

## Raport științific

privind implementarea proiectului in perioada octombrie – decembrie 2011

Etapa I 15. 12. 2011

Investigarea procesului de autoasociere a bioliganzilor in faza lichida, prin RMN

Investigațiile privind homo-asocierea diferitelor molecule aromatice, precum și legarea lor competitivă de anumiți receptori biologici reprezintă unul dintre aspectele de maximă importanță ale interacțiunilor intermoleculare. Din punctul de vedere al complexării unor biomolecule cu ciclodextrine sau derivati de ciclodextrina, procesul de autoasociere poate concura sau chiar domina procesul de complexare, conducând astfel la imposibilitatea obținerii unor complecși de incluziune de tip „oaspete – gazda” în faza lichida. Interacțiunile de tip  $\pi - \pi$  ale moleculelor aromatice pot governa diverse structuri supramoleculare sau agregate, atât în soluție cât și în faza solidă. Spectroscopia RMN are unele avantaje față de metodele optice de investigare a proceselor de complexare moleculară, deoarece ea poate fi utilizată pentru determinarea constantelor de echilibru în cazul unei soluții multicomponent, furnizând totodată și detalii privind structura complecșilor formați. Din acest motiv, în prezenta decontare ne propunem să efectuăm o analiză comparativă a două modele de autoasociere moleculară având la bază datele experimentale furnizate de către spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară. Modelele analizate au toate la bază măsurători ale variației deplasărilor chimice ale protonilor moleculei aromatice în funcție de concentrație și permit determinarea cantitativă a constantelor de asociere precum și a valorilor limită ale deplasărilor chimice în complecșii de asociere investigați. În plus, pe baza spectroscopiei 2D RMN se pot obține informații privind modelul structural de autoasociere a acestor molecule în soluție apoasă. În final propunem un nou model ce descrie procesul de autoasociere. Acest model este bazat pe principiile mecanicii statistice conform căreia datorită contribuției entropice, constanta de asociere  $K_n$  trebuie să scadă cu fiecare pas de asociere, pornind de la cea mai mare valoare a lui  $K_2$  și tinzând asimptotic spre  $K$ , pentru dimensiuni suficient de mari ale oligomerilor.

### Modele teoretice de auto-asociere

*a) Model isodesmic.* Acest model admite formarea oligomerilor de ordin superior,  $A_n$  ( $n = 2 \div \infty$ ) dar considera că indiferent de rangul oligomerului, formarea acestuia este caracterizată de către aceeași constantă de asociere,  $K$ . Astfel pe baza relației  $A_j + A \xrightleftharpoons{K} A_{j+1}$  și a bilanțului concentrațiilor oligomerilor prezenți în soluție se poate demonstra că  $[A_j] = K^{j-1}[A]^j$  iar

$$[A_0] = [A]/(1 - K[A])^2 \quad (1)$$

unde  $[A_0]$  este concentrația totală a soluției  $A$  iar  $[A]$  este concentrația de monomer în soluție. Ipoteza general acceptată în cazul modelelor de autoasociere consideră că deplasarea chimică a nucleului observat prin RMN care aparține unei molecule situate la capătul oligomerului este media aritmetică a deplasărilor chimice corespunzătoare monomerului și moleculei din interiorul oligomerului. În cazul unui oligomer de ordinul  $j$  avem

$$\delta_j = \frac{(j-1)\delta_i + \delta_m}{j} = \delta_{A_j} \quad (2)$$

unde  $\delta_j$  este deplasarea chimică a oligomerului de ordin  $j$ ,  $\delta_m$  este deplasarea chimică a monomerului iar  $\delta_i$  este deplasarea chimică maximă a protonilor moleculei de solute în interiorul unui oligomer. Deoarece

reactiile de autoasociere sunt caracterizate de un schimb rapid de asociere/disociere, deplasarea chimica observata,  $\delta_{obs}$  este o medie ponderata a tuturor deplasarilor chimice corespunzatoare oligomerilor existenti in solutie.

$$\delta_{obs} = \frac{1}{[A_0]} \left\{ [A] \delta_m + \sum_{n=2}^{\infty} n [A_n] \delta_{A_n} \right\} \quad (3)$$

Substituind ec (1) si (2) in ec.(3) se obtine:

$$\delta_{obs} = \left( \frac{\sqrt{1+4K[A_0]} - 1}{2K[A_0]} \right) \delta_m + \left( 1 + \frac{1 - \sqrt{1+4K[A_0]}}{2K[A_0]} \right) \delta_i \quad (4)$$

Mentionam ca modelul de dimerizare in care se iau in considerare doar  $\delta_m$  si  $\delta_{dimer}$  conduce la o ecuatie identica cu ec.(4) in care K este inlocuit de  $2K_{dimer}$  iar  $(\delta_i - \delta_m)$  prin  $(\delta_{dimer} - \delta_m)/2$ . Deci datele de deplasare chimica RMN nu pot face distinctia intre procesul de dimerizare si cel de formare a oligomerilor de ordin superior, daca se aplica modelul isodesmic.

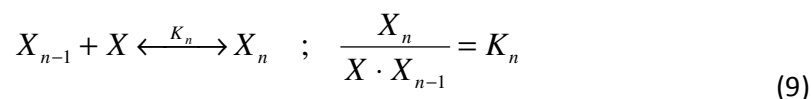
b) Modelul atenuat Modelul presupune ca pe masura ce gradul de agregare creste, constanta de asociere scade conform relatiei  $K_i = K/i$ . Punctul slab al acestei metode consta in faptul ca valoarea asimptotica a constantei de asociere pentru oligomeri de ordin superior tinde spre zero. Urmand aceiasi procedura ca si in cazul modelului prezentat anterior, rezultatele obtinute sunt:

$$[A_0] = [A] e^{K[A]} \quad (7)$$

$$\delta_{obs} = \frac{1}{K[A_0]} \left\{ (e^{K[A]} - 1) \delta_m + (e^{K[A]} (K-1) + 1) \delta_i \right\} \quad (8)$$

#### Model atenuat bazat pe considerente entropice

In cele ce urmeaza propunem un model care conduce la o formula general valabila pentru deplasarea chimica observata. Procesul de auto-asociere indefinita a moleculelor in solutie este descris de urmatorul set de ecuatii:



unde  $X_n$  este concentratia oligomerului ce contine n monomeri iar  $K_n$  sunt constantele de asociere ce caracterizeaza aparitia oligomerilor cu n monomeri autoasociati. Concentratia fiecarui oligomer de ordinul n este legat de concentratia monomerului ( $X_1 = X$ ) prin relatia:

$$X_n = K_n X X_{n-1} = K_2 K_3 \cdots K_{n-1} K_n X^n \quad (10)$$

In mod corespunzator, concentratia totala a oligomerilor  $X_a$  (include si monomerii) si concentratia totala de monomeri  $X_t$  este data de relatiile:

$$X_a = \sum_{n=1} X_n \quad ; \quad X_t = \sum_{n=1} n X_n \quad (11)$$

Semnalele  $^1\text{H}$  RMN ale protonilor monomerului sunt afectate in mod diferit de catre procesul de auto-asociere, in functie de taria interactiunii lor cu alti monomeri din oligomer. Ipoteza general acceptata considera ca pentru un proces de auto-asamblare liniar, influenta este limitata la primii vecini. Daca arhitectura monomerului are o asimetrie intrinseca, atunci deplasarea chimica corespunzatoare trebuie sa fie afectata asimetric de catre vecinul din stanga, respectiv dreapta,  $\Delta\delta_{l,r} = \delta_m - \delta_{l,r}$ . Aceasta influenta este resimtita de prima si ultima molecula din oligomer. Orice alta molecula interioara, cumuleaza efectul ce apare de la vecinul stang si drept,  $\Delta\delta = \Delta\delta_l + \Delta\delta_r$ , iar deplasarea lui chimica devine  $\delta_i = \delta_m - \Delta\delta$ . In consecinta, contributia fiecarui monomer dintr-un agregat de ordinul n se obtine ca o medie ponderata a contributiilor monomerilor interni si externi.

$$\delta_n = \frac{\delta_l + \delta_r + (n-2)\delta_i}{n} = \delta_m - \frac{(n-1)\Delta\delta}{n} \quad ; \quad \delta_n \xrightarrow{n \rightarrow \infty} \delta_i \quad (12)$$

iar deplasarea chimica observata va fi o medie ponderata a contributiilor agregatelor de orice ordin din solutie.

$$\delta_{obs} = \frac{\delta_m X + \sum_{n=2} n X_n \delta_n}{X_t} = \delta_m - \Delta\delta \left( 1 - \frac{X_a}{X_t} \right) \quad (13)$$

Aceasta ecuatie are o valabilitate generala pentru orice proces de auto-asociere. Un model particular va conduce la o dependenta specifica a lui  $X_a$  de  $X_t$  si va specifica variatia lui  $\delta_{obs}$  de  $X_t$ . Modelul propus de noi condidera ca modificarile de entropie asociate cu adaugarea fiecarui monomer la agregat conduce la o descrestere gradata pornind de la valoarea  $K_2$  si tinde asimptotic spre  $K$ , la dimensiuni mari ale oligomerilor conform relatiei

$$K_n = \left( \frac{n}{n-1} \right)^p K \quad (14)$$

Parametrul p depinde de geometria monomerului si a agregatilor si valoarea p=2 descrie cel mai bine o geometrie unidimensionala in care interactiunile intermonomeri sunt de tip  $\pi - \pi$ . Conform cu ec. (10) si (14), modelul propus conduce la o expresie compacta pentru concentratia oricarui agregat de ordinul n si anume  $x_n = n^p x^n$ , expresie in care s-au introdus „concentratiile” adimensionale:

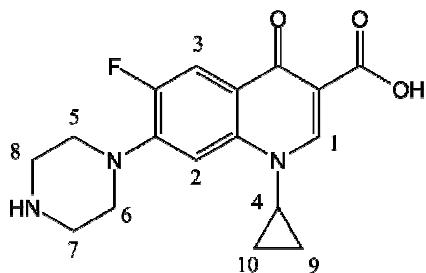
$$x = KX; \quad x_n = KX_n \quad x_a = KX_a \quad x_t = KX_t$$

Sumele din cadrul ec.(11) pot fi calculate cu usurinta si conduc la urmatoarele rezultate:

$$x_{a,p}(x) = \sum_{n=1} x_n = \left( x \frac{d}{dx} \right)^p \sum_{n=1}^{\infty} x^n = \left( x \frac{d}{dx} \right)^p \frac{1}{1-x} \quad (15)$$

$$x_{t,p} = \sum_{n=1} n x_n = \left( x \frac{d}{dx} \right) x_{a,p} \quad (16)$$

**Rezultate experimentale** Drept molecula model a fost aleasa ciprofloxacina, un antibiotic utilizat in chemoterapie. Incercarile de a obtine complexi de incluziune ai ciprofloxacinei cu  $\beta - \text{CD}$  s-au concretizat cu mare greutate si doar in faza solida [1].



Ciprofloxacina

Dupa obtinerea complexului, constanta de stabilitate a acestuia a fost determinata prin spectroscopie de fluorescenta si are valoarea  $K = 278 \text{ M}^{-1}$ . Incercarile noastre de determinare a constantei de asociere prin RMN au pus in evidenta o variatie extrem de redusa a deplasarilor chimice ale protonilor din cavitatea  $\beta$ -CD (aprox. 0.04 ppm), in timp ce protonii gruparii aromatice ai ciprofloxacinei prezinta o variatie cu cel putin un ordin de marime mai mare ( $\Delta\delta > 0.4 \text{ ppm}$ ). Acest rezultat sugereaza ca in solutie, procesul de complexare cu  $\beta$ -CD este puternic concurat de un process de auto-asociere al moleculelor de ciprofloxacina. Pentru a caracteriza procesul de auto-asociere, am efectuat masuratori de inalta rezolutie  $^1\text{H}$  RMN la  $T = 298 \text{ K}$  cu un spectrometru Bruker Avance III, 500 MHz. Variatia deplasarilor chimice ale protonilor ciprofloxacinei au fost masurate fata de TMS pe un set de probe in care concentratia ciprofloxacinei a variat de la 0,25 mM la 70 mM. Rezultatele obtinute sunt prezentate in Fig.1. In aceasta figura punctele reprezinta valorile determinate experimental iar linia continua este rezultatul fitarii cu modelul propus de noi.

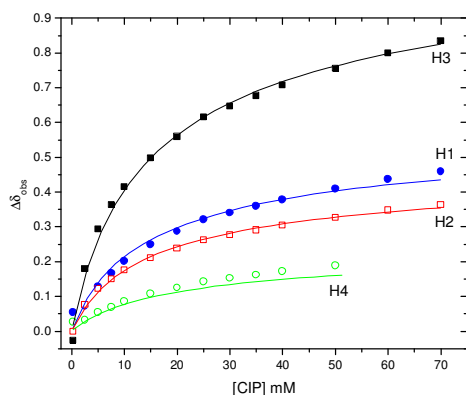


Fig.1 Variatia deplasarii chimice  $\Delta\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{m}} - \delta_{\text{obs}}$  a protonilor H1, H2, H3 si H4 ai ciprofloxacinei functie de concentratia molară a acesteia

Aplicarea modelelor prezentate anterior s-a realizat prin fitarea datele experimentale obtinute cu ecuatiile (4), (8) si (13). Rezultatele obtinute sunt prezentate in tabelul 1. Informatii privind aranjamentul moleculelor de ciprofloxacina in cadrul unui agregat, sunt furnizate de spectrul 2D – ROESY al unei solutii 30 mM de ciprofloxacina in  $\text{D}_2\text{O}$  (Fig.2). Spectrul prezinta semnalele caracteristice unei interactiuni dipolare intermoleculare intre diversi protoni ai ciprofloxacinei. Astfel protonul H(2) interactioneaza puternic cu protonii H(4), H(5,6), H(7,8), H(9) si H(9,10), in timp ce protonul H(3) interactioneaza puternic cu H(4), H(5,6) si H(9) si putin mai slab cu H(7,8). Aceste interactiuni dipolare ale protonilor aromatici pot avea loc doar daca moleculele de ciprofloxacina se plaseaza una peste cealalta intr-o orientare “cap – coada”. Acelasi tip de aranjament al moleculelor de ciprofloxacina a fost pus in evidenta si in faza cristalina [2]

Tabel 1. Valorile constantelor de asociere si a deplasarilor chimice rezultate in urma fitarii datelor

Parametru	Proton	Isodesmic	Atenuat	Model propus
$\delta_m$	H(1)	8.81±0.01	8.80±0.01	8.81±0.01
	H(2)	7.65±0.01	7.65±0.01	7.65±0.01
	H(3)	7.91±0.01	7.91±0.01	7.91±0.01
	H(4)	3.75±0.01	3.75±0.01	3.75±0.01
$\delta_i$	H(1)	8.11±0.03	7.91±0.04	7.89±0.04
	H(2)	7.08±0.03	6.92±0.04	6.90±0.04
	H(3)	6.59±0.04	6.21±0.04	6.17±0.05
	H(4)	3.19±0.03	3.11±0.04	3.35±0.04
$\Delta\delta = \delta_m - \Delta\delta$	H(1)	0.70±0.02	0.89±0.03	0.92±0.03
	H(2)	0.57±0.02	0.73±0.03	0.75±0.03
	H(3)	1.32±0.03	1.70±0.03	1.74±0.04
	H(4)	0.31±0.02	0.39±0.03	0.40±0.03
<b>K</b>		<b>65.87±5.30</b>	<b>107.05±8.89</b>	<b>13.73±1.19</b>
<b>K<sub>2</sub></b>		<b>65.87±5.30</b>	<b>53.53±4.45</b>	<b>54.92±4.76</b>
<b>K<sub>inf</sub></b>		<b>65.87±5.30</b>	<b>0</b>	<b>13.73±1.19</b>

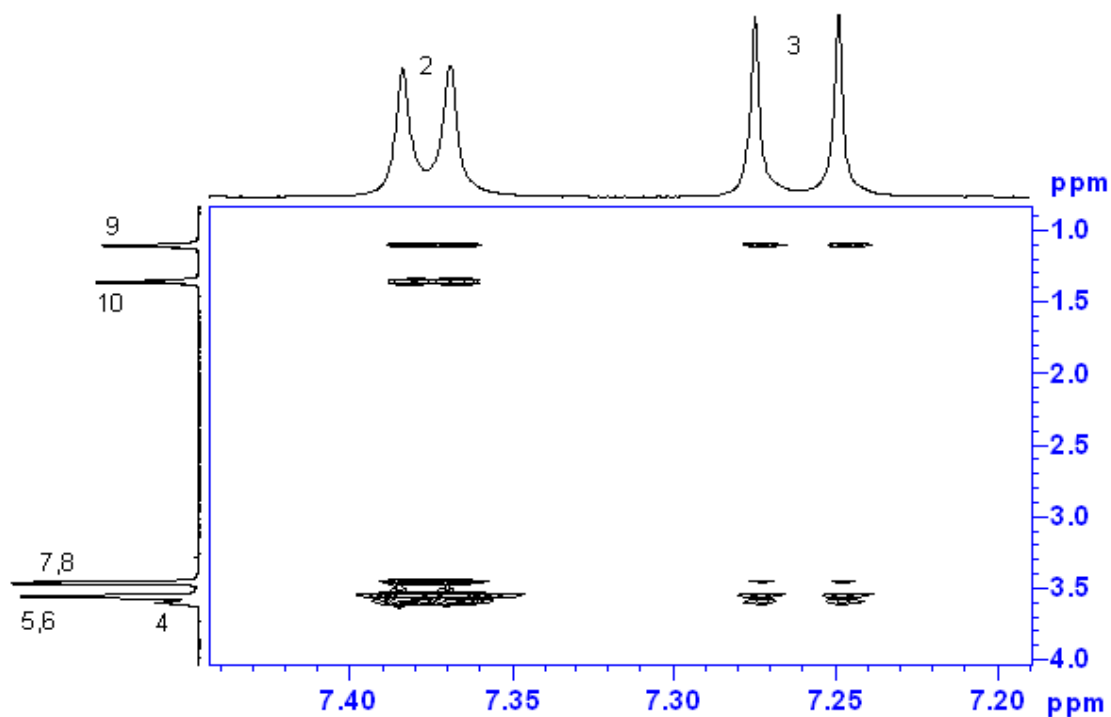


Fig. 2 Spectrul 2D-ROESY al unei solutii de 30 mM ciprofloxacina

Rezultatele obtinute vor fi trimise spre publicare la J. Phys. Chem. B

[1] J.Chao, I.Chen, H.Xu, D.Meng, Spectrochim. Acta A 58, (2002) 2809-2815

[2] I.Turel, k.Gruber, I.Ieban, N.Bukovec, J. Inorg.Biochem. 61, (1996) 197 – 212

Director proiect,

*Lu Bogdan*