



Universitatea Babeş-Bolyai  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Rezumatul tezei de doctorat

Designul, sinteza și proprietățile optice ale unor noi coloranți cationici de tip fenotiazinium

Doctorand

Bianca-Alexandra Stoean (căs. Vasile)

Conducător științific:

Prof. Dr. Habil. Radu-Lucian Silaghi-Dumitrescu

Cluj-Napoca

2024

**Cuvinte cheie:** coloranți de tip fenotiazinium, acid folic, sinteză asistată de ultrasunete, sinteză mecanochimică, proprietăți optice, fluorofor, fotosensibilizator, indicator colorimetric de oxigen.

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

1.	INTRODUCERE.....	4
2.	STUDIUL DE LITERATURĂ.....	9
2.1.	Albastrul de metilen – compusul etalon pentru clasa coloranților de tip fenotiazinium.....	9
2.2.	Metode și strategii de sinteză pentru obținerea coloranților de tip fenotiazinium.....	10
2.3.	Proprietățile optice și aplicațiile albastrului de metilen și ale analogilor săi.....	12
2.4.	Terapia fotodinamică și utilizarea coloranților de tip fenotiazinium ca fotosensibilizatori.....	16
3.	CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	19
3.1.	Sinteza și caracterizarea structurală a noilor coloranți de tip fenotiazinium.....	19
3.1.1.	Sinteza noilor coloranți de tip fenotiazinium.....	19
3.1.2.	Caracterizarea structurală.....	23
3.2.	Impactul unităților auxochrome asupra proprietăților optice și fizice.....	31
3.2.1.	Absorbția UV-viz.....	32
3.2.2.	Emisia de fluorescență.....	33
3.2.3.	Solvatocromismul coloranților de tip fenotiazinium.....	34
3.2.4.	Studiu de agregare.....	34
3.3.	Activitatea biologică a noilor coloranți de tip fenotiazinium.....	36
3.3.1.	Potențiali agenți de contrast și antitumorali: imagistica prin microscopie de fluorescență și evaluarea activității antitumorale în celulele canceroase ovariene umane.....	36
3.3.2.	Noi fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică anticancer: eficacitatea și evaluarea stresului oxidativ în celulele de melanom B16F10.....	44
3.3.3.	Concluzii.....	52
3.4.	Funcționalizarea coloranților de tip fenotiazinium cu acid folic.....	52
3.4.1.	Sinteza și caracterizarea structurală a noilor derivați.....	52
3.4.2.	Proprietățile optice și fizice ale noilor folați.....	54

3.4.3. Noi fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică antimicrobiană: evaluarea citotoxicității în bacterii Gram-pozitive și Gram-negative.....	57
3.4.4. Concluzii.....	63
3.5. Speciile radicalice ale coloranților de tip fenotiazinium și indicatori de oxigen.....	64
3.5.1. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de absorbție UV-viz.....	65
3.5.2. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de rezonanță electronică de spin .....	67
3.5.3. Indicatori colorimetrici de oxigen.....	69
3.5.4. Concluzii.....	71
4. MATERIALE ȘI METODE.....	73
4.1. Sinteza și caracterizarea structurală.....	73
4.1.1. Procedura generală de sinteză pentru analogii de albastru de metilen.....	73
4.1.2. Procedura generală pentru sinteza esterilor acidului folic FAE 2-4.....	76
4.1.3. Difrakția de raze X pe monocristal.....	78
4.2. Proprietăți optice și fizice.....	78
4.2.1. Randamentul cuantic de fluorescență.....	78
4.2.2. Randamentul cuantic de generare a oxigenului singlet.....	79
4.2.3. Determinarea coeficientului de partiție n-octanol/apă.....	79
4.3. Activitatea biologică.....	80
4.3.1. Studii de imagistică prin microscopie de fluorescență.....	80
4.3.2. Activitatea biologică a MBA 2-4 în celule tumorale ovariene umane.....	81
4.3.3. Activitatea biologică a MBA 5-7 ca fotosensibilizatori în celule de melanom B16-F10 .....	86
4.3.4. Activitatea biologică a MBA 2-4 și FAE 2-4 ca fotosensibilizatori în bacterii Gram-pozitive și Gram-negative.....	88
4.4. Indicatori colorimetrici de oxigen.....	89
4.4.1. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de absorbție UV-viz.....	89
4.4.2. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de rezonanță electronică de spin .....	89
4.4.3. Indicatori colorimetrici de oxigen încorporați în matricea polimerică de carboximetilceluloză (CMC) ChOxIn.....	90
4.4.4. Indicatori fotochimici de oxigen ce conțin fotocatalizatorul TiO <sub>2</sub> pe suport de alcool polivinilic (PVA) PhOxIn.....	90

4.4.5. Testarea indicatorilor de oxigen.....	90
5. CONCLUZII.....	92
REFERINȚE.....	97
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPAREA LA CONFERINȚE.....	114
ANEXE.....	116

## Cuprinsul rezumatului tezei de doctorat

Introducere .....	6
1. Sinteza și caracterizarea structurală a noilor coloranți de tip fenotiazinium .....	8
1.1. Sinteza noilor coloranți de tip fenotiazinium .....	8
1.2. Caracterizarea structurală .....	9
2. Impactul unităților auxochrome asupra proprietăților optice și fizice .....	10
2.1. Proprietăți de absorbție UV-viz .....	11
2.2. Proprietăți de emisie de fluorescență .....	11
2.3. Solvatocromismul coloranților de tip fenotiazinium .....	12
2.4. Studiu de agregare .....	12
3. Activitatea biologică a noilor coloranți de tip fenotiazinium .....	13
3.1. Potențiali agenți de contrast și antitumorali: imagistica prin microscopie de fluorescență și evaluarea activității antitumorale în celulele canceroase ovariene umane ..	13
3.2. Noi fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică anticancer: eficacitatea și evaluarea stresului oxidativ în celulele de melanom B16F10 .....	14
4. Funcționalizarea coloranților de tip fenotiazinium cu acid folic .....	16
4.1. Sinteza și caracterizarea structurală a noilor derivați .....	16
4.2. Proprietățile optice și fizice ale noilor folați .....	17
4.3. Noi fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică antimicrobiană: evaluarea citotoxicității în bacterii Gram-pozitive și Gram-negative .....	18
5. Speciile radicalice ale coloranților de tip fenotiazinium și indicatori de oxigen .....	20
5.1. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de absorbție UV-viz .....	20
5.2. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de rezonanță electronică de spin	21
5.3. Indicatori colorimetrici de oxigen .....	21
6. Concluzii .....	23
Referințe .....	26

## Introducere

În bazele de date științifice există aproximativ 5000 de compuși în care heterociclul fenotiazină este funcționalizat <sup>1</sup>. În majoritatea cazurilor, aceste structuri chimice sunt reprezentate de analogi ai albastrului de metilen <sup>2</sup>. Noile strategii de derivatizare a structurilor analogilor albastrului de metilen au scopul de a optimiza proprietățile necesare utilizării acestora în domeniul medical. Proprietăți precum absorbția la o lungime de undă specifică, emisia de fluorescență, solubilitatea sau lipofilicitatea, pot duce la agenți terapeutici cu specificitate sporită și efecte secundare diminuate <sup>3</sup>.

Această teză descrie sinteza și caracterizarea structurală a unor noi coloranți de tip fenotiazinium. Designul compușilor sintetizați a avut ca scop final posibilitatea utilizării acestora ca agenți de contrast în microscopia de fluorescență pentru țesuturile maligne, ca medicamente anticancer sau ca fotosensibilizatori în terapia fotodinamică (anticancer sau antimicrobiană).

Proprietățile biochimice și fizice ale compușilor sintetizați au fost optimizate prin introducerea diferitelor grupări auxochrome în structura lor. Efectul includerii diferitelor grupări auxochrome, asupra proprietăților optice (absorbția UV-viz, emisia de fluorescență și solvatocromismul) ale coloranților, a fost investigat prin diferite metode spectroscopice.

Studiile efectuate pentru determinarea activității antitumorale (în celulele canceroase ovariene umane) și pentru determinarea eficacității în terapia fotodinamică (în celulele de melanom) au arătat că acești coloranți de tip fenotiazinium au potențial ca agenți de contrast în imagistica prin microscopie de fluorescență și ca fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică, unii dintre ei dând rezultate superioare în comparație cu standardul - albastru de metilen. Funcționalizarea noilor derivați de fenotiazinium cu acid folic a fost realizată pentru a îmbunătăți potențialul antibacterian, în special pentru bacteriile rezistente, care sunt capabile să producă acid folic și derivații săi *de novo*.

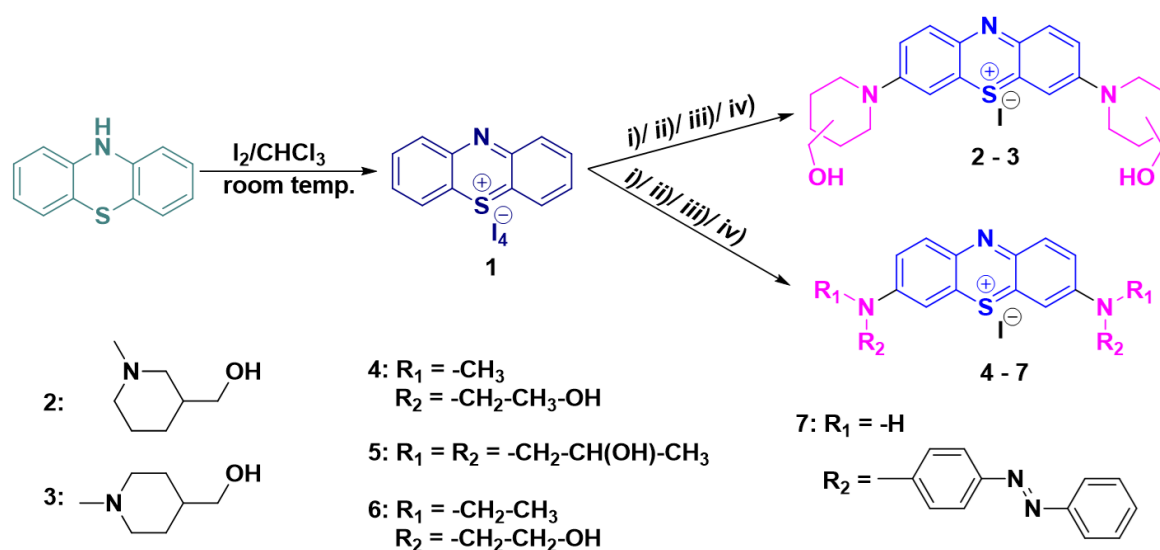
Trei dintre coloranții de tip fenotiazinium sintetizați ar putea fi utilizați ca senzori colorimetrici de oxigen. De asemenea, speciile radicalice ale acestor compuși au fost observate și investigate. Astfel, studiul formelor radicalice a ajutat la o mai bună înțelegere a

comportamentului fotochimic al coloranților de tip fenotiazinium, proprietatea ce poate fi exploatată și în aplicații biomedicale sau de protecția mediului.

# 1. Sinteza și caracterizarea structurală a noilor coloranți de tip fenotiazinium

## 1.1. Sinteza noilor coloranți de tip fenotiazinium

Sinteza noilor coloranți de tip fenotiazinium a fost realizată prin substituția nucleofilă a tetraiodurii de fenotiazinium **1** (Schema 1) cu amine alifatiche sau aromatice, cu caracter nucleofil diferit. Designul compușilor sintetizați a fost propus pentru a investiga impactul diferitelor grupări auxochrome asupra relației structură-proprietăți fizico-chimice.



**Schema 1.** Sinteza analogilor de albastru de metilen-MBA **2-7**. Condiții de reacție: *i*) etanol, reflux, 24h; *ii*) agitare mecanică, temperatura camerei, 30 min; *iii*) etanol, iradiere indirectă cu ultrasunete, temperatura camerei, 45 min; *iv*) etanol, iradiere directă cu ultrasunete, temperatura camerei, 45 min.

Pentru a determina variațiile proprietăților biologice, fizice și chimice care pot fi obținute prin introducerea diferitelor grupări auxochrome în structura cromoforului, au fost selectate următoarele tipuri de agenți nucleofili: a) amine heterociclice-alifatiche secundare, polare (compușii **MBA 2** și **MBA 3**), b) amine alifatiche secundare cu un caracter hidrofил pronunțat (compușii **MBA 4-6**) și c) o amină aromatică-primară, cu un caracter lipofil (compusul **MBA 7**).

Sinteza acestor coloranți a fost realizată prin patru proceduri diferite, și anume, metoda clasică (cu solvent) și alte trei noi metode, mai prietenoase cu mediul <sup>4,5</sup>. Aceste metode includ

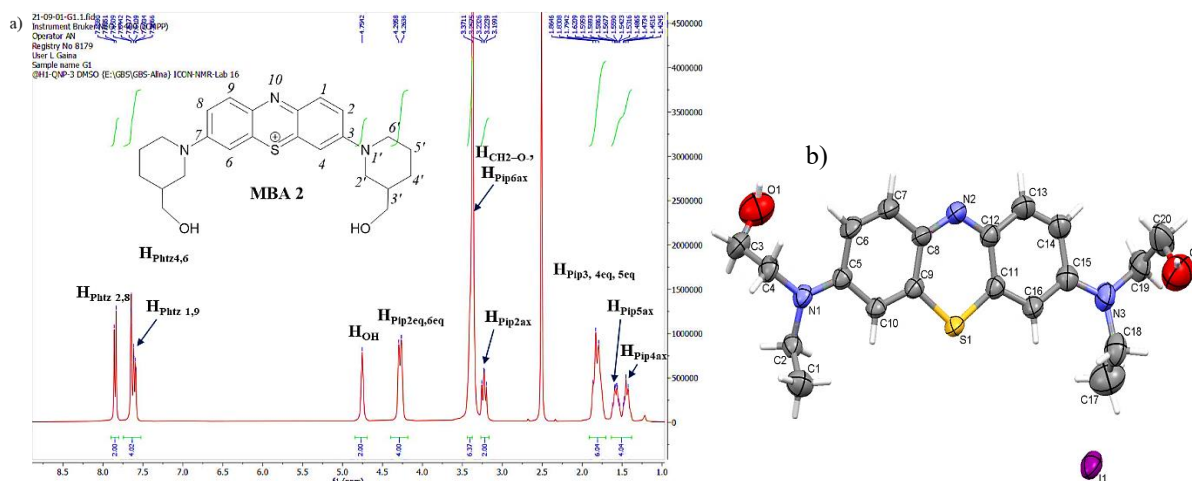


procedura mecanochimică și procedurile de iradiere cu ultrasunete (iradiere directă și indirectă), care, cu excepția colorantului **MBA 7**, au dat rezultate superioare (timp de reacție, randament și număr redus de etape de purificare) în toate cazurile ce implică sinteza compușilor **MBA 2-6**.

### 1.2. Caracterizarea structurală

Formarea compușilor de tip fenotiazinium 3,7-disubstituiți, ca produs principal de reacție, a fost confirmată prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Pentru compusul **MBA 6**, au fost obținute cristale care au putut fi măsurate prin difracție de raze X pe monocristal.

În spectrele RMN de proton ale compușilor **MBA 2-7**, cei șase protoni din cromoforul fenotiazinium dau trei semnale distincte în zona aromatică, cu valori ale deplasării chimice în intervalul 8,04 ppm și 7,38 ppm. În toate cazurile, protonii H<sub>2</sub> și H<sub>8</sub> au dat cele mai dezecranate semnale datorită învecinării cu atomul de azot deficitar în electroni (Figura 1-a)).

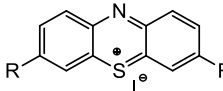
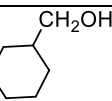
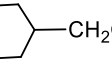
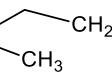
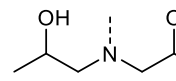
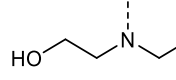
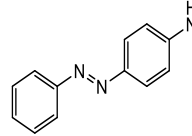


**Figura 1.** a) Spectrul <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) pentru compusul **MBA 2**; b) Unitățile asimetrice ale compusului **MBA 6** ilustrând atomii ca elipsoizi termici, cu o probabilitate de 50%.

## 2. Impactul unităților auxochrome asupra proprietăților optice și fizice

Proprietățile fotofizice ilustrate în spectrele de absorbție UV-viz și de emisie de fluorescență ale noilor coloranți de tip fenotiazinium cu unități auxochrome hidrofile (**MBA 2-6**) și unități lipofile 4-fenildiazenilanilină (**MBA 7**), precum și cele ale albastrului de metilen sunt rezumate în tabelul 1.

**Tabelul 1.** Proprietățile fotofizice ale coloranților de tip fenotiazinium **MBA 2-7**.

	$\lambda_{\max\text{abs}}^a$ [nm]	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\lambda_{\max\text{em}}^b$ [nm]	Randament cuantic de fluorescență [%]	Deplasarea Stokes [cm <sup>-1</sup> ]	Log P <sup>d</sup>
<b>MB</b> R=—N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>665</b>	7,5x10 <sup>4</sup>	<b>690</b>	4 <sup>6</sup>	545	-0,9 <sup>7</sup>
<b>2</b> R=—N 	<b>668</b>	5,1x10 <sup>4</sup>	<b>715</b>	4,6	984	-1,15
<b>3</b> R=—N 	<b>664</b>	3,9x10 <sup>4</sup>	<b>698</b>	2,7	734	-1,29
<b>4</b> R=—N 	<b>660</b>	13,2x10 <sup>4</sup>	<b>670</b>	11,1	226	-1,21 <-1,6 <sup>8</sup>
<b>5</b> R= 	<b>645</b>	25x10 <sup>4</sup>	<b>691</b>	3,9	1011	-1,96
<b>6</b> R= 	<b>648</b>	30x10 <sup>4</sup>	<b>685</b>	2,9	834	-1,21
<b>7</b> R= 	<b>578</b>	5,1x10 <sup>4</sup>	-	-	-	0,93

<sup>a</sup> soluție de etanol

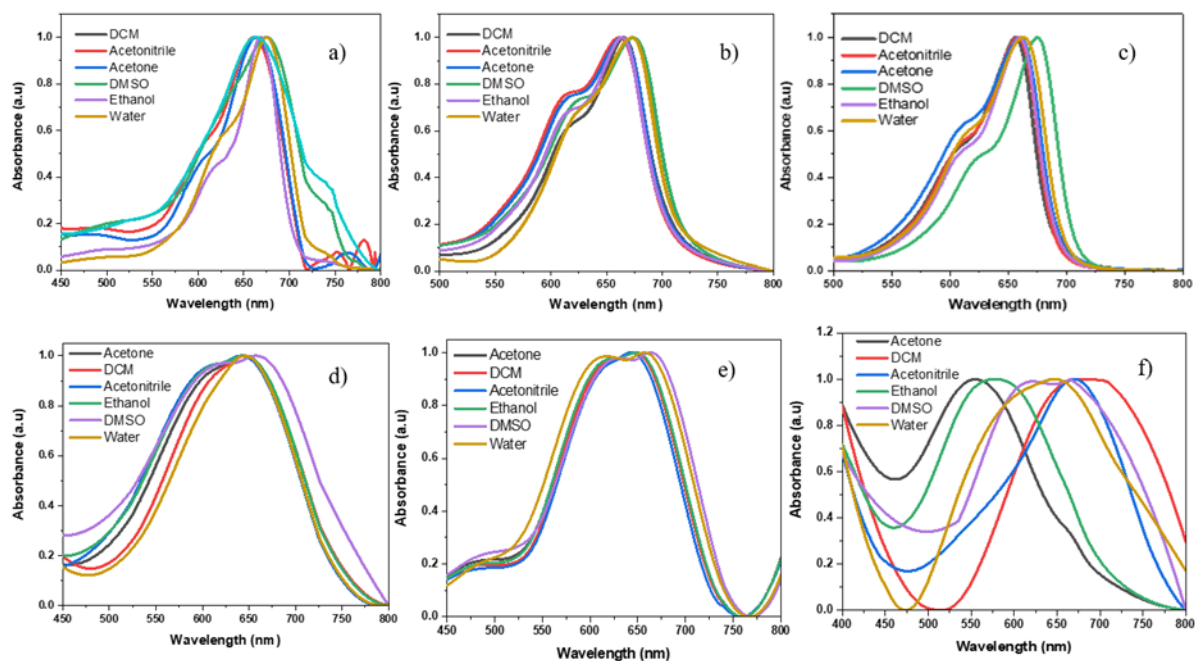
<sup>b</sup> soluție de etanol,  $\lambda_{\text{excitație}} = 650$  nm

<sup>c</sup> în raport cu standardul albastru de metilen

<sup>d</sup> apă/soluție de *n*-octanol

## 2.1. Proprietăți de absorbție UV-viz

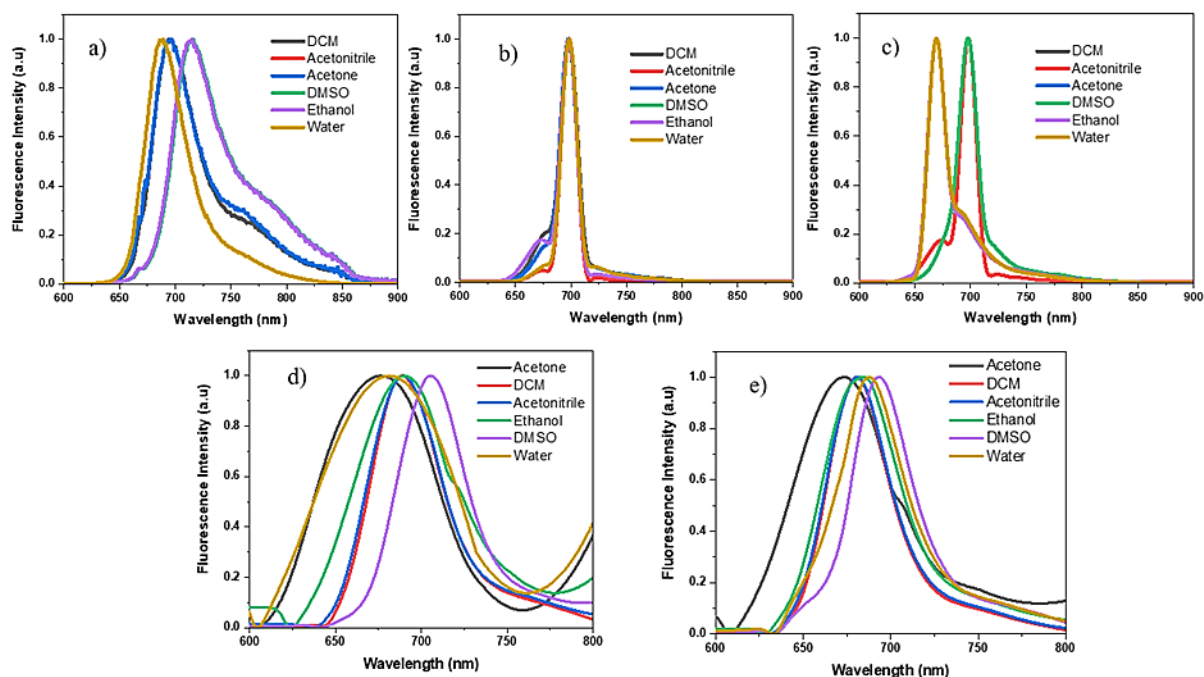
Pentru toți compușii sintetizați, maximele de absorbție (pentru soluțiile în etanol) se situează la lungimi de undă din intervalul 555-668 nm (Figura 2). Compușii **MBA 2-6** au proprietăți electronice similare cu ale albastrului de metilen. Iodura de 4-fenildiazanilină-fenotiazinium **MBA 7** prezintă benzi de absorbție mult mai largi, cu maxime în intervalul 555-668 nm, fără a se observa o dependență clară față de polaritatea solventului; autoagregarea și/sau interacțiunea cu solventul pot explica acest comportament.



**Figura 2.** Spectrele de absorbție normalizate ale analogilor de albastru de metilen, la concentrații micromolare, în solvenți de diferite polarități: a) **MBA 2**; b) **MBA 3**; c) **MBA 4**; d) **MBA 5**; e) **MBA 6**; f) **MBA 7**.

## 2.2. Proprietăți de emisie de fluorescență

Spectrele de emisie de fluorescență ale compușilor **MBA 2-6** au fost măsurate la concentrații micromolare în solvenți de diferite polarități. Pentru **MBA 7**, nu a fost observată emisia de fluorescență în niciun solvent studiat. Coloranții **MBA 2-6** au emis fluorescență în domeniul vizibil (670-715 nm – Figura 3). Deplasarea Stokes descrește în ordinea  $5 > 2 > 6 > 3 > MB > 4$  (Tabelul 1). **MBA 2** și **MBA 4** au dat randamente cuantice de fluorescență mai mari - 4,6% pentru **MBA 2** și 11,1% pentru **MBA 4** și valori aproape duble ale deplasării Stokes ( $984 \text{ cm}^{-1}$  pentru **MBA 2**) comparativ cu MB ( $545 \text{ cm}^{-1}$ ). Cea mai mare valoare a deplasării Stokes ( $1011 \text{ cm}^{-1}$ ) a fost observată pentru cel mai hidrofil colorant, **MBA 5**.



**Figura 3.** Spectrele normalizate de emisie de fluorescență ale coloranților de tip fenotiazinium: a) **MBA 2**; b) **MBA 3**; c) **MBA 4**; d) **MBA 5**; e) **MBA 6**, la concentrații micromolare, în solvenți de diferite polarități.

### 2.3. Solvatocromismul coloranților de tip fenotiazinium

O deplasare batocromă a maximelor de absorbție și emisie a fost observată pentru compușii **MBA 2**, **MBA 4**, **MBA 5** și **MBA 6** în solventul polar, aprotic DMSO, în timp ce pentru **MBA 3** polaritatea solventului nu a avut niciun impact asupra proprietăților optice. Azocolorantul **MBA 7** prezintă cel mai pronunțat solvatocromism dintre noii compuși sintetizați. Cea mai mare lungime de undă a maximumului de absorbție pentru compusul **MBA 7** se obține în solventul mai puțin polar, diclorometan ( $\lambda_{\max, \text{abs}}=680$  nm).

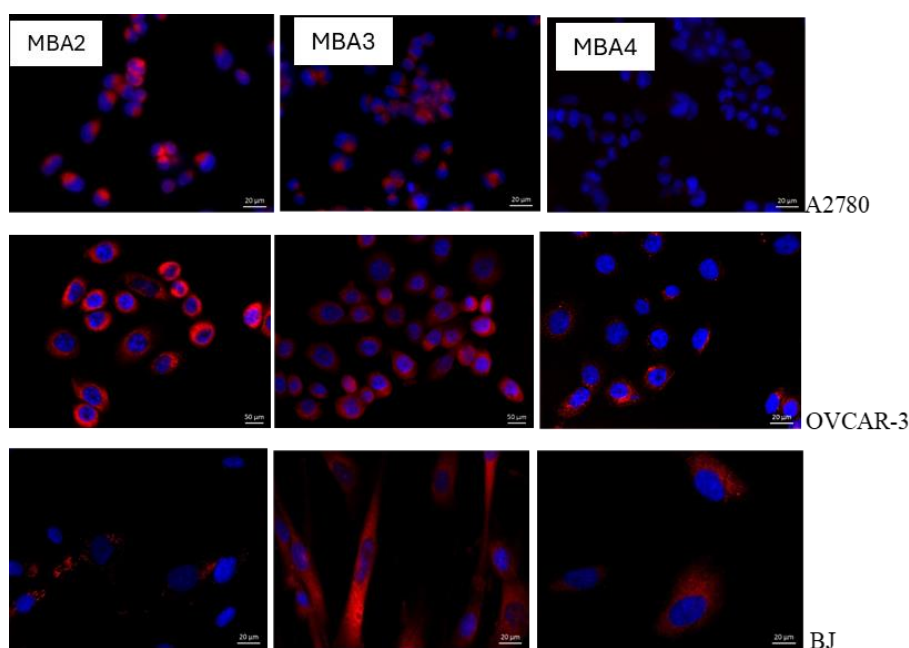
### 2.4. Studiu de agregare

Studiul de agregare a compușilor **MBA 2**, **MBA 3**, **MBA 5** și **MBA 6**, efectuat în soluții apoase, nu a indicat nicio tendință de agregare a acestora la concentrații din domeniul micromolar. În spectrele de absorbție, se observă respectarea legii Lambert-Beer, fără dovezi ale efectelor de dimerizare, cum ar fi o deplasare hipsocromă relevantă sau o scădere a secțiunii transversale de absorbție la creșterea concentrației. Pentru **MBA 4**, o tendință slabă de a forma agregate a fost raportată anterior <sup>8</sup>. În timp ce absorbanta compusului **MBA 7** scade odată cu creșterea concentrației, nu se observă apariția unui maxim suplimentar de absorbție (tipic pentru formele dimerice).

### 3. Activitatea biologică a noilor coloranți de tip fenotiazinium

#### 3.1. Potențiali agenți de contrast și antitumorali: imagistica prin microscopie de fluorescență și evaluarea activității antitumorale în celulele canceroase ovariene umane

Pentru a determina potențialul analogilor **MBA 2-4** în colorarea selectivă a celulelor ovariene tumorale, a fost evaluată internalizarea acestora în trei linii celulare diferite. După cum se poate observa în imaginile obținute prin microscopie de fluorescență (Figura 4), fluoroforii **MBA 2, 3** au fost bine internalizați în celulele ovariene, colorând citoplasma în roșu. Imaginile intracelulare capturate în domeniul infraroșu apropiat arată că cea mai bună internalizare a coloranților **MBA 2, 3** se realizează în celulele tumorale OVCAR-3. **MBA 2** colorează ambele linii celulare de adenocarcinom, având totuși o internalizare mai bună în celulele OVCAR-3. **MBA 3** a prezentat o afinitate neselectivă pentru toate tipurile de celule testate, în timp ce **MBA 4** colorează în special celulele netumorale BJ.

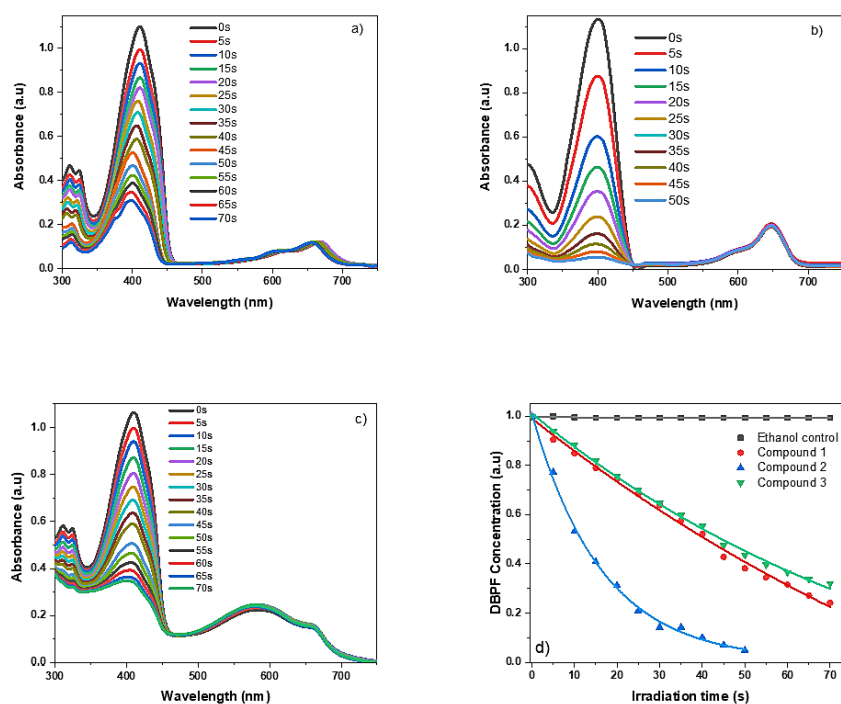


**Figura 4.** Imagini obținute prin microscopie de fluorescență: internalizarea celulară *in vitro* a analogilor albastrului de metilen în celulele tumorale ovariene A2780 și OVCAR-3, respectiv, în celulele netumorale BJ. Pe fiecare linie, de la stânga la dreapta: celule tratate cu analogii **MBA 2, 3** și **4**. Nucleul celulelor a fost contracolorat cu colorantul DAPI (fluorescență albastră). Scală: 20 μm.

În plus față de capacitatea lor de a colora selectiv celulele tumorale OVCAR-3, A2780 și celulele ovariene sănătoase BJ, analogii piperidinil-carbinol **MBA 2-3** au inhibat dezvoltarea celulelor *in vitro* și au influențat activitatea metabolică a acestora. **MBA 2** a prezentat cea mai pronunțată activitate biologică în ceea ce privește citotoxicitatea, internalizarea celulară și influența asupra funcțiilor celulelor ovariene chimiorezistente, modulând trei molecule cu rol în creșterea și migrarea celulelor canceroase: FOLR1, ICAM-1 și VCAM-1. Prin funcționalizarea sau încorporarea în vectori precum nanostructurile, **MBA 2** poate deveni un agent de contrast cu proprietăți anticancer, promițător.

### 3.2. Noi fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică anticancer: eficacitatea și evaluarea stresului oxidativ în celulele de melanom B16F10

Randamentele cuantice de generare a oxigenului singlet ale analogilor **MBA 5-7** au dat valori mai mari pentru compusul **5** ( $\phi\Delta^1\text{O}_2 = 68\%$ ) și **6** ( $\phi\Delta^1\text{O}_2 = 78\%$ ) sau cel puțin egale (**7**:  $\phi\Delta^1\text{O}_2 = 52\%$ ) cu cele ale standardului clasei, albastrul de metilen.



**Figura 5.** Spectrele UV-viz ale senzorului 1,3-difenilizobenzofuran (DPBF) în timpul iradierii: a) **MBA 5** ( $\text{CM} = 10^{-6} \text{ M}$ ), b) **MBA 6** ( $\text{CM} = 10^{-6} \text{ M}$ ), c) **MBA 7** ( $\text{CM} = 10^{-5} \text{ M}$ ), soluții de etanol, iradiate cu un LED la 660 nm și d) spectrele normalizate ale degradării DPBF în prezența noilor fotosensibilizatori **MBA 5-7**.

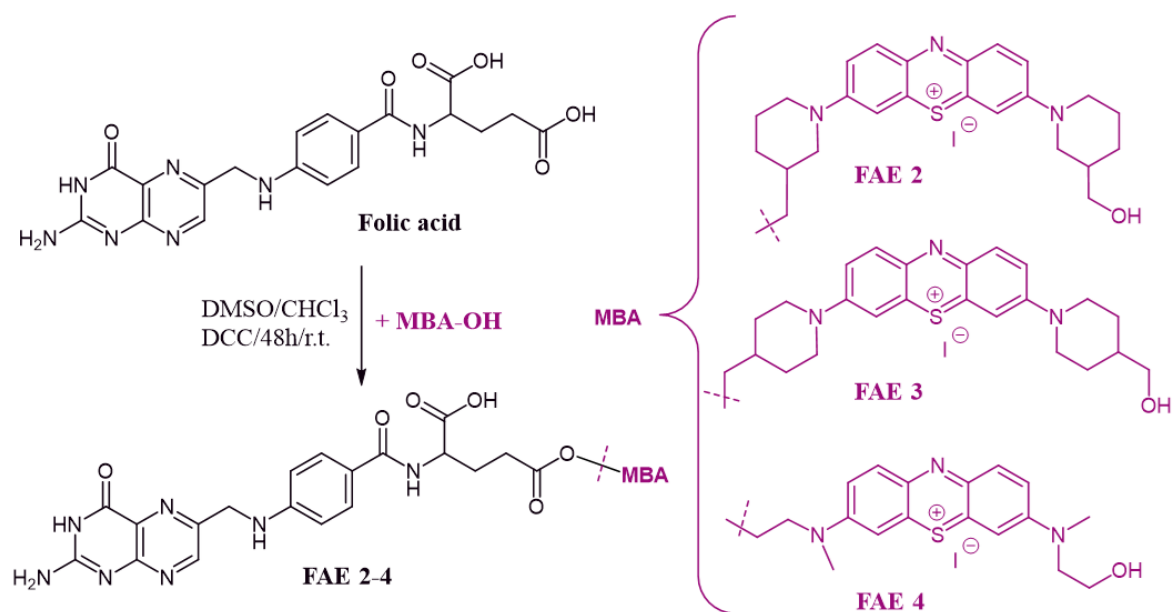
Randamentele cuantice de generarea a oxigenului singlet pentru compușii **MBA 5-7** au fost calculate utilizând valorile maximelor de absorbție ale DPBF în prezența coloranților **MBA 5-7**, utilizați ca fotosensibilizatori (PS) (Figura 5). **MBA 6**, cu complexitatea structurală minimă, a dat cel mai mare randament cuantic de generare a oxigenului singlet ( $\phi\Delta^1\text{O}_2 = 78\%$ ), degradarea senzorului având loc în 50 de secunde de iradiere a PS **MBA 6**, comparativ cu **MBA 5** și **MBA 7**, care au necesitat 20 de secunde suplimentare de iradiere cu lumină de 660 nm (Figura 5-d)).

Evaluarea activității biologice în celulele de melanom, a demonstrat eficacitatea **MBA 5** ca potențial candidat pentru terapia fotodinamică anticancer, prezentând valori scăzute ale  $\text{IC}_{50}$  și activitate ridicată a glutathion reductazei atât în celulele neiradiate, cât și în cele iradiate. **MBA 6** și **MBA 7** au arătat creșteri semnificative ale activității superoxid dismutazei, **MBA 5** prezentând un efect inhibitor asupra acestei enzime.

## 4. Funcționalizarea coloranților de tip fenotiazinium cu acid folic

### 4.1. Sinteza și caracterizarea structurală a noilor derivați

Sinteza noilor derivați folați ai **MBA 2-4** este ilustrată în schema 2. Randamente bune de reacție (40-60%) au fost obținute în prezența agentului de cuplare *N,N*-diciohexilcarbodiimidă (*DCC*) și a 4-dimetilaminopiridinei (*DMAP*) în cantități catalitice, în solvenți organici (*DMSO* și cloroform).



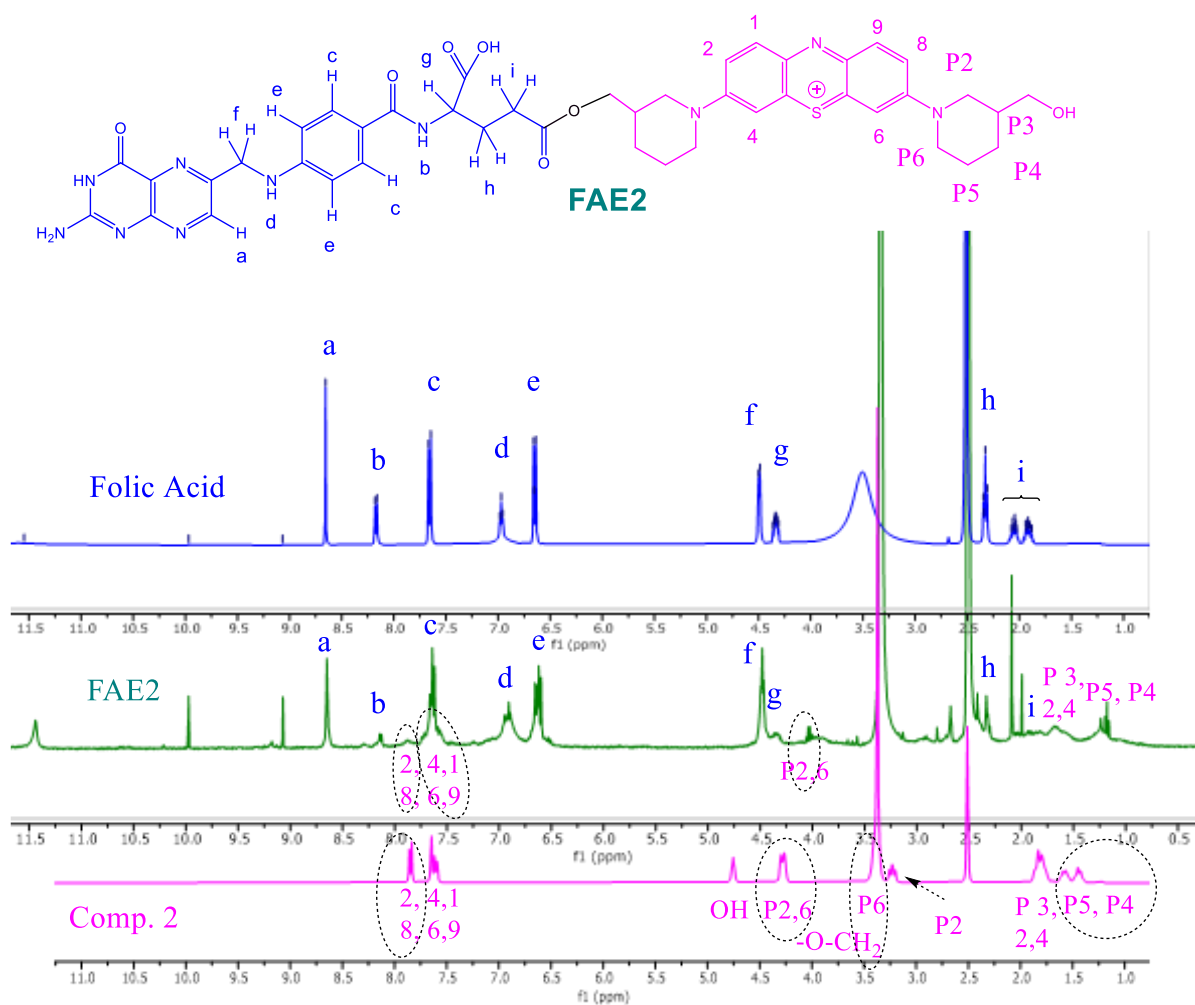
**Schema 2.** Sinteza folaților FAE 2-4.

Formarea ca produs majoritar de reacție a monoesterilor **FAE 2-4**, obținuți prin legarea covalentă a coloranților **MBA 2-4** de acidul folic, a fost demonstrată prin spectrometrie de masa MALDI-TOF și spectroscopie RMN.

Solubilitatea foarte scăzută a noilor esteri ai acidului folic **FAE 2-4**, corelată cu complexitatea lor structurală (prezența tautomerilor lactam/lactim ai fragmentului de pterină, protonii diastereotopici din reziduurile de acid glutamic ale unității de acid folic și efectele de ecranare comparabile care generează izocronismul accidental al semnalelor aparținând esterului folic și analogilor de albastru de metilen - unitatea de fenazationium și protonii axiali/ecuatoriali ai fragmentului de piperidină), fac ca spectrele RMN să poată fi interpretate doar prin comparație cu cele ale materiilor prime. În spectrele <sup>1</sup>H-RMN ale compușilor **FAE 2-**



4, cel mai dezecranat semnal din regiunea aromatică aparține protonului pterinei și prezintă aceeași deplasare chimică, 8,65 ppm, ca în acidului folic. Semnalele protonilor din fragmentul 4-aminobenzoil, precum și protonii din grupările metilen sau metin sunt la deplasări chimice identice în **FAE 2-4** și în acidul folic (Figura 6), rezultate similare fiind deja raportate <sup>9,10</sup>.



**Figura 6.** Spectrele <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) suprapuse ale acidului folic (albastru), esterului folat **FAE 2** (verde) și compusului **2** (magenta).

#### 4.2. Proprietățile optice și fizice ale noilor foliați

Proprietățile optice ale esterilor foliați **FAE 2-4** au fost investigate prin spectroscopie de absorbție / emisie de fluorescență. O comparație a maximelor de absorbție / emisie ale esterilor foliați cu cele ale precursorilor **MBA 2-4** este prezentată în Tabelul 2. Esterii **FAE 2-4** au prezentat maxime de absorbție la lungimi de undă similare cu **MBA 2-4**. Valorile acestor maxime de absorbție sunt specifice pentru tranzițiile electronice  $\pi$ - $\pi^*$  ale cromoforului fenotiazinium <sup>4</sup>.

**Tabelul 2.** Date privind absorbția UV-viz și emisia de fluorescență ale **MBA 2-4** și **FAE 2-4** în soluție de DMSO.

Comp.	$\lambda_{\text{maxabs}}$ [nm]	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\lambda_{\text{maxem}}$ [nm]	Randament cuantic de fluorescență [%]	Deplasarea Stokes [cm <sup>-1</sup> ]
<b>MBA 2</b>	674	5,16x10 <sup>4</sup>	725	4,6	1043
<b>MBA 3</b>	673	3,92x10 <sup>4</sup>	698	2,7	532
<b>MBA 4</b>	674	13,23x10 <sup>4</sup>	697	11,1	489
<b>FAE 2</b>	680	2,60x10 <sup>3</sup>	702; 761	7,5	1565
<b>FAE 3</b>	676	1,27x10 <sup>3</sup>	698	5,4	466
<b>FAE 4</b>	669	5,78x10 <sup>3</sup>	697	11,2	600

În ceea ce privește emisia de fluorescență, esterificarea acidului folic cu analogii de albastru de metilen nu a indus o stingere a fluorescenței, fenomen des întâlnit la legarea chimică a unui fluorofor de o moleculă voluminoasă. În cazul folaților **FAE 3** și **FAE 4**, nu se observă nicio modificare a maximului de emisie, în comparație cu analogii liberi (**MBA 3** ( $\lambda_{\text{max}} = 698$  nm) și **MBA 4** ( $\lambda_{\text{max}} = 697$  nm)). Pentru **MBA 2**, legarea de acidul folic a dus la o deplasare batocromă a maximului de emisie, de la 725 nm pentru **MBA 2** la 761 nm pentru **FAE 2**. Cea mai mare valoare a randamentului cuantic de fluorescență a esterilor folați (în DMSO) a fost obținută pentru **FAE 4** ( $\Phi F = 11,2\%$ ), valoarea fiind similară cu a precursorului **MBA 4**. Valorile randamentelor pentru **FAE 2** ( $\Phi F = 7,5\%$ ) și % pentru **FAE 3** ( $\Phi F = 5,4\%$ ) au fost mai mari decât în cazul precursorilor **MBA 2** și **MBA 3**.

#### 4.3. Noi fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică antimicrobiană: evaluarea citotoxicității în bacterii Gram-pozitive și Gram-negative

Toți analogii de albastru de metilen și folații lor au randamente cuantice de generare a oxigenului singlet la valori apropiate de randamentul albastrului de metilen ( $\Phi \Delta^1 O_2 = 52\%$ )<sup>11</sup>; cu toate acestea, aceste rezultate nu indică neapărat o citotoxicitate în celulele țintă, deoarece efectul citotoxic depinde de factori precum mediul celular și de capacitatea PS de a pătrunde și de a se internaliza în celulele țintă, iar sub iradiere să ducă la formarea oxigenului singlet<sup>12</sup>.

Din spectrele de absorbție ale DPBF în prezența **MBA 2-4** sau **FAE 2-4** ca fotosensibilizatori, s-au calculat randamentele cuantice de generare a oxigenului singlet. Cele mai bune rezultate au fost date de **MBA 4**, care prezintă o valoare a randamentului cuantic de generare a oxigenului singlet de 61%. În cazul esterilor folați, se observă o scădere semnificativă a randamentelor cuantice de generare a oxigenului singlet comparativ cu precursorii lor **MBA** ( $\Phi\Delta^1O_2$ : 19% **FAE 2** / 47% **MBA 2**, 12% **FAE 3** / 59% **MBA 3**, 28% **FAE 2** / 61%, **MBA 4**).

Pentru a evalua proprietățile antimicrobiene ale compușilor testați ca fotosensibilizatori, a fost determinată concentrația minimă inhibitorie, în comparație cu standardul clasei - albastrul de metilen, atât la iradierea cu LED (pentru terapia fotodinamică) cât și în absența iradierii. Rezultatele obținute indică îmbunătățiri semnificative ale activității antimicrobiene pentru compușii sintetizați, în special în condițiile terapiei fotodinamice.

În toate studiile comparative, cei șase compuși sintetizați au demonstrat în mod constant o activitate antimicrobiană superioară în comparație cu albastrul de metilen, de exemplu, concentrația minimă inhibitorie pentru *Deinococcus radiodurans* este de 400  $\mu\text{M}$  pentru albastrul de metilen, în timp ce analogii acestuia sunt mult mai eficienți - 29  $\mu\text{M}$  pentru **MBA 2-3** și 134  $\mu\text{M}$  pentru **MBA 4** fără iradiere; această tendință este evidentă atât în condițiile terapiei fotodinamice, cât și în cele de neiradiere. Legarea chimică a acidului folic de analogii albastrului de metilen a îmbunătățit potențialul lor antimicrobian.

În mod remarcabil, iradierea cu un LED de 660 nm a sporit semnificativ eficacitatea antimicrobiană a tuturor compușilor. Acest efect poate fi atribuit generării de specii reactive de oxigen în timpul terapiei fotodinamice, care îmbunătățește activitatea antimicrobiană a compușilor prin provocarea de leziuni celulelor microbiene. Mecanismul mediat de speciile reactive de oxigen amplifică efectele bactericide ale compușilor, ducând la o reducere notabilă a valorilor concentrațiilor minime inhibitorii. În acest caz, pentru toți compușii există o scădere de aproximativ patru ori a acestor valori.

## 5. Speciile radicalice ale coloranților de tip fenotiazinium și indicatori de oxigen

În acest studiu <sup>13</sup>, analogii de albastru de metilen **MBA 2-4** și albastrul de metilen au fost investigați ca posibili indicatori colorimetrici de oxigen. De asemenea, a fost investigat mecanismul procesului redox care implică albastrul de metilen și analogii săi, utilizând spectroscopia de rezonanță electronică de spin (RES) și spectroscopia de absorbție UV-viz. Prin spectroscopie RES au fost caracterizate speciile radicalice generate în procesul redox în prezența agentului reducător-glucoză, la pH alcalin (KOH). Interpretarea spectrelor RES a dus la concluzia că electronul liber este localizat la atomul de azot al heterociclului de tip fenotiazinium, atât în cazul albastrului de metilen, cât și în cazul celor trei analogi studiați.

Toți compușii testați au dat rezultate promițătoare în formularea a două tipuri de indicatori de oxigen, ce pot fi utilizați în aplicații din industria ambalajelor alimentare: a) indicator fotochimic ce conține coloranții de tip fenotiazinium încorporați într-un suport de alcool polivinilic, împreună cu fotocatalizatorul TiO<sub>2</sub> și b) indicator chimic ce conține un amestec de colorant de tip fenotiazinium, glucoză și KOH, încorporat într-o matrice polimerică de carboximetilceluloză. Toți senzorii s-au dovedit a fi foarte sensibili, schimbarea culorii având loc la concentrații volumetriche sub 0,01% O<sub>2</sub> în atmosfera ambalajului vidat.

### 5.1. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de absorbție UV-viz

Prin spectroscopie de absorbție UV-viz au fost investigate proprietățile optice ale leucoformelor albastrului de metilen și ale **MBA 2-4** și schimbarea culorii acestora în timpul procesului de oxidare. Pentru înregistrarea spectrelor de absorbție, leucoformele coloranților studiați au fost generate *in situ* dintr-un amestec al colorantului corespunzător cu agentul reducător, în atmosferă de argon. În toate cazurile, au fost identificate maxime de absorbție la lungimea de undă în jurul valorii de 259 nm, caracteristică cromoforului fenotiazină <sup>14</sup> (Tabelul 3).

În timpul procesului de oxidare a leucoformelor tuturor compușilor, în spectrul lor de absorbție UV-viz apare un maxim de absorbție tranzitoriu situat în regiunea 552-592 nm (Tabelul 3). Aceste maxime de absorbție amintesc de cele atribuite anterior unei specii tranzitorii de radical aminil, generată în procesul de oxidare a fenotiazinelor <sup>15</sup>. Prin urmare, aceste specii au fost investigate în continuare prin spectroscopie RES.

**Tabelul 3.** Lungimile de undă ale maximelor de absorbție pentru albastrul de metien și analogii **MBA 2-4**, conținând 0,1M KOH(aq): 1M Glucoză(aq):1M colorant de tip fenotiazinium (în etanol) (v/v/v 1/1/1).

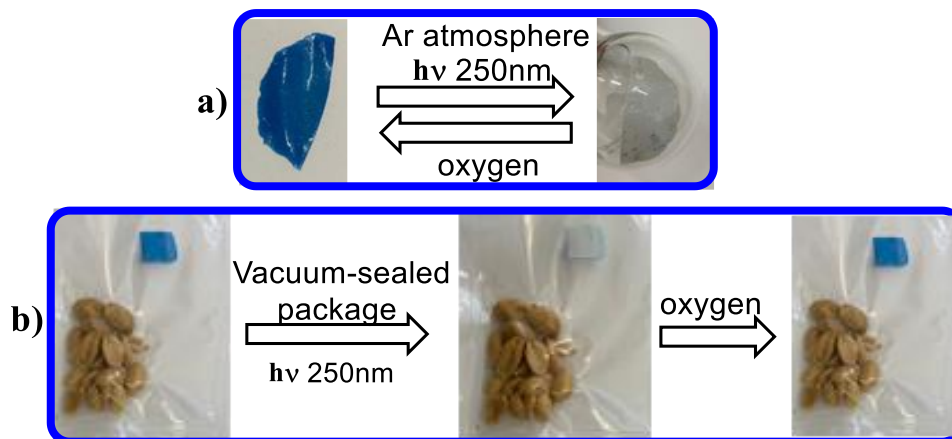
Colorant de tip fenotiazinium	$\lambda_{\max,abs}$ [nm]		
	Forma oxidată	Radicalii liberi	Leuco-forma
<b>1 (MB)</b>	612; 664	552	311; 252
<b>MBA 2</b>	628; 678	592	296; 259
<b>MBA 3</b>	620; 674	588	315; 255
<b>MBA 4</b>	614; 662	591	318; 257

### 5.2. Caracterizarea speciilor radicalice prin spectroscopie de rezonanță electronică de spin

Speciile radicalice ale tuturor celor patru compuși au dat semnale ușor de recunoscut, caracteristice pentru un radical liber centrat pe azot. Scindarea semnalului sub forma unui triplet apare datorită cuplării dintre momentul magnetic al electronului neîmperecheat ( $S = 1/2$ ) cu momentul magnetic al nucleului  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ). Similitudinea dintre cei patru compuși este în concordanță cu atribuirea radicalului ca fiind centrat pe heterociclul de tip fenotiazinium, observându-se o influență redusă a substituenților de tip amine terțiare.

### 5.3. Indicatori colorimetrici de oxigen

Au fost formulate două tipuri de senzori colorimetrici de oxigen prin încorporarea coloranților de tip fenotiazinium (albastrul de metilen și analogii **MBA 2-4**) într-o matrice polimerică permeabilă la oxigen, cum ar fi carboximetilceluloza (ChOxIn) sau alcoolul polivinilic (PhOxIn). În mediile reducătoare, prezența leuco-formei colorantului face ca senzorul să fie incolor. La introducerea oxigenului în mediul studiat, senzorul devine albastru datorită oxidării leuco-formei. Ambii indicatori pot fi activați cu ușurință în vid, în prezența glucozei ca agent reducător chimic (ChOxIn) sau în prezența agentului fotochimic reducător  $\text{TiO}_2$ , iradiat cu lumină UV ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ ) (PhOxIn).



**Figura 7.** Procesul cromogenic reversibil pentru indicatorii fotochimici de oxigen care conțin dioxid de titan, glicerol, alcool polivinilic și colorant de tip fenotiazinium: a) albastru de metilen, b) **MBA 2**.

## 6. Concluzii

Au fost sintetizați șapte compuși din clasa coloranților de tip fenotiazinium, analogi ai albastrului de metilen. Sinteza tuturor compușilor s-a realizat atât prin metoda clasică de sinteză, cât și prin alte trei metode mai ecologice, și anume, sinteza asistată de ultrasunete (iradiere directă și indirectă) și procedura mecanochimică. Coloranții de tip fenotiazinium **MBA 2-4** au fost funcționalizați prin reacția de esterificare cu acid folic. Formarea compușilor de tip fenotiazinium 3,7-disubstituiți și a monoesterilor folați ai acestora, ca produs principal de reacție, a fost confirmată prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Pentru compusul **MBA 6**, au fost obținute cristale care au putut fi măsurate prin difracție de raze X pe monocristal.

Proprietățile optice ale noilor coloranți de tip fenotiazinium au fost investigate prin spectroscopie de absorbție UV-viz și emisie de fluorescență și apoi comparate cu proprietățile optice ale albastrului de metilen. Lungimea de undă la care se află maximele de absorbție ale analogilor sintetizați (în etanol) se situează în intervalul 555-668 nm. Compușii **MBA 2-6** au emis fluorescență în domeniul vizibil în intervalul 670-715 nm, atunci când au fost excitați cu lumină la lungimea de undă a maximelor de absorbție. Pentru **MBA 2** și **MBA 4** s-au obținut cele mai mari randamente cuantice de fluorescență (4,6% pentru **MBA 2** și 11,1% pentru **MBA 4**).

Pentru folații **FAE 2-4** au fost observate maxime de absorbție / emisie de fluorescență la lungimi de undă similare cu cele ale coloranților precursori **MBA 2-4**. Legarea covalentă a **MBA 2-4** ( $\lambda_{\text{abs,max}} \sim 674$  nm) de acidul folic ( $\lambda_{\text{abs,max}} \sim 285$  nm) nu a produs o schimbare semnificativă a maximelor de absorbție ale folaților FAE, deoarece puntea alifatică ce separă cromoforul de fenotiazinium de gruparea carboxil a acidului folic restricționează extinderea conjugării. Randamentele cuantice de fluorescență ale esterilor folați (în DMSO) au valori cel puțin egale, sau chiar mai mari în comparație cu analogii liberi (**FAE 4**:  $\Phi F = 11,2\%$ , similar cu **MBA 4**, **FAE 2**:  $\Phi F = 7,5\%$  și **FAE 3**:  $\Phi F = 5,4\%$ ).

Coeficientul de partiție al coloranților **MBA 2-7** a fost determinat prin metoda spectrofotometrică. Valorile obținute atestă caracterul hidrofil, comparabil cu MB pentru **MBA 2, 3** și o hidrofilicitate mai pronunțată pentru coloranții **MBA 4-6**. În schimb, **MBA 7** este, fără îndoială, un compus lipofil. Caracterul lipofil se datorează în cea mai mare măsură existenței celor două grupări auxochrome aromatice de 4-fenildiazenilanilină.

Compatibilitatea **MBA 2-4** cu mediul biologic, prezisă în etapa de design prin selectarea ca auxocrom a piperidinei (monociclu voluminos, decorat suplimentar cu funcționalități hidrofile pentru compușii **MBA 2** și **3**), a fost confirmată de rezultatele experimentale. În plus față de capacitatea lor de a colora selectiv celulele tumorale OVCAR-3, A2780 și celulele ovariene sănătoase BJ, coloranții piperidinil-carbinol fenotiazinium **MBA 2** și **3** au prezentat inhibarea creșterii celulare *in vitro* și au influențat activitatea metabolică a celulelor. **MBA 2** a dat cele mai bune rezultate în ceea ce privește activitatea biologică, prezentând citotoxicitate la cele mai mici concentrații în comparație cu ceilalți compuși analizați, o acumulare selectivă, influențând funcțiile celulelor ovariene foarte maligne, rezistente la chimioterapie.

Al doilea studiu de activitate biologică a implicat testarea **MBA 5-7** ca fotosensibilizatori pentru tratamentul celulelor melanomului B16F10. Au fost obținute randamente cuantice de generare a oxigenului singlet mai mari (**MBA 5**:  $\phi\Delta^1O_2 = 68\%$  și **MBA 6**:  $\phi\Delta^1O_2 = 78\%$ ) sau cel puțin egale (**MBA 7**:  $\phi\Delta^1O_2 = 52\%$ ) cu cele ale standardului clasei, albastrul de metilen. Din testarea activității biologice a celor trei compuși a rezultat că **MBA 5** poate fi eficient ca potențial fotosensibilizator în terapia fotodinamică anticancer, prezentând valori scăzute ale  $IC_{50}$  și o activitate crescută a glutatonei reductazei atât în celulele neiradiate, cât și în cele iradiate.

Esterii acidului folic **FAE 2-4** au fost testați ca fotosensibilizatori pentru terapia fotodinamică antimicrobiană. Evaluarea eficacității lor a fost realizată pe tulpini bacteriene Gram-pozitive și Gram-negative. Legarea covalentă a acidului folic de analogii albastrului de metilen a oferit posibilitatea de a ținti specific calea metabolismului acidului folic din celulele microbiene și / sau de a adera mai eficient la bistratul lipidic al membranelor, fără a compromite proprietățile optice ale fotosensibilizatorului. **FAE 2-4** au demonstrat o eficacitate superioară față de precursorii neesterificați, specificitate și valori mai scăzute ale concentrațiilor minime inhibitorii, fiind susținut astfel potențialul lor ca agenți antimicrobieni mai eficienți.

De asemenea, albastrul de metilen și analogii **MBA 2-4** au fost testați ca posibili indicatori colorimetrici de oxigen. În prezența oxigenului, apariția culorației albastre pe suprafața senzorilor se datorează procesului redox în care este implicată leucoforma coloranților de tip fenotiazinium. Utilizând spectroscopia de rezonanță electronică de spin și spectroscopia de absorbție UV-viz, acest studiu a investigat și mecanismul procesului redox ce implică clasă de coloranți de tip fenotiazinium. Prin spectroscopie RES, au fost caracterizate speciile radicalice ale albastrului de metilen și ale analogilor săi, generate în procesul redox, în prezența agentului reducător (glucoză în mediu alcalin). Interpretarea spectrelor RES a dus la



concluzia că electronul liber este localizat la atomul de azot al heterociclului de tip fenotiazinium, în cazul tuturor compușilor studiați. De asemenea, speciile radicalice ale celor patru compuși au fost observate și în experimentele UV-viz, având maxime de absorbție caracteristice, în intervalul 552-592 nm. Toți compușii testați au dat rezultate promițătoare în formularea a două tipuri de indicatori de oxigen ce pot fi utilizați în industria alimentară: a) indicatori fotochimici ce utilizează coloranți de tip fenotiazinium și fotocatalizatorul  $\text{TiO}_2$ , depuși pe un suport de alcool polivinilic și b) indicatori chimici ce utilizează un amestec de colorant de tip fenotiazinium, glucoză și KOH încorporat într-o matrice polimerică de carboximetilceluloză. Toți senzorii s-au dovedit a fi foarte sensibili, schimbarea culorii având loc la concentrații volumetrice sub 0,01%  $\text{O}_2$  în atmosfera ambalajului alimentar vidat.

## Referințe

- (1) Karuppaiah, G.; Lee, M. H.; Bhansali, S.; Manickam, P. Electrochemical Sensors for Cortisol Detection: Principles, Designs, Fabrication, and Characterisation. *Biosens. Bioelectron.* **2023**, *239*, 115600. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115600>.
- (2) Padnya, P. L.; Khadieva, A. I.; Stoikov, I. I. Current Achievements and Perspectives in Synthesis and Applications of 3,7-Disubstituted Phenothiazines as Methylene Blue Analogues. *Dye. Pigment.* **2023**, *208*, 110806. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110806>.
- (3) Thesnaar, L.; Bezuidenhout, J. J.; Petzer, A.; Petzer, J. P.; Cloete, T. T. Methylene Blue Analogues: In Vitro Antimicrobial Minimum Inhibitory Concentrations and in Silico Pharmacophore Modelling. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *157* (October 2020), 105603. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105603>.
- (4) Stoean, B.; Gaina, L.; Cristea, C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Branzanic, A. M. V.; Focsan, M.; Fischer-Fodor, E.; Tigiu, B.; Moldovan, C.; Cecan, A. D.; Achimas-Cadariu, P.; Astilean, S.; Silaghi-Dumitrescu, L. New Methylene Blue Analogues with N-Piperidinyl-Carbinol Units: Synthesis, Optical Properties and in Vitro Internalization in Human Ovarian Cancer Cells. *Dye. Pigment.* **2022**, *205*, 110460. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2022.110460>.
- (5) Stoean, B.; Lupan, I.; Cristea, C.; Sillion, M.; Silaghi-Dumitrescu, L.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Gaina, L. I. Outcomes of Folic Acid Esterification upon the Properties of Hydrophilic Phenothiazinium Dyes: New Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2024**, *451* (January), 115500. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2024.115500>.
- (6) Xiao, Q.; Lin, H.; Wu, J.; Pang, X.; Zhou, Q.; Jiang, Y.; Wang, P.; Leung, W.; Lee, H.; Jiang, S.; Yao, S. Q.; Gao, L.; Liu, G.; Xu, C. Pyridine-Embedded Phenothiazinium Dyes as Lysosome-Targeted Photosensitizers for Highly Efficient Photodynamic Antitumor Therapy. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (9), 4896–4907. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00280>.
- (7) Gorman, S. A.; Bell, A. L.; Griffiths, J.; Roberts, D.; Brown, S. B. The Synthesis and Properties of Unsymmetrical 3,7-Diaminophenothiazin-5-ium Iodide Salts: Potential

- Photosensitisers for Photodynamic Therapy. *Dye. Pigment.* **2006**, *71* (2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.06.011>.
- (8) Gollmer, A.; Felgenträger, A.; Bäumlner, W.; Maisch, T.; Späth, A. A Novel Set of Symmetric Methylene Blue Derivatives Exhibits Effective Bacteria Photokilling - A Structure-Response Study. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (2), 335–351. <https://doi.org/10.1039/c4pp00309h>.
- (9) Yallappa, S.; Manjanna, J.; Dhananjaya, B. L.; Vishwanatha, U.; Ravishankar, B.; Gururaj, H. Phytosynthesis of Gold Nanoparticles Using Mappia Foetida Leaves Extract and Their Conjugation with Folic Acid for Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26* (9), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5567-3>.
- (10) Gocheva, G.; Petkov, N.; Garcia Luri, A.; Iliev, S.; Ivanova, N.; Petrova, J.; Mitrev, Y.; Madjarova, G.; Ivanova, A. Tautomerism in Folic Acid: Combined Molecular Modelling and NMR Study. *J. Mol. Liq.* **2019**, *292*, 111392. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111392>.
- (11) Korínek, M.; Dědic, R.; Molnár, A.; Svoboda, A.; Hála, J. A Comparison of Photosensitizing Properties of Meso-Tetraphenylporphin in Acetone and in Dimethyl Sulfoxide. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744–747* (SPEC. ISS.), 727–731. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.036>.
- (12) Wainwright, M.; Meegan, K.; Loughran, C.; Giddens, R. M. Phenothiazinium Photosensitisers, Part VI: Photobactericidal Asymmetric Derivatives. *Dye. Pigment.* **2009**, *82* (3), 387–391. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2009.02.011>.
- (13) Stoean, B.; Lehene, M.; Zagrean-Tuza, C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Cristea, C.; Gaina, L. Transient Radical Species and Oxygen Colorimetric Indicators Grounded on Phenothiazinium Dyes. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2024**, *320*, 124602. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2024.124602>.
- (14) Molnar, E.; Gal, E.; Gaina, L.; Cristea, C.; Fischer-Fodor, E.; Perde-Schrepler, M.; Achimas-Cadariu, P.; Focsan, M.; Silaghi-Dumitrescu, L. Novel Phenothiazine-Bridged Porphyrin-(Hetero)Aryl Dyads: Synthesis, Optical Properties, in Vitro Cytotoxicity and Staining of Human Ovarian Tumor Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (9), 3178. <https://doi.org/10.3390/ijms21093178>.

- (15) Bodea Cornel; Silberg, I. A. Octachlorophenothiazinyl: A Very Stable Nitrogen Radical. *Nature* **1963**, *198* (4003), 883–884. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/198883a0>.