



Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Rezumatul tezei de doctorat

Reactivitate redox relevantă din punct de vedere biologic în molecule
mici

Doctorand

Alina-Cătălina Matei

Conducător științific:

Prof. Dr. Radu Silaghi-Dumitrescu

Cluj-Napoca

2020

Cuprinsul tezei

1. Despre această teză	1
2. Considerații generale	2
2.1. Stresul oxidativ.....	2
2.2. Antioxidanți.....	4
2.3. Activitatea antioxidantă.....	6
2.4. Activitatea prooxidantă	8
2.5. Hemoproteine	10
2.6. Metode experimentale utilizate în studiul reactivității redox relevante din punct de vedere biologic în molecule mici	12
3. Aplicații ale testului HAPX pe extracte din plante.....	14
3.1. Considerații generale despre extractele de <i>Salvia</i>	14
3.2. Materiale și metode	15
3.3. Rezultate și discuții	16
3.4. Concluzii	17
4. Legarea antioxidantului la globine	18
4.1. Introducere	18
4.2. Materiale și metode	20
4.3. Rezultate și discuții	21
4.4. Concluzii	28
5. Analiza cinetică a reactivității antioxidante cu relevanță biomedicală crescută, bazată pe lipozomi și mioglobină	30
5.1. Introducere	30
5.2. Materiale și metode	31
5.3. Rezultate și discuții	32
5.4. Concluzii	42
6. Despre stabilitatea glutaralhidei în compoziția biocidelor	44
6.1. Introducere	44

6.2.	Materiale și metode	46
6.3.	Rezultate și discuții	48
6.3.1.	Reactivitate redox	48
6.3.2.	Spectre Raman	48
6.3.3.	Spectre RMN	52
6.3.4.	Analiza LC-MS	56
6.3.5.	Titrare cu glicină	61
6.3.6.	Eficiența reticulării proteinelor (SDS-PAGE)	64
6.3.7.	Spectre UV-Vis	67
6.4.	Concluzii	72
7.	Diferența dintre HOMO-LUMO și spectre UV-Vis a candidaților fenotiazinici folosiți ca agenți de marcarea a tumorii	74
7.1.	Introducere	74
7.2.	Materiale și metode	75
7.3.	Rezultate și discuții	76
7.4.	Concluzii	94
8.	Concluzii generale	96
9.	Bibliografie	97
10.	Lista lucrărilor publicate	106

Cuprinsul rezumatului

1. Despre această teză	5
2. Considerații generale	6
3. Aplicarea testului HAPX pe extracte din plante	7
4. Legarea antioxidantului la globine	8
5. Analiza cinetică a reactivității antioxidante cu relevanță biomedicală crescută, bazată pe lipozomi și mioglobină	10
6. Despre stabilitatea glutaralhidei în compozițiile de biocide	12
7. Diferența dintre HOMO-LUMO și spectre UV-Vis a candidaților fenotiazinici folosiți ca agenți de marcarea a tumorii.....	15
8. Concluzii generale	19
9. Bibliografia tezei	19

Cuvinte cheie: *antioxidanți, activitatea antioxidantă, mioglobină, glutaraldehydă, fenotiazine, spectroscopie.*

1. Despre această teză

Prezenta teză are ca scop examinarea diferitelor fațete ale reactivității redox relevante din punct de vedere biologic în molecule mici. Astfel de fațete includ:

- Aplicarea metodologiei standard de testare pentru evaluarea proprietăților redox ale extractelor de plante bogate în antioxidanți – cu accent pe metodele nou dezvoltate, care implică reactivi relevanți din punct de vedere biologic (și în primul rând hemoglobina)
- Examinarea interacțiunii moleculelor antioxidante cu proteine, folosind spectroscopia
- Dezvoltarea unei noi versiuni a unui test cantitativ pentru activitatea antioxidantă, care utilizează un amestec de reactivi lipozomi-mioglobină, cu relevanță biologică crescută în comparație cu testele antioxidante clasice
- Aplicarea metodelor de calcul pentru examinarea diferenței HOMO-LUMO (și spectrelor UV-Vis) într-o serie de compuși cu posibile aplicații biomedicale
- Examinarea reactivității redox în soluțiile stoc de glutaraldehidă – a evoluat în continuare într-un studiu mai complex, cu relevanță pentru proprietățile lor în biocide și aplicabilitatea în medii medicale

Pentru a realiza lucrurile menționate mai sus, teza reunește un set divers de metode – spectroscopie (UV-Vis, fluorescență, RMN, Raman), cinetică (inclusiv enzimatică Michaelis-Menten), spectrometrie de masă și calcule DFT/TD-DFT. Esențialul tezei este interacțiunea moleculelor mici redox-active cu proteinele (în special hemoglobina și mioglobină) și celulele.

2. Considerații generale

Stresul oxidativ poate apărea ca o criză/scădere a sistemelor antioxidante, o creștere generală a speciilor reactive de oxigen sau ambele. Dacă sistemele antioxidante nu contracarează speciile reactive de oxigen, ele pot provoca leziuni ale ADN-ului, pot crește peroxidarea lipidelor și/sau pot induce modificări ale acizilor nucleici și ale proteinelor.¹

Studiile vechi și recente în domeniul antioxidantilor s-au concentrat mai mult pe rolul antioxidantilor, vitamina C, E, acidul cafeic, acidul galic, acidul ferulic, catechinul, rutinul, seleniul, carotenoizii și acidul folic cu proprietăți protectoare împotriva unor boli precum cancerul, boli de inimă, arteroscleroză.¹¹

Căile activității antioxidante sunt diverse și implică captarea oxigenului singlet, inhibitorii ai reacțiilor radicalilor liberi, oprirea propagării reacției de autooxidare în lanț, sinergie cu alți antioxidanți, agenți chelatori care transformă compușii prooxidanți în compuși stabili.⁹ Lista de metode care determină activitatea antioxidantă include capacitatea de absorbție a radicalilor de oxigen (ORAC), testul de inhibiție/evaluare a capacității de captare a radicalului liber DPPH, testul de determinare a conținutului total de fenoli prin utilizarea reactivului Folin-Ciocalteu;²⁰ metode mai relevante din punct de vedere biologic includ testul de inhibare a activității peroxidazice a hemoglobinei/ascorbatului (HAPX) și testul bazat pe inhibarea peroxidării induse a lipozomilor.²¹

Capacitatea prooxidantă se referă la prezența unor substanțe capabile să inducă stresul oxidativ prin reprimarea sistemelor antioxidante sau prin generarea speciilor reactive. În literatura de specialitate au fost raportate câteva flavonoide cunoscute care acționează ca prooxidant în anumite circumstanțe și care au capacitatea de a promova oxidarea altor substanțe. Antioxidanții sunt considerați substanțe cu "două fețe", deoarece pot avea un efect prooxidant în anumite circumstanțe. Acidul ascorbic este un important antioxidant solubil în apă, cu rol în apărarea organismului împotriva speciilor reactive de oxigen, dar se poate comporta și ca prooxidant în prezența cupru sau fier cu generarea de peroxid de hidrogen..^{28,29,30}

Proteinele sunt macromolecule indispensabile, care se regăsesc în toate organismele vii. Mioglobina este o proteină globulară monomerică cu funcție importantă în transportul și stocarea oxigenului în mușchi. Oxigenul este stocat pentru utilizarea în stadiul anaerob a respirației. În plus, mioglobina este implicată în reglarea și neutralizare a monoxidului de

azot. Hemoglobina este o proteină tetramerică, cu rol important în transportul oxigenului de la plămâni către țesuturi.^{38,39}

Informații utile despre structurile proteinelor, interacțiunile, legarea ligandului exogen, stările de oxidare și stările de spin ale intermediarilor, chiar și funcția enzimelor, au fost colectate folosind metodele experimentale precum UV-Vis, Raman, Mössbauer, spectroscopia de dicroism circular, cristalografia cu raze X, rezonanța paramagnetică electronică (RES), rezonanța magnetică nucleară (RMN) și chimia computațională.^{37,40,41}

3. Aplicarea testului HAPX pe extracte din plante

Speciile de *Salvia* sunt cele mai utilizate plante medicinale și, în general, cunoscute pentru efectele farmacologice multiple, inclusiv efectele antiproliferative, antiinflamatorii, antinoceptivă, antioxidante, antimicrobiene, antimutagene, antidementia, hipoglicemice și hipolipidemică⁴⁴. Evaluarea conținutului polifenolic și a activității antioxidante a șase specii de *Salvia L.* din flora moldovenească spontană (*S. etiologis*, *S. austriaca*, *S. sclarea*, *S. nutans*, *S. verticillata* și *S. nemorosa*), a fost realizată utilizând trei sisteme model în vitro, DPPH, FRAP și HAPX.

Tabel 3.1. Activitatea antioxidantă a speciilor de *Salvia*.

Probe	DPPH IC ₅₀ (μg/mL)	FRAP (mmol Trolox/mg d.w.)	HAPX (mg CAE)/g
<i>S. aetiopsis</i>	158.76 ± 0.82	1399 ± 5.01	6.31 ± 0.21
<i>S. austriaca</i>	123.14 ± 0.70	2066 ± 4.81	8.88 ± 1.56
<i>S. sclarea</i>	97.67 ± 0.56	2791 ± 4.81	146.66 ± 23.69
<i>S. nutans</i>	158.03 ± 0.88	1546 ± 4.81	62.2 ± 7.31
<i>S. verticillata</i>	42.923 ± 0.23	8044 ± 4.81	1074.3 ± 836.16
<i>S. nemorosa</i>	80.09 ± 0.6	2797 ± 4.81	91.2 ± 10.34
Quercetin	5.62 ± 0.33	-	-
BHT	16.2 ± 0.42	-	-

S. verticillata prezintă cea mai mare capacitate antioxidantă determinată de DPPH (42.923±4.81μg/ml), FRAP (8044±4.81 mmol Trolox/mg) și HAPX (1074.3± 836 mg CAE)/g). *S. nutans*, *S. austriaca* și *S. aetiopsis* au cea mai mica activitate antioxidantă (Tabel 3.1).

Profilul polifenolic și activitatea antioxidantă pentru șase specii de *Salvia* au fost evaluate pentru a completa datele științifice legate de genul *Salvia*, care pot fi surse importante de antioxidanți naturali.

4. Legarea antioxidantului la globine

În condiții de stres oxidativ, hemoglobina feroasă-oxi din sânge suferă nu numai auto-oxidarea la Fe(III), dar, de asemenea, oxidarea la forma toxică, feril (Fe(IV)-oxo). Compușii antioxidanți pot reduce feril înapoi la met hemoglobină (Fe(III)), care poate fi transformată în continuare prin met hemoglobin reductază în hemoglobină. Antioxidanții endogeni (cum ar fi ascorbatul sau uratul) s-au dovedit a fi eficienți în aceste procese de reducere pentru finalizarea unui ciclu catalitic pseudo-peroxidază, cu relevanță biomedicală și analitică.

Hemoglobina și mioglobina dispun fluorescență la ~330 nm datorită reziduurilor de Trp și Tyr. Această fluorescență poate fi afectată de liganzi dacă/atunci când se leagă de Hb în apropierea reziduurilor de Trp și/sau Tyr. Figura 4.1 arată că fluorescența Mb este stinsă de ascorbat într-o manieră dependentă de concentrație.

Interacțiunea cu mioglobina la trei temperaturi diferite (297 K, 303 K și 310 K) a fost studiată în continuare pentru a stabili ce tip de mecanism de stingere a fluorescenței este prezent; după cum se poate observa, Tabelul 4.1 ilustrează relația constantelor dinamice Stern-Volmer de stingere și temperatura.

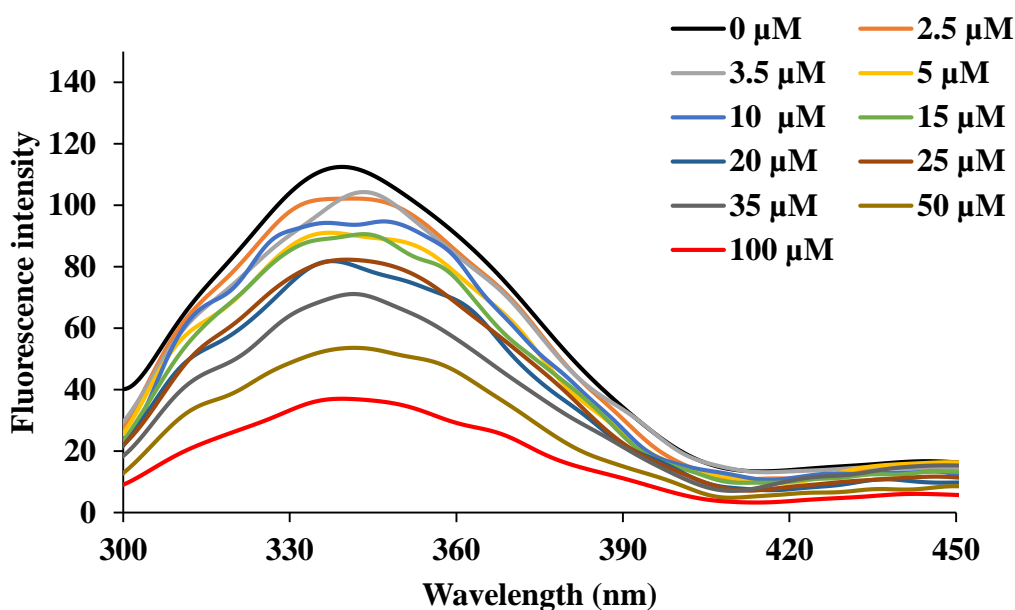


Figura 4.1. Spectrele de emisie ale mioglobinei în prezența diferitelor concentrații de ascorbat la lungimea de undă de excitație 280 nm, în soluția tampon PBS, la temperatura camerei.

Tabel 4.1. Constantele de stingere Stern-Volmer și parametrii termodinamici ai interacțiunii ascorbat-Mb la pH 7.4.

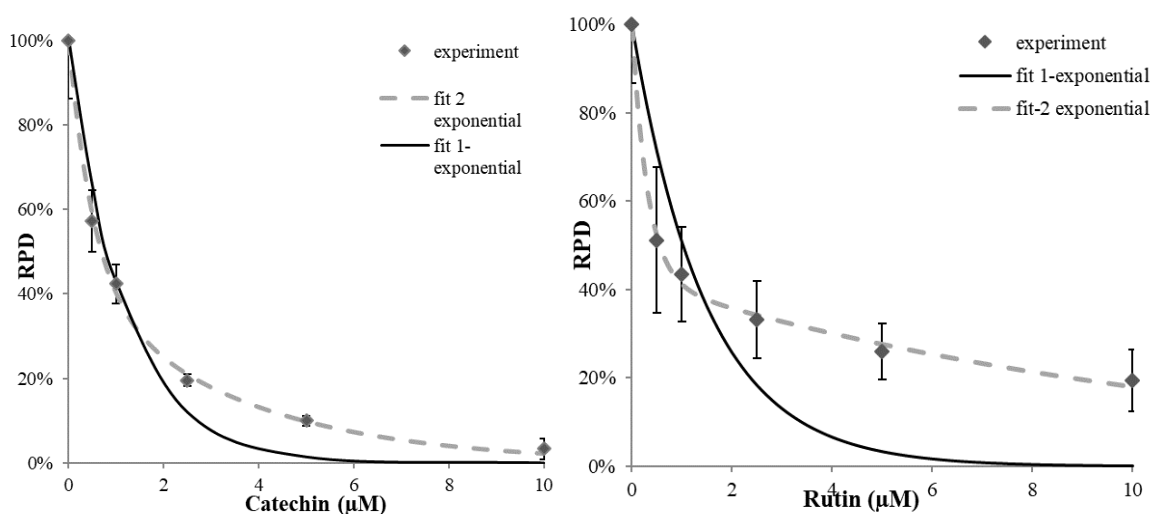
T (K)	KSV (L* mol^{-1})	R ²	n	Kd (μM)	Ka ($\times 10^4 \text{L}^* \text{mol}^{-1}$)	R ²	ΔS J/mol	ΔH KJ/mol	ΔG KJ/mol
297	10191	0.98	1	7.34	3.90	0.99	-100	-55.99	-26.19
303	14180	0.91	1	25.30	2.28	0.92			-25.59
310	15922	0.97	1	1613	1.51	0.93			-24.89

Valorile energiei libere (ΔG), entropiei (ΔS) și entalpiei (ΔH) sunt prezentate în Tabelul 4.1. Semnul negativ pentru ΔG implică faptul că procesul de interacțiune este spontan. Contribuția majoră la ΔG este de la ΔH , mai mult decât de la ΔS , ceea ce reflectă faptul că procesul de legare este predominant condus de entalpie și legatura de hidrogen este forța de interacțiune majoră în legarea ascorbatului la Mb.

5. Analiza cinetică a reactivității antioxidante cu relevanță biomedicală crescută, bazată pe lipozomi și mioglobină

Inhibarea autooxidării lipozomilor de către citocromul *c* poate fi utilizată pentru analize cel puțin calitative sau semi-cantitative ale reactivității antioxidante cu relevanță biologică; acest tip de test va fi denumit în continuare ILA-citc (inhibition of liposome autooxidation by cytochrome c).^{21,98,109,110,117,118} Un test bazat pe oxidarea lipozomilor are avantajul de a fi aplicabil atât antioxidanților solubili în apă, cât și antioxidanților lipofilici. Raportăm aici că mioglobina poate fi folosită în loc de citocrom *c* într-un astfel de test lipozomic (denumit în continuare ILA-Mb) pentru reactivitate antioxidantă, cu trei avantaje: (1) utilizarea unei proteine mai accesibile în general (Mb vs. citocrom *c*), (2) reducerea duratei experimentului, și (3) oferind un test cantitativ, spre deosebire de versiunile semi-cantitative descrise anterior bazate pe citocromul *c*.

Aici se propune o măsură cantitativă a reactivității antioxidante, "gradul relativ de peroxidare" (RPD), calculat pe baza creșterii absorbanței la 235 nm într-un timp stabilit după inițierea reacției. Sunt explorate două opțiuni pentru valoarea acestui timp stabilit: 120 și 180 min; aceste valori sunt alese astfel încât să exploreze limitele superioare și inferioare ale părții ascendente a curbei absorbantei = $f(\text{timp})$, observând că într-un caz (ascorbat vs. catechin la 2,5 μM) ordinea reactivității măsurată la aceste două puncte de timp este diferită. În continuare sunt prezentate datele pentru 120 min, timp stabilit.



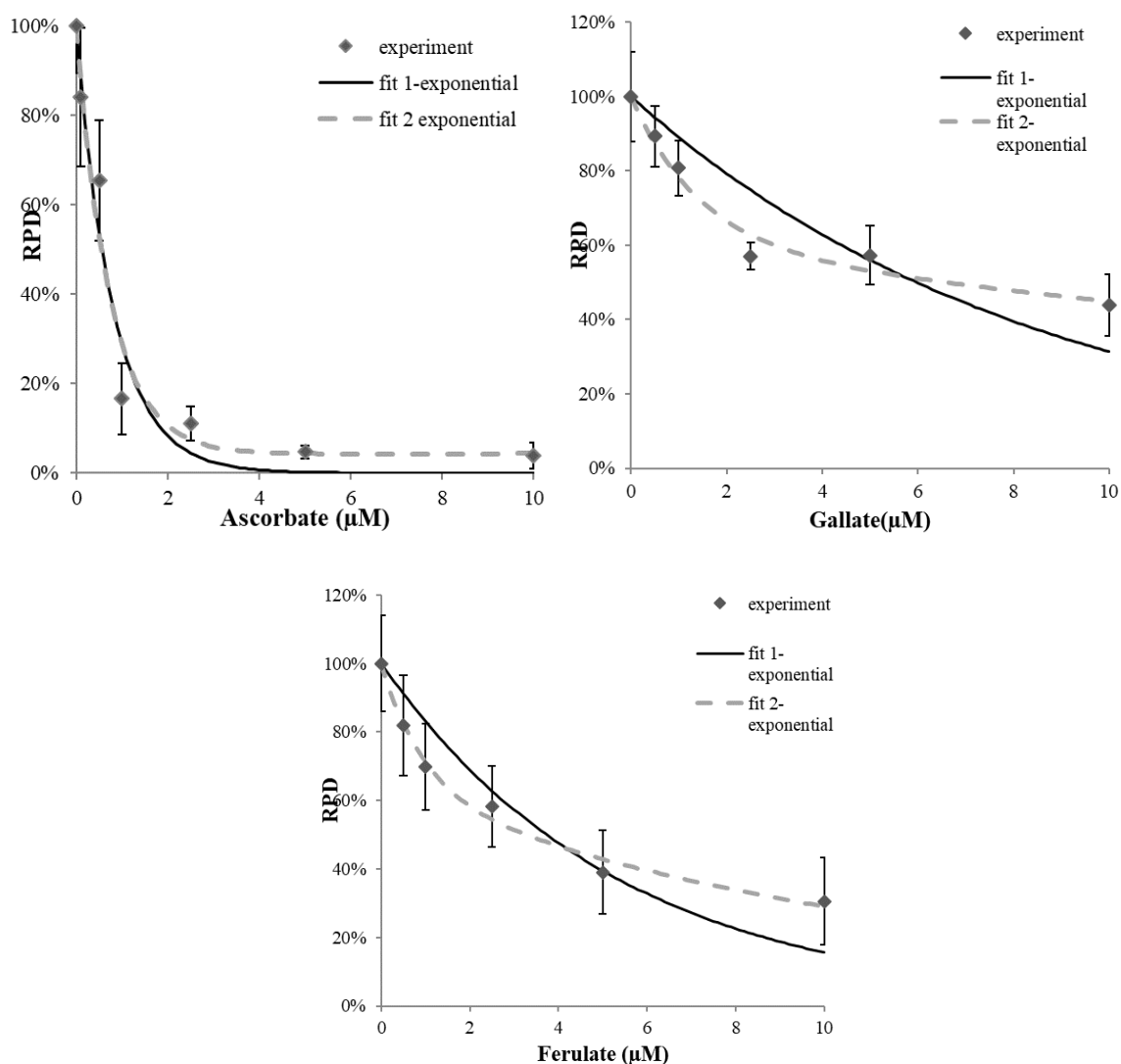


Figura 5.1. Dependența de concentrație a RPD pe baza datelor la 120 min timp stabilit.

Tabel 5.1. Date numerice conform datelor din Figura 5.1.

Antioxidanți	Model mono-exponențial	R ²	IC ₅₀	Model bi-exponențial	R ²	IC ₅₀
Catechin	$y = e^{-0.848x}$	0.985	0.8	$y = 0.428 * e^{-0.293x} + 0.572 * e^{-1.935x}$	0.998	0.7
Rutin	$y = e^{-0.679x}$	0.870	1	$y = 0.424 * e^{-0.086x} + 0.576 * e^{-3.223x}$	0.997	0.6
Ascorbat	$y = e^{-1.239x}$	0.965	0.5	$y = 0.042 * e^{-0.005x} + 0.958 * e^{-1.352x}$	0.967	0.5
Acid galic	$y = e^{-0.116x}$	0.859	5.9	$y = 0.602 * e^{-0.029x} + 0.398 * e^{-0.699x}$	0.975	6.6

Acid ferulic	$y = e^{-0.186x}$	0.939	3.7	$y = 0.628 * e^{-0.077x} + 0.372 * e^{-1.051x}$	0.990	3.2
--------------	-------------------	-------	-----	---	-------	-----

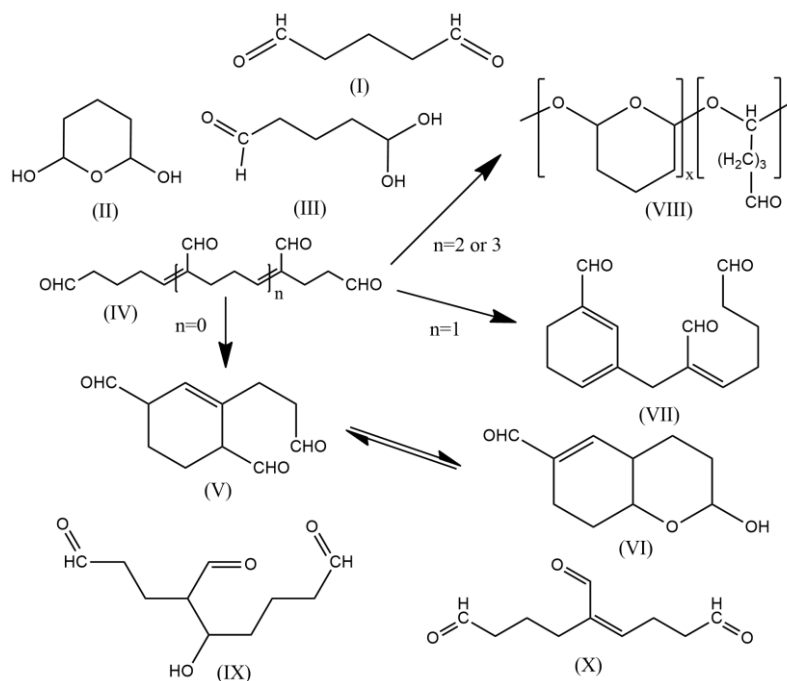
Datele din Figura 5.1 permit calcularea unui parametru IC_{50} (concentrație la care antioxidantul atinge 50% RPD), care sunt astfel enumerate în Tabelul 5.1. Ordinea și magnitudinea acestor valori este în esență similară pentru cei cinci antioxidanți, indiferent de timpul de reacție (120 vs. 180 min). Astfel, cea mai mică IC_{50} este indicată de ascorbat (~1 μM), urmat de catechin și rutin cu valori în esență identice unele cu altele și doar puțin mai mari decât ascorbatul, și urmat de ferulat cu o creștere de 3 ori, cu galat care indică cea mai mare valoare (de două ori mai mare decât ferulatul).

S-a conceput și descrie/demonstrate așadar o metodă de analiză cantitativă a reactivității antioxidante, bazată pe inhibarea autooxidării lipozomilor induși de mioglobină (ILA-Mb). Concentrațiile scăzute de antioxidanți, necesare pentru acest test, precum și prezența lipidelor, îl fac mai potrivit pentru antioxidanții mai puțin solubili în apă și, de asemenea, permite să se opereze la intervale de concentrație mai relevante din punct de vedere biologic ale substanțelor care urmează să fie testate.

6. Despre stabilitatea glutaralhidei în compozițiile de biocide

Dintre multiplele utilizări ale glutaralhidei (industriale, agricole, medicale), aplicabilitatea sa ca biocid în mediul sanitar este printre cele mai importante. Determinarea concentrației de glutaralhidă (GA) este esențială în contexte precum verificarea conformității biocidelor¹²⁸ utilizate în spitale sau analize de toxicitate asupra naturii¹²⁹ (GA este o substanță volatilă, iar vaporii pot irita pielea, ochii, nasul și plămâni).¹³⁰ Cu toate acestea, chiar și în soluțiile "pure", GA (I în schema 6.1) suferă o gamă largă de reacții - inclusiv într-o primă etapă ciclizarea (II), formarea hidratului (III), dimerizarea prin condensare aldolică (IX) și crotonică (X). Reacțiile ulterioare apar, de asemenea, așa cum s-a descris anterior. Schema 6.1 ilustrează structurile chimice ale produșilor posibili prezenți în soluțiile de GA.¹³⁷ Cele două grupări aldehydice ale GA permit ca acesta să fie utilizată ca reactiv de reticulare în special care vizează grupările amino ale proteinelor, producând atât specii polimerice, cât și specii nepolimerice. La concentrații mari, această reticulare duce la efectele biocide.¹³⁸ Investigații publice recente privind conformitatea compoziției chimice a biocidelor utilizate în prezent în

spitalele românești^{139,140} au constatat că GA (ca ingredient cheie) este de până la 10 ori diluată în raport cu concentrația nominală listată pentru produsele respective.



Scheme 6.1. Structurile chimice ale produșilor posibili prezenți în soluțiile de GA.

Raportată aici este o explorare a datelor experimentale și teoretice care pot permite analize mai precise a concentrației de GA în biocide, precum și, în general, în soluții care conțin GA.

Glutaraldehida, în general, își exercită activitatea de biocid prin reticularea grupărilor amino din proteine prin formarea grupărilor imine. Titrarea cu amine a fost într-adevăr propusă anterior ca instrument pentru cuantificarea aldehydelor în soluție, urmărind absorbanta distinctă a grupării iminice nou formate.¹⁴⁹ Într-adevăr, produsul de reacție imină rezultat din glicină și GA poate fi urmărit la 270 nm, fără interferențe din partea maximelor de absorbție mult mai slabe ale GA la 235 nm și 280 nm.¹⁵⁰ Figura 6.1 prezintă astfel de date; după numai două săptămâni de incubare la 40°C, concentrația grupurilor aldehydice titrabile cu glicină (GTAP) apare redusă la jumătate. Având în vedere că o simplă condensare aldolică reduce numărul de grupuri titrabile cu o treime, atunci Figura 6.1 sugerează că deja după două săptămâni la 40°C toate GA a condensat.

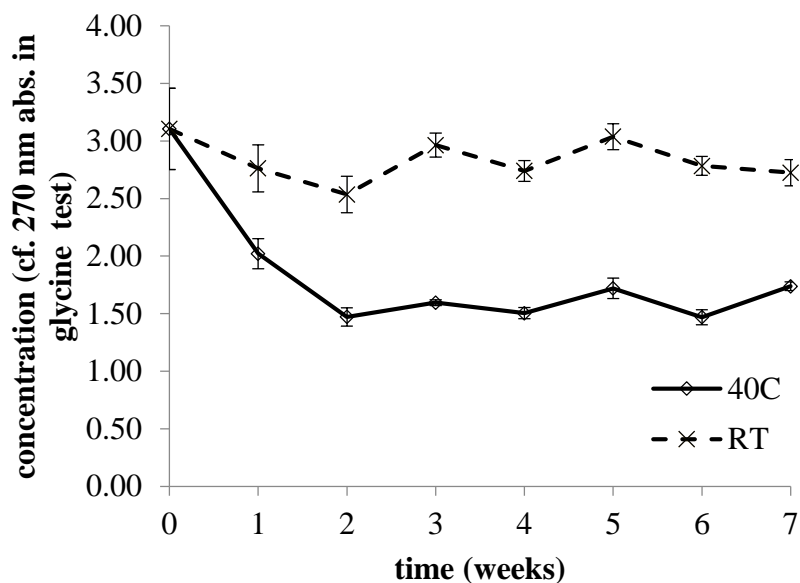


Figura 6.1. Evoluția timp de 8 săptămâni a concentrației de GA la 40°C și la temperatura camerei, măsurată prin titrarea cu glicină.

Glutaraldehida este utilizată pe scară largă pentru policondensarea hemoglobinei (Hb) și a altor proteine.^{115,143,151} Figura 6.2 prezintă astfel de date, în care eficiența condensării este estimată cu ajutorul SDS-PAGE, Tabelul 6.1 indicând modificările proporțiilor relative ale fracțiunilor de masă moleculară diferită.

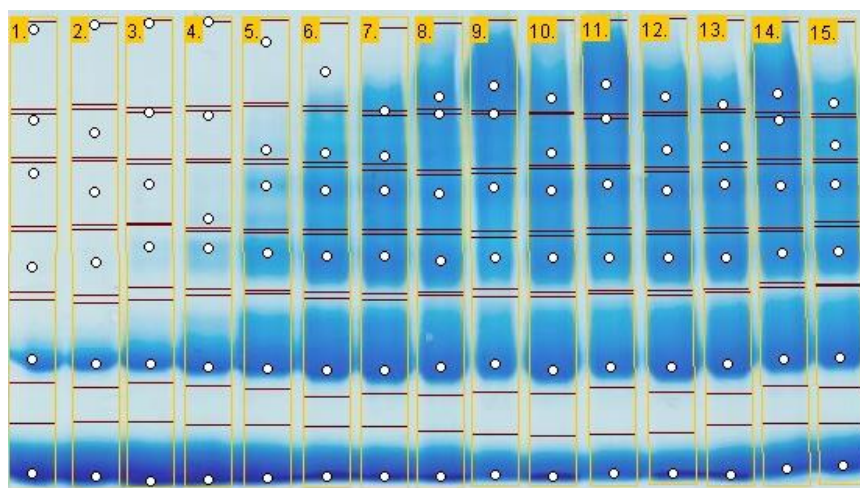


Figura 6.2. 12% SDS-PAGE pentru 1.5 mM hemoglobină polymerizată cu concentrații variabile de GA: 1, 2: 0 mM, 3: 0.5 mM, 4: 1 mM, 5: 3 mM, 6: 5 mM, 7: 7 mM, 8: 3 mM, RT, săpt. 8, 9: 5 mM, RT, săpt. 8, 10: 3 mM, 40°C, săpt. 8, 11: 5 mM, 40°C, săpt. 8, 12: 3 mM, 1,2% izopropanol, 13: 3 mM, izopropanol, 60°C, 5h, 14: 5 mM, izopropanol, 60°C, 5h, 15: 3 mM izopropanol, 40°C, săpt. 8.

Tabel 6.1. Intensitățile relative ale benzilor hemoglobinei polimerizată cu GA.

Probă / ~MW (kDA)	250	130	100	70	55	35
0 mM GA	0	0	0	0.01	0.49	1
0.5 mM GA	0.01	0	0.01	0.06	0.61	1
1 mM GA	0	0	0.03	0.18	0.81	1
3 mM GA	0	0.05	0.34	0.49	1	0.82
5 mM GA	0.08	0.43	0.65	0.56	1	0.67
7 mM GA	0.28	0.51	0.68	0.58	1	0.67
3 mM GA, RT, săpt. 8	0.65	0.64	0.58	0.57	1	0.77
5 mM GA, RT, săpt. 8	1	0.6	0.52	0.36	0.75	0.52

Aceste date confirmă faptul că în timp GA a fost consumată treptat din soluție. Cu toate acestea, ele sugerează, de asemenea, că unii dintre derivații GA formați în timpul depozitării (dimeri, oligomeri etc. cf. Schema 6.1) pot fi mai eficienți în reticulare decât monomerul. Acest lucru indică apoi o limită cu privire la gradul în care un test SDS-PAGE poate fi utilizat pentru evaluarea concentrației unor soluții de GA.

Titarea cu glicină, urmată la 270 nm, arată că proba expusă două săptămâni la 40°C pare să reducă numărul de grupări carbonil titrabile la un grad echivalent cu 100% condensare bi-moleculară a GA în soluție (adică, unde nu există GA intactă/monomerică rămasă în soluție). Experimentele SDS-PAGE dezvăluie un caracter imprevizibil al GA în timpul procesului de polimerizare. Reacțiile de reticulare a proteinelor sugerează că unii dintre produșii de degradare ai GA (dimeri, oligomeri) pot fi mai eficienți decât monomerul în reticularea proteinelor. Dintre metodele explorate aici pentru estimarea integrității soluțiilor GA, cea mai convenabilă pare a fi titrarea cu glicină utilizând absorbanta la 270 nm.

7. Diferența dintre HOMO-LUMO și spectre UV-Vis a candidaților fenotiazinici folosiți ca agenți de marcarea a tumorii

Cancerul ovarian este a doua cea mai frecventă cauză de deces în Europa. Pentru moment, cel mai bun tratament împotriva cancerului ovarian este chirurgia și chimioterapia.¹⁵³ Scopul acestui studiu este de a descoperi o soluție nouă, mai bună și mai eficientă, de a găsi substanța adecvată pentru a fi utilizată în imagistica cu fluorescență în

infraroșu apropiat (NIR) pentru a îmbunătăți acuratețea imagisticii în chirurgia cancerului ovarian. Pentru ca acest lucru să poată fi realizat, s-a căutat cea mai bună substanță potențială de utilizat ca probă fluorescentă specifică pentru receptorul de acid folic alfa pentru vizualizarea în timp real a tumorilor ovariene. Receptorul de acid folic alfa a fost descoperit în 1991 ca marker tumoral pentru cancerul ovarian.¹⁵⁵

Substanța vizată trebuie să aibă o absorbție maximă în câmpul NIR, respective în același timp să nu fie toxic.¹⁵⁶ Un număr de coloranți cationici, cu un sistem cromofor de fenotiazină și diverși substituenți auxocromici atașați, au fost subiectul central al acestui studiu. Pentru a atinge obiectul studiului, au fost utilizate metode avansate de modelare moleculară pentru a calcula spectrul UV-Vis al unor serii cu substituenți simetrici și asimetrici atașați la structura de bază a fenotiazinei.¹⁵⁷

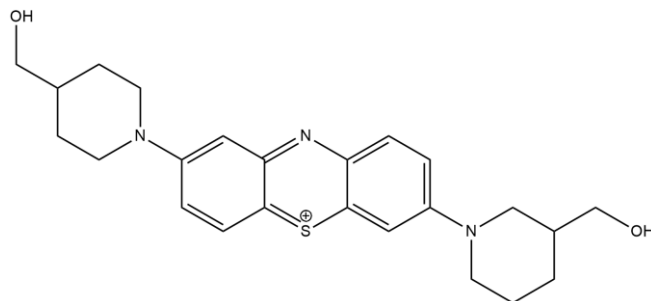
Tabel 7.1. Pozițiile și intensitățile maxime relevante a modelelor examinate.

Substituent	sarcină N central	sarcină S	LWHIM	OSLWHIM	LWM	OSLWM
metil/metil	0.125	-0.531	444	1.240	450	0.008
etil/etil	0.141	-0.555	449	1.365	900	0.0000165
propil/propil	0.142	-0.59	455	1.402	455	1.402
butil/butil			457	1.494	926	7.26E-26
t-butil/t-butil			632	0.786	1302	2.55E-22
fenil/fenil	0.169	-0.527	508	1.380	508	1.380
fenil-OH/fenil-OH			583	0.822	583	0.822
fenil-Oethyl/fenilOetil			629	1.009	629	1.009
fenil-N(CH ₃) ₂ /fenil-N(CH ₃) ₂			809	1.149	809	1.149
fenil-NH ₂ /fenil-NH ₂			706	0.997	706	0.997

naftil/naftil			704	0.581	704	0.581
naftil- N(CH ₃) ₂ /naftil- N(CH ₃) ₂			913	0.987	1399	0.003

Scopul acestor calcule a fost identificarea sistemelor cu maxime intense în domeniul NIR. Așa cum se arată în Tabelul 7.1, din seria sistemelor alifactice, cel mai apropiat de obiectiv este sistemul t-butil simetric, la 632 nm – care este încă insuficient. Unele sisteme alifactice au, de asemenea, maxim în regiunea NIR, dar cu o intensitate foarte mică. De asemenea, o delocalizare mai bună în sistemele aromatice (naftil vs fenil, sau substituenți atașați pe fenil/naftil) aduce un avantaj. Cea mai bună moleculă pare a fi cea cu substituenții diamino naftil atașați pe fenotiazină.

De asemenea, s-a examinat cromoforul fenotiazinic cu substituenți piperidinic și piperidinic în poziții simetrice și asimetrice. Cel mai bun substituent are lungimea de undă maximă de 931 nm și este N-(3-hidroxitil) piperidinic în poziția asimetrică 3,8.



LWHIM (nm)	OSLWHIM	LWM (nm)	OSLWM
465	0,267	931	0,076

Figura. 7.1. Cation disubstituit 3,8-N-(3-hidroxitil) piperidinic cu pozițiile și intensitățile maxime relevante.

Geometria stării fundamentale a N-(3-hidroxitil) piperidinicului și (3,7-bis-N-(3-hidroxitil) piperidinic) fenotiazinicului a fost optimizată în vid și în solvenți folosind metoda

DFT și valorile obținute au fost comparate cu cele experimentale. Datele sunt prezentate numai pentru N-(3-hidroxiimetil) pirolidinil fenazationiu.

Pentru datele referitoare la N-(3-hidroxiimetil) pirolidinil fenazationiu, absorbția maximă calculată în solvent este pentru dimetil sulfoxid, la 540 nm iar puterea oscilatorului de 1,16 (corespunzând la $\sim 46000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) și 675 nm determinată experimental. De asemenea, solventul cu aceeași valoare de absorbție maximă determinată experimental este apa.

Tabel 7.2. Datele experimentale și computaționale asupra absorbanței N-(3-hidroxiimetil) pirolidinil fenotiazionului în diferiți solvenți (puterea oscilatorului de 1.13 corespunde cu $\sim 45810 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ coeficient de extincție).

Solvent	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{exp}}$	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{DFT}}$	f	Contribuția majoră (%)
Vid		506	0.97	H → L 76%
Acetonă	664	536	1.14	H → L 87%
Acetonitril	661	536	1.13	H → L 87%
Diclorometan	664	539	1.16	H → L 70%
Dimetil sulfoxid	675	540	1.16	H → L 88%
Tetrahidrofuran	-	538	1.15	H → L 88%
Etanol	668	536	1.14	H → L 87%
Apă	675	535	1.13	H → L 88%

$\lambda_{\text{abs}}^{\text{exp}}$ – valoare maximă de absorbție experimentală

$\lambda_{\text{abs}}^{\text{DFT}}$ - valoare maximă de absorbție calculată

f - puterea oscilatorului

8. Concluzii generale

S-au folosit diferite metode de investigație – în special bazate pe UV-vis, fluorescență și chimie computațională, dar și implicând alte metode precum RMN, GC-MS, Raman - pentru a evalua multiplele fațete ale reactivității redox relevante din punct de vedere biomedical în molecule mici.

Proprietățile redox ale extractelor din plante cu conținut ridicat de antioxidanți au fost evaluate utilizând teste standard de capacitate antioxidantă, dar și metode dezvoltate și descrise în cadrul tezei, care utilizează hemoglobina sau mioglobina ca reactiv mai relevant din punct de vedere biologic. O nouă versiune a testului de activitate antioxidantă a fost dezvoltată folosind ca reactiv amestecul de lipozom-mioglobină pentru o mai bună înțelegere a interacțiunii antioxidant-proteine, dar și pentru a avea relevanță biologică în comparație cu testele antioxidante clasice.

Reactivitatea redox a soluțiilor de glutaraldehidă a fost examinată pentru a stabili concentrația exactă și legătura dintre concentrația și activitatea sa biocidă prin multitudinea metodelor spectroscopice utilizate.

S-au utilizat metode de calcul cunoscute pentru investigarea distanței HOMO-LUMO și prezicerea spectrelor UV-Vis pentru o serie de substanțe cu potențiale aplicații biomedicale.

9. Bibliografia tezei

1. Roberts, C. K. & Sindhu, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* **84**, 705–712 (2009).
2. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40 (2006).
3. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *CURBIO* **24**, R453–R462 (2014).
4. Bouayed, J. & Bohn, T. *Nutrition, Well-Being and Health.* (2012).
5. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
6. Ohashi, T. *et al.* Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: Formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS*

- Lett.* **511**, 21–27 (2002).
7. Blázquez-Castro, A. *et al.* *Light-initiated oxidative stress*. *Oxidative Stress* **2**, (Elsevier Inc., 2020).
 8. Gangwar, R. S., Bevan, G. H., Palanivel, R., Das, L. & Rajagopalan, S. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biol.* **34**, 101545 (2020).
 9. Carocho, M. & Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15–25 (2013).
 10. Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sport. Med* **36**, 327–358 (2006).
 11. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152–159 (1997).
 12. Amarowicz, R. & Pegg, R. B. *Natural antioxidants of plant origin*. *Advances in Food and Nutrition Research* **90**, (Elsevier Inc., 2019).
 13. Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513–523 (2011).
 14. Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 503–515 (2010).
 15. Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A. & Andrade, P. B. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules* **14**, 2202–2211 (2009).
 16. Arrigoni, O. & De Tullio, M. C. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1569**, 1–9 (2002).
 17. Silencio Barrita, J. L. & Santiago Snchez, M. del S. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases. in *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* (2013). doi:10.5772/52181
 18. Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S. & Ekpo, O. E. Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, (2018).
 19. Bernatoniene, J. & Kopustinskiene, D. M. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules* **23**, 1–11 (2018).
 20. Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods* **2**, 41–60 (2009).
 21. Mot, A. C. C. *et al.* Antioxidant activity evaluation by physiologically relevant assays based on haemoglobin peroxidase activity and cytochrome c-induced oxidation of liposomes. *Nat. Prod. Res.* **30**, 1315–1319 (2016).
 22. Prior, R. L. & Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 39–47 (1999).
 23. Bischin, C. *et al.* Ascorbate peroxidase activity of cytochrome c. *Free Radic. Res.* **45**, 439–444 (2011).
 24. Amarowicz, R. & Pegg, R. B. Protection of natural antioxidants against low-density lipoprotein oxidation. in *Advances in Food and Nutrition Research* 1–41 (Elsevier Inc., 2020). doi:10.1016/bs.afnr.2020.04.002
 25. Moț, A. C., Bischin, C., Damian, G. & Silaghi-Dumitrescu, R. Antioxidant Activity Evaluation

- Involving Hemoglobin- Related Free Radical Reactivity. in *Advanced Protocols in Oxidative Stress III* **1208**, 293–326 (2014).
26. Mateus, P. G., Wolf, V. G., Borges, M. S. & Ximenes, V. F. Quercetin: Prooxidant Effect and Apoptosis in Cancer. in *Studies in Natural Products Chemistry* **58**, 265–288 (Elsevier B.V., 2018).
 27. Rahal, A. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res. Int.* 1–19 (2014). doi:10.1155/2014/761264
 28. Bischin, C. *et al.* Free-radical reactions: the fine line between the anti- and pro-oxidant reactivities. *Oxid. Commun.* **41**, 130–140 (2018).
 29. Taciuc, V., Bischin, C. & Silaghi-Dumitrescu, R. A novel mechanism for platinum-based drugs: cisplatin and related compounds as pro-oxidants in blood. *Met. Elem. Environ. Med. Biol. Tome IX* 130–134 (2009).
 30. Lehene, M. *et al.* Excess ascorbate is a chemical stress agent against proteins and cells. *Submitt. Manuscr.* (2020).
 31. Khan, H. Y., Hadi, S. M., Mohammad, R. M. & Azmi, A. S. Prooxidant anticancer activity of plant-derived polyphenolic compounds: An underappreciated phenomenon. in *Functional Foods in Cancer Prevention and Therapy* 221–236 (Elsevier Inc., 2020). doi:10.1016/b978-0-12-816151-7.00012-0
 32. Shin, J., Song, M. H., Oh, J. W., Keum, Y. S. & Saini, R. K. Pro-oxidant actions of carotenoids in triggering apoptosis of cancer cells: A review of emerging evidence. *Antioxidants* **9**, 1–17 (2020).
 33. Kadakeri, S. *et al.* Protein synthesis and characterization. in *Artificial Protein and Peptide Nanofibers* 121–161 (Elsevier Ltd., 2020). doi:10.1016/b978-0-08-102850-6.00006-1
 34. Yu, Y. & Fukagawa, N. K. Chapter 2 - Protein and amino acids. in *Present Knowledge in Nutrition* 15–35 (Elsevier Inc., 2020). doi:10.1016/B978-0-323-66162-1.00002-0
 35. Marcus, S. R. & Dharmalingam, M. Iron, Oxidative Stress and Diabetes. in *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* 51–64 (2013). doi:10.1016/B978-0-12-405885-9.00006-1
 36. Collins, D. P. & Dawson, J. H. Recent History of Heme-Containing Proteins: Advances in Structure, Functions, and Reaction Intermediate Determination. in *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Applications* **3**, 65–102 (Elsevier Ltd., 2013).
 37. Gebicka, L. Redox reactions of heme proteins with flavonoids. *J. Inorg. Biochem.* **208**, 1–8 (2020).
 38. Riess, J. G. & Riess, J. G. Oxygen carriers ('blood substitutes') - Raison d'être, chemistry, and some physiology. *Chem. Rev.* **101**, 2797–2919 (2001).
 39. Silaghi-Dumitrescu, R. *An introduction to bioinorganic chemistry.* (Presa Universitara Clujeana, 2015).
 40. Tanaka, K. *Theoretical Chemistry for Experimental Chemists. Theoretical Chemistry for Experimental Chemists* (2020). doi:10.1007/978-981-15-7195-4
 41. Chua, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* **150**, 805–817 (2013).
 42. Ciocârlan, V. *Flora ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta.* (2009).
 43. Ghorbani, A. & Esmailizadeh, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.* **7**, 433–440 (2017).

44. Alizadeh, Ardalan; Shaabani, M. Essential oil composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in *Salvia officinalis* L. cultivated in Iran. *Adv. Environ. Biol.* **6**, 221–226 (2012).
45. Asadi, S. *et al.* In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: A comparative study. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1341–1349 (2010).
46. Tosun, M. *et al.* Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biol. Res.* **42**, 175–181 (2009).
47. Aghaei Jeshvaghani, Z., Rahimmalek, M., Talebi, M. & Goli, S. A. H. Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different *Salvia* species using three model systems. *Ind. Crops Prod.* **77**, 409–414 (2015).
48. Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A. & Sokmen, A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* **95**, 200–204 (2006).
49. Yumrutas, O., Sokmen, A. & Ozturk, N. Determination of in vitro antioxidant activities and phenolic compounds of different extracts of *salvia verticillata* ssp. *verticillata* and spp. *amasiaca* from Turkey's flora. *J. Appl. Pharm. Sci.* **1**, 43–46 (2011).
50. Armstrong, D. Advanced protocols in oxidative stress III. in *Advanced Protocols in Oxidative Stress III* **1208**, 1–477 (2014).
51. Benedec, D. *et al.* Assessment of rosmarinic acid content in six Lamiaceae species extracts and their antioxidant and antimicrobial potential. *Pak. J. Pharm. Sci.* **28**, 2297–2303 (2015).
52. Moğ, A. C. *et al.* An assay for pro-oxidant reactivity based on phenoxyl radicals generated by laccase. *Food Chem.* **143**, 214–222 (2014).
53. Cameron, E., Pauling, L. & Leibovitz, B. Ascorbic Acid and Cancer: A Review. *Cancer Res.* **39**, 663–681 (1979).
54. Arabi, Y. M., Fowler, R. & Hayden, F. G. Critical care management of adults with community-acquired severe respiratory viral infection. *Intensive Care Med.* **46**, 315–328 (2020).
55. Cheng, R. Z. Can early and high intravenous dose of vitamin C prevent and treat coronavirus disease 2019 (COVID-19)? *Med. Drug Discov.* (2020). doi:10.1016/j.medidd.2020.100028
56. Wu, R. *et al.* An Update on Current Therapeutic Drugs Treating COVID-19. *Curr. Pharmacol. Reports* 1–15 (2020). doi:10.1007/s40495-020-00216-7
57. Dunne, J. *et al.* Ascorbate removes key precursors to oxidative damage by cell-free haemoglobin in vitro and in vivo. *Biochem. J.* **399**, 513–524 (2006).
58. Cooper, C. E. E., Silaghi-Dumitrescu, R., Rukengwa, M., Alayash, A. I. I. & Buehler, P. W. W. Peroxidase activity of hemoglobin towards ascorbate and urate: A synergistic protective strategy against toxicity of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOC). *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1415–1420 (2008).
59. May, J. M., Qu, Z. C. & Cobb, C. E. Recycling of the Ascorbate Free Radical by Human Erythrocyte Membranes. *Free Rad. Biol. Med.* **31**, 117–124 (2001).
60. Carlsen, C. U., Kröger-Ohlsen, M. V., Bellio, R. & Skibsted, L. H. Protein binding in deactivation of ferrylmyoglobin by chlorogenate and ascorbate. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 204–212 (2000).
61. Bielski, B. H. J., Allen, A. O. & Schwartz, H. A. Mechanism of Disproportionation of Ascorbate Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3516–3518 (1981).
62. VanDuijn, M. M., Tijssen, K., VanSteveninck, J., Van den Broek, P. J. A. & Van der Zee, J.

- Erythrocytes Reduce Extracellular Ascorbate Free Radicals using Intracellular Ascorbate as an Electron Donor. *J. Biol. Chem.* **275**, 27720–27725 (2000).
63. May, J. M., Qu, Z. C. & Cobb, C. E. Extracellular Reduction of the Ascorbate Free Radical by Human Erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 118–123 (2000).
 64. Sullivan, S. G. & Stern, A. Effects of Ascorbate on Methemoglobin Reduction in Intact Red-Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **213**, 590–594 (1982).
 65. Frei, B., England, L. & Ames, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Proceedings Natl. Acad. Sci. United States Am.* **86**, 6377–6381 (1989).
 66. Mehlhorn, R. J. Ascorbate and Dehydroascorbate Acid Mediated Reduction of Free Radicals in the Human Erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **266**, 2724–2731 (1991).
 67. Puscas, C. *et al.* The high affinity of small-molecule antioxidants for hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* **124**, 260–274 (2018).
 68. Mot, A. C., Bischin, C., Damian, G. & Silaghi-Dumitrescu, R. Antioxidant activity evaluation involving hemoglobin-related free radical reactivity. *Methods Mol. Biol.* **1208**, 247–255 (2015).
 69. Irwin, J. A., Ostdal, H., Davies, M. J., Østdal, H. & Davies, M. J. Myoglobin-induced oxidative damage: Evidence for radical transfer from oxidized myoglobin to other proteins and antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 94–104 (1999).
 70. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Proceedings Natl. Acad. Sci. United States Am.* **78**, 6858–6862 (1981).
 71. Giulivi, C. & Cadenas, E. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. Antioxidant and prooxidant aspects. *FEBS Lett.* **332**, 287–290 (1993).
 72. Vollaard, N. B. *et al.* A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1216–1228 (2005).
 73. Gibson, Q. H. The Reduction of Methaemoglobin by Ascorbic Acid. *Biochem. J.* **37**, 615–618 (1943).
 74. Cooper, C. E., Green, E. S. R., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J. & Wrigglesworth, J. M. A hydrogen-donating monohydroxamate scavenges ferryl myoglobin radicals. *Free Radic. Res.* **20**, 219–227 (1994).
 75. Farcas, A. D. *et al.* Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/prooxidant effect of galium verum extract during acute restraint and dark stress in female rats. *PLoS One* **13**, 1–18 (2018).
 76. Cox, B. M., Leslie, F. M. & Dunlap, C. E. The use of ascorbate as a probe of opioid receptor structure: Evidence for two independent mechanisms of receptor destruction by ascorbate. *J. Recept. Signal Transduct.* **1**, 329–354 (1980).
 77. Miura, K., Yazama, F. & Tai, A. Oxidative stress-mediated antitumor activity of erythorbic acid in high doses. *Biochem. Biophys. Reports* **3**, 117–122 (2015).
 78. Makino, Y., Sakagami, H. & Takeda, M. Induction of cell death by ascorbic acid derivatives in human renal carcinoma and glioblastoma cell lines. *Anticancer Res.* **19**, 3125–3132 (1999).
 79. Iheanacho, E. N., Hunt, N. H. & Stocker, R. Vitamin C redox reactions in blood of normal and malaria-infected mice studied with isoascorbate as a nonisotopic marker. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 543–552 (1995).

80. Grzesik, M. *et al.* Dietary antioxidants as a source of hydrogen peroxide. *Food Chem.* **278**, 692–699 (2019).
81. Song, J. H. *et al.* Rapid uptake of oxidized ascorbate induces loss of cellular glutathione and oxidative stress in liver slices. *Exp. Mol. Med.* **35**, 67–75 (2003).
82. Adjimani, J. P. & Asare, P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicol. Reports* **2**, 721–728 (2015).
83. Murata, A., Kawasaki, M., Motomatsu, H. & Katoil, F. Virus-Inactivating Effect of D-Isoascorbic Acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **32**, 559–567 (1986).
84. Ensing, B., Buda, F., Blochl, P. & Baerends, E. J. Chemical Involvement of Solvent Water Molecules in Elementary Steps of the Fenton Oxidation Reaction. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 2893–2895 (2001).
85. Liu, W. & Li, H. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism. *Chemarxiv* (2020).
86. Qin, C. *et al.* Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 762–768 (2020).
87. Choy, E. & Rose-John, S. Interleukin-6 as a multifunctional regulator: Inflammation, immune response, and fibrosis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2**, S1–S5 (2017).
88. Dolhnikoff, M. *et al.* Pathological evidence of pulmonary thrombotic phenomena in severe COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 1517–1519 (2020).
89. Klok, F. A. *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb. Res.* **191**, 145–147 (2020).
90. Serafini, M. & Del Rio, D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Report* **9**, 145–52 (2004).
91. Huang, D., Boxin, O. U. & Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856 (2005).
92. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* **76**, 270–276 (1998).
93. Reeder, B. J., Svistunenko, D. A., Sharpe, M. A. & Wilson, M. T. Characteristics and mechanism of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin. *Biochemistry* **41**, 367–375 (2002).
94. Reeder, B. J. & Wilson, M. T. The effects of pH on the mechanism of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide consumption by myoglobin: a role for the protonated ferryl species. *Free. Radic. Biol. Med.* **30**, 1311–1318 (2001).
95. Silaghi-Dumitrescu, R., Reeder, B. J. J., Nicholls, P., Cooper, C. E. E. & Wilson, M. T. T. Ferryl haem protonation gates peroxidatic reactivity in globins. *Biochem. J.* **403**, 391–395 (2007).
96. Reeder, B. J. & Wilson, M. T. Mechanism of reaction of myoglobin with the lipid hydroperoxide hydroperoxyoctadecadienoic acid. *Biochem. J.* **330**, 1317–1323 (1998).
97. Cooper, C. E. *et al.* Haptoglobin binding stabilizes hemoglobin ferryl iron and the globin radical on tyrosine beta145. *Antioxid. Redox Signal* **18**, 2264–2273 (2013).
98. Lehene, M. *et al.* Excess Ascorbate is a Chemical Stress Agent against Proteins and Cells. *Pharm. 2020, Vol. 13, Page 107* **13**, 107 (2020).
99. Mot, A. C., Puscas, C., Dorneanu, S. A. & Silaghi-Dumitrescu, R. EPR detection of sulfanyl

- radical during sulfhemoglobin formation – Influence of catalase. *Free Radic. Biol. Med.* **137**, 110–115 (2019).
100. Bischin, C. *et al.* Evaluation of the biochemical effects of silyl-phosphaalkenes on oxidative and nitrosative stress pathways involving metallocenters. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **190**, 292–299 (2015).
 101. Liu, Z. *et al.* Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Proceedings Natl. Acad. Sci. United States Am.* **103**, 8965–8970 (2006).
 102. Barr, D. P. & Mason, R. P. Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides. An ESR spin trapping investigation. *J. Biol. Chem.* **270**, 12709–12716 (1995).
 103. Lawrence, A., Jones, C. M., Wardman, P. & Burkitt, M. J. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. Implications for oxidative stress during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 29410–29419 (2003).
 104. Radi, R., Turrens, J. F. & Freeman, B. A. Cytochrome c-Catalyzed Membrane Lipid Peroxidation by Hydrogen Peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 118–125 (1991).
 105. Hathazi, D. *et al.* Oxidative protection of hemoglobin and hemerythrin by cross-linking with a nonheme iron peroxidase: potentially improved oxygen carriers for use in blood substitutes. *Biomacromolecules* **15**, 1920–1927 (2014).
 106. Mot, A. C., Damian, G., Sarbu, C. & Silaghi-Dumitrescu, R. Redox reactivity in propolis: Direct detection of free radicals in basic medium and interaction with hemoglobin. *Redox Rep.* **14**, 267–274 (2009).
 107. Hanganu, D. *et al.* Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities from two trifolium species. *Farmacia* **65**, 443–449 (2017).
 108. Benedec, D. *et al.* Contrast between water- and ethanol-based antioxidant assays: Aspen (*Populus tremula*) and black poplar (*Populus nigra*) extracts as a case study. *J. Food Qual.* **37**, 259–267 (2014).
 109. Dezsi, S. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic profile of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Corymbia ficifolia* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson leaves. *Molecules* **20**, 4720–4734 (2015).
 110. Benedec, D. *et al.* *Achillea schurii* flowers: Chemical, antioxidant, and antimicrobial investigations. *Molecules* **21**, 1050 (2016).
 111. Tamokou Jde, D. *et al.* Anticancer and antimicrobial activities of some antioxidant-rich cameroonian medicinal plants. *PLoS One* **8**, e55880 (2013).
 112. Benedec, D. *et al.* Comparative HPLC-MS analysis of phenolics from *achillea distans* and *achillea millefolium* and their bioactivity. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.* **60**, 257–266 (2015).
 113. Bischin, C., Taciuc, V. & Silaghi-Dumitrescu, R. Cisplatin effect on hemoglobin and myoglobin autooxidation. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.* **55**, 313–318 (2010).
 114. Hathazi, D. *et al.* The Reaction of Oxy Hemoglobin with Nitrite: Mechanism, Antioxidant-Modulated Effect, and Implications for Blood Substitute Evaluation. *Molecules* **23**, E350 (2018).
 115. Holt, S. *et al.* Increased lipid peroxidation in patients with rhabdomyolysis. *Lancet* **353**, 1241 (1999).
 116. Rogers, M. S. *et al.* Prooxidant Effects of Cross-Linked Hemoglobins Explored Using Liposome

- and Cytochrome-C-Oxidase Vesicle Model Membranes. *Biochem. J.* **310**, 827–833 (1995).
117. Moore, K. P. *et al.* A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalinization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J. Biol. Chem.* **273**, 31731–31737 (1998).
 118. Reeder, B. J. *et al.* Toxicity of myoglobin and haemoglobin: oxidative stress in patients with rhabdomyolysis and subarachnoid haemorrhage. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 745–748 (2002).
 119. Plattner, S., Erb, R. & Chervet, J. Studying the reducing potencies of antioxidants with the electrochemistry inherently present in electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 213–224 (2014).
 120. Ratanasopa, K., Strader, M. B., Alayash, A. I. & Bulow, L. Dissection of the radical reactions linked to fetal hemoglobin reveals enhanced pseudoperoxidase activity. *Front. Physiol.* **6**, 39 (2015).
 121. Svistunenko, D. A., Reeder, B. J., Wilson, M. T. & Cooper, C. E. Radical formation and migration in myoglobins. *Prog. React. Kinet. Mech.* **28**, 105–118 (2003).
 122. Reeder, B. J. *et al.* Tyrosine residues as redox cofactors in human hemoglobin: implications for engineering nontoxic blood substitutes. *J. Biol. Chem.* **283**, 30780–30787 (2008).
 123. Ballantyne, B. & Jordan, S. L. Toxicological, medical and industrial hygiene aspects of glutaraldehyde with particular reference to its biocidal use in cold sterilization procedures. *J. Appl. Toxicol.* **21**, 131–151 (2001).
 124. Power, E. G. M. & Russell, A. D. Assessment of ‘Cold Sterilog Glutaraldehyde Monitor’. *J. Hosp. Infect.* **11**, 376–380 (1988).
 125. Gannon, P. F., Bright, P., Campbell, M., O’Hickey, S. P. & Burge, P. S. Occupational asthma due to glutaraldehyde and formaldehyde in endoscopy and x ray departments. *Thorax* **50**, 156–159 (2008).
 126. Jolibois, B., Guerbet, M. & Vassal, S. Glutaraldehyde in hospital wastewater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**, 137–144 (2002).
 127. Barnes, A. R. Determination of glutaraldehyde in solution as its bis-2,4-dinitrophenylhydrazone derivative; determination of geometrical isomer ratios. *Pharm. Acta Helv.* **68**, 113–119 (1993).
 128. Pieraccini, G. *et al.* Gas chromatographic determination of glutaraldehyde in the pentafluorobenzyl) hydroxylamine on a solid-phase microextraction fibre. *J. Chromatogr. A* **955**, 117–124 (2002).
 129. Kang, H. I. & Shin, H. S. Determination of glutaraldehyde in water samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,2,2-trifluoroethylhydrazine. *J. Chromatogr. A* **1448**, 115–120 (2016).
 130. Kang, H. I. & Shin, H. S. Sensitive determination of glutaraldehyde in environmental water by derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Methods* **8**, 3216–3223 (2016).
 131. Pranaityte, B., Padarauskas, A., Dikčius, A. & Ragauskas, R. Rapid capillary electrophoretic determination of glutaraldehyde in photographic developers using a cationic polymer coating. *Anal. Chim. Acta* **507**, 185–190 (2004).
 132. Shaw, J. & Frigerio, A. A Simple Method for Determination of Glutaraldehyde. *J. Histochem. Citochemistry* **17**, 176–181 (1969).
 133. Migneault Isabelle, Dartiguenave Catherine, Bertrand Michel J. & Waldron Karen C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* **37**, 790–802 (2004).

134. Scurtu, F., Zolog, O., Iacob, B. & Silaghi-Dumitrescu, R. Hemoglobin-albumin cross-linking with disuccinimidyl suberate (DSS) and/or glutaraldehyde for blood substitutes. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **42**, 13–17 (2014).
135. Hospital Scandal Brings Down Romanian Pharma Co. Available at: <https://www.forbes.com/sites/stephenmcgrath/2016/05/13/hospital-scandal-brings-down-romanian-pharma-co/#7134da155a23>. (Accessed: 21st May 2019)
136. Romanian prosecutors make first arrest in the diluted disinfectants scandal | Romania Insider. Available at: <https://www.romania-insider.com/first-arrest-diluted-disinfectants-scandal>. (Accessed: 21st May 2019)
137. Bowes, J. H. & Cater, C. W. The reaction of glutaraldehyde with proteins and other biological materials. *J. R. Microsc. Soc.* **85**, 193–200 (1966).
138. Everette, J. D. *et al.* Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8139–8144 (2010).
139. Arkosi, M., Scurtu, F., Vulpoi, A., Silaghi-Dumitrescu, R. & Kurtz Jr., D. M. Copolymerization of Recombinant *P. gouldii* Hemerythrin with Human Serum Albumin for Use in Blood Substitutes. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* **45**, 218–223 (2017).
140. Silaghi-Dumitrescu, R., Tomoiaga, N. & Jurco, E. Variability in biochemical composition of milk among three representative breeds of dairy cows from Romania. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.* **63**, 55–62 (2018).
141. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 09. *Gaussian 09 r. A1; Gaussian, Inc., Wallingford CT* (2009).
142. Attia, A. A. A., Cioloboc, D., Lupan, A. & Silaghi-Dumitrescu, R. Multiconfigurational and DFT analyses of the electromeric formulation and UV–vis absorption spectra of the superoxide adduct of ferrous superoxide reductase. *J. Inorg. Biochem.* **165**, 49–53 (2016).
143. Guthrie, J. P. Equilibrium constants for a series of simple aldol condensations, and linear free energy relations with other carbonyl addition reactions. *Can. J. Chem.* **56**, 962–973 (1978).
144. Kurz, J. L. The Hydration of Acetaldehyde. I. Equilibrium Thermodynamic Parameters. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3524–3528 (1967).
145. Okuda, K., Urabe, I., Yamada, Y. & Okada, H. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 100–105 (1991).
146. Korn, A. H., Fearheller, S. H. & Filachoine, E. M. Glutaraldehyde: Nature of the reagent. *J. Mol. Biol.* **65**, 525–529 (1972).
147. Silva, C. J. S. M., Sousa, F., Gübitz, G. & Cavaco-Paulo, A. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. *Food Technol. Biotechnol.* **42**, 51–56 (2004).
148. Alayash, A. I., Summers, A. G., Wood, F. & Jia, Y. Effects of glutaraldehyde polymerization on oxygen transport and redox properties of bovine hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* **391**, 225–234 (2001).
149. Van Dam, G. M. *et al.* Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: First in-human results. *Nat. Med.* **17**, 1315–1319 (2011).
150. Vahrmeijer, A. L., Hutteman, M., Van Der Vorst, J. R., Van De Velde, C. J. H. & Frangioni, J. V. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 507–518 (2013).
151. Parker, N. *et al.* Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal. Biochem.* **338**, 284–293 (2005).

152. Wainwright, M. & Crossley, K. B. Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons? *J. Chemother.* **14**, 431–443 (2002).
153. Gal, E. *et al.* Novel meso-phenothiazinylporphyrin dyes: Synthesis, optical, electrochemical properties and PDT assay. *Dye. Pigment.* **99**, 144–153 (2013).
154. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 98 (Revision A.1), Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998. (1998).
155. Spartan. Spartan 06. *SPARTAN '06 for Windows*, Wavefunction Inc., 18401 Von Karman Avenue, Suite 370 Irvine, CA 92612 (2006).