

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

"CAROL DAVILA", BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL FARMACIE

***COMBINAȚII COMPLEXE ALE METALELOR TRANZIȚIONALE CU ANTIBIOTICE CU
NUCLEU CHINOLONIC***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. UIVAROȘI VALENTINA

Student-doctorand:

MĂCIUCĂ (CĂSĂTORITĂ IANA) ANA-MĂDĂLINA

ANUL 2020

Cuprins

Listă abrevieri.....	6
INTRODUCERE.....	8
I. PARTEA GENERALĂ.....	11
I.1. NOȚIUNI GENERALE DESPRE CHINOLONE.....	12
I.1.1. Evoluție. Structură. Mecanism de acțiune.....	12
I.1.2. Farmacocinetică.....	18
I.1.3. Acțiuni biologice.....	20
I.1.3.1. Acțiune antimicrobiană.....	20
I.1.3.2. Acțiune antitumorală.....	23
I.1.3.3. Acțiune imunomodulatoare.....	24
I.1.4. Profil farmacotoxicologic.....	25
I.1.4.1. Efecte adverse asupra SNC.....	26
I.1.4.2. Neuropatie periferică.....	27
I.1.4.3. Cardiotoxicitate.....	27
I.1.4.4. Toxicitate sanguine.....	28
I.1.4.5. Reacții asupra aparatului respirator.....	29
I.1.4.6. Hepatotoxicitate.....	29
I.1.4.7. Disglicemii.....	32
I.1.4.8. Efecte secundare gastrointestinale.....	33
I.1.4.9. Cristalurie și nefrotoxicitate.....	33
I.1.4.10. Efecte secundare datorate dereglării metabolismului colagenului.....	35
I.1.4.11. Fototoxicitate.....	36
I.1.5. Interacțiuni.....	37
I.1.5.1 Interacțiuni medicamentoase.....	37
I.1.5.2 Interacțiuni cu metale di- și trivalente.....	38
I.1.6. Fenomenul de rezistență.....	38
I.1.7. Prezența fluorochinolonelor în mediu.....	41
I.2. COMPLECȘI AI CHINOLONELOR CU IONI AI LANTANIDELOR.....	43
I.2.1. Noțiuni generale despre abilitatea chinolonelor de a forma complecși cu ioni metalici.....	43
I.2.2. Complecși ai chinolonelor cu cationi ai lantanidelor.....	45
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	50
II.1. OBIECTIVELE STUDIULUI. MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE.....	51
II.1.1. Obiectivele studiului.....	51
II.1.2. Materiale și metode.....	52
II.1.2.1. Materiale utilizate.....	52
II.1.2.2. Metode de sinteză și purificare.....	52
II.1.2.3. Caracterizarea fizico-chimică a complecșilor.....	55
II.1.2.4. Calcule DFT (density functional theory).....	55

II.1.2.5. Studii asupra acțiunii biologice.....	56
II.2. COMPLECȘI AI ACIDULUI NALIDIXIC.....	62
II.2.1. Introducere.....	62
II.2.2. Metoda de sinteză.....	63
II.2.3. Caracterizarea fizico-chimică a complexilor obținuți.....	64
II.2.3.1. Analiza elementală.....	64
II.2.3.2. Spectrele în domeniul UV-vizibil- NIR.....	65
II.2.3.3. Spectrele în domeniul IR.....	68
II.2.3.4. Analiza termică.....	76
II.2.3.5. Concluziile analizei fizico-chimice.....	80
II.2.4. Calcule DFT.....	81
II.2.5. Studii asupra acțiunii biologice.....	84
II.2.5.1. Citotoxicitate.....	84
II.2.5.2. Studii asupra interacțiunii cu molecula de ADN.....	87
II.2.5.3. Studii asupra interacțiunii cu albumina serică și apo-transferină.....	98
II.2.6. Concluzii.....	132
II.3. COMPLECȘI AI ACIDULUI OXOLINIC.....	134
II.3.1. Introducere.....	134
II.3.2. Metoda de sinteză.....	135
II.3.3. Caracterizarea fizico-chimică a complexilor obținuți.....	135
II.3.3.1. Analiza elemental.....	135
II.3.3.2. Spectrele în domeniul UV-vizibil- NIR.....	136
II.3.3.3. Spectrele în domeniul IR.....	137
II.3.3.4. Spectre de masa.....	143
II.3.3.5. Analiza termică.....	148
II.3.3.6. Concluziile caracterizării fizico-chimice.....	149
II.3.4. Calcule DFT.....	149
II.3.5. Acțiune biologică.....	152
II.3.5.1. Citotoxicitate.....	152
II.3.5.2. Studii asupra interacțiunii cu molecula de AND.....	155
II.3.5.3. Studii asupra interacțiunii cu albumina serică și transferină.....	162
II.3.6. Concluzii.....	185
II.4. COMPLECȘI AI DIFLOXACINEI.....	186
II.4.1. Introducere.....	186
II.4.2. Metoda de sinteză.....	187
II.4.3. Caracterizarea fizico-chimică a complexilor obținuți.....	188
II.4.3.1. Analiza elemental.....	188
II.4.3.2. Spectrele în domeniul UV-vizibil- NIR.....	188
II.4.3.3. Spectrele în domeniul IR.....	189
II.4.3.4. Analiză termică.....	193

II.4.4. Calcule DFT.....	194
II.4.5. Acțiune biologică.....	197
II.4.5.1. Citotoxicitate	197
II.4.5.2. Studii asupra interacțiunii cu molecula de ADN.....	199
II.4.5.3. Studii asupra interacțiunii cu albumina serică și transferină.....	204
II.4.6. Concluzii.....	215
II.5. CONCLUZII GENERALE. CARACTERUL ORIGINAL ȘI INTERDISCIPLINAR AL CERCETĂRILOR.....	216
II.5.1. Concluzii generale.....	216
II.5.2. Caracterul original și interdisciplinar al cercetărilor.....	218
BIBLIOGRAFIE.....	221
ANEXE.....	262

INTRODUCERE

Rezistența bacteriană și tumorală la schemele clasice de tratament reprezintă o continuă provocare pentru medicina modernă. În acest context, repoziționarea medicamentelor poate reprezenta o strategie mai eficientă; acest proces are la bază găsirea de noi utilizări terapeutice pentru medicamente deja existente, dar care nu mai sunt utilizate în terapie din diferite motive precum: apariția unor molecule cu un mecanism nou de acțiune, mai potente, apariția rezistenței, efecte toxicologice etc.

Scopul tezei de doctorat a fost dezvoltarea de noi combinații complexe cu acțiune biologică, care să lărgască gama de compuși metalici cu potențiale aplicații terapeutice. Ca liganzi au fost aleși trei reprezentanți din clasa chinolonei, o clasă importantă de chimioterapice cu o largă permeabilitate în țesuturi și spectru larg de acțiune, proprietăți care le fac utile în tratarea infecțiilor la diferite nivele. Larga utilizare atrage după sine și apariția rezistenței microbiene, magnitudinea procesului fiind direct proporțională cu numărul de specii microbiene sensibile.

Din punct de vedere chimic, chinolonele reprezintă liganzi ideali, oferind patru posibilități de coordonare, în funcție de natura cationului: gruparea carboxil din poziția 3 și gruparea cetonă din poziția 4 pentru cationii oxofili și atomii de azot ai inelului piperazinic din poziția 7 pentru cationii cu afinitate pentru atomii de azot. Numeroase combinații complexe au fost sintetizate și studiate din punct de vedere al capacității antimicrobiene, antitumorale și al interacțiunilor cu macromolecula de ADN și cu proteinele serice, prezentând activități promițătoare. În unele cazuri, se poate observa o activitate antimicrobiană mai intensă comparativ cu ligandul liber, inclusiv pe tulpini microbiene rezistente. Nici acțiunea antitumorală testată pe multiple linii celulare nu este de ignorat, toate aceste aspecte punând chinolonele pe lista de candidați ideali pentru repoziționare.

Chinolonele utilizate ca liganzi pentru obținerea combinațiilor complexe studiate în cadrul tezei de doctorat sunt reprezentanți din generația I, de uz uman (acidul nalidixic și acidul oxolinic), și o fluorochinolona din generația a II-a, de uz veterinar (difloxacină). Cationii selectați sunt ioni trivalenți ai pământurilor rare: Y^{3+} , La^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , puțin investigați până în prezent în obținerea de combinații complexe ale chinolonei.

Teza de doctorat este compusă din două părți: Partea generală și cea a Contribuțiilor personale. La cele două părți principale ale tezei se adaugă Introducerea, Bibliografia și Anexele, ce cuprind articolele publicate din teza de doctorat.

În prima parte a tezei sunt descrise evoluția chinolonei, elementele de farmacologie și toxicologie, interacțiunile medicamentoase, fenomenul de rezistență, prezența chinolonei în mediul înconjurător – un subiect de mare interes, precum și particularitățile complexelor chinolonei cu ioni ai lantanidelor studiați până în prezent. Cercetarea minuțioasă a literaturii de specialitate în ceea ce privește acțiunea biologică a chinolonei a evidențiat două alte acțiuni care transformă chinolonele în candidați propice pentru procesul de „repoziționare”: acțiunea antitumorală și cea imunomodulatoare.

Partea de contribuții personale este structurată în patru capitole: obiectivele studiului și materiale și metode, complexi ai acidului nalidixic, complexi ai acidului oxolinic, complexi ai difloxacinei, concluzii generale și contribuții personale.

Au fost obținuți în total 17 complexi metalici noi, 9 ai acidului nalidixic, 6 ai acidului oxolinic și doi ai difloxacinei. Fiecare clasă de complexi metalici a fost tratată separat și caracterizată din punct de vedere fizico-chimic prin analiză elementală, spectroscopie în domeniile UV-vizibil-NIR, IR și analiză termică. În urma acestor analize a fost posibilă atribuirea structurilor chimice probabile. Deoarece nu a fost posibilă obținerea de monocristale, structurile propuse pentru complexii obținuți au fost confirmate prin

calcule DFT (density-functional theory), atât prin generarea structurii corespunzătoare unei energii minime, cât și prin generarea spectrelor în IR și compararea acestora cu cele obținute experimental.

Următoarea etapă a constat în evaluarea acțiunii biologice a compușilor obținuți, care a cuprins studii de citotoxicitate, studii asupra interacțiunilor cu macromolecula de ADN și studii asupra interacțiunii cu proteinele serice precum albumina serică umană și apotransferina. Pentru studiile de citotoxicitate au fost utilizate trei linii celulare: HUVEC (celule normale endoteliale din vena ombilicală umană), LoVo (adenocarcinom colorectal) și MDA-MB 231 (adenocarcinom mamar). Studiile asupra interacțiunilor cu macromolecula de ADN au constat în evaluarea capacității de legare prin tehnici de spectroscopie în domeniul UV-vizibil și în efectuarea studiilor de legare competitive cu bromura de etidiu, un cunoscut intercalator al moleculei de ADN, prin înregistrarea spectrelor de emisie de fluorescență. Fiecare determinare a fost însoțită de calcularea constantelor caracteristice fiecărui tip de interacțiune și anume, K_b (constanta de legare), K_{SV} (constanta Stern-Volmer) și K_{50} (constanta de disociere).

Studiile asupra interacțiunilor noilor combinații complexe cu proteinele serice au inclus studii privind efectul de diminuare a fluorescenței native a proteinelor și studii asupra modificării conformației acestora; toate acestea au fost realizate prin intermediul spectroscopiei de fluorescență. Evaluarea interacțiunilor a fost realizată prin intermediul parametrilor caracteristici: K_a (constanta de afinitate), K_{SV} (constanta Stern-Volmer), K_q (constanta de diminuare a fluorescenței), K_d (constanta de disociere), f_a (fracția accesibilă de fluorofor), n_1 (numărul de situsuri de legare), n_2 (coeficientul Hill).

În ansamblu, compușii testați prezintă o activitate biologică satisfăcătoare. Acțiunea citotoxică asupra liniilor celulare tumorale este una moderată, în unele cazuri apropiată de cea a substanței de referință, în timp ce citotoxicitatea asupra liniei celulare normale este inferioară cisplatinului. Interacțiunile cu macromolecula de ADN pot fi caracterizate ca fiind medii, cel mai probabil prin groove binding; modul de legare intercalativ, deși sugerat de spectrele de fluorescență, nu este susținut de valorile constantei K_{SV} . Interacțiunile cu proteinele serice sunt suficient de puternice pentru a putea asigura un transport eficient al complexelor în sânge, dar, în același timp, suficient de labile încât să nu determine modificări farmacocinetice sau farmacodinamice. Complexii studiați prezintă o afinitate mai mare față de albumina serică.

I. Parte generală

I.1. Noțiuni generale despre chinolone

Chinolonele reprezintă o clasă de agenți antibacterieni sintetici cu spectru larg de acțiune și o bună biodisponibilitate [1], [2] caracteristici care le plasează pe lista candidaților potriviți pentru tratarea infecțiilor cu diferite localizări: cutanate, urinare, respiratorii, osoase, gastrointestinale etc. [3]. Pentru a lărgi spectrul antibacterian și pentru a îmbunătăți proprietățile farmacocinetice, la scheletul acidului nalidixic au fost aduse numeroase modificări; cele aduse în pozițiile 5, 6, 7 și 8 au condus la îmbunătățirea proprietăților farmacocinetice precum: timpi de înjumătățire prelungiți, penetrare tisulară îmbunătățită, volum de distribuție mărit și o biodisponibilitate superioară [4].

Chinolonele prezintă un mecanism de acțiune bactericid ce rezultă din inhibarea transcrierii și replicării ADN-ului bacterian. În esență, în micobacterii [5] și în majoritatea bacteriilor Gram-negative, chinolonele acționează predominant prin întreruperea activității topoizomerazei II, cunoscută și sub denumirea de ADN-girază [6], în timp ce în bacteriile Gram-pozitive [7,8] topoizomeraza IV este ținta principală [9].

Familia de enzime ADN-topoizomerază specifice celulei eucariote prezintă aceleași funcții: reglare a replicării, transcripția ADN-ului, reparare prin recombinare, decondensarea cromatinei [10]. Blocarea activității acestor enzime se traduce prin obținerea unui efect antitumoral; agenți antitumorali utilizați în practică prezentând acest mecanism de acțiune sunt etopozid, antraciclinele (doxorubicina, daunorubicina) și mitoxantrona [11]. În ceea ce privește efectul imunomodulator, a fost observată influența chinolonei asupra proceselor de aderare bacteriană și colonizare a suprafețelor epiteliale, precum și asupra eliberării de produse bacteriene proinflamatorii [12,13].

I.2. Complecși ai chinolonei cu ioni ai lantanidelor

În majoritatea cazurilor chinolonele acționează ca liganzi bidentați, legându-se la ionul metalic prin unul din cei doi atomi de oxigen din gruparea carboxil și atomul de oxigen din gruparea 4-oxo (**Figura 1**). mai rar și în condiții de lucru speciale se întâmplă ca legarea să aibă loc doar prin intermediul celor doi atomi de oxigen din gruparea carboxil sau, depinzând de proprietățile ionului metalic (spre exemplu, ionul de argint), prin unul sau ambii atomi de azot ai inelului piperazinic [8], [14], [15,16].

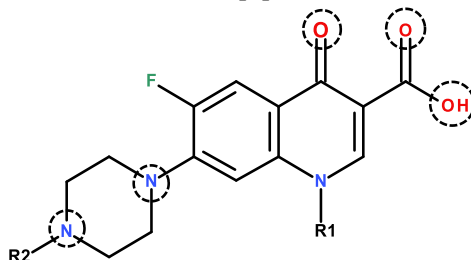


Figura 1. Atomii donori în structura generală a fluorochinolonei [17].

Chelații chinolonei cu ioni lantanidici trivalenți (Ln^{3+}) au devenit de interes pentru cercetători după ce au fost observate o serie de efecte fiziologice în urma înlocuirii ionului de Ca^{2+} de către cel de La^{3+} în diferite situsuri fiziologice [18]. De asemenea, dezvoltarea agenților de contrast pentru RMN pe bază de chelați ai gadoliniului (III) [19–21] și observarea abilității complexelor luminescenți ai Tb^{3+} și Eu^{3+} de a se

lega de "situsul pentru medicamente II" al albuminei [22] au determinat explorarea proprietăților chelatoare și luminescente ale complexilor.

Chelatarea este cea mai stabilă și cea mai importantă modalitate de formare a complexilor pentru ionii lantanidelor. Numerele de coordinare variază în general între 6 și 12; pentru molecule biologice, totuși, cele mai întâlnite sunt 8 și 9. Acești chelați prezintă o serie de proprietăți spectroscopice propice analizei: benzi de emisie înguste și bine structurate, diferențe mari între lungimile de undă de absorbție și cele de emisie (deplasări Stokes), timp de viață lungi ai stărilor excitate [23,24]. Toate caracteristicile menționate determină o bună sensibilitate și selectivitate.

II. Contribuții personale

II.1 Obiectivele studiului. Materiale și metode utilizate

II.1.1. Obiectivele studiului

Data fiind tema acestei lucrări, scopul a fost obținerea de noi complecși ai unor chinolone cu utilizări limitate în prezent, acidului nalidixic, acidului oxolinic și difloxacina, și testarea activității biologice a acestora. Cercetările personale efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au avut următoarele obiective: sinteza de combinații complexe ale unor cationi ai metalelor tranziționale Y^{3+} , La^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} cu acidul nalidixic, acidul oxolinic și difloxacina, caracterizarea structurală a acestora prin analiză chimică elementală, spectroscopie în domeniile UV-vizibil-NIR și IR, analiză termogravimetrică, spectrometrie de masă și studii DFT (density functional theory), testarea preliminară a activității citotoxice a complexelor obținuți și testarea interacțiunii complexelor cu macromolecula de ADN și cu proteinele serice albumina serică umană (HSA) și apotransferina (apo-Tf).

II.1.2. Materiale și metode

II.1.2.1. Materiale utilizate

Toți reactivii și solvenții au fost de puritate analitică și au fost utilizați fără aplicarea altor metode de purificare. Acidul oxolinic, acidul nalidixic, clorhidratul de difloxacină, sărurile metalice $YCl_3 \cdot 6H_2O$, $LaCl_3$, $EuCl_3 \cdot 6H_2O$, $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, $SmCl_3 \cdot 6H_2O$, $TbCl_3 \cdot 6H_2O$, transferina umană, albumina serică umană și ADN-ul dublu catenar obținut din timus de vițel (CT-ADN) au fost achiziționate de la Sigma Aldrich Chemical Co. (Schnelldorf, Germany). Toate celelalte substanțe chimice și solvenți sunt disponibile comercial, și au fost utilizate fără purificare suplimentară. Următoarele abrevieri au fost utilizate pentru descrierea benzilor în spectrele IR: w = weak (intensitate slabă), m = medium (intensitate medie), s = strong (intensitate puternică), b = broad (bandă largă).

II.1.2.2. Metode de sinteză și purificare

II.1.2.2.1. Obținerea combinațiilor complexe ale acidului nalidixic

Sinteza generală a presupus următorii pași:

- acidul nalidixic se aduce într-un balon cu fund rotund, împreună cu o cantitate corespunzătoare de NaOH solid, peste care se adaugă apă distilată; amestecul este încălzit la reflux, sub agitare magnetică, aproximativ 30 min., până la dizolvarea completă a acidului nalidixic;
- soluția fierbinte se adaugă treptat, picătură cu picătură peste cantitatea necesară de sare metalică pentru obținerea de complecși în raport molar 1:2 și 1:3; în cadrul acestei etape, pH-ul amestecului este constant verificat și ajustat la valoarea 5, utilizând soluții proaspăt preparate de HCl 0.5 M sau NaOH 1M, după caz; la final, pH-ul amestecului de reacție este adus la valoarea 7, utilizând aceleași soluții;
- amestecul este menținut la reflux aproximativ 4.5 ore, timp în care se observă formarea unor precipitate albe, gelatinoase;

- după răcire, conținutul balonului se aduce într-un pahar Berzelius, iar peste el se adaugă 50 mL acetonă cu scopul obținerii de precipitate cristaline; amestecul este păstrat la frigider aproximativ 15 h;
- a doua zi este adus la temperatura camerei și filtrat prin creuzet filtrant, sub vacuum; precipitatele se spală de 3 ori, alternativ cu câte 5 mL apă și 5 mL acetonă și se usucă în exsicator.

II.1.2.2.2. Obținerea combinațiilor complexe ale acidului oxolinic

Pentru obținerea combinațiilor complexe, au fost parcurși următorii pași:

- acidul oxolinic este dizolvat în soluție NaOH 1M, sub continuă agitare și ușoară încălzire, pentru obținerea sării de sodiu a acestuia; apa este evaporată prin încălzire, izolând sarea în formă solidă;
- peste aceasta se adaugă clorură metalică solidă și apă distilată; această etapă a sintezei este executată la sintetizatorul cu microunde (aparatură utilizată: sintetizator marca Biotage, Suedia) unde amestecul a fost menținut timp de 30 de minute, la 165°C, sub agitare continuă;
- se obțin precipitate gălbui care se filtrează, apoi se spală cu apă distilată (3 x 10 mL) și se lasă la uscat în exsicator.

II.1.2.2.3. Obținerea combinațiilor complexe ale difloxacinei

Sinteza complexelor a presupus următorii pași:

- difloxacina clorhidrat se aduce într-un balon cu fund rotund, împreună cu hidroxidul de sodiu solid, peste care se adaugă apă distilată;
- amestecul este încălzit la reflux, pe baie de apă, la aproximativ 70-75°C, sub agitare magnetică, până la dizolvarea completă a difloxacinei și obținerea unei soluții limpezi, galbene;
- soluția fierbinte se adaugă treptat, picătură cu picătură peste cantitatea necesară de clorură metalică; în cadrul acestei etape, pH-ul amestecului este constant verificat și ajustat la valoarea 6, utilizând soluții proaspăt preparate de HCl 0.5 M sau NaOH 1M, după caz; la final, pH-ul amestecului de reacție este adus la valoarea 7, utilizând aceleași soluții;
- amestecul este menținut la reflux aproximativ 4.5 ore, pe baie de apă la aproximativ 80-85°C, timp în care se observă formarea unor precipitate alb -gălbui;
- după răcire, conținutul balonului este adus într-un pahar Berzelius, lăsat peste noapte la frigider și filtrat a doua zi prin hârtie de filtru; precipitatele sunt spălate de trei ori cu câte 5 mL apă, alternativ cu 5 mL acetonă.

II.1.2.3. Caracterizarea fizico-chimică a complexelor

Analiza elementală a compușilor obținuți a fost efectuată pentru elementele C, H și N, utilizând aparatul PE 2400 (Perkin Elmer).

Spectrele în domeniul UV-vizibil-NIR au fost înregistrate prin metoda reflectanței difuze, pe domeniul 200- 2000 nm, utilizând probe solide și spectralon ca probă de referință, la spectrofotometrul V-670 (Jasco).

Spectrele în domeniul infraroșu (IR) au fost înregistrate pe probe solide, utilizând aparatul FT-IR VERTEX 70 (Bruker) prevăzut cu accesoriu ATR cu cristal de diamant.

Comportamentul termic (TG și DTA) a fost analizat utilizând instrumentul Labsys 1200 Setaram, pe probe cu o masă medie de 12 mg introduse în creuzete de alumina, în intervalul de temperatură 20-1000°C, cu o rată de încălzire de 10°C/min; măsurătorile au fost executate într-o atmosferă de aer sintetic cu un debit de 16.66 cm³/min.

Pentru spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HRMS), complexii au fost dizolvați în DMSO, iar probele diluate cu metanol în raport 1:10 (V:V) au fost injectate în analizorul LTQ-Orbitrap Velos Pro cu interfață nanoESI. Datele au fost achiziționate manual și prelucrate utilizând soft-ul LTQ Tune v2.7.

II.1.2.4. Calcule DFT (density functional theory)

Utilizând soft-ul Gaussian 09 (versiunea A.02) [25] și funcția B3LYP DFT a fost posibilă obținerea structurilor optimizate ale combinațiilor complexe **Sm oxo**, **Sm(nal)**₂ și **Eu(dflx)**₂. Potențialul de nucleu ECP52MWB a fost utilizat pentru cation și setul de bază 6-31G(d,p) pentru atomii de H, C și O. Multiplicitatea dubletelor de spin și metoda câmpului auto-susținut (self-consistent field (SCF)) au fost utilizate pentru obținerea geometriilor optimizate corespunzătoare unui potențial minim al energiei de suprafață. Nu au fost impuse restricții de simetrie la prelucrarea geometriilor optimizate, iar absența frecvențelor imaginare a fost verificată în analiza vibrațională pentru a confirma că fiecare structură corespunde unui minim adevărat. Soft-urile Gauss View 6.0.16 [26] și Mercury 4.0 [27] au fost utilizate pentru vizualizarea datelor și, respectiv, pentru captura imaginilor.

II.1.2.5. Studii asupra acțiunii biologice

II.1.2.5.1. Citotoxicitate

Studiul de citotoxicitate are la bază capacitatea celulelor metabolice active de a reduce substanța MTS, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, sare internă), o sare tetrazolică de culoare galbenă, la formazan, substanță colorată și solubilă în mediul de cultură; concentrația de formazan poate fi cuantificată spectrofotometric. Celulele au fost tratate timp de 24 h, respectiv, 48 h cu soluții ale complexelor de concentrație 200, 100, 50, 25, 12.5, respectiv 6.25 μM. Concentrația formei reduse a MTS a fost evaluată spectrofotometric la lungimea de undă λ = 492 nm. Testele au fost efectuate pe 3 linii celulare și anume: HUVEC (celule normale endoteliale din vena ombilicală umană), LoVo (adenocarcinom de colon) și MDA-MB 231 (adenocarcinom mamar). Datele sunt exprimate ca viabilitate celulară prin compararea cu celulele netratate, considerate 100% viabile, utilizând următoarea formulă de calcul:

$$\text{viabilitate celulară (\%)} = \frac{\text{A celule tratate} - \text{A mediu de cultură}}{\text{A celule netratate} - \text{A mediu de cultură}} \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

unde A= absorbanța.

A fost utilizat și procentul de citotoxicitate celulară conform formulei:

$$\text{Citotoxicitate celulară (\%)} = 100 - \text{viabilitate celulară (\%)}.$$

Determinările au fost realizate în triplicat (n=3), iar rezultatele au fost exprimate ca valoare medie ± deviație standard (SD). Analiza statistică a fost realizată prin metoda ANOVA și testul Tukey; o valoare a parametrului p ≤ 0.05 a fost considerată semnificativă statistic. În paralel, a fost evaluată citotoxicitatea

DMSO în aceleași condiții experimentale; nu a fost observată toxicitate celulară la concentrații mai mici de 1%.

Liniile celulare utilizate sunt MDA-MB 231 (adenocarcinoma mamar) și LoVo (adenocarcinom colorectal), iar efectele observate pentru complexii testați au fost comparate cu cele ale adriamicinei (ADR), respectiv cisplatin (Cis-Pt).

Toate testele au fost derulate utilizând plăci de microtitrare cu 96 de cuve cu fundul plat (Falcon), kit-ul de proliferare celulară CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega). Concentrația de formazan a fost evaluată spectrofotometric utilizând aparatul Tecan GENios.

II.1.2.5.2. Interacțiunea cu molecula de ADN

II.1.2.5.2.1. Investigarea interacțiunii cu ADN prin spectrometrie în domeniul UV-vizibil

Studiile asupra interacțiunii complexelor cu molecula de ADN au fost realizate prin înregistrarea spectrelor de absorbție în domeniul UV-Vis ale probelor ce conțin compus de interes și cantități crescătoare de soluție stoc de ADN. Probele au fost preparate utilizând soluția tampon Tris-HCl ca solvent (5 mM Tris-HCl/ 50 mM NaCl cu pH ajustat la 7.4 utilizând o soluție de 0.1 M HCl). Concentrația soluției stoc de ADN a fost determinată prin măsurarea absorbției la lungimea de undă de 260 nm și utilizând valoarea de 6600 M⁻¹ cm⁻¹ pentru coeficientul molar de extincție. Determinarea încărcăturii proteice a soluției stoc de ADN a fost posibilă prin calcularea raportului absorbanțelor soluției la lungimile de undă 260 nm și 280nm; raportul având o valoare de 1.8 se încadrează în intervalul optim de 1.8- 2.0 corespunzător unei încărcături proteice minime [28]. Aceste studii au fost derulate utilizând spectrofotometrul Jasco V650, în cuve de cuarț cu drumul optic de 1 cm, la temperatura camerei.

Ecuția (2) a fost utilizată pentru calcularea constantei de legare (K_b):

$$\frac{[ADN]}{\epsilon_a - \epsilon_f} = \frac{[ADN]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad \text{Ec. (2)}$$

unde [ADN] reprezintă concentrația de ADN din probă, exprimată în nucleobaze, ϵ_a , ϵ_b , ϵ_f , coeficienții de absorbție aparentă, coeficientul de extincție pentru complexul în formă total legată și, respectiv, coeficientul de extincție pentru complexul în formă liberă, iar K_b este constanta de legare intrinsecă; aceasta poate fi determinată ca raportul dintre panta dreptei ecuației (1/($\epsilon_b - \epsilon_f$)) și intersecția cu axa ordonată (1/K_b($\epsilon_b - \epsilon_f$)) [29].

1.2.5.2.2. Teste de legare competitivă cu bromura de etidiu (EB) prin înregistrarea spectrelor de emisie de fluorescență

Testele de legare competitivă au fost realizate utilizând fluorimetrul Jasco FP 6500, la temperatura camerei, în cuve de cuarț cu drumul optic de 1 cm. Spectrele de fluorescență au fost înregistrate pe probe cu volumul de 1.6 mL conținând 10 μM CT-ADN și 2 μM EB în absența, respectiv prezența cantităților crescătoare (0 - 40 μM cu un increment de 5 μM) de complexi, după o perioadă de incubare de 10 min. la temperatura camerei, sub continuă agitare și ferit de lumina. Lungimea de undă de excitație utilizată a fost 500 nm, iar spectrul a fost înregistrat pe domeniul 520 - 800 nm.

Datele pot fi interpretate utilizând ecuația clasică Stern-Volmer (Ec. (3)) [30]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad \text{Ec. (3)}$$

unde F_0 și F sunt intensitățile fluorescențelor probelor de EB-ADN în absența, respectiv prezența compușilor de testat și $[Q]$ este concentrația compușilor; K_{SV} este constanta Stern-Volmer și poate fi calculată ca panta drepte din graficul F_0/F vs. $[Q]$.

Constanta K_{50} corespunzătoare concentrației de compus pentru un procent de legare de 50% a putut fi calculată utilizând funcția Hill modificată (Ec. (4)); aceasta permite înlăturarea efectului pe care DMSO îl are asupra fluorescenței. Rerezentarea grafică a datelor a fost posibilă utilizând softul Origin®:

$$y = A_1 + \frac{(A_2 - A_1) \times x^n}{K_{50}^n + x^n} \quad \text{Ec. (4)}$$

unde y este raportul intensităților fluorescenței (F/F_0) și x este concentrația de complex, A_1 este valoarea minimă dintre valorile y obținute, A_2 este valoarea maximă dintre valorile obținute pentru y , K_{50} este concentrația corespunzătoare unui procent de legare de 50% și n este coeficientul Hill [31].

1.2.5.3. Interacțiunea cu proteinele serice

1.2.5.3.1. Mecanismul de scădere a fluorescenței native a proteinelor

Spectrele de fluorescență ale albuminei serice (HSA) și apo-transferinei (apo-Tf) au fost înregistrate cu spectrofluorimetrul Jasco FP 6500, în cuve de cuarț cu drumul optic de 1 cm. 2.5 mL de probă conținând 2.5 μ M HSA sau 1 μ M apo-Tf, au fost titrați prin adăugarea succesivă a câte 5 μ L soluție compus de testat, corespunzător unui increment de 1 μ M, în intervalul 0-8 μ M. Probele au fost menținute 3 min. sub agitare continuă și apoi au fost înregistrate spectrele corespunzătoare în intervalul 300-500 nm la lungimea de undă de excitație de 280 nm (HSA), respectiv 305-500 nm și 295 nm (apo-Tf). Probele au fost obținute utilizând ca solvent soluția tampon Tris-HCl cu un pH=7.4 (5 mM Tris-HCl/ 50 mM NaCl pentru HSA, respectiv 5 mM Tris-HCl/ 50 mM NaCl/ 25 mM NaHCO₃ pentru apo-Tf). Ecuația Stern-Volmer modificată a fost utilizată pentru calcularea constantei cu același nume:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_{SV}[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad \text{Ec. (5)}$$

unde F_0 și F sunt intensitățile fluorescenței înregistrate în absența, respectiv prezența compușilor testați, f_a este fracția de fluorofor accesibilă compusului, $[Q]$ este concentrația compusului și K_{SV} (M^{-1}) este constanta Stern-Volmer; din reprezentarea grafică a raportului $F_0/(F_0-F)$ vs. $1/[Q]$, K_{SV} și f_a pot fi calculate drept panta, respectiv intersecția cu axa ordonată.

$$K_{SV} = K_q \tau_0 \quad \text{Ec. (6)}$$

unde K_q ($M^{-1} s^{-1}$) este constanta bimoleculară a ratei de scădere a fluorescenței și τ_0 este timpul de viață al fluoroforului în absența compusului studiat [32,33]. Valoarea K_q este utilă pentru evaluarea mecanismului ce stă la baza fenomenului de diminuare a fluorescenței ca fiind static sau dinamic [28].

Constanta de afinitate (K_a) și numărul de situsuri de legare (n_1) au fost calculate utilizând următoarea ecuație:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_a + n \lg Q \quad \text{Ec. (7)}$$

Pentru calcularea constantei de disociere, K_d , următoarea ecuație poate fi utilizată:

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_b} = \frac{[P]_t + [Q] + K_d - \sqrt{([P]_t + [Q] + K_d)^2 - 4[P]_t[Q]}}{2[P]_t} \quad \text{Ec. (8)}$$

unde F și F_0 reprezintă intensitățile fluorescențelor proteinelor obținute în prezența, respectiv absența compușilor de interes, F_b este fluorescența compusului în totalitate legat de proteină, $[P]_t$ este concentrația totală a proteinei și $[Q]$ este concentrația adăugată de compus. Pentru cuantificarea afinității de legare, fiecare izotermă de legare a fost reprezentată grafic ca raport al proteinei legate și liberă (F/F_0) în funcție de concentrația totală a compusului în soluție; apoi izotermele au fost potrivite funcției nonliniare de regresie:

$$\frac{F}{F_0} = F_1 + (F_2 - F_1) \frac{K_d^n}{K_d^n + [Q]^n} \quad \text{Ec. (9)}$$

unde n este coeficientul Hill (n_2), iar F_2 și F_1 sunt asimptotele verticală, respectiv orizontală. Parametrul K_d din ec. (9) este derivat din funcția cvadratică de legare (eq. (8)) [31]. Datele au fost obținute în triplicat și exprimate ca medie $\pm$ deviație standard (SD). Toate funcțiile de procesare a datelor au fost definite și dezvoltate utilizând softul OriginPro 2018.

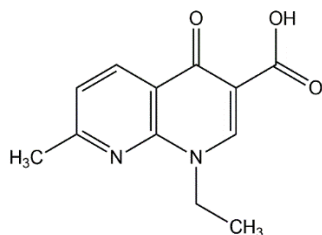
1.2.5.3.2. Studii asupra modificărilor conformaționale ale proteinelor datorate interacțiunii cu complexii testați

Aceste studii au presupus înregistrarea spectrelor sincron de fluorescență ale celor două proteine în absența, respectiv prezența compușilor studiați; au fost utilizate aceleași probe ca în experimentul descris anterior, dar utilizând $\Delta\lambda = 60$ nm și $\Delta\lambda = 15$ nm, respectiv, în intervalul 250 - 400 nm.

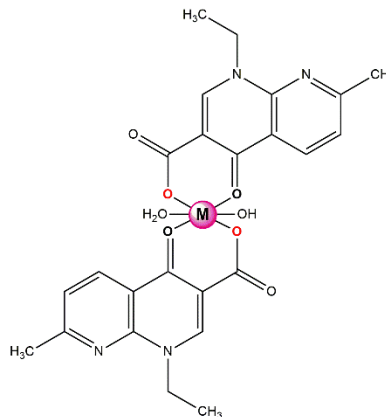
II.2. Complecși ai acidului nalidixic

Au fost sintetizate și caracterizate 5 combinații complexe noi în raport molar 1:2 ale ligandului acid nalidixic cu ionii La^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} și 4 combinații complexe în raport molar 1:3 cu ionii La^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} și Tb^{3+} . Compușii sunt de tip chelat și corespund formulelor generale $[\text{M}(\text{nal})_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=2$ pentru La^{3+} , $n=3$ pentru Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , $n=1.5$ pentru Tb^{3+}), respectiv $[\text{La}(\text{nal})_3(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=6$ pentru La^{3+} , $n=2.5$ pentru Eu^{3+} , $n=1.5$ pentru Gd^{3+} și Tb^{3+}). Formulele chimice și structura probabilă au fost propuse în urma efectuării mai multor analize: elementală, termogravimetrică și spectroscopie în domeniile UV-viz-NIR și IR. Geometria de coordinare a fost confirmată prin studii DFT. În urma acestor studii, în cazul combinațiilor complexe 1:2 a fost propusă o geometrie octaedrică, ionul metalic fiind înconjurat de două molecule deprotonate de ligand (legate de acesta prin atomii de oxigen), o moleculă de apă și o grupare hidroxid. În cazul complexelor obținute în raport molar 1:3, numărul de coordinare al ionului metalic este 8, acesta fiind înconjurat de trei molecule deprotonate de ligand și două molecule de apă.

A.



B.



C.

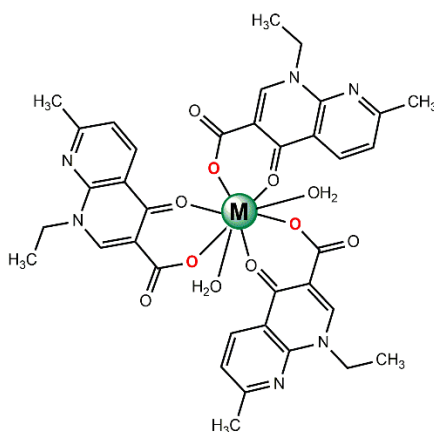


Figura 2. Structura chimică a: **A.** acidului nalidixic, **B.** complexii acidului nalidixic în raport molar 1:2, **C.** complexii acidului nalidixic în raport molar 1:3.

Tabel 1. Procentele de C, H și N obținute în urma analizei elementale a complexelor acidului nalidixic în raport 1:2, respectiv 1:3.

COMPUS	C (%)		H (%)		N (%)	
	Teoretic	Practic	Teoretic	Practic	Teoretic	Practic
[La(nal) ₂ (OH)(H ₂ O)]·2H ₂ O La(nal) ₂ M = 672.41 g/mol	42.87	42.35	4.35	4.45	8.33	8.09
[Sm(nal) ₂ (OH)(H ₂ O)]·3H ₂ O Sm(nal) ₂ M = 701.88 g/mol	41.07	40.65	4.45	4.28	7.98	7.51
[Eu(nal) ₂ (OH)(H ₂ O)]·3H ₂ O Eu(nal) ₂ M = 703.49 g/mol	40.98	40.47	4.44	4.51	7.96	7.45
[Gd(nal) ₂ (OH)(H ₂ O)]·3H ₂ O Gd(nal) ₂ M = 708.77 g/mol	40.67	41.07	4.41	4.69	7.90	7.21
[Tb(L) ₂ (OH)(H ₂ O)]·1.5H ₂ O Tb(nal) ₂ M = 683.43 g/mol	42.18	42.78	4.13	4.78	7.20	7.57
[La(nal) ₃ (H ₂ O) ₂]·6H ₂ O La(nal) ₃ M = 976.71 g/mol	44.27	44.97	5.06	5.15	8.60	8.41
[Eu(nal) ₃ (H ₂ O) ₂]·2.5H ₂ O Eu(nal) ₃ M = 926.71 g/mol	46.66	47.08	4.57	4.55	9.07	9.48
[Gd(nal) ₃ (H ₂ O) ₂]·1.5H ₂ O Gd(nal) ₃ M = 886.96 g/mol	48.75	48.24	4.20	4.51	9.48	9.32
[Tb(nal) ₃ (H ₂ O) ₂]·1.5H ₂ O Tb(nal) ₃ M = 888.64 g/mol	48.66	48.57	4.20	4.68	9.46	9.73

Tabel 2. Benzile observate în domeniul IR pentru acidul nalidixic, sarea de sodiu și complexii acestuia

Compus	ν C=O carboxilic	ν C=O piridonic	ν O-C-O as	ν O-C-O s	Δ	ν M-O
Nal	1707	1613	-	-	-	-
Nal·Na ⁺	-	1578	1632	1438	140	-
La(nal) ₂	-	1570	1618	1443	127	578,492 477 410
Sm(nal) ₂	-	1569	1616	1443	126	599 559 492 409
Eu(nal) ₂	-	1567	1615	1442	125	599 559 492 409
Gd(nal) ₂	-	1567	1614	1441	126	558 408
Tb(nal) ₂	-	1568	1615	1442	126	602 559 469
La(nal) ₃	-	1562	1615	1442	120	558 425
Eu(nal) ₃	-	1563	1616	1442	121	463 433 402
Gd(nal) ₃	-	1559	1615	1439	120	599 558 405
Tb(nal) ₃	-	1559	1614	1439	120	590 558 403

Acțiunea citotoxică a noilor combinații complexe a fost studiată pe trei linii celulare: HUVEC, LoVo și MDA-MB 231. Complexii de tipul $M(nal)_2$ și $M(nal)_3$ prezintă o activitate satisfăcătoare pe ambele linii celulare, unii complecși fiind caracterizați de un indice IC_{50} superior substanței de referință, cisplatin, pe linia celulară LoVo. Seria 1:3 oferă doi reprezentanți mai activi decât cisplatinul, iar toți compușii din această serie sunt mai activi decât omologii din seria 1:2. În cazul liniei celulare MDA-MB 231 complexii din seria 1:2 sunt mai acitivi decât omologii 1:3. Efectul toxic asupra liniei de celule normale, HUVEC, este mai slab comparativ cu cel observat asupra celor două linii celulare tumorale. În ansamblu, se poate evidenția un potențial citotoxic pentru acești complecși dar este necesară testarea și pe alte linii celulare.

Tabel 3. Indicele IC_{50} calculat pentru acidul nalidixic și complexii acestuia.

Compus	IC_{50} (μM)		
	LoVo	MDA-MB 231	HUVEC
Ac nalidixic	> 100	43.59 ± 14.11	> 200
La(nal) ₂	> 200	50.69 ± 6.71	> 100
Sm(nal) ₂	70.89 ± 7.86	> 100	> 200
Eu(nal) ₂	92.24 ± 1.79	30.45 ± 2.38	> 100
Gd(nal) ₂	68.88 ± 0.03	83.91 ± 21.14	> 100
Tb(nal) ₂	31.41 ± 0.96	> 100	> 100
La(nal) ₃	40.98 ± 3.42	> 200	> 100
Eu(nal) ₃	71.94 ± 17.58	75.99 ± 22.24	> 100
Gd(nal) ₃	32.95 ± 1.39	> 100	> 100
Tb(nal) ₃	> 200	44.08 ± 4.70	> 100
Cis-Pt	40.15 ± 13.94	-	28.46 ± 6.28
ADR	-	7.85 ± 0.70	

În ceea ce privește capacitatea de legare și, respectiv, de intercalare a macromoleculei de ADN, acestea au fost studiate prin spectroscopie în UV-vizibil și spectroscopie de fluorescență, complexii prezentând valori medii (10^5 , respectiv 10^3) ale constantelor ce caracterizează aceste procese (K_b , respectiv K_{SV}); valorile sunt mai mici ca ale unor agenți intercalanți clasici, totuși, fenomenul este confirmat de spectrele de fluorescență înregistrate. În cazul complexilor din seria 1:3, constantele K_{SV} și K_b scad în aceeași ordine dealungul seriei. Interacțiunile cu proteinele serice au fost investigate prin tehnici de titrare fluorescentă, prin urmărirea fenomenului de diminuare a fluorescenței și înregistrarea de spectre sincron 15 și 60. Datele sugerează o afinitate ridicată pentru acestea, prezentând valori ridicate ale constantelor; complexii prezintă o afinitate mai crescută pentru HSA decât pentru apo-Tf, mecanismul de atenuare a fluorescenței fiind unul static. Valorile obținute pentru constanta K_d nu sunt suficient de mari pentru a cauza retenție semnificativă a complexilor în țesuturi, ceea ce ar avea repercursiuni negative asupra cineticii și eficacității lor.

În concluzie, noile combinații complexe prezintă un potențial biologic.

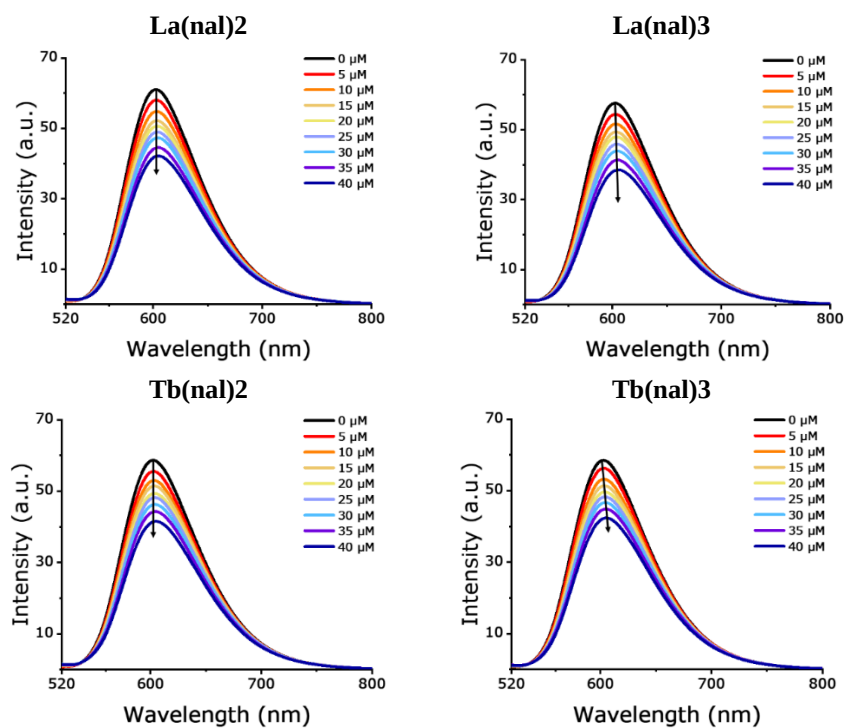


Figura 3. Spectrele de fluorescență ale sistemului EB – ADN în absența, respectiv prezența cantităților crescătoare de compuși. $\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$, $[\text{EB}] = 2 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{ADN}] = 10 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{compus}] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 \text{ } \mu\text{M}$. Săgețile indică modul de descreștere al intensității fluorescenței odata cu creșterea cantităților de compus adăugate.

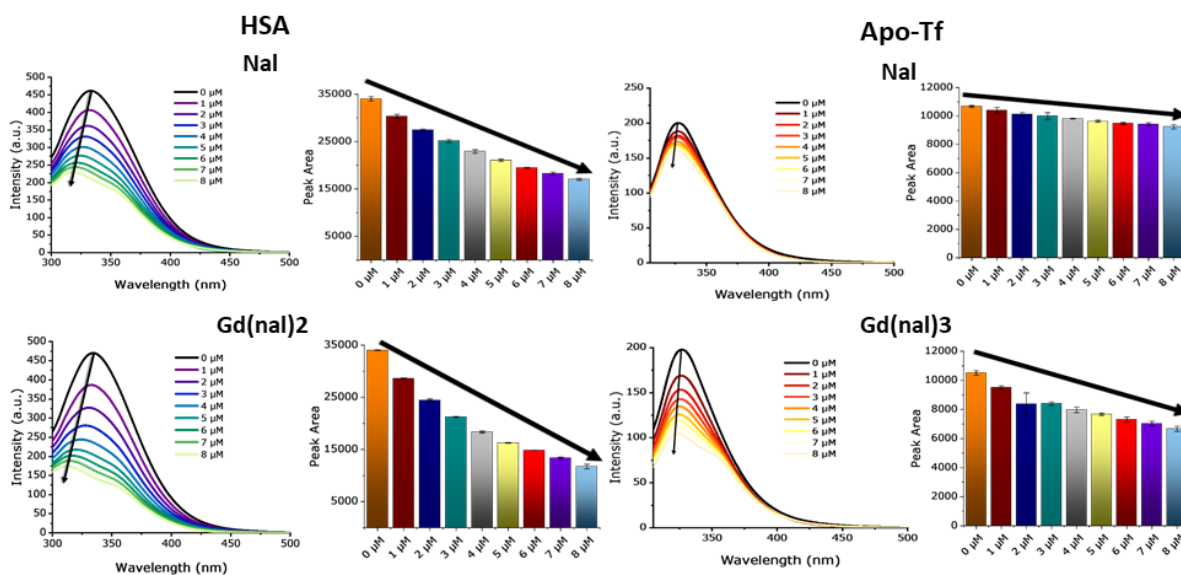


Figura 4. Variația intensității fluorescenței proteinelor studiate (HSA și apo-Tf) la adăugarea de cantități crescătoare de compus studiat. $[\text{apo-Tf}] = 1 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{HSA}] = 2.5 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{compus}] = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ } \mu\text{M}$. Săgețile negre indică modul de descreștere a ariilor maximele cu creșterea concentrației de complex.

II.3. Complecși ai acidului oxolinic

Au fost sintetizați și caracterizați 6 complecși noi în raport molar 1:2 ai ligandului acid oxolinic cu ionii Y^{3+} , La^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} și Tb^{3+} . Compușii sunt de tip chelat și corespund formulelor generale $[M(oxo)_2(OH)(H_2O)] \cdot nH_2O$ ($n=0$ pentru Y^{3+} , La^{3+} și Eu^{3+} , $n=1$ pentru Sm^{3+} și 0.5 pentru Gd^{3+} și Tb^{3+}). Structura probabilă a acestora a fost atribuită în urma efectuării mai multor analize: elementală, termogravimetrică și determinări spectroscopice în domeniile UV-viz-NIR și IR. Geometriile propuse au fost confirmate prin studii DFT. În urma acestor studii se poate afirma că aceste noi combinații complexe prezintă o geometrie octaedrică distorsionată, ionul metalic fiind înconjurat de două molecule deprotonate de ligand, legate de acesta prin atomii de oxigen, o moleculă de apă și o grupare hidroxid.

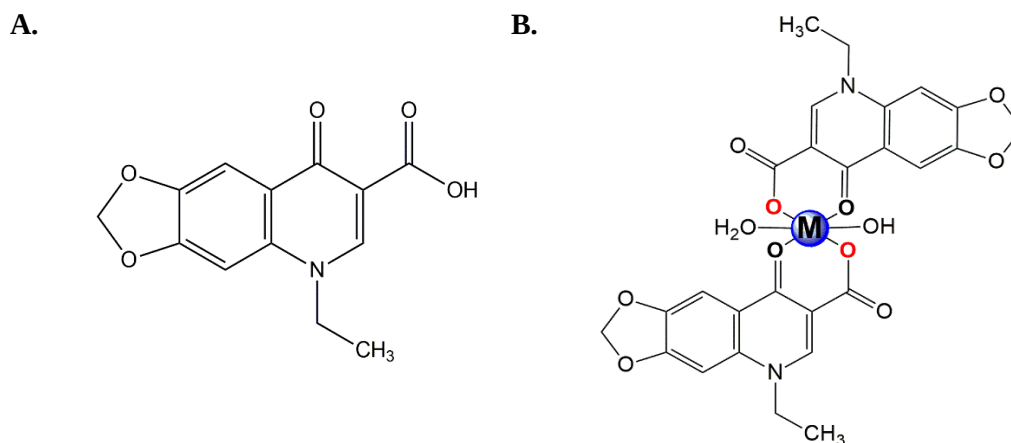


Figura 5. Structura chimică a: **A.** acidului oxolinic, **B.** complecșilor acidului oxolinic.

Tabel 4. Procentele de C, H și N obținute în urma analizei elementale a complecșilor acidului oxolinic.

COMPUS	C (%)		H (%)		N (%)	
	Teoretic	Practic	Teoretic	Practic	Teoretic	Practic
$[Y(oxo)_2(OH)(H_2O)]$ Y oxo M = 644.37 g/mol	48.46	48.97	3.60	3.53	4.35	3.89
$[La(oxo)_2(OH)(H_2O)]$ La oxo M = 694.37 g/mol	44.97	44.95	3.34	3.08	4.03	4.16
$[Sm(oxo)_2(OH)(H_2O)] H_2O$ Sm oxo M = 723.84 g/mol	43.14	41.13	3.48	3.19	3.87	4.47
$[Eu(oxo)_2(OH)(H_2O)]$ Eu oxo M = 707.43 g/mol	44.14	43.91	3.28	2.92	3.96	4.24
$[Gd(oxo)_2(OH)(H_2O)] 0.5H_2O$ Gd oxo M = 721.72 g/mol	43.62	43.52	3.35	3.17	3.88	4.17
$[Tb(oxo)_2(OH)(H_2O)] 0.5H_2O$ Tb oxo M = 723.40 g/mol	43.16	43.31	3.35	3.39	3.87	4.18

Complecșii acidului oxolinic cu ionii metalici studiați prezintă o activitate citotoxică moderată pe ambele linii celulare, complecșii **Sm oxo** și **Tb oxo**, prezentând valori ale indicelui IC_{50} comparabile cu ale cisplatinului. Citotoxicitatea compușilor testați este mai ridicată pe linia LoVo decât pe MDA-MB 231,

totuși, complexul **Sm oxo** se detașează ca fiind singurul moderat activ pe ambele linii celulare. Efectul toxic asupra linii celulare HUVEC este inferior celui observat în cazul liniilor celulare tumorale și inferior celui observat pentru cisplatin.

Tabel 5. Benzile înregistrate în domeniul IR pentru acidul oxolinic, sarea de sodiu și complexii acestuia.

Compus	ν C=O carboxilic	ν C=O piridonic	ν O-C-O as	ν O-C-O s	Δ	ν M-O
Oxo	1698	1632	-	-	-	-
Oxo·Na⁺	-	1592	1634	1337	297	-
Y-oxo	-	1594	1630	1338	292	500, 512, 611
La-oxo	-	1577	1632	1341	292	510
Sm-oxo	-	1577	1634	1340	293	500, 513, 610
Eu-oxo	-	1579	1633	1340	293	512, 643
Gd-oxo	-	1579	1633	1341	292	511, 609
Tb-oxo	-	1631	1562	1336	295	511, 610

Tabel 6. Indicele IC₅₀ calculat pentru acidul oxolinic și complexii acestuia.

Compus	IC ₅₀ (μM)		
	LoVo	MDA-MB 231	HUVEC
oxo	> 200 μM	43.49 ± 4.94	> 200 μM
Y oxo	90.41 ± 9.30	33.22 ± 14.92	> 200 μM
La oxo	52.10 ± 5.54	> 100 μM	> 200 μM
Sm oxo	41.51 ± 15.28	40.42 ± 6.27	> 200 μM
Eu oxo	106.60 ± 16.04	73.65 ± 19.80	> 200 μM
Gd oxo	56.49 ± 3.83	73.79 ± 18.50	> 200 μM
Tb oxo	40.59 ± 7.43	> 200 μM	> 200 μM
Cis-Pt	40.15 ± 13.94	-	28.46 ± 6.28
ADR	-	7.85 ± 0.70	-

Interacțiunea cu macromolecula de ADN este caracterizată de valori moderate ale constantelor. Fenomenul de intercalare nu poate fi confirmat prin testele efectuate, valorile constantei K_{SV} neîncadrându-se în limitele agenților intercalanți consacrați, dar nu poate fi nici infirmat întrucât fenomenul de diminuare a fluorescenței are loc conform experimentelor.

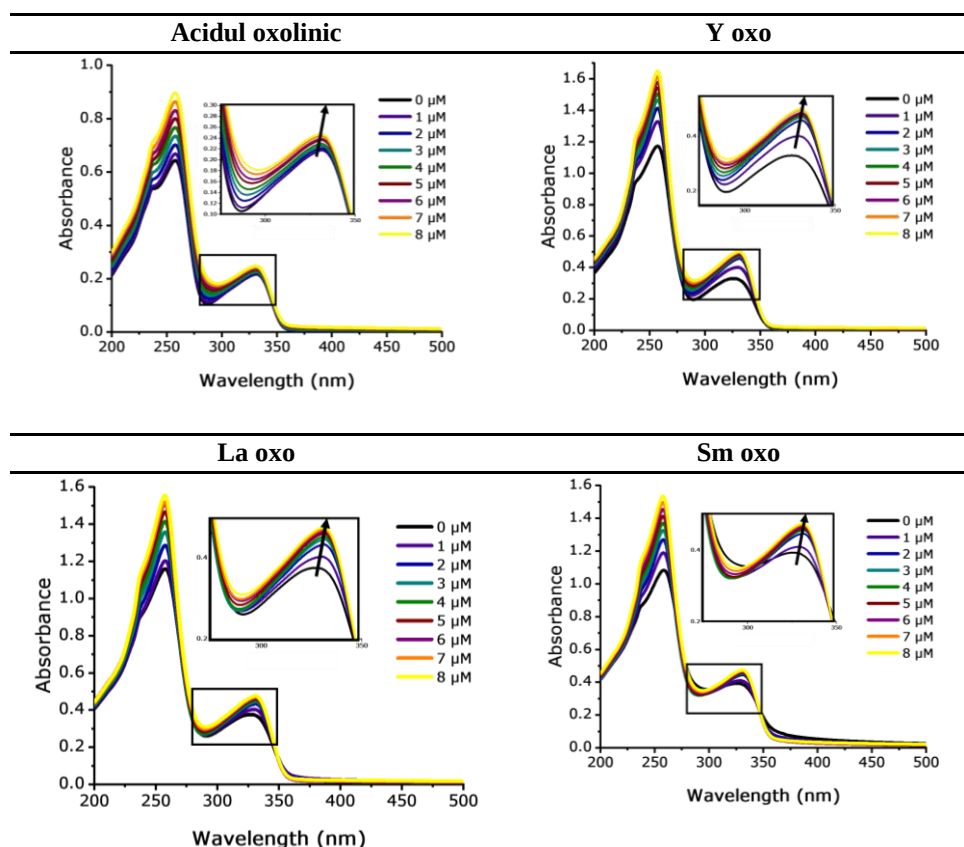


Figura 6. Spectrele de absorbție ale compușilor testați în prezența, respectiv absența cantităților crescătoare de CT-ADN. **[compus]** = 20 μM; **[CT-ADN]** = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 μM. Săgețile indică modificările absorbanței la adăugarea de cantități crescătoare de **CT-ADN**.

Datele obținute în urma interacțiunilor cu proteinele serice sugerează o afinitate ridicată pentru acestea, prezentând valori ridicate ale constantelor; complexii prezintă o afinitate mai mare pentru HSA decât pentru apo-Tf. Valorile K_{SV} calculate încadrează aceste interacțiuni la mecanismul static de atenuare a fluorescenței. Valorile obținute pentru constanta K_d nu sunt suficient de mari pentru a cauza retenție semnificativă a complexelor în țesuturi, ceea ce ar avea repercursiuni negative asupra cineticii și eficacității lor.

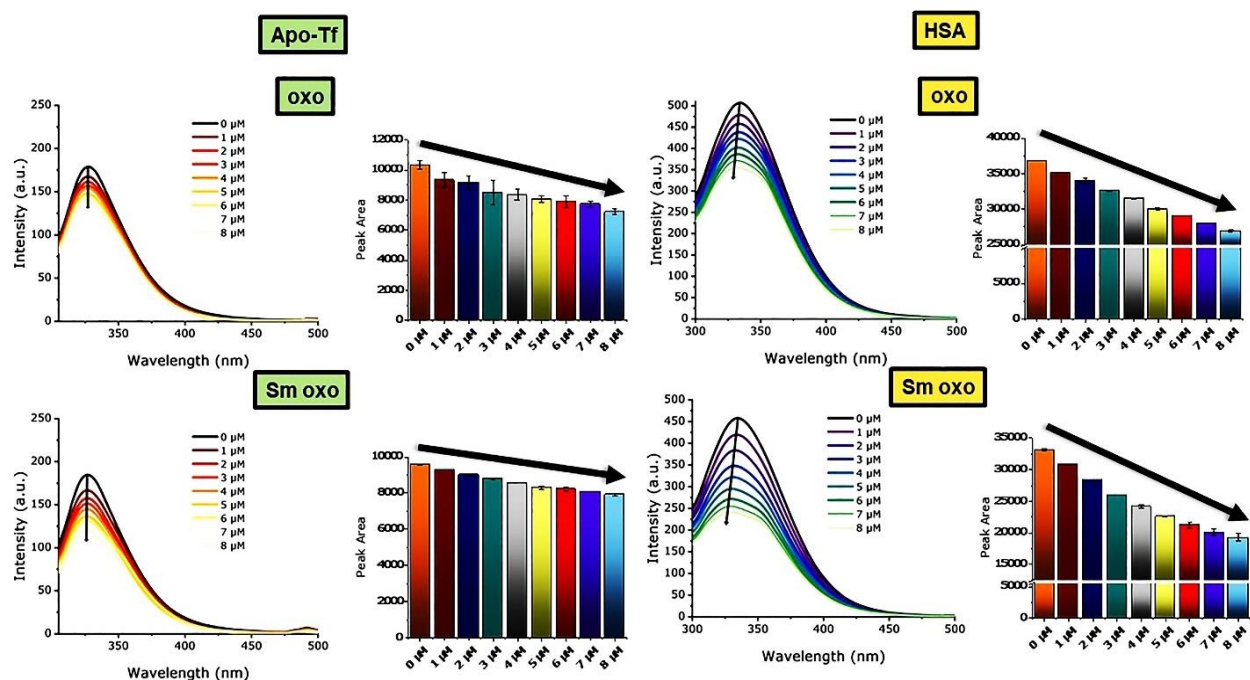


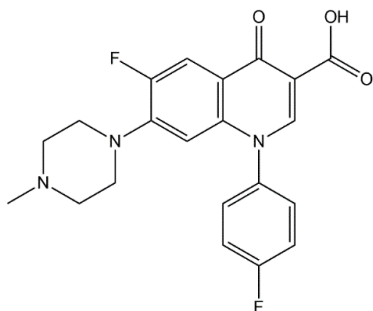
Figura 7. Variația intensității fluorescenței proteinelor studiate (HSA și apo-Tf) la adăugarea de cantități crescătoare de compus studiat. $[apo-Tf] = 1 \mu M$, $[HSA] = 2.5 \mu M$, $[compus] = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \mu M$. Săgețile negre indică modul de descreștere a ariilor maximelor cu creșterea concentrației de complex.

II.4. Complecși ai difloxacinei

Au fost sintetizați și caracterizați 2 complecși noi în raport molar 1:2 ai ligandului difloxacină cu ionii Eu^{3+} și Tb^{3+} . Compușii sunt de tip chelat și corespund formulei generale $[\text{M}(\text{dflx})_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\text{M} = \text{Gd}^{3+}$, respectiv Tb^{3+}). Formulele chimice și structura probabilă a combinațiilor complexe au fost stabilite în urma efectuării mai multor determinări fizico-chimice: analiză elementală, analiză termogravimetrică și spectroscopie în domeniile UV-viz-NIR și IR. Geometria complexelor a fost investigată suplimentar prin studii DFT. În urma acestor studii se poate afirma că aceste noi combinații complexe prezintă o geometrie octaedrică, ionul metalic fiind înconjurat de două molecule deprotonate de ligand legate de acesta prin atomii de oxigen, o moleculă de apă și o grupare hidroxid.

Complecșii difloxacinei cu cationii Eu^{3+} și Tb^{3+} prezintă o activitate citotoxică moderată reflectată de valorile indicelui IC_{50} ; complecșii sunt comparabili ca activitate cu substanța de referință doar pe linia celulară LoVo.

A.



B.

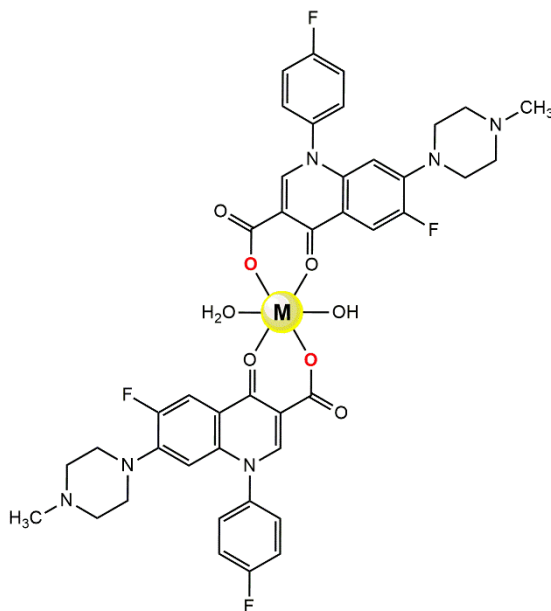


Figura 8. Structura chimică a: **A.** Difloxacinei, **B.** complecșii difloxacinei.

Tabel 7. Procentele de C, H și N obținute în urma analizei elementale a complecșilor difloxacinei.

COMPUS	C (%)		H (%)		N (%)	
	Teoretic	Practic	Teoretic	Practic	Teoretic	Practic
$[\text{Eu}(\text{dflx})_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $\text{Eu}(\text{dflx})_2 \text{ M} = 1037.80$	48.61	48.35	4.37	4.64	8.10	8.97
$[\text{Tb}(\text{dflx})_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $\text{Tb}(\text{dflx})_2 \text{ M} = 1044.76$	48.28	49.03	4.34	4.19	8.04	8.15

Tabel 8. Benzile înregistrate în domeniul IR pentru difloxacină, sarea de sodiu și complexii acesteia.

Compus	$\nu\text{C=O}$ carboxilic	$\nu\text{C=O}$ piridonic	$\nu\text{O-C-O}$ as	$\nu\text{O-C-O}$ s	Δ	$\nu\text{M-O}$
Difloxacina	1714	1614	-	-	-	-
Dflx·Na ⁺		1578	1615	1375	240	-
Eu(dflx) ₂		1560	1612	1375	237	546
Tb(dflx) ₂		1573	1613	1374	239	546

Tabel 9. Indicele IC₅₀ calculat pentru difloxacină și complexii acesteia.

Compus	IC ₅₀ (μM)		
	LoVo	MDA-MB 231	HUVEC
Difloxacina	71.91 ± 13.01	85.98 ± 0.06	>100
Eu(dflx) ₂	46.61 ± 1.58	52.22 ± 6.92	33.33±7.28
Tb(dflx) ₂	49.25 ± 13.37	29.01 ± 1.24	31.53±11.48
Cis-Pt	40.15 ± 13.94	-	28.46 ± 6.28
ADR	-	7.85 ± 0.70	

Interacțiunile între cei trei compuși testați și macromolecula de ADN pot fi considerate similare, dar de intensități diferite; valorile K_b sugerează o legare moderată a complexilor de macromolecula ADN, dar nu oferă informații cu privire la tipul acesteia.

În ceea ce privește interacțiunile cu proteinele serice se remarcă complexul Eu(dflx)₂, acesta prezentând atât afinitate cât și capacitatea de diminuare a fluorescenței mai mare decât complexul Tb(dflx)₂, atât în cazul interacțiunii cu apo-Tf, cât și în cea cu HSA. De remarcat este diferența de două ordine de mărime între constantele de afinitate corespunzătoare interacțiunii cu HSA și cele interacțiunii cu apo-Tf.

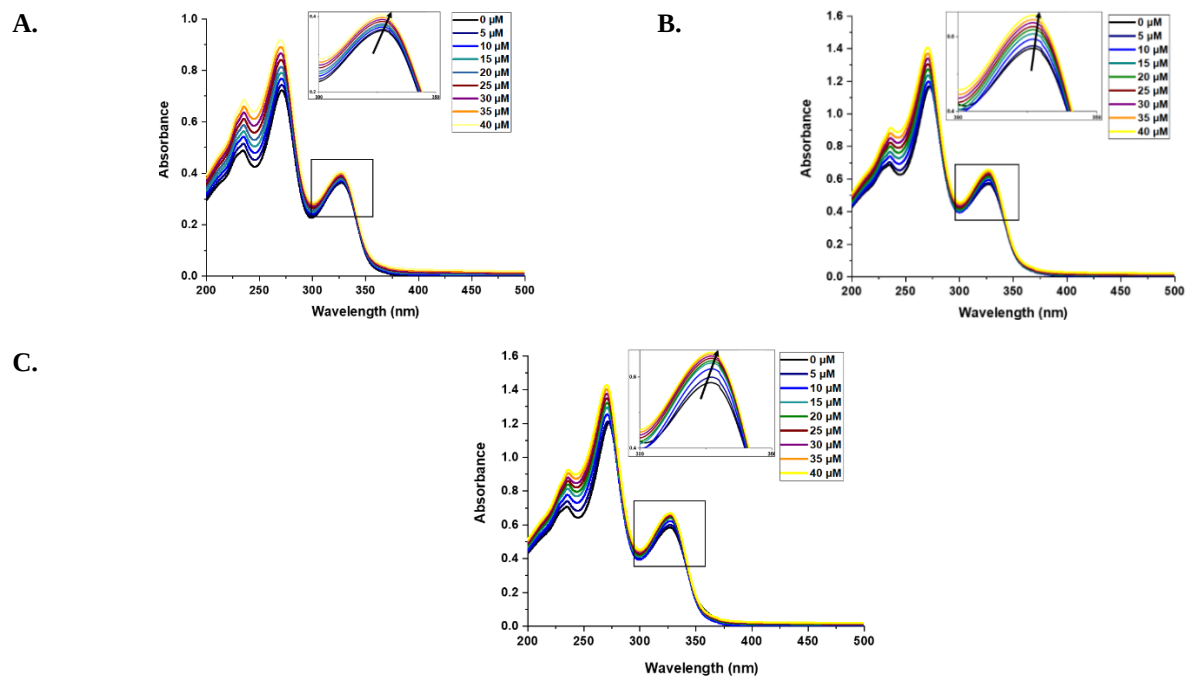


Figura 9. Spectrele de absorbție ale compușilor testați în prezența, respectiv absența cantităților crescătoare de CT-ADN. $[\text{compus}] = 20 \mu\text{M}$; $[\text{CT-ADN}] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 \mu\text{M}$. Săgețile indică modificările absorbției la adăugarea de cantități crescătoare de **CT-ADN**.

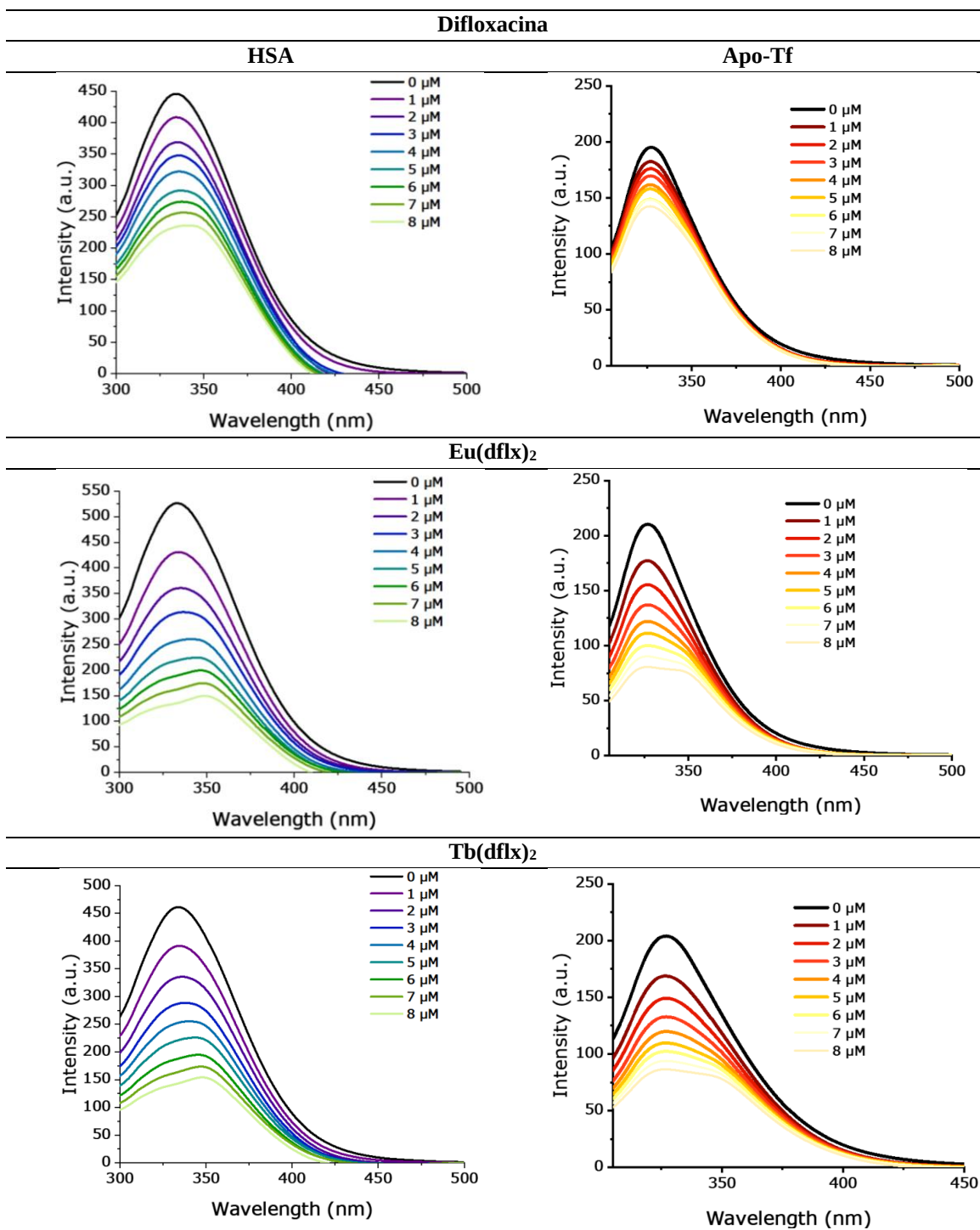


Figura 10. Prezentarea în paralel a modificărilor spectrelor de fluorescență ale HSA (stânga) și apo-Tf (dreapta) în absența, respectiv prezența compușilor testați; $[HSA] = 2.5 \mu M$, $[apo-Tf] = 1 \mu M$, $[compus] = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \mu M$.

II.5. Concluzii generale. Caracterul original și interdisciplinar al cercetărilor

II.5.1. Concluzii generale

În cadrul tezei de doctorat au fost sintetizate și caracterizate din punct de vedere fizico-chimic și biologic 17 noi combinații complexe ale unor ioni trivalenți de pământuri rare conținând ca liganzi trei chinolone din primele generații, scoase din schemele terapeutice actuale (acid nalidixic – Hnal, acid oxolinic – Hoxo și difloxacină – Hdflx).

Combinațiile complexe obținute prezintă următoarele formule generale:

- $[M(nal)_2(OH)(H_2O)] \cdot nH_2O$, ($M=La^{3+}$, $n=2$; $M=Sm^{3+}$, Eu^{3+} , Gd^{3+} , $n=3$; $M=Tb^{3+}$, $n=1,5$),
- $[M(nal)_3(H_2O)_2] \cdot nH_2O$ ($M=La^{3+}$, $n=6$; $M=Eu^{3+}$, $n=2,5$; $M=Gd^{3+}$, Tb^{3+} , $n=1,5$),
- $[M(oxo)_2(OH)(H_2O)] \cdot nH_2O$ ($M=Y^{3+}$, La^{3+} , Eu^{3+} , $n=0$; $M=Sm^{3+}$, $n=1$; $M=Gd^{3+}$, Tb^{3+} , $n=0,5$) și
- $[M(dflx)_2(OH)(H_2O)] \cdot 3H_2O$ ($M=Eu^{3+}$, Tb^{3+}).

Caracterizarea fizico-chimică a combinațiilor complexe obținute a fost realizată pe baza determinărilor de analiză elementală, spectrometrie UV-viz, IR, de masă și analiză termică. Acestea au permis determinarea numărului de liganzi coordinați de către ionul metalic, determinarea modului de coordonare a ligandului – bidentat, printr-un atom de oxigen carboxilic și unul piridonic, a numărului și naturii moleculelor de apă (de coordonare și de cristalizare). Întrucât nu a fost posibilă obținerea compușilor sub formă de monocristale, studiile DFT au permis propunerea structurii complexelor și modul de coordonare, descriind geometria de coordonare ca fiind, în general, un octaedru deformat.

Evaluarea acțiunii biologice a acestor noi combinații complexe a presupus testarea citotoxicității asupra trei linii celulare (HUVEC, LoVo și MDA-MB 231), testarea intensității și naturii interacțiunilor cu macromolecula de ADN și investigarea interacțiunilor cu două proteine serice de interes, albumina serică umană și apotransferina.

În ceea ce privește citotoxicitatea asupra liniei celulare LoVo, combinațiile complexe cu acid nalidixic, atât în raport molar 1:2 cât și 1:3, prezintă un indice IC_{50} mai mic decât al substanței de referință, cisplatinul; sunt urmate, ca intensitate a acțiunii, de complexii acidului oxolinic și apoi de cei ai difloxacinei. Făcând o comparație între activitatea citotoxică a ligandului și cea a complexelor corespunzătoare, cea mai mare îmbunătățire se observă în cazul complexelor acidului oxolinic, valoarea indicelui IC_{50} reducându-se de la peste 200 μM în cazul ligandului liber, la aproximativ 40 μM , minimul obținut pentru această serie și foarte apropiat de valoarea corespunzătoare substanței de referință. În cazul acidului nalidixic, indicele IC_{50} cu o valoare de peste 100 μM scade la aproximativ 32 μM , o valoare sub cea corespunzătoare substanței de referință. Difloxacina prezintă o activitate citotoxică superioară celorlalți liganzi ($IC_{50} \sim 72 \mu M$), scăderea valorii indicelui IC_{50} nefiind la fel de accentuată.

Activitatea înregistrată de combinațiile complexe și liganzii liberi pe linia celulară MDA-MB 231 este mai slabă, toți compușii prezentând valori ale IC_{50} mult mai mari decât a substanței de referință, adriamicina ($IC_{50} \sim 8 \mu M$). Totuși, se poate observa o diminuare a indicelui corespunzător complexelor testați față de ligand, cea mai semnificativă îmbunătățire fiind observată în cazul seriei de complexe a difloxacinei (de la $\sim 86 \mu M$ la $\sim 29 \mu M$).

Citotoxicitatea asupra liniei celulare HUVEC, în cazul cărora indicii IC_{50} prezintă valori mai mari de 100 μM , este mai slabă decât cea prezentată față de liniile celulare tumorale. Compușii studiați au, așadar, o toxicitate mai mică decât cisplatin asupra celulelor normale. Excepție face din nou seria difloxacinei, compușii testați prezentând valori asemănătoare cisplatinului.

Interacțiunile tuturor combinațiilor complexe testate cu macromolecula de ADN sunt unele moderate, constanta caracteristică de legare, K_b , prezentând valori de ordinul 10^5 ; în cazul complexelor acidului oxolinic și difloxacinei procesul de complexare atrage după sine o creștere a afinității pentru ADN, fapt reflectat de creșterea valorii constantei de legare cu un ordin de mărime. Acesta nu este cazul complexelor acidului nalidixic, ambele serii de complexe și ligandul liber prezentând valori de ordinul 10^5 pentru constanta de legare. În ceea ce privește procesul de intercalare, acesta este evidențiat prin spectrele de fluorescență obținute în cadrul testelor de legare competitivă; totuși, valorile medii ale constantelor caracteristice fiecărui sistem EB-ADN-complex nu susțin această ipoteză. Se pot observa diferențe între seriile de complexe; astfel, ambele serii ale acidului nalidixic prezintă valori apropiate, dar cu un ordin de mărime mai mici de cât cele corespunzătoare complexelor acidului oxolinic și difloxacinei. Mai mult, acidul nalidixic și complexii săi prezintă valori apropiate ale constantei K_{SV} , ceea ce sugerează că procesul de complexare nu conduce la o îmbunătățire a acestei proprietăți.

Interacțiunile cu proteinele serice, albumina și apotransferina, au fost de asemenea studiate; în esență, interacțiunile ce induc scăderea fluorescenței native a proteinelor sunt de intensitate medie în cazul ambelor proteine studiate și pentru toate seriile de combinații complexe, valorile constantei caracteristice K_{SV} indicând un proces static la baza acestui fenomen. Complexii acidului nalidixic și ai difloxacinei prezintă valori mai mari (10^5) decât cele înregistrate de complexii acidului oxolinic (10^4). Afinitatea pentru cele două proteine este diferențiată, constanta K_a prezentând valori mai mari pentru albumina serică față de apotransferină. Complexii difloxacinei se diferențiază de ceilalți, prezentând afinități mai mari de ordinul 10^7 pentru HSA și 10^5 pentru apo-Tf, în timp ce complexii acidului nalidixic și oxolinic prezintă valori de ordinul 10^5 pentru HSA și 10^4 pentru apo-Tf. Aceste valori sugerează un transport și o interacțiune eficientă cu potențialii receptori, dar nu sunt suficient de mari pentru a ridica probleme de retenție tisulară.

În concluzie, cele 17 noi combinații complexe prezintă potențial biologic, având o activitate antitumorală medie, toxicitate redusă asupra celulelor normale, interacțiunea și capacitatea de a interacționa cu ADN-ul fiind, de asemenea, moderate. În ceea ce privește interacțiunea cu proteinele serice, combinațiile complexe obținute prezintă o bună afinitate de legare și un proces static de diminuare a fluorescenței.

II.5.2. Caracterul original și interdisciplinar al cercetărilor

Caracterul actual al cercetărilor efectuate în cadrul acestei teze de doctorat este susținut de publicarea a două articole [34], [35] în două numere ale revistei *Molecules*, cu factor de impact peste 3, suma factorilor de impact ai articolelor publicate depășind astfel valoarea 6.

Prin sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea acțiunii biologice a celor 17 noi compuși, am contribuit la extinderea clasei de combinații complexe ale chinolonelor; prin utilizarea unor liganzi mai puțin studiați, a căror utilizare a devenit foarte restrânsă, sperăm să trezim interesul pentru căutarea de noi aplicații pentru aceste chimioterapice.

Primul capitol al tezei tratează clasa chinolonelor din punct de vedere farmacologic, punând accent pe mecanismul de acțiune, aspecte de farmacocinetică, farmacodinamie și farmacotoxicologie. Explorarea literaturii de specialitate în această direcție a avut ca scop punerea în evidență a unor noi mecanisme de acțiune care pot fi utile în procesul de repoziționare. În subcapitolul de farmacotoxicologie sunt menționați mulți membri ai clasei a căror utilizare a fost limitată sau total abandonată; considerarea acestora pentru repoziționarea terapeutică sau aplicabilitatea în domeniul chemiluminiscenței ar merita explorată.

Caracterul interdisciplinar al cercetărilor realizate în cadrul tezei de doctorat este susținut de completarea studiilor de chimie coordinativă (sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor noi combinații

complexe) cu calcule de optimizare a geometriei moleculare, determinări analitice privind interacțiunea cu macromolecule de interes precum ADN și proteinele serice albumina și transferina, studii de biologie celulară.

Perspectivile pe care le deschide teza de doctorat pentru cercetările viitoare includ:

- evaluarea efectului antibacterian al acestor combinații complexe, comparativ cu liganzii, inclusiv pe tulpini rezistente;
- evaluarea efectului antibiofilm, un factor important în dezvoltarea de tulpini rezistente;
- obținerea unor combinații complexe ternare utilizând aceleași chinolone studiate în această lucrare, împreună cu alți liganzi potriviți pentru intercalare; ne dorim ca prin modificarea mecanismului de interacțiune cu macromolecula de ADN, să obținem o îmbunătățire a activității antitumorale;
- evaluarea gradului de incluziune celulară a combinațiilor complexe pe diferite linii celulare tumorale;
- investigarea mecanismului de acțiune citotoxică;
- evaluarea aplicabilității utilizării sistemelor formate din liganzii studiați și cationii lantanidelor Eu^{3+} și Tb^{3+} în dozarea chinolonei în cauză sau a ADN-ului dublu catenar;
- evaluarea proprietăților magnetice ale combinațiilor complexe studiate cu ioni lantanidici și potențiala lor utilizare ca agenți de contrast pentru imagistica medicală.

În plus, un subiect de interes poate fi contribuția la dezvoltarea metodelor de detecție și cuantificare a chinolonei în mediul înconjurător, pe baza formării de combinații complexe. Contaminarea mediului înconjurător cu fluorochinolone este un aspect bine cunoscut dar căruia nu îi este acordată suficientă atenție; discuția poate fi extinsă și către alte clase de antibiotice sau alte medicamente, reieșind nevoia elaborării unui sistem funcțional de strângere, depozitare și distrugere a deșeurilor medicamentoase, a unui sistem eficient de îndepărtare a reziduurilor medicamentoase din apele menajere, precum și instruirea populației în ceea ce privește consumul și achiziționarea responsabilă de medicamente.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Appelbaum, P.C.; Hunter, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 5–15, doi:[https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00192-8).
2. Hooper, D.C. Clinical applications of quinolones. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1998**, *1400*, 45–61, doi:[https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00127-4).
3. Andriole, V.T. The quinolones: past, present, and future. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41 Suppl 2*, S113–9, doi:10.1086/428051.
4. Pham, T.D.M.; Ziora, Z.M.; Blaskovich, M.A.T. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm* **2019**, *10*, 1719–1739, doi:10.1039/C9MD00120D.
5. Cole, S.T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C.E. 3rd; et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **1998**, *393*, 537–544, doi:10.1038/31159.
6. Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O’Dea, M.H.; Nash, H.A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, *73*, 3872–3876, doi:10.1073/pnas.73.11.3872.
7. Kato, J.; Nishimura, Y.; Imamura, R.; Niki, H.; Hiraga, S.; Suzuki, H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli. *Cell* **1990**, *63*, 393–404, doi:10.1016/0092-8674(90)90172-b.
8. Cozzarelli, N.R. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **1980**, *207*, 953–960, doi:10.1126/science.6243420.
9. Takei, M.; Fukuda, H.; Kishii, R.; Hosaka, M. Target preference of 15 quinolones against Staphylococcus aureus, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 3544–3547, doi:10.1128/AAC.45.12.3544-3547.2001.
10. Kathiravan, M.K.; Khilare, M.M.; Nikoomanesh, K.; Chothe, A.S.; Jain, K.S. Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 419–435, doi:10.3109/14756366.2012.658785.
11. Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 421–433, doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012.
12. Riesbeck, K. Immunomodulating activity of quinolones: review. *J. Chemother.* **2002**, *14*, 3–12, doi:10.1179/joc.2002.14.1.3.
13. Dalhoff, A.; Shalit, I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet. Infect. Dis.* **2003**, *3*, 359–371, doi:10.1016/s1473-3099(03)00658-3.
14. Sadeek, S.; El-Shwiniy, W.; El-Attar, M. Synthesis, characterization and antimicrobial investigation of some moxifloxacin metal complexes. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *84*, 99–110, doi:10.1016/j.saa.2011.09.010.

15. Li, Y.-X.; Chen, Z.-F.; Xiong, R.-G.; Xue, Z.; Ju, H.-X.; You, X.-Z. A mononuclear complex of norfloxacin with silver (I) and its properties. *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, *6*, 819–822.
16. Gao, F.; Yang, P.; Xie, J.; Wang, H. Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel Fe (III), Co (II), and Zn (II) complexes with norfloxacin. *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *60*, 61–67.
17. Uivarosi, V. Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update. *Molecules* **2013**, *18*, 11153–11197, doi:10.3390/molecules180911153.
18. Evans, C.H. Interactions of Lanthanides with Tissues, Cells, and Cellular Organelles BT - Biochemistry of the Lanthanides. In: Evans, C.H., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1990; pp. 211–283 ISBN 978-1-4684-8748-0.
19. Bottrill, M.; Kwok, L.; Long, N.J. Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 557–571, doi:10.1039/B516376P.
20. Aime, S.; Chiaussa, M.; Digilio, G.; Gianolio, E.; Terreno, E. Contrast agents for magnetic resonance angiographic applications: ¹H and ¹⁷O NMR relaxometric investigations on two gadolinium(III) DTPA-like chelates endowed with high binding affinity to human serum albumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 766–774, doi:10.1007/s007750050349.
21. Caravan, P.; Cloutier, N.J.; Greenfield, M.T.; McDermid, S.A.; Dunham, S.U.; Bulte, J.W.M.; Amedio, J.C.J.; Looby, R.J.; Supkowski, R.M.; Horrocks, W.D.J.; et al. The interaction of MS-325 with human serum albumin and its effect on proton relaxation rates. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3152–3162, doi:10.1021/ja017168k.
22. Montgomery, C.P.; New, E.J.; Parker, D.; Peacock, R.D. Enantioselective regulation of a metal complex in reversible binding to serum albumin: dynamic helicity inversion signalled by circularly polarised luminescence. *Chem. Commun. (Camb)*. **2008**, 4261–4263, doi:10.1039/b810978h.
23. Georges, J. Lanthanide-sensitized luminescence and applications to the determination of organic analytes. A review. *Analyst* **1993**, *118*, 1481–1486, doi:10.1039/AN9931801481.
24. Gómez-Hens, A.; Aguilar-Caballeros, M. Terbium-sensitized luminescence: A selective and versatile analytical approach. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 131–141, doi:10.1016/S0165-9936(01)00139-X.
25. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; et al. Gaussian 09 2009.
26. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. Gaussian 16, Revision C.01 2016.
27. Macrae, C.F.; Sovago, I.; Cottrell, S.J.; Galek, P.T.A.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Platings, M.; Shields, G.P.; Stevens, J.S.; Towler, M.; et al. Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction. *J. Appl. Crystallogr.* **2020**, *53*, 226–235, doi:10.1107/S1600576719014092.
28. Wu, S.-S.; Yuan, W.-B.; Wang, H.-Y.; Zhang, Q.; Liu, M.; Yu, K.-B. Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (N, N'-dibenzylethane-1, 2-diamine) transition metal complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 2026–2034.

29. Navarro, M.; Hernández, C.; Colmenares, I.; Hernández, P.; Fernández, M.; Sierraalta, A.; Marchán, E. Synthesis and characterization of [Au (dppz) ₂] Cl₃. DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 111–116.
30. Lakowicz, J.R.; Weber, G. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4161–4170.
31. Munteanu, A.-C.; Badea, M.; Olar, R.; Silvestro, L.; Mihaila, M.; Brasoveanu, L.I.; Musat, M.G.; Andries, A.; Uivarosi, V. Cytotoxicity studies, DNA interaction and protein binding of new Al (III), Ga (III) and In (III) complexes with 5-hydroxyflavone. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, *32*, e4579, doi:10.1002/aoc.4579.
32. Fu, X.-B.; Lin, Z.-H.; Liu, H.-F.; Le, X.-Y. A new ternary copper (II) complex derived from 2-(2'-pyridyl) benzimidazole and glycylglycine: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation and HSA interaction. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *122*, 22–33.
33. Zhang, G.; Wang, Y.; Zhang, H.; Tang, S.; Tao, W. Human serum albumin interaction with paraquat studied using spectroscopic methods. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2007**, *87*, 23–29.
34. Maciucă, A.-M.; Munteanu, A.-C.; Mihaila, M.; Badea, M.; Olar, R.; Nitulescu, G.M.; Munteanu, C.V.A.; Bostan, M.; Uivarosi, V. Rare-Earth Metal Complexes of the Antibacterial Drug Oxolinic Acid: Synthesis, Characterization, DNA/Protein Binding and Cytotoxicity Studies. *Mol.* **2020**, *25*.
35. Măciucă, A.-M.; Munteanu, A.-C.; Uivarosi, V. Quinolone Complexes with Lanthanide Ions: An Insight into their Analytical Applications and Biological Activity. *Molecules* **2020**, *25*, 1347.