

Raport științific
privind implementarea proiectului PCE_ PNII-ID-PCE-2011-3-0226,
octombrie 2011- octombrie 2016

Proiectul a urmărit identificarea, analiza și utilizarea unor biocatalizatori comerciali sau din biodiversitatea României, microorganisme și vegetale, care să fie utilizate în catalizarea unor reacții importante pentru chimia organică.

Scopul proiectului a fost de a sintetiza compuși N-heterociclici funcționalizați, cu proprietăți bioactive (Singh G. S. et al., 2011), electrochimice, fluorescente, prin metode clasice și neconvenționale, utilizând biocatalizatori, activare cu microunde, ultrasunete, metode cunoscute ca aparținând "chimiei verzi" și ulterior testarea acestor proprietăți.

Obiectivele proiectului au fost îndeplinite și sunt prezentate sintetic în cele ce urmează.

O.I.1. Selecția biocatalizatorilor

*Un prim obiectiv îndeplinit al proiectului a fost **selecția biocatalizatorilor** care au fost utilizați în cataliza reacțiilor de sinteză a N-heterociclicilor. S-au avut în vedere enzime comerciale, sau surse naturale de enzime (microorganisme și țesuturi vegetale). Celulele microorganismelor (bacterii, drojdii și mușci) au fost testate atât din punct de vedere a potențialului de a produce diferite enzime extracelulare, cu rol în biocataliză, cât și utilizarea biomasei în calitate de biocatalizatori complecși. Complexul enzimatic al celulelor întregi este mult mai util comparativ cu enzimele pure datorită existenței unor complexe enzimatic care pot cataliza diferite reacții. Comparativ cu biocatalizatorii de origine microbiană, plantele au căi metabolice mult mai complexe, care sunt mult mai puțin înțelese, pot avea enzime necunoscute și unice. Deoarece cele mai multe secvențe genomice ale ADN-ului din fructe și legume nu sunt disponibile, este de mare importanță exploatarea celulelor din plante, cu activitățile catalitice, extrem de bune (B. Xie et al., 2009) Biocatalizatori precum biomasa microorganismelor sau țesuturile vegetale sunt eficiente a fi utilizate în sinteza organică deoarece sunt ușor de procurat de pe piață și ușor de manipulat (E. M. Isin et al., 2007).*

Studiile preliminare realizate au urmărit utilizarea unor celule microbiene și enzime sintetizate de acestea, țesuturi vegetale sau enzime comerciale ca biocatalizatori în reacții de cicloadiție cu scopul de a obține compuși cu proprietăți bioactive, fluorescente, antioxidante. Compușii 4,4'-bipiridilul (bpy), ω-bromacetofenona (wBr), dibromura de N,N'-di(p-metoxifenacil)-4,4'-bipiridiniu și propiolatul de etil(PE) au fost aleși în aceasta etapă ca substraturi model pentru selecția biocatalizatorilor.

*Microorganismele testate în calitate de biocatalizatori au fost tulpini de: bacterii cum ar fi *Pseudomonas* spp., bacterii filamentoase, *Streptomyces* spp. (tulpini izolate din soluri polare); drojdii (*Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida arborea*), mușci (*Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, *Epicoccum nigrum*); celule vegetale (*Armoracia rusticana*, *Daucus carota*, *Petroselinum hortense*-*

sativum, Raphanus sativus, Allium porrum, Fagopyrum sagittatum), și enzime comerciale (lipaze și dehidrogenaze).

În cazul microorganismelor s-a testat potențialul biocatalitic al biomasei (celule întregi), al culturilor cu vârste diferite și al preparatelor enzimatiche brute eliberate extracelular. Selecția biocatalizatorilor s-a realizat în funcție de capacitatea acestora de a produce transformări ale substraturilor cu formare de compuși fluorescenți, proprietate care a fost pusă în evidență prin cromatografie pe strat subțire și vizualizarea fluorescenței în UV.

Reacțiile biocatalizate de celule vegetale s-au efectuat cu materialul vegetal tăiat în bucăți de dimensiuni mici, în condiții sterile, în condiții foarte blânde, în soluție tampon fosfat pH 7-7,2, la temperatura de 25°-50° C, cu agitare la 200rpm, timp de 72 h.

Toate reacțiile de sinteză biocatalizate au fost monitorizate prin cromatografie pe strat subțire.

Studiile au demonstrat că biocatalizatorii testați au capacitatea de bioconversie a compușilor cu formare de produși fluorescenți, procesul de biotransformare fiind influențat de timpul de reacție, pH, temperatură, proprietățile catalitice ale biocatalizatorului. În cazul microorganismelor, bioconversia evoluează diferit în funcție de tip, particularitățile metabolice și energetice ale celulelor, precum și de vârsta acestora și condițiile de cultivare. În cazul celulelor vegetale utilizate până în prezent, reacția a decurs cu viteză mai mare, comparativ cu a culturilor microbiene în calitate de biocatalizatori (rezultate publicate în [Curr.Opinion Biotech, 2013,IF 8,4](#)).

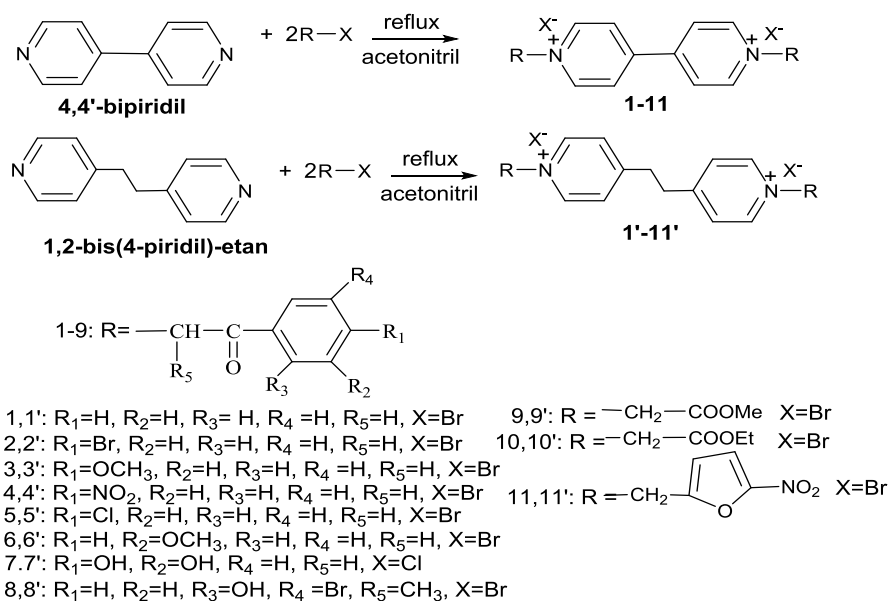
O.I.2 Obținerea compușilor de plecare, derivați halogenați reactivi și noi săruri cuaternare de amoniu

Pentru realizarea reacțiilor de cicloadiție precursorii necesari au fost **derivații halogenați reactivi** utilizați apoi în sinteza noilor **săruri cuaternare de amoniu**.

Acești compuși au fost obținuți după metodele de obținere din literatura de specialitate ([Dinica, R. et al., 2008](#)) și a constituit un alt obiectiv îndeplinit.

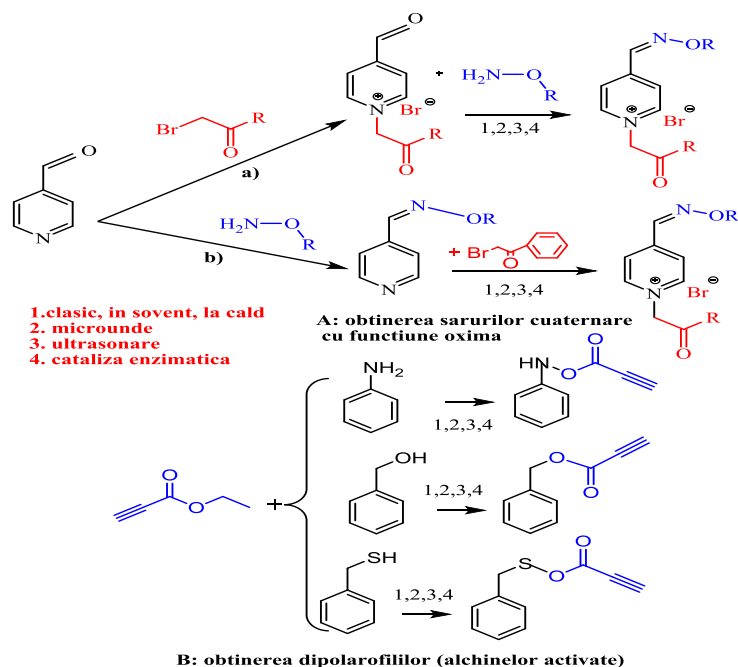
Obținerea o-hidroxicetonelor halogenate-derivați halogenați reactivi s-a realizat plecând de la o-hidroxicetonă care se bromurează în acid acetic glacial. Produsul solid obținut se filtrează și se recrystalizează din solvent potrivit.

Ulterior, derivații halogenați s-au utilizat pentru obținerea sărurilor cuaternare de amoniu, precursori în obținerea indolizinelor (rezultate publicate în [Tetrahedron, 2012, I.F. 2,621](#)). Compușii s-au obținut după schema de reacție de mai jos plecând de la diverse cicluri piridinice și derivați halogenați reactivi:



Schema 1. Sinteza sărurilor cuaternare de amoniu

Obținerea de noi sintoni cu funcția oximă în poziția 4, de tipul sărurilor cuaternare de piridiniu, a avut ca scop obținerea de noi compuși bioactivi, funcțiunea oximă regăsindu-se în numeroase medicamente importante în tratarea intoxicațiilor cu fosfați organici ([Acharya, 2011](#)) antibiotice ([Lorke, 2008](#)), sau având activitate inhibitorie asupra kinazei supraexprimată în boli neurodegenerative precum Alzheimer sau Parkinson. Acționând ca nucleaze artificiale, pot deveni instrumente utile în biotehnologie, în terapia genică sau în chimioterapie ([Fernandes, 2008](#)).



Schema 2. Obținerea intermediarilor utilizați în reacții de cicloadiție

Astfel, pornind de la **4-piridin-aldehidă**, am obținut **oxima** prin două căi (schema 2A) metoda cea mai bună constituind-o **calea b**. Reacțiile dezvoltate **în prezența mw sau us** se desfășoară în timp scurt (1-6h) și cu **randament cantitativ**. Obținerea de noi alchine activate cu funcția amidă, ester și tioester va conduce la noi indolizine cu potențial bioactiv (schema 2B). Este interesant de remarcat că **reacțiile au loc doar catalizate de enzime** (CAL A, CAL B, lipază porcină tip II), în timp ce pe cale **clasică nu au loc** (rezultate publicate în Tetrahedron, 2013, I.F. 2,621).

O.II.1 Sinteza moleculelor fluorescente prin reacții de cicloadiție

Acest obiectiv s-a realizat utilizând cataliza enzimatică, microunde, ultrasunete și solvenți netoxici. Rezultatele acestei etape au constat în realizarea cu succes a unor reacții de tip "click chemistry", utilizând ca **materiale de plecare** mai mulți **heterocicli cu azot**, diferiți **derivați halogenați reactivi** și **compuși cu triplă legătură activată** de o grupare atrăgătoare de electroni.

Chimia "click" este un concept propus de Sharpless în 2001 care descrie reacții de cuplare între două subunități chimice reactive care pot genera ușor noi compuși (Kolb, H.C., 2004). Prin definiție, aceste reacții trebuie să fie foarte rapide, utilizarea lor să fie flexibilă și foarte largă, și să ducă la formarea stereospecifică a unui singur produs cu randament ridicat. În plus, reacțiile "click" trebuie să se desfășoare în condiții de reacție blânde (ideale în apă la temperatura camerei) și să nu genereze subproduse toxice. În final, produsul format ar trebui să fie ușor de purificat și stabil în condiții fiziologice.

Cea mai populară reacție de acest tip este reacția de cicloadiție 1,3-dipolară dintre grupări azidice și alchinice, care duce la formarea unui inel de 1,2,3 triazol. Reacția originală Huisgen se face la temperaturi ridicate și conduce la un amestec al celor doi regioizomeri 1,4 și 1,5-triazoli (figura 1).

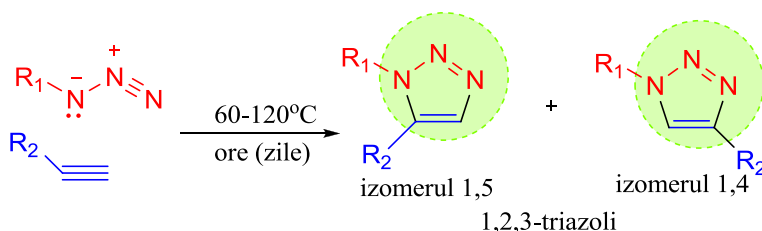


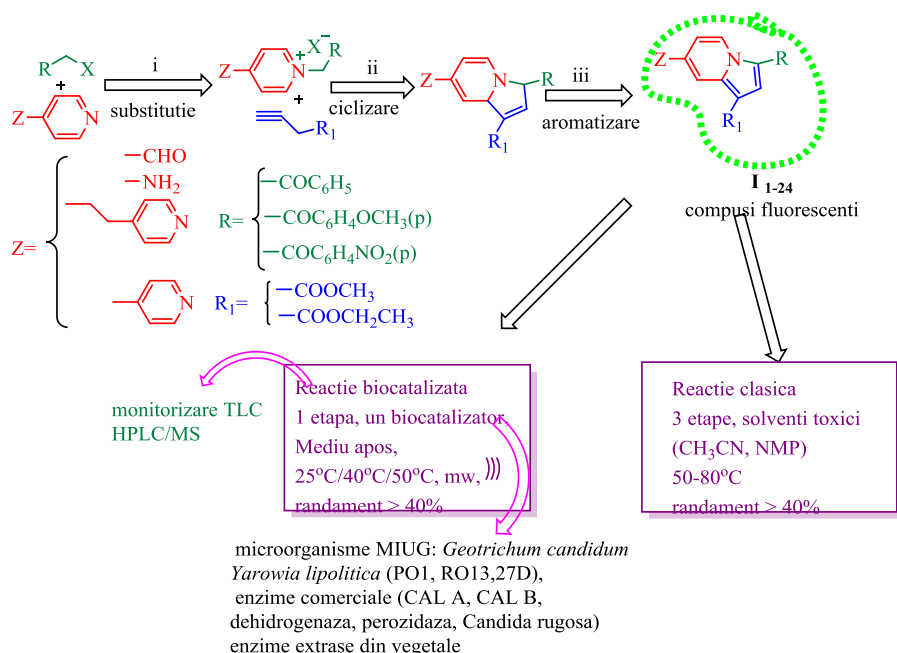
Figura 1. Reacția originală Huisgen

Având în vedere variatele metode "click" am continuat să studiem în detaliu reacțiile de cicloadiție, pentru a obține noi molecule ,bioactive (antibacteriene, antioxidante, fluorescente), și să explorăm utilizarea acestora în chimia "click".

Reacțiile biocatalizate au fost multiple, deoarece am variat compușii de plecare pentru a obține compuși diferit funcționalizați, care pot avea proprietăți diferite, **bioactive, fluorescente**, datorită substituenților prezenți în moleculă. Reacțiile enzimatică s-au desfășurat utilizând atât **enzime comerciale** cât și enzime provenite din **biomasa microbiană și vegetală**. Reacțiile au fost activate și cu ajutorul microundelor (mw) sau a ultrasunetelor (us). Reacțiile s-au desfășurat

comparativ, atât prin metoda clasică (încălzire, solvenți organici), cât și prin metode alternative (biocataliză, microunde, ultrasunete, mediu apos) pentru a demonstra avantajul utilizării biocatalizatorilor.

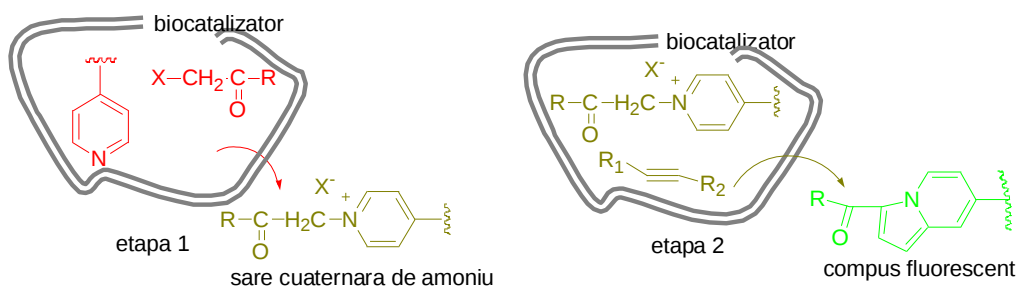
Reacțiile desfășurate prin metoda clasică au avut loc în trei etape (i, ii, iii), conform schemei 3:



Schema 3. Obținerea cicloaducțiilor

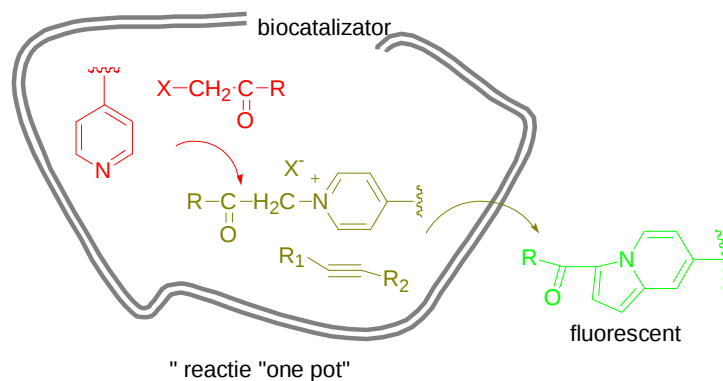
Etapa (i) s-a desfășurat în acetonitril, etapele (ii), (iii) în N-metilpirolidonă sau benzen.

Reacțiile de sinteză biocatalizate, care conduc la formarea de N-heterocicluri fluorescente s-au realizat prin două variante. Prima variantă s-a realizat în etape (schema 4), urmând aceeași cale de sinteză care se utilizează la sinteza prin metoda clasică (fără biocatalizatori):



Schema 4. Biocataliza realizată în două etape: 1-obținerea sărurilor cuaternare de amoniu; 2-reacția sărurilor cu dipolarofili cu triplă legătură cu obținerea ciclului indolizinic fluorescent

A doua variantă se realizează prin sinteză "one-pot", într-o singură etapă (schema 5), metoda fiind mult mai avantajoasă (timp mai scurt, randament global mai mare).



Schema 5. Sinteza „click”, biocatalizată într-o singură etapă

Reacțiile biocatalizate, într-o singură etapă, („one-pot”) s-au desfășurat în mediu apos, la 25°C, respectiv 40 °C sau 50°C, adăugând simultan în mediul de reacție N-heterociclul, agentul alchilant și dipolarofilul. Reacțiile au fost monitorizate prin cromatografie pe strat subțire (CSS) și prin HPLC/MS. În **reacțiile** realizate în prezența **catalizatorilor enzimatici comerciali** s-au utilizat biocatalizatori ca: lipaza din *Candida Antarctica* **CAL A**, **CAL B**, *Candida Rugosa*, **alcool dehidrogenaza**, **lipaza din pancreas de porc**, **enzimele din hrean**. În paralel, s-a realizat și reacția martor în mediu apos la pH 7, în absența catalizatorilor enzimatici – Im. Evoluția reacțiilor s-a urmărit comparativ cu produsul pur (M), sintetizat anterior de noi (*Dinica, et al, Synlett, 1013, 2001*), prezența produsului indolizinic urmărit fiind pusă în evidență prin CSS, prin UV-VIS și spectroscopie de masă (MS). În cazul reacției fără catalizatori enzimatici, obținerea cicloaductului s-a realizat cu randament scăzut. Activarea reacției biocatalizate cu ultrasunete sau microunde a condus la creșterea randamentului dar și la scurtarea timpului de reacție (**rezultate publicate în *Marine drugs*, 2013, IF 4.031 și *Molecules*, 2016, IF 2,749**).

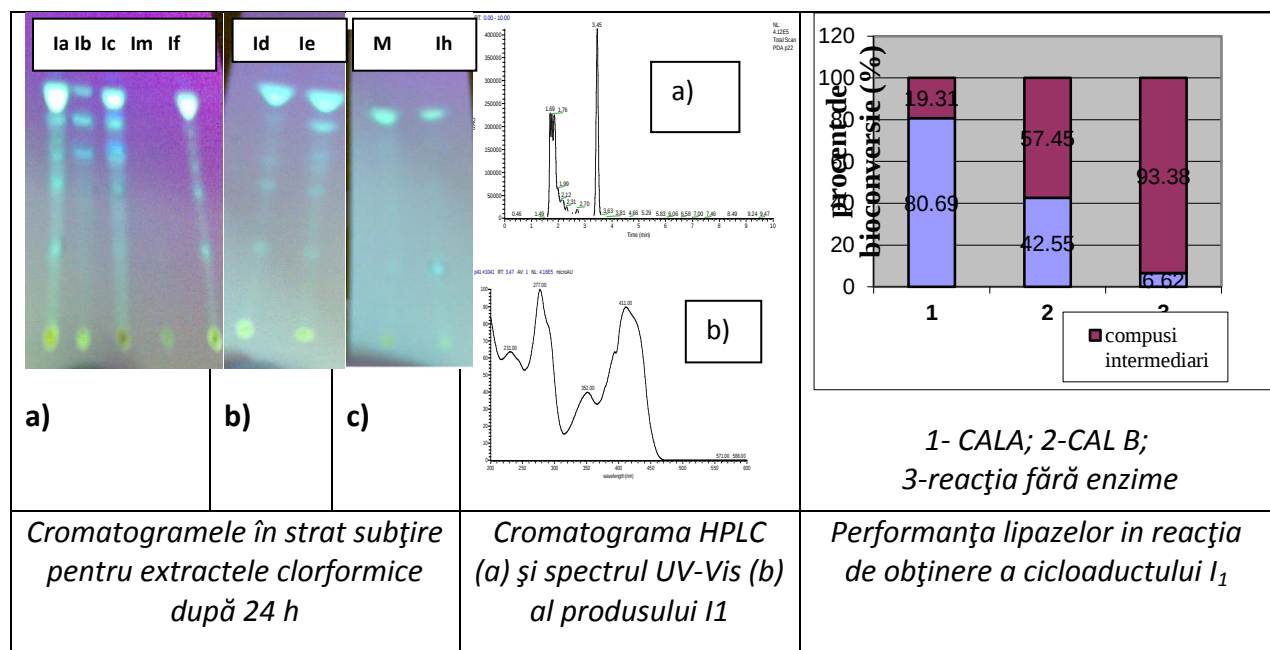


Figura 2. Rezultatele obținute în urma reacțiilor biocatalizate

Se poate observa că **reacția catalizată de CAL A are loc cu o conversie foarte bună**, în 2 h, dacă reacția este activată cu **ultrasunete**, comparativ cu reacția neactivată, efectuată în 48h (Figura 2).

Aceleași tipuri de reacții au fost catalizate de unele **microorganisme** selectate în etapa I a proiectului și evaluate prin CSS și HPLC/MS. Cromatogramele CSS și HPLC/MS, arată că **primele rezultate** apar după 24 h de reacție.

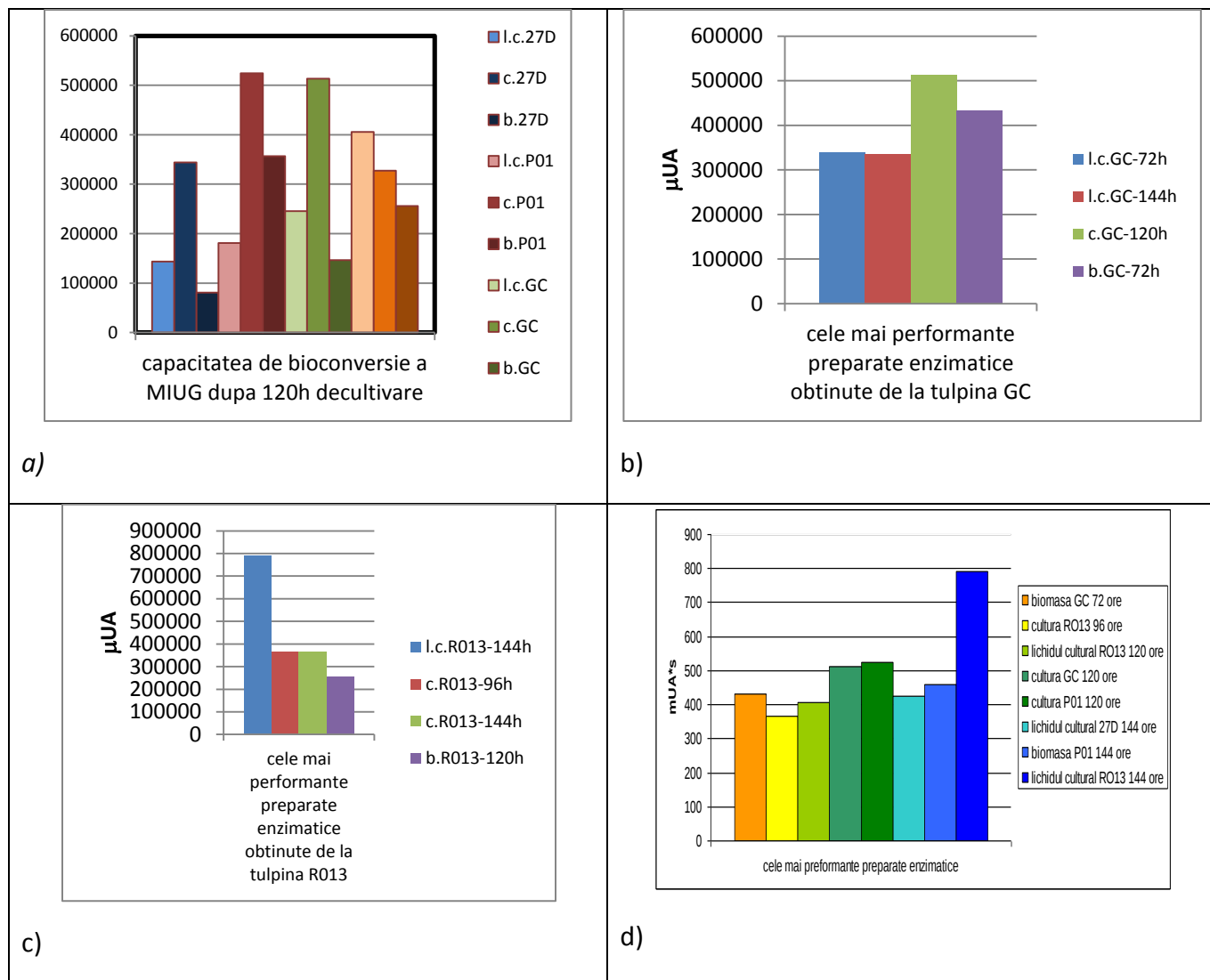


Figura 3. Rezultatele bioconversiei reacțiilor „one pot” cu microorganisme din colecția MIUG

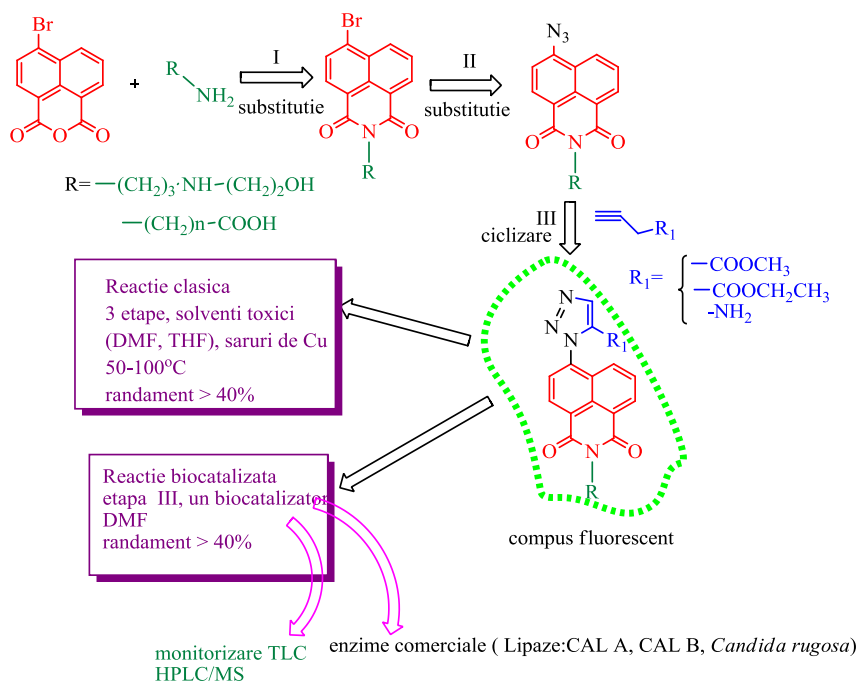
Reacțiile au fost catalizate utilizând culturi de microorganisme la 72, 96, 120 și 124h de cultivare pe parcursul a 6 zile de reacție. Toate experimentele s-au realizat în triplicat. Evaluarea rezultatelor reacțiilor biocatalizate de biomasa microbiană au condus la concluzii importante și anume că extractele enzimice folosite catalizează diferit reacțiile de cicloadiție. Din grafice (figura 3) reiese că din cele 4 tulpini utilizate, 27D, P01, RO13 (*Yarrowia lipolytica*) și GC (*Geotrichum candidum*) cele mai active sunt **cultura întreagă P01 și Gc și lichidul cultural de RO13 obținute după 96 h de cultivare**. Pentru Gc o capacitate biocatalitică superioară are

lichidul cultural, obținut după 120h iar pentru tulpina RO13 lichidul cultural după 144h de cultivare în sistem submers. În figura d se regăsesc cele mai performante preparate enzimatice utilizate în obținerea compusului **I1**. O observație de asemenea importantă a fost că în reacțiile catalizate de biomasă chiar dacă randamentul de bioconversie este mai mic, se obțin produșii cu puritatea cea mai ridicată.

Rezultatele obținute arată că reacțiile desfășurate în prezența biocatalizatorilor sunt mult mai avantajoase din următoarele considerente: reacțiile se desfășoară în timp mult mai scurt, se elimină solvenți toxici, compușii obținuți au puritate ridicată iar randamentele sunt comparabile cu cele obținute pe cale clasică.

O.II.2.Sinteza moleculelor fluorescente prin reacții de cuplare

Acest obiectiv a constat în realizarea unor reacții de ciclizare utilizând ca materiale de plecare 4-bromo-1,8-naftalinanhidrida, compuși aminici și compuși cu triplă legătură activată de o grupare atrăgătoare de electroni cu acces la **noi** compuși fluorescenți derivați de triazol, care pot fi utilizați în sinteza controlată a moleculelor bioactive complexe (schema 6).



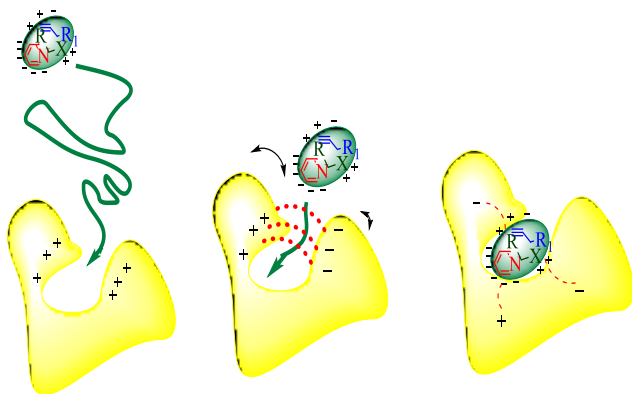
Schema 6. Reacții de cuplare cu obținere de derivați de triazol

Reacțiile tip "click" catalizate de enzime au fost realizate în **lichide ionice**, solvenți mai puțin toxici, selectivi, care nu necesită protejarea altor funcțiuni (amine, alcooli...) prezente în sintoni și conduc la produși în general puri (urmăriți prin CSS) și care nu generează decât puține deșeuri ținând cont că multe din metodele de obținere a acestor compuși necesită catalizatori metalici, precum cuprul, platina, argintul, aurul sau paladiul, timp îndelungat de reacție, solvenți toxici (Singh, 2011, Liu, 2010, Wang, 2006).

Astfel în cadrul acestui obiectiv au fost obținuți compuși noi, compuși cu proprietăți fluorescente prin reacții "one-pot" (la care participă trei componenți) utilizând cataliză enzimatică. Pentru prima dată în reacții de cicloadiție am utilizat biocatalizatori **enzime comerciale**, **microorganisme** din colecția Platformei Bioaliment a UDJ sau **enzime** de proveniență **vegetală**. Reacțiile au avut loc în **mediu apos**, la temperaturi cuprinse între **25-50°C**, reacții care s-au realizat și prin activare cu **mw** și **us**. S-a constatat că atât enzimele cât și mw sau us **cresc viteza reacției** și, în unele cazuri **crește puritatea** produșilor. Rezultatele sunt promițătoare având în vedere că reacțiile decurg în condiții blânde, în apă, cu enzime care pot fi procurate cu ușurință și care sunt materiale **regenerabile**. Avantajul utilizării biocatalizatorilor reiese din tabelul 1 în care sunt comparate două procese posibile prin care se poate realiza reacția de cicloadiție-clasic, respectiv enzimatic (**rezultate publicate în ICA, 2016, IF 1,78**).

Tabelul 1. Medii de reacție utilizate în procesul chimic versus procesul biocatalizat

Proces chimic	Proces biocatalizat „chimie verde”
acetonitril	Tampon fosfat pH=7
NMP/ Benzen	H ₂ O, enzime
metanol	Cloroform
cloroform	



Rezultatele cercetărilor efectuate pe parcursul acestei etape contribuie la elucidarea mecanismului de acțiune al biocatalizatorilor în reacții de cicloadiție. Moleculele utilizate ca substrat în reacțiile noastre sunt specii încărcate. Deși situsurile active ale enzimelor expun spații hidrofobe, câmpul electrostatic global produs de proteină cu toate grupările ei polare și încărcate poate conduce la un

Schema 8. Mecanism posibil al acțiunii biocatalizatorilor

potențial electrostatic cu o sarcină netă în regiunea situsului activ fiind posibil ca acest potențial să direcționeze substratul în situsul activ cu sarcină opusă, crescând astfel probabilitatea de a produce legatura. Căile prin care câmpul electric poate ajuta la formarea legăturilor în reactanții noștri ar putea fi ilustrate ca în figura 5 și pot fi utilizate chiar de o singură enzimă. Pentru elucidarea mecanismului de acțiune al enzimei încercăm să obținem în continuare rezultate prin studii de modelare moleculară.

O.III.1. Caracterizarea fizico-chimică a compușilor sintetizați

Toți compușii obținuți pentru prima dată în laboratorul nostru prin reacții de biocoversie au fost caracterizați prin metode spectrale, UV-Vis, fluorescență, IR, RMN și MS pentru a li se dovedi structura.

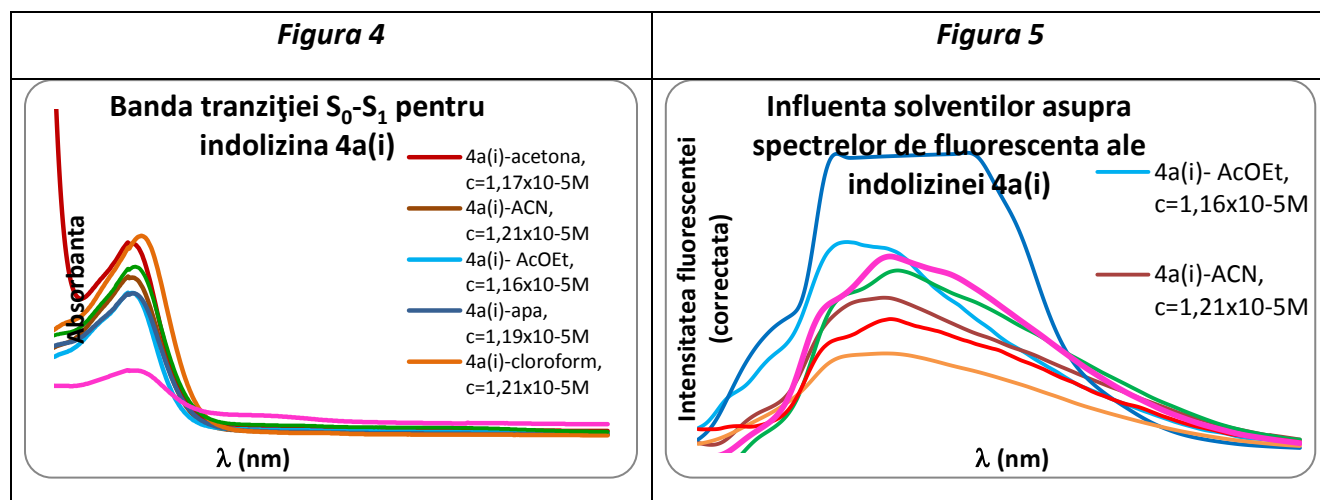
Studiul spectrelor de fluorescență

Literatura de specialitate demonstrează că spectroscopia de fluorescență este utilizată în general în domeniul științelor vieții, ca o modalitate nedistructivă de urmărire sau analizare a moleculelor biologice. Utilizarea marcajului cu fluorofori are numeroase aplicații în biologie moleculară și medicină, spre exemplu pentru investigarea transformărilor chimice dinamice și conformaționale și determinarea cantitativă a diferitelor elemente, ioni și molecule prezente în celule, lichide biologice sau alte sisteme biologice complexe (J.Chan et al, 2011) precum și în investigarea modului de acțiune al medicamentelor in vivo sau in vitro (B. Mandal, et al, 2012). Numărul de sonde de fluorescență este mare și există, de asemenea, mai multe sisteme noi disponibile, prin urmare, acum este posibil să se aleagă un fluorofor care să fie utilizat ca marker de fluorescență, care este optim pentru caracteristicile materialului de analizat. Cu toate acestea, în ciuda avantajelor inerente ale fluoroforilor, există încă multe cercetări de realizat în scopul îmbunătățirii proprietăților specifice sau eludarea anumitor limitări (M. Shigeta, 2012). Deși se cunosc markeri de fluorescență organici care includ compuși cu emisie în spectrul electromagnetic ultraviolet și infraroșu apropiat, există încă limitări pentru sondele de lungime de undă mai mari, acestea fiind de importanță deosebită pentru multe aplicații biologice (Ute Resch-Genger, 2008). Astfel, există o mare nevoie de noi fluorofori sau derivați ai fluoroforilor cunoscuți cu bună solubilitate în apă și randamentele cuantice de fluorescență mari. Cea mai mare provocare este fără îndoială proiectarea și sinteza de fluorofori care posedă aceste caracteristici. Există, desigur, cerința suplimentară ca acești compuși să includă și o grupare funcțională capabilă de legare covalentă eficientă cu diverse biomolecule.

Pentru studierea proprietăților fotoluminiscente ale moleculelor anterior sintetizate au fost înregistrate spectrele de absorbție și emisie în solvenți de diferite polarități: apă, acetat de etil, etanol 95%, dimetilformamidă, acetonitril, acetonă, cloroform. Înregistrarea tuturor spectrelor de absorbție și de emisie s-a realizat cu soluții de concentrație aproximativ constantă ($\sim 10^{-5}$ M; $\sim 10^{-6}$ M) lucrând la temperatura camerei (25°C) utilizând un spectrofotometru UV-Vis Labomed Inc. S și un spectrofotometru Perkin-Elmer.

În ceea ce privește influența solvenților asupra spectrelor de absorbție și de emisie ale compușilor sintetizați, din spectrele de absorbție înregistrate se poate observa că în toți solvenții studiați, compușii investigați prezintă un spectru continuu de absorbție, nestructurat, ceea ce sugerează o conformație neplanară a moleculelor atât în starea fundamentală cât și în starea excitată (Figura 4) în care este prezentată banda de absorbție corespunzătoare tranziției S0-S1. Se poate constata efectul batocrom al solvenților aprotici (ex. cloroform) asupra acestei benzi de absorbție.

Spectrele de emisie înregistrate în diverși solvenți, arată că maximele curbelor de fluorescență se află în domeniul albastru-verde, verde, după cum se poate vedea din tabelul 2.



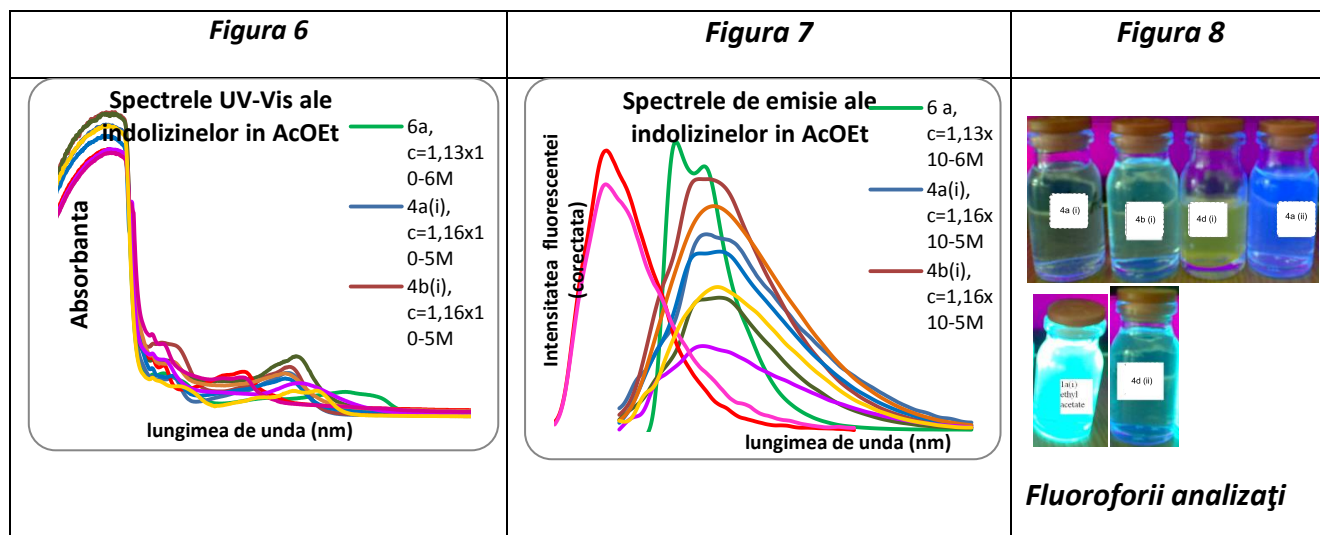
Tabelul 2. Parametrii spectrali ai compusului 4a (indolizină derivată de la bipiridil)

Compusul 4a(i)	Solvent						
	H ₂ O	AcOEt	EtOH 95%	CH ₃ CN	DMF	(CH ₃) ₂ CO	CHCl ₃
$\lambda_{max, exc.}$ (nm)	366	366	366	366	369	366	372
$\lambda_{max, em}$ (nm)	534	474	496	493	499	490	488
$I_{F, max}$	866	607	565	445	524	383	283

Forma curbelor de emisie este aproximativ aceeași, continuă și nestructurată, după cum se poate vedea din figura 5. Asupra spectrului de fluorescență, solvenții nu au o mare influență asupra lungimii de undă a maximului de emisie, dar exercită o influență mai importantă asupra intensității maximului de fluorescență. Astfel în solvenții protici fluorescența este mai ridicată decât în solvenții aprotici nepolari sau slab polari, de tipul cloroformului. Totodată, se poate constata o deplasare hipsocromă a maximului de fluorescență, în solvenți aprotici (cloroform, acetat de etil, acetona).

În ceea ce privește studiile realizate pentru determinarea influenței factorilor interni (substituenți, structură) asupra fluorescenței mono- și bis-indolizinelor, se poate constata că spectrele de absorbție au același aspect continuu, cu benzile S1 și S2 complet separate, indiferent de natura substituenților și de modul de legare al nucleelor indolizininice (Figura 6). Din spectrele de emisie înregistrate pentru soluțiile în acetat de etil ale unora din cicloaducții sintetizați, se constată puternice proprietăți fluorescente ale tuturor compuşilor indolizininici (figura 8) cu maxime ale benzii de emisie în regiunea albastru-violet (tabelul 3 și figurile 7 și 8), cea mai mare fluorescență aparținând unui cicloaduct bis-indolizinic provenit de la 4,4'-bipiridil, probabil datorită conjugării directe între inelele indolizininice.

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.



Tabelul 3. Parametrii spectrali ai compuşilor analizați

AcOEt	Compuși									
	4a(i)	4b(i)	4c(i)	4d(i)	4a(ii)	4b(ii)	4c(ii)	4d(ii)	5a	6a
$\lambda_{max, exc.} (nm)$	366	369	374	335	366	366	376	335	388	410
$\sigma\lambda_{max, em} (nm)$	474	477	483	389	467	478	481	388	468	448, 472
$I_{F, max}$	607	778	410	866	553	694	259	762	443	893 817

Totodată prezența în pozițiile 1 și/sau 3 ale nucleului indolizinic a substituenților esterici, $COOC_2H_5$ și $COOCH_3$ conduce la randamente de fluorescență ridicate și deplasări ușor hipsocrome ale maximului benzii de emisie.

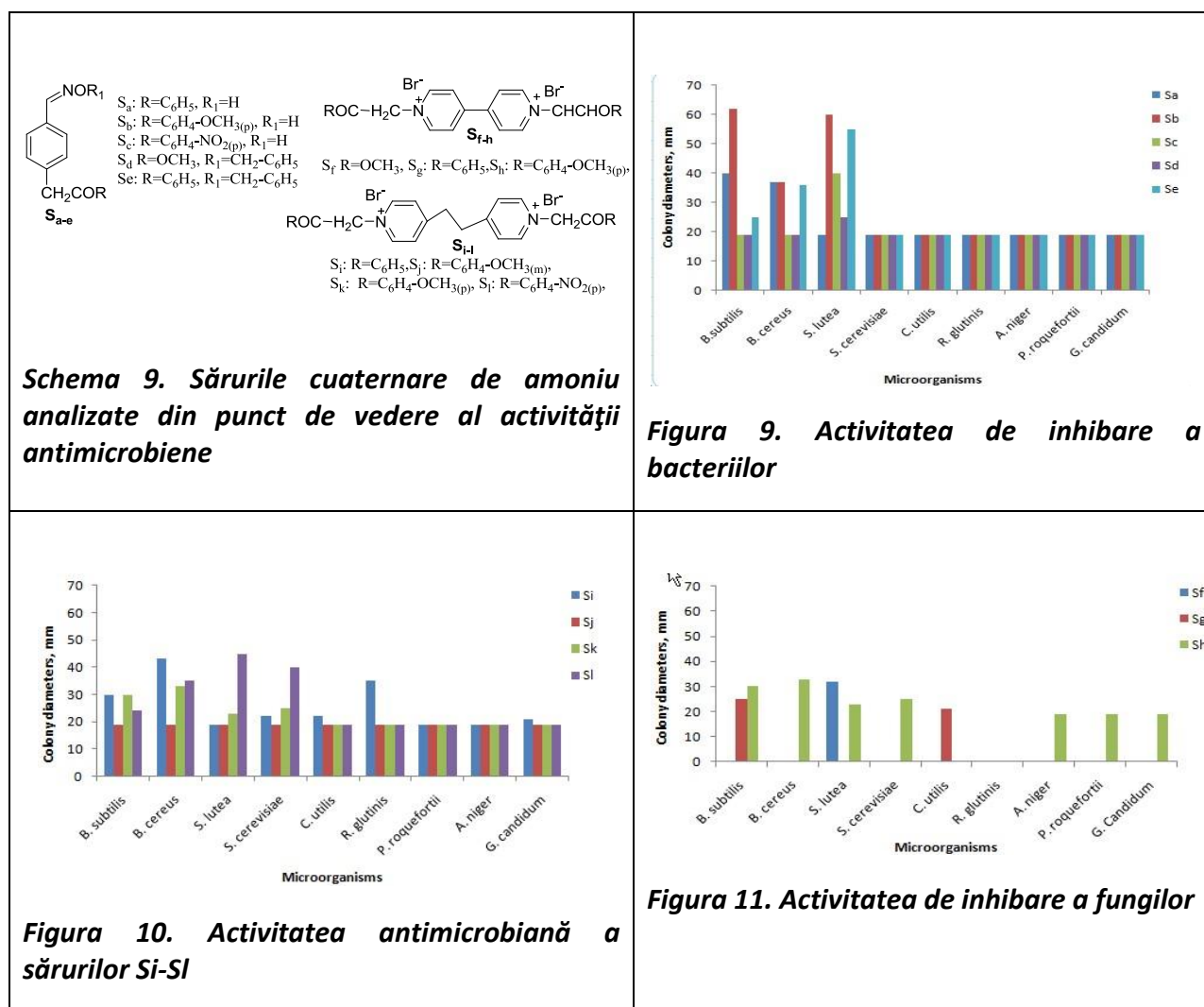
Studiile de fluorescență demonstrează puternice proprietăți fluorescente ale tuturor compuşilor analizați cu maxime ale benzii de emisie în regiunea albastru-violet. Rezultatele sunt în curs de publicare.

O.III.2. Caracterizarea biologică a compuşilor sintetizați

Analizele care s-au realizat pentru caracterizarea biologică a compuşilor obținuți au inclus : determinarea activității antimicrobiene – metoda difuziei în agar (discuri); determinarea activității antioxidante – metoda DPPH; determinarea activității antioxidante – metoda

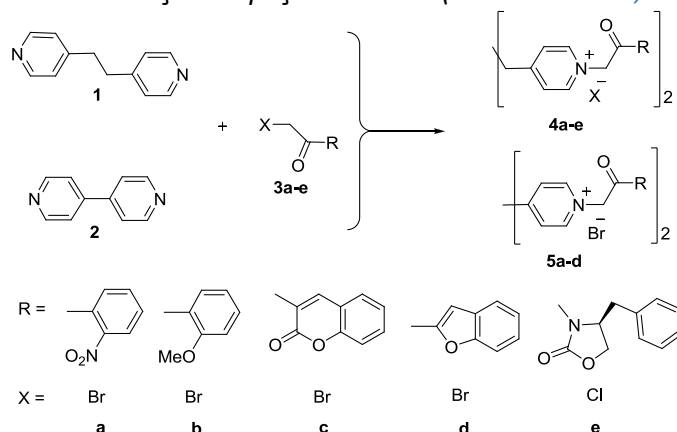
decolorării β -carotenului; determinarea activității anti-acetilcolinesterazice – metoda Ellman. Studiile s-au realizat practic cu un **Microplate reader Nanoquant Infinite Pro 200 Tecan** achiziționat în etapa a II-a a proiectului.

Pentru **analiza antimicrobiană** au fost studiate mai întâi sărurile cuaternare de amoniu substituite cu diferiți substituenți, proprietățile antibacteriene și antifungice ale unor compuși asemănători fiind cunoscute în practica industrială, medicală și cosmetică. Testele de inhibiție au utilizat metoda discurilor, de difuzie în agar și s-au realizat pe nouă tulpini microbiene din colecția MIUG. În general, sărurile cuaternare au prezentat activității antimicrobiene moderate, cele derivate de la bipiridil conducând la rezultatele cele mai slabe. **Doi dintre compuși, Sb și Se,** derivați de la piridină, **au ieșit în evidență, inhibând puternic creșterea bacteriilor** (figura 9). Alte două săruri, **Sg și Sh,** au demonstrat un **spectru larg de acțiune**, dar cu inhibare moderată (figurile 10, 11).



O altă serie de săruri cuaternare de bis-piridiniu (bis-PyQAs) conținând radicali organici diferiți (schema 10) au fost investigate pentru **activitatea** lor **antimicrobiană** asupra unor același

microorganisme nepatogene. Compușii au fost testați pe bacterii, mușcăiuri și drojdii; activitățile au fost exprimate prin concentrațiile minime inhibitorii (CMI)(Tab.4). Ulterior a fost analizată relația dintre descriptorii structurali (LogP, polarizabilitate, aria suprafeței polare (2D) și aria suprafeței Van der Waals (3D)) și activitatea biologică a compușilor bis-PyQAs din schema 10 de mai jos. Datele din literatură arată că determinarea acestor descriptorii pot contribui la prezicerea citotoxicității compușilor chimici (J. Ranke et al, 2007).



Schema 10. Obținerea compușilor testați

Compușii 4a-d, 5a și 5d indică proprietăți inhibitorii eficiente cel puțin împotriva unei tulpini bacteriene. Cu toate acestea, una din cele mai active bis-PyQAs a fost compusul 5b, cu un spectru larg de activitate(Tab.4). În studiile noastre proprietățile antibacteriene par să se coreleze bine cu descriptorii structurali LogP și valorile pentru zona de suprafață polară și van der Waals (Tab.5). Toți compușii analizați au demonstrat o activitate antibacteriană semnificativă in vitro împotriva tulpinilor bacteriene, compușii 4b și 5b având activitate antimicrobiană superioară împotriva tuturor microorganismelor care fac obiectul studiului.

Tabelul 4 Diametrul zonelor de inhibiție (Diz), exprimat în mm, pentru compușii bis-PyQAs -4a- d și 5a-d

Compuși testați MO	DIZ (mm)								
	4a	4b	4c	4d	5a	5b	5c	5d	H2O
<i>B. subtilis</i>	35.00±0.57	30.33±0.33	19.16±0.16	40.83±0.44	41.33±0.33	45.00±0.57	19.83±0.44	25.33±0.33	0
<i>B. cereus</i>	41.66±0.33	43.00±0.57	19.33±0.33	37.33±0.33	35.50±0.28	50.50±0.28	19.50±0.28	21.16±0.16	0
<i>S. lutea</i>	22.33±0.33	19.50±0.28	41.00±0.57	19.50±0.28	46.00±0.57	45.33±0.33	21.50±0.28	41.50±0.28	0
<i>S. cerevisiae</i>	22.00±0.57	22.66±0.66	19.66±0.66	19.16±0.16	19.50±0.28	23.16±0.16	19.33±0.16	19.33±0.33	0
<i>C. utilis</i>	22.66±0.66	22.50±0.28	19.33±0.33	19.33±0.33	19.16±0.16	22.66±0.66	19.33±0.33	19.16±0.16	0
<i>R. glutinis</i>	40.33±0.33	35.33±0.33	19.50±0.28	19.83±0.44	19.66±0.33	53.50±0.28	19.50±0.28	19.50±0.50	0
<i>A. niger</i>	19.66±0.66	19.33±0.33	19.83±0.44	19.33±0.33	19.33±0.33	32.33±0.33	19.33±0.33	19.16±0.16	0
<i>P. roquefortii</i>	19.50±0.28	19.16±0.16	19.16±0.16	19.16±0.16	19.16±0.16	19.16±0.16	19.16±0.16	19.50±0.28	0
<i>G. candidum</i>	20.00±0.57	21.66±0.66	19.33±0.33	19.33±0.16	19.33±0.33	33.16±0.16	19.16±0.16	19.33±0.33	0

Valorile sunt prezentate ca medie±SEM. Diametrul discului de hârtie-19 mm

Studiile noastre preliminare arată că unele dintre aceste săruri sunt, de asemenea, capabile să distrugă formarea biofilmelor formate de microorganisme din industria alimentară (rezultate publicate în [Molecules](#), 2013).

Tabelul 5. Proprietăți fizico-chimice ale sărurilor sintetizate

Comp.	M.p. (°C)	LogP	Aria suprafeței polare (2D)	Aria suprafeței Van der Waals (3D)	Polarizabilitate	Hidrofobicitate (RM)
4a	>250	-3.4	133.5	711.4	52.5	2.091±0.027
4b	241-243	-3.6	60.3	730.7	53.6	2.325±0.014
4c	>300	-3.0	94.5	732.4	59.5	2.122±0.047
4d	>300	-3.2	68.2	707.4	57.6	1.938±0.023
4e	nd	-3.0	100.9	888.2	65.9	
5a	258-259	-4.3	133.5	652.1	50.3	1.739±0.035
5b	252-253	-4.5	60.3	667.1	51.6	2.142±0.024
5c	>300	-3.9	94.5	671.0	57.3	1.917±0.049
5d	301-302	-4.1	68.2	646.0	55.4	2.092±0.023

LogP, Ariile suprafețelor polare și van der Waals și polarizabilitatea au fost calculate folosind MarvinSketch 6.0.2 (<http://www.chemaxon.com>). Valorile RM sunt prezentate ca medie ± SEM

Studiul activității antimicrobiene a compușilor heterociclici obținuți prin reacții de biocataliză s-a realizat și prin determinarea **activității biologice asupra unor microorganisme patogene prin metoda difuzimetrică și testul viabilității celulare, MTT.**

În acest context, sunt prezentate rezultatele obținute la testarea sărurilor cuaternare de amoniu acestea fiind una dintre cele mai utilizate clase de dezinfectanți, cu largă aplicabilitate în mediile spitalicești, tratarea apelor, textile, vopseluri și industria alimentară datorită toxicității relativ reduse pentru oameni și animale.

Compușii analizați au dovedit activitate antimicrobiană intensă față de *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp.; efectul antimicrobian este intensificat de prezența grupărilor nitrofuranice și de prezența halogenilor în moleculă; s-au obținut valori relativ mici ale CMI (31,25 μg/mL). Cea mai intensă activitate a compușilor a fost împotriva *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., și *E. coli*, respectiv cea mai slabă fiind împotriva *Candida albicans*. Importanți sunt compușii ale căror CMI pentru *Stafilococ* și *Streptococ* sunt foarte mici (≤ 250 μg/mL) pot fi de interes terapeutic.

Datele privind viabilitatea celulară au fost mult timp obținute din testele de citotoxicitate in vitro ([Manish Raj Pandey et al, 2014](#)). Sensibilitatea, rapiditatea, și costul redus al acestei metode o recomandă ca una dintre cele mai utilizate teste în acest scop. Studiul viabilității celulare a fost evaluată pe o bacterie patogenă, *Escherichia coli* utilizând MTT. După tratarea celulelor cu compușii chimici mai multe perioade de timp (0, 2, 4, 24 h), mediul de cultură a fost îndepărtat și celulele au fost tratate cu soluție 1mg/mL MTT când inelul tetrazolic este redus de succinat dehidrogenaza mitocondrială la un precipitat violet care s-a determinat spectrofotometric în intervalul 490-600 nm, cu un cititor de microplăci Tecan 900 Pro. Metoda MTT a arătat că, în urma tratamentului cu compușii testați, a fost inhibată activitatea mitocondrială a celulelor de *Escherichia coli* mai ales la compușii conținând grupări funcționale metoxi și nitro (**rezultate publicate în [J. Biotechnology](#), 2015, IF 3,108**).

Activitatea antioxidantă, cuantificată prin două metode și activitatea anti-acetilcolinesterazică, au fost realizate pentru 28 de compuși organici obținuți în etapele anterioare rezultatele fiind comparate cu activitatea antioxidantă a unor compuși de referință cunoscuți pentru activitatea biologică analizată (rutina, BHA și vitamina C pentru activitatea antioxidantă). **Rezultatele sunt în curs de publicare.**

Determinarea activității antioxidante prin metoda reducerii radicalului liber DPPH a necesitat prelucrarea a 744 de probe, fiind analizate șase concentrații ale fiecărui compus la patru intervale de timp.

În urma analizei activității antioxidante a unor **săruri cuaternare de amoniu** preparate prin metode de activare neconvenționale, s-au detașat net **doi compuși cu activitate antioxidantă foarte bună**, cu IC 50 sub 20 μg/mL (Sg, Si), și un compus cu IC 50 puțin peste 20 μg/mL(Sh) dar cu o viteză de reducere foarte bună.

Activitatea antioxidantă a **compușilor indolizini determinată** prin această metodă a indicat că indolizina **Ik are IC 50 sub 20 μg/mL** și o **viteza de reducere mare**, la 40 μg/mL prezentând o activitate antioxidantă de aproape 52% după numai 5 minute de reacție.

Determinarea activității antioxidante prin metoda decolorării β-carotenului a necesitat prelucrarea a 1860 de probe, fiind analizate șase concentrații ale fiecărui compus la 10 intervale de timp. Dintre **sărurile cuaternare de amoniu**, cea mai bună activitate antioxidantă prin metoda decolorării β-carotenului a fost aceea a unei săruri derivate de la piridină, **Se** aceasta fiind de **85%** după 180 de minute, la 40 μg/mL.

S-au remarcat **doi compuși, cu activități antioxidante superioare substanțelor de referință analizate** (rutina, BHA și vitamina C). Astfel, două indolizine, indolizina Im și indolizia Ip au prezentat o foarte bună stabilitate în timp obținându-se valori ale activității antioxidante de 91% respectiv 89%, la concentrația minimă analizată, după 180 de minute .

În urma studiilor biologice efectuate s-a dovedit **activitatea biologică remarcabilă** a unora dintre compușii sintetizați prin reacții enzimaticе. **O sare cuaternară** derivată de la piridina, Se, a avut **cea mai bună activitate antioxidantă** prin metoda decolorării β-carotenului dintre toți compușii analizați. Dintre sărurile derivate de la bipiridil au ieșit în evidență doi compuși, Sg și Sh, cu rezultate foarte bune împotriva radicalului liber DPPH dar și de inhibare a acetilcolinesterazei. Compusul **Si** a demonstrat o foarte bună activitate antioxidantă prin metoda cu DPPH, iar în testele **antimicrobiene** s-a dovedit a fi un **compus cu spectru larg de acțiune**. Trei dintre derivații indolizini au condus la rezultate deosebite, fiind cei mai activi compuși care s-au opus decolorării β-carotenului (**rezultate în curs de publicare**).

O.IV.1. Caracterizarea biologică a compușilor sintetizați

Studii de toxicitate si citotoxicitate

Cercetările actuale demonstrează că **sărurile cuaternare de piridiniu**, precum și **sărurile biscuaternare** au numeroase proprietăți antibacteriene cu spectru larg, inclusiv împotriva unor tulpini de Staphylococcus aureus rezistente la meticilină sau Enterococcus faecalis rezistente la

vancomicină (Pernak et al., 2001, Chanawanno et al., 2010). Funcțiile oximă grefate pe aceste săruri generează proprietăți importante în tratarea intoxicărilor cu fosfați organici, dar și antibiotică (Lorke, 2008). O serie de bispiridiniu-oxime au o foarte bună activitate de reactivare a acetilcolinesterazei inhibitate de sarin și paraoxon (Acharya et al., 2011, Bharate et al., 2009). O altă aplicație interesantă a acestui tip de compuși este generată de capacitatea lor de a hidroliza ADN-ul, acționând ca nucleaze artificiale, putând deveni astfel instrumente utile în biotehnologie, în terapia genică sau în chimioterapie (Fernandes et al., 2008).

Clasa compușilor **indolizini** prezintă un interes deosebit datorită proprietăților fluorescente dar și a activității biologice. Astfel, unele indolizine au activitate antiinflamatorie, antivirală, antioxidantă, fiind vizate pentru a trata cancerul, bolile cardiovasculare și infecțiile cu virusul HIV (Shen et al., 2010). Studiile arată de asemenea că derivații indolizini manifestă citotoxicitate împotriva liniilor de celule canceroase rezistente la antibiotice (David A. James et al., 2008). Derivații de **triazol** obținuți prin **reacții tip “click chemistry”** sunt mai mult decât linkeri pasivi, ei se asociază cu ușurință probelor biologice prin legături de hidrogen și interacțiuni dipolare (B. S. Sekhon, et al., 2012).

Având în vedere cercetările de actualitate, am continuat studiul activității biologice a compușilor intermediari și finali ai reacțiilor biocatalizate (realizate în etapele anterioare), săruri cuaternare de piridiniu, indolizine și triazoli, studii care s-au desfășurat pe următoarele direcții:

- i. studiul toxicității compușilor utilizați în biocataliză asupra mai multor microorganisme;
- ii. studii de citotoxicitate efectuate pe *Saccharomyces cerevisiae*;
- iii. studiul toxicității compușilor asupra germinării plantelor

Testele de toxicitate realizate de noi au constatat în utilizarea unor metode preluate din literatura de specialitate, sensibile, ieftine și precise cu ajutorul cărora se poate evalua toxicitatea și citotoxicitatea și / sau efectele citostatice ale diversilor compuși chimici.

i. Studiul toxicității compușilor intermediari (utilizați în sinteza biocatalizată) a constatat în evaluarea gradului de toxicitate a reactanților unei reacții-model (derivat piridinic, derivat halogenat reactiv și, propiolat de etil) asupra unor tulpini de **bacterii, drojdii și mucegaiuri** (*C. robusta* MIUG 3.2, *C. robusta* MIUG 3.3, *C. tropicalis* MIUG 3.4, *C. utilis* MIUG 3.5, *Saccharomyces cerevisiae* MIUG 3.6, *Yarrowia lipolytica* RD 14 MIUG, *Yarrowia lipolytica* RD 15 MIUG, *Yarrowia lipolytica* RD 16 MIUG, *Saccharomycopsis fibuligera*), aparținând colecției de microorganisme din cadrul Platformei „Bioaliment” a Universității „Dunărea de Jos” Galați, având indicativul MIUG. În cadrul procesului de selecție a microorganismelor din colecția MIUG au fost analizate probe rezultate în urma incubării a 21 de microorganisme timp de 5 zile în prezența a patru concentrații diferite de substanțe chimice (0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM). Dintre tulpinile testate s-au evidențiat trei tulpini de drojdii, una de mucegai și o bacterie. Concentrația de 1,5 mM este cea optimă pentru reacțiile biocatalizate. Astfel, tulpinile ***Yarrowia lipolytica* RD13 MIUG, *Yarrowia lipolytica* RD14 MIUG, *Yarrowia lipolytica* RD15 MIUG, *Geothricum candidum* MIUG 27** respectiv ***Pseudomonas fluorescens* MIUG MP11** au fost selectate ca fiind rezistente la compușii testați, și ca biocatalizatori ai reacțiilor tip “clik-chemistry”, de formare a compușilor heterociclici cu azot, în mediu apos neutru (rezultate publicate în [J. Biotech, 2015, IF 3,108 și Scientific Study & Research, Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, 2016](#)).

ii. Studii de citotoxicitate efectuate pe *Saccharomyces cerevisiae*

Modelele biologice au fost mult timp folosite pentru a stabili citotoxicitatea și activitatea citostatică a multor compuși chimici naturali și/sau sintetici. Tehnicile de analiză actuale,

necesită de obicei utilizarea de reactivi chimici sau echipamente tehnologice costisitoare sau le lipsește sensibilitatea de testare adecvată.

Scopul nostru a fost de a evalua citotoxicitatea indusă de compușii sintetizați prin teste de supraviețuire pe *Saccharomyces cerevisiae*, un microorganism care prezintă mai multe caracteristici genetice și biochimice similare cu celulele umane (T. S. Gonçalves et al, 2014, N. P. Poletto et al, 2008). Aceasta a fost utilizată pe scară largă ca organism model pentru studiul bolilor la mamifere și evaluarea compușilor toxici, cum ar fi agenți genotoxici și citotoxici (Armour CD et al, 2005).

Au fost evaluate trei grupe de compuși: săruri cuaternare de piridiniu, derivați indolizini și triazolici.

În studiu s-a utilizat o cultură pură de *Saccharomyces cerevisiae* MIUG D 27. Aceasta se repică pe mediu de cultură must de malț agar (MMA) înclinat și se incubează la 25°C, cu 48 de ore înainte de prepararea inoculului. După 24 și 48 de ore de cultivare se prelevează probe pentru evaluarea gradului de înmugurire și gradului de autoliză prin numărare directă cu camera Thoma.

Creșterea coloniilor de celule de drojdie a fost măsurată în mediu de cultură conținând concentrații crescătoare din agenții chimici. Rezultatele au arătat că testul a fost capabil să diferențieze în mod clar efectul citotoxic al compușilor, urmând o curbă exponențială cu concentrații crescătoare.

Gradul de autoliză se determină raportând numărul de celule autolizate la numărul total de celule dintr-un câmp microscopic, realizându-se numărarea din 10 câmpuri. În cazul indolizinelor, rezultatele obținute sunt remarcabile. La concentrație maximă gradul de autoliză a fost comparabil cu acela determinat în absența compușilor, iar la concentrația minimă testată, 10^{-6} M, s-au identificat cu aproximativ 60% mai puține celule autolizate decât în cazul probelor martor.

Adăugând 1 μ mol indolizină /L mediu de cultură se obține un grad de autoliză al celulelor de 13,88%, mai scăzut decât acela determinat în condiții normale, de 23,09% după 96 ore de cultivare submersă.

În cazul sării cuaternare derivată dela piridină, adăugarea a 0,3 mg compus/L mediu de cultură conduce la scăderea gradului de autoliză față de proba martor, până la o valoare de aproximativ 12%.

Gradul de înmugurire se determină raportând numărul de celule înmugurite la numărul total de celule dintr-un câmp microscopic, realizându-se numărarea din 10 câmpuri.

După primele 24 de ore de cultivare, gradul de înmugurire din probele martor are valori comparabile cu cel al probelor suplimentate cu indolizină. După 48 de ore de cultivare, valoarea gradului de înmugurire în prezența unei concentrații de 10^{-5} M depășește 24%.

În cazul indolizinei derivată de la bipiridil (bpy), la concentrația minimă utilizată în cadrul acestui experiment se constată un grad de înmugurire a celulelor mai scăzut decât în probele martor, cu 20% mai mic după 48 de ore de cultivare submersă.

La concentrația maximă testată, prezența sării derivată de la piridină a produs înmugurirea a peste 20% din celulele de drojdie, în timp ce concentrația de 10^{-6} M în mediul de cultură a condus la valori comparabile cu acelea ale probelor martor, după 48 de ore de cultivare submersă.

iii. Studiul toxicității compușilor asupra germinării plantelor

Impactul diferitelor tipuri de compuși asupra plantelor superioare a fost intens studiat (Hong și Otaki, 2006; Lin și colab., 2009; Seeger și colab., 2009). Atunci când sunt în creștere, plantele absorb cantități relativ mari de elemente esențiale și neesențiale, care la anumite concentrații pot fi toxice. Grâul este o cultură importantă pentru alimentația umană în întreaga lume și este considerat a fi un model pentru speciile monocotiledonate pentru cercetări în biologia moleculară.

Pentru a testa efectul compușilor sintetizați prin biocataliză (săruricuaternare de piridiniu, indolizine și triazoli) asupra germinării semințelor de grâu, experimentul a fost efectuat în condiții de laborator, folosind semințe de grâu achiziționate de la o piață locală din Galați. Semințele sănătoase au fost selectate și se sterilizează la suprafață cu soluție 10% hipoclorit de sodiu timp de 10 min, apoi sunt puternic clătite cu apă distilată sterilizată înainte de a se transfera în vase Petri având un strat dublu de hârtie de filtru. S-au folosit 100 de boabe de grâu pentru fiecare placă Petri, alegându-se doar boabele cu cariopsa intactă. După 4 zile de germinare se numără boabele negerminate, se numără plumulele boabelor germinate și se măsoară înălțimea plumulelor pentru a calcula înălțimea medie.

Germinarea boabelor de grâu în prezența compușilor indoliziniici derivați de la bpy și bpe a condus la o înălțime a plumulelor cel puțin egală cu a acelor din probele martor, chiar și în cazul concentrației superioare analizate. În cazul unor compuși, 54% din boabe au prezentat plumule după 4 zile de cultivare, față de 40% în probele martor.

În urma efectuării acestui experiment, s-a constatat că doi dintre compușii testați scad sensibilitatea la apă a boabelor de grâu. Se constată că adăugarea unei concentrații mai mari de compus are un efect benefic. O concentrație de 10^{-5} M a unor compuși conduce la o scădere a procentului de boabe negerminate cu 75% față de probele martor. Pentru a avansa studiile de citotoxicitate și a realiza teste pe mamifere (șoareci de laborator) s-au realizat și studii avansate de cristalizare a proteinelor (lizozim) utilizate ulterior ca material de încapsulare pentru compușii obținuți în cadrul proiectului cu scopul de a realiza studii farmacologice.

Pentru prima dată au fost realizate studii toxicologice și citologice pe microorganisme eucariote model cum este drojdia *Saccharomyces cerevisiae*. În urma studiilor efectuate s-a dovedit activitatea biologică remarcabilă a unora dintre compușii sintetizați prin reacții de biocataliză (rezultate în curs de publicare).

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 hibridilor 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 (S. U. Rehman et al., 2014).

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, M. Sirajuddin et al., 2013; S. U. Rehman et al., 2015).

În cercetarea noastră am studiat comportamentul fotofizic al compușilor sintetizați și s-au căutat soluții pentru a obține derivați cu proprietăți îmbunătățite și excepționale (figura 12). Datorită fluorescenței caracteristice, derivații indolizini și triazolici au fost utilizați ca senzori fotochimici, senzori de legături de hidrogen și sonde fluorescente sensibile (M. Becuwe et al., 2011, B. C. Ghosh et al., 2011, M. K. Bayazit et al., 2014). Indolizinele au fost utilizate pentru a studia interacția cu ADN-ul și ca pigmenți fotochimici (Dinică et al., 1999, Furdui et al., 2007).

Cercetările privind studiul interacției acizilor nucleici cu diverse molecule biologic 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).

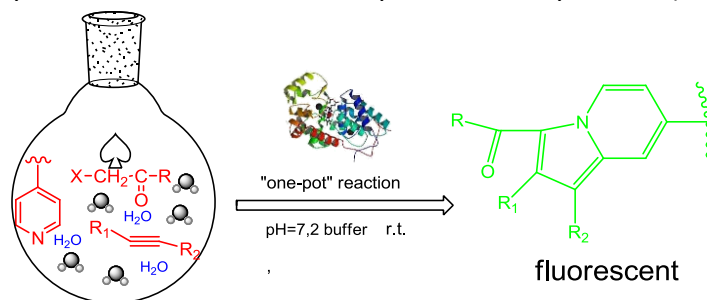
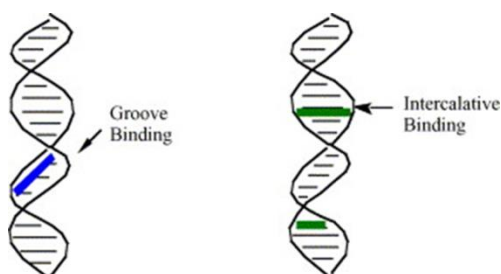


Figura 12. Sinteza indolizinelor

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. 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.



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 indolizine derivate de la 4,4'-bipiridil și de la bispiridiletan.

Soluțiile stoc de indolizine au fost preparate prin dizolvarea unei cantități corespunzătoare de compus în tampon Tris-HCl, pH 7,6.

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 Reader. Determinările s-au realizat la 24°C, iar concentrația pigmentului s-a situat între 2 și 20 μM , în funcție de experiment.



Figura 13. 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.

Determinarea concentrației 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.

Determinarea concentrației acizilor nucleici s-a făcut utilizând același echipament 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. 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 de ADN în cantități progresive, în condiții fiziologice.

Spectrele de absorbție ale soluțiilor ADN-indolizine sunt prezentate în figurile 14,15 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 (R.Hajian et al., 2013).

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

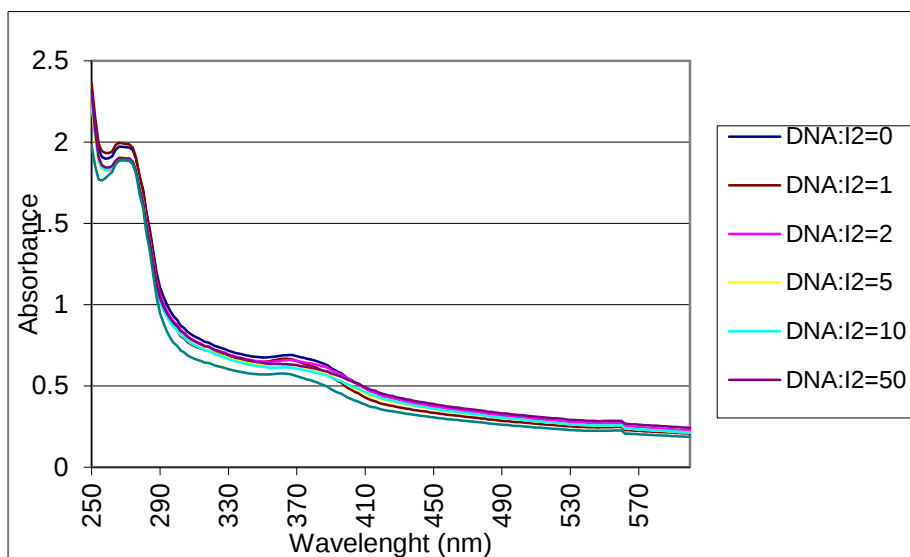
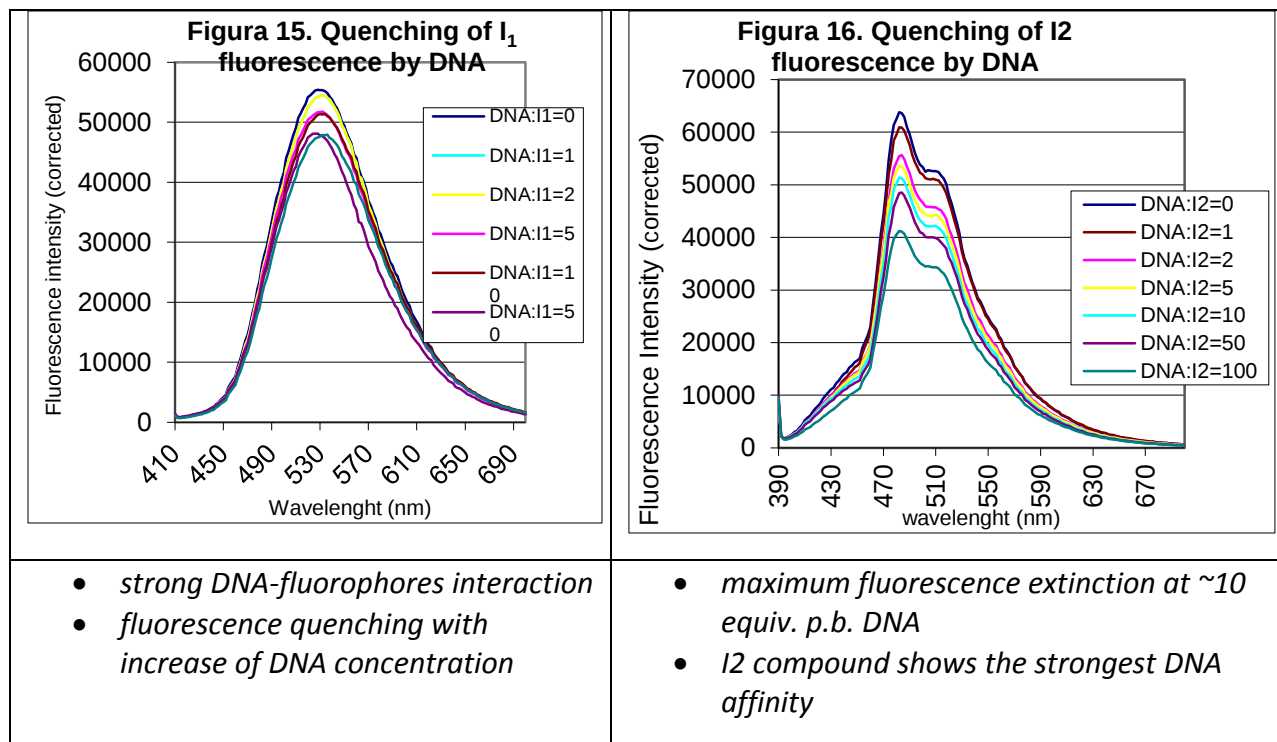


Figure 14 Spectrele de absorbție pentru indolizina I2 în absența și prezența cantităților crescătoare de ADN

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 cu ADN-ul. Modul de legare al compușilor cu ADN-ul s-a evaluat prin spectroscopie de fluorescență, prin menținerea constantă a concentrației compușilor (ex. 10^{-5}M) și varierea concentrației de ADN. Spectrele de fluorescență au fost astfel înregistrate la diverse rapoarte molare ADN: indolizină, excitarea probelor realizându-se la maximul 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), prezentată în figurile 15, 16 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 (rezultate în curs de publicare).

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 fosfat ale catenei ADN având ca rezultat 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). Figura 17 demonstrează că indolizinele interacționează cu acizii nucleici, acest lucru conducând la scăderea absorbantei și emisiei la concentrații diferite de indolizină.

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.

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 absorbantei și emisiei la concentrații diferite de indolizină (figurile 17,18).

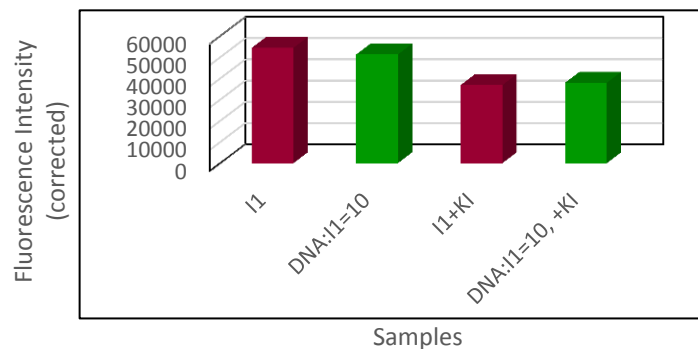


Figura 17. Evaluarea stingerii fluorescenței cu KI pentru indolizina I1 si indolizina-ADN

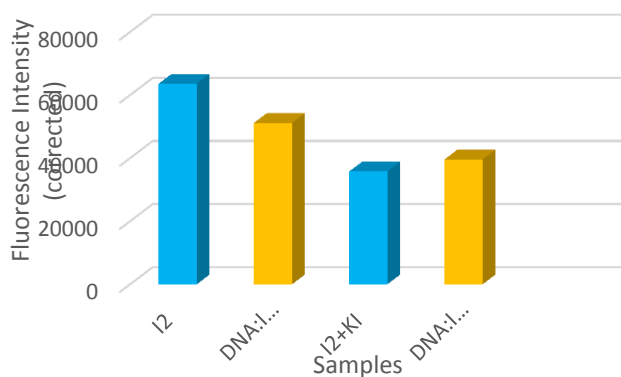


Figura 18. Evaluarea stingerii fluorescenței cu KI pentru indolizina I2 si indolizina-ADN

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

Spectroscopia cu transformata Fourier în infraroșu (FT-IR), își găsește importante aplicații în domeniul științelor biologice. Amprenta moleculară a ADN-ului pur se află în regiunea spectrală de $1800-700\text{ cm}^{-1}$ datorită vibrațiilor în planuri diferite ale bazelor azotate, vibrațiilor de întindere (asimetrice și simetrice) ale grupărilor fosfat și vibrațiilor de întindere ale deoxiribozei. Legarea moleculelor mici de pentozo- 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).

Figurile 19 și 20 prezintă spectrele FT-IR de ADN din timus de vițel în absența și în prezența indolizinelor I1 și I2.

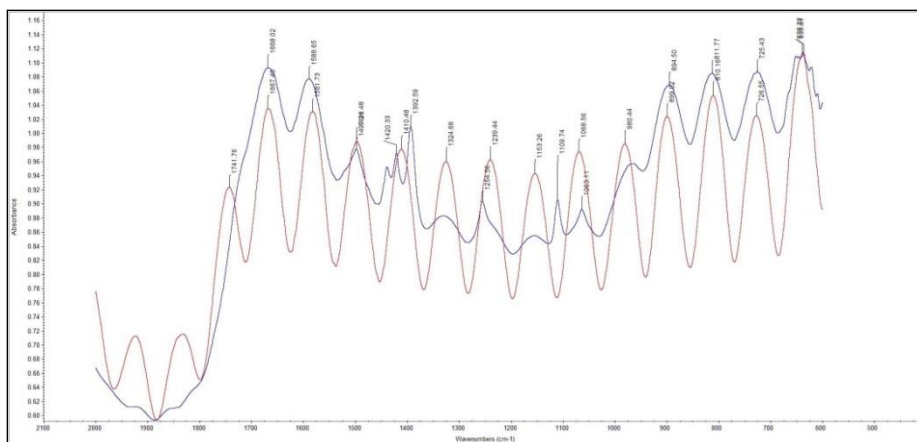


Figura 19. Spectrele FT-IR: ADN și ADN-indolizina 1

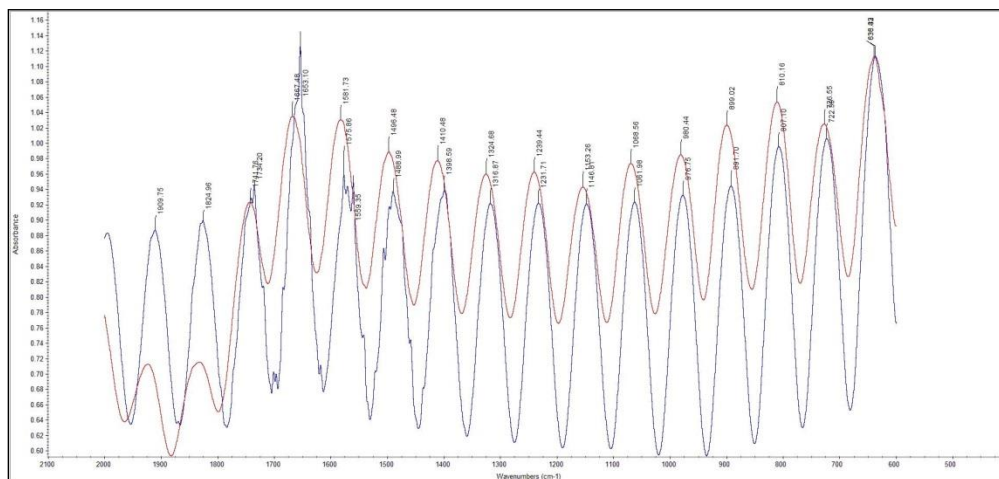
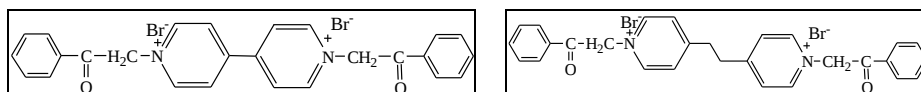


Figura 20. Spectrele FT-IR: ADN și ADN-indolizina 2

Legarea moleculelor analizate de bazele ADN este demonstrată prin evaluarea benzilor spectrale la 1741 cm^{-1} , care sunt atribuite 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) (**rezultate în curs de publicare**).

O.IV.2 Studiul proprietăților electrochimice

Viologenii prezintă un interes semnificativ, datorită modificării proprietăților și culorii acestora în funcție de mediul de reacție. În cadrul acestui studiu, s-a determinat pentru prima dată comportamentul electrochimic a două săruri cuaternare de piridiniu (intermediari în reacții de cicoladiție), prin voltametrie ciclică în mediu apos. 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.



Schema 11. Structura sărurilor de bipyridiniu, Lr și Lm

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.

Elucidarea schimburilor electronice ale compușilor obținuți este utilă pentru investigarea electrochimică (R. Palin et al., 2002). Compușii pot fi utilizați ca indicatori redox biologici, senzori electrochimici, transportori de electroni și precursori pentru compuși cu structură indolizinică, compuși bioactivi ce pot fi utilizați ca markeri și liganzi fluorescenți pentru receptorii de estrogen (M. Eda et al., 2008, D. H. Evans et al., 2001). Direcții viitoare de cercetare includ elucidarea mecanismelor de cicloadiție și substituție în mediu apos.

Studiul stabilității liganzilor

Compușii sintetizați au fost **dibromura de N,N' di-(p-bromofenacil)-4,4'-bipyridiniu** (numită ligand rigid-Lr) și **dibromura de N,N' di-(p-bromofenacil)-1,2-bis(4-piridiniu)-etan** (numită ligand flexibil-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 (λ_{max}) (Furdui et al., 2012), pentru a le studia stabilitatea inițial și după 24 ore (Figura 21). Cea mai mare valoare a absorbanței 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 pH 8). Ligandul Lm este mai stabil la pH slab acid (aproximativ pH 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 AH₂ la AH⁻.

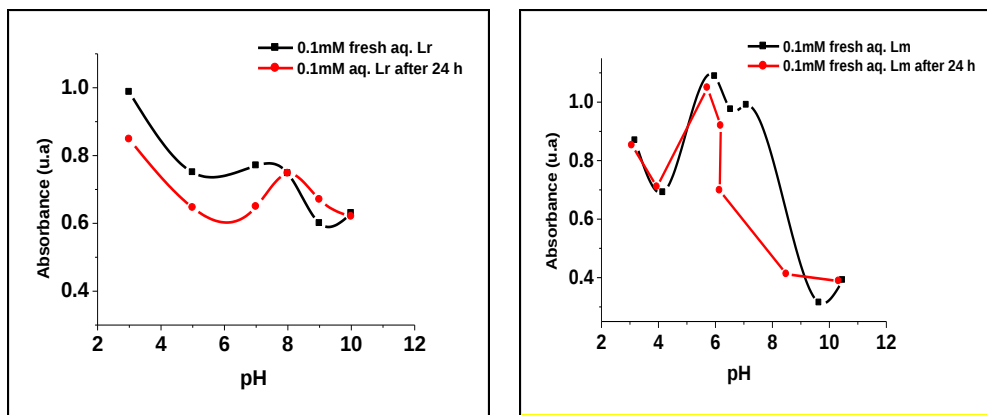


Figura 21. Modificarea absorbanței cu pH-ul la soluțiile apoase ale Lr și Lm

După 24 de ore la temperatura camerei se constată o ușoară modificare a absorbanței 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 ($AH^{+•}$). și ulterior a speciei neutre. În același timp, Lm prezintă stabilitate în mediu acid, până la pH 6, dar o evidentă scădere a valorii absorbanței 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.

Valorile OCP sunt corelate cu structurile prezentate în schema 11 și explică stabilitatea acestora, confirmată de determinări spectrofotochimice. Rezultatele obținute contribuie la explicarea mecanismului de electro-oxidare propus dar sunt date 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 N-heterociclorilor în mediu apos, la diferite valori ale pH-ului și ale potențialului aplicat.

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 în soluțiile apoase, în funcție de pH (figurile 22 și 23). Alura acestora poate explica influența grupărilor funcționale din molecula ligandului, corelate cu stabilitatea acestora în timp, în funcție de pH.

Ambele săruri cuaternare înregistrează un comportament similar la desfășurarea procesului redox pe electrod de platină, ceea ce indică prezența a cel puțin unui cuplu prototropic (AH^{2-}/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 μA și la un potențial mai puțin pozitiv.

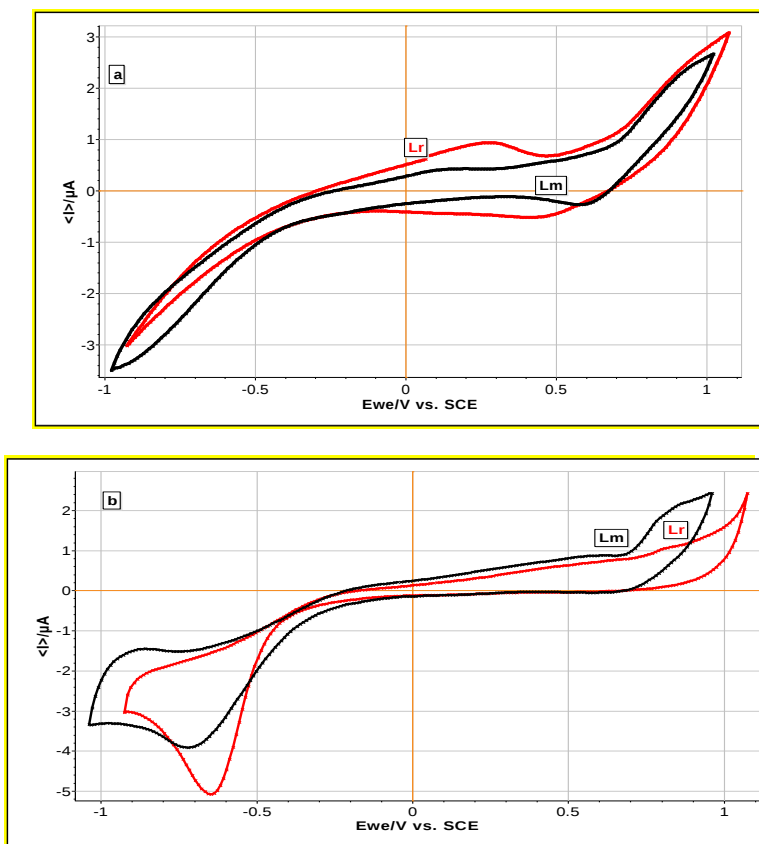


Figura 22. Voltamograme ciclice a soluțiilor apoase ale Lr și Lm – soluțiile proaspăt preparate la pH inițial (a) și la pH 12 (b); $E = \pm 1.0$ V vs. SCE, din direcție negativă. Viteză de scanare 100 mV s⁻¹(a), 50 mV s⁻¹(b).

Se observă un peak anodic corespunzător oxidării Lr la radicalul anion corespunzător, proces ireversibil datorită reactivității mari. Prin determinări de tipul CV se poate identifica existența mai multor schimburi redox, realizate de noii compuși. Apa este acceptorul de proton, sarcina pozitivă este delocalizată la nivelul primului strat de molecule de apă format în jurul sării de piridiniu. În mediu alcalin (pH 9), Lr prezintă un proces de reducere evident, spre deosebire de comportamentul în mediul acid și neutru (figura 23a). Viteza de scanare rămâne un parametru important al acestor procese de transfer de electroni (Figura 23b). 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 deprotonat (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 datorită nucleului piridinic, prin adsorbție pe substratul de platină.

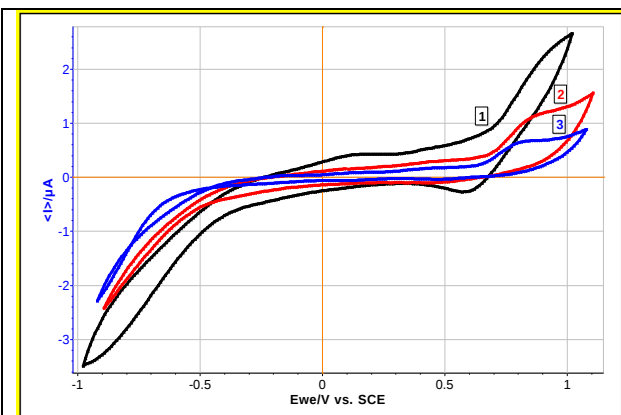


Figura 23a. Voltamograme ciclice ale soluției apoase Lm proaspăt preparată (pH 5,5), la viteze diferite de scanare: 100 mV s⁻¹(1); 50 mV s⁻¹(2) și 20 mV s⁻¹(3), E = ± 1.0 V

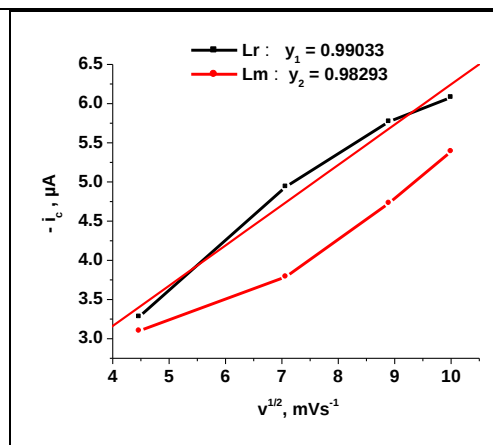


Figura 23b. Distribuția curentului catodic în funcție de rădăcina pătrată a vitezei de scanare

Efectul vitezei de scanare a potențialului. Pentru soluțiile apoase ale celor două săruri s-au înregistrat voltamograme ciclice cu electrod de platină la diferite rate de scanare (100 – 20 mV s⁻¹) pentru E = ± 1 V. Nu s-au observat deplasări semnificative ale potențialului redox la creșterea vitezei de scanare de la 20 la 100 mV•s⁻¹ pentru Lr la pH 6. 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 electric (Furdui et al, 2012).

Poziția peak-ului catodic obținut la 100 mV s⁻¹ corespunde transformărilor redox de la potențialul (E_{pc}) de +350 mV pentru Lr la +600 mV pentru Lm (Figura 23a). Un studiu comparativ al soluțiilor alcaline ale liganzilor prezintă comportamentul diferit al acestora (Tabel 6).

Tabel 6. Parametri electrochimici și viteza de scanare a potențialului aplicat soluțiilor apoase ale sărurilor cuaternare de amoniu (pH 9)

scan rate (mV•s ⁻¹)	- E _{pc} (mV vs SCE)		- i _c (μA)		E _{pa} (mV vs SCE)		i _a (μA)	
	Lr	Lm	Lr	Lm	Lr	Lm	Lr	Lm
100	670	901	6.08	5.39	910	876	2.85	2.35
80	652	886	5.65	4.73	880	780	2.54	2.27
50	647	874	4.94	3.79	790	760	1.66	2.15
20	613	818	3.28	3.10	690	660	1.45	1.87

Ambele săruri studiate 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 23b).

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 guvernat de legea lui Fick (A. M. O. Brett et al., 2003). Așadar, în procesul de transfer de electroni și protoni, sărurile de piridiniu funcționează ca mediator, în mediu apos. Peak-ul, caracterizat de E_p și I_a , se deplasează cu creșterea pH-ului.

Prin studiul inițiat am confirmat că sărurile de amoniu generează unde de curent în voltamogramele ciclice, descrise ca două etape tipice de transfer al unui electron. Prima etapă este reducerea AH^2 ($AH^2/AH^{\cdot}$) iar cea de-a doua implică rolul ligandului de piridiniu de transportor de electroni ($AH^{\cdot}/AH^{\cdot-}$). 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. Adiția unui donor de protoni implică modificări nu doar la nivelul speciilor electroactive, dar și ale mecanismului global de reacție, acesta devenind concertat. În mediu apos alaclin, sărurile mediază un proces ireversibil de transfer de electroni, confirmat de peak-ul catodic, mai evident la L_r decât în cazul L_m iar datele electrochimice arată că mecanismul de reacție este diferit în funcție de pH-ul mediului de reacție.

Determinările spectrochimice realizate indică valori ale pH-ului între 6 și 7 unități pentru o bună stabilitate a compușilor. Potențialul OCP este un instrument util în caracterizarea stabilității compușilor în mediu apos. 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 compușilor în mediu apos la pH neutru sau acid. Studiul nostru stimulează efectuarea unor alte studii; voltametria ciclică poate fi utilizată pentru a caracteriza capacitatea reducătoare și comportamentul electrochimic al compușilor organici 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 (rezultate publicate în [Studia Chimia](#), 2015).

Studiul interacției dintre lipază și compușii implicați în reacțiile „click” prin CV

Au fost evaluate deasemenea, prin **voltametrie ciclică, proprietățile biocatalitice ale enzimelor** studiind interacția lipazei și comportamentul acesteia la interacția cu compușii care sunt materiale de plecare în reacțiile de cicloadiție biocatalizate (bromura de fenacil, propiolatul de etil, sărurile quaternare de piridiniu), pentru a obține ciclul indolizinic (rezultate publicate în [J. Electrochem. Sci.](#), 2016).

Soluțiile au fost preparate prin dizolvarea a 0.1 mM din fiecare ligand de piridiniu în 0.1 M KNO_3 în apă deionizată sterilă. Două soluții proaspete de ligand au fost analizate în prezența și absența lipazei, una conținând oxigen dizolvat iar cealaltă fără oxigen, fiind introdusă timp de 5 minute în atmosferă inertă de azot. Au fost de asemenea investigați precursorul bromură de fenacil și dipolarofilul propiolat de etil, implicați în procesul biocatalizat de lipază. La soluțiile acestora s-au daăugat diferite concentrații de lipază. Rezultatele au fost colectate la

temperatură ambiantă ($20\pm 1^\circ\text{C}$), utilizând soluții proaspăt preparate, dar și de-a lungul unei perioade de timp de la preparare (1-14 zile). Conductivitatea și pH-ul soluțiilor a fost monitorizat utilizând instrumentul Consort C862 multiparameter, iar datele spectrale au fost obținute cu echipamentul UV-VIS T90+.

Proprietățile fizico-chimice ale interacției dintre lipază și liganzii de piridiniu au fost caracterizate prin tehnica voltametriei ciclice (CV), utilizând un echipament Bio-logic SP50. Determinările au fost efectuate utilizând un electrod de carbon imersat în soluțiile preparate, la diferite viteze de scanare între $0.5\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ – $0.02\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ pentru un potențial variat între $E = -1.0\text{ V}$ și $+1.0\text{ V}$ vs Ag/AgCl. Rezultatele au fost colectate la temperatură ambiantă ($20\pm 1^\circ\text{C}$) dar și la 40°C . Determinările de potențial redox liber (potențialul de circuit deschis – OCP) și de voltametrie ciclică (CV).

Morfologia lipazei recuperată în urma investigațiilor electrochimice a fost caracterizată prin **microscopie electronică (SEM)** și **spectroscopie de raze X (EDX)** utilizând echipamentul Quanta 200. După filtrarea soluțiilor, lipaza recuperată a fost uscată în aer la ambiantă și apoi depusă pe o grilă de cupru acoperită cu film de carbon.

Stabilitatea sărurilor de piridiniu în prezența și în absența lipazei evaluată prin CV

Influența enzimei asupra ligandului rigid (Lr) și a celui mobil (Lm) a fost evaluată prin investigarea proprietăților fizico-chimice.

Lr a avut un pH de 6.5 în soluție apoasă proaspăt preparată, stabil și după 2 zile. În urma adăugării unei cantități mici de lipază (0.05 mg/mL), nu se observă o modificare semnificativă a pH-ului în soluția de electrolit Lr, după 2 zile de la contactul inițial cu enzima. Cu creșterea cantității de lipază, pH-ul scade ușor, astfel că după 7 zile, proba cu 0.5 mg/mL lipază a prezentat o scădere a pH-ului cu o unitate față de proba Lr fără enzimă (figura 24).

Lm a fost inițial caracterizat printr-un pH slab acid, variind de la 6.4 la 6.8 pe parcursul celor 14 zile de observație.

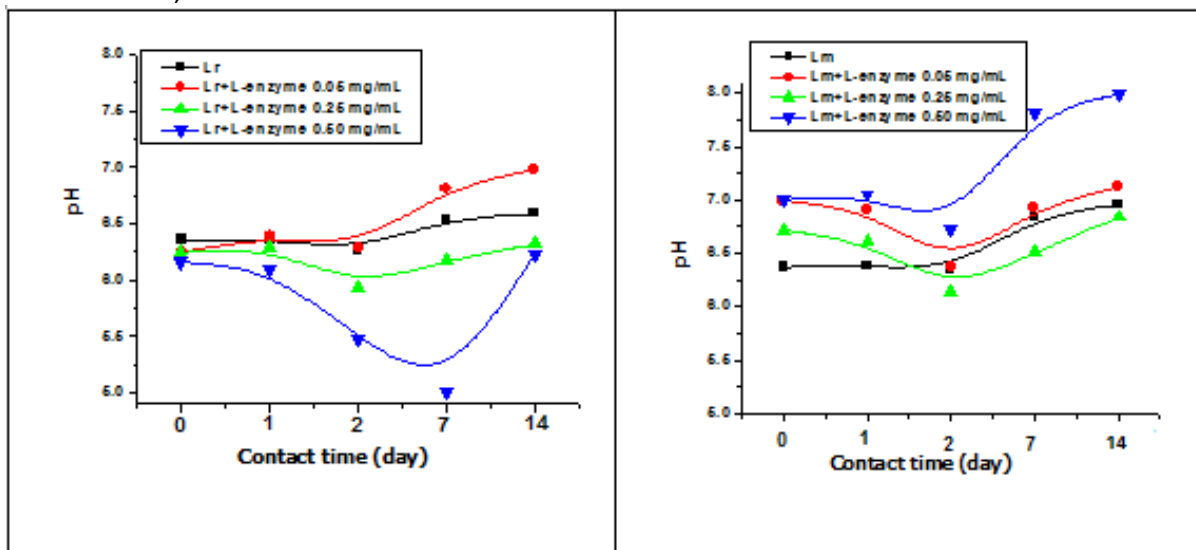


Figure 24. Evoluția în funcție de timp a pH-ului liganzilor rigid și mobil (Lr și Lm) cu și fără lipază

Prezența lipazei a indus schimbări semnificative asupra pH-ului soluției, înregistrându-se un valori de pH neutru sau slab alcalin, în special în cazul concentrațiilor mai mari de enzimă (0.5 mg/mL). Cu trecerea timpului se atinge pH-ul optim al activității enzimatice (pH neutru), observându-se o creștere a concentrației ionilor OH^- și activitatea lipazei crește (Figura 24). Soluția apoasă (0.1 mM) a electroliților în absența lipazei prezintă o conductivitate de 12-13 mS/cm. În toate probele se observă o scădere constantă a conductivității în timp, cu 2 mS/cm după prima și a doua zi, rămânând apoi aproape constantă în zilele următoare (Figura 25). Pentru Lm, în prezența concentrațiilor de 0.05 mg/mL și 0.25 mg/mL, după 7 zile se observă o variație mică a conductivității.

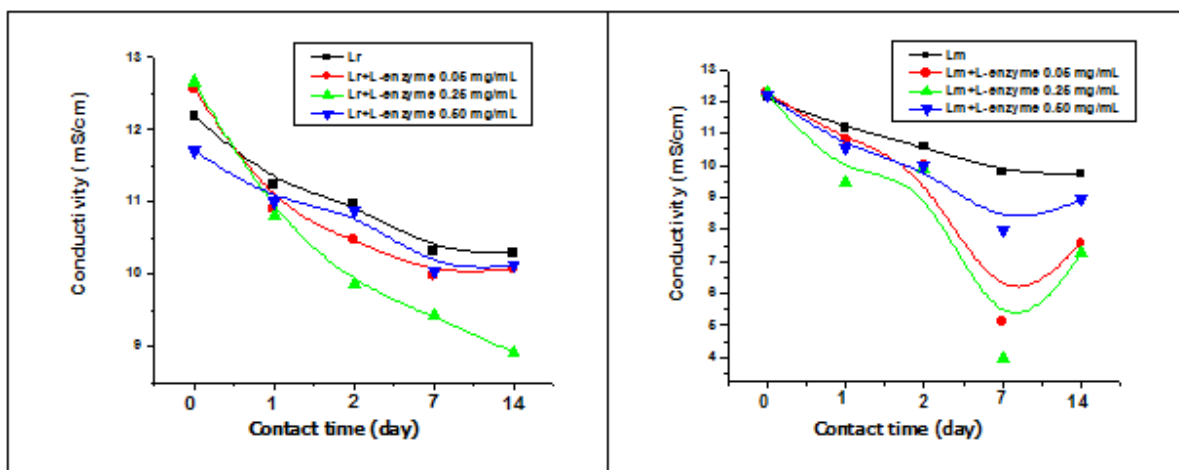


Figura 25. Evoluția în funcție de timp a conductivității liganzilor rigid și mobil (Lr și Lm) cu și fără lipază

Au fost înregistrate spectrele UV-Vis ale soluțiilor apoase cu și fără lipază. Lungimea de undă a maximului (λ_{max}) a Lr și Lm este de 264 nm (UV).

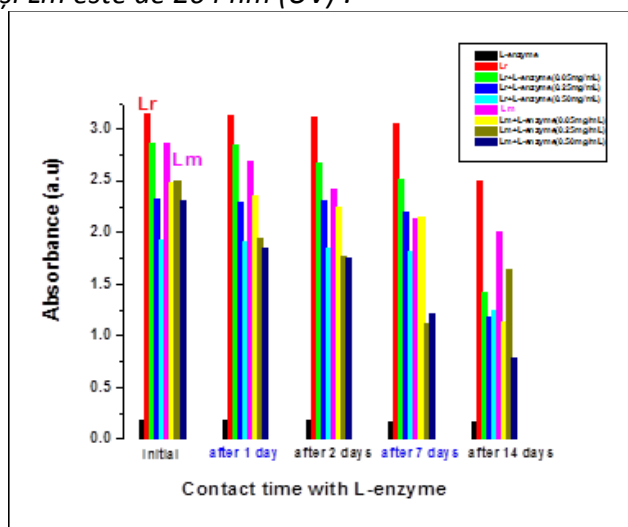


Figura 26. Evoluția în funcție de timp a absorbantei liganzilor cu și fără lipază

Absorbanța prezintă o deplasare pentru ambii liganzi în contact cu lipaza. Cele mai mari valori ale absorbantei s-au obținut pentru Lr. Adăugarea lipazei a condus la o scădere a valorii absorbantei în cazul Lm. Cele mai scăzute valori au fost obținute în prezența unei concentrații de enzimă de 0.5 mg/mL, ca o consecință a inhibiției enzimei în soluția de ligand. Această tendință descendentă s-a menținut pe parcursul celor 14 zile de observație (Figura 26).

Efectul temperaturii asupra liganzilor în prezența și absența lipazei

Reacțiile enzimatice sunt afectate de temperatură, iar temperatura optimă pentru numeroase enzime este 35 - 40°C. Temperatura optimă pentru activitatea lipazei este 37-40°C. Soluțiile liganzilor au fost preparate după metoda descrisă anterior, adăugându-se diferite concentrații de lipază la 40°C (menținând temperatura constantă), fără agitare sau agent de emulsionare. Odată cu creșterea temperaturii, s-a înregistrat o creștere a valorii pH-ului în cazul ambilor liganzi (Figura 27). În prezența enzimei, pH-ul Lr a scăzut, iar pH-ul Lm a crescut către valori alcaline, între 6.8 (la concentrația minimă de enzimă) și 8.2 (la concentrația maximă de enzimă). Conductivitatea soluțiilor s-a redus drastic la 40°C, având valori de ordinul $\mu\text{S/cm}$. Disocierea în absența enzimei a fost mai mare cu aproximativ 200 $\mu\text{S/cm}$ în cazul Lm față de Lr. În prezența lipazei, comportamentul disociativ a fost diferit. Conductivitatea soluției Lr în contact cu concentrația minimă de enzimă este redusă la jumătate (114 $\mu\text{S/cm}$), crescând ușor până la 135 $\mu\text{S/cm}$ în prezența concentrației maxime (Figura 27). Similar, în cazul Lm s-a observat o scădere cu 145 unități față de conductivitatea în absența lipazei (343 $\mu\text{S/cm}$) și o ușoară creștere de până la 317 $\mu\text{S/cm}$ odată cu creșterea concentrației de lipază adăugate. Interacția liganzilor cu lipaza la 40°C a fost evaluată și spectrofotometric. În cazul ambilor liganzi, s-a observat o scădere a absorbantei, atribuită activității enzimatice și a temperaturii crescute.

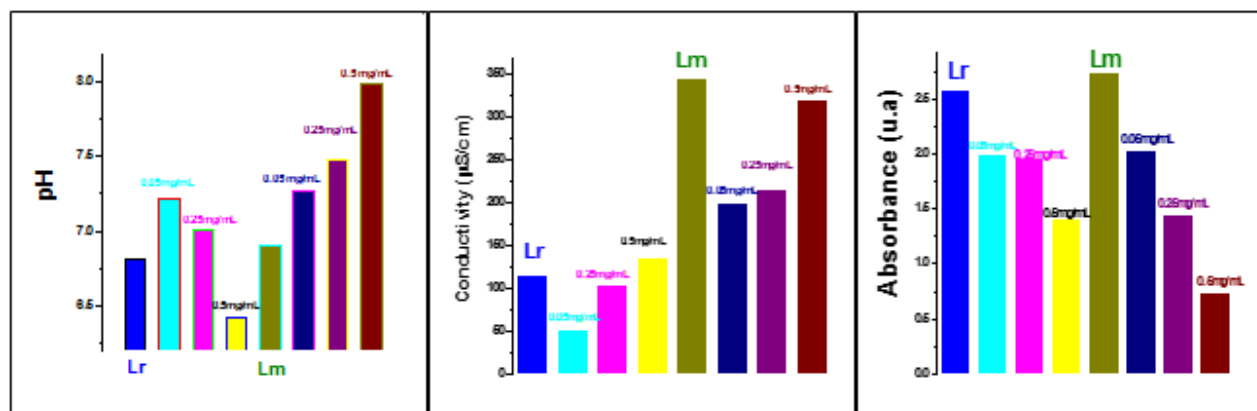


Figura 27. Efectul temperaturii de 40°C în evoluția pH-ului, a conductivității și a absorbantei (λ_{max} 264 nm) liganzilor piridinici în prezența lipazei

Studii de voltametrie ciclică

Soluțiile liganzilor electrolitici inițiale și după 1, 2, 7 și respectiv 14 zile de păstrare la o temperatură constantă (20°C) au fost analizate prin măsurători electrochimice. Măsurătorile de voltametrie ciclică au fost realizate ca metodă electroanalitică utilă pentru caracterizarea capacității de reducere și a comportării electrochimice a noilor piridiniu-liganzi care sunt implicați în reacțiile de cicloadiție biocatalizate de lipază. Procesele de oxidare (reacții anodice) se manifestă prin peak-uri la curenți pozitivi, iar procesele de reducere (reacții catodice) prin peak-uri negative, utile în înțelegerea mecanismului reacției.

Măsurătorile OCP ale electrolitului Lr fără enzimă prezintă un potențial variind de la 0.034 V la 0.045 V vs Ag/AgCl până la 2000 s iar pentru Lm între 0.052 - 0.056 V vs Ag/AgCl, ca efect al structurii zwitterionice a ligandului. Liganzii fără lipază au prezentat pentru Lr un curent anodic de 0,24 μA comparativ cu un curent anodic aproape constantă pentru Lm, care nu a fost mai mult de 0,054 μA . S-au înregistrat voltamogramele ciclice pentru un potențial aplicat între $E = \pm 1\text{ V}$ vs Ag/AgCl pe ambii liganzi 0.1mM în electrolit KNO_3 0.1 M, cu și fără lipază. Conținutul de lipază în soluțiile liganzilor electrolitici are efecte semnificative asupra proprietăților fizico-chimice precum și asupra răspunsului voltametric, mai mult în cazul lui Lr comparativ cu Lm, iar acest efect a fost dependent de structura lor și, de asemenea, de concentrația de lipază și viteza de scanare a potențialului aplicat.

Efectul concentrației de lipază

Voltamogramele ciclice generate ca efect al concentrației lipazei asupra ambilor liganzi electrolitici sunt prezentate în Figura 28.

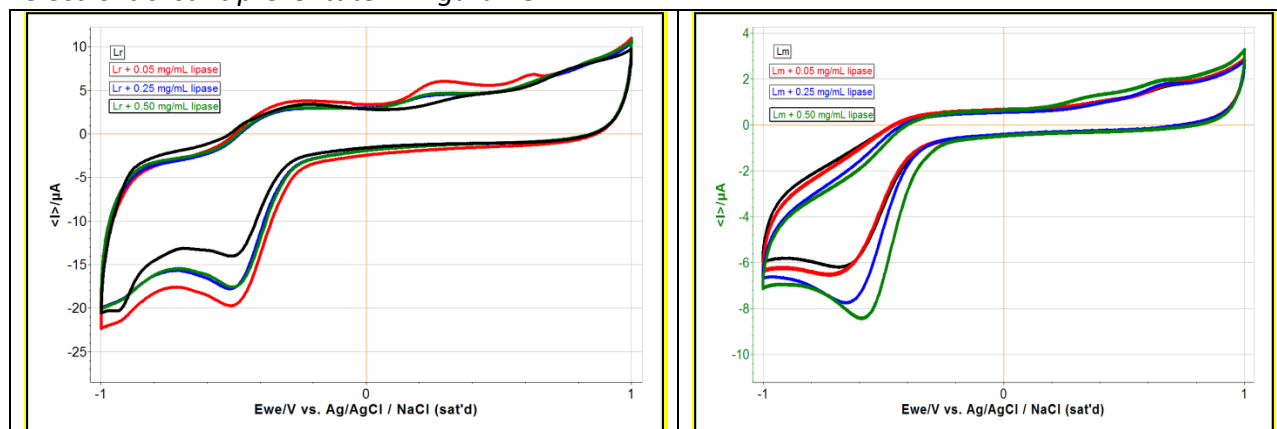


Figura 28. Voltamogramele ciclice generate de Lr și Lm în electrolit KNO_3 0,1 M în prezența a diferite concentrații de enzime, $E = \pm 1\text{ V}$ vs Ag / AgCl, $0.5\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ pentru Lr și $0,1\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ pentru Lm

Când s-au adăugat 0.05 mg/mL lipază pentru Lr, curentul anodic a crescut cu 0.25 μA și au fost observate două picuri de curent, comparativ cu ligandul fără enzimă. Când mai multă enzimă a fost adăugată la electrolitul Lr un vârf de curent anodic relativ distinct (picul a) la un potențial de 0.5 V vs Ag/AgCl a fost obținut și crește cu 1.50 μA la 0.5 mg/mL lipază. Molecula Lr suferă ușor electrooxidare. În primul rând, este reducerea AH^{2-} ($\text{AH}^{2-}/\text{AH}^-$), iar al doilea pas este rolul de purtător de electroni al ligandului piridinic (AH/AH^-). Radicalul intermediar format supune

ulterior AH^- la formarea unui nou radical $AH^{\cdot-}$ asupra ligandului. Atunci când concentrația de enzimă a fost crescută treptat de la 0.05 mg/mL până la 0.50 mg/mL a existat o creștere treptată a răspunsului curentului de vârf și acest răspuns a fost în final saturat (la 1,76 μA) la concentrația de 0.25 mg/mL a lipazei, unde valorile curentului anodic observate au fost aproape constante (Figura 5). Lm în interacțiune cu lipaza a prezentat un curent anodic între 0.08 μA și 0.1 μA , fără nici un pic distinct. Pentru studiile ulterioare oxigenul a fost îndepărtat din soluții și voltamogramele au fost generate (Figura 29). S-a observat o reducere a curentului anodic și efectul este, de asemenea, în funcție de viteza de scanare a potențialului aplicat (Figura 29).

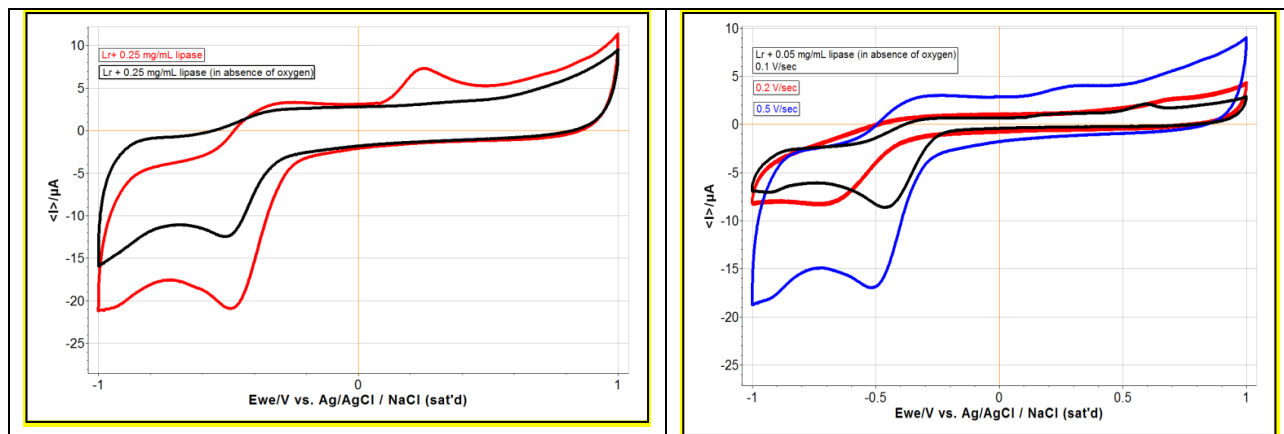


Figura 29. Voltamogramele generate de Lr în electrolit 0.1 M KNO_3 în prezența lipazei cu și fără oxigen, $E = \pm 1$ V vs Ag / AgCl, $0,5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$

Efectul vitezei de scanare

Interacțiunea lipazei la temperatura camerei, cu liganzi piridiniu este intens afectată de viteza de scanare a potențialului aplicat. Voltamogramele arată schimbarea undelor în ambii liganzi când viteza de scanare a potențialului aplicat a fost schimbată de la $0,02 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ la $0,5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Figura 30 prezintă CV-urile piridiniu-liganzilor în absența și în prezența a 0.25 mg/mL de lipază (pH 7.0) la o viteză de scanare diferită ($E = \pm 1$ V vs Ag/AgCl). O creștere a I_a se obține pentru Lr de la 2.77 μA (la $0,2 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$) la 6,3 μA (la $0,5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$), precum și o deplasare a potențialului de la E_1 de 0.22 V la E_2 de 0.28 V vs Ag/AgCl. Pentru Lm nu s-a observat un pic anodic evident, dar o creștere a I_a cu viteza de scanare a potențialului aplicat a fost observată.

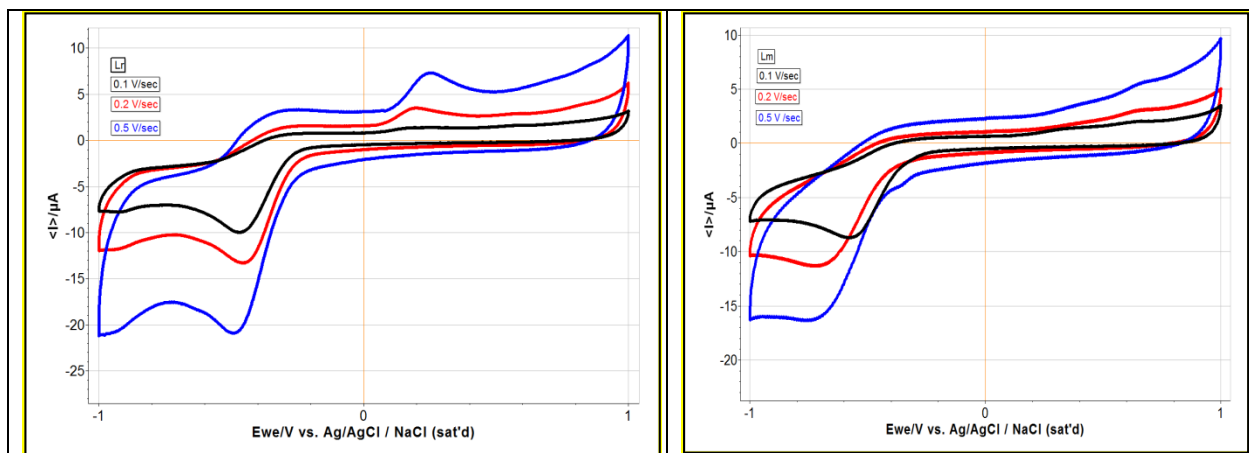


Figura 30. Voltamogramele generate de electroliții Lr și Lm în prezența a 0.25 mg/mL de enzimă la diferite viteze de scanare, $E = \pm 1 \text{ V vs Ag / AgCl}$

Figura 31 prezintă voltamogramele ambilor liganzi în prezența a 0.50 mg/mL de lipază (pH 7.0) la viteza de scanare de 0.5 V s^{-1} . Un pic anodic distinct se obține ca efect al unui proces redox intensiv, mai evident la Lr decât la Lm. Comportamentul liganzilor este diferit, lipaza prezentând un efect pozitiv asupra Lr comparativ cu Lm. Această diferență de activitate catalitică a lipazei se datorează în principal existenței mai multor grupe funcționale active în structura Lr decât a Lm. Activitatea enzimatică a lipazei este dependentă de structură. Valoarea la pentru Lr este mai mare decât la Lm ($\Delta I_a = 45 \text{ } \mu\text{A}$), ceea ce ar putea explica un proces mai rapid de transfer de electroni pentru Lr, ca urmare a structurii sale favorabile, comparativ cu Lm.

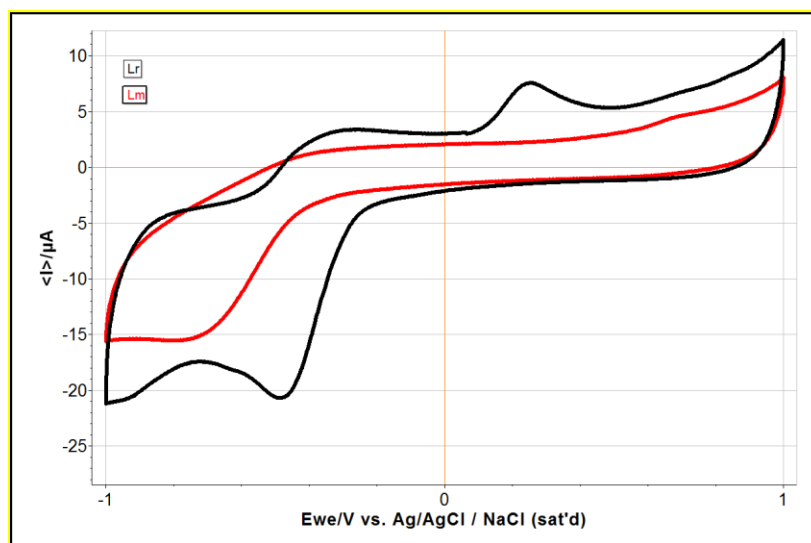


Figura 31. Voltamogramele generate de electroliții Lr și Lm în prezența a 0.50 mg de lipază, $E = \pm 1 \text{ V vs Ag/AgCl}$, $0,5 \text{ V mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Nici o undă de reducere nu a fost observată în prezența precursorului piridiniu-liganzilor, bromura de fenacil și respectiv asupra propiolatului de etil (sinton), în prezența sau absența lipazei. Interacțiunea lipazei asupra precursorului nu se observă (Figura 32). Voltamogramele înregistrează doar efectul procesului de difuzie pe electrodul de carbon. Aceste rezultate au demonstrat că piridiniu-liganzii cu o structură diferită față de a precursorului au prezentat un comportament electro-oxidativ iar lipaza are un efect asupra lor (Figurile 28-31).

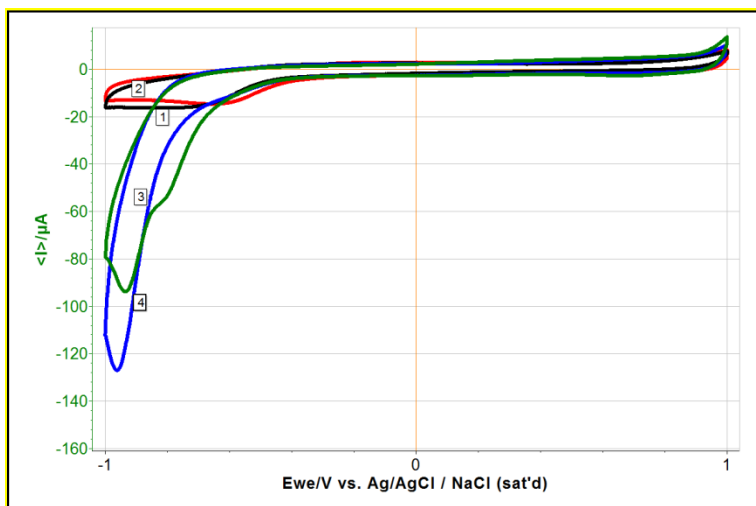


Figura 32. Voltamogramele generate de bromura de fenacil (1), în prezența L-enzimei 0.25 mg/mL (2) și propiolat de etil (sinton-3) în prezența L-enzimei 0.25 mg/mL (4), $E = \pm 1 \text{ V vs Ag/AgCl}$, $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Caracterizarea structurală

Lipaza a fost analizată înainte și după interacțiunea cu liganzii electrolitici. Enzima care a fost în contact cu liganzii din măsurătorile de voltametrie ciclică a fost recuperată prin filtrare și uscată în aer, la temperatura camerei. Imaginile SEM și analiza elementală (EDX) au fost realizate când lipaza a fost plasată pe cărbune acoperit cu cupru, pentru a observa morfologia și modificările structurale. Imaginile SEM au arătat o modificare în structura lipazei înaintea experimentului și după interacțiunea cu liganzi, în prezența sau absența oxigenului (Figura 33).

Dimensiunea granulelor lipazei (figura 33a) a fost modificată în mod semnificativ în prezența electrolitului Lr (Figura 33c), chiar și analiza chimică a indicat aproape aceeași concentrație de carbon 95.89% în greutate față de 95.44% în greutate și, respectiv, oxigen 4.11% în greutate față de 4.56% în greutate. Reducerea în greutate a carbonului la 88.2% și oxigenului la 1.5%, borului (10.18% în greutate), de asemenea, Na și Mg în conținut mic cu un rol de consolidare în celulă sunt evident rezultatul unui contact al lipazei cu Lr (Figura 33b).

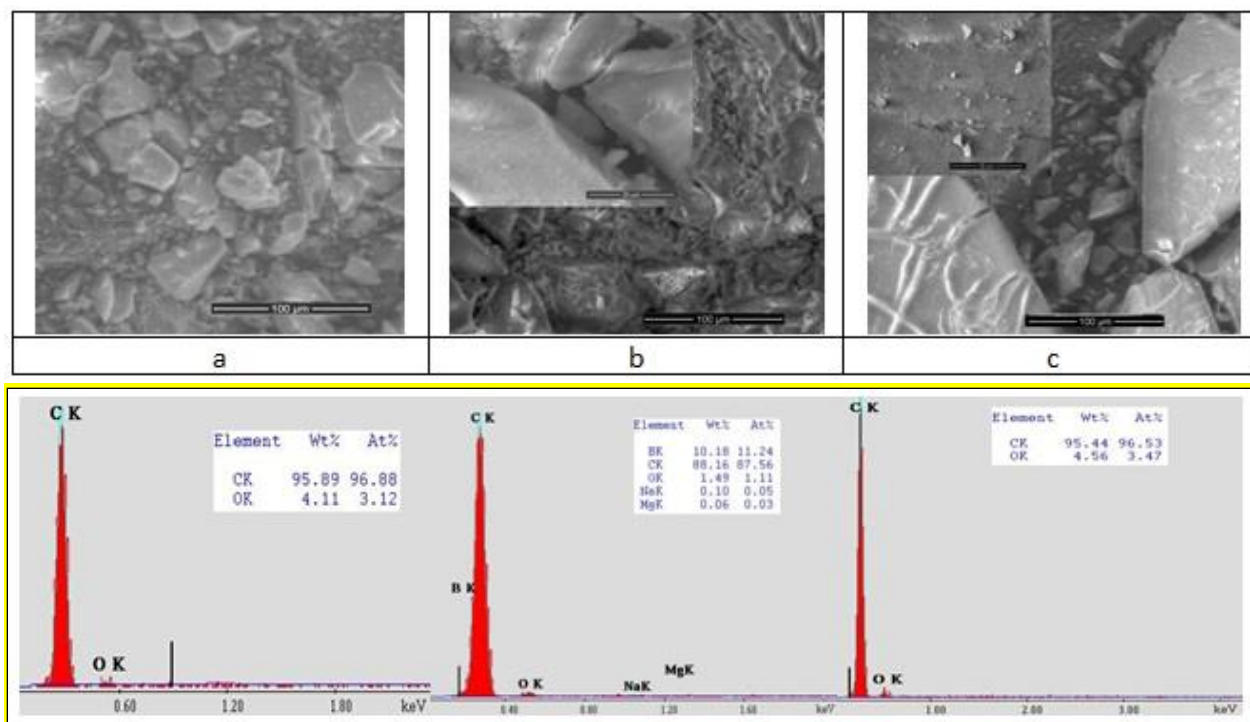


Figura 33. Imaginile SEM și analiza EDX a lipazei (a); interacțiunea lipazei cu Lr în prezența oxigenului (b) și fără oxigen (c)

În concluzie, stabilitatea noilor liganzi, în KNO_3 10^{-1} M ca suport electrolitic, este influențată de cantitatea de lipază adăugată și o bună corelație a fost observată pe parcursul unei anumite perioade de timp între pH, conductivitate și măsurătorile spectrale UV/Vis.

Procese de electro-oxidare ale transferului de electroni depind de structura liganzilor. Conținutul lipazei în soluțiile de ligand are efecte semnificative asupra proprietăților lor fizico-chimice, precum și asupra răspunsului voltametric. Voltamogramele înregistrate au arătat un transfer electronic intens datorită interacțiunii Lr cu lipaza comparativ cu Lm, din cauza absenței unei grupări etilen mobile din structura chimică a ligandului Lr. În prezența oxigenului, piridiniu-liganzii acționează în mod diferit, luând în considerare toate proprietățile fizico-chimice și potențialul redox. Acest lucru ar putea rezulta din aranjamentul cel mai favorabil al structurii lor moleculare, în funcție de concentrația lipazei și de viteza de scanare a potențialului aplicat. Studiul este util pentru a înțelege mecanismul reacțiilor cicloadiție în care compușii ar putea participa ca sintoni. Liganzii cuaternari au fost concepuți ca precursori pentru sinteza indolizinelor fluorescente.

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.

O IV.3. Încercări de obținere a unor senzori prin diverse tehnici

In ultimii ani, numeroase aplicații ce implică depunerea de molecule organice, biomolecule sau polimeri ca substrat au fost intens studiate. S-au realizat multe studii pentru o varietate largă de aplicații biologice specifice într-un domeniu de cercetare cu creștere rapidă, pentru tehnologii medicale. Au fost, de asemenea investigate pelicule polimerice pentru aplicații în dispozitive electronice organice și senzori.

Țintele primare pentru tehnica MAPLE (Matrix Assisted Pulse Laser Evaporation- matrice asistată prin evaporare cu laser în impulsuri) au fost moleculele biologice și polimeri. Folosind MAPLE au fost depuse proteine și enzime. Enzima lipază care se găsește în majoritatea sistemelor biologice este utilizată în biosenzori, iar o problemă importantă este imobilizarea / depunere acestora ca substrat. Moleculele depuse prin tehnica MAPLE isi păstrează caracteristicile conformaționale.

Această tehnică este derivată de la depunere laser cu impulsuri (PLD), având ca diferență doar compoziția materialului țintă/matricea. O probă congelată (de exemplu, polimer 1-5 % concentrație de masă) dintr-o soluție / solvent reprezintă ținta de depunere. Speciile moleculare sunt ionizate, iar materialul țintă este solid la temperatura camerei. Dintre condițiile cele mai multe importante necesare în tehnica MAPLE se remarcă lungimea de undă a undei laser și materialul matricei (A. Piqué, 2011). Un fascicul laser pulsant, de obicei, cu raze ultraviolete sau infraroșii, având un spot între 1 la 25 mm² este direcționat într-o cameră de vid printr-o fereastră de laser. Fluxul de laser este ales pentru a minimiza degradarea sistemului de solvenți / solut, variind de la 0.01 - 5 J cm⁻². Câteva ml de soluție din materialul țintă/matrice este congelată într-o cupă metalică (de obicei din Al) și introdusă apoi în interiorul camerei de vacuum, pe un suport rotativ răcit pentru a menține înghețată proba în timpul experimentului. La început, este stabilit un vid scăzut (10⁻² la 10⁻⁷ torr). Suportul substrat pe care se va realiza depunerea este poziționat paralel cu cupa metalică ce conține ținta/ matricea la o distanță de 3 cm la 10 cm. Monitorizarea grosimii în timpul depunerii este asigurată în unele echipamente.

Experimentul nostru l-am realizat la Institutul National pentru Fizica Laserilor, Plasmei si Radiatiei (INFLPR), București folosind un echipament Nd:YAG solid state laser source Brilliant B from Quantel, France (Figura 34). Caracteristica în studiul nostru a fost o sursă laser excitată cu impulsuri KrF ($\lambda = 248$ nm, $\tau = 25$ ns, $\nu = 10$ Hz). Mai multe variabile trebuiesc luate în considerare pentru această tehnică: lungime de undă laser, durata pulsului, solventul, concentrația, presiunea de fond, speciile gazoase, temperatura substratului, etc. Prin ajustări se găsește varianta optimă pentru depunere în scopul urmărit.

Mecanismul de depunere în procesul MAPLE se bazează pe interacțiunea fotofizică inițială dintre laser și țintă, responsabilă pentru scoaterea din matrice (solvent) și formarea peliculei (depunerii) (Datcu, A. et al., 2015).

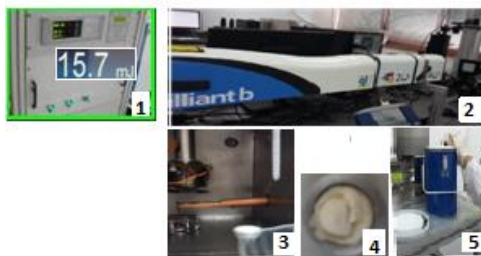


Figura 34. Prezentarea schematică a tehnicii MAPLE: 1-sursa laser Nd-Yag; 2- energia fasciculului razei laser, 3 - camera de vid în atmosferă de Ar, 4 - proba țintă în cupă metalică; 5 –înghetarea probei

În studiul nostru preliminar noi prezentăm că este posibilă utilizarea tehnicii MAPLE, pentru a depune compuși noi, liganzi heterociclici pe un substrat de siliciu și, respectiv, cuarț.

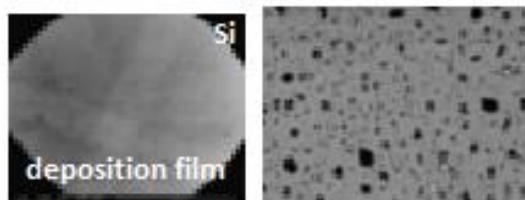


Figura 35. Filmul depuneri noilor compuși și imaginea SEM a depunerii

Din imaginea SEM (Figura 34) se poate observa că prin această tehnică se păstrează structura intactă a compușilor, confirmată de asemenea, prin analiza FTIR fiind același profil al spectrului în soluție și filmul de depunere (Figura 36).

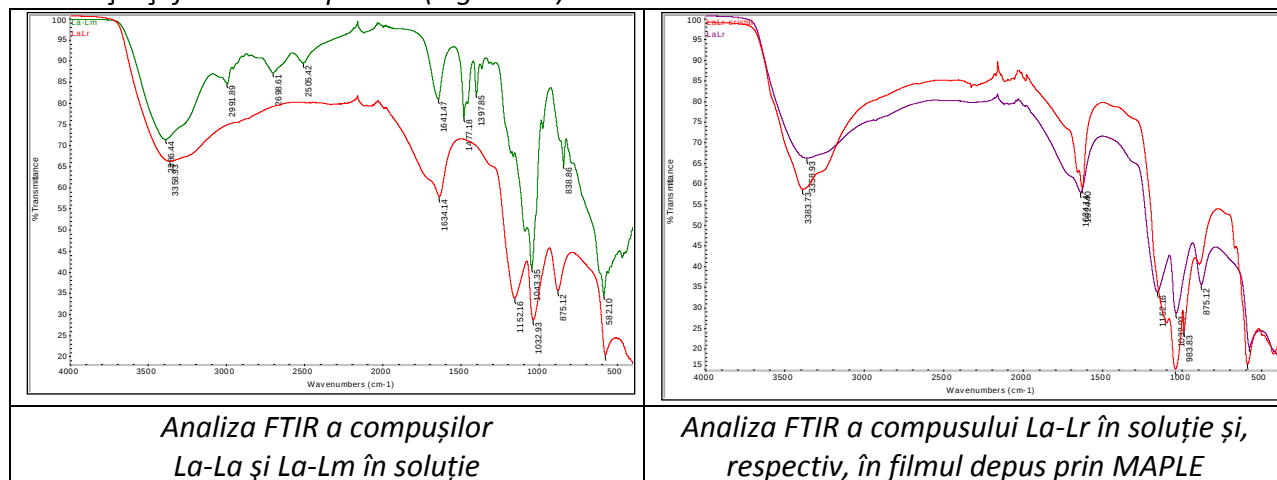


Figura 36. Analiza FTIR comparativă

În studiul nostru încercăm să arătăm că este posibil folosind tehnica MAPLE pentru a depune molecule organice, pe un substrat cu păstrarea structurii sale, așa cum se arată prin analiza FTIR.

Mai multe articole au prezentat progresul enorm al tehnicii MAPLE în obținerea de biosenzori (Touloupaki E et al, 2012). Noi nu prezentăm și nu discutăm despre un anumit biosenzor; doar demonstrăm fezabilitatea tehnicii MAPLE prin prezentarea rezultatelor testului preliminar; este posibilă imobilizarea unor compuși într-un compozit polimer pentru aplicații ca biosenzor și structura și activitatea biomoleculelor poate fi păstrată.

Coordonarea de simulări și experimente sunt necesare pentru a proiecta filme cu proprietăți specifice dorite, folosind această tehnică. MAPLE este o tehnică de depunere versatilă, fiind o abordare mai blândă a proceselor cu laser pentru depunerea filmelor, care permite un control suplimentar asupra procesului de creștere a filmelor, în comparație cu alte metode (rezultate în curs de publicare).

Concluzii

- ✓ Toate obiectivele propuse în proiectul PN-II-ID-PCE-2011-3-0226 au fost atinse.
- ✓ Studiile efectuate în acest proiect demonstrează că biocatalizatorii testați au capacitatea de bioconversie a compușilor cu formare de noi produși de reacție, cu proprietăți diverse, procesul de biotransformare fiind influențat de timpul de reacție, pH, temperatura, proprietățile catalitice ale biocatalizatorului. În cazul microorganismelor, bioconversia evoluează diferit în funcție de tip, particularitățile metabolice și energetice ale celulelor, precum și de vârsta acestora și condițiile de cultivare. În cazul celulelor vegetale utilizate până în prezent, reacția a decurs cu viteză mai mare, comparativ cu a culturilor microbiene în calitate de biocatalizatori.
- ✓ Pentru prima dată au fost obținuți compuși noi, din clasa indolizinelor și triazolilor, compuși cu proprietăți fluorescente, prin reacții "click" utilizând cataliză enzimatică.
- ✓ Pentru prima oară în reacții de cicloadiție am utilizat biocatalizatori enzime comerciale, microorganisme din colecția Platformei Bioaliment a UDJ sau enzime de proveniență vegetală. Reacțiile au avut loc în mediu apos, la temperaturi cuprinse între 25-50°C, reacții care s-au realizat și prin activare cu mw și us. S-a constatat că atât enzimele cât și mw sau us cresc viteza reacției și, în unele cazuri crește puritatea produșilor. Rezultatele sunt promițătoare având în vedere că reacțiile decurg în condiții blânde, în apă, cu enzime care pot fi procurate cu ușurință și care sunt materiale regenerabile.
- ✓ În urma studiilor biologice efectuate s-a dovedit activitatea biologică remarcabilă a unora dintre compușii sintetizați prin reacții enzimatică. O sare cuaternară derivată de la piridina, a avut cea mai bună activitate antioxidantă prin metoda decolorării β-carotenului dintre toți compușii analizați. Dintre sărurile derivate de la bipiridil au ieșit în evidență doi compuși, cu rezultate foarte bune împotriva radicalului liber DPPH dar și de inhibare a acetilcolinesterazei. Un compus a demonstrat o foarte bună activitate antioxidantă prin metoda cu DPPH, iar în testele antimicrobiene s-a dovedit a fi un compus cu spectru larg de acțiune. Trei dintre derivații indoliziniici au condus la rezultate deosebite, fiind cei mai activi compuși care s-au opus decolorării β-carotenului.

- ✓ Pentru prima dată au fost realizate studii **toxicologice și citologice** pe microorganisme eucariote model cum este drojdia *Saccharomyces cerevisiae*. În urma studiilor efectuate s-a dovedit activitatea biologică remarcabilă a unora dintre compușii sintetizați prin reacții de biocataliză.
- ✓ 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.
- ✓ Studiile de fluorescență demonstrează **puternice proprietăți fluorescente** ale tuturor compușilor analizați cu maxime ale benzii de emisie în regiunea albastru-violet.
- ✓ **Studile de interacție cu ADN** s-au realizat prin spectroscopie UV-Vis, IR și de fluorescență, pentru a analiza natura legăturii fluorofor-ADN. S-a identificat intercalarea ca potențială metodă de legare, dar și o puternică interacție ADN-fluorofor, determinată prin stingerea fluorescenței acestora proporțional cu creșterea raportului molar ADN-fluorofor.
- ✓ Prin **studii electrochimice** s-a identificat o bună corelare între potențialul electro-oxidativ și stabilitatea sărurilor cuaternare în mediu apos la pH neutru sau acid, în prezența sau absența enzimelor. Studiile de voltametrie ciclică demonstrează puternice proprietăți redox ale tuturor compușilor. Aceste studii contribuie la **elucidarea mecanismelor** la care pot participa acești compuși organici în mediu apos.
- ✓ Pentru prima dată au fost realizate studii electrochimice și încercări de obținere a senzorilor prin depunerea compușilor sintetizați prin **tehnica MAPLE**. În urma studiilor efectuate s-a dovedit structura și activitatea biomoleculelor poate fi păstrată.
- ✓ Procesele biocatalitice utilizate de noi pentru prima oară în obținerea compușilor heterociclici menționați necesită un consum energetic mai mic datorită condițiilor blânde de lucru (biocatalizatori ieftini, T scăzută) și a etapelor mai puține, precum și utilizarea de solvenți mai puțin toxici (apa), putând fi astfel considerate procese care au loc în spiritul conceptului de „**green chemistry**”.
- ✓ Rezultatele cercetărilor contribuie și la elucidarea mecanismului de acțiune al biocatalizatorilor în reacții de cicloadiție.
- ✓ Colaborarea între partenerii implicați în proiect a avut și rezultat elaborarea unor lucrări publicate respectiv trimise spre publicare sau în lucru în care sunt prezentate rezultatele cercetărilor interdisciplinare vizate în proiect.
- ✓ Rezultatele obținute în această perioadă au fost valorificate după cum urmează: **9 lucrări apărute în reviste cotate ISI, 4 lucrări ISI proceedings; 1 articol BDI, 34 lucrări prezentate la conferințe internaționale**, la care se mai adaugă **4 manuscrise pregătite pentru a fi publicate** în care sunt prezentate rezultatele nepublicate ale cercetărilor din cadrul proiectului iar alte rezultate sunt în curs de a fi valorificate.
- ✓ A fost editată **o monografie** referitoare la metode electrochimice de analiză, metode aplicate în ultima etapă a proiectului în încercarea de obținere de senzori
- ✓ A fost editat **un capitol în cartea** *Scope of Novel Heterocycles from Organic and Pharmaceutical*, open acces.
- ✓ Au fost finalizate **2 teze de doctorat** de către doi membri ai proiectului (Ioana Otilia Ghine și Simon Bonte).

- ✓ Proiectul a susținut **trei proiecte de colaborare bilaterală**, două cu Franța și unul cu China în care au fost implicați mai mulți membri ai acestui proiect.
- ✓ Rezultatele obținute în etapa referitoare la activitatea biologică au contribuit la participarea și **câștigarea unui proiect Cost (Active and intelligent fibre-based packaging - innovation and market introduction- COST FP1405 ActInPak, oc-2014-1-18987)** în care membri ai proiectului sunt și membri ai acestei acțiuni.
- ✓ Cercetările realizate în cadrul proiectului au condus la dezvoltarea altor idei care s-au concretizat în **trei propuneri de proiect** în cadrul competiției Parteneriate 2013, PNCDI III (colaborari bilaterale și Proiect experimental demonstrativ, 2016).
- ✓ Rezultatele cercetărilor au condus la **obținerea titlului de abilitare** a directorului de proiect și la dezvoltarea unor noi direcții de cercetare și prin debutul **unei noi teze de doctorat (Andreea Veronica Dediu)**.
- ✓ Pe parcursul acestei perioade, cu resurse financiare din suma alocată acestui proiect **a fost modernizat** cu aparatură de ultimă generație **un laborator de cercetare** în care s-au desfășurat și se desfășoară activitățile proiectului.
- ✓ La obținerea acestor rezultate, alături de cercetătorii cu experiență au contribuit în măsură semnificativă tineri cercetători și studenți masteranzi, atingându-se astfel și obiectivul de formare a resursei umane.

Director proiect,
Prof.dr. habil.Dinică Rodica Mihaela

Romina