

## **Raport stiintific**

*privind implementarea proiectului in perioada ianuarie – decembrie 2012*

Etapa II 15. 12. 2012

### **Studiul complexilor supramoleculari de tip macromolecula – bioligand prin RMN, spectroscopie de fluorescenta si calorimetrie de titrare izoterma (ITC)**

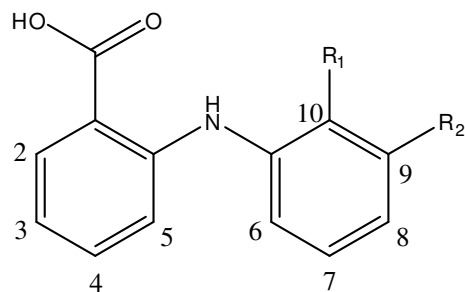
Conceptul de imbunatatire a proprietatilor fizico-chimice a medicamentelor, aditivilor alimentari, cosmeticelor si agrochimicalelor, prin incapsularea acestora in ciclodextrine solubile in apa, biodegradabile si relative ieftine, a fost exploatat de mult timp. Ciclodextrinele (CD), sunt oligozaharide ciclice formate din 6 ( $\alpha$ -CD), 7 ( $\beta$ -CD) sau 8 ( $\gamma$ -CD) unitati de glucopiranoza, avand o cavitate interna hidrofoba si o suprafata exterioara hidrofila. Ciclodextrinele pot forma complexi de incluziune prin inglobarea totala sau partiala a unei biomolecule in cavitatea hidrofoba. Acest proces de complexare nu implica existenta unor legaturi covalente, iar in conditii fiziologice complexii disociaza, biomoleculele libere fiind intr-un echilibru rapid cu cele legate in interiorul cavitatii. De asemenea, majoritatea medicamentelor administrate se leaga de albumina serica din sange, aceasta fiind principalul mijloc de transport al biomoleculilor in organismul uman. Este bine cunoscut faptul ca transportul, metabolismul si eficacitatea medicamentelor este puternic afectata de legarea acestora de albumina serica umana (HSA). Din acest motiv, studiul interactiunii medicamentelor cu HSA precum si determinarea parametrilor caracteristici procesului de legare, joaca un rol important in studiile de farmacologie si farmacocinetica. In cele ce urmeaza vom prezenta rezultatele obtinute in cadrul acestui proiect prin intermediul unor tehnici spectroscopice si calorimetrice, privind caracterizarea fizico – chimica a unor complexi de incluziune cu CD, respective interactiunea unor biomolecule cu albumina serica umana.

#### **A) Caracterizarea prin spectroscopie de RMN a complexilor de incluziune ai $\beta$ -ciclodextrinei cu agenti anti-inflamatorii nesteroidieni (NSAID)**

Agentii anti-inflamatorii nesteroidieni reprezinta una dintre cele mai utilizate grupe de medicamente din lume. Cu toate acestea, marea majoritate a acestor medicamente avand in structura chimica grupari acide (carboxilice), conduc la o solubilitate apoasa si biodisponibilitate extrem de scazuta, sau chiar la o instabilitate chimica. In plus, in cazul administrarii orale a unor doze mari si repetate, aceste medicamente pot produce ulceratii sau chiar sangerari ale tractului gastrointestinal. Metoda cea mai des utilizata de amplificare a solubilitatii apoase si de inlaturare a efectelor secundare nedorite, o reprezinta incapsularea acestor agenti in ciclodextrine.

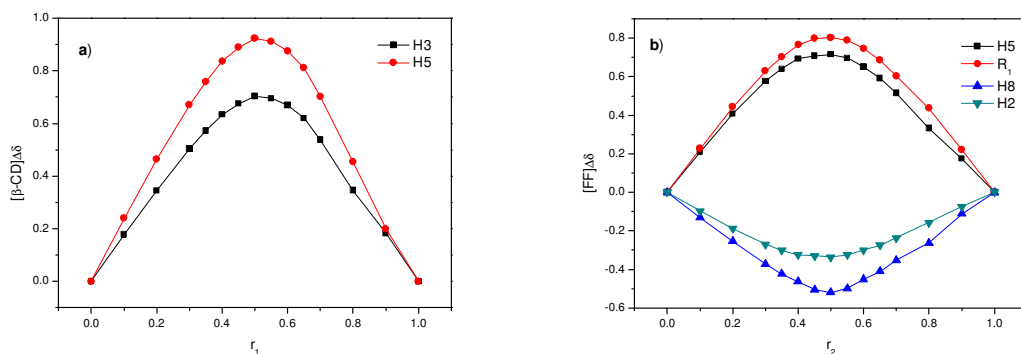
##### **A1) Studiul $^1\text{H}$ NMR al complexilor de incluziune ai acidului tolfenamic si flufenamic cu $\beta$ -CD**

Acidul tolfenamic (TA) si acidul flufenamic (FF) sunt agenti anti-inflamatorii nesteroidieni, derivati ai acidului antranilic. Ei sunt utilizati pe scara larga ca analgezice si antipiretice, inhiband biosinteza prostaglandinei. La fel ca majoritatea NSAID, TA si FF (Fig.1), sint foarte putin solubili in apa. Din aceasta cauza, solubilitatea lor apoasa da nastere unor dificultati majore in procesul de formulare farmaceutica, conducand la biodisponibilitati variabile. Acesta a fost motivul pentru care am abordat studiul procesului de incluziune al TA si FF cu  $\beta$ -CD, prin  $^1\text{H}$  NMR. S-a determinat stoichiometria complexilor de incluziune pe baza metodei variatiei continue a deplasarilor chimice induse a protonilor moleculei gazda ( $\beta$ -CD) respectiv oaspete (TA si FF).



**Fig.1** TA:  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{Cl}$  FF:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CF}_3$ .

Solutiile stoc au fost pteparate in  $\text{D}_2\text{O}$  avand o concentratie de 10 mM. Pentru disolutia TA si FF, in solutiile stoc s-a introdus  $5\mu\text{l/ml}$  de NaOD 40%. Solutiile de TA: $\beta$ -CD si FF: $\beta$ -CD s-au preparat prin amestecarea a doua solutii ( $\beta$ -CD cu TA sau FF) la volum constant dar in proportii diferite, astfel incat sa fie acoperit un domeniu complet ( $0 < r < 1$ ) de fractii molare  $r = [X] / ([G] + [H])$ , unde  $[X] = [H]$  sau  $[G]$  reprezinta concentratiile molare ale moleculelor gazda ( $\beta$ -CD) sau oaspete (TA sau FF). Masuratorile de RMN s-au efectuat pe un spectrometru BRUKER - 500MHz la temperatura de 298 K. Deplasarile chimice s-au raportat fata de TMS Spectrele 2D ROESY s-au achizitionat cu suprimarea semnalului apei reziduale. Fiecare spectru consta dintr-o matrice 4K/4K, acoperind un domeniu spectral de 4000 Hz. Procesul de incluziune al TA si FF in cavitatea  $\beta$ -CD a fost pusa in evidenta prin modificarea valorilor deplasarii chimice a unor protoni apartinand gazdei sau moleculei oaspete, in comparatie cu valorile deplasarii chimice ale acestor protoni in componentii aflati in stare libera. S-a pus in evidenta faptul ca in prezenta  $\beta$ -CD, aproape toti protonii moleculelor oaspete sunt afectati, fara o preferinta anume pentru un anumit ciclu aromatic. Aceste rezultate RMN privind sistemele investigate, implica doua posibilitati: (i) prezenta a doua tipuri de complexi 1:1 prin includerea ambelor cicluri aromatice in cavitatea CD, adica o **complexare bimodala**, sau (ii) formarea unui complex avind stoichiometrie 1:2. Analizand structura chimica a TA sau FF, includerea simultana a unei molecule oaspete in 2 molecule de  $\beta$ -CD pare a fi steric nefavorabila. Pentru elucidarea situatiei am aplicat metoda variatiei continue. Conform acestei metode, daca o marime fizica ce contine variatia deplasarii chimice,  $\Delta\delta$ , este reprezentata in functie de fractia molară a moleculei oaspete sau gazda,  $r$ , maximul ei va apare la  $r_1 = m/(m+n)$  or  $r_2 = n/(m+n)$  unde  $m$  si  $n$  sunt rapoartele molare ale  $\beta$ -CD si ale biomoleculii (TA sau FF) in complexul  $(\text{biomolecula})_n:(\beta\text{-CD})_m$ . Aceasta metoda a fost aplicata tuturor protonilor apartinand moleculelor investigate si s-au obtinut rezultate aproape identice. Pentru conciziune, prezentam doar cazul anumitor protoni apatinand sistemului  $\beta$ -CD:FF



**Fig.2** Grafice Job pentru protonii a)  $\beta$ -CD , respectiv b) FF , din complexul FF:

In absolut toate cazurile, graficele Job prezinta un maxim la  $r = 0.5$ , indicand existenta unor complexi avand simetrie 1:1. Ipoteza complexarii bimodale a fost confirmata de spectrele 2D ROESY ale complexilor  $\beta$ -CD:TA si  $\beta$ -CD:FF. Ele pun in evidenta cross-peak-uri intre protonii H3 si H5 ai  $\beta$ -CD, situati in interiorul cavitatii si protoni apartinand ambelor cicluri aromatice ale TA sau FF, demonstrand astfel penetrarea cavitatii moleculei de  $\beta$ -CD de catre ambele cicluri aromatice ale biomoleculelor investigate. Este bine cunoscut faptul ca in cazul unei **complexari bimodale** nu se pot determina exact constantele microscopice de asociere  $K_{X'Y}$  si  $K_{XY}$  ale celor doi izomeri. Pentru a evalua ordinul de marime ale celor 2 constante de stabilitate, am tratat independent cazul celor doi izomeri, considerand separat cei doi complexi 1:1. Aceasta abordare reprezinta o aproximare destul de grosiera, dar permite evaluarea ordinului de marime a celor doua constante microscopice de asociere. Rezultatele obtinute sunt prezentate in Tabel 1.

Tabel 1. Valorile constantelor microscopice de asociere precum si a constantei macroscopice  $K_{1:1}$  pentru cele doua sisteme investigate.

Sistem	$K_{X'Y} (M^{-1})$	$K_{XY} (M^{-1})$	$K_{1:1} = K_{X'Y} + K_{XY} (M^{-1})$
TA: $\beta$ -CD	144.1	151.9	296.
FF: $\beta$ -CD	647.1	802.6	1449.7

Comparand rezultatele obtinute, concluzionam ca FF este mult mai puternic legat de  $\beta$ -CD decat TA. De asemenea consideram ca procesul de complexare afecteaza in principal gruparea metil-fenil sau trifluoremetil-fenil si mai putin gruparea caracteristica acidului benzoic.

*Rezultatele obtinute, constituie subiectul unei lucrari acceptate spre publicare in J. Molecular Structure*

## A2) Studiul $^1H$ NMR al complexarii flurbiprofenului cu $\beta$ -CD

Procesul de complexare dintre flurbiprofen racemic si  $\beta$ -CD in solutie apoasa a fost investigat prin spectroscopie 1D si 2D RMN. In prezenta  $\beta$ -CD, protonii aromatici ai flurbiprofenului sunt cei mai afectati sugerand o implicare puternica a grupurilor fenil in mecanismul de incluziune. Pe baza metodei variatiei continue a deplasarilor chimice induse atat pentru protonii moleculei gazada ( $\beta$ -CD) cat ai celei oaspete (flurbiprofen) s-a dedus **stoichiometria de 1:1 a complexului**. Constanta de asociere  $K_a$  a complexului de incluziune a fost determinata ca fiind  $K_a = 2483.8 M^{-1}$ . Pe de alta parte, semnalele RMN corespunzatoare protonilor atasati gruparii carboxil, sunt despicate in prezenta  $\beta$ -CD, indicand astfel existenta unui proces de **diferentiere enantiomerică**. S-au determinat *constantele aparente de asociere* pentru cei doi enantiomeri, obtinandu-se valorile  $K_L = 712 M^{-1}$  respectiv  $K_R = 146 M^{-1}$ . Rezultatul obtinut indica o mult mai mare stabilitate pentru complexul de incluziune al  $\beta$ -CD cu enantiomerul **L** decat cel format cu enantiomerul **R**. Mentionam de asemenea ca semnalele RMN corespunzatoare protonilor flurbiprofenului situati in interiorul cavitatii nu sunt despicate, fapt ce conduce la concluzia ca ambii enantiomeri adopta in interiorul cavitatii o conformatie identica. Deosebirea dintre cei doi enantiomerici se manifesta doar pentru protonii atasati gruparii carboxil care se afla situata in zona gruparilor hidroxil primare. Pe baza spectroscopiei 2D RMN si anume NOE in sistemul rotitor (ROESY), s-a stabilit geometria complexului de incluziune flurbiprofen: $\beta$ -CD in faza lichida (Fig.3). Rezultatele obtinute sugereaza ca molecula de flurbiprofen penetreaza cavitatarea  $\beta$ -CD cu gruparea carboxil prin latura gruparilor hidroxil primare, situind gruparea fenil in apropierea gruparilor hidroxil secundare. Structura propusa difera foarte putin de

structura cristalina a complexului de incluziune dintre flurbiprofenul racemic si  $\beta$ -CD, obtinuta pe baza experimentelor de difractie cu raze X.

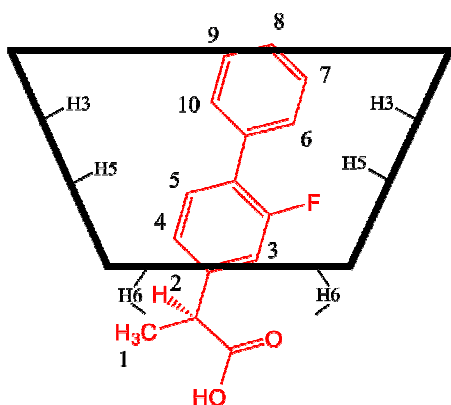


Fig.3 Geometria complexului de incluziune Flurbiprofen: $\beta$ -CE in solutie apoasa.

*Rezultatele obtinute, constituie subiectul unei lucrari trimise spre publicare la J. Incl. Phen. Macrocl. Chem.*

### A3) Investigarea procesului de incluziune al cicluronului in ciclodextrine, prin difractie de raze X, rezonanta magnetica nucleara (RMN) si calorimetrie de titrare izoterma (ITC)

S-a studiat procesul de complexare dintre cicluron, un ierbicid derivat din uree si ciclodextrinele naturale  $\alpha$ -,  $\beta$ - si  $\gamma$ -CD, atat in stare solida cat si lichida, utilizand tehnici complementare de investigare care au permis o mai buna aprofundare a procesului de complexare de tip oaspete-gazda. In cadrul acestei investigatii s-a determinat structura cristalina atat a cicluronului necomplexat cat si a complexului lui de incluziune cu  $\beta$ -CD prin intermediul difractiei de raze X pe pulberi. In plus fata de investigatiile efectuate in starea solida, am utilizat spectroscopia RMN si ITC pentru a investiga formarea complexilor de incluziune in solutii apoase. Spectroscopia RMN a fost utilizata in vederea determinarii stoichiometriei complexilor de incluziune si a constantelor lor de asociere. Calorimetria de titrare izoterma (ITC) a permis determinarea constantelor de asociere precum si a parametrilor termodinamici ( $\Delta H$ ,  $\Delta H$  si  $\Delta G$ ) asociati interactiunilor intermoleculare in solutie. Datele caracteristice celor doua structuri cristaline investigate sunt sintetizate in Tabelul 2.

Tabel 2. Structura cristalina a cicluronului si a complexului acestuia cu  $\beta$ -CD

	<b>Cicluron</b>	<b>Complexul <math>\beta</math>-CD: cicluron</b>
Formula chimica	$C_{11}H_{22}N_2O$	$C_{42}H_{70}O_{35}C_{11}H_{22}N_2O \cdot 11.5H_2O$
Masa formulei	198.31	1540.47
Sistem cristalin	Ortorombic	Triclinic
Grup spatial	Pbca	P1
$a(\text{\AA})/\alpha(^{\circ})$	10.673/90	15.320/79.549
$b(\text{\AA})/\beta(^{\circ})$	10.180/90	15.464/85.134
$c(\text{\AA})/\gamma(^{\circ})$	21.547/90	15.979/74.971
Volum ( $\text{\AA}^3$ )/Z	2341.4/8	8825.9/1

Experimentele de titrare RMN au permis construirea graficelor Job, care prezenta pentru toate cele trei tipuri de complexi de incluziune, un maxim la  $r = 0.5$ , adica existenta unei stoichiometrii 1:1.

Constantele de asociere in cazul complexilor  $\alpha$ CD-cicluron si  $\beta$ CD-cicluron s-au determinat pe acelasi set de probe utilizat la determinarea stoichiometriei. In cazul  $\gamma$ CD-cicluron s-a preparat un set nou de probe in care concentratia de cicluron a fost de 2.5 mM iar cea de  $\gamma$ CD a variat intre 0 si 40mM. Constantele de asociere s-au calculate utilizand programe proprii de fitare neliniara a variatiei deplasarii chimice a liniilor RMN ale cicluronului respective ciclodextrinei. Rezultatele obtinute sunt:

$$K_{\alpha\text{CD}} = 228 \text{ M}^{-1} \quad K_{\beta\text{CD}} = 3254 \text{ M}^{-1} \quad K_{\gamma\text{CD}} = 155 \text{ M}^{-1}$$

Schimbul de caldura rezultat in urma complexarii cicluronului cu cele trei tipuri de CD, s-a masurat prin intermediul unui Nano ITC. In fiecare caz s-a obtinut o izoterma de legare, functie de raportul molar al celor doi componenti. Constantele de asociere precum si parametrii termodinamici caracteristici s-au determinat in ipoteza unei stoichiometriei 1:1. Rezultatele obtinute sunt prezentate in Tabelul 3.

Tabel 3. Constantele de stabilitate si parametrii termodinamici caracteristici procesului de complexare

Sistem	K (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	T $\Delta S$ (kJ/mol)
$\alpha$ -CD	459 $\pm$ 7	-15 $\pm$ 5	-2.0 $\pm$ 0.1	13.2
$\beta$ -CD	4753 $\pm$ 31	-21 $\pm$ 9	-8.9 $\pm$ 0.1	12.1
$\gamma$ -CD	74 $\pm$ 1	-11 $\pm$ 1	5.68 $\pm$ 0.01	16.3

*Rezultatele obtinute au fost publicate in **Supramolecular Chem.** 24, 406 – 414 (2012)*

## **B) Studiul interactiunilor biomolecule – albumina serica umana (HSA), prin spectroscopie de fluorescenta si calorimetrie de titrare izoterma (ITC).**

### **B1) Natura artefactuala a legarii stavudinei de HSA**

Interactiunea dintre stavudina, un medicament anti – HIV, si HSA a fost investigat prin spectroscopie de fluorescenta si ITC. Procesul de “*inghetare*” al fluorescentei albuminei in prezenta stavudinei prezinta o buna liniaritate. Analizand aceste date s-a obtinut pentru constanta de disociere valoarea  $K_a = (18.18 \pm 0.46) \times 10^{-5} \text{ M}$ . Cu toate acestea, datorita rezultatelor contradictorii obtinute in experimentele ITC, datele de fluorescenta au fost testate la influenta efectului de filtrare intern. Pe baza datelor de spectroscopie UV/VIS, intensitatile observate ale fluorescentei au fost corectate. In final s-a concluzionat, in concordanta cu rezultatele obtinute prin ITC, ca procesul de legare al stavudinei de HSA este neglijabil, iar procesul de “*inghetare*” al fluorescentei albuminei este in totalitate cauzat de catre efectul de filtru intern.

*Rezultatele “in extenso” vor apare in **J. Pharm. Biomed. Anal.** 72, 134 – 138 (2013)*

Director proiect,

