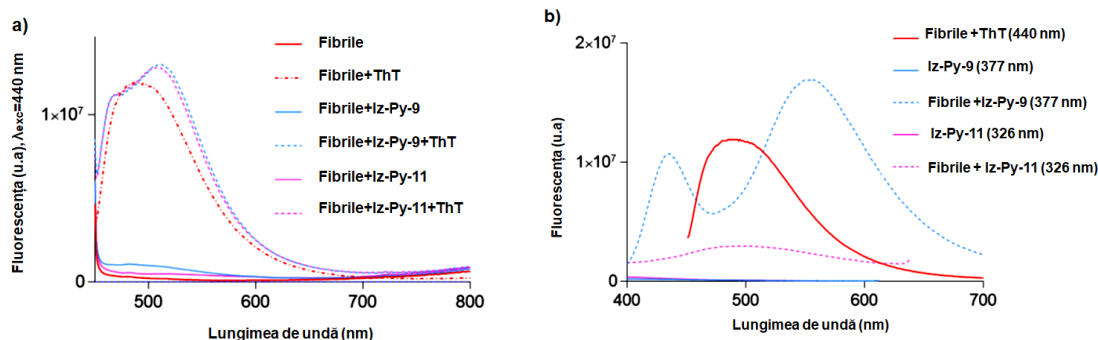


Figura 7.25. Interacțiunea Iz-Py-9 și Iz-Py-11 cu fibrile AcR3. (a) Testul ThT, $\lambda_{excitație}=440$ nm. Raportul compus/ThT = 1/1 (100 μ M), fibrilele AcR3 fiind preparate din 100 μ M de peptidă, 10 μ M heparină în absența (linii continue) sau în prezența (linii punctate) a 100 μ M ThT. (b) Emisia în fluorescență pentru

compuși Iz-Py-9 și Iz-Py-11 (100 μ M) individual și în prezența a 100 μ M de fibrile preformate (preparate în absența ThT). Lungimea de undă de excitație corespunde cu absorbanta maximă a acestora.

Pentru a studia interacțiunea moleculelor hibride s-a folosit spectroscopia de dicroism circular (CD) care oferă informații structurale despre peptidele amiloide în timpul procesului de agregare. Spectrele CD ale peptidei AcR3 au fost înregistrate în tampon fosfat în prezența heparinei ca inductor de fibrilație. Ei au prezentat profilul tipic al unei peptide cu o fracțiune mare de structuri β -pliate, caracterizată printr-un umăr negativ larg în jur de 218 nm (Figura 7.28, culoare roșie) în mai puțin de 24 de ore la 37°C. Nu s-a observat nici o diferență semnificativă atunci când compușii Iz1-f și Iz-Py1-3 au fost adăugați peste amestecul de fibrilație (Figura 7.28.a) demonstrând că acești compuși nu au împiedicat formarea structurilor β -pliate. Aceste rezultate tind să arate că Iz1-f și Iz-Py1-3 nu inhibă formarea fibrilelor sau cel puțin formarea structurilor bogate în foaie β -pliate.

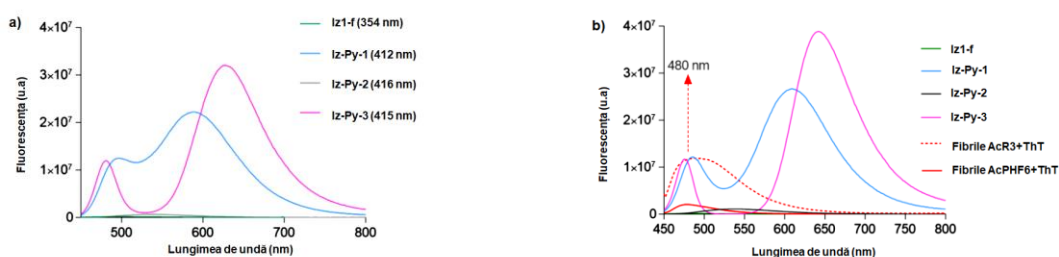


Figura 7.26. Spectrele de fluorescență. (a) Spectrele au fost înregistrate la o concentrație de 20 μ M în tampon fosfat de 50 mM în prezența a 0,1% DMSO. Lungimile de undă de excitație corespund absorbantei maxime (valorile dintre paranteze); (b) Spectrele au fost înregistrate la o concentrație de 100 μ M în tampon fosfat de 50 mM în prezența a 0,5% DMSO. Lungimea de undă de excitație a fost de 440 nm, care este utilizată pentru testul ThT. Pentru a compara profilurile de fluorescență ale colorantului ThT (10 μ M) în prezența fibrilelor AcR3 și AcPHF6 (100 μ M), acestea fiind reprezentate cu roșu. Se evidențiază intensitatea fluorescenței compușilor Iz-Py-1 și Iz-Py-3 la 480 nm.

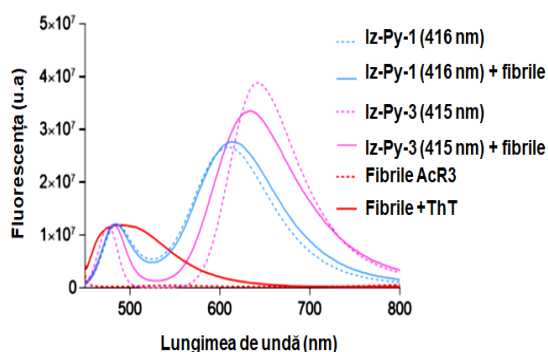


Figura 7.27. Spectrele de fluorescență pentru Iz-Py-1 și Iz-Py-3 cu fibrile AcR3. Spectrele au fost înregistrate la o concentrație de 100 μ M de compus în tampon fosfat de 50 mM în prezența a 0,5% DMSO, individual sau în prezența a 100 μ M de fibrile AcR3 preformate. Lungimea de undă de excitație corespunde absorbantei maxime a acestora (valoarea dintre paranteze). Pentru a compara profilul de fluorescență al colorantului ThT (100 μ M) în prezența ACR3, acesta fiind reprezentat cu roșu

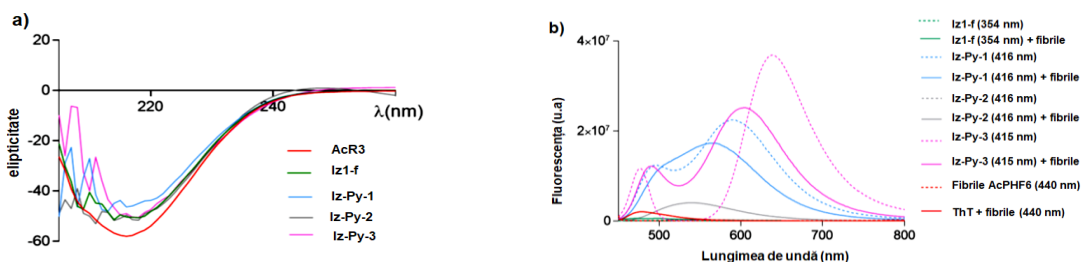


Figura 7.28. (a) Spectre CD obținute după o incubare de 24 de ore la 37°C a AcR3 la concentrația de 100 μ M, individual (roșu) sau în prezența a 100 μ M de Iz1-f și Iz-Py1-3 (verde, albastru, gri și roz). Heparina 10 μ M a fost utilizată ca inductor de fibrilație. (b) Emisia de fluorescență a seriei Iz1-f și Iz-Py1-3 (100 μ M) pentru fiecare compus în parte (linii punctate) și în prezența a 100 μ M de fibrile AcPHF6 preformate (linii continue). Lungimea de undă de excitație corespunde cu absorbanta maximă a acestora (valoarea menționată în paranteze); Pentru comparație s-a utilizat 10 μ M ThT în prezența fibrilelor (linia continuă roșie)

CAPITOLUL 8. Analiza unor compuși sintetizați prin studii *in silico* (modelare moleculară)

8.2. Obiective științifice specifice

Obiectivul științific specific al cercetărilor prezentate în acest capitol a fost de a evalua *in silico* compuși N-heterociclici împotriva maladii Alzheimer prin determinarea interacțiunilor intra-moleculare precum și a afinității de legare de molecula țintă. Pentru a îndeplini acest obiectiv, au fost efectuate studii de andocare cu cele mai relevante molecule pentru a înțelege factorii implicați în inhibarea colinesterazei, precum și influența structurilor chimice asupra modurilor de legare de molecule cheie implicate în AD.

8.5. Rezultate și discuții

S-a determinat un set de descriptori ADMET pentru moleculele hibride iar datele obținute sunt colectate în Tabelul 8.1.

Tabelul 8.1. Descriptori moleculari ADMET calculați pentru o serie de molecule hibride

Compusul analizat	Numărul de situsuri acceptoare de legături de H	Masa moleculară (g/mol)	LogP (LogD)	PSA (Å ²)	Trecerea BBB
Iz-1-f	5	370,4	3,78 (3,77)	60,6	da
Iz-Py-1	4	385,4	-0,16 (-0,16)	51,6	da
Iz-Py-2	9	430,4	-0,22 (-0,22)	94,8	nu
Iz-Py-3	6	415,4	-0,32 (-0,32)	60,9	da
Iz2-f	7	414,4	4,15 (3,96)	69,9	da
Iz2-g	5	338,3	2,86 (3,14)	69,9	da
Iz-Py-4	6	429,5	0,21 (0,21)	60,9	da
Iz-Py-5	10	565,6	1,62 (1,62)	79,3	nu
Iz-Py-6	8	473,5	-0,42 (-0,42)	81,1	nu
Iz-Py-7	4	353,4	-1,09	60,9	da
Iz3-a	7	428,5	4,60 (4,36)	69,9	da
Iz3-b	5	352,4	3,30 (3,53)	69,9	da
Iz-Py-8	6	443,5	0,65 (0,65)	60,9	da
Iz-Py-9	10	579,6	2,06 (2,06)	79,3	nu
Iz-Py-10	4	367,4	-0,64 (-0,64)	60,9	da
Iz-Py-11	8	503,5	0,77 (0,77)	79,3	nu

Pentru a realiza un studiu comparativ între compușii hibridi din tabelul 8.1 și alți compuși sintetizați, s-au calculat și descriptorii pentru unele săruri simetrice de bis-piridiniu și bis-indolizine (S1a-c, S2a-c și, respectiv, Iz1a-c și Iz2a-c). Toate calculele au fost realizate folosind software-ul *Marvin* și colectate în Tabelul 8.2.

Tabelul 8.2. Descriptorii moleculari ADMET pentru săruri simetrice de bis-piridiniu și bis-indolizine

Compusul analizat	Numărul de acceptori de legături de H	Masa moleculară (MW)*	LogP (=LogD)
S1a	4	394,4	-4,24
S1b	14	484,4	-4,36
S1c	8	454,5	-4,55
S2a	4	422,5	-3,35
S2b	14	512,5	-3,47
S2c	8	482,5	-3,66
Iz1a	8	584,6	6,37
Iz1b	18	674,6	6,25
Iz1c	12	644,6	6,06
Iz2a	8	612,6	7,26
Iz2b	18	702,6	7,14
Iz2c	12	672,7	6,95

Piridil-indolizinele (Iz1-f, Iz2-f, Iz2-g, Iz3-a și Iz3-b) nu sunt protonate sau sunt doar parțial protonate la pH 7,4 (pKa calculat de 4,6 pentru Iz1-f și 5,6 pentru ceilalți compuși), ceea ce duce la o creștere mare a lipofilității reflectată de valorile mari LogP. Alchilarea inelului piridinic duce la generarea de molecule monocationice într-un interval mare de pH, conferind astfel valori ale descriptorilor ADMET compatibile cu potențialele medicamente ale SNC [596].

În seriile de molecule hibride derivate de la 1,2-di(4-piridil)etan și 1,3-bis(4-piridil)propan, s-a constatat că schimbarea grupării mai hidrofobe p-metoxibenzoil de pe nucleul indolizinic de către gruparea metiloxycarbonil nu are niciun efect asupra PSA, dar scade în mod semnificativ valorile LogP (de la 0,65 pentru Iz-Py-8 la -0,64 pentru Iz-Py-10, sau de la 2,06 pentru Iz-Py-9 la 0,77 pentru Iz-Py-11). Creșterea lungimii catenei dintre cele două nuclee piridinice nu are niciun efect asupra PSA, dar duce la o creștere a lipofilității (LogP fiind cuprins între -0,32 pentru Iz-Py-3 și 0,65 pentru Iz-Py-8).

Capacitatea de penetrare a BBB a fost estimată folosind serviciul web *Swiss ADME*. Rezultatele au prezis că unele molecule prezintă PSA și/sau LogP cu valori ridicate (Iz-Py-5, Iz-Py-6, Iz-Py-9, Iz-Py-11), adică acei compuși care conțin substituenți lipofili mari nu sunt favorabile penetrării BBB. Dicationii simetrici de bis-piridiniu (S1a-c, S2a-c) sunt prea polari (logP puternic negativ). De asemenea, s-a observat că bis-indolizinele (Iz1a-c, Iz2a-c) sunt prea lipofile (LogP > 6), cu valori ridicate ale PSA. Lipofilitatea lor ridicată calculată este corelată experimental cu o solubilitate scăzută în apă și formarea de agregate. Cu toate acestea, nu poate fi exclusă implicarea unui mecanism activ de penetrare a BBB.

Au fost efectuate **calcule de andocare** pentru a compara posibilele moduri de legare ale compușilor Iz-Py-8 și Iz-Py-10 (Figura 8.3) în situsurile active ale celor două colinesteraze umane, hAChE și hBChE. În timp ce ambii compuși s-au dovedit a fi activi ca inhibitori ai AChE (din pește sau umană), aceștia au prezentat un comportament diferit asupra BChE (cabalină sau umană). Este dificil să se proiecteze un inhibitor bun care să fie activ atât pe hAChE, cât și pe hBChE, deoarece aceste două enzime diferă considerabil în mărime (situsul de legare al hAChE este mult mai mic decât cel al hBChE) și compoziție (reziduuri W286, V294, Y124, Y337, F297 pentru hAChE și respectiv A277, P285, Q119, A328 și V288 pentru hBChE).

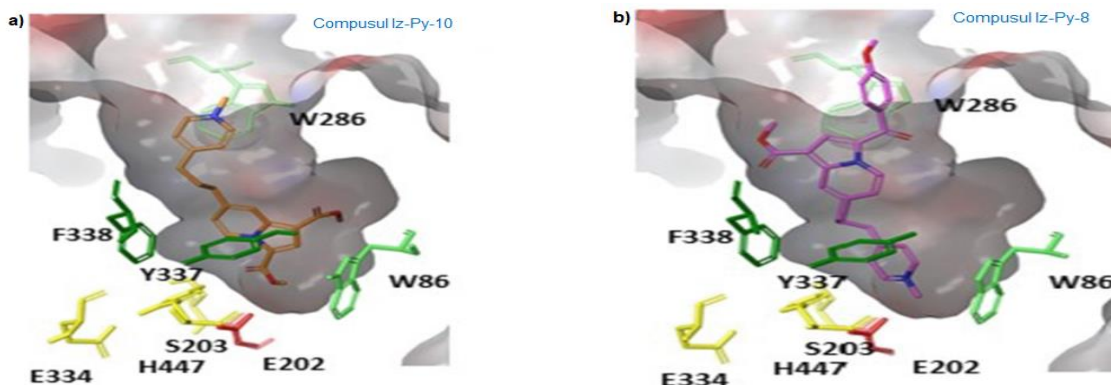
Compușii Iz-Py-8 și Iz-Py-10 au prezentat scoruri de andocare *Glide* de -11,3 și respectiv -9,3 kcal/mol în hAChE și -9,1 kcal/mol și respectiv -8,5 kcal/mol în hBChE. Aceste modele teoretice de afinitate sunt în concordanță cu valorile IC₅₀ experimentale prezentate în Capitolul 7, compusul Iz-Py-8 fiind mai activ decât Iz-Py-10 pe ambele enzime. În situsul activ hAChE (Figura 8.4), orientarea spațială optimizată a compusului Iz-Py-8 s-a identificat cu fragmentul de piridiniu orientat spre partea inferioară a situsului catalitic, în imediata apropiere de E202 și de serina catalitică S203 (Figura 8.4.b).

Acest mod de legare a fost pe deplin conservat printre cele mai bune 20 de poziții ale compusului Iz-Py-8, determinat probabil de interacțiunea stabilizatoare cu E202 cu sarcină negativă. Compusul Iz-Py-8 nu s-a aflat într-o poziție adecvată pentru hidroliza enzimatică cu hAChE. Compusul Iz-Py-10 cu o grupare metil-estică a fost orientat cu fragmentul de piridiniu spre intrarea în cutia *grid* (x, y, z), iar gruparea metil-estică din poziția 3 în zona proceselor catalitice din partea inferioară, permițând o posibilă hidroliză (Figura 8.4.b). Fragmentul indolizinic este înconjurat de reziduurile W86, Y337, F338 iar fragmentul de piridiniu stabilește interacțiuni de tip π cu W286. Datorită dimensiunii sale mai mici, compusul Iz-Py-10 a arătat mai multă eterogenitate între pozițiile de legare. Aceste date sunt în concordanță cu activitatea similară observată atât pentru Iz-Py-8, cât și pentru Iz-Py-10 asupra hAChE.

În situsul de legare al hBChE, compusul Iz-Py-8 a adoptat o conformație optimizată orientată cu fragmentul de piridiniu inserat în partea de jos a situsului catalitic, aproape de subunitatea catalitică H438. Sarcina este stabilizată de grupările hidroxil din tirozina Y332, tirozina Y440 și de trei grupări carbonil ale reziduurilor A328, G78 și H438 (Figura 8.4.d). Reziduul W82 asigură o interacțiune favorabilă π cu fragmentul de piridiniu.

Esterul metilic este situat la mai puțin de 5 Å față de S198 catalitic și se presupune că acest compus poate adopta un mod de legare strâns de butirilcolină (substratul natural). Acest mod de legare a fost foarte conservat printre cele mai bune douăzeci de poziții ale compusului Iz-Py-8. Conformația optimizată a compusului Iz-Py-10 a arătat fragmentul său de piridiniu orientat spre intrarea în cutia *grid*, unde este stabilizat de oxigenul din gruparea carbonil al reziduuului A328 (Figura 8.4.c). Esterul metilic din poziția 1 se află într-o poziție foarte bună pentru hidroliza de către subunitatea S198. Compușii Iz-Py-8 și Iz-Py-10 au adoptat o orientare protejată a fragmentelor lor de piridiniu în situsul activ al hBChE, dar o poziționare inversă în hAChE, Iz-Py-8 apare cu fragmentul de piridiniu spre situsul activ, în timp ce Iz-Py-10 are același fragment orientat spre intrarea în cutia *grid*.

Compușii interacționează cu aminoacidul vecin AlaW286 din hAChE datorită interacțiunii electrostatice de natură pi-cation dintre substituentul benzoil din structura compusului Iz-Py-8 și fragmentul de piridiniu din structura compusului Iz-Py-10. În ceea ce privește cele două grupări esterice din structura compusului Iz-Py-10, s-a remarcat faptul că în cazul ambelor enzime, un ester metilic se află în poziție favorabilă pentru hidroliză.



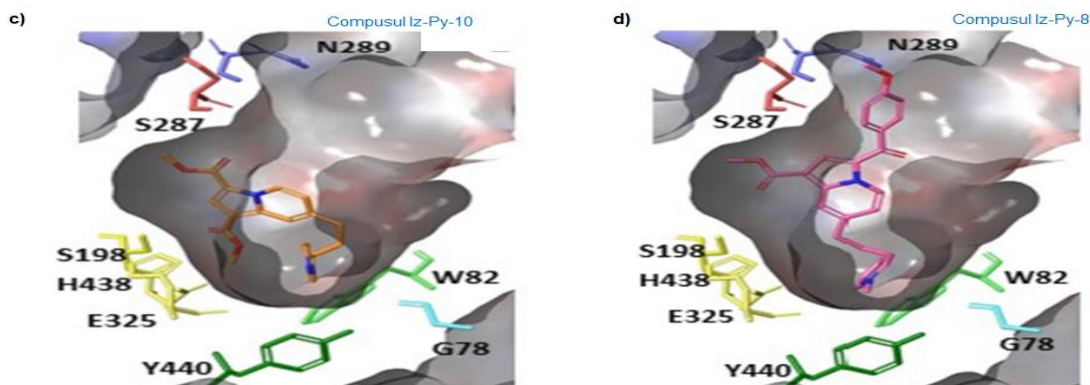


Figura 8.4. În a) și b) sunt ilustrate situsurile de legare ale hAChE cu compușii andocați Iz-Py-10 și respectiv Iz-Py-8. În c) și, respectiv, d) sunt reprezentate pozițiile optimizate de andocare ale compușilor Iz-Py-10 și Iz-Py-8 în situsul activ al hBChE. Reziduurile catalitice sunt reprezentate cu galben

CAPITOLUL 9. Concluzii generale și elemente de originalitate

9.1. Concluzii generale și elemente de originalitate

Diverse proceduri au fost prezentate în literatura de specialitate pentru sinteza indolizinelor care includ o singură etapă sau mai multe etape de reacție. Principalele căi de sinteză a compușilor indoliziniici includ reacția Tschitschibabin, reacțiile de cicloadiție, ciclizări intramoleculare, cicloizomerizarea din derivați de 2-piridină și cicloadiția piridotriazolilor cu alchine. Metode mai noi și mai prietenoase cu mediul înconjurător, cum ar fi reacțiile asistate de microunde, ultrasunete, reacțiile pe suport solid, fără solvenți, fără catalizatori metalici și reacțiile în mediu apos au fost propuse mai ales în ultimii ani de literatura de specialitate prin sinteze „verzi” de săruri cuaternare de piridiniu și compuși indoliziniici.

În această teză de doctorat, sinteza compușilor N-heterociclici (sărurile cuaternare de piridiniu, derivații indoliziniici, hibridi indolizininil-piridiniu, complex metallic) a fost realizată prin metode de obținere convenționale pornind de la trei compuși bipiridinici (4,4'-bipiridil, 1,2-di(4-piridil)etan și 1,3-bis(4-piridil)propan). Sărurile cuaternare de piridiniu obținute (S1a-e și S2a-q) prin sinteză convențională au prezentat randamente ridicate ($85-95\% \pm 1\%$) și au fost caracterizate prin analiză elementală și metode spectrale, IR, ^1H RMN și ^{13}C RMN. Prin procedee clasice de sinteză s-au obținut bisindolizine (Iz1a-e, Iz2a-e) și mono-indolizine cu randamente variabile (12-85%) caracterizate prin analiză elementală, IR, ^1H RMN și ^{13}C RMN.

O serie de noi hibridi N-indolizininil-piridinici (Iz-Py) cu diversitate structurală s-a obținut prin varierea bipiridinelor inițiale și substituenții N-alchilici cu randamente bune (50-100%). Au fost concepute două strategii de sinteză bazate pe formarea nucleului de indolizină prin cicloadiția 1,3-dipolară a alchinelor cu ilide formate *in situ* din săruri de piridiniu substituie corespunzător. Compușii au prezentat o puritate ridicată și s-au caracterizat prin analize spectrofotometrice, cromatografice și elementale.

Un nou complex mixt de lantanide(III) La-Nd-DPY a fost preparat prin reacția sulfaților de La(III) și Nd(III) cu sarea bis-cuaternară de bipiridiniu. Caracterizarea structurii posibile pentru noul complex mixt de Ln s-a realizat prin mai multe tehnici moderne de analiză (MS, SEM, PXRD). O metodă electrochimică modernă, voltametria ciclică, a fost utilizată în studiul potențialului redox al complexului La-Nd-DPY, care s-a dovedit a fi în interval relevant din punct de vedere biologic. Procesele de sinteză prin metodele *verzi* (MW și US) au decurs cu randamente foarte bune (77-98%) și într-un timp mult mai scurt (5-15 min) față de metoda clasică.

Structura compușilor sintetizați a fost confirmată prin determinarea punctelor de topire, analize IR, RMN și elementale și compararea datelor obținute cu cele ale compușilor martor

obținuți prin sinteza clasică. O serie de săruri cuaternare de piridiniu, care au la bază structura de 1,2-di(4-piridil) etan, au fost obținute utilizând pentru prima dată două metode *verzi* diferite, cum ar fi iradierea cu microunde (MW) și ultrasunete (US). Prin utilizarea metodelor neconvenționale în procesele de sinteză a unor compuși organici cu proprietăți biologice importante s-a redus considerabil consumul de reactivi.

Deși studii cu sinteze mai puțin toxice ale compușilor indoliziniici sau fără catalizatori metalici sunt prezentate în literatura de specialitate, sinteza prin biocataliză cu enzime vegetale în soluție tampon apoasă nu a fost raportată până în prezent în alte studii.

Procese într-o singură etapă care au dus la generarea de compuși simetrici bis-indoliziniici au fost dezvoltate pentru prima dată, prin noi abordări de biocataliză enzimatică. Sinteza neconvențională de bis-indolizine cu randamente moderate până la excelente (40-86%) s-a realizat prin reacții multicomponent, pornind de la compuși heterociclici bipiridinici, derivați halogenați reactivi și alchine activate. Un set de plante locale a fost evaluat pentru activitatea enzimatică în biocataliza „one pot” a compușilor indoliziniici fluorescenți. Majoritatea plantelor evaluate au demonstrat un conținut bogat în enzime din clasa oxidoreductazelor (POD: 0,56-1,08 mmol purpurogalină·g⁻¹ masă vegetală proaspătă·min⁻¹, PPO: 27,19-48,95 unități PPO/mg țesut vegetal, CAT: 3,27-21,71 μmol O₂·g⁻¹ masă vegetală proaspătă·min⁻¹). Rădăcina de hrean (*Armoracia rusticana*) a fost selectată drept cea mai promițătoare sursă de biocatalizatori dintre plantele evaluate, iar randamentele obținute au fost mai mari decât în metoda convențională de sinteză.

Compușii indoliziniici au putut fi obținuți și prin reacții catalizate cu ajutorul sistemului I₂ / H₂O₂, aceasta fiind o metodă neconvențională nouă de sinteză utilizată pentru prima dată în sinteza bis-indolizinelor. Structurile derivaților bis-indoliziniici au fost confirmate prin spectrometrie RMN, analiză elementală, precum și prin spectrometrie FT-IR.

S-a constatat că ScPy testate nu prezintă acțiune toxică asupra plantelor, activitate evaluată prin efectul asupra germinării semințelor de grâu. Utilizarea unor teste simple de germinare a semințelor a permis demonstrarea absenței efectelor toxice ale ScPy (S1a-e și S2a-e) și ale indolizinelor (Iz1a-e și Iz2a-e) asupra germinării plantelor și, implicit, asupra mediului înconjurător. Expunerea semințelor de grâu la diverse concentrații de ScPy (10⁻⁵M; 10⁻⁶M) sau compuși indoliziniici (10⁻³M; 10⁻⁴M) nu a prezentat efecte nocive asupra procesului de germinare și de creștere a tulpinițelor. Cei mai sensibili parametri fiziologici au demonstrat că compușii indoliziniici, la concentrațiile evaluate, nu au prezentat efecte nocive asupra germinării și creșterii germenilor de grâu, fapt confirmat și de analizele microscopice cu scanare laser confocală.

De asemenea, a fost evaluată **citotoxicitatea unor compuși indoliziniici** asupra creșterii microorganismului model de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* MIUG 3.6. Prin adăugarea compușilor indoliziniici în mediul de fermentare al tulpinii de drojdie *S. cerevisiae* MIUG 3.6, s-a constatat o stimulare a fermentației alcoolice pentru toate probele analizate prin suplimentarea mediilor fermentative cu compuși indoliziniici comparativ cu proba control de fermentare a celulelor de drojdie (în absența compușilor testați). Diferiți parametri (numărul de generații, rata de creștere, timpul de generare, randamentul de substanță uscată, gradul celulelor de drojdie în devenire și gradul de autoliză a drojdiei, intensitatea fermentației), care descriu creșterea drojdiei, sugerează că mediul de cultură suplimentat cu diferite concentrații de compuși bis-indoliziniici (10 μM și 1 μM) nu au exercitat efecte toxice asupra creșterii tulpinii de drojdie, în condiții de cultivare aerobe submerse și cu agitare. În această teză s-a realizat pentru prima dată evaluarea toxicității sărurilor cuaternare de dipiridiniu și a compușilor indoliziniici asupra germinării plantelor, precum și asupra creșterii microorganismului model de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* în procesele de multiplicare și fermentare.

Evaluarea activității antimicrobiene a demonstrat că cele mai multe ScPy din seria S2a-c și S2f-q au avut activitate bună împotriva microorganismului patogen *E. coli*. Cele mai active ScPy împotriva *E. coli* au fost S2c, S2g și S2q, cu o valoare a CMI de 0,312 mg/mL. Dintre cele nouă bacterii și fungi testate, *Alternaria* spp. a prezentat cea mai mare sensibilitate față de compușii simetrici evaluați la concentrația de 5 mg/mL (diametrul zonei de inhibiție a fost de maxim 27 mm), în timp ce *Penicillium expansum* a prezentat o sensibilitate medie (zona de inhibiție cu diametrul de maxim 12 mm).

Activitatea citotoxică a La-Nd-DPY pe liniile de celule canceroase de origine ovariană (A2780), mamară (MCF7) și prostatică (PC3) și asupra sferoizilor tumorali multicelulari derivați din celule PC3 a fost evaluată prin metodele cu 3-(4,5-dimetiltiazol), MTT și fosfatază acidă (APH). În comparație cu cisplatina, acest nou complex a arătat o toxicitate îmbunătățită, cu valori IC₅₀ de cel puțin 10 ori mai mari, chiar și la 24 de ore de expunere. Efectele citotoxice par să fie mediate de generarea de specii reactive de oxigen (ROS), dar nu de apoptoză, confirmată de o activare a caspazei-3/7 și de testele de colorare cu Hoechst a nucleelor. Mecanismul morții celulare observat în testele de citotoxicitate se datorează probabil altor căi de liză celulară, care pot fi investigate în cercetările viitoare.

În această teză de doctorat, s-au sintetizat și evaluat o serie de săruri de bis-piridiniu și hibridi de indolizinin-piridiniu. Moleculele au fost testate împotriva proceselor distinctive pentru AD, adică proprietățile antioxidante, inhibarea AChE și BChE și interferența cu fibrilarea amiloidului folosind modele de peptide *tau* (τ). Nici un compus indolizinic hibrid nu a prezentat activitate semnificativă asupra celor trei ținte simultan, adică activitate antioxidantă (inhibarea DPPH %>50 la 48 μ g/mL), inhibarea hChE (IC₅₀ < 10 μ M) și inhibarea formării fibrilei amiloidice. Seriiile Iz-Py-4, 5, 6, 7 și Iz-Py-8, 9, 10, 11 au demonstrat activitate antioxidantă redusă și o inhibare moderată a formării fibrilelor amiloidice. Cu toate acestea, majoritatea moleculelor cationice din aceste două serii au fost active atât pe eeAChE, cât și pe hChE într-un interval micromolar de concentrații.

Câteva molecule au inhibat de asemenea eqBChE, dar nu au inhibat enzima umană hBChE. Seria Iz-Py-1, Iz-Py-2 și Iz-Py-3 a arătat un comportament semnificativ diferit față de celelalte două serii de compuși. Atât limitarea solubilității (moleculele sunt predispuse la agregare în soluție apoasă), cât și proprietățile spectrale nu au permis studiul lor nici ca inhibitori ai colinesterazei, nici ca inhibitori ai fibrilelor. Cu toate acestea, în contextul fibrilei amiloidice, experimentele de fluorescență și CD au arătat că, dacă aceste molecule nu interferează în procesul de fibrilare, compușii Iz-Py-1, Iz-Py-2 și Iz-Py-3 încărcăți cu sarcină pozitivă, și în special derivatul substituit cu gruparea nitro, pot fi noi coloranți fluorescenți în formarea fibrilei amiloidice. Prin metoda de inhibare a denaturării termice a albuminei umane s-a observat un potențial antiinflamator promițător al ScPy S1a-c și S2a-c, apropiat de al diclofenacului sodic, un antiinflamator cunoscut. Alchilarea inelului piridinic duce la generarea de molecule monocationice într-un interval mare de pH, generând valori ale descriptorilor ADMET compatibile cu potențialele medicamente ale SNC.

Creșterea lungimii catenei dintre cele două nuclee piridinice nu influențează valorile PSA, dar duce la o creștere a lipofilității. Compușii care conțin substituenți lipofili mari nu sunt favorabili pentru penetrarea barierei hematoencefalice. Simularea prin modelare moleculară comparativă a compușilor andocați Iz-Py-8 și Iz-Py-10 în hAChE și hBChE, a evidențiat în mecanismul de legare importanța substituentului la C-3 (p-metoxibenzoil sau, respectiv, metiloxicarbonil) din structura indolizinei. S-a constatat că hibridul Iz-Py-8 cu o moleculă mai mare se potrivește mai bine în situsul activ al celor două enzime, comparativ cu compusul Iz-Py-10 care a prezentat un grad mai mare de libertate.

Datele prezentate pun în evidență rolul pe care îl au compușii obținuți prin procese de sinteză ale „chimiei verzi” în cercetarea unor proprietăți biologice.

Compușii organici de sinteză reprezintă un domeniu fructuos de cercetare pentru a detecta molecule necunoscute, cu structuri noi și proprietăți pe care evoluția în cercetare le-a rafinat pentru roluri biologice țintite.

Această teză a condus, de asemenea, la identificarea și caracterizarea structurală a unor molecule noi, care ar putea contribui la procesul complex de descoperire a unor potențiale medicamente pentru tratarea unei game largi de afecțiuni. Aceste rezultate au demonstrat importanța compușilor N-heterociclici și constituie premiza pentru cercetarea de noi compuși, raportați în această teză de doctorat, care ar putea fi agenți promițători în cercetările viitoare ca agenți antiinflamatori, antimicrobieni și anticancer cu toxicitate redusă sau lipsiți de toxicitate.

CAPITOLUL 10. Diseminarea rezultatelor

Articole publicate în reviste de specialitate indexate ISI (WOS) în perioada studiilor doctorale (FI cumulat = 105,6)

Articles published in specialized journals indexed by ISI (WOS) during doctoral studies
(cumulative FI = 105,6)

Articole publicate în reviste de specialitate indexate ISI (WOS) din teza de doctorat (FI cumulat = 25,9)

Articles published in ISI indexed specialist journals (WOS) from the doctoral thesis
(cumulative FI = 25,9)

1. **Botezatu Dediu, A.V.**; Bahrim, G.E.; Ungureanu, C.V.; Busuioc, A.C.; Furdui, B.; Dinica, R.M. Green "one-Pot" Fluorescent Bis-Indolizine Synthesis with Whole-Cell Plant Biocatalysis. *Green Process. Synth.* **2023**, *12*, <https://doi.org/10.1515/gps-2023-0046>, **FI = 4,3**.
2. **Dediu Botezatu, A.V.**; Apetrei, R.-M.; Costea (Nour), I.F.; Barbu, V.; Grigore-Gurgu, L.; Botez, F.; Dinica, R.M.; Furdui, B.; Cârâc, G. Synthesis and Characterization of Novel Chitosan Derivatives (Containing Dipyridinium Quaternary Salts) with Antimicrobial Potential. *Carbohydr. Res.* **2023**, 108964, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108964>, **FI = 3,1**.
3. Baussanne, I.; Firstova, O.; **Dediu Botezatu, A.**; Larosa, C.; Furdui, B.; Ghinea, I.O.; Thomas, A.; Chierici, S.; Dinica, R.; Demeunynck, M. Interest of Novel N-Alkylpyridinium-Indolizine Hybrids in the Field of Alzheimer's Disease: Synthesis, Characterization and Evaluation of Antioxidant Activity, Cholinesterase Inhibition, and Amyloid Fibrillation Interference. *Bioorg. Chem.* **2021**, *116*, 105390, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105390>, **FI = 5,3**.
4. **Botezatu (Dediu), A.V.**; Horincar, G.; Ghinea, I.O.; Furdui, B.; Bahrim, G.-E.; Barbu, V.; Balanescu, F.; Favier, L.; Dinica, R.-M. Whole-Cells of *Yarrowia lipolytica* Applied in "One Pot" Indolizine Biosynthesis, *Catalysts* **2020**, *10*, 629. <https://doi.org/10.3390/catal10060629>, **FI = 4,1**.
5. Tăbăcaru, A.; **Botezatu Dediu, A.V.**; Dinică, R.M.; Cârâc, G.; Basliu, V.; Paula Cabral Campello, M.; Silva, F., Pinto; C.I.G., Guerreiro, J.F., Martins, M., Mendes, F., Marques, F. (2020) Biological properties of a new mixed lanthanide(III) complex incorporating a dipyridinium ylide, *Inorganica Chim. Acta*, **506** (III), 119517. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119517>, **FI = 2,8**.
6. Tăbăcaru, A.; **Dediu Botezatu, A.V.**; Horincar, G.; Furdui, B.; Dinică, R.M. Green Accelerated Synthesis, Antimicrobial Activity and Seed Germination Test of Quaternary Ammonium Salts of 1,2-bis(4-pyridyl)ethane, *Molecules* **2019**, *24*, 2424. <https://doi.org/10.3390/molecules24132424>, **FI = 4,6**
7. Carac, A.; Boscencu, R.; **Dediu, A.V.**; Bungau, S.G.; Dinica, R.M. Solvent Effects on the Spectral and Electrochemical Properties of Some Pyridinium Quaternary Compounds. *Rev. Chim.* **2017**, *68*, <https://doi.org/10.37358/RC.17.7.5688>, **FI = 1,7**.

Cărți/Capitole în cărți din teza de doctorat:
Books/Chapters in books from the doctoral thesis:

1. Bianca Furdui, **Andreea V. Dediu (Botezatu)**, Rodica M. Dinica, Copper Catalysis in Organic Synthesis, editat de Gopinathan Anilkumar, Salim Saranya; **Capitolul 2, Cu-Catalyst in Reactions Involving Pyridinium and Indolizinium Moieties**; pg7-22; John Wiley & Sons, **2021**; ISBN 3527347372, 9783527347377; <https://books.google.ro/books?id=0KTsDwAAQBAJ>
2. Chia-Hung Kuo and Chwen-Jen Shieh (Eds.), Biocatalytic Process Optimization, Pages: 296, Published: January **2021** (*This book is a printed edition of the Special Issue Biocatalytic Process Optimization that was published in Catalysts*), ISBN 978-3-03943-915-7 (Hbk); ISBN 978-3-03943-916-4 (PDF), pg 203-219, <https://doi.org/10.3390/books978-3-03943-916-4>.

Articole publicate în reviste de specialitate indexate ISI (WOS) prin colaborare (FI cumulat = **79,7**)

Articles published in ISI indexed specialist journals (WOS) through collaboration (cumulative FI = **79,7**)

1. El Moujahed, S.; Dinica, R.M.; Abou Oualid, H.; Cudalbeanu, M.; **Botezatu-Dediu, A.V.**; Cazanevscaia Busuioc, A.; Ouazzani Chahdi, F.; Kandri Rodi, Y.; Errachidi, F. „Sustainable Biomass as Green and Efficient Crosslinkers of Collagen: Case of by-Products from Six Pomegranate Varieties with Global Commercial Interest in Morocco”. *J. Environ. Manage.* **2023**, 335, 117613, doi:10.1016/j.jenvman.2023.117613, **FI = 8,7**.
2. Busuioc, A.C.; Costea, G.V.; **Botezatu, A.V.D.**; Furdui, B.; Dinica, R.M. „Cucumis Metuliferus L. Fruits Extract with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antidiabetic Properties as Source of Ursolic Acid”. *Separations* **2023**, 10, doi:10.3390/separations10050274, **FI = 3,34**.
3. Bălănescu, F.; **Botezatu, A.V.**; Marques, F.; Busuioc, A.; Marinceaș, O.; Vinătoru, C.; Cârâc, G.; Furdui, B.; Dinica, R.M.; „Bridging the Chemical Profile and Biological Activities of a New Variety of Agastache Foeniculum (Pursh) Kuntze Extracts and Essential Oil”. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 828, doi:10.3390/ijms24010828, **FI = 6,2**.
4. Zongo, E.; Busuioc, A.; Meda, R.N.-T.; **Botezatu, A.V.**; Mihaila, M.D.; Mocanu, A.-M.; Avramescu, S.M.; Koama, B.K.; Kam, S.E.; Belem, H.; „Exploration of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Cassia Sieberiana DC and Piliostigma Thonningii (Schumach.) Milne-Redh, Traditionally Used in the Treatment of Hepatitis in the Hauts-Bassins Region of Burkina Faso”. *Pharmaceuticals* **2023**, 16, 133, doi:10.3390/ph16010133, **FI = 5,2**.
5. Souleymane, H.D.; Djibo, A.K.; Seyni, S.H.; Zakaria, O.; **Botezatu, A.V.**; Dinica, R.M.; Ibrahim Maman Laouali, A.; Kouakou, N.D.V. „Phytochemical Characterization and In Vitro Evaluation of the Anti-Sickle Cell Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Two Medicinal Plants from Niger: Flueggea Virosa (Roxb. Ex Willd.) Royle and Kigelia Africana (Lam.) Benth”. *Plants* **2023**, 12, 3522, doi:10.3390/plants12203522, **FI = 4,5**.
6. Lanciu Dorofte, A.; Dima, C.; Ceoromila, A.; **Botezatu, A.**; Dinica, R.; Bleoanca, I.; Borda, D. „Controlled Release of β -CD-Encapsulated Thyme Essential Oil from Whey Protein Edible Packaging”. *Coatings* **2023**, 13, 1–18, doi:10.3390/coatings13030508, **FI = 3,4**.
7. Musat, V.; Crintea (Capatana), L.; Anghel, E.-M.; Stanica, N.; Atkinson, I.; Culita, D.C.; Baroiu, L.; Tigau, N.; Ceoromila, A.C.; **Botezatu (Dediu), A.-V.**; et al., „Ag-Decorated Iron Oxides-Silica Magnetic Nanocomposites with Antimicrobial and Photocatalytic Activity”. *Nanomaterials* **2022**, 12, doi:10.3390/nano12244452, **FI = 5,71**.
8. Nechita, P.; Roman, M.; Cantaragiu Ceoromila, A.; **Botezatu, A.V.** „Improving Barrier Properties of Xylan-Coated Food Packaging Papers with Alkyl Ketene Dimer”. *Sustainability* **2022**, 14, doi:10.3390/su142316255, **FI = 3,88**.

9. Silihe, K.K.; Zingue, S.; Sipping, M.T.K.; Cazanevscaia, A.B.; **Botezatu, A.V.D.**; Njamen, D.; Dinica, R.M. „The Antioxidant Potential of *Ficus Umbellata* Vahl (Moraceae) That Accelerates In Vitro and the In Vivo Anti-Inflammatory Protective Effects”. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, doi:10.3390/app12189070, **FI = 2,83**.
10. Rusu, L.; Grigoras, C.-G.; Simion, A.-I.; Suceveanu, E.-M.; **Botezatu, A.V.D.**; Harja, M. „Biosorptive Removal of Ethacridine Lactate from Aqueous Solutions by *Saccharomyces Pastorianus* Residual Biomass/Calcium Alginate Composite Beads: Fixed-Bed Column Study”. *Materials (Basel)*. **2022**, *15*, doi:10.3390/ma15134657, **FI = 3,74**.
11. Tanase (Butnariu), L.-A.; Nistor, O.-V.; Andronoiu, D.-G.; Mocanu, G.-D.; **Botezatu Dedi, A.V.**; Botez, E. „Different Types of Meatballs Enriched with Wild Thyme/Lemon Balm Aqueous Extract-Complex Characterization”. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27123920, **FI = 4,92**.
12. Balanescu, F.; Busuioc, A.C.; **Botezatu, A.V.D.**; Gosav, S.; Avramescu, S.M.; Furdui, B.; Dinica, R.M. „Comparative Study of Natural Antioxidants from *Glycine Max*, *Anethum Graveolens* and *Pimpinella Anisum* Seed and Sprout Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction”. *Separations* **2022**, *9*, 152, doi:10.3390/separations9060152, **FI = 3,34**.
13. Ngeenge Tamfu, A.; Roland, N.; Munvera Mfifen, A.; Kucukaydin, S.; Gaye, M.; **Botezatu, A.V.**; Emin Duru, M.; Mihaela Dinica, R. „Phenolic Composition, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Parkia Biglobosa* (Jacq.) Benth., *Tithonia Diversifolia* (Hemsl) A. Gray, and *Crossopteryx Febrifuga* (Afzel.) Benth”. *Arab. J. Chem.* **2022**, *15*, 103675, doi:10.1016/j.arabjc.2021.103675, **FI = 6,21**.
14. El Moujahed, S.; Errachidi, F.; Abou Oualid, H.; **Botezatu-Dedi, A.V.**; Ouazzani Chahdi, F.; Kandri Rodi, Y.; Dinica, R.M. „Extraction of Insoluble Fibrous Collagen for Characterization and Crosslinking with Phenolic Compounds from Pomegranate Byproducts for Leather Tanning Applications”. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 4175–4186, doi:10.1039/d1ra08059h, **FI = 4,03**.
15. Ngeenge Tamfu, A.; Mfifen Munvera, A.; **Dedi Botezatu, A.V.**; Talla, E.; Ceylan, O.; Tagatsing Fotsing, M.; Tanyi Mbafor, J.; Shaheen, F.; Mihaela Dinica, R. „Synthesis of Benzoyl Esters of β -Amyrin and Lupeol and Evaluation of Their Antibiofilm and Antidiabetic Activities”. *Results Chem.* **2022**, *4*, 100322, doi:10.1016/j.rechem.2022.100322, **FI = 2,3**.
16. Dinica, R.M.; Sandu, C.; Dedi **Botezatu, A.V.**; Busuioc, A.C.; Balanescu, F.; Mihaila, M.D.I.; Dumitru, C.N.; Furdui, B.; Iancu, A.V. „Allantoin from Valuable Romanian Animal and Plant Sources with Promising Anti-Inflammatory Activity as a Nutricosmetic Ingredient”. *Sustainability* **2021**, *13*, 10170, doi:10.3390/su131810170, **FI = 3,25**.
17. Rusu, L.; Grigoraș, C.G.; Suceveanu, E.M.; Simion, A.I.; **Botezatu, A.V.D.**; Istrate, B.; Doroftei, I. „Eco-Friendly Biosorbents Based on Microbial Biomass and Natural Polymers: Synthesis, Characterization and Application for the Removal of Drugs and Dyes from Aqueous Solutions”. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, doi:10.3390/ma14174810, **FI = 3,74**.
18. Busuioc, A.C.; **Botezatu, A.V.D.**; Furdui, B.; Vinatoru, C.; Maggi, F.; Caprioli, G.; Dinica, R.M. „Comparative Study of the Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Fresh Juices from Romanian Cucurbitaceae Varieties”. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25225468, **FI = 4,41**.

Participări în echipele proiectelor de cercetare-dezvoltare / granturilor de cercetare:

1. **Director de proiect** , **Andreea V. DEDIU BOTEZATU** (PN-III-P1-1.1-MC2019-1608 din cadrul Proiecte de mobilitate pentru cercetători competiția **2019**): Stagiul de pregătire în cazul tezei de doctorat în Departamentul de Chimie Farmaceutică Moleculară, Universitatea Rhone Alpes, Grenoble, Franța, noiembrie 2019 -decembrie **2019**.

2. Membru în proiectul Erasmus KA220-HED, Cooperation Partnership, number 2022-1-TR01-KA220-HED-000089361, 7171, „Green Chemistry Applications on Selected Medicinal and Aromatic Plants in the Artvin Region”, financed by the European Union.
3. Membru în proiectul ADER 5.2.1, nr. 521/18.07.2023, Conservarea și valorificarea patrimoniului genetic al speciilor aromatice și medicinale pretabile a fi cultivate pe teritoriul României, MADR, Coordonator de proiect BRGV Buzău.
4. **Andreea V. DEDIU BOTEZATU**, Membru al grupului țintă în cadrul proiectului ”Proactive Health Without Borders” 2SOFT/4.1/104, Joint Operational Programme Romania–Republic of Moldova 2014- 2020 – ENI -2nd Call for proposals Prioritatea 4.1 – Sprijin pentru dezvoltarea serviciilor de sănătate și a accesului la sănătate.
5. Membru Grup țintă, **Andreea-Veronica Dediu Botezatu**, Programul 1-Dezvoltarea sistemului național de cercetare-dezvoltare, Subprogram 1.2 – Performanță instituțională – Proiecte de finanțare a excelenței în CDI, Cod proiect 14PFE/17.10.2018, 2018, Titlu proiect: Excelență, performanță și competitivitate în activități CDI la Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați, EXPERT.
6. Membru, **Andreea-Veronica Dediu Botezatu**, Titlu proiect: ”Strategii inovative și durabile de obținere a acoperirilor pe bază de hemiceluloză cu proprietăți adecvate hartiei de ambalaj activ pentru alimente”, PN-III-P4-PCE2021-0714, 2021.

Participarea la școli de vară internaționale:

1. **Andreea Veronica Dediu Botezatu**, Dunărea de Jos University of Galati, has Attended the Web edition of the International School of Chemistry for everyday life, 2020 September 1-6, Camerino Italy.
2. **Andreea Veronica DEDIU BOTEZATU**, participated to International Summer School, FOOD SAFETY AND HEALTHY LIVING, FSHL – 2020, held online, July 5-8, 2020.

Premii

1. **Premiul I**, 11th Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University, Galați, 18-19 iunie **2023**.
2. **Premiul III**, 11th Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University, Galați, 18-19 iunie **2023**.
3. Diplomă de Excelență Asist.drd. **Botezatu Andreea Veronica**, pentru rezultatele excelente în activitatea de cercetare în cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați, CNFIS-FDI-2021-0443, CEREX **2022**
4. **Premiul I**, 10th Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University, Galați, 18-19 iunie **2022**.
5. Diplomă de Excelență Asist.drd. **Botezatu Andreea Veronica**, pentru rezultatele excelente în activitatea de cercetare în cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați, CNFIS-FDI-2021-0443, CEREX **2021**
6. **Premiul I**, 9th Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University, 10th and 11th of June **2021**.
7. **Premiul II**- 9th Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University, 10th and 11th of June **2021**.
8. **Premiul I** in cadrul competiției Danube Growth Initiative din cadrul proiectului BLUACT - BLUegrowth cities in ACTion, **2020**
9. **Award for the MOST ACTIVE PhD STUDENT, Andreea Veronica DEDIU BOTEZATU**, during International Summer School, FOOD SAFETY AND HEALTHY LIVING, FSHL – **2020**, July 5-8, 2020.

10. **AWARD - THE MOST ACTIVE TEAM OF STUDENTS, PhD Students from “Dunarea de Jos” University of Galati**, Romania during International Summer School FOOD SAFETY AND HEALTHY LIVING FSHL – 2020, held online, Romania, July 5-8, **2020**.
11. **Premiul I**, Eighth Edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University, Galați, 18-19 iunie **2020**.
12. **Premiul II**, Seventh edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of „Dunărea de Jos” University, Galați, 13-14 iunie **2019**.
13. PN-III-P1-1.1-PRECISI-2020-48235, coordonat de UEFISCDI - premiere pentru articolul cu titlul „Biological properties of a new mixed lanthanide(III) complex incorporating a dypiridinium ylide”.
14. PN-III-P1-1.1-PRECISI-2021-65925, coordonat de UEFISCDI - premiere pentru articolul cu titlul „Allantoin from Valuable Romanian Animal and Plant Sources with Promising Anti-Inflammatory Activity as a Nutricosmetic Ingredient”.
15. PN-III-P1-1.1-PRECISI-2021-66903, coordonat de UEFISCDI - premiere pentru articolul cu titlul „Interest of novel N-alkylpyridinium-indolizine hybrids in the field of Alzheimer’s disease: Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant activity, cholinesterase inhibition, and amyloid fibrillation interference”.
16. PN-III-P1-1.1-PRECISI-2020-50800, coordonat de UEFISCDI - premiere pentru articolul cu titlul „Whole-Cells of Yarrowia lipolytica Applied in “One Pot” Indolizine Biosynthesis”.

Participări la conferințe cu prezentări orale/postere:

1. International Scientific Symposium „Modern Trends In The Agricultural Higher Education” October 5-6, 2023, „Technical University” of Moldova (UTM).
2. „Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG Perspectives and challenges in doctoral research 11th Edition”, „Dunarea de Jos” University of Galati, 8-9 of June 2023.
3. „Modern approaches of the environment-climate change interconnectivity, ENVIROCLIM 2” 2-nd edition, September 20-23, 2023, Galați.
4. „6th Edition of International Conference on Chemical Engineering, ICCE,” 05-07.10.2022, Iasi, Romania.
5. „A XXXVI-a Conferință Națională De Chimie – CNChim”, 2022, Călimănești – Căciulata, Romania.
6. „Young Researchers’ International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE III)”, Cluj-Napoca, June 04 – 05, 2021.
7. „Scientific Conference of Doctoral Schools SCDS-UDJG 2021, The Ninth Edition,” Galați, 10th-11th of June 2021.
8. „International Conference on Innovative Research EUROINVENT”, 20-21 Mai 2021, Iasi.
9. „EurOAliment”, 7-8 octombrie 2021, Galați.
10. „Symposium ‘Ecology And Protection Of Ecosystems’ The XIIIth Edition”, 4–5 of November 2021 Bacau, Romania.
11. „Scientific Conference of Doctoral Schools-UDJG 2020 The Eighth Edition, Perspectives and challenges in doctoral research”, Galați, 18th-19th of June 2020.
12. „Conferința Facultății de Chimie, IasiChem 2019”, 31 octombrie - 01 noiembrie 2019.
13. „55èmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique”, 2019, Nantes, France - July 3-5, 2019.
14. „The 2nd International Symposium on Catalysis and Specialty Chemicals ISCSC-2018”, October 1-3, 2018; Tlemcen – Algeria.
15. „4th European Organic Chemistry congress”, March 01-03, 2018, London, UK.
16. „4ème Colloque Franco-Roumain de Chimie Médicinale”, 05-07 Octobre 2017, Universitatea Al. I. Cuza, Iași.

17. „Conferința Internațională AGRI-FOOD 2017, Agriculture and Food for the XXI century”, 2017, Sibiu România.
18. „Conferința Școlii Doctorale 2017-Perspectives and challenges in doctoral research”, Galați, 2017, România.
19. „a 8-a ediție a Simpozionului Internațional Euroaliment 2017 – Mutatis mutandis in Food”, Galați, România.
20. „Journées Scientifiques du Médicament Epigenetic : Toward New Therapeutic Targets ”June 1st 2017, Grenoble, France.
21. „a 8-a ediție a Conferinței Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry”, Cluj-Napoca, 2016.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Hao, W.; Liu, Y. C-H Bond Halogenation Catalyzed or Mediated by Copper: An Overview. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 2132–2144, doi:10.3762/bjoc.11.230.
- Sadowski, B.; Klajn, J.; Gryko, D.T. Recent Advances in the Synthesis of Indolizines and Their π -Expanded Analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7804–7828, doi:10.1039/c6ob00985a.
- Liao, Y.; Huang, B.; Huang, X.; Cai, M. Heterogeneous Copper-Catalyzed Cascade Three-Component Reaction Towards Imidazo[1,2-A]pyridines: Efficient and Practical One-Pot Synthesis of Alpidem. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 2320–2326, doi:10.1002/slct.201900128.
- Munir, I.; Zahoor, A.F.; Rasool, N.; Naqvi, S.A.R.; Zia, K.M.; Ahmad, R. Synthetic Applications and Methodology Development of Chan–Lam Coupling: A Review. *Mol. Divers.* **2019**, *23*, 215–259, doi:10.1007/s11030-018-9870-z.
- Verma, C.; Quraishi, M.A.; Ebenso, E.E. Microwave and Ultrasound Irradiations for the Synthesis of Environmentally Sustainable Corrosion Inhibitors: An Overview. *Sustain. Chem. Pharm.* **2018**, *10*, 134–147, doi:10.1016/j.scp.2018.11.001.
- Dinică, R.; Furdui, B.; Bahrim, G.; Demeunynck, M. Précurseurs de Nouveaux Hétérocycles D'intérêt Biologique. *Rev. Roum. Chim.* **2008**, *53*, 21–24.
- Furdui, B.; Dinica, R.M.; Tabacaru, A.; Pettinari, C. Synthesis and Physico-Chemical Properties of a Novel Series of Aromatic Electron Acceptors Based on N-Heterocycles. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6164–6168, doi:10.1016/j.tet.2012.05.077.
- Dinica, R.M.; Pettinari, C. Synthesis of Substituted 7,7'-bis-Indolizines via 1,3-Dipolar Cycloaddition under Microwave Irradiation. *Heterocycl. Commun.* **2001**, *7*, doi:10.1515/HC.2001.7.4.381.
- Furdui, B.; Parfene, G.; Ghinea, I.O.; Dinica, R.M.; Bahrim, G.; Demeunynck, M. Synthesis and in Vitro Antimicrobial Evaluation of New N-Heterocyclic Diquaternary Pyridinium Compounds. *Molecules* **2014**, *19*, 11572–11585, doi:10.3390/molecules190811572.
- Dinica, R.M.; Druta, I.I.; Pettinari, C. The Synthesis of Substituted 7,7'-Bis-Indolizines via 1,3-Dipolar Cycloaddition under Microwave Irradiation. *Synlett* **2000**, *2000*, 1013–1015, doi:10.1055/s-2000-6657.
- Vlahovici, A.; Druța, I.; Andrei, M.; Cotlet, M.; Dinica, R. Photophysics of Some Indolizines, Derivatives from Bipyridyl, in Various Media. *J. Lumin.* **1999**, *82*, 155–162, doi:10.1016/S0022-2313(99)00027-7.
- Bonte, S.; Ghinea, I.O.; Dinica, R.; Baussanne, I.; Demeunynck, M. Investigation of the Pyridinium Ylide-Alkyne Cycloaddition as a Fluorogenic Coupling Reaction. *Molecules* **2016**, *21*, 1–15, doi:10.3390/molecules21030332.
- Furdui, B.; Dinica, R.; Druta, I.I.; Demeunynck, M. Improved Synthesis of Cationic Pyridinium-Substituted Indolizines. *Synthesis (Stuttg)*. **2006**, 2640–2642, doi:10.1055/s-2006-942482.
- Furdui, B.; Dinică, R.; Demeunynck, M.; Druța, I.; Vlahovici, A. New Reactive Pyridinium-Indolizines Fluorophores. *Rev. Roum. Chim.* **2007**, *52*, 633–637.
- Smith, B. *Infrared Spectral Interpretation*; 1st Edition; CRC Press: Boca Raton, **1998**; ISBN 9780203750841.
- Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R.A., Ed.; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, **2000**; pp. 1–304 ISBN 9780203750841.
- Jacobsen, N.E. Interpretation of Proton (^1H) NMR Spectra. In *NMR Spectroscopy Explained*; Wiley, **2007**; pp. 39–73 ISBN 9780470173350.
- Jacobsen, N.E. Carbon-13 (^{13}C) NMR Spectroscopy. In *NMR Spectroscopy Explained*; John Wiley & Sons, Ltd, **2007**; pp. 135–154 ISBN 9780470173350.
- Balci, M. *Basic ^1H - and ^{13}C -NMR Spectroscopy*; Balci, M.B.T.-B. ^1H -and ^{13}C -N.S., Ed.; Elsevier:

Amsterdam, 2005; ISBN 9780444518118.

Balci, M. 13C Chemical Shifts of Organic Compounds. In *Basic 1H- and 13C-NMR Spectroscopy*; Balci, M.B.T.-B. 1H-and 13C-N.S., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **2005**; pp. 293–324 ISBN 978-0-444-51811-8.

Cârâc, A.; Boscencu, R.; Dinică, R.M.; Guerreiro, J.F.; Silva, F.; Marques, F.; Campello, M.P.C.; Moise, C.; Brîncoveanu, O.; Enăchescu, M.; et al. Synthesis, Characterization and Antitumor Activity of Two New Dipyridinium Ylide Based Lanthanide(III) Complexes. *Inorganica Chim. Acta* **2018**, *480*, 83–90, doi:10.1016/j.ica.2018.05.003.

Druta, Ioan I.; Dinica, R.M.; Bacu, E.; Humelnicu, I. Synthesis of 7,7'-Bisindolizines by the Reaction of 4,4'-Bipyridinium-Ylides with Activated Alkynes. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10811–10818.

Silverstein, R.W.; Bassler, G.C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. *J. Chem. Educ.* **1962**, *39*, 546–553, doi:10.1021/ed039p546.

Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, **2009**; ISBN 0470405872.

Aljuhani, A.; Rezki, N.; Al-Sodies, S.; Messali, M.; Elshafei, G.M.S.; Hagar, M.; Aouad, M.R. Dicationic Bis-Pyridinium Hydrazone-Based Amphiphiles Encompassing Fluorinated Counteranions: Synthesis, Characterization, TGA-DSC, and DFT Investigations. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27082492.

Naik, V.M.; Mallur, N.B. Synthesis and Characterization of Lanthanide(III) Nitrate Complexes with Terdentate ONO Donor Hydrazone Derived from 2-Benzimidazolyl Mercaptoaceto Hydrazone and O-Hydroxy Aromatic Aldehyde. *E-Journal Chem.* **2011**, *8*, 1900–1910, doi:10.1155/2011/743948.

Liu, S.; Yang, L.W.; Rettig, S.J.; Orvig, C. Bulky Ortho 3-Methoxy Groups on N4O3 Amine Phenol Ligands Producing Six-Coordinate Bis(ligand)lanthanide Complex Cations [Ln(H3L)2]3+ (Ln = Pr, Gd; H3L = Tris((2-Hydroxy-3-Methoxybenzyl)amino)ethyl)amine). *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 2773–2778, doi:10.1021/ic00064a031.

Dehnicke, K.; Greiner, A. Unusual Complex Chemistry of Rare-Earth Elements: Large Ionic Radii - Small Coordination Numbers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42*, 1340–1354, doi:10.1002/anie.200390346.

Cotton, S.A. Establishing Coordination Numbers for the Lanthanides in Simple Complexes. *Comptes Rendus Chim.* **2005**, *8*, 129–145, doi:10.1016/j.crci.2004.07.002.

Na, B.; Zhang, X.-J.; Shi, W.; Zhang, Y.-Q.; Wang, B.-W.; Gao, C.; Gao, S.; Cheng, P. Six-Coordinate Lanthanide Complexes: Slow Relaxation of Magnetization in the Dysprosium(III) Complex. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 15975–15980, doi:10.1002/chem.201404573.

Das, A.; Banik, B.K. *Microwave-Assisted Synthesis of N-Heterocycles*; Elsevier Inc., **2021**; ISBN 9780128228951.

Garella, D.; Borretto, E.; Di Stilo, A.; Martina, K.; Cravotto, G.; Cintas, P. Microwave-Assisted Synthesis of N-Heterocycles in Medicinal Chemistry. *Medchemcomm* **2013**, *4*, 1323, doi:10.1039/c3md00152k.

Torres, E.; Ayala, M. Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts. *Biocatal. Based Heme Peroxidases Peroxidases as Potential Ind. Biocatal.* **2010**, 1–358, doi:10.1007/978-3-642-12627-7.

Eduardo, T.; Marcela, A. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*; Torres, E., Ayala, M., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2010**; Vol. 53; ISBN 978-3-642-12626-0.

Khanmohammadi, M.; Dastjerdi, M.B.; Ai, A.; Ahmadi, A.; Godarzi, A.; Rahimi, A.; Ai, J. Horseradish Peroxidase-Catalyzed Hydrogelation for Biomedical Applications. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 1286–1298, doi:10.1039/c8bm00056e.

Guo, J.; Liu, Y.; Zha, J.; Han, H.; Chen, Y.; Jia, Z. Enhancing the Peroxidase-Mimicking Activity of Hemin by Covalent Immobilization in Polymer Nanogels. *Polym. Chem.* **2021**, *12*, 858–866, doi:10.1039/d0py01465f.

Botezatu (Dediu), A.V.; Horincar, G.; Ghinea, I.O.; Furdui, B.; Bahrim, G.-E.E.; Barbu, V.; Balanescu, F.; Favier, L.; Dinica, R.-M.M.; Botezatu, A.V.; et al. Whole-Cells of *Yarrowia Lipolytica* Applied in "one Pot" Indolizine Biosynthesis. *Catalysts* **2020**, *10*, 1–16, doi:10.3390/catal10060629.

Luo, Y.; Liang, J.; Zeng, G.; Chen, M.; Mo, D.; Li, G.; Zhang, D. Seed Germination Test for Toxicity Evaluation of Compost: Its Roles, Problems and Prospects. *Waste Manag.* **2018**, *71*, 109–114, doi:10.1016/j.wasman.2017.09.023.

Tiquia, S.M.; Tam, N.F.Y.; Hodgkiss, I.J. Effects of Composting on Phytotoxicity of Spent Pig-Manure Sawdust Litter. *Environ. Pollut.* **1996**, *93*, 249–256, doi:10.1016/S0269-7491(96)00052-8.

Li, R.; He, J.; Xie, H.; Wang, W.; Bose, S.K.; Sun, Y.; Hu, J.; Yin, H. Effects of Chitosan Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth of Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 91–100, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.118.

Tabacaru, Aurel, A.V.D.B.; Horincar, G.; Furdui, B.; Dinica, R.M. Green Accelerated Synthesis ,

Antimicrobial Activity. *Molecules* **2019**.

Alptüzün, V.; Parlar, S.; Taşlı, H.; Erciyas, E. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Pyridinium Salts. *Molecules* **2009**, *14*, 5203–5215, doi:10.3390/molecules14125203.

Liang, Z.; Zhu, M.; Yang, Y.W.; Gao, H. Antimicrobial Activities of Polymeric Quaternary Ammonium Salts from Poly(glycidyl Methacrylate)s. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25*, 117–122, doi:10.1002/pat.3212.

Yamane, N.; Oiwa, T.; Kiyota, T.; Saitoh, H.; Sonoda, T.; Tosaka, M.; Nakashima, M.; Fukunaga, H.; Masaki, T.; Miyagawa, K. Multicenter Evaluation of a Colorimetric Microplate Antimycobacterial Susceptibility Test: Comparative Study with the NCCLS M24-P. *Rinsho Byori.* **1996**, *44*, 456–464.

Ol'Khovik, V.K.; Matveienko, Y. V.; Vasilevskii, D.A.; Kalechits, G. V.; Zheldakova, R.A. Synthesis, Antimicrobial and Antifungal Activity of Double Quaternary Ammonium Salts of Biphenyls. *Russ. J. Gen. Chem.* **2013**, *83*, 329–335, doi:10.1134/S1070363213020163.

Abate, G.; Aseffa, A.; Selassie, A.; Goshu, S.; Fekade, B.; WoldeMeskal, D.; Miörner, H. Direct Colorimetric Assay for Rapid Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 871–873, doi:10.1128/JCM.42.2.871-873.2004.

Moussa, S.H.; Tayel, A.A.; Al-Hassan, A.A.; Farouk, A. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *J. Mycol.* **2013**, *2013*, 1–7, doi:10.1155/2013/753692.

Klančnik, A.; Piskernik, S.; Jeršek, B.; Možina, S.S. Evaluation of Diffusion and Dilution Methods to Determine the Antibacterial Activity of Plant Extracts. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *81*, 121–126, doi:10.1016/j.mimet.2010.02.004.

Altman, F.P. *Tetrazolium Salts and Formazans*; Gustav Fischer Verlag · Stuttgart, **1976**; Vol. 9; ISBN 3437104535.

Thom, S.M.; Horobin, R.W.; Seidler, E.; Barer, M.R. Factors Affecting the Selection and Use of Tetrazolium Salts as Cytochemical Indicators of Microbial Viability and Activity. *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, *74*, 433–443, doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb05151.x.

Caviedes, L.; Delgado, J.; Gilman, R.H. Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of Mycobacterium Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 1873–1874, doi:10.1128/JCM.40.5.1873-1874.2002.

Chanawanno, K.; Thuptimdang, P.; Chantrapromma, S.; Fun, H.-K. New Tunable Pyridinium Benzenesulfonate Amphiphiles as Anti-MRSA Quaternary Ammonium Compounds (QACs). *J. Mol. Struct.* **2022**, *1254*, 132389, doi:https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132389.

Li, L.; Zhao, Y.; Zhou, H.; Ning, A.; Zhang, F.; Zhao (Kent), Z. Synthesis of Pyridinium N-Chloramines for Antibacterial Applications. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 321–325, doi:10.1016/j.tetlet.2016.12.021.

Ezelarab, H.A.A.A.; Abbas, S.H.; Abourehab, M.A.S.S.; Badr, M.; Sureram, S.; Hongmanee, P.; Kittakoop, P.; Abu-Rahma, G.E.-D.D.A.; Hassan, H.A. Novel Antimicrobial Ciprofloxacin-Pyridinium Quaternary Ammonium Salts with Improved Physicochemical Properties and DNA Gyrase Inhibitory Activity. *Med. Chem. Res.* **2021**, *30*, 2168–2183, doi:10.1007/s00044-021-02798-3.

Mundhe, P.; Kidwai, S.; Saini, S.M.; Singh, H.R.; Singh, R.; Chandrashekarappa, S. Design, Synthesis, Characterization, and Anti-Tubercular Activity of Novel Ethyl-3-Benzoyl-6, 8-Difluoroindolizine-1-Carboxylate Analogues: Molecular Target Identification and Molecular Docking Studies. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1284*, 135359, doi:10.1016/j.molstruc.2023.135359.

Gilbert, P.; Al-taae, A. Antimicrobial Activity of Some Alkyltrimethylammonium Bromides. *Lett. Appl. Microbiol.* **1985**, *1*, 101–104, doi:10.1111/j.1472-765X.1985.tb01498.x.

Vereshchagin, A.N.; Gordeeva, A.M.; Frolov, N.A.; Proshin, P.I.; Hansford, K.A.; Egorov, M.P. Synthesis and Microbiological Properties of Novel Bis-Quaternary Ammonium Compounds Based on Biphenyl Spacer. *European J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 4123–4127, doi:10.1002/ejoc.201900319.

Gupta, D.; Bhatia, D.; Dave, V.; Sutariya, V.; Gupta, S.V. Salts of Therapeutic Agents: Chemical, Physicochemical, and Biological Considerations. *Molecules* **2018**, *23*, 1–15, doi:10.3390/molecules23071719.

Lenoir, S.; Pagnoulle, C.; Detrembleur, C.; Galleni, M.; Jérôme, R. New Antibacterial Cationic Surfactants Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2006**, *44*, 1214–1224, doi:10.1002/pola.21229.

Mohammed, M.; Tahar, B.; Aïcha, D.; Eddine, H.D. Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium Salt from Diethylaminoethyl Methacrylate. *E-Journal Chem.* **2010**, *7*, 61–67, doi:10.1155/2010/637549.

Marini, M.; Bondi, M.; Iseppi, R.; Toselli, M.; Pilati, F. Preparation and Antibacterial Activity of Hybrid Materials Containing Quaternary Ammonium Salts via Sol-Gel Process. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 3621–3628, doi:10.1016/j.eurpolymj.2007.06.002.

Luo, M.; Zhou, L.; Huang, Z.; Li, B.; Nice, E.C.; Xu, J.; Huang, C. Antioxidant Therapy in Cancer: Rationale and Progress. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1–19, doi:10.3390/antiox11061128.

- Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D. Oxidative Stress Induced-Neurodegenerative Diseases: The Need for Antioxidants That Penetrate the Blood Brain Barrier. *Neuropharmacology* **2001**, *40*, 959–975, doi:10.1016/S0028-3908(01)00019-3.
- Kim, T.Y.; Leem, E.; Lee, J.M.; Kim, S.R. Control of Reactive Oxygen Species for the Prevention of Parkinson's Disease: The Possible Application of Flavonoids. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–28, doi:10.3390/antiox9070583.
- Mendiratta, M.; Gupta, S. Exploring the Role of Phytochemicals and Antioxidants on Antihyperglycemic Potentials of Indian Medicinal Plants. **2017**.
- Gulcin, İ. *Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview*; **2020**; Vol. 94; ISBN 0123456789.
- Dontha, S. A Review on Antioxidant Methods. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2016**, *9*, 14–32, doi:10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092.
- Lauridsen, C. From Oxidative Stress to Inflammation: Redox Balance and Immune System. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 4240–4246, doi:10.3382/ps/pey407.
- Tsuji, A. Small Molecular Drug Transfer across the Blood-Brain Barrier via Carrier-Mediated Transport Systems. *NeuroRx* **2005**, *2*, 54–62, doi:10.1602/neurorx.2.1.54.
- Al-Sodies, S.; Rezki, N.; Albelwi, F.F.; Messali, M.; Aouad, M.R.; Bardaweel, S.K.; Hagar, M. Novel Dipyrindinium Lipophile-Based Ionic Liquids Tethering Hydrazone Linkage: Design, Synthesis and Antitumorogenic Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10487, doi:10.3390/ijms221910487.
- Wang, Z.M.; Lin, H.K.; Zhu, S.R.; Liu, T.F.; Chen, Y.T. Spectroscopy, Cytotoxicity and DNA-Binding of the lanthanum(III) Complex of an L-Valine Derivative of 1,10-Phenanthroline. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *89*, 97–106, doi:10.1016/S0162-0134(01)00395-6.
- Tai, S.; Sun, Y.; Squires, J.M.; Zhang, H.; Oh, W.K.; Liang, C.Z.; Huang, J. PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. *Prostate* **2011**, *71*, 1668–1679, doi:10.1002/pros.21383.
- Mittler, F.; Obeid, P.; Rulina, A. V.; Haguët, V.; Gidrol, X.; Balakirev, M.Y. High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, doi:10.3389/fonc.2017.00293.
- Marullo, R.; Werner, E.; Degtyareva, N.; Moore, B.; Altavilla, G.; Ramalingam, S.S.; Doetsch, P.W. Cisplatin Induces a Mitochondrial-Ros Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0081162.
- McIlwain, D.R.; Berger, T.; Mak, T.W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, doi:10.1101/cshperspect.a026716.
- Brentnall, M.; Rodriguez-Menocal, L.; De Guevara, R.L.; Cepero, E.; Boise, L.H. Caspase-9, Caspase-3 and Caspase-7 Have Distinct Roles during Intrinsic Apoptosis. *BMC Cell Biol.* **2013**, *14*, doi:10.1186/1471-2121-14-32.
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95, doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- Kapková, P.; Alptüzün, V.; Frey, P.; Erciyas, E.; Holzgrabe, U. Search for Dual Function Inhibitors for Alzheimer's Disease: Synthesis and Biological Activity of Acetylcholinesterase Inhibitors of Pyridinium-Type and Their A β Fibril Formation Inhibition Capacity. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14*, 472–478, doi:10.1016/j.bmc.2005.08.034.
- Goux, W.J.; Kopplin, L.; Nguyen, A.D.; Leak, K.; Rutkofsky, M.; Shanmuganandam, V.D.; Sharma, D.; Inouye, H.; Kirschner, D.A. The Formation of Straight and Twisted Filaments from Short Tau Peptides. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26868–26875, doi:10.1074/jbc.M402379200.
- Lunven, L.; Bonnet, H.; Yahiaoui, S.; Yi, W.; Da Costa, L.; Peuchmaur, M.; Boumendjel, A.; Chierici, S. Disruption of Fibers from the Tau Model AcPHF6 by Naturally Occurring Aurones and Synthetic Analogues. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 995–1003, doi:10.1021/acschemneuro.6b00102.
- Gade Malmos, K.; Blancas-Mejia, L.M.; Weber, B.; Buchner, J.; Ramirez-Alvarado, M.; Naiki, H.; Otzen, D. ThT 101: A Primer on the Use of Thioflavin T to Investigate Amyloid Formation. *Amyloid* **2017**, *24*, 1–16, doi:10.1080/13506129.2017.1304905.