

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

**CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA ȘI EVALUAREA UNOR
COMPLECȘI AI LANTANIDELOR CU LIGANZI N-
HETEROCICLICI CU APLICAȚII FARMACEUTICE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. RICA BOSCHENCU

DOCTORAND
ANDREEA CÂRÂC

2018

CUPRINS

INTRODUCERE.....	5
1. DATE GENERALE PRIVIND PROPRIETĂȚILE ȘI ROLUL BIOLOGIC AL LANTANIDELOR	8
1.1 Lantanide – încadrare și proprietăți generale.....	8
1.2 Capacitatea coordinativă a ionilor lantanidelor.....	10
1.3 Proprietăți biochimice și farmacologice ale ionilor lantanidelor.....	13
1.4 Aplicații ale combinațiilor generate de ionii lantanidelor	20
1.4.1 Aplicații bioanalitice ale complecșilor cu ioni ai lantanidelor	21
1.4.2 Aplicații ale lantanidelor în diagnoza medicală.....	23
1.4.3 Aplicații ale lantanidelor în terapie	25
1.5 Efecte toxicologice ale ionilor lantanidelor.....	30
1.6 Abordări moderne privind obținerea, caracterizarea și aplicabilitatea combinațiilor complexe ale lantanidelor cu liganzi N-heterociclici.....	34
1.7 Considerații generale asupra derivaților dicuaternari de piridină.....	43
PARTEA EXPERIMENTALĂ	
2. Derivați de N,N'-bis-fenacil-4,4'-bipiridiniu – sinteza și proprietăți	49
2.1 Sinteza liganzilor.....	49
2.2 Caracterizarea structurală și spectrală a liganzilor.....	50
2.3 Studii privind stabilitatea liganzilor în mediul apos.....	56
2.4 Proprietăți electrochimice ale liganzilor N-heterociclici. Studii de voltametrie ciclică.....	58
2.5 Concluzii.....	72
3. Sinteza combinațiilor complexe ale ionilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N-heterociclici bipiridinici	73
3.1 Sinteza combinațiilor complexe ale La(III) și Nd(III) cu dibromură de N,N' bis-fenacil - 4,4'-bipiridiniu (L ₁).....	73
3.2 Sinteza combinațiilor complexe ale La(III) și Nd(III) cu dibromură de N,N' bis-fenacil-1,2-bis(4-piridil)etan (L ₂)	80

**Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu
liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice**

3.3	Monitorizarea reacțiilor de complexare prin evaluarea spectrală a componentelor rezultate la interacțiunea ligand-ion lantanid. Spectre de absorbție și spectre de fluorescență.....	83
3.4	Concluzii.....	102
4.	Caracterizarea structurală și spectrală a combinațiilor complexe ale ionilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N–heterociclici bipyridinici	104
4.1	Caracterizarea structurilor complexe prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier	104
4.2	Evaluarea structurală a combinațiilor complexe ale ionilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N–heterociclici bipyridinici prin Rezonanță Magnetică Nucleară și Spectroscopie de Masă	117
4.3	Analiza termogravimetrică a structurilor complexe generate de ionii La(III) și Nd(III).....	121
4.4	Analiza structurală prin difracție de raze X a complecșilor La(III) și Nd(III)	126
4.5	Analiza morfologică (SEM) și cantitativă (EDAX) pentru complecșii La(III)-L ₁ și Nd(III)-L ₁	130
4.6	Evaluarea proprietăților electrochimice ale complecșilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N–heterociclici bipyridinici.....	138
4.7	Concluzii.....	155
5.	Evaluarea potențialului antitumoral al combinațiilor complexe ale ionilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N- heterociclici bipyridinici.....	157
5.1	Evaluarea activității citotoxice a combinațiilor complexe ale La(III) și Nd(III) cu liganzi bipyridinici	157
5.2	Evaluarea procesului de apoptoză.....	170
5.3	Identificarea speciilor reactive de oxigen (ROS).....	172
5.4	Concluzii.....	174
6	CONCLUZII GENERALE.....	175
	Bibliografie	180
	Lista abrevierilor și simbolurilor	200
	Lista lucrărilor științifice publicate	204
	Anexe.....	206

Introducere

Domeniul biomedical include o gamă largă de aplicații ale lantanidelor ca elemente de diagnostic clinic, fapt ce a generat extinderea studiilor și asupra aplicabilității combinațiilor complexe generate de ioni acestora.

Complecșii lantanidelor sunt utilizați cu succes în bioanaliză, imagistică, radioimunoterapie și în terapia fotodinamică a cancerului, fiind caracterizați de selectivitate mai bună față de celulele tumorale comparativ cu celulele sănătoase.

Ioni lantanidelor manifestă proprietăți de acizi Lewis și pot genera, în interacție cu liganzi N-heterociclici, combinații complexe stabile cu proprietăți antibacteriene, antifungice, antivirale sau antitumorale, liganzii având un rol cheie în mecanismul de absorbție și distribuție a structurilor complexe.

Strategii moderne de sinteză aplicate în domeniul chimiei medicamentului au generat noi structuri cu ioni lantanidelor, structuri selective și cu profil farmacologic îmbunătățit.

În acest context, obiectivul principal al tezei de doctorat a vizat obținerea, caracterizarea structurală, spectrală și evaluarea potențialului antitumoral al unor noi combinații complexe cu ioni ai La(III) și Nd(III) și liganzi N-heterociclici.

Cercetările incluse în planul tezei au urmărit obținerea unor rezultate experimentale optime, prin monitorizarea permanentă a relației dintre structura chimică, proprietățile spectrale și efectul exercitat la nivelul celulelor tumorale de combinațiile nou sintetizate.

În acest scop, etapele parcurse pentru realizarea obiectivelor propuse au vizat:

- *documentarea aprofundată privind profilul bioanorganic al ionilor elementelor din blocul f, cu prezentarea celor mai actuale date referitoare la aplicațiile bioanalitice și terapeutice ale combinațiilor generate de ioni trivalenți ai lantanidelor precum și date privind potențialul toxicologic al acestora.*

- *studii privind sinteza, proprietăți spectrale și stabilitatea în mediu apos a derivaților de N,N'-bis-fenacil-4,4'-bipiridiniu, utilizați ca liganzi în coordinarea ionilor La(III) respectiv Nd(III) și obținerea combinațiilor complexe cu potențial antitumoral.*

- *studii privind sinteza combinațiilor complexe a ionilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N-heterociclici bipiridinici și monitorizarea reacțiilor de complexare prin evaluarea spectrală a componentelor rezultate la interacțiunea ligand-ion lantanid.*

- *evaluarea structurală și spectrală a combinațiilor complexe obținute prin abordarea celor mai moderne tehnici de analiză fizico-chimică: Rezonanță Magnetică Nucleară (RMN), spectroscopie de Masă (MS), spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), analiză termogravimetrică (TG, TGA), spectroscopie de absorbție (UV-Vis), analiză structurală prin difracție de raze X (XRD), analiză morfologică (SEM) și cantitativă (EDAX).*

- *evaluarea liganzilor și a structurilor complexe sintetizate prin studii de voltametrie ciclică în scopul stabilirii potențialului acestora de a participa la procese cu schimb de electroni.*

- *evaluarea în vitro la nivel celular a potențialului antitumoral al liganzilor și a combinațiilor complexe sintetizate, utilizând celule aparținând liniilor celulare MCF7 și A2780 prin corelarea rezultatelor în funcție de concentrația compusului (50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 5.25 μ M, 3 μ M, 1 μ M) și timpul de incubare (24, 48, 72 ore).*

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice

Cercetările interdisciplinare efectuate în vederea îndeplinirii obiectivelor propuse au fost realizate utilizând infrastructura modernă din laboratoarele de cercetare aparținând:

- *Disciplinei de Chimie Anorganică, Facultatea de Farmacie, U.M.F. „Carol Davila”, București;*
- *Laboratorului de Electrochimie, Facultatea de Științe și Mediu, Universitatea “Dunărea de Jos”, Galați;*
- *Centrului de Știința Suprafeței și Nanotehnologie (CSSNT), Universitatea Politehnică, București;*
- *Departamentului de Cercetare în Compuși Anorganici, Universitatea Camerino, Italia;*
- *Centrului de Știință și Tehnologie Nucleară, Institutul Superior Tehnic, Lisabona, Portugalia.*

Date generale privind proprietățile și rolul biologic al lantanidelor

Cercetările moderne privind îmbunătățirea strategiilor ce vizează obținerea de noi compuși anorganici cu potențial de marker și agent antitumoral, încadrează chimia bioanorganică a lantanidelor în principalele domenii de studiu ale chimiei medicamentului [Kostova, 2005].

Studii recente au demonstrat că dintre elementele sistemului periodic, lantanidele, prin ionii lor, prezintă numeroase aplicații în diagnoză și terapia antitumorală dar și în analiza biologică [Teo și colab., 2016]. Aceste aplicații valorifică nu numai proprietățile spectrale și magnetice ale ionilor lantanidelor dar și activitatea radioizotopilor sintetici ai acestora [Cotton, 2012].

Manifestările biologice la nivel celular ale lantanidelor se bazează pe similitudinea razelor ionice ale acestora cu cele ale ionului de calciu [Sudhindra și Gagnani, 2004]; dualitatea și diversitatea efectelor biologice ale ionilor lantanidelor pot fi explicate prin analogia proprietăților acestora cu proprietățile ionului Ca^{2+} [Wang și colab., 2003b].

Primele aplicații biomedicale ale combinațiilor generate de ionii lantanidelor au fost raportate la scurt timp de la descoperirea metalelor rare [Simpson, 1854].

Lantanidele, prin ionii lor, prezintă proprietăți biochimice și farmacologice cu importanță clinică, acționând astfel ca agenți antimicrobieni, anticoagulanți, antivirali și citotoxici [Wang și colab., 2003c; Enyeart și colab., 2002; Zhang și colab., 2000a; Zhang și colab., 2000b; Acton, 2013; Liu și colab., 2000; Chan și colab., 2015].

Datele de literatură indică pentru unii ioni ai metalelor rare proprietăți inhibitorii în peroxidarea lipidică asociată cu ROS, oxidarea proteinelor membranare și interacțiunea cu radicalii liberi [Wang și colab., 2003b; Hu și colab., 2013]. Ionii Ce(III) și Gd(III) au fost raportați pentru efectele lor asupra proliferării celulare [Cotton și Harrowfield, 2012; Rai și colab., 1997; Daire și colab., 2017].

Cercetări recente demonstrează utilizarea nanoparticulelor de lantan în detectarea biomarkerilor tumorali, cum ar fi receptorul de activare a plasminogenului prin urokinaza, antigenul carcinoembrionar; identificarea unei proteine asemănătoare mucinei din celulele MCF-7 umane de cancer de sân și detectarea acidului lysophosphatidic (biomarker a cancerului ovarian) [Beaufort și colab., 2014]. De asemenea, nanoparticulele lantanidelor prezintă acțiune citotoxică pentru carcinomul cu celule scuamoase, carcinomul hepatocelular, pancreatic și celulele tumorale ale epiteliului alveolar [Wason și Zhao, 2013].

Combinațiile complexe generate de ionii lantanidelor au aplicabilitate în analize imunologice, în screeningul selectiv și în determinări ale activității enzimatică [Hagren și colab., 2008; Bünzli, 2010; Hemmilä și Laitala, 2005; Mizukami și colab., 2008; Laitala și colab., 2007]. Astfel, aplicații recente descriu metode de analiză a autoantigenilor în diabet [Westerlund-Karlsson și colab., 2003; Ankelo și colab., 2003], în analiza DELFIA utilizată pentru determinarea diferitelor sulfonamide și proteine [Korpimäki și colab., 2004], în dozări hormonale TSH [Pelkkikangas, 2004], în determinarea valorilor insulinei [Yuan și colab., 2004] și a antigenului hepatitei [Hai și colab., 2004; Armelao și colab., 2016].

Pe baza proprietăților paramagnetice, ionii lantanidelor au fost introduși ca agenți de contrast în imagistică prin rezonanță magnetică (RMN), aceasta fiind una dintre cele mai actuale tehnici de diagnostic și cercetare biomedicală. În prezent, complecșii Gd(III) sunt utilizați pe scară largă ca agenți de contrast în diagnoza tumorilor hepatice, craniene sau a tumorilor de sân, în chirurgia cardiacă pentru vizualizarea fluxului sanguin [Bilow, 2002; Reimer și Vosshenrich, 2004; Knopp, 2004; Evans, 1990]. De asemenea, combinații complexe ale Eu(III), Tb(III), Sm(III), Dy(III) sau Tm(III) sunt raportate în literatură pentru aplicabilitate în tehnici de diagnoză medicală.

Mai mult, a fost demonstrat că ionii lantanidele pot favoriza absorbția celulară a anumitor medicamente, de ex. cisplatină, prin creșterea permeabilității celulare [Canada și colab., 1995].

Radioizotopii lantanidelor au capacitatea de a emite radiații α , β și γ ce pot fi utilizate în terapia antitumorală. ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{171}Eu și ^{157}Dy au fost studiați în radioterapia metastazelor în cancerul de sân sau prostată [Marciniak și colab., 1996].

Proprietățile antiinflamatorii și antineoplazice dovedite de combinațiile ionilor lantanidelor largesc spectrul de aplicabilitate al acestora și către imunoterapie, sub forma de noi sisteme bazate pe nanoparticule care încorporează potențiatori imuni și α -emițători pe bază de lantanide. Potențiatorii imuni funcționează ca adjuvanți ai vaccinului, în timp ce α -emițătorii, protejează celulele sănătoase de efectul radiațiilor.

Concentrația este factorul esențial pentru trecerea efectelor biologice ale ionilor lantanidelor de la toxicitate la efect farmacologic, de la daune la protecție, sau de la up-reglarea prin sensibilizare la down-reglarea prin desensibilizare.

Traykova și colab [2014] consideră că efectele adverse ale lantanidelor sunt puternice la administrarea de săruri simple (cloruri, nitrați) și minore la administrarea acestora sub formă de complecși cu molecule organice.

Toxicitatea diferitelor săruri de neodim variază astfel: clorură<propionat<acetat<3-sulfoisonicotinat<sulfat<nitrat. Sărurile neodimului sunt foarte iritante la nivelul pielii, al mucoaselor membranare și la nivel ocular; ionul trivalent al neodimului provoacă, la concentrații ridicate, embolism pulmonar și afecțiuni renale.

Studii privind toxicitatea hepatică a clorurilor de lantan, ceriu și neodim [Huang și colab., 2011] au demonstrat acumularea ionilor metalici cu producerea de leziuni oxidative în nucleeele și mitocondriile hepatice.

Toxicitatea ionilor lantanidelor poate fi redusă prin utilizarea agenților de chelare dar și de dexametazonă și glucocorticoizi.

Rezultate experimentale au demonstrat eficiența antitumorală a complecșilor generați de ionii Nd(III) și La(III) asupra celulelor de tip MDA-MB-231(cancer de sân) și DU-145 (cancer de prostată) [Saha și colab., 2016; Caporale și colab., 2017].

Ținând cont de rezultatele recente prezentate în literatura de specialitate privind aplicațiile terapeutice ale combinațiilor generate de ionii trivalenți ai lantanidelor, obiectivul principal al tezei a vizat obținerea, caracterizarea structurală și evaluarea potențialului antitumoral al unor noi combinații complexe cu ioni ai La(III) și Nd(III) și liganzi N-heterociclici.

Tehnici de investigare clasice și moderne au fost aplicate în studiul complecșilor; datele obținute au permis elucidarea mecanismelor și fenomenelor chimice ce au loc în soluție și a mecanismului de acțiune în mediul biologic.

Partea experimentală

În domeniul biomedical se evidentiază aplicații multiple ale combinațiilor complexe generate de ionii lantanidelor, aplicații ce vizează în principal identificarea și distrugerea formațiunilor de natură tumorală [Cotton, 2012; Tanner, 2011; Rosenani și colab., 2012; Bünzli, 2010].

În încercarea de a încadra tematica tezei de doctorat în stadiul actual al studiilor ce vizează obținerea de noi substanțe active cu potențial antitumoral, obiectivele cercetărilor experimentale au urmărit:

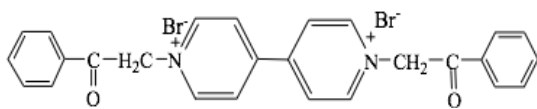
- *Sintetiza de noi molecule de tipul unor complecși ai La(III) și Nd(III) cu liganzi N-heterociclici. În realizarea sintezelor au fost evaluați factorii ce influențează capacitatea coordinativă a liganzilor în raport cu ionii La(III) și Nd(III) și parametrii reacțiilor de sinteză care să permită obținerea în condiții de laborator a unor complecși cu grad de puritate ridicat și să asigure reproductibilitatea reacțiilor.*
- *Studiul proprietăților structurale și spectrale ale noilor molecule sintetizate, studii realizate prin utilizarea unor metode fizico–chimice moderne: FT-IR, RMN, spectroscopie de fluorescență, termogravimetrie, analiză structurală XRD, SEM-EDAX.*
- *Evaluarea proprietăților redox ale liganzilor și noilor complecși prin voltametrie ciclică, în scopul identificării capacității acestor molecule de a participa la reacții cu schimb de electroni în mediul biologic.*
- *Evaluarea în vitro la nivel celular a complecșilor La(III) și Nd(III) cu liganzi de tip dibromură de N,N' bis-fenacil-4,4'-bipiridiniu utilizând celule tumorale aparținând liniilor celulare MCF₇ și A₂₇₈₀.*

Derivați de N,N' bis-fenacil-4,4'-bipiridiniu – sinteză și proprietăți

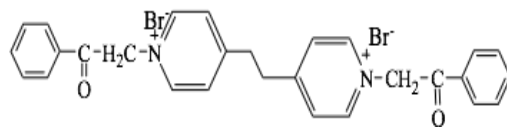
Liganzii utilizați în reacțiile de sinteză a combinațiilor complexe ale La(III) și Nd(III) au fost sintetizați conform metodei prezentată în literatură [Druta și colab., 1998; Furdul și colab., 2007] și caracterizați prin analiză elementală și analiză spectrală FT-IR, RMN și UV-VIS.

- *dibromura de N,N'bis(fenacil)-4,4'-bipiridiniu (L₁)*
- *dibromura de N,N' bis(fenacil)-1,2-bis(4-piridil)etan (L₂)*

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice



dibromură de *N,N'* bis(fenacil)-4,4'-
bipiridiniu (L_1)



dibromură de *N,N'* bis(fenacil)-1,2-bis(4-
piridil)etan (L_2)

Structuri ale liganzilor utilizați în reacția de complexare

Analiza elementală (C, H, N, S) a compuşilor din probele solide purificate s-a realizat într-un cuptor al analizorului Fisons Instruments 1108 CHNSO (Universitatea din Camerino, Italia). Spectrele IR au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru cu transformată Fourier, tip Nicolet iS50 FT-IR, Thermo Scientific, echipat cu un accesoriu ATR încorporat, un detector DTGS și un dispozitiv de decodificare KBr (la 21°C). Analiza RMN a liganzilor s-a realizat la temperatura camerei în dimetilsulfoxid (DMSO) folosind un spectrofotometru VXR-300 Varian (Universitatea din Camerino, Italia) care operează la 400 MHz, folosind tetrametilsilan (TMS) ca standard intern. Măsurătorile spectrofotometrice au fost realizate cu Spectrofotometrul T90+, în cuve de 1 cm, confecționate din cuarț.

Bromura de *N,N'* bis-(fenacil)-4,4'-bipiridiniu (L_1)

- cristale galbene, greu solubile în apă, solubile în alcool.
- se obține cu randament 90%, în reacția dintre precursorul de bipiridil ($C_{10}H_8N_2$) și bromură de fenacil ($C_6H_5C(O)CH_2Br$)
- $C_{26}H_{22}Br_2N_2O_2$, $M = 554 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- analiza elementală (%)- calc. (exp.): C: 56.31(56.23), H: 3.97 (3.43), N: 5.05 (5.17).
- IR (KBr, cm^{-1}): 1677; 3100; 3092; 2987; 2995; 1625; 1578; 1592; 1557
- ^1H -RMN (75 MHz), DMSO- d_6 /ppm: 6,65 (s, Hc); 7,65-7,89 (m, 6 H, 4 He, 2 Hf); 8,15(d, 4 Hd); 8,91 (d, 4 Hb); 9,35 (d, 4 Ha).

Bromura de *N,N'* bis-(fenacil)-1,2-bis(4-piridil)-etan(L_2)

- cristale alb murdar, solubile în alcool.
- se obține cu randament de 92%, din precursorii 1,2-bis(4-piridil)etan ($C_{12}H_{12}N_2$) și bromură de fenacil ($C_6H_5C(O)CH_2Br$).
- $C_{28}H_{26}Br_2N_2O_2$, $M = 582,33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- analiza elementală (%)-calc. (exp.): C: 57.75 (57.53), H: 4.50 (4.68), N: 4.81 (4.91).
- IR (KBr, cm^{-1}): 3009; 2948; 1691; 1637; 1594, 1570, 1518; 1228; 995.
- ^1H -RMN (75 MHz), DMSO- d_6 /ppm: 8.96 (d, $J_{\text{H}} 46.8 \text{ Hz}$, 4H), 8.27 (d, $J_{\text{H}} 46.8 \text{ Hz}$, 4H), 8.09 (d, $J_{\text{H}} 48.8 \text{ Hz}$, 4H), 7.82 (t, $J_{\text{H}} 7.43 \text{ Hz}$, 2H), 7.69 (t, $J_{\text{H}} 7.8 \text{ Hz}$, 4H), 6.48 (s, 4H: 2CH₂), 3.50 (s, 4H: 2CH₂).

Evaluarea spectrală UV-Vis privind stabilitatea liganzilor s-a realizat în medii diferite (apos, alcoolic și aprotic) și la intervale de timp diferite. Liganzii N-heterociclici prezintă, atât în mediul apos cât și în mediul aprotic, un maxim în domeniul spectral $\lambda = 240-260$ nm, maxim dependent de pH-ul și concentrația soluțiilor analizate [Dinică și colab., 2007; Cârâc și colab., 2017b].

În scopul evaluării comportamentului electrochimic, a stabilității și performanțelor electrochimice, dibromura de N,N-bis(fenacil)-4,4'-bipiridiniu (L_1) și dibromura de N,N-bis(fenacil)-1,2-bis(4-piridil)-etan (L_2), au fost studiate prin voltametrie ciclică, în mediul apos [Cârâc și colab., 2015b] și mediul aprotic [Cârâc și colab., 2017a] la potențialul aplicat de $E \pm 1$ V, pentru diferite viteze de scanare ($100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$). S-a utilizat un echipament Biologic potențiostat/galvanostat, tip SP-150 (Franța), un potențiostat performant cu un singur canal; o celulă electrochimică clasică și trei electrozi: electrodul de referință (ER-calomel saturat (SCE)), electrodul de lucru (EL-din Pt-platină) și electrodul auxiliar (EA- fir de Pt). Rezultatele studiilor de voltametrie ciclică au sugerat pentru ligandul L_1 un potențial de schimb electronic favorabil comparativ cu ligandul L_2 , rezultate determinate de aranjamentul structural a celor două molecule.

Sinteza combinațiilor complexe ale ionilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N-heterociclici bipiridinici

- *Sinteza combinațiilor complexe ale La(III) și Nd(III) cu dibromură de N, N'-bis-fenacil-4,4'-bipiridiniu (L_1)*

Sinteza combinațiilor complexe ale La(III)- L_1 și Nd(III)- L_1 s-a realizat în metanol prin reacția ligandului bipiridinic cu sulfatul de lantan sau de neodim, în prezență de trietilamină. Peste 0.5 mmoli ligand, dizolvat complet în 20 mL metanol (prin agitare și încălzire la 60°C), s-au adăugat 0.5 mmoli $\text{Ln}_2(\text{SO}_4)_3$ ($\text{Ln} = \text{La}, \text{Nd}$) și după câteva minute 1 mL trietilamină; amestecul de reacție s-a menținut la reflux sub agitare continuă timp de 2 ore. După răcire, produsul de reacție a fost filtrat, spălat cu metanol și apoi cu apă distilată. S-au obținut probe solide de culoare violet care au fost uscate la vid (50°C , $\sim 10^{-4}$ bar) până la o masă constantă. Reacția de sinteză a complexului La(III)- L_1 a decurs cu un randament 85% în timp ce complexul Nd(III)- L_1 a fost obținut cu un randament de 80%.

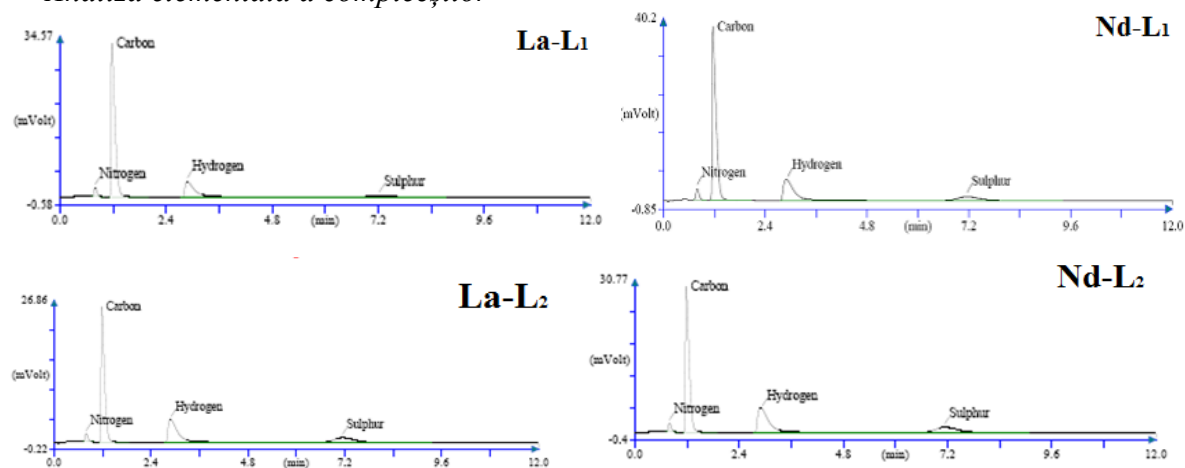
- *Sinteza combinațiilor complexe ale La(III) și Nd(III) cu dibromura de N,N' bis-fenacil-1,2-bis(4-piridil) etan (L2)*

Complecșii La(III)-L₂ și Nd(III)-L₂ au fost preparați printr-un procedeu similar celui prezentat la complexarea ligandului L₁, utilizând ca mediu de reacție metanolul și un raport de combinare ion metalic:ligand de 1:1. S-au obținut precipitate de culoare bej pentru ionul La(III) ($\eta=55\%$) iar pentru ionul Nd(III) ($\eta=45\%$) un alb-murdar. Pentru ambii liganzi s-au încercat reacții de complexare și în mediul apos (folosind apă distilată ultrapură) dar s-au obținut cantități mici de precipitat (chiar și pentru timpi de reacție mai mari), în timp ce pentru reacțiile în metanol depunerile de precipitat au fost semnificative.

Într-o prima etapă, produșii rezultați în reacțiile de complexare au fost evaluați prin: analiză elementală, măsurători de pH și conductibilitate, analiză spectrală UV-Vis, FT-IR, RMN. În plus, s-au realizat studii de evaluare a potențialului fluorescent al compușilor sintetizați, în raport cu polaritatea solventului.

Analiza elementală a complecșilor s-a realizat cu analizor de tip Fisons Instruments 1108 CHNSO. Măsurătorile de pH s-au realizat cu ajutorul pH-metrului Metler Toledo iar cele de conductibilitate utilizând echipamentul Consort C862. Spectrele IR ale complecșilor au fost înregistrate pe domeniul spectral 4000-450 cm⁻¹ folosind spectrometru cu transformată Fourier, Spectrum Two IR, Perkin Elmer. Determinările experimentale în analiza structurală RMN a complecșilor La(III)-L₁ și La(III)-L₂ s-au efectuat cu spectrometru Bruker 400 Ultrashield (400 MHz) și DMSO deuterat ca solvent. Datorită proprietăților paramagnetice ale ionului Nd(III), combinațiile complexe ale Nd(III) nu au fost analizate structural prin RMN. Spectrele de fluorescență s-au înregistrat la temperatura camerei, cu spectrofotometru Perkin-Elmer, TECAN (Infinite M 200) în intervalul spectral $\lambda = 280 - 850$ nm, mărimea pasului de emisie a fost de 2 nm $\lambda_{excitație} = 260$ nm, 230 nm și 250 nm.

Analiza elementală a complecșilor

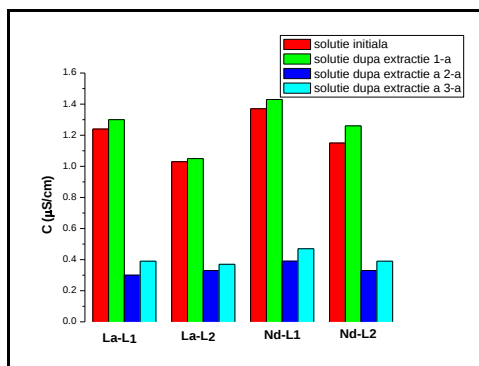


Spectre rezultate la analiza elementală a complecșilor La(III) și Nd(III) cu liganzii L₁ și L₂

Rezultatele analizei elementale ale complecșilor La(III) și Nd(III) cu liganzii L₁ și L₂

Compusul	N %		C %		H %		S %	
	calculat	confirmat	calculat	confirmat	calculat	confirmat	calculat	confirmat
La(III)-L₁	3,35	3,14	31,64	30,24	3,21	3,14	7,68	8,27
Nd(III)-L₁	3,85	3,56	38,99	39,11	3,43	3,27	5,29	5,25
La(III)-L₂	3,27	2,02	30,91	21,16	3,20	3,25	7,49	9,63
Nd(III)-L₂	3,25	1,83	30,67	27,98	3,17	2,88	7,43	8,61

În continuarea studiilor, precipitatele obținute au fost dizolvate, prin trei extracții succesive în metanol. Probele obținute au fost filtrate, apoi dizolvate complet în metanol sub agitare. După 24 de ore fracțiunile alcoolice, rezultate din extracțiile succesive în metanol, au fost evaluate prin *măsurători de pH și conductivitate*. S-a observat că în filtrat, pH-ul inițial este alcalin și prezintă o scădere pentru toate fracțiunile rezultate prin extracțiile succesive cu metanol. Extractele metanolice ce conțin ioni La(III) și L₁ indică un pH alcalin (pH=11) ce scade cu până la o unitate de pH, la a treia extracție. Valorile înregistrate pentru conductivitate pe fracțiile analizate, indică diferențe de ordinul $\mu\text{S/cm}$, cu o valoare de $2\mu\text{S/cm}$ mai mare pentru complexul Nd(III)-L₁. În primele două extracte metanolice pentru ambii ioni de lantan cu L₁ se observă diferențe de disociere mai mici, cu valori de $0,20\mu\text{S/cm}$, ceea ce sugerează faptul că L₁ rămâne angajat în procesul de complexare cu ioni lantanidelor.



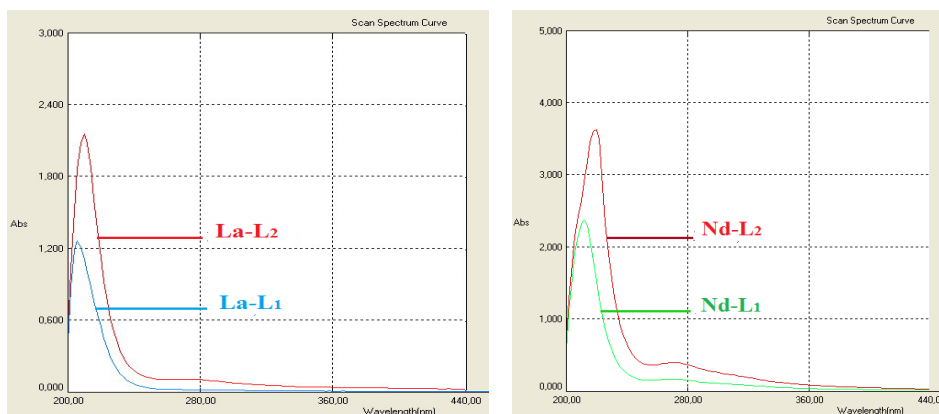
Variația conductibilității în extractele succesive ale precipitatelor rezultate în reacțiile de sinteză

Spectre de absorbție

În spectrele de absorbție ale complecșilor sintetizați (soluții metanolice) se evidențiază următoarele valori ale parametrilor spectrali: **La(III)-L₁**: $\lambda_{\text{max}}=206\text{nm}$, $\varepsilon=10164 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; **Nd(III)-L₁**: $\lambda_{\text{max}}=212\text{nm}$, $\varepsilon=20076 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; **La(III)-L₂**: $\lambda_{\text{max}}=208\text{nm}$, $\varepsilon=14984 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; **Nd(III)-L₂**: $\lambda_{\text{max}}=220\text{nm}$, $\varepsilon=30644 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice

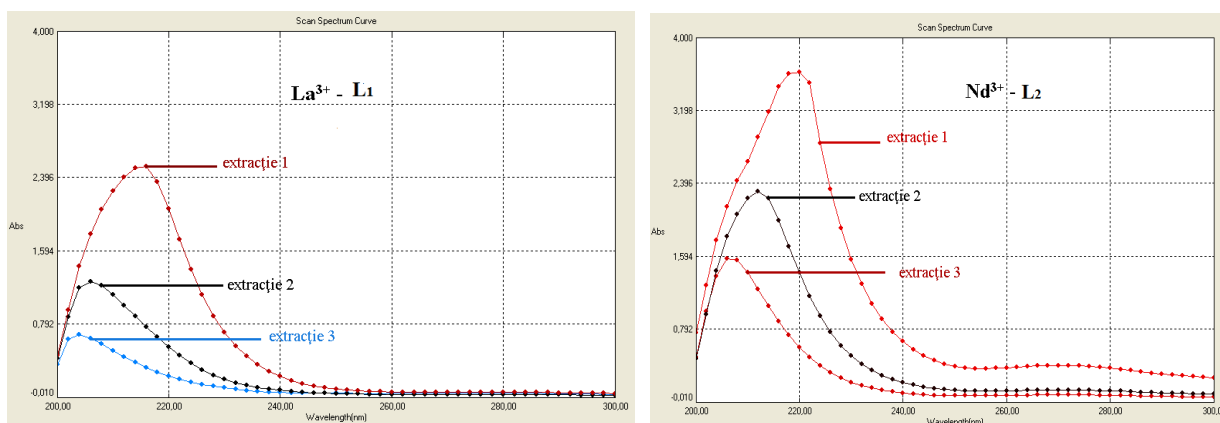
Diferențele spectrale indică aranjări preferențiale ale liganzilor N-heterociclici în structura complexelor cu ioni La(III) și Nd(III) .



Spectre UV-Vis ale soluțiilor metanolice ce conțin complecșii La(III) și Nd(III) cu liganzii N-heterociclici

Pentru o monitorizare riguroasă a procesului de complexare, s-au efectuat analize spectrale pentru probe prelevate din amestecul de reacție, probe separate prin filtrare și dizolvate în metanol.

S-au realizat trei extracții succesive, prin adăugare a 10 mL metanol în fiecare probă. Soluțiile metanolice rezultate au fost analizate spectral după 24 de ore. Deplasarea maximelor de absorbție spre valori mai mari ale λ , la creșterea volumului de metanol, se explică prin scădere a energiei tranziției permise de tip $\pi \rightarrow \pi^*$ la interacțiunile cu moleculele de solvent, iar deplasarea spre λ mai mici se explică prin creșterea energiei de tranziție $n \rightarrow \pi^*$.



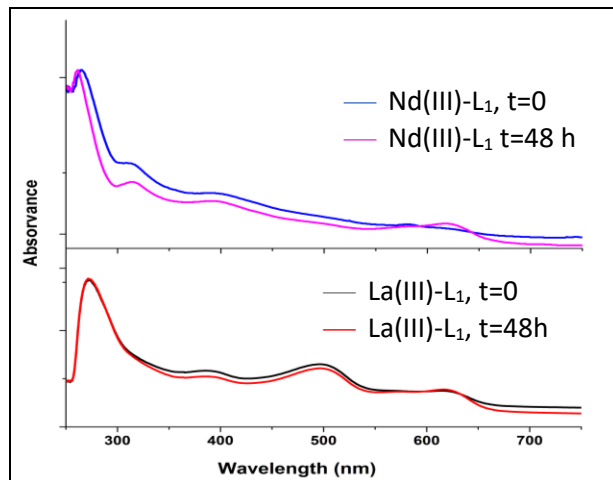
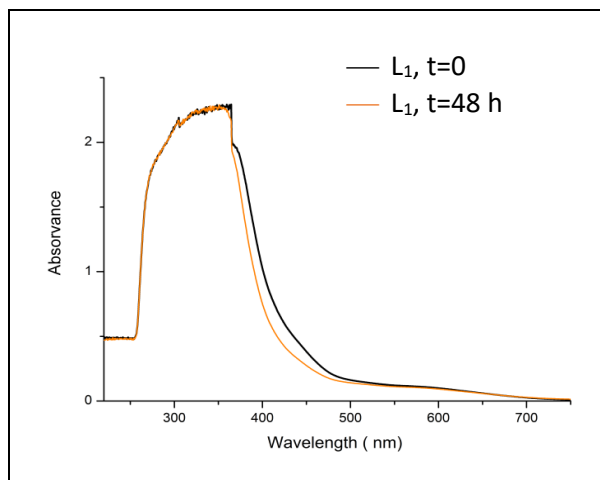
Spectre de absorbție ale soluțiilor metanolice ce conțin sistemele La(III)-L1 și Nd(III)-L2

Analiza spectrală a probelor obținute la dizolvarea completă a precipitatelor (după trei extracții succesive) indică un minim al absorbantei la $\lambda = 270-276\text{nm}$ în ordinea: $\text{Nd(III)-L}_2 < \text{Nd(III)-L}_1 < \text{La(III)-L}_1 < \text{La(III)-L}_2$.

Valoarea cea mai mare înregistrată pentru intensitatea absorbantei în cazul Nd(III)-L_2 comparativ cu La(III)-L_2 indică o strategie de coordinare influențată de natura ligandului și ionul metalic, cu apariția unor diferențe structurale între complecșii rezultați din sinteză.

Evaluarea biologică a combinațiilor complexe sintetizate a evidențiat proprietăți citotoxice remarcabile pentru structurile complexe generate de dibromura de N,N'-bis-fenacil-4, 4'-bipiridiniu cu ionii La(III) și Nd(III) . De aceea, cercetările experimentale au vizat și evaluarea comportamentului spectral al structurilor menționate în soluții alcoolice și soluții în DMSO, folosind ca variabile timpul și concentrația de substanță activă.

Studiile spectrale privind stabilitatea în timp a soluțiilor etanolice ($c=3 \cdot 10^{-5}\text{M}$) de ligand sau combinație complexă, au evidențiat clar stabilitatea în timp a structurii L_1 și instabilitatea moleculelor complexe ale La(III) și Nd(III) . Studiul spectral al complecșilor La(III)-L_1 și Nd(III)-L_1 în DMSO s-a realizat la temperatura camerei la diferite intervale de timp; rezultatele obținute au confirmat stabilitatea complecșilor La(III)-L_1 și Nd(III)-L_1 în DMSO la o concentrație de 10^{-5}M , timp de 48 de ore.



Spectre UV-Vis ale L_1 , La(III)-L_1 și Nd(III)-L_1 în DMSO ($c=10^{-5}\text{M}$) inițial și după 48h

Spectre de fluorescență

Pentru a evidenția profilul fluorescent al complecșilor La(III) și Nd(III) cu liganzii N-heterociclici bipyridinici, în prezența solvenților cu polarități diferite, s-au înregistrat spectrele de fluorescență în apa ultrapură și metanol. Rezultatele au confirmat potențialul fluorofor (mai accentuat în metanol decât în mediul apos) pentru soluțiile complecșilor ionilor lantanidelor cu liganzii N heterociclici. Cea mai mare intensitate de fluorescență s-a înregistrat pentru complexul Nd(III)-L₁ (cu aport de Et₃N) datorită efectelor de conjugare directă ce apar între electronii inelelor piridinice. Analiza spectrelor de fluorescență înregistrate pentru complecșii ionilor La(III) și Nd(III) indică diferențe în valorile intensității de emisie, dependente de natura ionului metalic, a ligandului și natura solventului.

Parametrii spectrali ai complecșilor La(III) și Nd(III) (soluții în metanol)

Parametrul spectral	La(III)-L ₁	La(III)-L ₂	Nd(III)-L ₁	Nd(III)-L ₂
$\lambda_{\text{max, exc.}}$ (nm)	260	260	260	260
$\lambda_{\text{max, emisie}}$ (nm)	326	324	326	326
$I_{\text{Fmax.}}$ (u.a)	18917	19604	18902	18790

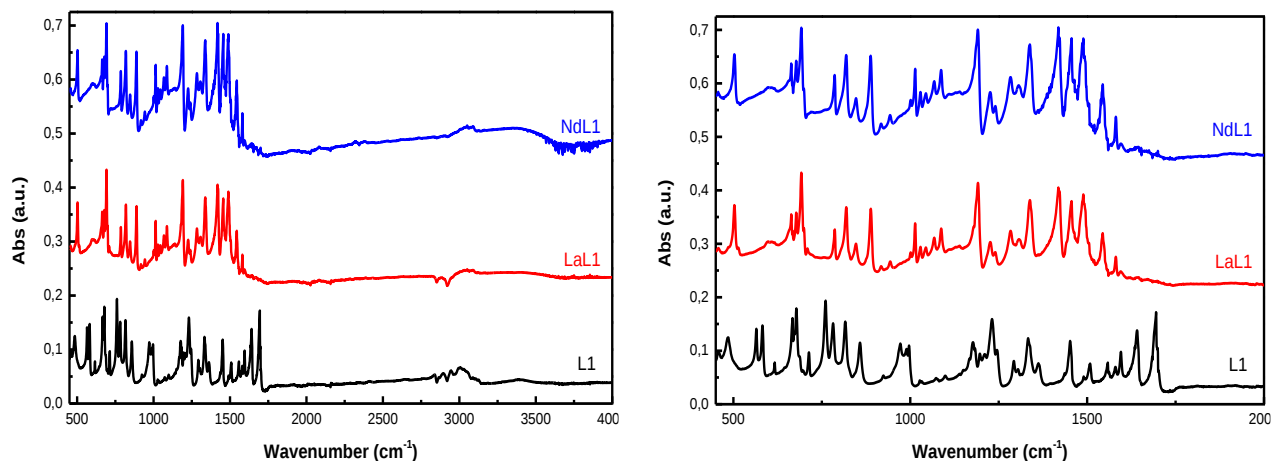
Caracterizarea structurilor complexe prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier

Datele obținute prin analiza FT-IR (domeniul spectral 4000–650cm⁻¹) pentru combinațiile complexe, permit obținerea de informații privind existența și tăria legăturii ion metalic–ligand, prin corelare cu valori ale frecvențelor de vibrație corespunzătoare tranzițiilor din molecula ligandului.

Datele de literatură, indică faptul că atunci când densitatea electronică crește la ionul generator de complex și ligandul conține atomi de oxigen sau azot în moleculă, scăderea valorilor frecvenței de vibrație asociată legăturii metal-ligand este corelată cu o creștere a tăriei legăturii coordinative de tip ion metalic–ligand [Derenne și colab., 2013]. În spectrele FT-IR înregistrate pentru liganzi și combinațiile complexe corespunzătoare, se remarcă trei zone spectrale distincte: 3300-1600cm⁻¹, 1600-1000cm⁻¹ și sub 1000cm⁻¹. Semnalul înregistrat sub forma unei benzi largi (datorate asocierilor prin legături de hidrogen) care apare la 3344-3373cm⁻¹, poate fi asociat frecvențelor de vibrație corespunzătoare grupelor –OH; semnalul spectral lipsește în spectrele liganzilor dar apare în spectrele complecșilor ca rezultat al efectului de solvent (metanolul din reacția de sinteză). Coordinarea liganzilor N-heterociclici bipyridinici la ionul La(III) sau Nd(III) este confirmată de

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice

prezența în spectrele complecșilor a benzilor de absorbție ν_{CHarom} poziționate la $3054\text{--}3061\text{cm}^{-1}$, cu o ușoară deplasare spre stânga comparativ cu cele din spectrele liganzilor.



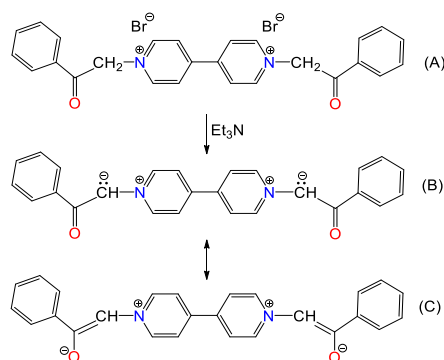
Spectre FT-IR pentru La(III)-L₁, Nd(III)-L₁ și ligandul L₁

Parametrii spectrali FT-IR pentru complecșii La(III) și Nd(III) și liganzii L₁ și L₂

Compus	ν_{OH}	ν_{CHarom}	$\nu_{\text{C=O}}$ ν_{sulfat}	$\nu_{\text{C=N}}$	$\nu_{\text{C=N}}$ $\nu_{\text{C=C}}$	$\nu_{\text{N=O}}$	$\nu_{\text{C-O-C}}$	ν_{sulfat}	$\nu_{\text{C-eth.}}$	$\nu_{\text{C-S}}$	$\nu_{\text{C-H}}$ nucleu	ν_{lig}	$\nu_{\text{La-O}}$
L ₁		3040-3000	1700 1670	1640- 1630			1200 1100						
L ₂		ν_{CHaliph} 2900-2880							990				
La(III)-L ₁	3367	3059	1697 1596	1641	1490 1450 1408	1341		1087 1036		888 804	760 719	690	
La(III)-L ₂	3373	3061	1693 1598	1641	1474 1450	1346	1231	1095w 1036w	961	842	760	689	
Nd(III)-L ₁	3373	3054	1697 1581 1596 1544	1642	1489 1455 1420	1339 1308	1284 1225	1191 1085 1049 1014		888 846 819	786 758 717	692 677	406 455 487
Nd(III)-L ₂	3344		1695 1598 1574 1519	1642	1474 1451	1345	1233	1183 1041	996	845	760		432

Prezența ionului sulfat în spectrele IR ale complecșilor este confirmată de benzile intense din regiunea spectrală $1190\text{--}1036\text{ cm}^{-1}$. În cazul coordinării de tip punte la fiecare bandă se observă o scindare în mai multe componente. Pentru anionii sulfat din complexul de Nd(III)-L₁ sunt identificate o serie de benzi ce indică coordinarea lor de tip punte. În spectrele IR ale complecșilor benzile cele mai intense apar la 1191cm^{-1} , 1085cm^{-1} , 1049cm^{-1} și 1014cm^{-1} . Benzile identificate la

690cm⁻¹ în spectrul complexului La(III)-L₁ respectiv 689cm⁻¹ pentru La(III)-L₂ pot fi atribuite vibrațiilor de valență ce se manifestă în structura liganzilor N heterociclici (L₁ și L₂) [Nelson și colab., 2013]. Spectrele IR ale complecșilor prezintă o bandă intensă și una de intensitate medie în regiunea 1490–1420cm⁻¹ care pot fi atribuite vibrațiilor C=C și C=N din dublele legături ale nucleului aromatic. Prezența legăturilor de tipul C=N din cadrul complecșilor sintetizați este confirmată de benzile înregistrate la 1641cm⁻¹, benzi prezente la aceeași frecvență în spectrele liganzilor L₁ și L₂. În concordanță cu date raportate anterior [Derenne și colab., 2013], banda poziționată la 1640cm⁻¹ se poate datora existenței moleculelor de apă (sau grupărilor -OH) coordinate la ionul metalic. Dacă spectrul FT-IR al ligandului L₁ prezintă o bandă intensă la ~1700cm⁻¹, specifică grupării carbonil C=O, în spectrele FT-IR ale complecșilor corespunzători această bandă lipsește, fapt ce confirmă transformarea ligandului sub acțiunea Et₃N, cu apariția unei benzi de intensitate medie la 1010cm⁻¹ și o bandă slabă la 1063cm⁻¹, care pot fi atribuite frecvențelor de vibrație din grupările -C=CH și C-O rezultate prin transformarea grupei carbonil.



Mecanismul de transformare a ligandului L₁

De remarcat este faptul că, în spectrele complecșilor La(III) și Nd(III) cu ligandul L₂ se distinge o bandă poziționată la 990cm⁻¹ specifică grupării etilenice poziționată simetric (ν_{C-etilenică}).

În cazul complexului La(III)-L₂ se observă o deplasare a acestei benzi spre stânga cu 30cm⁻¹ iar pentru complexul Nd(III)-L₂ o deplasare de doar 6cm⁻¹, datorită razei ionice diferite a ionilor metalici. Stabilirea unor legături covalent coordinative între ionul La(III) sau Nd(III) cu heteroatomii liganzilor, oxigen (sau azotul din coligandul Et₃N) este confirmată de prezența benzilor specifice între 430-460cm⁻¹.

Analiza termogravimetrică a structurilor complexe generate de ionii La(III) și Nd(III)

Studiile experimentale privind comportarea termică a compuşilor sintetizați s-au realizat în cadrul laboratorului de cercetare al CSSNT București, cu un echipament de tip Perkin Elmer STA 6000 Simultaneous Thermal Analyzer și au vizat evaluarea stabilității termice a complecșilor La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ comparativ cu ligandul L₁, precum și evaluarea pierderilor de greutate prin încălzire de la temperatura camerei la 1200°C în atmosferă de azot. Rezultatele obținute au confirmat stabilitatea ligandului L₁ în intervalul de temperatură de 25°C-300°C, cu o etapă de descompunere la 294°C și o pierdere în masă de 99,3 % [Furdui și colab., 2012].

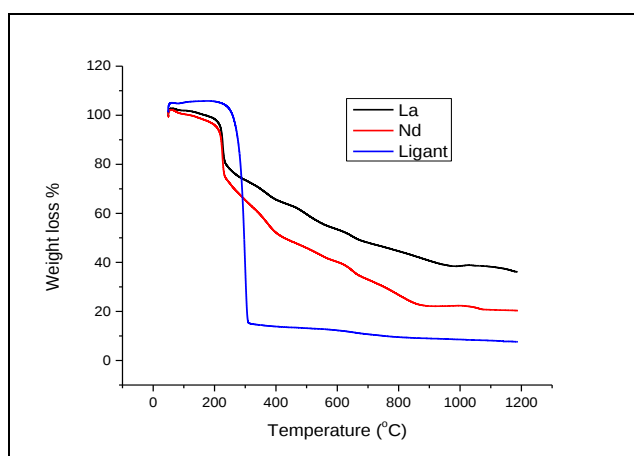


Diagrama termogravimetrică comparativă pentru complecșii La(III) și Nd(III) cu ligandul L₁

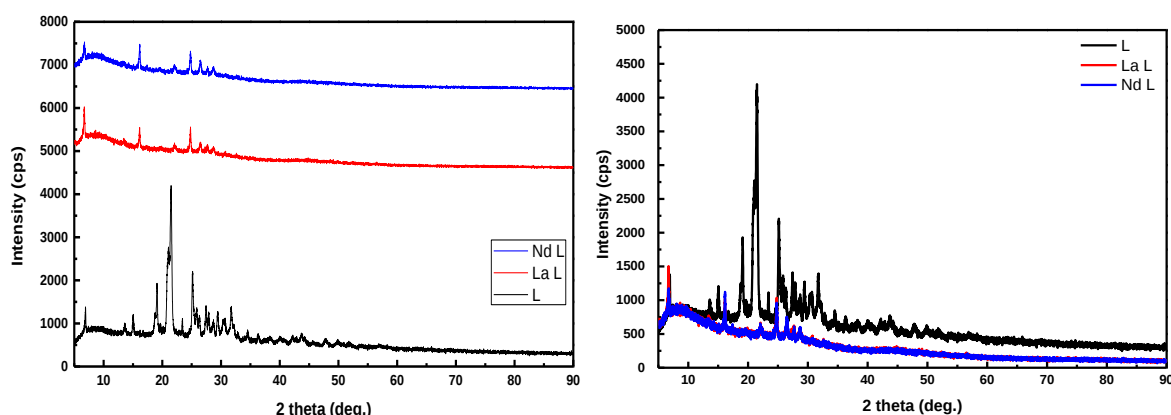
Complecșii La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ au prezentat o stabilitate ușor mai scăzută față de ligandul L₁, (descompunere la aproximativ 205°C). La această temperatură, o descompunere rapidă a complecșilor a înregistrat o pierdere în greutate de cca. 18,5% pentru La(III)-L₁ și cca. 16,5% pentru Nd(III)-L₁, pierderi corelate cu evaporarea moleculelor Et₃N coordonate în ambii complecși.

Descompunerea a fost progresivă până la 1200°C, cu evoluția completă a trei grupări sulfat și a ligandului, de cca. 59,5% pentru La(III)-L₁ (pierdere teoretică în greutate 58,6 %) și cca. 54,9 % pentru Nd(III)-L₁ (pierdere teoretică în greutate 55,7%). Reziduurile finale au fost asociate ionului metalic (La(III) și Nd(III))cu punct de topire ridicat.

Datele experimentale obținute prin tehnica TG–TGA au confirmat stabilitatea termică ridicată a complecșilor La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ la temperaturi de peste 1100°C și aduc argumente favorabile structurilor propuse.

Analiza structurală prin difracție de raze X a complecșilor La(III) și Nd(III)

Analiza XRD a fost realizată în laboratorul de cercetare din cadrul Centrului de Știința Suprafețelor și Nanotehnologie, București, pe pulberi ale complecșilor La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ în domeniul de 5-90° (domeniul 2θ). Pentru măsurare s-a utilizat un difractometru Rigaku SmartLab cu difractometru de raze X folosind radiația Cu: K_{β1}=1.39217 Å, K_{α1}=1.540598 Å și Cu K_{α2}=1.544426 Å, utilizând geometria Bragg Brentano, la temperatura camerei cu următorii parametri de lucru: *domeniu de scanare: 5– 90 deg. (2 theta), pasul 0,01 deg, IS = RS = 1/2 deg, RS2 = 0,3 mm. Generatorul a fost setat la 45 Kv și un curent al tubului la 200 mA.* Valorile parametrilor sintetici ai picurilor reprezentative din difractogramele XRD au demonstrat că structurile celor doi complecși La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ sunt izomorfe, prezentând aceleași poziții, cu unghiul 2θ identic sau cu foarte mică abatere.

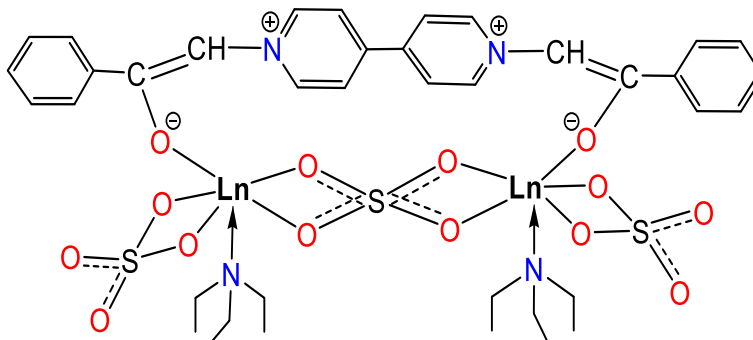


Difractograme XRD comparative pentru complecșii La(III)-L₁, Nd(III)-L₁ și ligandul L₁

Parametrii picurilor reprezentative din difractogramele complecșilor La(III)-L₁, Nd(III)-L₁ și L₁

La(III)-L ₁			Nd(III)-L ₁			L ₁		
2-theta (deg)	d (ang.)	FWHM (deg)	2-theta (deg)	d (ang.)	FWHM (deg)	2-theta (deg)	d (ang.)	FWHM (deg)
6,7266	13,13007	0,1974	6,7110	13,16044	0,1639	6,9200	12,76354	0,1623
13,4979	6,55466	0,231	13,4979	6,55466	0,2310	13,6147	6,49869	0,2563
16,1259	5,49189	0,1717	16,1335	5,48932	0,2032	15,0035	5,90010	0,1721
22,0473	4,02846	0,3958	22,0056	4,03598	0,3902	21,4776	4,13399	0,325
24,7789	3,59020	0,1994	24,7789	3,5902	0,2312	23,3674	3,80377	0,105
26,4876	3,36234	0,3079	26,4372	3,36863	0,2216	26,3515	3,37940	0,2383
28,6679	3,11139	1,5717	28,6423	3,11411	0,2447	28,7437	3,10336	0,3442

Formula structurală propusă pentru complecșii La(III) și Nd(III) sintetizați este de formă generală $\{(\text{Ln}(\text{Et}_3\text{N})(\text{SO}_4))_2(\mu\text{-DPY})(\mu\text{-SO}_4)\}$ ($\text{Ln}=\text{La, Nd}$) [Cârâc și colab., 2018].

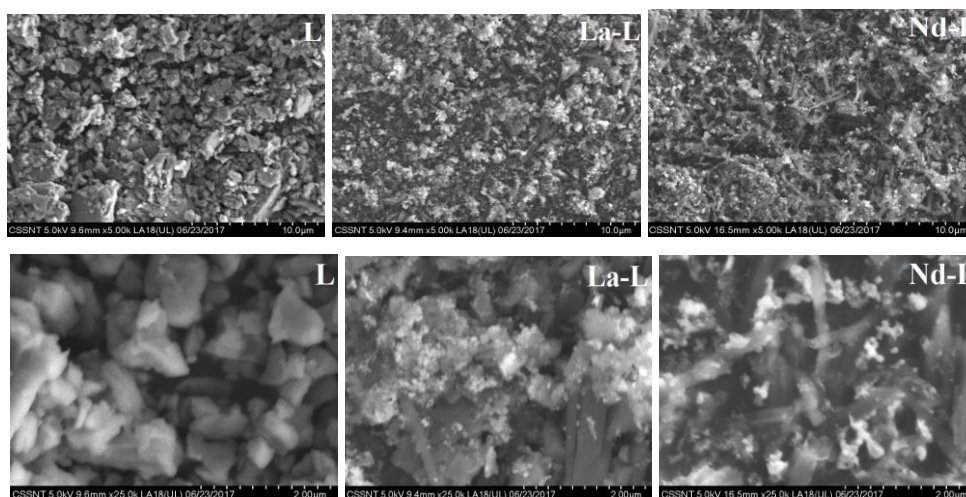


Structura complecșilor $\{(\text{Ln}(\text{Et}_3\text{N})(\text{SO}_4))_2(\mu\text{-DPY})(\mu\text{-SO}_4)\}$ ($\text{Ln} = \text{La, Nd}$)

Pentru combinațiile complexe La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ formulele moleculare propuse sunt: $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{La}_2\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}_3$ ($M = 1160.83 \text{ g mol}^{-1}$) și $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{Nd}_2\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}_3$ ($M = 1171.50 \text{ g mol}^{-1}$).

Analiza morfologică (SEM) și cantitativă (EDAX) pentru complecșii La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁

Morfologia complecșilor La(III) și Nd(III) a fost investigată prin microscopie electronică de scanare (SEM). Pentru analiza SEM a probelor s-a utilizat echipamentul Hitachi SU 8230 Scanning Electron Microscope echipat cu analizorul detector EDX Oxford din laboratoarele Centrului de Știința Superfeței și Nanotehnologie (București). Imaginile de electroni secundari au fost captate la diferite magnificații de la 1kx până la 25kx. Imaginile microscopice electronice ale probelor dezvăluie agregate compuse din mai multe microparticule.

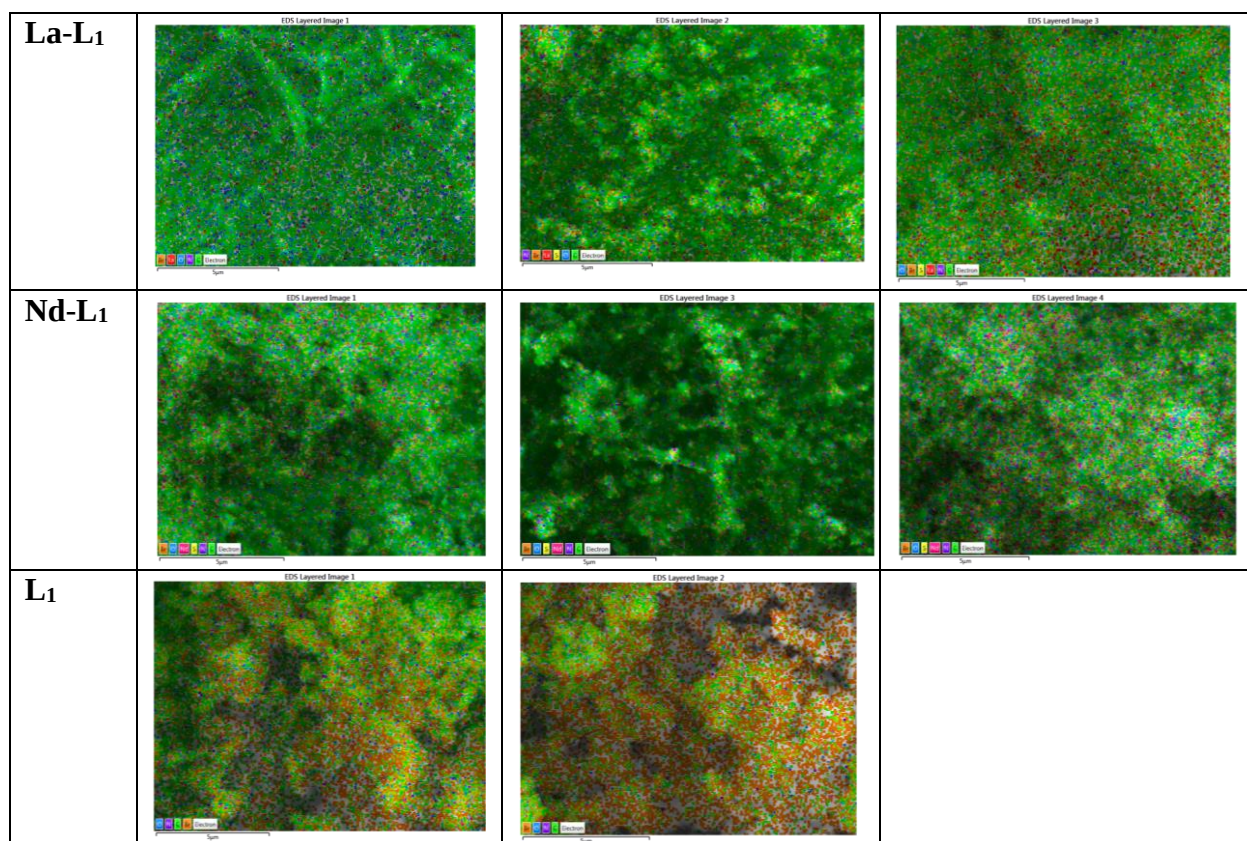


Imagini SEM la complecșii La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ obținute cu magnificație de 5 Kv și 25 Kv

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice

O comparație a imaginilor SEM pentru ambii complecși cu ligandul L_1 indică structuri cu legături covalente, foarte omogene și uniforme. Imaginile SEM a acestor complecși confirmă o textură specifică, fiind implicați în coordinare doi ioni metalici diferiți. Mai mult decât atât, sunt identificați numeroși sferoizi (cu diametrul de aproximativ 1-2 μ m) la suprafață și sugerează implicarea ligandului L_1 în formarea acestei morfologii. Morfologia La(III)- L_1 și Nd(III)- L_1 relevă agregate de nanoparticule cu dimensiuni variind de la 10 la 40 nm, respectiv de la 30 la 250 nm.

Analiza cantitativă a probelor s-a realizat concomitent cu analiza SEM folosind Spectroscopia Energiei Dispersive de raze X (EDAX) în două moduri: cartografiere de achiziție de date a elementelor (hartă de achiziție) și profilul compozițional.



Imagini EDAX de achiziție a elementelor la complecșii lantanidelor comparativ cu ligandul L_1

Se constată că, în general elementele chimice din structura ligandului L_1 (carbon, azot, oxigen, brom) sunt prezente în distribuția elementelor în imaginile EDAX ale complecșilor sintetizați. Totodată, se observă și prezența elementelor din sulfatii de La(III) și Nd(III). Profilul compozițional s-a realizat pe cel puțin trei zone din imaginile SEM ale fiecărei probe, prin colectarea datelor din

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice

cel puțin patru spectre ale fiecărei imagine. Analiza EDAX indică concentrații de 17,5% pentru ionul metalic din proba La(III)-L₁ și respectiv proba Nd(III)-L₁ și înregistrarea de hărți de distribuție uniformă a elementelor specifice.

Din profilul spectrelor EDAX s-au obținut rezultate concludente care confirmă prezența elementelor în compoziția complecșilor analizați. Valorile medii ale elementelor din toate spectrele EDAX achiziționate sunt redate în % greutate și % atomic și indică prezența elementelor în procente apropiate de cele confirmate de analiza elementală pentru ligand și complecși, deși prin SEM și analiza EDAX se realizează o analiză morfologică și cantitativă doar pe un fragment din structurile complexului, aceștia fiind structuri cu masă moleculară mai mare de 1000 g mol⁻¹.

Analiza cantitativă a elementelor (EDAX) pentru La(III)-L₁, Nd(III)-L₁ și L₁ (% greutate)

Proba	C	N	O	Br	Ln	S
La(III)-L ₁	63.23-83.86	1.86-7.87	9.57-25.07	1.47-3.72-	2.43-10.34	0.25-0.78
Nd(III)-L ₁	62.92-82.12	1.42-4.84	11.62-16.56	0.45-0.77	4.04-13.55	0.45-1.36
L ₁	56.08-70.10	4.17-5.07	4.62-6.25	4.04-5.42	-	-

Analiza cantitativă a elementelor (EDAX) pentru La(III)-L₁, Nd(III)-L₁ și L₁ (%atomic)

Proba	C	N	O	Br	Ln	S
La(III)-L ₁	70.86-89.93	1.71-7.56	7.71-21.10	0.25-0.67	0.23-1.08	0.10-0.35
Nd(III)-L ₁	77.45-88.68	1.32-5.10	9.42-15.29	0.45-0.77	0.36-1.39	0.14-0.63
L ₁	81.95-85.52	5.20 -5.32	5.05-5.72	3.44-57.80	-	-

Analiza morfologică SEM completată de analiza cantitativă EDAX a confirmat structurile complecșilor La(III) și Nd(III) cu ligandul L₁, cu compoziție chimică eterogenă.

Evaluarea proprietăților electrochimice ale complecșilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N-heterociclici bipiridinici

Studiile privind evaluarea potențialului de transfer electronic de către moleculele liganzilor N-heterociclici bipiridinici și a combinațiilor complexe ale acestora cu ionii La(III) și Nd(III) au fost justificate de faptul că, multitudinea de procese ce descriu activitatea substanțelor active la nivel celular și subcelular, includ și reacții cu transfer electronic. Studiul electrochimic al complecșilor realizat în DMSO, a indicat prezența unor structuri moleculare cu posibilitate de transfer de electroni, dependent de potențialul aplicat și viteza de scanare. Rezultatele spectroelectrochimice înregistrate pentru complecșii sintetizați au confirmat un potențial oxidant blând al acestora și posibilitatea utilizării acestor structuri ca substanțe active în medierea unor procese redox la nivel celular.

Evaluarea potențialului antitumoral al combinațiilor complexe ale ionilor La(III) și Nd(III) cu liganzi N- heterociclici bipyridinici

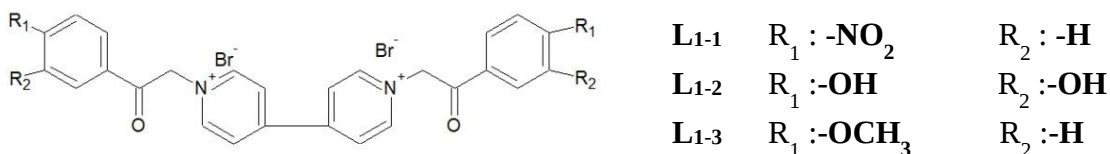
Studiile finale în realizarea obiectivelor tezei de doctorat au vizat evaluarea *in vitro* la nivel celular a potențialului antitumoral al liganzilor și combinațiilor complexe sintetizate utilizând celule tumorale aparținând liniilor celulare MCF₇ și A₂₇₈₀, prin corelarea rezultatelor în funcție de concentrația compusului testat (50 μM, 25 μM, 12.5μM, 5.25μM, 3μM, 1 μM) și timpul de incubare (24, 48, 72 ore).

Determinările experimentale au fost realizate în laboratorul de Biologie Celulară din cadrul Centrului de Știință și Tehnologie Nucleară, Institutul Superior Technic din Lisabona, sub coordonarea științifică a Dr. Fernanda Marques.

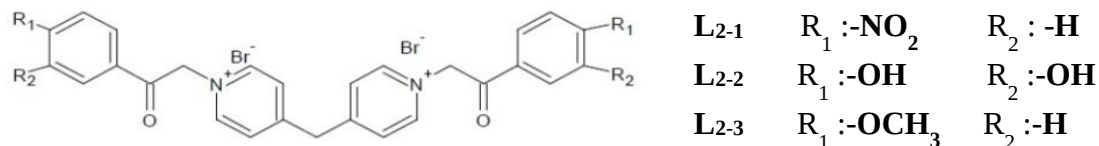
Evaluarea activității citotoxice a combinațiilor complexe ale La(III) și Nd(III) cu liganzi bipyridinici

Studiile *in vitro* la nivel celular s-au realizat utilizând complecșii de La(III) și Nd(III) cu liganzii N- heterociclici sintetizați și caracterizați în capitolele anterioare, sulfatul de lantan, sulfatul de neodim și liganzii folosiți în sinteză.

Pentru a evalua influența unor substituenți cu polarități diferite asupra potențialului citotoxic, s-au testat și o serie de liganzi derivați ai **L₁** și **L₂**.



Liganzii N-heterociclici derivați de la **L₁**



Liganzii N-heterociclici derivați de la **L₂**

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice

Celulele de tip MCF₇ aparținând liniei celulare umane de carcinom de sân, au fost menținute prin cultivare în mediu de cultură DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin (SFB) de la Biochrom și cu soluție 1% antibiotic (penicilină/streptomicină), la 37°C într-o atmosferă de 5% CO₂. O metodologie asemănătoare a fost utilizată pentru celule A₂₇₈₀ dar cu mediul de cultură RMPI (Roswell Park Memorial Institute, Merck). Viabilitatea celulară a fost evaluată prin metodele colorimetrice MTT (bromura de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazol) și RN (roșu neutru), metode considerate de referință [Fotakis și Timbrell, 2006; Repetto și colab., 2008]. Cisplatina a fost utilizată drept control pozitiv, a fost inițial solubilizată în soluție salină (0,9% NaCl) și a fost adăugată în concentrații precum ceilalți compuși.

Celulele au fost cultivate în plăci cu 96 godeuri; în cazul plăcilor incubate pentru 24 ore s-au folosit 3x10⁴ celule/godeu (200 μL), pentru 48 ore 2.5x10⁴ celule / godeu iar pentru 72 ore 2x10⁴ celule/godeu.

Liganzii și complecșii au fost solubiliizați în DMSO și ulterior în mediul de cultură al celulelor pentru a obține concentrații de la 50 μM la 1μM. Concentrația finală de DMSO în mediul de cultură nu trebuie să depășească 1%. După expunerea continuă a compușilor timp de 24/48/72 ore prin incubare la 37°C, 5% CO₂, mediul a fost îndepărtat și celulele au fost tratate cu 200 μL MTT în soluție tampon de fosfat (0.5 mg /mL). După incubare 3-4 ore la 37°C, 5% CO₂ soluția a fost îndepărtată și cristalele de formazan purpurii formate în interiorul celulelor au fost dizolvate în 200 μL DMSO prin agitare ușoară.

Viabilitatea celulară a fost evaluată prin măsurarea absorbției la 570 nm, la temperatura ambientală prin utilizarea Spectrofotometrului Power Wave Xs, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, SUA. Efectele citotoxice ale compușilor au fost cuantificate prin calcularea concentrației ce inhibă creșterea celulelor tumorale cu 50% (IC₅₀), pe baza analizei regresiei nonlineare a datelor concentrație-răspuns (s-a utilizat softul GraphPad Prism vs 5.0). Compușii au fost testați prin ambele metode, cel puțin de două ori și în 6 replici ale concentrației.

Activitatea citotoxică a liganzilor bipiridinici

Calcularea valorii IC₅₀ pentru sulfatul de lantan, sulfatul de neodim, liganzii L₁ și L₂ și derivații acestora s-a efectuat ca rezultat al analizei MTT pe celulele MCF₇ și A₂₇₈₀ după o incubare de 48 ore, la 35°C și în atmosferă de CO₂ 5%. Pentru fiecare compus s-au preparat 6 soluții, pe un domeniu de concentrație 1μM- 50μM. Valorile absorbției au fost citite la 570 nm la un interval de timp de 3 ore după tratarea celulelor cu MTT.

Rezultatele sunt prezentate ca medii ± deviația standard a cel puțin 2 experimente independente, comparativ cu cisplatina și evidențiază caracterul citotoxic foarte scăzut al sărurilor ionului metalic.

Valorile IC₅₀ pentru sulfat de lantan, sulfat de neodim și cisplatină la 24 și 48 ore de incubare pe liniile celulare MCF₇ și A₂₇₈₀

Compus	MCF7		A2780	
	24 h	48 h	24 h	48 h
La ₂ (SO ₄) ₃	>100	>100	>100	69 ± 11
Nd ₂ (SO ₄) ₃	>100	>100	>100	79 ± 24
Cisplatină	60±12	28±6.0	26.0±5.0	20.7±4.0

**Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu
liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice**

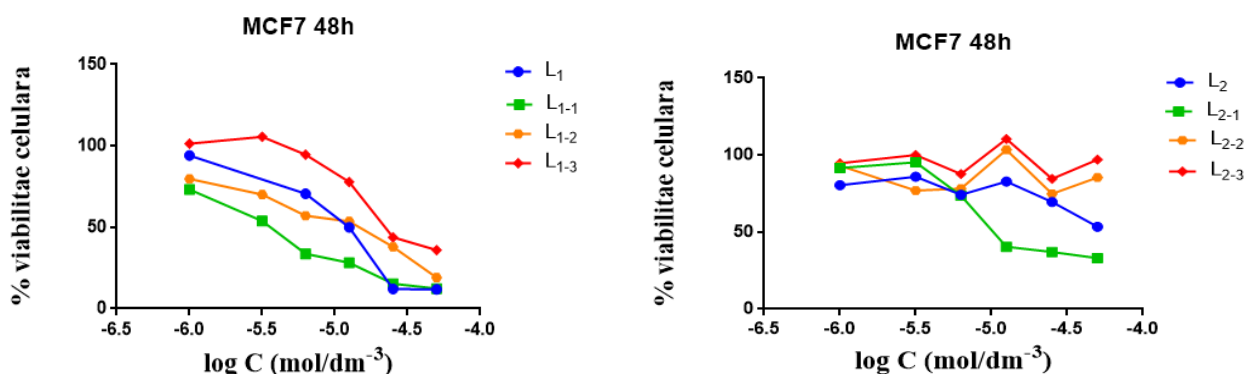
Valorile IC₅₀ pentru seria L₁ la 48 ore de incubare pe liniile celulare MCF₇ și A₂₇₈₀

Compus	IC ₅₀ [μM] ± SD	48 h
	MCF ₇	A ₂₇₈₀
L ₁	22 ± 9.3	20 ± 5
L ₁₋₁	3.49 ± 0.5	1.58 ± 0.2
L ₁₋₂	20 ± 4.3	20 ± 8.9
L ₁₋₃	33 ± 12	7.8 ± 1.2

Valorile IC₅₀ pentru seria L₂ la 48 ore de incubare pe liniile celulare MCF₇ și A₂₇₈₀

Compus	IC ₅₀ [μM] ± SD	48h
	MCF ₇	A ₂₇₈₀
L ₂	119 ± 58	>200
L ₂₋₁	15 ± 3.7	5.4 ± 0.7
L ₂₋₂	167 ± 15.4	34 ± 12
L ₂₋₃	>200	60 ± 2,5

Rezultatele obținute sugerează cea mai ridicată activitate în cazul liganzilor ce conțin grupări – NO₂ (L₁₋₁ și L₂₋₁). Liganzii ce conțin gruparea –OH sau –OCH₃ nu au demonstrat o influență semnificativă asupra activității citotoxice comparativ cu liganzii nesubstituiți. L₂ este non toxic pentru linia celulară A₂₇₈₀ în timp ce pentru celule MCF₇ L₂₋₃ prezintă non toxicitate. Comparând cele două grupuri de liganzi putem observa că, pentru ambele tipuri de celule, seria liganzilor L₁ manifestă citotoxicitate superioară comparativ cu seria L₂.



Analiza regresiei nonlineare a datelor concentrație–răspuns pentru seriile L₁ și L₂ la 48 ore de incubare pe linia de celule MCF₇

Activitatea citotoxică a combinațiilor complexe

Combinațiile complexe ale La(III) și Nd(III) cu liganzii L₁, L₂ și L₁₋₃ au fost evaluate din punct de vedere al potențialului citotoxic pe cele două linii celulare, MCF₇ și A₂₇₈₀, și timpi de incubare

Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice

de 24, 48 și 72 ore, pe un domeniu de concentrații între 1μM - 50μM. Rezultatele sunt prezentate ca medii ± deviația standard a cel puțin 2 experimente independente. Evaluarea datelor experimentale evidențiază un potențial citotoxic superior în cazul complecșilor La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ comparativ cu ligandul liber. În cazul ligandului L₂ și a combinațiilor complexe corespunzătoare, La(III)-L₂ și Nd(III)-L₂, testele de citotoxicitate au relevat caracterul non toxic al acestor structuri asupra celulelor de tip MCF₇ și o citotoxicitate moderată manifestată de complecși asupra celulelor A₂₇₈₀. Asupra celulelor tumorale A₂₇₈₀, ligandul L₂ nu a prezentat activitate citotoxică.

Valorile IC₅₀ corespunzătoare seriilor L₁, L₂ și L₁₋₃, la 24, 48 și 72 ore de incubare pe linia celulară MCF₇

Compus	IC ₅₀ [μM] 24 h	± SD	48 h	72 h
L ₁	41 ± 15.4		22 ± 9.3	30 ± 0.8
La(III)-L ₁	43 ± 8		38 ± 9.6	9.8 ± 3.3
Nd(III)-L ₁	21 ± 5.8		14 ± 5.8	12 ± 5.5
L ₂	>200		119 ± 5.8	>200
La(III)-L ₂	>200		178 ± 130	>200
Nd(III)-L ₂	>200		>200	>200
L ₁₋₃	69 ± 3.2		33 ± 12.9	36 ± 4.1
La(III)-L ₁₋₃	149 ± 5.2		>200	>200
Nd(III)-L ₁₋₃	>200		>200	>200

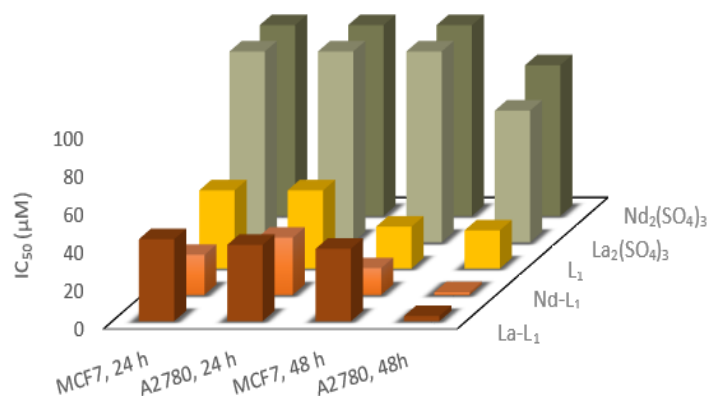
Valorile IC₅₀ corespunzătoare seriilor L₁, L₂ și L₁₋₃, la 24, 48 și 72 ore de incubare pe linia celulară A₂₇₈₀

Compus	IC ₅₀ [μM] 24 h	± SD	48 h	72 h
L ₁	70 ± 9.5		20 ± 5	7.4 ± 2.5
La(III)-L ₁	40 ± 14		2.7 ± 0.3	45 ± 0.9
Nd(III)-L ₁	30 ± 11.5		1.4 ± 1.5	4.3 ± 15.1
L ₂	>200		>200	>200
La(III)-L ₂	56 ± 46		53 (14.7)	36 ± 11.9
Nd(III)-L ₂	52 ± 3.95		187(122)	103 ± 0.685
L ₁₋₃	42 ± 10		7.8 ± 1.1	5.6 ± 1.8
La(III)-L ₁₋₃	45 ± 30.8		35 ± 10.3	9.7 ± 2.1
Nd(III)-L ₁₋₃	>200		38 ± 12.3	11 ± 4.5

Un efect diferit s-a evidențiat în cazul compusului L₁₋₃ care s-a dovedit a fi mai citotoxic decât ambii complecși. Pentru ligandul L₂ se remarcă un slab efect citotoxic asupra celulelor MCF₇ la timp de incubare 48 ore, efect absent la 24 și 72 ore de incubare.

Absența efectului citotoxic asupra celulelor de tip MCF₇ a fost identificată la structurile L₂ și La(III)-L₂ la timpii de incubare de 24 și 72 ore, Nd(III)-L₁₋₃ și Nd(III)-L₂ pentru toți timpii de

incubare testați și La(III)-L₁₋₃ la timpi de incubare de 48 și 72 ore. În cazul celulelor tumorale A₂₇₈₀ structurile lipsite de activitate citotoxică au fost ligandul L₂ pentru toate perioadele de incubare și Nd(III)-L₃ la 24 ore.



Activitatea citotoxică a compușilor L₁, La(III)-L₁, Nd(III)-L₁ asupra liniilor celulare MCF₇ și A₂₇₈₀, la 24 și 48 de ore de incubare

Rezultatele experimentale au indicat clar o creștere a citotoxicității ligandului după coordinarea ionului metalic, în special pentru linia de celule A₂₇₈₀. Pentru sărurile ionilor metalici s-a înregistrat, pe ambele linii celulare, o toxicitate considerabil mai redusă comparativ cu complecșii corespunzători (IC₅₀>100μM). Efectul citotoxic a fost puternic asupra celulelor de tip A₂₇₈₀ comparativ cu MCF₇, cu o creștere considerabilă la timpi de incubare 48 de ore.

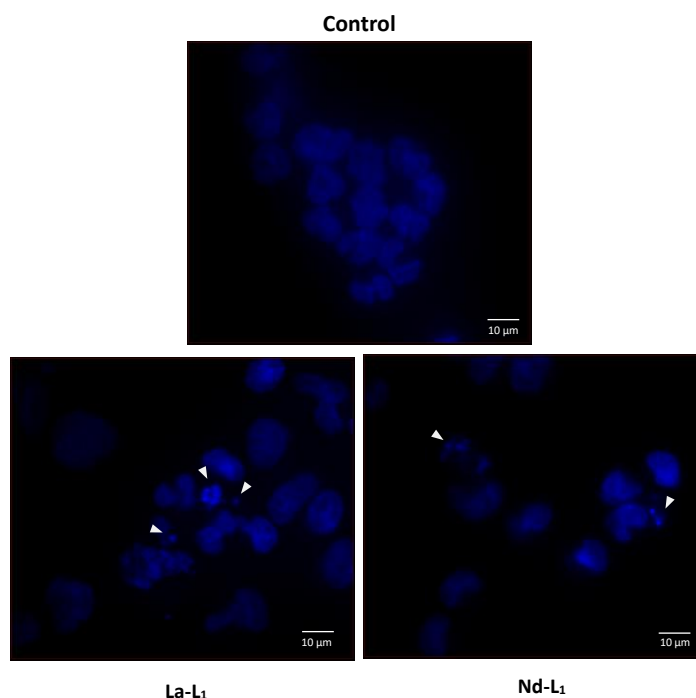
În plus, activitatea antitumorală manifestată de cisplatina în celulele A₂₇₈₀ după 24 de ore de incubare a fost de același ordin de mărime ca în cazul complexului Nd(III)-L₁ (26,0 ± 5,0 vs 30 ± 11). În celulele MCF₇, ambii complecși, La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁, au fost mai activi decât cisplatina.

În comparație cu cisplatina, medicament antitumoral utilizat pe scară largă și utilizând aceleași condiții experimentale, ambii complecși prezintă proprietăți citotoxice importante, în special în raport cu celulele tumorale ovariene.

Evaluarea procesului de apoptoză

Celule A₂₇₈₀ de densitate 2x10⁵celule/mL au fost incubate în mediul de cultură RPMI pentru 48h în prezența și absența complecșilor.

Evaluarea procesului de apoptoză s-a realizat prin utilizarea colorantului fluorescent Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) și a microscopiei cu fluorescență [Lenis-Rojas și colab., 2017]. Mediul de cultură a fost îndepărtat și celulele au fost spălate cu tampon fosfat salin și fixate cu paraformaldehidă 4% pentru 15 minute la temperatura camerei. După fixare, celulele au fost tratate din nou cu tampon fosfat salin și incubate cu colorant fosforescent Hoechst 33342 (diluție 1:2000). După incubare, procesul de spălare cu tampon fosfat salin a fost repetat de 3 ori și celulele au fost aduse în mediul Vectashield H-100 (Vector Laboratories, Burlingame, Canada). Plăcile au fost analizate la microscopul cu fluorescență Zeiss Axioplan2. S-au analizat mai multe câmpuri microscopice aleatorii pe probă, corespunzătoare a cel puțin 300 de nuclee pe probă, în două experimente independente.



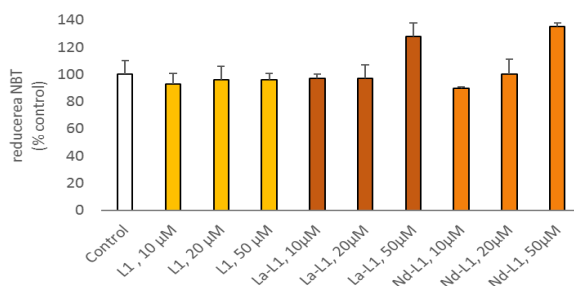
**Celule A2780 la utilizarea colorantului Hoechst 33342 în absența (control) sau după
tratarea cu complecșii La(III)-L1 și Nd(III)-L1 pentru vizualizarea nucleelor apoptotice**

Mecanismele care ar putea sta la baza proprietăților citotoxice a complecșilor au fost evaluate prin testul Hoechst de colorare a nucleilor pentru a estima nivelul de apoptoză care apare într-o populație A₂₇₈₀ celulară în prezența sau absența complecșilor. Analiza se bazează pe capacitatea colorantului Hoechst 33342 de a pătrunde în celule și de a marca ADN-ul, permițând detectarea nucleelor ce prezintă markeri apoptotici, cum ar fi condensarea sau fragmentarea cromatinei și

formarea de corpuri apoptotice. Rezultatele obținute indică faptul că ambii complecși (La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁) pot induce apoptoză în celulele A₂₇₈₀. Considerând că a fost utilizată concentrația IC₅₀ a complecșilor, acest efect nu este la fel de intens cum era de așteptat. Rezultatul obținut sugerează că apoptoza nu este unicul mecanism care induce moartea celulară.

Identificarea speciilor reactive de oxigen (ROS)

Celule A₂₇₈₀ cu o densitate de 2x10⁴celule/200μL au fost aduse în plăci cu 96 godeuri. După 24 de ore, mediul a fost înlocuit cu mediu proaspăt ce conține compușii de analizat. Generarea speciilor reactive de oxigen a fost evaluată prin metoda NBT (clorură de 2,2'-bis(4-Nitrofenil)-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difetil etan)ditetrazoliu) [Lopes și colab., 2017]. Celulele au fost tratate cu compușii de analizat și 20μL soluție apoasă NBT 10 mg/mL și incubate timp de o oră la 37°C. Soluția NBT a fost îndepărtată și depozitele de formazan au fost solubilizate cu 200μL amestec 90%DMSO:10%NaOH 0,01M iar după o omogenizare atentă a fost măsurată absorbanta la 550nm. Toți compușii au fost testați în cel puțin două experimente independente, fiecare cuprinzând 4 replici pe concentrație. Analiza NBT a fost utilizată pentru a evalua inducerea speciilor reactive de oxigen (anionul superoxid) în celulele A₂₇₈₀ după tratare cu complecșii ligandului L₁. Această analiză colorimetrică se bazează pe reducerea de către O₂⁻ a sării de tetrazoliu (galbenă) la formazan (albastru). Conversia NBT are loc intracelular și este mediată de oxidaza mitocondrială NAD(P)H. Rezultatele obținute au evidențiat faptul ca producția de ROS nu este considerabil diferită în raport cu proba martor, dar ușor crescută pentru La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ la concentrația 50 μM. Analiza sugerează faptul că, în condițiile experimentale alese, eliberarea rapidă a speciilor reactive de oxigen nu reprezintă mecanismul exclusiv implicat în citotoxicitatea celulară.



Reducerea NBT în celulele A₂₇₈₀ pentru ligandul L₁ și complecșii La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ la concentrațiile 10, 20 și 50 μM după 2 ore de incubare

CONCLUZII GENERALE

Combinatiile complexe generate de ioni ai lantanidelor cu liganzi *N*-heterociclici, constituie o clasă de compuși de interes pentru chimia medicamentului datorită profilului lor farmacologic de agenți antimicrobieni, anticoagulanți și antitumorali. În plus, selectivitatea bună a complecșilor lantanidelor față de celulele tumorale recomandă utilizarea lor ca markeri în diagnoza tumorală.

Pentru a încadra tematica prezentei tezei în stadiul actual al cercetărilor ce vizează obținerea de noi structuri cu potențial antitumoral, studiile au fost orientate către sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea biologică a unor noi combinații complexe ale La(III) și Nd(III) cu liganzi bipyridinici.

Teza de doctorat "*Cercetări privind obținerea și evaluarea unor complecși ai lantanidelor cu liganzi N-heterociclici cu aplicații farmaceutice*" cuprinde o parte teoretică cu prezentarea datelor actuale referitoare la profilul bioanorganic al ionilor lantanidelor, aplicațiile bioanalitice și terapeutice ale combinațiilor generate de acești ioni și partea experimentală cu descrierea metodelor de obținere și caracterizare spectrală și biologică a unor noi structuri complexe ce conțin ionii La(III) sau Nd(III) coordinați la liganzi *N*-heterociclici bipyridinici, structuri cu profil antitumoral.

Partea experimentală este structurată în patru capitole în care sunt incluse rezultate privind sinteza, proprietăți spectrale ale liganzilor de *N,N'* bis-fenacil-4,4'-bipyridiniu și a combinațiilor complexe ale acestora cu ionii La(III) și Nd(III) precum și rezultate obținute prin evaluarea *in vitro* al potențialului antitumoral al acestor structuri raportat la celule de tip MCF₇ și A₂₇₈₀.

Prima etapă a studiilor experimentale a inclus sinteza și caracterizarea structurală, spectrală și electrochimică a celor doi liganzi *N*-heterociclici bipyridinici. Studiile spectrale au fost realizate în medii diferite iar rezultatele au demonstrat că stabilitatea liganzilor *N*-heterociclici în mediu apos depinde de pH-ul soluțiilor; ligandul L₁ este favorizat în procesul complexare de valori slab bazice ale pH-ului în timp ce ligandul L₂ este favorizat de pH slab acid.

Studiul comportării electrochimice al celor doi liganzi a permis stabilirea mediului de reacție (apos sau aprotic) pentru care activitatea oxido-reducătoare este optimă iar corelarea dintre potențialul redox și stabilitatea soluțiilor apoase la valori diferite de pH a evidențiat un potențial de schimb electronic favorabil pentru ligandul L₁ comparativ cu ligandul L₂.

Datele experimentale privind procedeele de obținere a noilor combinații complexe cu liganzii N-heterociclici și ionii La(III) și Nd(III), precum și date ce descriu monitorizarea reacțiilor de complexare prin evaluarea spectrală a componentelor rezultate la interacțiunea ligand-ion lantanid, sunt prezentate în capitolul 3 al lucrării.

O prima etapă în caracterizarea spectrală a produșilor rezultați în reacțiile de complexare a inclus studii de analiză elementală, analiză spectrală UV-Vis și de evaluare a potențialului fluorescent al complecșilor în raport cu polaritatea solventului.

Rezultatele experimentale obținute prin analiza spectrală UV-Vis au confirmat procesul de complexare, proces dependent de structura liganzilor. S-a constatat ca ionul La(III) este mai favorabil în procesul de complexare cu ligandul L_1 .

Spectrele de emisie fluorescentă înregistrate pentru soluții ale complecșilor sintetizați, au confirmat potențialul fluorofor al acestora, mai accentuat în metanol comparativ cu mediul apos. Cele mai mari valori ale intensității de fluorescență s-au înregistrat pentru complexul Nd(III)- L_1 (cu aport de Et_3N), ca rezultat al efectelor de conjugare între sistemele de electroni ce aparțin inelelor piridinice.

Completarea tabloului de date structurale pentru combinațiile complexe nou sintetizate s-a realizat prin abordarea celor mai moderne tehnici fizico-chimice: FT-IR, XRD, SEM, EDAX, TG-TGA, OCP, CV iar rezultatele experimentale obținute sunt prezentate în capitolul 4 al lucrării.

Rezultatele obținute prin analiza FT-IR au confirmat coordinarea ionului metalic la ligandul de tip bipyridiniu, evidențiind și coordinarea extraligandului Et_3N la ionul metalic, participarea grupărilor carbonilice de la liganzii bipyridinici (structură ilidică) și coordinarea celor trei grupări sulfat.

Datele experimentale obținute prin analiza termogravimetrică (TG-TGA) confirmă stabilitatea termică mare a complecșilor La(III)- L_1 și Nd(III)- L_1 la temperaturi de peste $1100^\circ C$ și aduc argumente favorabile structurilor propuse.

Caracterizarea structurală realizată prin microscopie electronică de baleiaj, SEM cuplată cu analiza elementală EDAX și completată de analiza de difracție de raze X (XRD) a evidențiat particularități structurale specifice pentru complecși comparativ cu liganzii, prin morfologii, structuri, dimensiunea particulelor și compoziții diferite.

Combinațiile complexe studiate au fost identificate ca structuri cristaline multiforme, cu morfologii de micro- și nanoparticule alungite, micro- și nanoparticule agregate și suprafață

compactă. În cazul compușilor La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ rezultatele analizei XRD au confirmat un caracter izomorf al structurilor complexe.

Potențialul de substanțe biologic active al noilor complecși a impus și studii care să evidențieze capacitatea acestora de a participa la procese cu transfer de electroni. Rezultatele obținute prin studii de voltametrie ciclică au confirmat un potențial oxidant blând al acestor structuri și posibilitatea utilizării ca substanțe active în medierea unor procese redox la nivel celular.

Ansamblu de date experimentale ce descriu profilul structural și spectral al liganzilor și a noilor combinații complexe a fost completat cu rezultate obținute într-un studiu preclinic de testare a funcționalității celulare pe liniile celulare MCF₇ (cancer mamar) și A₂₇₈₀ (cancer ovarian). Corelarea rezultatelor a evidențiat un potențial antitumoral dependent de designul structural al moleculelor complexe, de concentrația și perioada de incubare a compusului testat.

Pentru o apreciere corectă a efectelor biologice determinate de coordonarea ionului metalic la ligandul de tip bipyridinic, studiile de citotoxicitate s-au realizat atât pentru complecși cât și pentru sulfatul de lantan, sulfatul de neodim, liganzii L₁, L₂ și derivați ai acestora iar rezultatele au fost exprimate prin valoarea IC₅₀, concentrația ce inhibă creșterea celulelor tumorale cu 50%. Ca referință s-a utilizat cisplatina. Valorile IC₅₀ obținute pentru sărurile ionilor metalici și cisplatina la 24 și 48 ore de incubare pe liniile celulare MCF₇ și A₂₇₈₀ au demonstrat un caracter citotoxic foarte scăzut al sărurilor comparativ cu cisplatina. În cazul liganzilor L₁, L₂ și derivați ai acestora, pentru timpi de incubare de 48 ore pe liniile celulare MCF₇ și A₂₇₈₀, s-a înregistrat citotoxicitate superioară pentru derivații din seria L₁ comparativ cu seria L₂.

Pentru combinațiile complexe La(III)-L₁ și Nd(III)-L₁ efectul citotoxic manifestat asupra celulelor tumorale MCF₇ și A₂₇₈₀ a fost superior comparativ cu ligandul L₁. Activitatea antitumorală a complexului Nd(III)-L₁ s-a dovedit a fi superioară cisplatinei.

Pentru combinațiile complexe La(III)-L₂ și Nd(III)-L₂ s-a înregistrat un efect citotoxic moderat în raport cu celulele de tip A₂₇₈₀ în timp ce ligandul L₂ nu prezintă toxicitate asupra celulelor de tip MCF₇ și A₂₇₈₀.

Lista lucrărilor științifice publicate

Articole ISI

1. **Cârâc A.**, Boscencu R., Dinică R., Guerreiro J., Silva F., Marques F., Campello M., Moise C., Brîncoveanu O., Enăchescu M., Cârâc G., Tăbăcaru A., **"Synthesis, characterization and antitumor activity of two new dipyridinium ylide based lanthanide(III) complexes"**, Inorganica Chimica Acta, 480, 83-90, 2018, Factor de impact 2.046, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.05.003>
2. **Cârâc A.**, Boscencu R., Cârâc G., **"Spectral study of some lanthanides complexes with quaternary pyridinium ligands"**, Revista de Chimie, 68(10), 2265-2269, 2017, Factor de impact 1.232, <http://www.revistadechimie.ro/pdf/13%20CARAC%2010%2017.pdf>
3. **Cârâc A.**, Boscencu R., Dediu A., Bungau S., Dinică R., **"Solvent Effects on the Spectral and Electrochemical Properties of Some Pyridinium Quaternary Compounds"**, Revista de Chimie, 68(7), 1423-1428, 2017, Factor de impact 1.232, <http://www.revistadechimie.ro/pdf/3%20CARAC%20A%207%2017.pdf>
4. **Cârâc A.**, Boscencu R., Dinică R., Cârâc G., **"Electrochemical behaviour of the new heterocyclic pyridinium ligands"**, Studia UBB Chemia, LX(3), 99-109, 2015, Factor de impact 0.191, <http://studia.ubbcluj.ro/download/pdf/937.pdf>

Articole BDI

1. **Cârâc A.**, **"Biological and biomedical applications of the lanthanides compounds: a mini review"**, Proc. Rom. Acad., Series B, 19(2), 2017, 69–74, <http://www.acad.ro/sectii2002/proceedingsChemistry/doc2017-2/art01.pdf>
2. **Cârâc A.**, Moroșan E., Ioniță A., Boscencu R., Cârâc G., **"Efficacy of combined CHAp and Lanthanum carbonate in therapy for hyperphosphatemia"** - International Journal of Medical, Health, Biomedical and Pharmaceutical Engineering Vol:9, No:2, 2015, p. 208-211, <http://waset.org/publications/10001239/efficacy-of-combined-chap-and-lanthanum-carbonate-in-therapy-for-hyperphosphatemia>

Participări la conferințe

1. **Cârâc A.**, Boscencu R., Dinică R., "*Proprietăți electrochimice ale complexilor de La (III) și Nd(III) derivați de la cicluri piridinice, compuși cu potențiale aplicații biomedicale*", The National Congress of Pharmacy from Romania, Septembrie 2016, București, România, P165, <http://cnfr2016.ro/>
2. **Cârâc A.**, Moroșan E., Ioniă A., Boscencu R., Cârâc G., "*Efficacy of combined CHAp and Lanthanum Carbonate in therapy for hyperphosphatemia*", 17th International Conference on Pediatrics, Februarie, 2015, Londra, <https://waset.org/conference/2015/02/london/program>
3. **Cârâc A.**, Dinică R., Cârâc G., Boscencu R., "*Spectral Study of New Ln - Heterocyclic Combinations*", 3rd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, October 2014, Iași, România, P8, <https://content.sciendo.com/view/journals/achi/22/2/article-p177.xml>
4. **Cârâc A.**, Boscencu R., Dinică R., "*Sinteza și evaluarea spectrală a unor combinații complexe ale La(III) și Nd(III) cu liganzi N-heterociclici cu potențiale aplicații biomedicale*", The National Congress of Pharmacy from Romania, Septembrie 2014, Iași, România, P7, <http://congresfarmacie2014.ro/EN/>

Participarea în proiecte de cercetare

EXCELIS Program POSDRU/159/1.5/S/138907, București (Romania): Excellence in scientific interdisciplinary research, doctoral and postdoctoral, in the economic, social and medical fields: 01.07.2014 - 30.05.2015; <http://www.excelis.ase.ro/>

Premii

1. **Premiul III** pentru rezultate deosebite în activitatea de cercetare din cadrul programului POSDRU /159/1.5/S/138907 EXCELIS "Excellence in scientific interdisciplinary research, doctoral and postdoctoral, in the economic, social and medical fields", 2015. <http://www.excelis.ase.ro/>
2. **Premiu UEFSCIDI** pentru articolul "Synthesis, characterization and antitumor activity of two new dipyridinium ylide based lanthanide(III) complexes", Autori: Cârâc A., Boscencu R., Dinică R., Guerreiro J., Silva F., Marques F., Campello M., Moise C., Brîncoveanu O., Enăchescu M., Cârâc G., Tăbăcaru A., acordat în cadrul programului "Premierea rezultatelor cercetării – Articole", Subprogramul 1.1., 2018

Bibliografie

1. Acton A., Lanthanoid Series Elements—Advances in Research and Application, Scholarly Editions, Atlanta, Georgia, 2013
2. Ankelo M., Westerlund-Karlsson A., Ilonen J., Knip M., Savola K., Kankaanpää P., Merio L., Siitari H., Hinkkanen A., Time-resolved fluorometric assay for detection of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD65), *Clinical Chemistry*, 49, 908-915, 2003
3. Armelao L., Dell'Amico D., Belluci L., Bottaro G., Labella L., Marchetti F., Samaritani S., A convenient synthesis of highly luminescent lanthanide 1D-zigzag coordination chains based only on 4,40-bipyridine as connector, *Polyhedron* 119, 371-376, 2016
4. Beaufort C., Helmhöfer J., Piskorz A., Hoogstraat M., Ruigrok-Ritstier K., Besselink N., Murtaza M., Ijcken W., Heine A., Smid M., Koudijs M., Brenton J., Berns E., Ovarian Cancer Cell Line Panel (OCCP): Clinical Importance of In Vitro Morphological Subtypes, *PLOS One* 9(9), 2014.
5. Bilow U., Signale aus dem Verborgenen, *Livingbridges*, 1, 16-21, 2002
6. Bunzli J.-C. G., Chauvin A.-S., Vandevyver C. D. B., Bo S., Comby S., Ann. N.Y., Lanthanide Bimetallic Helicates for In Vitro Imaging and Sensing, *Acad. Sci*, 1130, 97, 2008
7. Bünzli, J.C., Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chemical Reviews*, 110, 2729- 2755, 2010
8. Canada R. G., Andrews P., Mack K.M., Haider A., The effects of terbium on the accumulation of cisplatin in human ovarian cancer cells, *Biochimica et Biophysica acta*, 1267, 25-30, 1995
9. Caporale A., Palma G., Mariconda A., Vecchio V., Iacopetta D., Parisi O., Sinicropi M., Puoci F., Arra C., Longo P., Saturino C., Synthesis and Antitumor Activity of New Group 3 Metallocene Complexes, *Molecules*, 22(4), 526, 2017
10. Cârâc A., Biological and biomedical applications of the lanthanides compounds: a mini review, *Proc. Rom. Acad., Series B*, 19(2), 69–74, 2017c
11. Cârâc A., Boscencu R., Cârâc G., "Spectral study of some lanthanides complexes with quaternary pyridinium ligands", *Revista de Chimie*, 68(10), 2265-2269, 2017b
12. Cârâc A., Boscencu R., Dediu A., Bungau S., Dinică R., Solvent Effects on the Spectral and Electrochemical Properties of Some Pyridinium Quaternary Compounds, *Revista de Chimie*, 68(7), 1423-1428, 2017a
13. Cârâc A., Boscencu R., Dinică R., Carac G., Electrochemical behavior of the new heterocyclic pyridinium ligands, *Studia UBB Chemia*, LX(3), 99-109, 2015a
14. Cârâc A., Boscencu R., Dinică R., Guerreiro J., Silva F., Marques F., Campello M., Moise C., Brîncoveanu O., Enăchescu M., Cârâc G., Tăbăcaru A., Synthesis, characterization and antitumor activity of two new dipyrrolium ylide based lanthanide(III) complexes, *Inorganica Chimica Acta*, 480, 83-90, 2018
15. Cârâc A., Moroșan E., Ioniță A., Boscencu R., Cârâc G., Efficacy of combined CHAp and Lanthanum carbonate in therapy for hyperphosphatemia, *International Journal of Medical, Health, Biomedical and Pharmaceutical Engineering*, 9(2), 208-211, 2015b
16. Chan C.-F., Xie C., Tsang M.-K., Lear S., Dai L., Zhou Y., Cicho J., Karbowiak M., Hreniak D., Lan R., Cobb S.L., Lam M.H.-W., Hao J., Wong K.-L., The Effects of Morphology and Linker Length on

the Properties of Peptide–Lanthanide Upconversion Nanomaterials as G2 Phase Cell Cycle Inhibitors, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 4539-4545, 2015

17. Cotton S., *Lanthanides in Living Systems, The Rare Earth Elements*, 2012

18. Cotton, S. A., Harrowfield, J. M., *Lanthanides: Biological Activity and Medical Applications*, *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 2012

19. Daire J., Leporg B., Vilgrain V., Van Beers B., Schimdt S., Pasto C., Liver Perfusion Modifies Gd-DTPA and Gd-BOPTA Hepatocyte Concentrations Through Transfer Clearances cross Sinusoidal Membranes, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 42 (4), 657-667, 2017

20. Derenne A., Hemelryck V., Lamoral-Theys D., Kiss R., Goormaghtigh E., FTIR spectroscopy: A new valuable tool to classify the effects of polyphenolic compounds on cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1832(1), 46-56, 2013

21. Dinică R., Marchetti F., Pettinari C., Skelton BW, White AH, Synthesis, spectroscopic and structural characterization of the reaction products of quaternary cationic 2, 2'-bipyridylium ligand bromide salts with metal halides, *Inorganica chimica acta*, 360 (8), 2609-2614, 2007

22. Druta II, Dinică R., Bacu E., Himelnicu, Synthesis of 7, 7'-bisindolizines by the reaction of 4, 4'-bipyridinium-ylides with activated alkynes, *Tetrahedron*, 54 (36), 10811-10818, 1998

23. Enyeart J. J., Xu L., Enyeart J. A., Dual actions of lanthanides on ACTH-inhibited leak K⁺ channels, *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 282(6), 1255- 1266, 2002.

24. Evans C. H., *Biochemistry of the lanthanides*. Plenum Press, New York and London, 1990

25. Fotakis G., Timbrell J., In vitro cytotoxicity assays Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmiu chloride, *Toxicology Letters*, 160, 171-177, 2006

26. Furdui B., Dinică R., Demeunynck M., Druta I, Vlahovici A., New reactive pyridinium-indolizines fluorophores, *Revista de Chimie*, 52 (7), 633-637, 2007

27. Hagren, V., von Lode, P., Syrjälä, A., Soukka, T., Lövgren, T., Kojola, H., Nurmi, J., An automated PCR platform with homogeneous time-resolved fluorescence detection and dry chemistry assay kits, *Anal Biochem*, 374, 411-416, 2008

28. Hai B X., Tan M., Wang G., Ye Z., Yuan J., Matsumoto K., Preparation and a time-resolved fluoroimmunoassay application of new europium fluorescent nanoparticles, *Analytical. Sciences*, 20, 245-246, 2004

29. Hemmilä I., Laitala V., Progress in lanthanides as luminescent probes, *Journal of Fluorescence*, 15, 529-542, 2005

30. Hu W.-J., Wu X.-Y., Liu J.-F., Zhao G.-L., Synthesis, crystal structure and biological activity of Lanthanum(III) coordination polymer constructed with p-hydroxyphenylacetic acid anion, *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 29 (4), 861-866, 2013

31. Huang P., Li J., Zhang S., Chen C., Han Y., Liu N., Xiao Y., Wang H., Zhang M., Yu Q., Liu Y., Wang W., Effects of lanthanum, cerium, and neodymium on the nuclei and mitochondria of hepatocytes: Accumulation and oxidative damage, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31(1), 25-32, 2011

32. Knopp M. V., Primary and Secondary Brain Tumors at MR Imaging: Bicentric Intraindividual Crossover Comparison of Gadobenate Dimeglumine and Gadopentate Dimeglumine, *Radiology*, 230(1), 55-64, 2004
33. Korpimäki T., Häggen V., Brockmann E. C., Tuomola M., Generic lanthanide fluoroimmunoassay for the simultaneous screening of 18 sulfonamides using an engineered antibody, *Analytical Chemistry*, 76, 3091-3098, 2004
34. Kostova I., Lanthanides as Anticancer Agents, *Current Medicinal Chemistry-Anti Cancer Agents*, 5(6), 591-602, 2005
35. Laitala, V., Ylikoski, A., Raussi, H.M., Ollikka, P., Hemmilä, I., Time-resolved detection probe for homogeneous nucleic acid analyses in one-step format, *Analytical Biochemistry* 361, 126-131, 2007
36. Lenis-Rojas O.A., Roma-Rodrigues C., Fernandes A.R., Marques F., Pérez-Fernández D., Guerra-Varela J., Sánchez L., Vázquez-García D., López-Torres M., Fernández A., Fernández, Dinuclear RuII(bipy) 2 Derivatives: Structural, Biological, and in Vivo Zebrafish Toxicity Evaluation, *Inorganic Chemistry*, 56, 7127-7144, 2017.
37. Liu J., Mei W., Li Y., Wang E., Ji L., Tao P., Antiviral activity of mixed-valence rare earth borotungstate heteropoly blues against influenza virus in mice, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 11, 367-372, 2000
38. Lopes J., Alves D., Morais T.S., Costa P.J., Piedade M.F., Marques F., Villa de Brito M.J., Garcia M.H., New copper(I) and heteronuclear copper(I)-ruthenium(II) complexes: Synthesis, structural characterization and cytotoxicity., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 169, 68-78, 2017
39. Marciniak M., Chas J., Baltrukiewicz Z., Transport of lanthanides in milk into suckling rats, *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, 40(4), 351-358, 1996
40. Mizukami S., Tonai K., Kaneko M., Kikuchi K., Lanthanide-based protease activity sensors for time-resolved fluorescence measurements, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 14376-14377, 2008
41. Nelson D., Nolan S., Quantifying and understanding the electronic properties of N-heterocyclic carbenes, *Chemical Society Reviews*, 16, 6723-6753, 2013
42. Pelkkikangas A.-M., Simple, rapid, and sensitive thyroidstimulating hormone immunoassay using europium(III) nanoparticle label, *Analytical Chimica Acta* 517, 169-176, 2004
43. Rai R. M., Loffreda S., Karp C. L., Yang S. Q., Lin H. Z., Diehl A. M., Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver, *Hepatology*, 25(4), 889-895, 1997
44. Reimer P., Vosschenrich R., Kontrastmittel in der MRT, *Der Radiologe*, 44,3,273-283, 2004
45. Repetto G., del Peso A., Zurita JL., Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Natural Protocols*, 3(7), 1125-1131, 2008
46. Rosenani A., Ghdayeb M., Salman A., Budagumpi S., Ahamed M., Amin M.S., Majid A., Ag(I)-N-heterocyclic carbene complexes of N-allyl substituted imidazol-2-ylidenes with ortho, meta and para-xylyl spacers: Synthesis, crystal structures and in vitro cancer studies, *Inorganic Chemistry Communications*, 22, 113-119, 2012

47. Saha U., Palmajumder E., Mukherjea K., Synthesis, structure, DNA binding studies and nuclease activities of two luminescent neodymium complexes, *Journal of Coordination Chemistry*, 69 (19), 2920-2941, 2016
48. Simpson J. Y. , Note on the therapeutic action of the salts of cerium, *Monthly Journal of Medical Sciences*, 19, 564, 1854
49. Sudhindra, N., Gagnani, M., A., Biological and Clinical Aspects of Lanthanide Coordination Compounds, *Bioinorganic Chemistry and Application*, 2(3-4), 155-192, 2004
50. Tanner P.A., Lanthanide luminescence in solids, Springer series on fluorescence; lanthanide luminescence: photophysical, analytical and biological aspects. Vol. 7. Springer-Verlag, Berlin, 183-233, 2011
51. Teo R., Termini J., Gray H., Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy, *Journal of Medicinal Chemistry*, 59 (13), 6012-6024, 2016
52. Traykova M., Saso L., Kostova I., Involvement of Lanthanides in the Free Radicals Homeostasis, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(22), 1-12, 2014
53. Wang K., Cheng Y., Yang X., Li. R., Cell Response to Lanthanides and Potential Pharmacological Actions of Lanthanides in Metal ions in biological systems, in: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, S., *Metal Ions in Biological Systems: Vol. 40: The Lanthanides and Their Interrelations with Biosystems*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2003b.
54. Wang Y., Guo F., Yuan K., Hu Y., Effect of lanthanum chloride on apoptosis of thymocytes in endotoxemia mice, *Acta Academiae Medicinae Jiangxi*, 43(3), 31, 2003c
55. Wason MS., Zhao J., Cerium Oxide Nanoparticles: Potential Applications for Cancer and Other Diseases, *American Journal of Translational Research.*, 5, 126-131, 2013
56. Westerlund-Karlsson A., Suonpaa K., Ankelo M., Ilonen J., Knip M., Hinkkanen A. E, Detection of autoantibodies to protein tyrosine phosphatase-like protein IA-2 with a novel timeresolved fluorimetric assay, *Clinical Chemistry*, 49, 916-923, 2003
57. Yuan J., Tan M., Wang G., Synthesis and luminescence properties of lanthanide(III) chelates with polyacid derivatives of thienyl-substituted terpyridine analogues, *Journal of Luminescence*, 10691, 2004
58. Zhang H., Feng J., Zhu W.F., Liu C., Gu J., Bacteriostatic effect of cerium-humic acid complex: An experimental study, *Biological Trace Element Research*, 73(1), 29 – 36, 2000a
59. Zhang J., Cheng H., Gao Q., Zhang Z., Liu Q., Effect of lanthanum on growth and biochemical property of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Chinese Journal of Applied ecology*, 11(6), 382-384, 2000b.

