

Raport științific
privind implementarea proiectului PCE_ PNII-ID-PCE-2011-3-0226,
Etapa V, ianuarie-decembrie 2015

Obiectivele propuse pentru etapa V a proiectului au fost realizate în totalitate. Colaborarea între partenerii implicați în proiect a avut ca rezultat elaborarea unor lucrări publicate respectiv redactate pentru a fi publicate, în care sunt prezentate diverse activități prevăzute în proiect. Această etapă a avut ca scop *caracterizarea biologică a compușilor obținuți* în etapele anterioare prin *studiul interacției compușilor cu ADN și studiul proprietăților electrochimice* prin realizarea unor *determinări de voltametrie ciclică*.

Rezultatele obținute în urma realizării activităților cuprinse în etapa V sunt prezentate sintetic în cele ce urmează.

5.1. Caracterizarea biologică a compușilor sintetizați

5.1. 1. Interacția compușilor cu ADN-ul

ADN-ul are un rol crucial în procesele biologice, transmitând informația ereditară sub formă de coduri necesare sintezei proteinelor și enzimelor. ADN-ul controlează direct sau indirect structurile și funcțiile celulare. Încă de la descoperirea structurii acestuia, a fost ținta principală a moleculelor mici cu importanță terapeutică ce aparțin diverselor clase de medicamente, de la antitumorale la antibiotice. Moleculele mici interacționează cu proteinele asociate ADN-ului sau prin intermediul hibrizilor ADN-ARN, dar se pot și lega direct la helix-ul ADN. Aceste interacții au ca rezultat interferența cu activitatea diferitelor enzime și proteine implicate în menținerea structurilor și funcțiilor celulare. Interacțiunea moleculelor mici cu ADN-ul a fost studiată pe scară largă. Aceste studii dau direcții de dezvoltare a agenților terapeutici eficienți, ce pot controla expresia genelor. Molecule noi și mai eficiente, care țintesc ADN-ul, pot fi dezvoltate cu ușurință. Descifrarea mecanismului de acțiune a medicamentelor antitumorale a devenit posibilă prin studiul interacției moleculă-ADN (Sayeed Ur Rehman et al).

Studiile spectroscopice (de absorbție și fluorescență) pot oferi informații importante privind modul de legare al acizilor nucleici de molecule fluorescente (fluorofori) sau medicamente (Modukuru N. K. et al., 2006, Muhammad Sirajuddin et al., 2013; Sayeed Ur Rehman et al., 2015).

A fost studiat comportamentul fotofizic al indolizinelor și s-au făcut eforturi pentru a obține derivați cu proprietăți îmbunătățite și excepționale. Datorită fluorescenței caracteristice, derivații indoliziniici au fost utilizați ca senzori fotochimici, senzori de legături de hidrogen și sonde fluorescente sensibile (Matthieu Becuwe et al., 2011, Bankim Chandra Ghosh et al., 2011, Mustafa K. Bayazit et al., 2014). Indolizinele au fost utilizate pentru a studia interacția cu ADN-ul și ca pigmenți fotochimici (Dinică, 1999, Furdui et al., 2007).

Cercetările privind studiul interacției acizilor nucleici cu diverse molecule biologice active sintetizate în etapele anterioare ale proiectului contribuie la înțelegerea mecanismului de interacție al acestor molecule cu acizii nucleici. Interacția acizilor nucleici cu compușii organici

diferit funcționalizați (produși rezultați din reacții de ciclizare, indolizine fluorescente), obținuți în etapele anterioare prin biocataliză, s-a realizat prin metode spectrale (UV-Vis și IR).

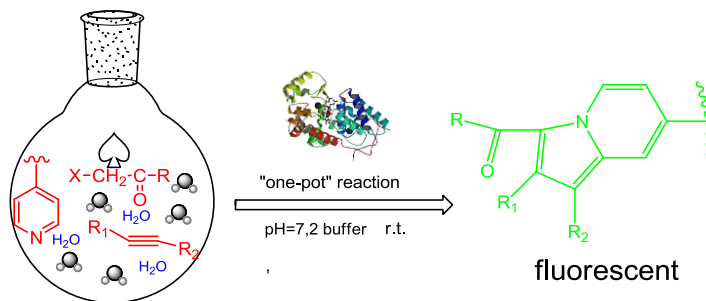
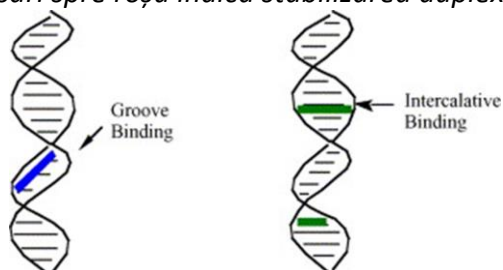


Figura 1 Sinteza indolizinelor

Măsurarea absorbției UV-vis este o metodă simplă, dar eficientă în detectarea formării complexului ADN-compus. În general, atunci când o moleculă mică interacționează cu ADN-ul și formează un nou complex, modificările ar trebui să apară în absorbanță și în poziția benzii de absorbție. Dacă modul de legare este intercalarea, orbitalul π^* al moleculei intercalate se poate cupla cu orbitalul π al perechilor de baze ADN, astfel, conducând la scăderea energiei tranziției $\pi^* \rightarrow \pi$ rezultând astfel efectul batocrom. Pe de altă parte, cuplarea orbitalului π parțial ocupat de electroni conduce la o scădere a probabilității de tranziție și concomitent rezultând un efect hipocrom. În general, hipercromismul și hipocromismul sunt caracteristici spectrale ale ADN-ului referitoare la structura de dublu helix; hipercromismul înseamnă ruperea structurii secundare a ADN-ului și hipocromismul înseamnă că modul de legare al moleculei de ADN este prin efect electrostatic sau de intercalare, efect care poate stabiliza duplexul ADN-ului, în timp ce existența unei deplasări spre roșu indică stabilizarea duplexului ADN.



Modul de legare al unui compus este influențat de caracteristicile geometrice, sterice și electrostatice ale acestuia. Astfel, legarea prin intercalare este frecvent întâlnită în cazul sistemelor aromatice și heterociclice cu molecule plane, în timp ce interacția electrostatică poate apărea în cazul prezenței unor funcțiuni cationice și a unor catene laterale.

Pregătirea probelor și a ADN-ului

Pentru studierea interacției fluoroforilor cu acizii nucleici, într-o primă etapă a cercetărilor de laborator s-au înregistrat spectrele de absorbție ale unor indolizinelor luate în lucru.

Spectrele UV-Vis ale pigmentilor au fost înregistrate între 200 și 800 nm, în soluție tampon fosfat. Indolizinele prezintă două maxime de absorbție în această regiune.

S-au efectuat măsurători de fluorescență la echilibru, utilizând aparatul Infinite 200 Pro NanoQuant Microplate Multimode Reade (300 μL / godeu). Determinările s-au realizat la 24°C, iar concentrația pigmentului s-a situat între 2 și 20 μM , în funcție de experiment.



Figura 2 Soluții de indolizine analizate

Spectrele de fluorescență înregistrate arată că grupele donoare (ex. metoxi) legate pe inelul fenilic produc un deplasare batocromică și o creștere a intensității fluorescenței, în timp ce grupele electronoacceptoare (nitro) deși cauzează tot o deplasare batocromă a maximului de emisie au un efect de „quenching” de fluorescență.

Concentrația acidului dezoxiribonucleic din timus de vițel

Sarea de sodiu a acidului dezoxiribonucleic din timus de vițel (Sigma Chem. Co., USA) a fost utilizată fără purificări suplimentare, preparându-se o soluție-stoc prin dizolvarea acesteia în apă bidistilată, ce ulterior a fost păstrată la 4°C. Concentrația ADN în soluția-stoc a fost determinată înregistrând absorbanta la 260 nm, cunoscându-se coeficientul de absorbție molară $\epsilon_{260} = 5000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Purity ADN-ului a fost evaluată prin calcularea raportului între absorbanta la 260 respectiv 280 nm. Rezultatul, $>1,8$, a condus la concluzia că ADN-ul este suficient de pur. Pentru determinările spectroscopice, acesta s-a dizolvat în soluție tampon 10 mM Tris-HCl, pH 7.

Interacția acizilor nucleici cu compușii organici s-a făcut cu un cititor de microplăci model Infinite 200 Pro NanoQuant, dotat cu o placă specială optică, din cuarț, ideală pentru 16 probe care garantează performanțe ridicate și o rată mare de reproductibilitate, pentru cuantificarea acizilor nucleici. Placa este compatibilă cu o pipetă de opt canale pentru a distribui ușor probele de analizat. Din fiecare diluție 2 μL ADN au fost transferate pe locurile speciale ale plăcii NanoQuant, care a fost ulterior citită. Toate măsurătorile au fost efectuate în triplicat.

Efectul ADN-ului asupra spectrelor UV-Vis

Spectrele au fost înregistrate prin adiție progresivă a soluției de ADN la indolizine. Titrările s-au efectuat menținând concentrația probei constantă și adăugând soluție ADN în cantități progresive, în condiții fiziologice, până la saturarea în hipocromicitate.

Spectrele de absorbție ale soluțiilor ADN-indolizine sunt prezentate în figura de mai jos. Legarea indolizinelor de ADN conduce la producerea unui efect batocrom, vizibil la concentrații mari ale ADN.

Efectele bato- sau hipsocrom, hiper- sau hipocrom, precum și punctul izocromatic sunt proprietăți spectrale ale interacției ADN-moleculă, aflate în legătură cu structura de dublu helix. Hipocromicitatea la maximum de absorbție al ADN (260 nm), spre exemplu, indică o compactare a ADN-ului datorată interacțiilor electrostatice, iar o intercalare induce hipercromicitate la această lungime de undă (Reza Hajian et al., 2013).

Odată cu creșterea concentrației de indolizine spectrul arată scăderea în intensitate a absorbției. Deoarece nucleul indolizinic conține inele aromatice care pot facilita intercalarea, este posibilă interacțiunea intercalativă clasică.

Titrare fluorimetrică. Stingerea fluorescenței de către ADN

Tehnicile de stingere a fluorescenței implică o varietate de interacții moleculare, precum reacții ale stărilor excitate, formarea unui complex în starea fundamentală, rearanjări moleculare, transfer de energie și coliziuni. În acest context, experimentele de stingere a fluorescenței s-au realizat pentru a investiga interacțiunile compușilor sintetizați, compuși indolizini, cu ADN-ul. Modul de legare al compușilor cu ADN-ul s-a evaluat prin spectroscopie de fluorescență, prin menținerea constantă a concentrației compușilor și varierea concentrației de ADN. Spectrele de fluorescență au fost astfel înregistrate la diverse rapoarte molare ADN:indolizină, excitarea probelor realizându-se la maximum de absorbție de energie minimă.

Spectrele de absorbție și emisie au permis evidențierea unei puternice interacții între ADN și fluoroforul studiat, care se manifestă printr-o stingere a fluorescenței acestuia, odată cu creșterea raportului molar ADN:fluorofor. Curba de titrare (intensitatea fluorescenței față de raportul molar ADN:indolizină), arată o scădere exponențială a intensității fluorescenței cu creșterea concentrației de indolizină.

Rezultatele obținute la titrările fotometrice au fost utilizate pentru a determina raportul optim, de interacțiune maximă ADN:ligand, din reprezentarea fluorescenței relative în funcție de raportul molar. Intensitatea fluorescenței indolizinei scade cu creșterea concentrației de ADN.

Efectul tăriei ionice

Studiul efectului tăriei ionice asupra interacțiunii moleculă-ADN este o metodă importantă pentru a analiza modul de legare dintre molecule mici și ADN. Electroliți puternici, cum ar fi NaCl, sunt utilizați în acest scop. Adăugarea de NaCl la ligandul liber în absența ADN-ului ar trebui să aibă un slab sau nici un efect asupra randamentului fluorescenței. Cu toate acestea, în prezența ADN-ului, Na⁺ neutralizează parțial grupările negative ale fosfat ale catenei ADN rezultând în reducerea respingerii electrostatice dintre ele.

Atracția electrostatică dintre o moleculă mică și suprafața ADN-ului este slăbită de adăugarea de ioni Na⁺. În cazul legării moleculei de suprafața ADN-ului, interacțiile electrostatice au loc în afara canelurii, în cazul în care intensitatea fluorescenței este stinsă la interacția cu ADN-ul. O moleculă mică aflată în canelura helixului ADN-ului este mult mai expusă la tăria ionică în solvent înconjurător decât o moleculă intercalată. Adăugarea de NaCl slăbește interacțiunea și conduce la eliberarea compusului din suprafața ADN rezultând în creșterea intensității fluorescenței. [S.U. Rehman, 2015].

Efectul concentrației de sare (clorură de sodiu) s-a studiat prin înregistrarea spectrelor de fluorescență în prezența unor concentrații diferite de NaCl, pentru a stabili natura interacției pigment-ADN (intercalare sau interacție electrostatică).

Studii de stingere a fluorescenței iodurii de potasiu KI

Studiile de stingere a fluorescenței iodurii de potasiu sunt de obicei folosite pentru a determina modul de legare a ADN cu medicamentele care sunt fluorescente. KI este moleculă mică cu proprietăți de stingere a fluorescenței și poate fi folosită pentru a determina tipul de legare a medicamentelor de ADN.

Experimentele de stingere indică locul de legare al moleculelor, fie în afara sau în interiorul helix-ului. Ionii de iod sunt încarcați negativ și pot stinge fluorescența moleculelor mici în mod eficient, într-o soluție saturată, în mediu apos. La interacțiunea cu ADN, ionii iodură fiind negativi sunt respinși de către grupările fosfat încărcate negativ ale catenei ADN. Orice moleculă mică intercalată în helix-ul ADN este bine protejată de a fi stinsă de către soluția saturată anionică, fluoroforul fiind restricționat. Cu toate acestea, moleculele electrostatice sunt expuse la solvenții din mediu și nu sunt bine protejate de anionii saturați, chiar și în mediul de ADN.

Concentrația de sare nu influențează semnificativ intensitatea fluorescenței în prezența ADN-ului astfel, prezența interacțiunii electrostatice poate fi exclusă.

Studiile preliminare demonstrează că indolizinele interacționează cu acizii nucleici acest lucru conducând la scăderea absorbției și emisiei la concentrații diferite de indolizină.

Interacția moleculelor cu acizii nucleici prin studii de spectroscopie FT-IR

Spectroscopia cu transformata Fourier în infraroșu (FT-IR), își găsește mare aplicație în domeniul științelor biologice. Aceasta oferă o modalitate ușoară de a identifica grupări funcționale prezente într-o moleculă și astfel identitatea unui compus pur poate fi stabilită. Radiația infraroșie (IR) este trecută printr-o probă în care unele dintre radiații sunt absorbite, în timp ce altele sunt transmise. Datele brute rezultate sunt prezentate sub forma unui spectru care se comporta ca o amprentă digitală moleculară a compusului sau moleculei. Studiul interacției drog-ADN evidențiază modificări spectrale adică schimbarea în intensitate și deplasări ale benzilor. Amprentă moleculară a ADN-ului pur se află în regiunea spectrală de 1800-700 cm^{-1} datorită vibrațiilor în pl ale diferitelor baze azotate, vibrațiilor de întindere (asimetrice și simetrice) ale grupărilor fosfat și vibrațiilor de întindere ale dezoxiribozei. Legarea moleculelor mici de pentoza fosfat a catenei ADN-ului este studiată prin monitorizarea schimbărilor în benzile de la 1228 și 1087 cm^{-1} care sunt cauzate de vibrații asimetrice și simetrice ale grupărilor fosfat [H. Arakawa, et al., 2000].

Tranziția conformației ADN de dublu helix de la forma B la forma A sau de la B la Z poate fi detectată cu ușurință prin legarea medicamentelor de ADN [T. Zhao, 2014, S.T. Saito, 2012, D.K. Jangir, 2011, H. Arakawa, 2000].

Legarea moleculelor analizate de bazele ADN sunt demonstrate prin evaluarea benzilor spectrale la 1741 cm^{-1} , care este atribuită în principal vibrațiilor de întindere în plan a guaninei (G), 1668

cm^{-1} cauzate de vibrațiile de bază ale timinei (T), 1581 și 1496 cm^{-1} cauzate de vibrațiile de întindere ale adeninei (A) și citozinei (C).

5.2. Studiul proprietăților electrochimice

5.2. 1. Studii de voltametrie ciclică

Compuși noi, cu structură de săruri de piridiniu, sintetizați în etape anterioare ale proiectului, precum dibromura de N,N' di-(p-bromofenacil)-4,4'-bipiridiniu (Lr) și dibromura de N,N' di-(p-bromofenacil)-1,2-bis(4-piridiniu)-etan (Lm), au fost investigați prin voltametrie ciclică pentru a le evalua comportamentul electrochimic. Stabilitatea acestor compuși heterociclici în mediu apos depinde de pH, această dependență fiind corelată cu date spectrofotochimice. Gruparea etilen a compusului Lm induce modificări ale stabilității și performanțelor electrochimice ale ligandului. Procesul cvasireversibil de transfer de electroni dintre grupările funcționale depinde de pH și de potențialul aplicat. Un pH alcalin al mediului apos este mai favorabil pentru stabilitatea liganzilor și pentru procesul de transfer de electroni la electrodul de platină. În urma studiului potențialului redox (voltametrie ciclică) al celor doi liganzi, s-a determinat rolul acestora de mediator în procesul de reducere. Credem că acest studiu va stimula investigații suplimentare asupra caracteristicilor chimice ale liganzilor și rolul acestora în chimia biologică și medicinală.

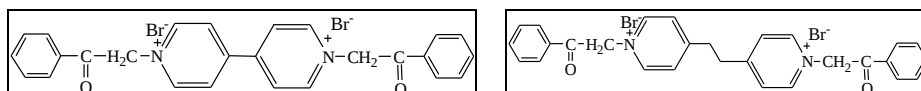


Figura 12. Structura sărurilor de bipiridiniu Lr și Lm

Elucidarea schimburilor electronice ale compuşilor obţinuţi este utilă pentru investigarea electrochimică [R. Palin et al., 2002]. Compuşii pot fi utilizaţi ca indicatori redox biologici, senzori electrochimici, transportori de electroni şi precursori pentru compuşi cu structură indolizinică, compuşi bioactivi ce pot fi utilizaţi ca markeri şi liganzi fluorescenţi pentru receptorii de estrogen [M. Eda et al., 2008, D. H. Evans et al., 2001]. Acest studiu ajută la elucidarea mecanismului de cicloadiţie a acestor liganzi cu diporaro-fili pentru a obţine derivaţi indolizinici. [Dinica et al., 2013]. Comportamentul acestor compuşi cu substituenţi aril la atomul de azot cuaternar a fost examinat, determinând faptul că proprietăţile spectroscopice şi electrochimice sunt modelate de natura heterociclului. Reacţiile de cuaternizare sunt realizate în mediu apos. Potenţialul redox al compuşilor conduce la determinarea proprietăţilor donor-acceptor a radicalilor [F. Tepl et al., 2012]. Direcţii viitoare de cercetare includ elucidarea mecanismelor de cicloadiţie şi substituţie în mediu apos. [Dinica et al., 2013]. Viologenii prezintă un interes semnificativ, datorită modificării proprietăţilor şi culorii acestora în funcţie de mediul de reacţie. În cadrul acestui studiu, s-a determinat pentru prima dată comportamentul electrochimic a două săruri cuaternare de piridiniu, prin voltametrie ciclică în mediu apos.

Studiul stabilității liganzilor

Compușii sintetizați au fost dibromura de N,N' di-(p -bromofenacil)-4,4'-bipiridiniu (numită ligand rigid-Lr) și dibromura de N,N' di-(p -bromofenacil)-1,2-bis(4-piridiniu)-etan (numită ligand mobil-Lm). Stabilitatea liganzilor derivați de la 4,4'-bipiridil (Lr) și 1,2-bis(4-piridil)-etan (Lm) a fost evaluată prin analiză spectrofotometrică și măsurători de potențial în circuit deschis (OCP). S-au preparat soluții apoase (0.1 mM), iar analiza s-a efectuat ajustând pH-ul la valori între 3 și 11. Soluțiile au prezentat culori diferite în funcție de pH, de la galben deschis la violet (Lr) și portocaliu (Lm). S-a observat o decolorare a soluției la scăderea concentrației ligandului sub 10^{-5} M.

Spectrele UV-Vis ale soluțiilor apoase au fost înregistrate la 264 nm ($\lambda_{\max}$) [Dinica et al., 2012], pentru a le studia stabilitatea inițial și după 24 ore (Figura 13). Cea mai mare valoare a absorbantei a fost înregistrată pentru Lr la pH 3 (galben pal) și pH 7 (slab violet), atunci când se formează speciile protonate. Soluția Lr proaspăt preparată este mai stabilă la pH slab bazic (aproximativ 8). Ligandul Lm este mai stabil la pH slab acid (aproximativ 6), iar forma dicationică este instabilă în mediu alcalin. Acest comportament sugerează prezența speciilor anionice AH^- la adăugarea unui exces de bază și tranziția de la AH_2 la AH^- .

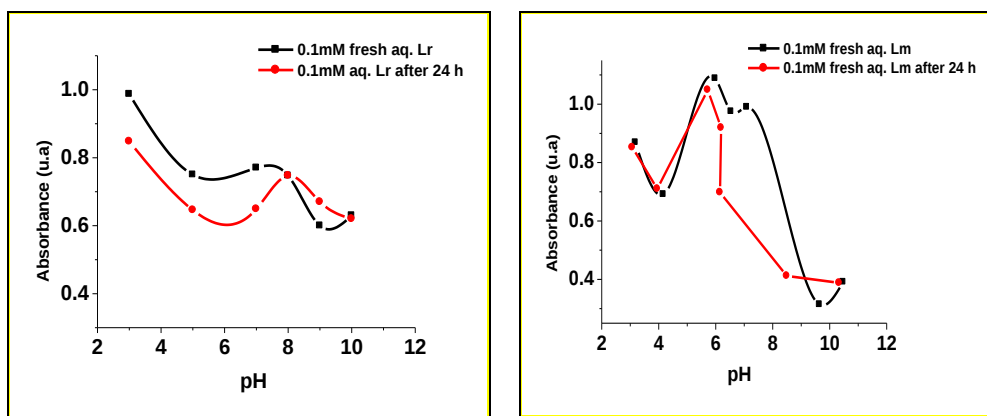


Figura 13. Modificarea absorbantei cu pH-ul la soluțiile apoase ale Lr și Lm

După 24 de ore la temperatura camerei se constată o ușoară modificare a absorbantei soluției liganzilor. Pentru Lr s-a înregistrat o scădere cu aproximativ 2 unități. Procesul de electro-oxidare este mai activ datorită echilibrului dinamic acido-bazic, favorabil reacției de transfer de electroni de la dication pentru obținerea radicalului cation ($AH^{\cdot+}$). și ulterior a speciei neutre. În același timp, Lm prezintă stabilitate în mediu acid, până la pH 6, dar o evidentă scădere a valorii absorbantei în mediu neutru sau alcalin. Acest comportament poate fi explicat prin favorizarea unor adiții periciclice în mediu alcalin, datorată grupării etilen.

Spectrele UV-Vis sunt bine corelate cu determinările OCP. Compușii derivați de bispiridiniu sunt oxidanți organici, iar tehnicile electrochimice pot fi utilizate pentru a permite caracterizarea comportamentului electro-oxidant al speciilor electroactive, pentru a stabili potențialul redox și a putea modela mecanismul reacției. Investigațiile electrochimice ale

soluțiilor ambilor liganzi (0,1 mM) au debutat cu monitorizarea OCP a soluțiilor proaspăt preparate, la pH acid. Pentru a realiza măsurătorile la diferite valori ale pH-ului, acesta s-a ajustat cu ajutorul soluțiilor tampon. Determinările OCP au fost repetate după 24, 120 respectiv 168 ore pentru a evalua stabilitatea electrochimică a echilibrului acido-bazic și procesul de electro-oxidare a compușilor; între determinări, soluțiile au fost păstrate la 4°C, în recipiente închise.

Deși soluția apoasă a liganzilor prezenta inițial o diferență de 0,5 unități de pH, nu s-au observat diferențe semnificative între valorile OCP (± 2 mV), aflate în jurul a +72 mV vs. Potențialul deschis a fost măsurat și pentru precursorii sărurilor sintetizate, solubili în mediu apos (0.1 mM). Precursorul Lr a prezentat un potențial de +65 mV vs SCE, iar precursorul Lm +75 mV vs SCE, neapărând modificări semnificative față de noii liganzi obținuți.

După 24 de ore s-a înregistrat o diferență de aproximativ 30 mV a valorilor OCP între soluțiile apoase în mediu acid ale liganzilor, +45 mV vs SCE pentru Lr și +63 mV vs SCE pentru Lm. Soluțiile proaspăt preparate ale Lm au prezentat variații mai mari ale valorilor OCP în tot domeniul de pH analizat, datorită instabilității punții etilenice. În aceleași condiții, Lr a prezentat o mai mare stabilitate.

Rezultatele OCP pentru soluția Lr au prezentat variații minime. Potențialul de electro-oxidare este mai ridicat pentru soluțiile apoase de pH 6 și pentru soluțiile neutre sau alcaline analizate după 7 zile. Așadar, Lr este un oxidant mai puternic, cu o mai mare stabilitate în timp, această proprietate menținându-se și la valori mai mari ale pH-ului. O diferență semnificativă, de 10 mV, a fost observată pentru soluția proaspăt preparată de pH 5,5 a Lm. În cazul ligandului mobil s-au obținut variații mai mari ale OCP în mediu alcalin și neutru decât în mediu acid.

Așadar, valorile OCP sunt corelate cu structurile prezentate în figura 12 și explică stabilitatea acestora, confirmată de determinări spectrofotochimice. Rezultatele obținute contribuie la explicarea mecanismului de electro-oxidare propus dar sunt momentan insuficiente pentru elucidarea cineticii reacției în mediu apos.

Sudii de voltametrie ciclică (CV)

Determinările electrochimice dau informații asupra stării compușilor organici la electrodul de lucru. CV are ca principal avantaj identificarea cuplurilor redox. Determinările CV atestă prezența structurilor protonate/deprotonate și dau informații asupra cineticii reacției. S-au realizat o serie de măsurători CV a liganzilor în mediu apos, la diferite valori ale pH-ului și ale potențialului aplicat.

Efectul pH-ului. pH-ul are un rol important pentru compușii organici, ca urmare a concentrației protonilor din mediul apos. Modificările apărute în voltamograme sunt rezultatul unor structuri diferite a liganzilor în soluțiile apoase, în funcție de pH (figurile 14 și 15). Alura acestora poate explica influența grupărilor funcționale din molecula ligandului, corelate cu stabilitatea acestora în timp, în funcție de pH.

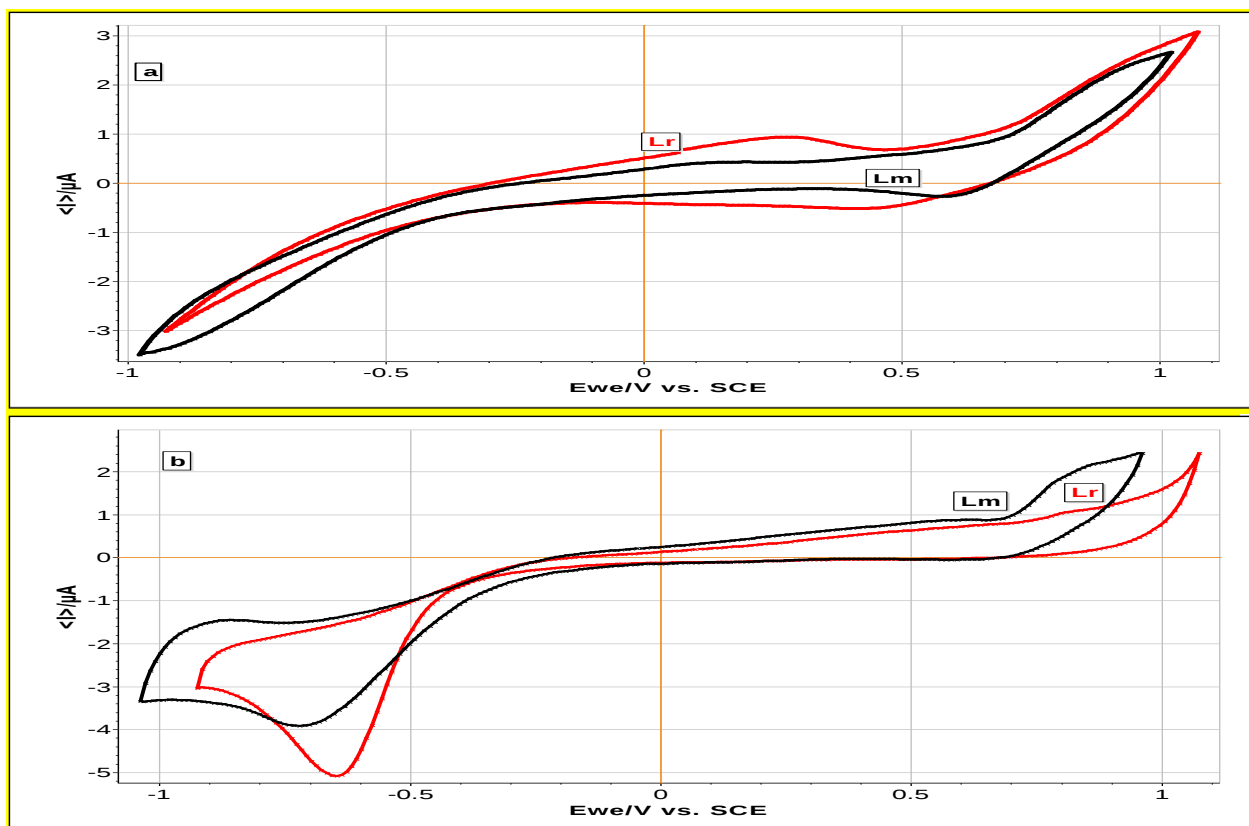


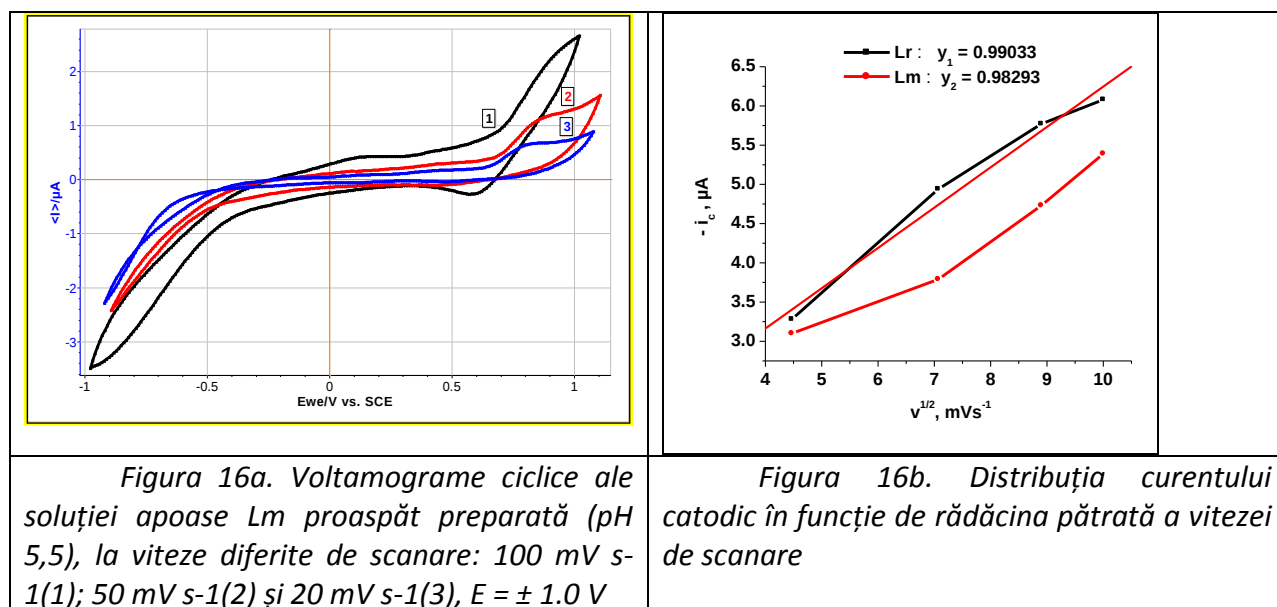
Figura 14. Voltamograme ciclice a soluțiilor apoase ale Lr și Lm – soluțiile proaspăt preparate la pH inițial (a) și la pH 12 (b); $E = \pm 1.0$ V vs. SCE, din direcție negativă. Viteză de scanare 100 mV s⁻¹(a), 50 mV s⁻¹(b).

În ceea ce privește curentul anodic, la ambii compuși se înregistrează un comportament similar la desfășurarea procesului redox pe electrod de platină. Peak-ul corespunzător inițierii oxidării anodice indică prezența a cel puțin unui cuplu prototropic (AH₂-/AH⁻) al compușilor organici. Peak-ul curentului anodic, aproximativ +300 mV vs. SCE, este mai evident pentru Lr și apare diminuat la Lm, cu o diferență de 0,5 μ A și la un potențial mai puțin pozitiv.

Se observă un peak anodic corespunzător oxidării Lr la radicalul anion corespunzător, proces ireversibil datorită reactivității mari. Prin determinări de tipul CV se pot identifica existența mai multor tranzații redox, realizate de compuși mai complecși. În cadrul acestui studiu, apa este acceptorul de proton, sarcina pozitivă este delocalizată la nivelul primului strat de molecule de apă format în jurul ligandului piridiniu. În mediu alcalin (pH 9), Lr prezintă un proces de reducere evident, spre deosebire de comportamentul în mediul acid și neutru (figura 15a). Viteza de scanare rămâne un parametru important al acestor procese de transfer de electroni (Figura 15b). În mediu bazic, peak-ul este transpus la un potențial mai pozitiv, la aproximativ +800 mV, iar reducerea catodică este un proces activ, intensiv. În același timp, Lm nu prezintă o transformare electro-oxidativă evidentă.

Se observă că în procesul catodic la electrodul de platină, la pH alcalin, cuplul conjugat deprototropic (de la AH- la AH) trece prin schimbări mai lente decât în mediu acid sau neutru. Acest comportament ar putea fi cauzat de o blocare a transferului electronic de la liganzii de piridiniu, prin adsorbție pe substratul de platină.

Efectul vitezei de scanare a potențialului. Pentru soluțiile apoase ale ambilor liganzi s-au înregistrat CV cu electrod de platină la diferite rate de scanare ($100 - 20 \text{ mV s}^{-1}$) pentru $E = \pm 1 \text{ V}$ (Figurile 3b și 4a). Nu s-au observat deplasări semnificative ale potențialului redox la creșterea vitezei de scanare de la 20 la $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ pentru Lr la pH 6 (Figura 3b). Totodată s-a obținut o creștere a curentului anodic cu creșterea vitezei de scanare, ca un efect al formării imediate a stadiului de ilidă la aplicarea unui potențial [Dinica, 2012].



Poziția peak-ului catodic obținut la 100 mV s^{-1} corespunde transformărilor redox de la potențialul (E_{pc}) de $+350 \text{ mV}$ pentru Lr la $+600 \text{ mV}$ pentru Lm (Figura 16a). Un studiu comparativ a soluțiilor alcaline ale liganzilor prezintă comportamentul diferit al acestora (Tabel 2).

Tabel 2. Parametri electrochimici și viteza de scanare a potențialului aplicat soluțiilor apoase ale liganzilor (pH 9)

scan rate (mV·s ⁻¹)	- E _{pc} (mV vs SCE)		- i _c (μA)		E _{pa} (mV vs SCE)		i _a (μA)	
	L _r	m	r	m	r	L _m	r	m
100	670	01	.08	.39	10	876	.85	.35
80	652	86	.65	.73	80	780	.54	.27
50	647	74	.94	.79	90	760	.66	.15
20	613	18	.28	.10	90	660	.45	.87

Peak-ul corespunzător reducerii a prezentat deplasări semnificative către potențiale mai negative, în timp ce peak-ul de oxidare al L_r prezintă o deplasare minimă. L_m are un potențial diferit între peak-ul anodic și cel catodic, ca urmare a procesului redox cvasireversibil datorat prezenței grupării etilenice. Ambii liganzi studiați prezintă peak-uri caracteristice transferului de electroni între grupările funcționale, mai evidente în zona catodică în soluții alcaline. Peak-urile catodice situate la potențiale joase nu pot fi atribuite procesului de reducere (Figura 16b).

Presupunând o viteză mare a transferului de electroni, curentul I_a s-a măsurat concomitent cu descreșterea potențialului și s-a considerat corelat cu viteza de difuzie a speciilor oxidate pe suprafața electrodului de platină, flux guvern timer de legea lui Fick [A. M. O. Brett et al., 2003]. Așadar, în procesul de transfer de electroni și protoni, liganzii de piridiniu funcționează ca mediatori, în mediu apos. Peak-ul, caracterizat de E_p și I_a, se deplasează cu creșterea pH-ului.

Liganzii studiați generează unde de curent în voltamogramele ciclice, descrise ca două etape tipice de transfer al unui electron. Prima etapă este reducerea AH₂ (AH₂/AH⁻) iar cea ce-a doua implică rolul ligandului de piridiniu de transportor de electroni (AH⁻/AH⁻). Pentru a explica acest comportament, s-a propus un mecanism de reducere catalitică a ionului H⁺, printr-un intermediar ¹H neutru (bazic) adsorbit pe electrodul de Pt în mediu apos. Adăugarea unui donator de protoni implică modificări nu doar la nivelul speciilor electroactive, dar și ale mecanismului global de reacție, acesta devenind concertat. În mediu apos alaclin, liganzii mediază un proces

irreversibil de transfer de electroni, confirmat de peak-ul catodic, mai evident la Lr decât în cazul Lm; datele electrochimice arată că mecanismul de reacție este diferit în funcție de pH.

Determinările spectrochimice realizate soluțiilor în condițiile prezentate, indică valori ale pH-ului între 6 și 7 unități pentru o bună stabilitate a liganzilor. Potențialul OCP este un instrument util în caracterizarea stabilității compușilor în mediu apos. Transferul de electroni mediat de liganzi a fost caracterizat prin voltametrie ciclică. Analizele electrochimice oferă posibilitatea de a studia potențialul redox și influența paramterilor precum pH-ul și viteza de scanare aplicată.

S-a identificat o bună corelare între potențialul electro-oxidativ și stabilitatea liganzilor în mediu apos la pH netru sau acid. Considerăm că acest studiu va stimula efectuarea unor alte studii de amploare; voltametria ciclică poate fi utilizată pentru a caracteriza puterea reducătoare și comportamentul electrochimic al compușilor precum liganzii de piridiniu, precum și pentru o mai bună înțelegere a rolului acestora în mediul biologic. Acest studiu contribuie la elucidarea mecanismelor la care pot participa acești compuși în mediu apos.

Concluzii. S-au efectuat în premieră studii spectroscopice și electrochimice asupra compușilor sintetizați în etapele anterioare. În urma acestor studii, s-au identificat proprietăți biologice și electrochimice remarcabile ale compușilor sintetizați prin reacții biocatalizate.

Studile de interacție cu ADN s-au realizat prin spectroscopie UV-Vis, IR și de fluorescență, pentru a analiza natura legăturii fluorofo-ADN. S-a identificat intercalarea ca potențială metodă de legare, dar și o puternică interacție ADN-indolizină, determinată prin stingerea fluorescenței acestora proporțional cu creșterea raportului molar ADN-fluorofo. Proprietățile electrochimice au fost evaluate prin voltametrie ciclică. Considerăm că acest studiu va stimula efectuarea unor alte studii de amploare; voltametria ciclică poate fi utilizată pentru a caracteriza puterea reducătoare și comportamentul electrochimic al compușilor precum liganzii de piridiniu, precum și pentru o mai bună înțelegere a rolului acestora în mediul biologic. Acest studiu contribuie la elucidarea mecanismelor la care pot participa acești compuși în mediu apos.

Obiectivele propuse până în acest moment în proiect au fost realizate în totalitate. Colaborarea între partenerii implicați în proiect a avut ca rezultat elaborarea unor lucrări publicate respectiv trimise spre publicare sau în lucru în care sunt prezentate rezultatele cercetărilor interdisciplinare vizate în proiect. Indicatorii prevăzuți au fost realizați, o parte din rezultate fiind publicate în reviste ISI și ISI proceedings (*STUDIA UBB CHEMIA, LX, 3, 2015, 99-109 and JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*), sau comunicate la conferințe internaționale (*BIOTRANS 2015, July, 2015, Vienna, Austria, EuroAliment Symposium 2015, September 2015, Galati, Romania, Trans Mediterranean Colloquium on Heterocyclic Chemistry, TRAMECH VIII, November 2015, Antalya, Turkey*). A fost editat un capitol de carte *Perspective-Breakthroughs in*

indole and indolizine chemistry - new synthetic pathways, new applications în: *Scope of Novel Heterocycles from Organic and Pharmaceutical* editura InTech open acces, iar alte rezultate sunt trimise spre publicare sau sunt în lucru.

Director proiect,
Conf.dr.chim.Dinică Rodica Mihaela

