



ACADEMIA ROMÂNĂ

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași



OBȚINEREA DE NOI DERIVAȚI SOLUBILI ÎN APĂ PE BAZĂ DE FENOTIAZINĂ

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific,

CS I Dr. Habil. Luminița Marin

Doctorand,

Chim. Sandu Cibotaru

Academia Română
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

Nr. 5570/10 x 2022

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **31 octombrie 2022**, ora **10:00**, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat **„Obținerea de noi derivați solubili în apă pe bază de fenotiazină”**, autor **Sandu Cibotaru**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

PREȘEDINTE: CS I **Dr. Valeria Harabagiu**

CONDUCĂTOR

ȘTIINȚIFIC: CS I **Dr. Habil. Luminița Marin**
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

REFERENȚI: **Acad. Bogdan Simionescu**
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

Prof. Dr. Irina-Draga Căruntu
Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore. T. Popa” din Iași

Prof. Dr. Ionel Mangalagiu
Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” din Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



Director,
Valeria Harabagiu

Mulțumiri

Mă simt onorat să adresez cuvinte de mulțumire sinceră și sentimente de considerație tuturor oamenilor deosebiți care m-au îndrumat în elaborarea și finalizarea acestei teze de doctorat.

Cu deosebit respect adresez cuvinte de mulțumire și întreaga mea recunoștință conducătorul științific, doamnei **Dr. Luminița Marin**, care prin profesionalism, încredere și sprijin moral m-a îndrumat în domeniul științei, supraveghindu-mi pașii pe parcursul întregului stagiul doctoral. Îi mulțumesc pentru înțelegere, răbdare și pentru bunăvoința de a mă forma profesional.

Sunt profund recunoscător doamnei **Dr. Dalila Belei** pentru inițierea mea ca tânăr cercetător, pentru răbdare și dăruire, și nu în ultimul rând pentru sprijinul și încrederea acordată până în momentul de față.

Distinse mulțumiri doamnei **Dr. Irina Căruntu** și domnilor **Dr. Bogdan C. Simionescu** și **Dr. Ionel Mangalagiu** pentru că au acceptat să facă parte din comisia de evaluare a tezei de doctorat, precum și pentru sugestiile formulate.

Adresez mulțumiri și aleasă recunoștință doamnei **Dr. Mariana Pinteală** pentru ca mi-a oferit posibilitatea de a lucra și învăța multe tehnici care mi-au permis să înțeleg mai bine aspecte importante ale studiile întreprinse.

În mod deosebit le mulțumesc colegilor de la **Universitatea de Științele Vieții „Ion Ionescu de la Brad”** pentru colaborarea fructuoasă pe parcursul stagiului de doctorat.

Mulțumesc **Academiei Române** pentru suportul financiar acordat pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.

Mulțumesc de asemenea conducerii **Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** din Iași pentru sprijinul acordat în elaborarea tezei de doctorat și în instruirea mea ca cercetător.

Tuturor colegilor mei din colectivele **Policondensare și Polimeri Termostabili**, precum și celorlalți **colegi din Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** doresc să le adresez cu această ocazie mulțumiri pentru contribuția directă sau indirectă la săvârșirea acestei teze, pentru că mi au fost alături și au făcut ca acest drum să fie presărat cu amintiri frumoase. Mulțumiri deosebite colegilor din **departamentul Intelcentru** pentru realizarea studiilor de biocompatibilitate, activitate anticanceroasă și antioxidantă.

Cuvintele nu pot exprima recunoștința pe care o simt pentru **părinții mei**. Le mulțumesc pentru dragostea, atenția și educația oferită. Mulțumesc **fratelui și surorii** pentru încredere și sprijin moral.

Cu dragoste doresc să îi mulțumesc soției mele, **Mădălina**, pentru că a ales să îmi fie alături în această perioadă și pe al vieții drum, făcându-mă să simt că imposibilul e posibil. Îi mulțumesc pentru dragostea oferită, pentru răbdare și încredere.

Vă mulțumesc!

Cuprins

LISTĂ DE ABREVIERI	4
Introducere	8
PARTEA I	12
Date de literatură	12
CAPITOLUL I	13
DERIVAȚI DE FENOTIAZINĂ. OBȚINERE ȘI APLICAȚII	13
I.1 Date generale. Obținere, proprietăți, solubilitate.....	13
I.1.1 Fenotiazina. Scurt istoric.....	13
I.1.2 Nomenclatura fenotiazinei	14
I.1.3 Metode de obținere a fenotiazinei	14
I.1.4 Proprietățile fizice ale fenotiazinei	16
I.1.5 Structura și reactivitatea fenotiazinei	17
I.1.6 Proprietățile chimice ale fenotiazinei	19
I.1.7 Solubilitatea în apă a derivaților de fenotiazină.....	24
I.2 Derivați de fenotiazină utilizați în domeniul optoelectronic.....	30
I.2.1 Derivați de fenotiazină utilizați în construcția celulelor fotovoltaice.....	30
I.2.2 Derivați de fenotiazină utilizați în construcția diodelor organice emițătoare de lumină	33
I.3 Derivați de fenotiazină utilizați în domeniul medical.....	38
I.3.1 Interacțiunea cu receptorii dopaminei	39
I.3.2 Interacțiunea cu membrana celulară.....	40
I.3.3 Inhibarea farenesiltransferazei	41
I.3.4 Inhibarea pompelor de eflux	43
I.3.5 Activitatea reversibilă asupra rezistenței la multimedicamente	43
I.3.6 Utilizarea derivaților de fenotiazină în sinteza de medicamente.....	45
I.4 Concluzii	63
Partea II	65
Contribuția autorului	65
CAPITOLUL II	66
DERIVAȚI N-PEGILAȚI DE FENOTIAZINĂ	66
II.1 Sinteza și caracterizarea derivaților N-PEGilați de fenotiazină.....	66
II.1.1 Introducere	66
II.1.2 Sinteza	67
II.1.3 Caracterizarea structurală	69
II.1.4 Stabilitatea hidrolitică și solubilitatea compușilor.....	72
II.1.5 Investigații fotofizice.....	74
II.1.6 Investigarea proprietăților de auto-asamblare	78
II.2 Activitatea anticancerואă a derivaților N-PEGilați de fenotiazină.....	81
II.2.1 Introducere	81
II.2.2 Studii preliminare de biocompatibilitate și citotoxicitate	82
II.2.3 Studii de citotoxicitate <i>in vitro</i>	84
II.2.4 Studii de toxicitate <i>in vivo</i>	92
II.2.5 Investigarea activității antitumorale <i>in vivo</i>	93
II.2.6 Mecanismul antitumoral ipotetic	96
II.3 Concluzii	105
CAPITOLUL III	107
IMINE PE BAZĂ DE DERIVAȚI N-PEGILAȚI DE FENOTIAZINĂ	107
III.1. Introducere	107

III.2 Sinteza și caracterizarea structurală.....	109
III.3 Auto-asamblarea derivaților iminici.....	113
III.4 Proprietățile fotofizice.....	114
III.5 Investigarea caracterului dinamic.....	119
III.6 Investigarea activității anticanceroase.....	124
III.6.1 Investigarea citotoxicității <i>in vitro</i>	125
III.6.2 Investigarea activității de inhibiție a speciilor reactive de oxigen.....	131
III.7 Concluzii.....	133
CAPITOLUL IV.....	135
MATERIALE PE BAZĂ DE DERIVAȚI N-TEGilați DE FENOTIAZINĂ ȘI CHITOSAN	135
IV.1 Introducere.....	135
IV.2 Obținerea de hidrogeluri și xerogeluri.....	137
IV.3 Caracterizare structurală.....	138
IV.4 Caracterizare supramoleculară (XRD).....	141
IV.5 Morfologie.....	144
IV.6 Comportarea xerogelurilor în mediu apos.....	145
IV.7 Proprietățile fotofizice ale hidrogelurilor/xerogelurilor.....	148
IV.8 Capacitatea de reținere a mercurului.....	150
IV.9 Concluzii.....	156
CAPITOLUL V.....	158
PARTEA EXPERIMENTALĂ.....	158
V.1 Materiale.....	158
V.2 Echipamente.....	159
V.3 Metode.....	161
<i>Pregătirea probelor de hidrogel pentru investigarea prin spectroscopia UV-vis</i>	163
<i>Determinarea gradului de umflare și a stabilității</i>	163
<i>Determinarea capacității de absorbție a mercurului</i>	163
<i>Determinarea gradului de încărcare pe baza analizei SEM-EDAX</i>	164
<i>Creșterea celulelor pentru testele in vitro</i>	164
<i>Studiile in vitro de citotoxicitate</i>	164
<i>Testul calitativ de viabilitate celulară</i>	165
<i>Determinarea activității de inhibare a radicalilor liberi</i>	166
<i>Investigarea inhibiției farnesiltransferazei</i>	167
<i>Prepararea probelor pentru testele in vivo</i>	168
<i>Designul experimental pentru testele antitumorale și de toxicitate in vivo</i>	168
V.4 Sintează și caracterizare.....	172
V.4.1. Sinteza și caracterizarea derivaților N-PEGilați de fenotiazină.....	172
V.4.2. Sinteza și caracterizarea iminelor pe bază de fenotiazină N-PEGilată.....	194
V.4.3. Sinteza hidrogelurilor pe bază de fenotiazină N-TEGilată.....	226
CONCLUZII GENERALE.....	227
Bibliografie.....	235

Introducere

Din multitudinea de derivați heterociclici, fenotiazina reprezintă unul dintre cei mai versatili, din punct de vedere structural. Această moleculă heterociclică formată din două cicluri benzenice unite prin doi heteroatomi, unul de azot și unul de sulf, este o structură condensată ce adoptă o geometrie necoplanară, cunoscută sub denumirea de *geometrie de tip fluture*. Prezența heteroatomilor conferă moleculei un caracter electronodonor puternic, benefic atât pentru aplicarea în optoelectronică, cât și în biomedicină.

Prima utilizare a fenotiazinei a fost atestată în anul 1891, sub forma albastrului de metilen, folosit pentru tratarea malariei de către Paul Guttman și Paul Ehrlich. Cu toate acestea, fenotiazina și derivații acesteia sunt cunoscuți în special pentru efectul antipsihotic, ei constituind „generația veche” de antipsihotice utilizate pentru tratarea bolilor neurologice. Derivații de fenotiazină au capacitatea de a trece de bariera hematoencefalică și de a inhiba receptorii dopaminici, efect atribuit similitudinii structurale cu dopamina. În prezent, utilizarea fenotiazinelor pentru tratarea bolilor neurologice s-a redus, din cauza evidențierii unor efecte secundare nedorite, însă investigarea derivaților de fenotiazină a luat amploare, în vederea aplicării în alte domenii de interes pentru societatea contemporană.

Structura electronodonoare a fenotiazinei este favorabilă formării de sisteme donor-acceptoare cu conjugare extinsă, utile în obținerea de materiale pentru construcția de celule fotovoltaice, capabile să transforme energia luminoasă în energie electrică. Pe de altă parte, conformația spațială necoplanară a acestei molecule facilitează formarea de structuri tridimensionale cu distanțe intermoleculare mari, care previn dezexcitarea non-radiativă și, în consecință, permite obținerea de materiale luminescente utile în construcția de diode organice emițătoare de lumină.

Modificarea structurală a fenotiazinei a condus la dezvoltarea unei game largi de compuși cu activitate antiinflamatoare, antivirală, antibacteriană, antifungică, antihelmintică și antitumorală.

Datorită acestor proprietăți, fenotiazina este o moleculă valoroasă pentru dezvoltarea de materiale active pentru dispozitive optoelectronice și biomedicale. Principalul impediment în aplicarea derivaților de fenotiazină este solubilitatea slabă a acestora în solvenți prietenoși mediului, fapt ce îngreunează prelucrarea lor sub formă de materiale, și le scade biodisponibilitatea din cauza solubilității reduse în fluide biologice.

Ținând cont de avantajele și dezavantajele utilizării fenotiazinei, obiectivul general al tezei de doctorat a fost obținerea de derivați de fenotiazină cu solubilitatea îmbunătățită, utili atât pentru aplicarea în medicină cât și în optoelectronică. Realizarea acestui deziderat s-a făcut la nivelul a trei obiective: **OI**. Obținerea de derivați de

fenotiazină *N*-PEGilați, solubili în solvenți organici comuni și chiar în apă, limitând astfel utilizarea de solvenți cu impact nociv asupra mediului, și conducând la îmbunătățirea biodisponibilității și a biocompatibilității; **02.** Caracterizarea structurală, supramoleculară, fotofizică și biologică a derivaților obținuți, în vederea identificării căilor principale de exploatare în aplicații; **03.** Crearea punții între cercetarea fundamentală și cea aplicativă, prin extinderea studiilor către obținerea de materiale și investigarea acestora pentru aplicarea ca medicamente antitumorale, în dispozitive de detecție de analiți sau de reținere a metalelor grele din apele uzate.

Astfel, teza de doctorat intitulată „**Obținerea de noi derivați solubili în apă pe bază de fenotiazină**” a fost dezvoltată pe trei direcții, și anume: **1)** sinteza unor derivați *N*-PEGilați de fenotiazină și investigarea proprietăților anticanceroase ale acestora, **2)** sinteza unor imine hibride pe bază de fenotiazină modificată cu unități poli(etilenglicol)/tri(etilenglicol) și sulfonamide, investigarea caracterului dinamic, a sensibilității la pH și a proprietăților anticanceroase, **3)** obținerea de materiale pe bază de derivați de fenotiazină și chitosan, cu capacitate de absorbție a mercurului.

Teza este structurată în două părți, ce includ cinci capitole: **Partea I** cuprinde **Capitolul I**, unde sunt prezentate date de literatură referitoare la tema studiată și **Partea II** ce include **Capitolele II, III, IV** în cadrul cărora sunt prezentate rezultatele cercetării proprii și **Capitolul V** ce include prezentarea materialelor, metodelor, echipamentelor și o parte din datele experimentale.

În **Capitolul I** sunt prezentate date de literatură privind aspecte generale ale fenotiazinei, incluzând metode de obținere ale acesteia, proprietăți chimice, metode de solubilizare în apă a derivaților de fenotiazină, și principiile aplicării acestora în domeniul optoelectronic și biomedical, cu accent pe aplicarea derivaților de fenotiazină ca medicamente antitumorale.

Capitolul II este structurat pe două subcapitole, primul dedicat sintezei unor derivați *N*-PEGilați de fenotiazină solubili în apă, și al doilea dedicat prezentării activității anticanceroase a acestora. Sinteza a fost realizată prin conectarea unui lanț de poli(etilenglicol) hidrofil la nucleul fenotiazinic hidrofob, iar compușii rezultați au fost caracterizați din punct de vedere structural, fotofizic, și al capacității de a genera nanoparticule.

Activitatea antitumorală a derivaților *N*-PEGilați de fenotiazină a fost evaluată atât *in vitro*, prin determinarea valorii concentrației medii inhibitorii pe diverse linii tumorale, cât și *in vivo*, prin determinarea potențialului de inhibiție al tumorilor induse la șoareci. De asemenea, a fost realizat un studiu de identificare a unui posibil mecanism de acțiune antitumorală, prin investigarea capacității acestor compuși de a inhiba farnesiltransferaza și speciile oxigen reactive.

Capitolul III prezintă o serie de derivați iminici obținuți prin condensarea acidă a unor derivați formulați de fenotiazină *N*-PEGilată sau *N*-TEGilată cu amine ce

conțin o unitate sulfonamidică. Sinteza a fost realizată prin iradiere cu microunde, metodă ce a favorizat conversia totală a reactanților în produși, și a diminuat timpul de lucru și consumul de energie. Compușii sintetizați au fost caracterizați din punct de vedere structural, și investigarea proprietăților a fost realizată în corelație cu structura lor chimică. Astfel, a fost studiată capacitatea lor de autoasamblare, datorită prezenței PEG-ului, caracterul dinamic indus de prezența legăturii imină, și proprietățile optice induse de prezența unității cromofore de fenotiazină. Studiile au fost aprofundate prin determinarea randamentului cuantic și a diagramelor de cromaticitate, atât pe soluții, în solvenți diferiți, cât și în filme, și capacitatea de a răspunde la stimulii externi, un exemplu fiind pH-ul. De asemenea, a fost investigată activitatea anticanceroasă a compușilor sintetizați, prin evaluarea citotoxicității *in vitro* pe mai multe linii canceroase și a capacității de inhibare a speciilor oxigen reactive.

Capitolul IV cuprinde obținerea și caracterizarea de materiale de tip hidrogel/xerogel, pe bază de chitosan și aldehida unui derivat *N*-TEGilat de fenotiazină descris în capitolul anterior, cu scopul utilizării acestora pentru absorbția mercurului din apă. Materialele au fost obținute prin reacția de iminare a chitosanului cu aldehida folosită, urmată de autoasamblarea hidrofil/hidrofobă a derivaților obținuți. Acestea au fost caracterizate din punct de vedere structural, supramolecular și morfologic, etapă urmată de efectuarea testelor de absorbție a ionilor de mercur din soluții apoase.

În **Capitolul V** este redată partea experimentală ce cuprinde materialele și echipamentele utilizate pentru efectuarea studiilor. De asemenea, sunt redate metodele de sinteză și protocoalele de lucru care au condus la obținerea rezultatelor prezentate în teză, precum și o serie de spectre și diagrame care nu au fost prezentate în capitolele anterioare.

În ultimele paragrafe ale tezei, este prezentată activitatea de diseminare a rezultatelor obținute pe perioada doctoratului, proiectele care au susținut financiar studiile efectuate în cadrul doctoratului și bibliografia consultată pentru întreaga activitate de cercetare.

**Acumularea informațiilor și
stabilirea strategiei de cercetare**

Obținere

**Derivați N- PEGilați
de fenotiazină**

**Derivați N- PEGilați
de fenotiazină
formilați și imine
hibride cu sulfonamide**

**Materiale pe bază de
chitosan și derivați
N-TEGilați de
fenotiazină**

Caracterizare

Structurală

Optică

Morfologică

**Evaluare în
vederea aplicării**

**Activitatea
anticancerosă**

**Sensibilitatea la
stimuli externi**

**Capacitatea de
absorbție a ionilor de
mercur**

Structurarea schematică a pașilor spre elaborarea tezei de doctorat *Obținerea de noi derivați solubili în apă pe bază de fenotiazină*

CAPITOLUL II

DERIVAȚI *N*-PEGILAȚI DE FENOTIAZINĂ

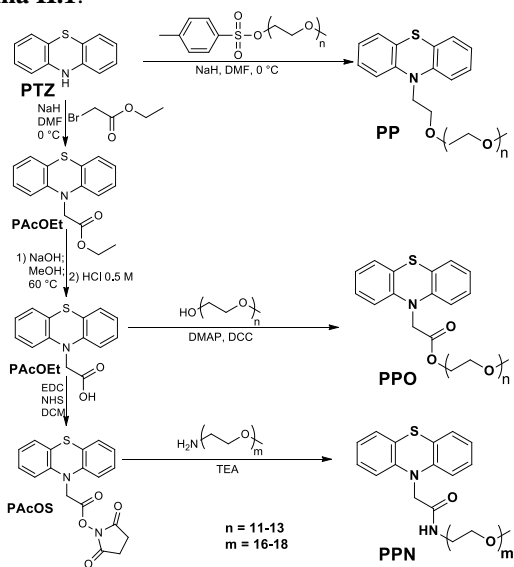
II.1 Sinteza și caracterizarea derivaților *N*-PEGilați de fenotiazină

II.1.1 Introducere

Fenotiazina a demonstrat activitate biologică versatilă, fiind utilizată în sinteza multor clase de medicamente precum cele bactericide, fungicide, antitumorale, antivirale, antiinflamatorii, antimalarice, anticonvulsive, analgezice, tranchilizante și agenți imunosupresivi [1]. Studiile de literatură au arătat că o problemă majoră în aplicarea derivaților de fenotiazină este solubilitatea scăzută în solvenți prietenoși mediului sau în biodispersanți apoși [2]. Pentru rezolvarea acestei probleme, în cadrul studiului a fost sintetizată o serie de trei derivați de fenotiazină *N*-PEGilați prin conectarea de lanțuri de poli(etilenglicol) la atomul de azot al fenotiazinei, prin unități de legătură de tip eter, ester și amidă. La alegerea unităților de legătură au fost luate în considerare proprietățile potențiale pe care le pot genera acestea, cu scopul de a produce blocuri structurale valoroase pentru bioaplicații și materiale optoelectronice ecologice.

II.1.2 Sinteza

Sinteza a trei derivați de fenotiazină *N*-PEGilați a fost realizată prin adaptarea metodelor sintetice cunoscute, pentru a obține randamente de reacție cât mai mari. Reacțiile de obținere, condițiile de reacție, structură și codurile compușilor sunt prezentate în **Schema II.1**.



Schema II.1. Sinteza derivaților *N*-PEGilați de fenotiazină

II.1.4 Stabilitatea hidrolitică și solubilitatea compușilor

Derivații *N*-PEGilați obținuți sunt lichide vâscoase, complet solubile în apă și în solvenți organici uzuali precum etanol, DCM, DMSO, hexan, pentru concentrații mai mici de 0,1 M (**Figura II.4**). Deoarece stabilitatea hidrolitică a acestor compuși reprezintă un aspect important pentru acest studiu, stabilitatea în apă a fost investigată prin înregistrarea spectrelor ^1H -RMN a compușilor dizolvați în apă deuterată, la momente diferite, în decurs de 7 zile (**Figura II.5**). Analizele efectuate au demonstrat că aceștia sunt stabili în apă și nu prezintă degradări.

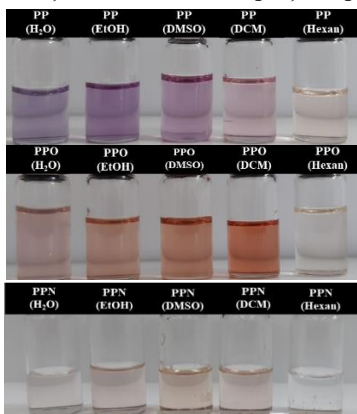


Figura II.4. Imaginile soluțiilor celor trei compuși studiați, în diferiți solvenți

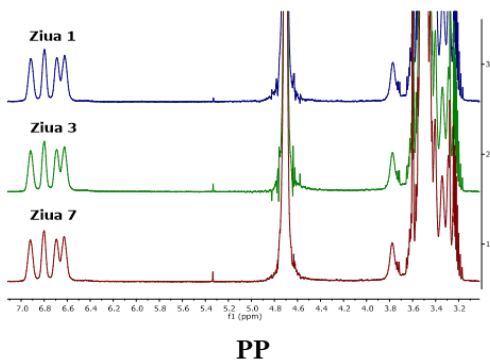


Figura II.5. Spectrele ^1H -RMN ale compusului PP

II.1.5 Investigații fizice

Spectrele UV-Vis ale derivaților *N*-PEGilați de fenotiazină au prezentat o deplasare batocromă a benzii caracteristice tranzițiilor $n-\pi^*$, de la 279 nm la 306 nm, fenomen caracteristic apariției agregării (**Figura II.6**).

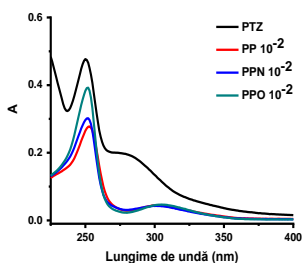


Figura II.6. Spectrul de absorbție UV-vis al compușilor la 10^{-2} mM

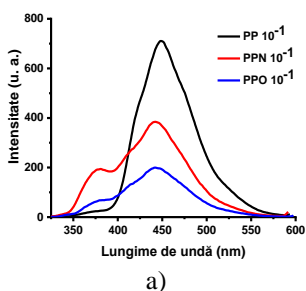
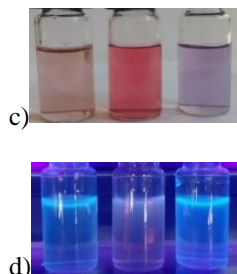


Figura II.8. Spectrele de emisie reprezentative ale soluțiilor apoase la concentrația de 10^{-1} mM. Imaginile soluțiilor compușilor studiați c) la lumina zilei și d) la iluminare cu o lampă UV (de la stânga la dreapta: PPO, PPN, PP)



Odată cu scăderea concentrației soluției, s-a observat lărgirea benzii de absorbție și scăderea intensității, iar conform acestor rezultate, se poate afirma că la concentrații mai mici de 10^{-4} mM nu se mai formează agregate stabile. Pentru a evidenția acest lucru, absorbbanțele compușilor au fost reprezentate grafic în funcție de concentrația soluției, interceptul reprezentând concentrația critică micelară (CMC), cu valorile de $7,06 \times 10^{-4}$ mM, $8,7 \times 10^{-4}$ mM și $9,47 \times 10^{-4}$ mM pentru **PPN**, **PP** și respectiv **PPO**.

La excitare cu lungimea de undă specifică formării de agregate (305 nm), cea mai intensă emisie a fost înregistrată pentru soluțiile de concentrație 10^{-1} mM. Alterarea intensității emisiei odată cu schimbarea concentrației sugerează o strânsă legătură cu parametrii ce definesc agregarea (precum diametrul agregatelor sau polidispersitatea), o posibilă conexiune fiind puterea forțelor intermoleculare dezvoltate în proximitatea nucleului fenotiazinic sub presiunea auto-asamblării. Considerând că moleculele sintetizate nu au grupări fluorofore (fenotiazina martor nu emite lumină), luminescența a fost atribuită fenomenului de emisie indusă de agregare, declanșată de auto-asamblarea moleculelor hidrofob-hidrofil (amfifile) de fenotiazină *N*-PEGilată [3,4].

II.1.6 Investigarea proprietăților de auto-asamblare

Deoarece investigarea fotofizică a compușilor a indicat un comportament de auto-asamblare amfifilă, o analiză mai exactă a acestui fenomen a fost realizată prin măsurători DLS, AFM, SEM, UV-CSM și POM. Datele obținute prin analiza DLS au confirmat formarea de agregate submicrometrice, în apă, cu o populație majoritară cu diametru hidrodinamic mai mic de 322 nm pentru soluțiile având concentrația în domeniul $10 - 10^{-1}$ mM (**Figura II.9a**). Pentru compusul **PP** s-a înregistrat o scădere de la 289 la 106 nm, la o scădere a concentrației de la 10 la 10^{-1} mM. Compusul **PPN** a arătat o variație mai mică a diametrului hidrodinamic, odată cu scăderea concentrației, de la 264 la 176 nm pentru soluțiile proaspete. În cazul compusului **PPO**, comportamentul agregatelor este diferit, diametrul acestora scăzând drastic de la 322 la 63 nm odată cu scăderea concentrației pentru soluțiile proaspete, iar după 6 zile diametrul hidrodinamic aproape se dublează.

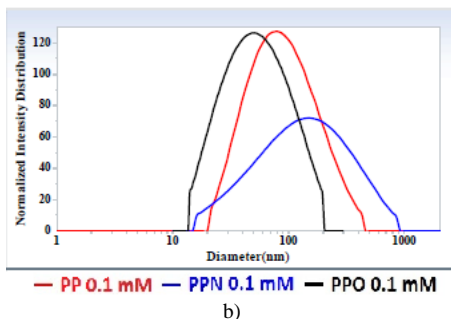


Figura II.9. Distribuțiile DLS ale compușilor în soluție apoasă la concentrația de 10^{-1} mM (roșu – **PP**, albastru – **PPN**, negru – **PPO**) la două luni după preparare

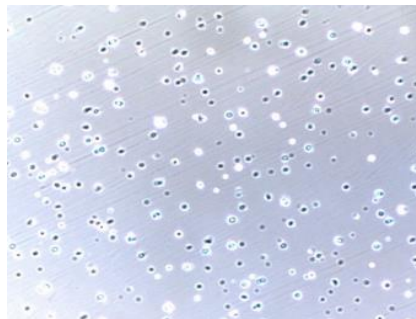


Figura II.10. Imagine POM ale compusului **PPN**

Tendința de agregare a acestor trei compuși a fost confirmată și prin tehnicile AFM, SEM, UV-CSM și POM (**Figura II.10**), aceste metode punând în evidență tendința de a forma agregate sferice, și nu dimensiunea acestora.

II.2 Activitatea anticanceră a derivaților *N*-PEGilați de fenotiazină

II.2.1 Introducere

Derivații *N*-PEGilați de fenotiazină caracterizați anterior au fost supuși unei investigații ample, *in vitro* și *in vivo*, pentru a stabili potențialul de inhibare a tumorilor.

II.2.2 Studii preliminare de biocompatibilitate și citotoxicitate

Pentru a studia activitatea anticanceră a derivaților *N*-PEGilați de fenotiazină, a fost realizat mai întâi un studiu preliminar de testare a citotoxicității acestora *in vitro* pe fibroblaste dermice umane normale (NHDF) și pe celule de cancer cervical (HeLa) ca model de celule tumorale. Măsurătorile au fost efectuate pe opt soluții de diferite concentrații, de la 10^{-6} la 10^{-1} mM, pentru fiecare compus, care a permis stabilirea unei relații între concentrația soluției și biocompatibilitate (**Figura II.11**).

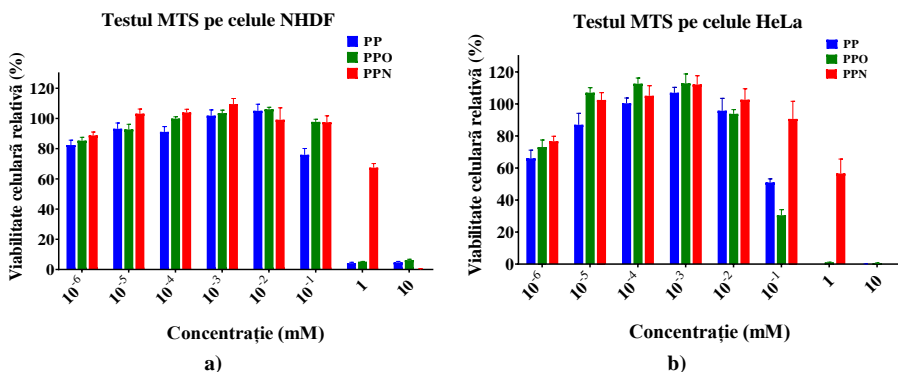


Figura II.11. Viabilitatea celulară pe a) celule fibroblaste dermice umane normale (NHDF) și b) celule umane de cancer cervical (HeLa)

Toți compușii au prezentat viabilitate de peste 80 % pentru concentrații mai mici de 10^{-1} mM, viabilitatea celulară cea mai bună fiind înregistrată pentru compusul PPN. Testele de viabilitate celulară efectuate pe HeLa au arătat o scădere semnificativă a viabilității pentru compușii PP și PPO la concentrația de 10^{-1} mM, sugerând necesitatea unei investigații mai aprofundată a acestor doi compuși.

II.2.3 Studii de citotoxicitate *in vitro*

Activitatea antitumorală a derivaților PP și PPO a fost evaluată prin determinarea efectului citotoxic pe cinci linii de celule canceroase: cancer cervical (HeLa), cancer epitelial (MeWo), osteosarcom (HOS), cancer mamar (MCF7) și cancer

hepatic (HepG2) prin comparație cu o linie de celule normale (NHDF). În vederea testării *in vivo* pe animale experimentale (șoareci), în studiul *in vitro* a fost inclusă și linia celulară de cancer de colon (CT26) specifică șoarecilor. În urma evaluării rezultatelor, a fost determinată concentrația medie inhibitorie (IC_{50}) a acestora, iar rezultatele au fost reprezentate grafic (**Figura II.12 m**).

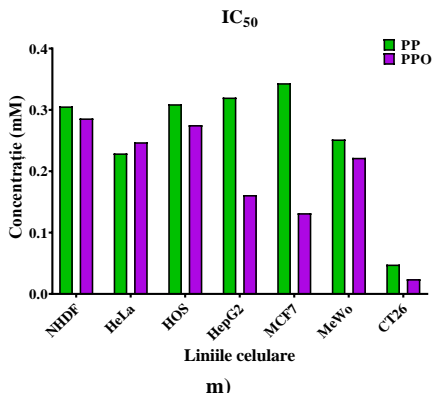


Figura II.12. Reprezentarea grafică a parametrului IC_{50}

obținută pentru linia de celule normale. Prin comparație, compusul **PP** a arătat un efect citotoxic mai mare pentru toate liniile celulare tumorale studiate comparativ cu celulele normale, dar valorile IC_{50} au fost semnificativ mai mici pentru liniile de celule canceroase HepG2 (cancer hepatic) și MCF7 (cancer mamar): 161,3 μ M, respectiv 131,7 μ M. Aceste valori au fost de trei, respectiv de două ori mai mici comparativ cu valoarea pentru celulele normale (286,2 μ M).

II.2.4 Studii de toxicitate *in vivo*

Întrucât compușii **PP** și **PPO** au prezentat activitate anticanceroasă *in vitro* încurajatoare, studiul a fost extins pentru testări *in vivo*, pe șoareci. În urma determinării dozei toxicității acute, valorile LD_{50} au fost stabilite la 952,38 mg/kg pentru fenotiazină (PTZ), 1450 mg/kg pentru **PP** și 1300 mg/kg pentru **PPO**. Concentrațiile au fost exprimate în echivalenți de fenotiazină, aceste valori indicând clar faptul că PEGilarea reduce toxicitatea fenotiazinei cu mai mult de 50 %.

II.2.5 Investigarea activității antitumorale *in vivo*

Următorul pas a fost monitorizarea efectului inhibitor al derivaților de fenotiazină asupra vitezei de creștere a tumorii în șoareci experimentali. Testele au fost efectuate prin administrarea intraperitoneală a soluțiilor compușilor **PP** și **PPO** în PBS comparativ cu PTZ - martor pozitiv și PBS – martor negativ.

Se observă faptul că derivații **PP** și **PPO** prezintă o toxicitate mult mai mare pentru linia celulară CT26, iar valorile IC_{50} au fost de 6 și respectiv 12 ori mai mici comparativ cu valorile obținute pentru linia celulară NHDF, indicând o selectivitate foarte bună. Ținând cont de valorile IC_{50} obținute pe liniile celulare umane, compusul **PP** are un efect citotoxic mai pronunțat pentru două linii de celule tumorale, și anume HeLa (cancer cervical) și MeWo (cancer epitelial), pentru care valorile IC_{50} sunt 229,1 μ M respectiv 251,9 μ M, comparativ cu valoarea 305,8 μ M

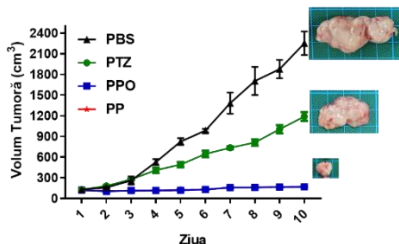


Figura II.14. Reprezentarea grafică a volumului tumorii (mm^3) în timpul tratamentului și imaginile reprezentative ale tumorilor după 10 zile de tratament (***) ($p < 0.0001$)

Rezultatele obținute nu au prezentat diferențe semnificativ statistice între grupurile tratate cu PP și cele cu PPO, iar inhibiția tumorii (T_i) înregistrată pentru compuşii studiați a fost de 47 % comparativ cu martorul pozitiv (PTZ) și 92 % comparativ cu martorul negativ (PBS) (**Figura II.14**).

II.2.6 Mecanismul antitumoral ipotetic

Dat fiind faptul că derivatul **PPO** este un ester, acesta poate fi ușor hidrolizat sub acțiunea enzimelor, rezultând precursorul acid (**PAcOH**) din care a fost sintetizat esterul.

În urma investigării capacității de inhibiție a farnesiltransferazei, s-a observat că precursorul acid al derivatului **PPO** are capacitatea de a inhiba farnesiltransferaza prin legarea ionilor metalici (Zn^{2+} și Mg^{2+}) din situsurile active ale acesteia. Acest lucru a fost pus în evidență atât prin difracția de raze X pe monocristalul obținut prin coordonarea **PAcOH** cu Mg^{2+} (**Figura II.19**), cât și prin metode spectroscopice (FTIR și RMN) și spectrofotometrice (UV-vis).

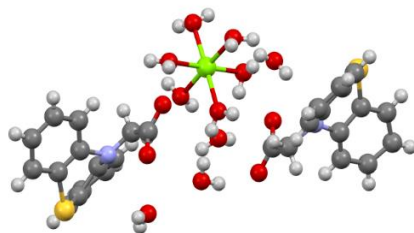
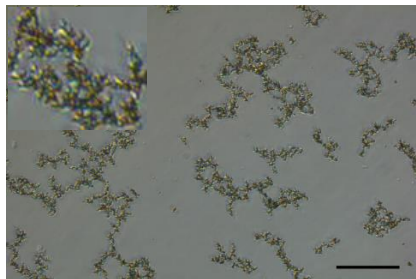


Figura II.19. Structura complexului obținut prin coordonarea **PAcOH** cu Mg^{2+} (difracție de raze X pe monocristal)

Investigarea derivaților de fenotiazină studiați a arătat că prezența PEG-ului facilitează auto-asamblarea sub formă de agregate în soluții apoase [5–7]. Pentru a evidenția dacă auto-asamblarea se produce în medii biologice, au fost preparate soluții ale compuşilor **PPO** și **PP** în mediul de cultură, fără celule, iar soluțiile preparate au fost analizate cu ajutorul microscopiei optice în lumină polarizată. După cum se poate observa în **Figura II.20**, **PPO** prezintă agregate birefringente cu tendință de aglomerare în mediul de cultură, fără influența celulelor.



PPO

Figura II.20. Imaginile de microscopie optică în lumină polarizată a compușilor PPO în mediul de cultură (scală – 100 μm)

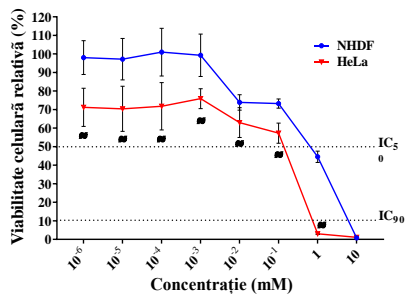


Figura II.23. Reprezentarea grafică a viabilității relative a celulelor NHDF și HeLa în urma tratării cu diferite concentrații de PAcOH ($p < 0.05$)

Pentru a verifica posibila activitate antitumorală a PAcOH, exprimată prin inhibarea farnesiltransferazei, acesta a fost supus testelor de citotoxicitate *in vitro* pe linia celulară canceroasă HeLa. A fost observat faptul că, pentru un domeniu larg de concentrație (10^{-6} - 10^{-3} mM), viabilitatea celulelor normale NHDF nu a fost afectată, în timp ce viabilitatea celulelor canceroase a fost de 70 % (Figura II.23). Acest fapt demonstrează că, în cazul unei eliberări lente a compusului PAcOH prin degradare enzimatică, moartea celulelor apare chiar pentru o concentrație foarte mică a acestuia.

Un posibil mecanism antitumoral al derivaților de fenotiazină și implicit al PAcOH rezultat este redat în Figura II.24.

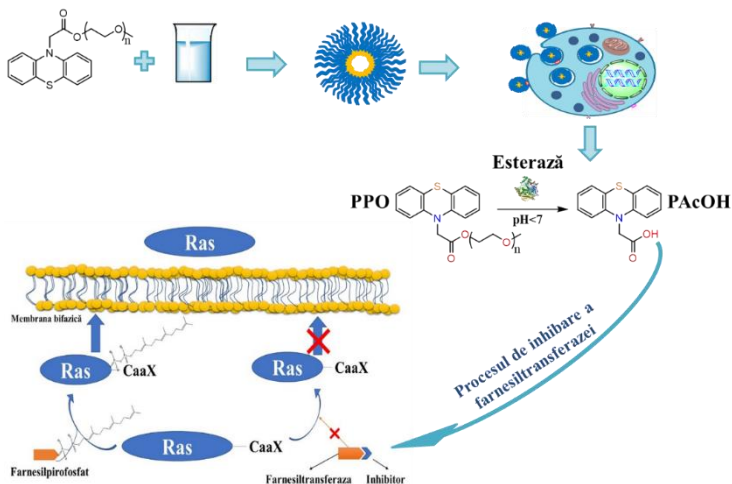


Figura II.24. Reprezentarea schematică a mecanismului antitumoral ipotetic

CAPITOLUL III

IMINE PE BAZĂ DE DERIVAȚI *N*-PEGILATI DE FENOTIAZINĂ

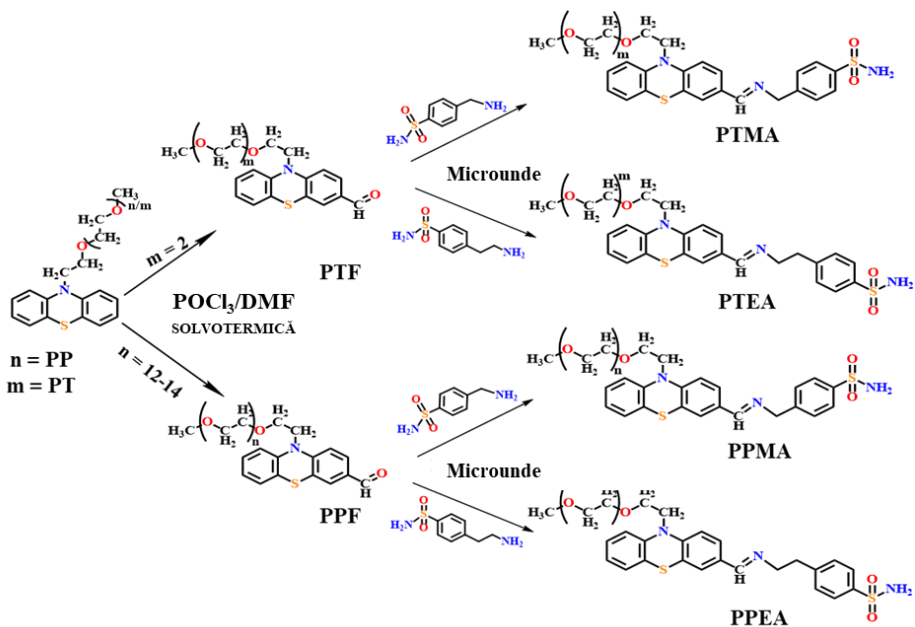
III.1 Introducere

Obiectivul acestui studiu a fost obținerea unei serii de imine pe bază de derivați de fenotiazină *N*-PEGilată, analiza comportamentului fotofizic și răspunsul la acțiunea unor stimuli externi. Pentru dezvoltarea acestui design, au fost obținuți derivați formulați ai fenotiazinelor *N*-PEGilate, care au fost reacționați ulterior cu sulfonamide. În alegerea sulfonamidelor, s-a ținut cont de proprietățile antimicrobiene, diuretice, hipoglicemice, antitiroidiene [8] și de potențialul lor de a inhiba creșterea tumorilor, cel mai probabil prin capacitatea de a inhiba anhidraza carbonică [9–12] și polimeraza tubulinică [13–15].

III.2 Sinteza și caracterizarea structurală

În vederea obținerii derivaților iminici de fenotiazină, mai întâi au fost sintetizați doi derivați formulați de fenotiazină prin intermediul reacției Vilsmeier-Haack. Derivații iminici au fost obținuți prin reacția celor doi derivați sintetizați cu două amine legate de o unitate sulfonamică (**Schema III.2**). Cele două fenotiazine modificate conțin o unitate de poli(etilenglicol) (PEG) sau tri(etilenglicol) (TEG) la atomul de azot. Sinteza a fost realizată utilizând un reactor cu microunde, obținându-se conversia totală a reacției după doar o oră.

Structurile propuse pentru compușii obținuți au fost confirmate prin intermediul spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară (^1H -RMN), prin apariția în spectru a semnalelor caracteristice protonului formilic la 9,8 ppm și respectiv a protonilor iminici la 8.41 și 8.16 ppm, precum și de prezența celorlalte semnale caracteristice protonilor compușilor obținuți. Complementar, structura compușilor a fost confirmată și prin spectroscopia în infraroșu, prin apariția în spectre a vibrațiilor caracteristice legăturii C=O la 1680 cm^{-1} și respectiv a legăturii C=N la 1640 cm^{-1} , precum și de prezența celorlalte benzi caracteristice.



Schema III.2. Sinteza derivaților formulați și a iminelor pe bază de fenotiazină *N*-PEGilată

III.4 Proprietățile fotofizice

Proprietățile fotofizice ale compușilor studiați au fost investigate prin spectroscopia de absorbție UV-Vis și cea de fotoluminescență, atât în soluție, utilizând drept solvenți THF, DMSO și EtOH, cât și în stare solidă, pe filme.

Spectrele UV-vis ale precursorilor formulați (PTF și PPF) au prezentat o bandă largă rezultată din suprapunerea mai multor benzi de absorbție până la 300 nm, atribuită tranzițiilor electronice din heterociclul de fenotiazină în diferite conformații, și o bandă de absorbție mai puțin intensă, dar bine definită, cu maximum la 380 nm, atribuită sistemului format prin conjugarea electronică a fenotiazinei cu unitatea formil. Derivații iminici (PTMA, PTEA, PPMA, PPEA) au prezentat în principal aceleași benzi, dar deplasate hipocromic cu aproximativ 20 nm (Figura III.5 b). În filme subțiri, profilul de absorbție a fost deplasat spre lungimi de undă mai mici, datorită efectului de agregare al compușilor.

Abilitatea de emisie a compușilor a fost investigată prin excitarea cu lumină de lungimi de undă corespunzătoare maximelor de absorbție. Culoarea emisiei depinde de structura compușilor și de solventul utilizat pentru solvatare. Maximele de emisie au variat între 510 la 570 nm pentru aldehide și 475 la 500 nm pentru imine (Figura III.5 e).

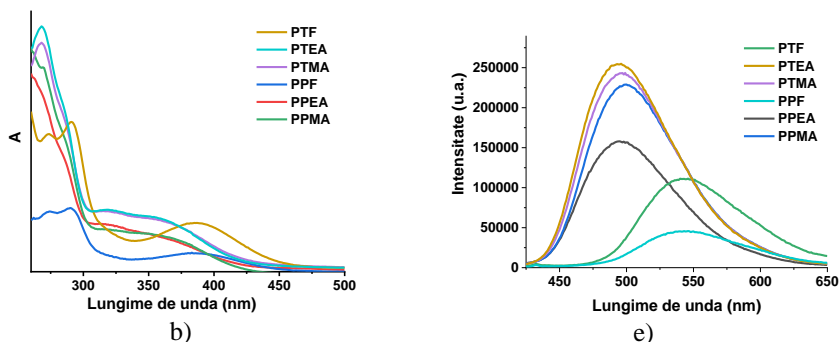


Figura III.5. Comportamentul fotofizic al compușilor studiați în DMSO b) spectrul de absorbție, e) spectrul de emisie, obținute la excitarea cu lumină de lungime de undă corespunzătoare maximului de absorbție de energie mică

Derivații formulați de fenotiazină au arătat o scădere a randamentului cuantic odată cu creșterea polarității solventului (de la 51 % în THF la 1 % în etanol pentru **PTF**). Pe de altă parte, derivații iminici au prezentat un randament cuantic mai mare în solventul mai polar (DMSO) (42,25 % pentru **PTEA** și 42,41 % pentru **PTMA**).

În stare solidă, comportamentul fotofizic este similar celui observat în soluția de THF (**Figura III.6 a, b**). Toți compușii au prezentat randamente cuantice mari, ajungând la 44 % pentru **PTF** și 30 % pentru **PPMA**.

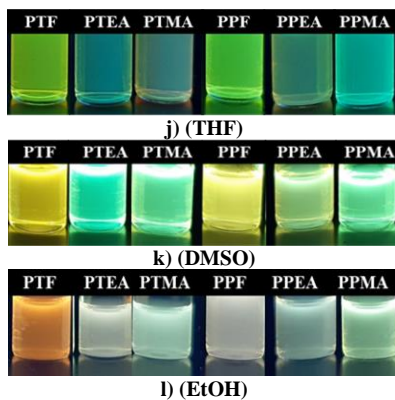


Figura III.5. Comportamentul fotofizic al compușilor studiați în soluții de THF, DMSO și EtOH: j,k,l) Imaginile soluțiilor sub lampa UV (365 nm)

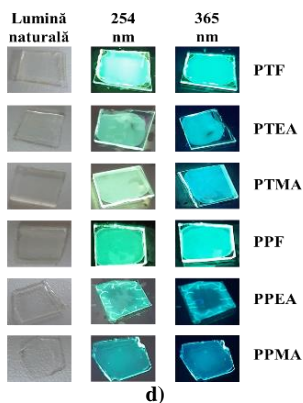


Figura III.6. Comportamentul fotofizic al compușilor studiați dispersați în filme de polimetilmetacrilat (PMMA): d) Imaginile probelor sub lampa UV

III.5 Investigarea caracterului dinamic

Este cunoscut faptul că reacția de iminare este una reversibilă, al cărei echilibru poate fi influențat de stimuli externi [16–19]. Reversibilitatea legăturii iminice din compușii studiați a fost evaluată prin monitorizarea raportului integralelor

semnalelor specifice protonilor imină/aldehidă din spectrele $^1\text{H-NMR}$, înregistrate în diferite medii, la anumite intervale de timp (**Figura III.7**).

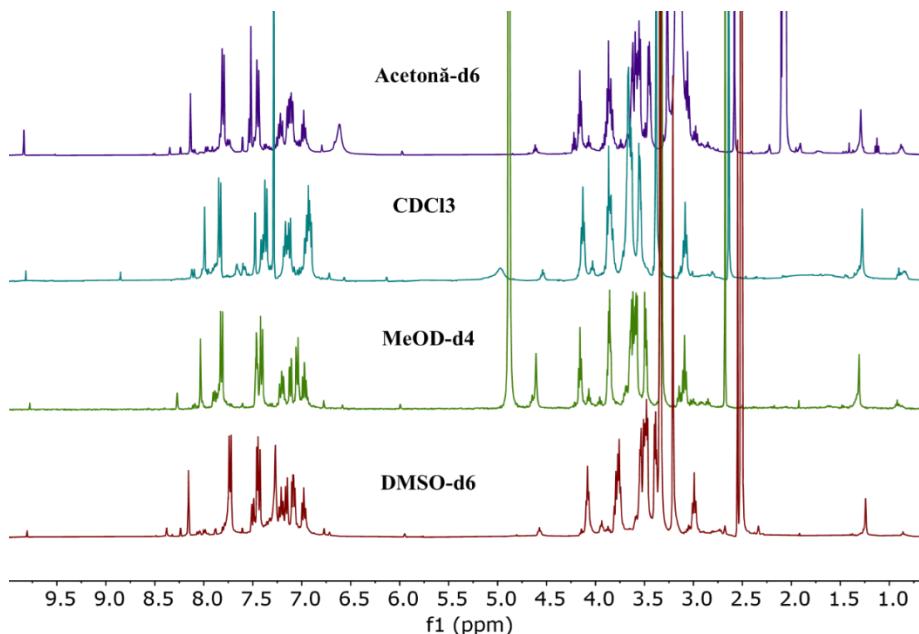


Figura III.7. Investigarea reversibilității legăturii iminice prin spectroscopie RMN. Spectrul $^1\text{H-RMN}$ al compusului **PTEA** în solvenți deuterati diferiți, înregistrate după 24 de ore de la prepararea soluțiilor

Toți compușii, cu excepția **PTMA**, au prezentat stabilitate bună în solvenți organici cu polaritate diferită, observându-se apariția semnalului protonului aldehidic de intensitate foarte mică.

A fost studiată influența pH-ului asupra reversibilității legăturii imină, prin monitorizarea comportamentului iminei în mediu acid sau bazic. La adăugarea de soluții acide, ex. TFA, echilibrul de iminare a fost deplasat complet către reactanți, în mai puțin de 6 ore. Dacă se adaugă TEA peste soluția acidă, echilibrul chimic se deplasează spre produși, cu formarea aproape completă a iminei (**Figura III.8 a**). Modificarea echilibrului de reacție a fost acompaniat și de schimbarea culorii luminii emise a soluției, de la verde la galben la adăugarea de acid, și revenirea la verde la adăugarea bazei (**Figura III.8 c**). În lumină normală, după adăugarea acidului, are loc schimbarea culorii soluției de la incolor la portocaliu intens (**Figura III.8 d**).

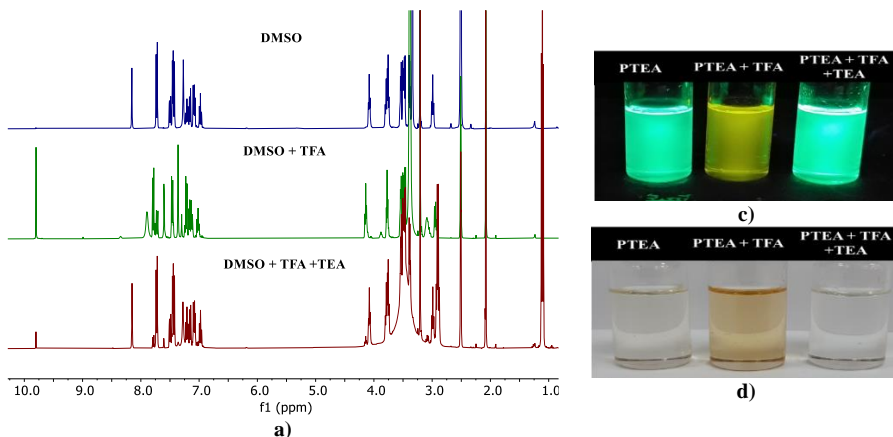


Figura III.8. Reversibilitatea legăturii iminice: a) Spectrul ¹H-NMR al compusului PTEA înregistrat în DMSO, DMSO/TFA, și DMSO/TEA; c,d) Imaginile soluțiilor de PTEA în DMSO sub lampa UV la 365 nm în lumină normală, înainte și după adăugare de TFA, și respectiv TEA

III.6 Investigarea activității anticanceroase

Activitatea antitumorală a celor patru imine (**PPMA**, **PPEA**, **PTMA**, **PTEA**) și a precursorilor lor (**PPF**, **PTF** și fenotiazina) a fost investigată prin determinarea citotoxicității pe șapte linii canceroase umane: carcinom cervical (HeLa); melanom malign (MeWo), osteosarcom (HOS), cancer mamar (MCF7), cancer hepatic (HepG2), glioblastom (LN229) și glioblastom grad IV (U18MG), în comparație cu o linie de celule normale, fibroblaști (NHDF). Similar studiului precedent, testele au fost efectuate și pe linia celulară caracteristică șoarecilor, și anume carcinom de colon (CT-26), în vederea evaluării compușilor *in vivo* pe tumori induse șoarecilor.

Testele de citotoxicitate au arătat o dependență a citotoxicității de structura compusului, de solubilitatea acestuia și de distanța dintre nucleul fenotiazinic și unitatea sulfonamidă.

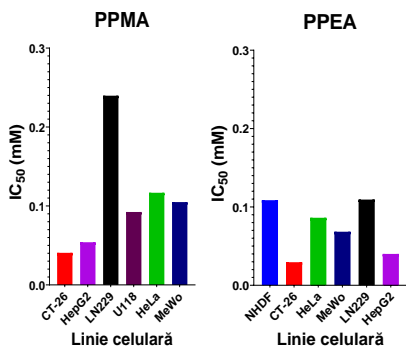


Figura III.12. Graficele reprezentative ale valorilor IC₅₀ calculate pentru compușii PPMA și PPEA

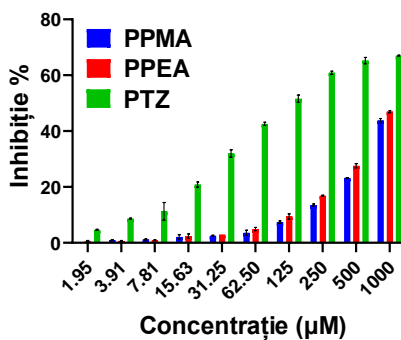


Figura III.14. Activitatea antioxidantă a derivaților de fenotiazină față de DPPH, comparativ cu fenotiazina martor

Cele mai bune rezultate obținute în urma testelor de citotoxicitate *in vitro* au fost pentru compușii **PPMA** (IC_{50} CT26 = 40 μ M , HepG2 = 54 μ M) și **PPEA** (IC_{50} CT26 = 29 μ M , HepG2 = 40 μ M) (**Figura V.12**).

Pe baza rezultatelor obținute în urma evaluării activității oxidante, doar compușii imină *N*-PEGilați (**PPMA** și **PPEA**) au prezentat activitate antioxidantă (**Figura III.14**). S-a remarcat faptul că derivații cu activitate antioxidantă prezintă activitatea antitumorală cea mai mare, sugerând ideea că activitatea antitumorală este influențată de activitatea antioxidantă.

CAPITOLUL IV

MATERIALE PE BAZĂ DE DERIVAȚI *N*-TEGilați DE FENOTIAZINĂ ȘI CHITOSAN

IV.1 Introducere

Obiectivul acestui studiu a fost obținerea materialelor ecologice poroase, capabile să detecteze și să rețină metale grele, în special mercurul. S-a propus obținerea de materiale poroase pe bază de chitosan și un derivat de fenotiazină prezentat în Capitolul III, conectate prin intermediul legăturilor imină. Design-ul propus a avut în vedere faptul că grupările amino și hidroxil ale chitosanului pot coordina metalele grele, iar această capacitate de coordonare se îmbunătățește prin prezența legăturilor imină [20]. Fenotiazina, prin prezența atomului de sulf, prezintă posibilitatea de legare a ionilor de mercur prin legături coordinative, dar și prin legături fizice.

Studii anterioare au demonstrat faptul că în condiții specifice, monoaldehidele pot juca rol de agent de reticulare a chitosanului [21]. În acest context, este de așteptat ca reacția de iminare a chitosanului cu aldehida pe bază de fenotiazină să fie însoțită de gelifierea sistemului, care prin liofilizare să producă materiale solide poroase, capabile să rețină și să detecteze ionii de mercur.

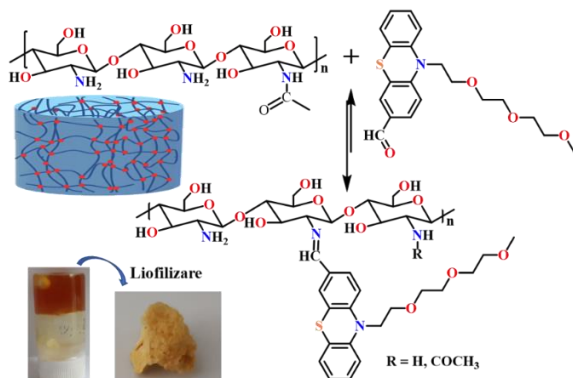
IV.2 Obținerea de hidrogeluri și xerogeluri

Pentru prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan, a fost utilizat derivatul formulat de fenotiazină (PTF) ca agent de reticulare. Acest compus ar trebui să faciliteze o dublă reticulare a lanțurilor de chitosan, chimică prin legături de tip imină și fizică prin legături de hidrogen. Au fost preparate hidrogeluri cu diferite grade de reticulare, variind raportul molar între gruparea amină din chitosan și cea aldehidă din **PTF** (**Tabel IV.1**).

Tabel IV.1. Compoziția și codurile hidrogelurilor/xerogelurilor

Cod probă	2h (2x)	4h (4x)	6h (6x)	Mh (Mx)
Raport NH_2/CHO	2/1	4/1	6/1	-
$m_{Chitosan}$ (g)	0,06	0,06	0,06	0,06
$m_{Aldehidă}$ (g)	0,054	0,027	0,18	-

Deoarece analiza RMN a arătat un grad mic de iminare, hidrogelurile obținute au fost liofilizate pentru a deplasa echilibrul de iminare către formarea produsului de reacție (**Schema IV.2**).



Schema IV.2. Reacția de iminare care stă la baza obținerii hidrogelurilor

Formarea legăturii imină a fost confirmată cu ajutorul spectroscopiei în infraroșu, prin apariția în spectru a benzii caracteristice grupării imină la 1648 cm^{-1} sub forma unei benzi ascuțite, diferit de umărul specific vibrației legăturii amidă din chitosan.

Pentru a investiga schimbările supramoleculare puse în evidență de spectroscopia în infraroșu prin deplasarea benzilor de absorbție specifice legăturilor de hidrogen, xerogeluri au fost analizate prin tehnica difracției de raze X la unghi larg. După cum se poate observa în **Figura IV.3**, chitosanul semicristalin a fost transformat prin reacția de iminare într-un material mai ordonat, iar distanțele intermoleculare cresc odată cu creșterea gradului de reticulare. Distanțele intermoleculare calculate pentru proba 2x (29 Å), au pus în evidență modul de reticulare al lanțurilor de chitosan grefate cu derivatul de fenotiazină prin intermediul unităților de tri(etilen glicol).

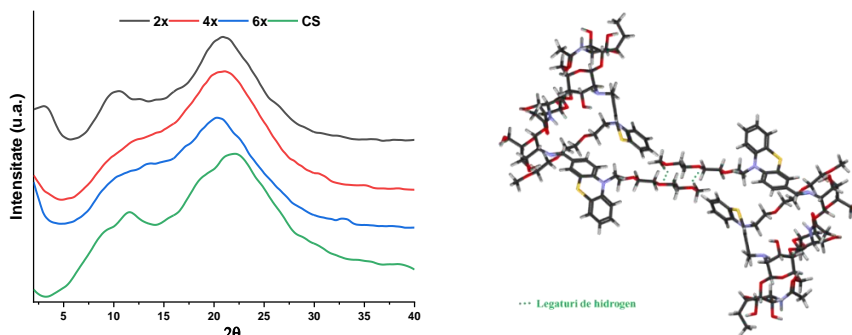
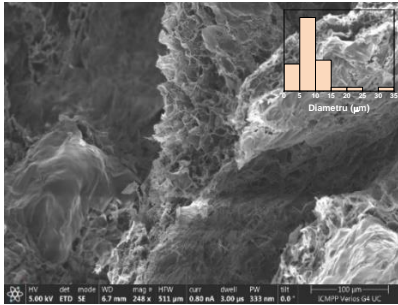


Figura IV.3. a) Difractogramele de raze X ale xerogelurilor și a chitosanului martor; b) Simularea ordonării derivatului iminic de chitosan, prin modelare moleculară cu programul HyperChem Professional 8.0

IV.5 Morfologie

Analiza xerogelurilor cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj a evidențiat o morfologie spongioasă, cu pori interconectați, cu diametri porilor variind între 2-35 μm .



2x

Figura IV.5. Imagine SEM reprezentativă pentru xerogelul obținut, și insertul cu histogramele dimensiunilor porilor

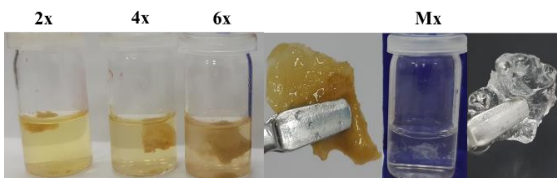
În comparație cu datele de literatură, care indică creșterea dimensiunii porilor hidrogelurilor pe măsură ce gradul de reticulare scade, pentru hidrogelurile studiate nu s-a observat un astfel de trend.

Macroscopic, se poate observa faptul că xerogelurile obținute pentru proba **2x** (**Figura IV.5**) sunt moi și flexibile, fapt ce se corelează bine atât cu densitatea mai mare de reticulare, cât și cu prezența unei cantități mai mari de unități TEG flexibile.

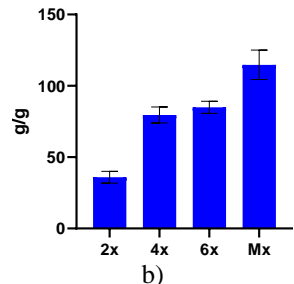
IV.6 Comportarea xerogelurilor în mediu apos

Au fost evaluate stabilitatea și gradul de umflare a xerogelurilor obținute, comparativ cu martorul obținut din chitosan în soluție apoasă de acid acetic cu $\text{pH}=3,7$ (egal cu pH -ul unei soluții de acetat de Hg 5 g/L). Xerogelul 2x se rehidratează, în timp ce probele 4x și 6x și martorul încep să se dezintegreze în bucăți mici. Acest lucru a pus în evidență faptul că un grad mare de reticulare conferă hidrogelurilor stabilitate mare în medii acide.

Comportamentul probelor a fost evaluat în mediu cu conținut de ioni de mercur, imersând probele într-o soluție 5 g/L de acetat de mercur, cu $\text{pH}=3,7$. În mod surprinzător, nici una dintre probe nu se dezintegrează, rămânând intacte pe parcursul experimentului (72 h) (**Figura IV.7 a**). Gradul de umflare masică la echilibru al xerogelurilor a crescut odată cu descreșterea gradului de reticulare (**Figura IV.7 b**).



a)



b)

Figura IV.7. a) Imagini ale probelor după imersarea timp de 72 ore în soluție 5 g/L de $(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \text{Hg}$; b) reprezentarea grafică a gradului de umflare masică la echilibru

IV.8 Capacitatea de reținere a mercurului

În vederea realizării acestui studiu, xerogelurile obținute și proba martor au fost imersate în două soluții de concentrație diferită de $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ (5 respectiv 10 g/L). Determinarea cantității de ioni de mercur obținută a fost realizată gravimetric. S-a observat că toate probele rețin mercur ionic într-o manieră dependentă de concentrația soluției și de gradul de reticulare (**Figura IV.10 b**). Astfel, cantitatea de mercur ionic reținută este net superioară pentru xerogelurile de chitosan/fenotiazină față de cea a chitosanului martor, indicând creșterea capacității materialelor studiate de legare a mercurului ionic. Pe de altă parte, cantitatea de mercur ionic reținută crește invers proporțional față de creșterea conținutului de fenotiazină, indicând capacitatea de umflare a xerogelurilor ca un factor important în acest proces.

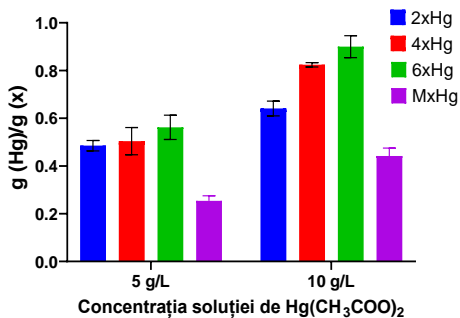


Figura IV.10. b) cantitatea de mercur ionic absorbită (g/g) de cele trei xerogeluri testate, în funcție de concentrația soluției

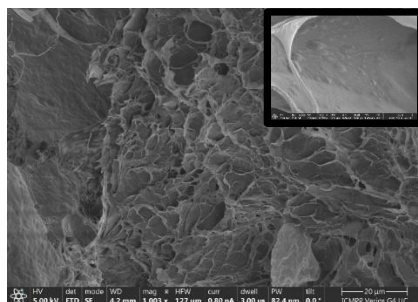


Figura IV.11. Evidențierea absorbției de mercur ionic în xerogeluri: a) imaginea SEM reprezentativă a probei **6x**, încărcate cu mercur ionic

Eficiența încapsulării mercurului ionic în xerogeluri a fost pusă în evidență și prin microscopie electronică de baleiaj, măsurătorile SEM-EDAX pe zone diferite

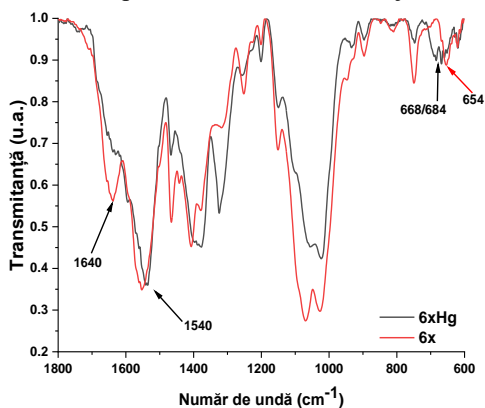


Figura IV.14. Spectrele FTIR suprapuse ale xerogelului **6x** înainte și după încărcarea cu mercur ionic

indicând o distribuție neuniformă a mercurului ionic pe suprafața materialului (**Figura IV.11 a**). Analiza prin difracție de raze X a xerogelurilor liofilizate, după absorbția de mercur ionic, a indicat apariția benzilor de reflexie noi, sugerând o rearanjare structurală în urma legării chimice a mercurului ionic. Acest fapt sugerează că modificările supramoleculare survin cel mai probabil în urma coordinării mercurului ionic de către legăturile imină. Pentru confirmarea acestei ipoteze, au fost înregistrate și analizate spectrele FTIR ale probelor **6x** și **6xHg** (**Figura IV.14**),

unde se observă clar modificări de poziție și formă ale benzilor de vibrație. Un prim indiciu care sugerează legarea coordinativă a ionului de mercur de azotul implicat în legătura iminică este dispariția benzii specifice vibrației C=N (1640 cm^{-1}) [22,23]. Un alt indiciu este apariția unei benzi noi la 1324 cm^{-1} specifică vibrațiilor de întindere a legăturilor C-S-C [24].

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată „*Obținerea de noi derivați solubili în apă pe bază de fenotiazină*” are 264 de pagini împărțite în cinci capitole care includ 19 tabele, 96 figuri, 19 scheme și 305 note bibliografice. Teza a fost structurată pe două părți, în Partea I (Capitolul I) fiind prezentat un studiu de literatură, iar în Partea II (Capitolele II-V) sunt prezentate contribuțiile proprii. Teza se încheie cu o serie de concluzii generale.

Rezultatele originale din Partea II a tezei sunt prezentate în patru capitole și vizează următoarele direcții:

- Sinteza de derivați *N*-PEGilați de fenotiazină și investigarea proprietăților anticanceroase ale acestora.
- Sinteza de imine hibride pe bază de fenotiazină modificată cu poli(etilenglicol) sau cu tri(etilenglicol) și două sulfonamide, și investigarea proprietăților optice, a caracterului dinamic și a proprietăților anticanceroase.
- Obținerea de materiale pe bază de derivați de fenotiazină și chitosan cu capacitate de absorbție a mercurului ionic.

Din studiile efectuate se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Urmărind obținerea de noi derivați de fenotiazină cu solubilitate ridicată în apă, au fost sintetizați trei derivați *N*-PEGilați de fenotiazină conectând un lanț de poli(etilenglicol) la nucleul fenotiazinic prin intermediu a trei grupări de legătură diferite, și anume eter (PP), ester (PPO) și amidă (PPN).
 - Structura celor trei derivați *N*-PEGilați a fost confirmată prin spectroscopie în infraroșu, această metodă punând în evidență vibrațiile legăturilor chimice nou create între nucleul fenotiazinic și vibrațiile specifice legăturilor chimice din poli(etilenglicol) și fenotiazină.
 - Spectrele de rezonanță magnetică nucleară, ^1H -RMN și ^{13}C -RMN, au confirmat atât structura compușilor, cât și puritatea acestora, forma și integrala semnalelor corespunzând structurilor propuse.
 - Prin analiza de rezonanță magnetică nucleară s-a demonstrat stabilitatea hidrolitică a celor trei derivați. Înregistrarea spectrelor la momente diferite timp de șapte zile, nu a scos în evidență apariția de semnale noi care să indice modificări structurale sau degradări, confirmând stabilitatea compușilor.
 - Compușii sintetizați au prezentat solubilitate bună în solvenți organici obișnuiți și în apă, până la o concentrație de 0,1M.

- Studiile fotofizice efectuate pe soluțiile apoase ale compușilor au indicat faptul că PEGilarea a avut ca efect scăderea energiei luminii absorbției, fenomen atribuit agregării. La excitare cu maximul lungimii de undă al luminii absorbite, soluțiile au emis lumină albastră, atribuită fenomenului de emisie indusă de agregare.
- Capacitatea de agregare a compușilor a fost confirmată prin studii de difuzie a luminii în regim dinamic. Mai mult, această metodă a demonstrat dependența stabilității agregatelor în funcție de natura legăturii chimice dintre fenotiazină și poli(etilenglicol).
- Studiul morfologic a fost extins pentru vizualizarea formei și gradului de ordonare al agregatelor prin microscopie electronică de baleiaj, microscopie optică în lumină polarizată, microscopie de forță atomică și microscopie confocal conică.

2. Activitatea biologică a derivaților *N*-PEGilați sintetizați a fost studiată prin investigarea citotoxicității atât *in vitro* cât și *in vivo*, cu scopul de a determina activitatea anticanceroasă a acestora și de a înțelege un mecanism posibil de acțiune.

- Studiile preliminare de biocompatibilitate au indicat faptul că la o concentrație de 100 μM , compușii sunt citotoxici pentru celulele canceroase HeLa dar nu și pe celule normale NHDF.
- Un studiu extins de determinare a activității anticanceroase pe cinci linii canceroase umane, a indicat faptul că derivatul cu unitate de legătură ester (PPO) a avut activitatea cea mai bună, el demonstrând un indice de selectivitate bun pe linia celulară MCF7 specifică cancerului mamar ($\text{SI} = 2$) și concentrații medii inhibitorii bune pentru linia celulară HepG2 specifică cancerului hepatic (161,3 μM) și pentru linia celulară MCF7 specifică cancerului mamar (131,7 μM).
- Testele de citotoxicitate efectuate pe linia celulară CT26 specifică cancerului de colon la șoareci au indicat o concentrație medie inhibitorie foarte mică atât pentru compusul cu unitate de legătură ester, PPO, (24,2 μM) cât și pentru cel cu legătură eter, PP, (47,9 μM), valorile obținute fiind comparabile cu cele ale medicamentelor antitumorale 5-fluorouracil și doxorubicină.
- Testele de biocompatibilitate pe șoareci au arătat o creștere semnificativă a dozei letale medie, de la 952,38 mg/kg pentru fenotiazină, până la 1450 mg/kg și 1300 mg/kg (în echivalenți de fenotiazină) pentru derivații *N*-PEGilați, subliniind rolul PEG-ului în îmbunătățirea biocompatibilității.
- Testele *in vivo* pe șoareci au demonstrat faptul că ambii compuși, PPO și PP, au inhibat creșterea tumorilor, atingând valori ale inhibiției de $T_i = 92\%$ în comparație cu valoarea de 60% raportată pentru alți compuși pe bază de fenotiazină cu o structură mult mai complexă.
- O testare complexă a unui posibil mecanism de inhibare al tumorilor a evidențiat mai multe efecte ce pot avea o acțiune sinergică. Astfel, toți compușii au dovedit capacitate de inhibare a speciilor oxigen reactive,

sugerând existența potențialului antioxidant și, deci, posibilitatea implicării acestuia în apoptoza celulară. Investigații spectrometrice și teste *in vitro* efectuate pentru compușii *N*-PEGilați, au sugerat faptul că legarea PEG-ului de nucleul fenotiazinic prin intermediul unei legături esterice favorizează (i) formarea de agregate cu rol de protecție al unităților fenotiazinice și (ii) clivarea enzimatică, cu eliberarea ulterioară a speciilor de acid fenotiazinic. Speciile de acid fenotiazinic au dovedit capacitate de inhibare a farnesiltransferazei, o enzima cu rol major în multiplicarea celulelor canceroase, prin legarea la centrul metalic al acesteia, Mg și Zn.

3. Cu scopul de a potența atât proprietățile biologice cât și cele optice, au fost sintetizate două aldehide ale fenotiazinei substituie cu poli(etilenglicol), și a fenotiazinei substituie cu tri(etilenglicol), care au servit drept precursori pentru sinteza a patru derivați iminici prin condensarea cu două amine cu grupări sulfonamidice.
 - Sinteza derivaților iminici studiați a fost efectuată prin reacția de condensare asistată de microunde, care a favorizat conversia totală a reactanților în produși, fata de reacția solvotermică care a decurs cu o conversie de aproximativ 42 %.
 - Structurile propuse pentru derivații formulați și iminici au fost confirmate prin spectroscopie RMN, în spectrele obținute fiind prezente semnalele caracteristice protonilor specifici grupărilor formil, și respectiv imină, în raportul corect al integralelor cu protonii din nucleul fenotiazinic și cei din restul sulfonamidic.
 - Prezența legăturilor aldehydă, respectiv imină, a fost confirmată prin spectroscopia în infraroșu, prin apariția în spectru a benzilor de vibrație caracteristice, în special a benzilor de vibrație a grupării formil la 1680 cm^{-1} , și respectiv a legăturii imină la 1640 cm^{-1} .
 - Derivații iminici sintetizați au prezentat capacitate de auto-asamblare în etanol, formând agregate cu diametru cuprins între 500 nm și 2 μm .
 - Investigarea proprietăților optice ale compușilor sintetizați a indicat emisie de lumină verde cu un randament cuantic de până la 42 % în soluție și până la 30 % în stare solidă pentru compușii iminici, și emisie de lumină galbenă cu randament cuantic de până la 51 % în soluție și 41 % în stare solidă pentru compușii aldehydici.
 - Valoarea randamentului cuantic a variat în funcție de polaritatea solventului, sugerând o relație de dependență între polaritatea solventului și delocalizarea electronică a compușilor, cu posibilitatea de control a eficienței cuantice prin stabilizarea stării excitate.
 - Prezența lanțului de PEG pe nucleul fenotiazinic a condus la îmbunătățirea eficienței cuantice, cel mai probabil printr-un efect de izolare al unității cromofore, limitând astfel dezexcitarea nonradiativă prin formarea de excimeri.
 - Studii RMN au evidențiat stabilitatea bună a iminelor în solvenți organici, o deplasare lentă a echilibrului de iminare spre reactanți în prezența apei și o

deplasare mai rapidă în prezența acizilor. Pe de alta parte, echilibrul de reacție a putut fi deplasat din nou către produși adăugând soluții bazice, subliniind caracterul dinamic al iminelor.

- Deplasarea echilibrului de reacție între produși și reactanți a fost însoțită de un efect optic, constând în modificarea culorii luminii emise între verde și galben, creând astfel premisele obținerii de senzori de pH. În stare solidă, luminescența a fost stinsă când filmele au fost expuse la vapori de acid.
 - Testele de citotoxicitate efectuate pe fibroblaști și pe șapte linii de celule canceroase umane și una specifică șoarecilor au evidențiat o dependență a citotoxicității de structura chimică și de solubilitatea compușilor.
 - Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru compusul iminic obținut din fenotiazina *N*-PEGilată, pe linia celulară HepG2 specifică cancerului hepatic ($IC_{50} = 40 \mu M$) și linia celulară CT-26 specifică cancerului de colon la șoareci ($IC_{50} = 29 \mu M$).
 - Testele de inhibare a radicalilor liberi au sugerat posibilitatea influenței caracterului antioxidant asupra citotoxicității celulare, compușii care au prezentat un caracter antioxidant fiind și compușii cu citotoxicitate mai ridicată.
4. A fost obținută o serie de hidrogeluri/xerogeluri poroase pe bază de chitosan și aldehida fenotiazinei *N*-TEGilate descrisă în Capitolul III, utilizată ca agent de reticulare, în trei rapoarte diferite ale grupărilor funcționale amină/aldehidă.
- Hidrogelurile și xerogelurile obținute au fost caracterizate din punct de vedere structural prin analiza RMN și FTIR, care au evidențiat unitatea imină formată între chitosan și derivatul fenotiazinic.
 - Prin analiza spectrelor FTIR și a difractogramelor de raze X s-a confirmat auto-asamblarea unităților imină în clusteri ordonați, ca proces de bază în producerea hidrogelării, și producerea de legături de hidrogen între unitățile de tri(etilenglicol) și chitosan, cu rol de ranforsare a reticulării.
 - Microscopia electronică de baleiaj a indicat o morfologie poroasă a xerogelurilor, cu dimensiuni ale porilor între 2-35 μm .
 - Hidrogelurile au fost solubile în soluții acide, și au fost stabile în soluții acide de săruri de mercur, fapt atribuit capacității legăturilor imină și a heterociclicurilor de fenotiazină de a coordina ionii de mercur, rezultând într-o reticulare suplimentară.
 - Hidrogelurile au prezentat un grad mare de absorbție a ionilor de mercur, care variază în funcție de gradul de reticulare al xerogelului și în funcție de concentrația soluției utilizate, atingând un maxim de 0,9 g/g.
 - Analizele efectuate pe xerogelurile încărcate cu ioni de mercur au pus în evidență legarea chimică a mercurului ionic prin legături coordinative datorită grupării iminice și a sulfului din nucleul fenotiazinic.

Rezultatele originale prezentate în teză au fost publicate sub formă de articole științifice în reviste internaționale și naționale cotate ISI.

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. **Sandu Cibotaru**, Andreea-Isabela Sandu, Dalila Belei, Luminita Marin, Water soluble PEGylated phenothiazines as valuable building blocks for biomaterials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020, 116, 111216. doi: 10.1016/j.msec.2020.111216 (IF: 8,457);
2. **Sandu Cibotaru**, Valentin Nastasa, Andreea-Isabela Sandu, Andra-Cristina Bostanaru, Mihai Mares, Luminita Marin, PEGylation of phenothiazine - A synthetic route towards potent anticancer drugs. *J Adv Res.* 2021, 37, 279-290. doi: 10.1016/j.jare.2021.07.003 (IF: 12,822);
3. **Sandu Cibotaru**, Alina Nicolescu, Luminita Marin, Dynamic PEGylated phenothiazine imines. Synthesis, photophysical behavior and reversible luminescence switching in response to external stimuli, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2022, 114282. doi: 10.1016/j.jphotochem.2022.114282 (IF: 5,141);
4. **Sandu Cibotaru**, Daniela Ailincăi, Bianca Iustina Andreica, Xinjian Cheng, Luminita Marin, TEGylated Phenothiazine-Imine-Chitosan Materials as Promising Framework for Mercury Recovery, Gels, - under review.

Lucrări proceeding

1. **Sandu Cibotaru**, Andreea-Isabela Sandu, Dalila Belei, Luminita Marin, Water Soluble PEGylated Phenothiazines. Synthesis, Characterization and Antitumor Properties, *First International Conference on "Green" Polymer Materials*, 2020;
2. **Sandu Cibotaru**, Valentin Nastasa, Andreea-Isabela Sandu, Andra-Cristina Bostanaru, Mihai Mares, Luminita Marin, PEG-ylated Phenothiazine Derivatives. Synthesis and Antitumor Activity, *IFMBE 87 Proceedings*, 2021.

Lucrări publicate în reviste cotate ISI (rezultate care nu sunt incluse în teză)

1. Daniela Ailincăi; **Sandu Cibotaru**; Alexandru Anisie; Corneliu G. Coman; Aurelian Sorin Pasca; Irina Rosca; Andreea-Isabela Sandu; Liliana Mititelu-Tartau, Luminita Marin, Mesoporous chitosan nanofibers loaded with norfloxacin and coated with phenylboronic acid perform as active dressings to accelerate the healing of burn wounds – **trimis spre publicare**

Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:

1. Asistent de cercetare in cadrul proiectului „Închiderea lanțurilor de valoare din bioeconomie prin obținerea de bioproduse inovative cerute de piață”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0569;
2. Asistent de cercetare in cadrul proiectului „Bandaj resorbabil cu eliberare controlată de norfloxacin pentru vindecarea arsurilor”, PN-III-P2-2.1-PED-2019-5071;

3. Asistent de cercetare in cadrul proiectului „*Nanomateriale ecologice pe bază de chitosan pentru aplicații de interes contemporan*”, PN-III-P4-ID-PCE-2020-2717;
4. Asistent de cercetare in cadrul proiectului „*Smart Wound Monitoring Restorative Dressings (SWORD)*”, H2020-MSCA-RISE-2019.

Participări la sesiuni științifice naționale și internaționale

a) Comunicări orale

1. **Sandu Cibotaru**, Andreea-Isabela Sandu, Dalila Belei, Luminita Marin, Water soluble PEGylated phenothiazines. Synthesis, characterization and antitumor properties, *Sesiunea De Comunicări Științifice A Tinerilor Cercetători Poartă Deschisă Spre Viitor*, **2020**, Iași, România;
2. **Sandu Cibotaru**, Valentin Nastasa, Andreea-Isabela Sandu, Andra-Cristina Bostanaru, Mihai Mares, Luminita Marin, PEG-ylated Phenothiazine Derivatives. Synthesis and Antitumor Activity, *5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (ICNBME)*, **2021**, Chișinău, Republica Moldova – *Invited speaker*;
3. **Sandu Cibotaru**, Luminita Marin, Novel Luminescent Phenothiazine Derivatives for Biological Applications, *ICMPP – Open Door To The Future, Scientific Communications Of Young Researchers (MacroYouth)*, **2021**, Iași, România;
4. **Sandu Cibotaru**, Valentin Nastasa, Andreea-Isabela Sandu, Andra-Cristina Bostanaru, Mihai Mares, Luminita Marin, New PEGylated phenothiazine derivatives with tumor growth inhibition properties, *XXXIth edition of the International Congress of “Apollonia” University of Iasi*, **2022**, Iași, România;
5. **Sandu Cibotaru**, Daniela Ailincăi, Alexandru Anisie, Luminita Marin, Bandages based on chitosan nanofibers for burn healing applications, *12th International Conference On Materials Science & Engineering (BRAMAT)*, **2022**, Brașov, România;
6. **Sandu Cibotaru**, Valentin Nastasa, Andreea-Isabela Sandu, Andra-Cristina Bostanaru, Mihai Mares, Luminita Marin, PEGylated phenothiazine derivatives with potent antitumor activity, *EPF European Polymer Congress*, **2022**, Praga, Republica Cehă.

b) Prezentare de postere

1. **Sandu Cibotaru**, Andreea-Isabela Sandu, Dalila Belei, Luminita Marin, PEGylated phenothiazine as water soluble building blocks for biomaterials, *5th International Conference on Chemical Engineering*, **2020**, Iași România;
2. **Sandu Cibotaru**, Andreea-Isabela Sandu, Dalila Belei, Luminita Marin, Water soluble PEGylated phenothiazines. Synthesis, characterization and antitumor properties, *E-conference “The First International Conference on “Green” Polymer Materials*, **2020**;
3. **Sandu Cibotaru**, Daniela Ailincăi, Alexandru Anisie, Luminita Marin, Drug delivery systems based on imino-chitosan nanofibers for burn healing applications, *EPF European Polymer Congress*, **2022**, Praga, Republica Cehă.

Bibliografie selectivă

- [1] K. Pluta, B. Morak-Młodawska, M. Jeleń, Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines, *Eur J Med Chem.* 46 (2011) 3179–3189. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.013>.
- [2] S. Ahmadian, V. Panahi-Azar, M.A.A. Fakhree, W.E. Acree, A. Jouyban, Solubility of Phenothiazine in Water, Ethanol, and Propylene Glycol at (298.2 to 338.2) K and Their Binary and Ternary Mixtures at 298.2 K, *J Chem Eng Data.* 56 (2011) 4352–4355. <https://doi.org/10.1021/jc2001649>.
- [3] R. Jiang, L. Huang, M. Liu, F. Deng, H. Huang, J. Tian, Y. Wen, Q. Cao, X. Zhang, Y. Wei, Ultrafast microwave-assisted multicomponent tandem polymerization for rapid fabrication of AIE-active fluorescent polymeric nanoparticles and their potential utilization for biological imaging, *Materials Science and Engineering: C.* 83 (2018) 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.010>.
- [4] L. Wang, Q. Xia, Z. Zhang, J. Qu, R. Liu, Precise design and synthesis of an AIE fluorophore with near-infrared emission for cellular bioimaging, *Materials Science and Engineering: C.* 93 (2018) 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.012>.
- [5] A. Bejan, L. Marin, Phenothiazine based nanocrystals with enhanced solid state emission, *J Mol Liq.* 265 (2018) 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.125>.
- [6] L. Marin, A. Bejan, S. Shova, Phenothiazine based co-crystals with enhanced luminescence, *Dyes and Pigments.* 175 (2020) 108164. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.108164>.
- [7] S. Cibotaru, A.-I. Sandu, D. Belej, L. Marin, Water soluble PEGylated phenothiazines as valuable building blocks for bio-materials, *Mater Sci Eng C.* 116 (2020) 111216. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111216>.
- [8] A. casini, A. Scozzafava, A. Mastrolorenzo, C. Supuran, Sulfonamides and Sulfonylated Derivatives as Anticancer Agents, *Curr Cancer Drug Targets.* 2 (2002) 55–75. <https://doi.org/10.2174/1568009023334060>.
- [9] M. Danish, M.A. Raza, H. Khalid, U. Iftikhar, M.N. Arshad, New metal complexes of sulfonamide: Synthesis, characterization, in-vitro anticancer, anticholinesterase, antioxidant, and antibacterial studies, *Appl Organomet Chem.* 35 (2021). <https://doi.org/10.1002/aoc.6033>.
- [10] P. Mikuš, D. Krajčiová, M. Mikulová, B. Horváth, D. Pecher, V. Garaj, S. Bua, A. Angeli, C.T. Supuran, Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine and amino acid structural motifs as inhibitors of the physiological carbonic anhydrase isozymes I, II and IV and tumor-associated isozyme IX, *Bioorg Chem.* 81 (2018) 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.08.005>.
- [11] A. El-Mekabaty, H.M. Awad, Convenient synthesis of novel sulfonamide derivatives as promising anticancer agents, *J Heterocycl Chem.* 57 (2020) 1123–1132. <https://doi.org/10.1002/jhet.3849>.
- [12] V. Garaj, L. Puccetti, G. Fasolis, J.-Y. Winum, J.-L. Montero, A. Scozzafava, D. Vullo, A. Innocenti, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating 1,2,4-triazine moieties, *Bioorg Med Chem Lett.* 14 (2004) 5427–5433. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.07.087>.
- [13] Y. Luo, Y. Zhou, Y. Song, G. Chen, Y.-X. Wang, Y. Tian, W.-W. Fan, Y.-S. Yang, T. Cheng, H.-L. Zhu, Optimization of substituted cinnamic acyl sulfonamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors with anticancer activity, *Bioorg Med Chem Lett.* 28 (2018) 3634–3638. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.10.037>.

- [14] M. v. Kachaeva, D.M. Hodyna, I. v. Semenyuta, S.G. Pilyo, V.M. Prokopenko, V. v. Kovalishyn, L.O. Metelytsia, V.S. Brovarets, Design, synthesis and evaluation of novel sulfonamides as potential anticancer agents, *Comput Biol Chem.* 74 (2018) 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.combiolchem.2018.04.006>.
- [15] A. Scozzafava, T. Owa, A. Mastrolorenzo, C. Supuran, *Anticancer and Antiviral Sulfonamides*, *Curr Med Chem.* 10 (2003) 925–953. <https://doi.org/10.2174/0929867033457647>.
- [16] M.E. Belowich, J.F. Stoddart, Dynamic imine chemistry, *Chem Soc Rev.* 41 (2012) 2003. <https://doi.org/10.1039/c2cs15305j>.
- [17] B. Dereka, D. Svechkarov, A. Rosspointner, A. Aster, M. Lunzer, R. Liska, A.M. Mohs, E. Vauthey, Solvent tuning of photochemistry upon excited-state symmetry breaking, *Nat Commun.* 11 (2020) 1925. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15681-3>.
- [18] S. Kulchat, M.N. Chaur, J.-M. Lehn, Kinetic Selectivity and Thermodynamic Features of Competitive Imine Formation in Dynamic Covalent Chemistry, *Chemistry - A European Journal.* 23 (2017) 11108–11118. <https://doi.org/10.1002/chem.201702088>.
- [19] C. Godoy-Alcántar, A.K. Yatsimirsky, J.-M. Lehn, Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution, *J Phys Org Chem.* 18 (2005) 979–985. <https://doi.org/10.1002/poc.941>.
- [20] A. Bejan, F. Doroftei, X. Cheng, L. Marin, Phenothiazine-chitosan based eco-adsorbents: A special design for mercury removal and fast naked eye detection, *Int J Biol Macromol.* 162 (2020) 1839–1848. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.232>.
- [21] A. Bejan, D. Ailincăi, B.C. Simionescu, L. Marin, Chitosan hydrogelation with a phenothiazine based aldehyde: a synthetic approach toward highly luminescent biomaterials, *Polym Chem.* 9 (2018) 2359–2369. <https://doi.org/10.1039/C7PY01678F>.
- [22] J.S. Sultan, S.M. Lateaf, D.K. Rashid, Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Mixed Ligand (HL) Complexes Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with Azide, *Open J Inorg Chem.* 05 (2015) 102–111. <https://doi.org/10.4236/ojic.2015.54011>.
- [23] N. Nawar, N.M. Hosny, Transition Metal Complexes of 2-Acetylpyridine o-Hydroxybenzoylhydrazone(APo-OHBH): Their Preparation, Characterisation and Antimicrobial Activity., *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 47 (1999) 944–949. <https://doi.org/10.1248/cpb.47.944>.
- [24] Shikha Parmar, Yatendra Kumar, Ashu Mittal, Synthesis, Spectroscopic and Pharmacological Studies of Bivalent Copper, Zinc and Mercury Complexes of Thiourea, *S Afr J Chem.* 63 (2010).