

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Studiul experimental și teoretic
al unor interacții moleculare

Conducător științific,

Prof. Dr. Mihaela Hillebrand

Doctorand,

Sandu Romică

2012

CUPRINS*

INTRODUCERE.....	6
PARTEA I	
Capitolul 1 GENERALITĂȚI	
TERMODINAMICA INTERACȚIEI LIGAND-MACROMOLECULĂ.....	7
Capitolul 2 SISTEME STUDIAȚE10	
2.1 CICLODEXTRINE.....	10
2.2 ALBUMINA SERICĂ UMANĂ.....	14
2.3 LIGANZI.....	15
Capitolul 3 METODE EXPERIMENTALE APLICATE ÎN STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND-MACROMOLECULĂ 16	
3.1 TITRAREA CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ.....	16
3.1.1 TEHNICA ITC.....	16
3.1.2 TRATAREA CANTITATIVĂ A DATELOR ITC.....	19
3.1.3 OPTIMIZAREA EXPERIMENTULUI ITC.....	23
3.2 SPECTROSCOPIA DE DICROISM CIRCULAR.....	25
3.3 METODE TEORETICE APLICATE.....	26
3.3.1 METODA DFT.....	26
3.3.2 METODA TDDFT.....	27
3.3.3 SIMULAREA DE DINAMICĂ MOLECULARĂ.....	27
PARTEA a II-a (rezultate originale)	
Capitolul 4 METODE EXPERIMENTALE SI TEORETICE APLICATE ÎN STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND-ALBUMINĂ ȘI LIGAND-CICLODEXTRINE..... 29	
4.1 TITRAREA CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ.....	29
4.2 SPECTROSCOPIA DE DICROISM CIRCULAR.....	31
4.3 MODELAREA TEORETICĂ A INTERACȚIEI LIGAND-CICLODEXTRINE.....	32
4.3.1 MODELAREA LIGANZILOR PRIN METODELE DFT ȘI TDDFT.....	32
4.3.2 SIMULAREA DE DINAMICĂ MOLECULARĂ A COMPLEXILOR DE INCLUZIUNE.....	32
Capitolul 5 STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND-CICLODEXTRINE PRIN SPECTROSCOPIE DE DICROISM CIRCULAR..... 33	
5.1 Date experimentale.....	33
5.1.1 INTRODUCERE.....	33
5.1.2 MATERIALE ȘI METODE.....	34
5.1.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	35
10,10-dioxid-fenoxatiina.....	35
2-brommetil-10,10-dioxid-fenoxatiina.....	39

2-acetil-10,10-dioxid-fenoxatiina.....	43
5.2 Modelarea teoretică a liganzilor la nivel DFT. Simularea spectrului de dicroism indus prin metoda TDDFT.....	47
5.2.1 INTRODUCERE.....	47
5.2.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	49
10,10-dioxid-fenoxatiina.....	49
2-brommetil-10,10-dioxid-fenoxatiina.....	53
2-acetil-10,10-dioxid-fenoxatiina.....	59
5.3 Modelarea teoretică a complexelor de incluziune prin simularea de dinamică moleculară.....	65
5.4 CONCLUZII.....	66
 Capitolul 6 STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND–CICLODEXTRINE PRIN TITRARE CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ.....	 69
6.1 INTRODUCERE.....	69
6.2 MATERIALE ȘI METODE.....	70
6.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	70
10,10-dioxid-fenoxatiina.....	70
Atenolol.....	74
3-carboxi-5,6-benzocumarina.....	79
6.4 CONCLUZII.....	81
 Capitolul 7 STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND–ALBUMINĂ PRIN TITRARE CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ.....	 82
7.1 INTRODUCERE.....	82
7.2 MATERIALE ȘI METODE.....	83
7.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	84
3-carboxi-5,6-benzocumarina.....	84
3-carboxi-7-metoxicumarina.....	88
7.4 CONCLUZII.....	89
CONCLUZII GENERALE.....	90
LISTA LUCRĂRILOR ELABORATE ÎN CADRUL TEZEI.....	92
BIBLIOGRAFIE.....	93
ANEXE.....	100

*Numerotarea capitolelor, figurilor și tabelor este cea din teza de doctorat.

INTRODUCERE

Teza de doctorat este structurată în două părți: Partea Teoretică, prezentată în cadrul a 3 capitole și Partea Originală, derulată pe parcursul a 4 capitole, în care sunt prezentate rezultatele studiilor originale efectuate.

Primul capitol și cel de al doilea realizează o descriere a termodinamicii interacției ligand-macromoleculă și a sistemelor studiate.

În cadrul celui de-al treilea capitol, în primele două subcapitole sunt prezentate tehnicile experimentale utilizate în cadrul tezei: titrarea calorimetrică izotermă și spectroscopia de dicroism circular. În ultimul subcapitol al părții teoretice sunt prezentate metodele teoretice aplicate în modelarea liganzilor și a complexilor de incluziune. Toată partea teoretică a fost scrisă conform bibliografiei studiate și menționată în prezenta lucrare. Referiri la această bibliografie sunt făcute și în cadrul discuțiilor din partea experimentală.

REZULTATE ORIGINALE

Teza de doctorat a avut următoarele obiective redate în cele 4 capitole ale părții originale:

- 1) Caracterizarea prin spectroscopie de dicroism circular a interacției unor derivați de fenoxatiină cu ciclodextrinele; modelarea teoretică a liganzilor prin metodele DFT și TDDFT; modelarea teoretică a complexilor de incluziune prin simularea de dinamică moleculară.
- 2) Caracterizarea prin titrare calorimetrică izotermă a interacției unor derivați de fenoxatiină și cumarină și a atenololului cu ciclodextrinele.
- 3) Caracterizarea prin titrare calorimetrică izotermă a interacției unor derivați de cumarină cu albumina serică umană.

Teza se încheie cu capitolul de concluzii care cuprinde principalele rezultate obținute, urmat de lista lucrărilor elaborate în cadrul tezei, bibliografia folosită și anexe. În anexe sunt cuprinse tabele și figuri care sunt menționate în textul tezei.

Capitolul 1

GENERALITĂȚI

TERMODINAMICA INTERACȚIEI LIGAND-MACROMOLECULĂ

Caracterizarea termodinamică a unei reacții de asociere moleculară, presupune a determina ΔG , ΔH , ΔS , K_{eq} și ΔC_p la o temperatură de referință dată [1].

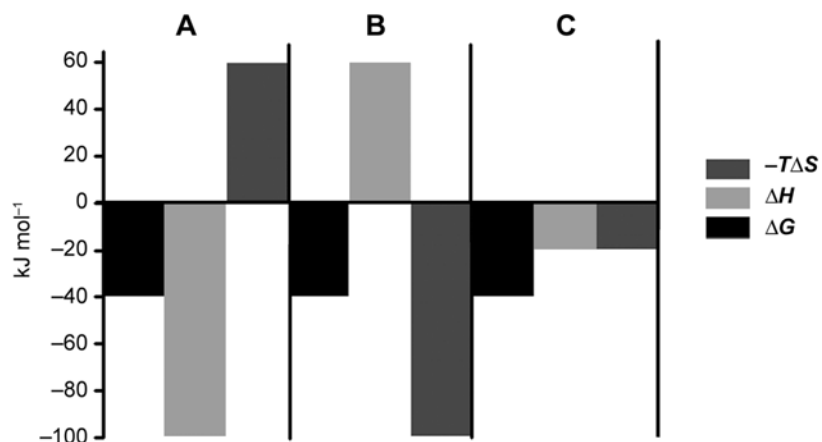


Fig. 1 O diagramă schematică arătând diferite profile termodinamice care pot fi observate, pentru tipuri distincte de interacții moleculare frecvent observate în biologie: (A) un nivel ridicat de legături de hidrogen, alături de modificări conformaționale; (B) legarea este dominată de interacții hidrofobe; (C) o contribuție mică favorabilă din legături de hidrogen, împreună cu o contribuție hidrofobă [Ref. 2].

Capitolul 2

SISTEME STUDIATE

2.1 CICLODEXTRINE

Ciclodextrinele cele mai studiate au ciclurile formate din 6-8 molecule de glucoză unite prin legături α 1-4 glicozidice, fiind cunoscute sub denumirea de α-, β- și γ-ciclodextrină. Acești compuși sunt capabili de a forma complexi de incluziune cu molecule mici de liganzi [9, 10].

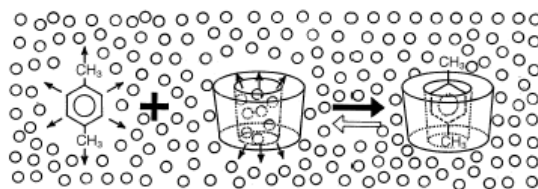


Fig. 3 Schematizare a procesului de incluziune a unui ligand în cavitatea ciclodextrinei (ref. 14).

2.2 ALBUMINA SERICĂ UMANĂ

Albumina serică umană (HSA), este cea mai abundentă proteină în plasma sanguină, având rolul fiziologic de a transporta acizi grași, lizolecitină, bilirubină, hem, hormoni, medicamente, etc. Această capacitate de transport se datorește mai multor situsuri de legare a multor molecule organice și anorganice, pe care albumina le prezintă [16-19].

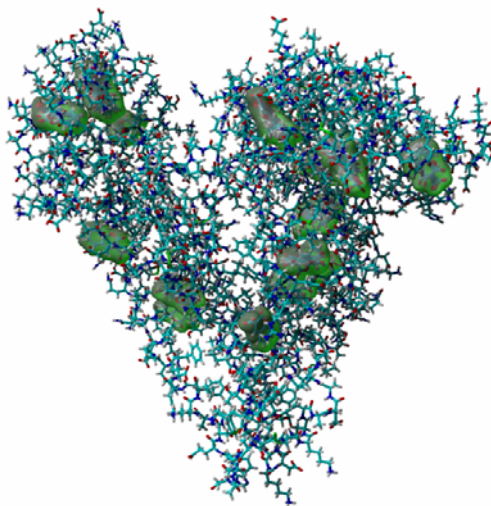
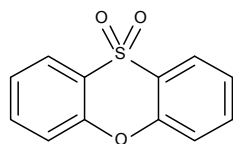


Fig. 4 Câteva posibile situsuri de legare a acidului 3-carboxi-cumarinic la HSA, evidențiate prin docare (minimizarea structurii, docarea și vizualizarea au fost realizate cu programul Yasara Structure. Structura inițială a HSA a fost structura 1e7i.pdb sau 1e7e.pdb din Banca de Date pentru Proteine, Protein Data Bank).

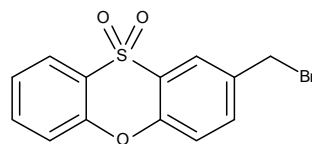
2.3 LIGANZI

Liganzii studiați în cadrul tezei aparțin la trei clase:

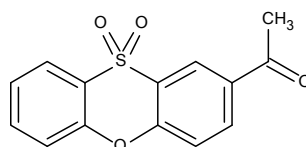
- Derivați de fenoxatiină:



10,10-dioxid-fenoxatiina

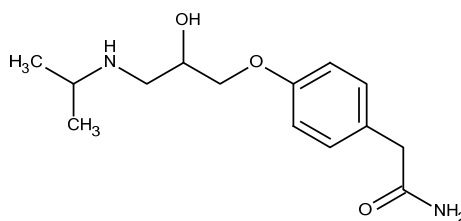


2-brommetil-10,10-dioxid-fenoxatiina



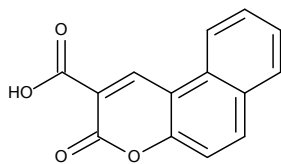
2-acetil-10,10-dioxid-fenoxatiina

- Medicamente betablocante:

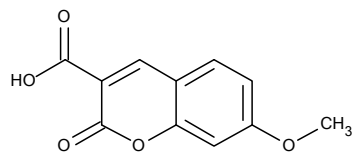


Atenololul

- Derivați de cumarină:



3-carboxi-5,6-benzocumarina



3-carboxi-7-metoxicumarina

(Structurile moleculare au fost editate cu MarvinSchetch 5.10.3)

Capitolul 3

METODELE EXPERIMENTALE APLICATE ÎN STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND–MACROMOLECULĂ

3.1 TITRAREA CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ

3.1.1 Tehnica ITC

Un experiment ITC tipic implică injectarea secvențială, în cantități precise a soluției unui reactant în celula calorimetrică conținând celălalt reactant. Termogramele astfel obținute, pot fi analizate folosind Microcal Origin sau alte programe de regresie neliniară și apoi se obțin n , ΔH și K .

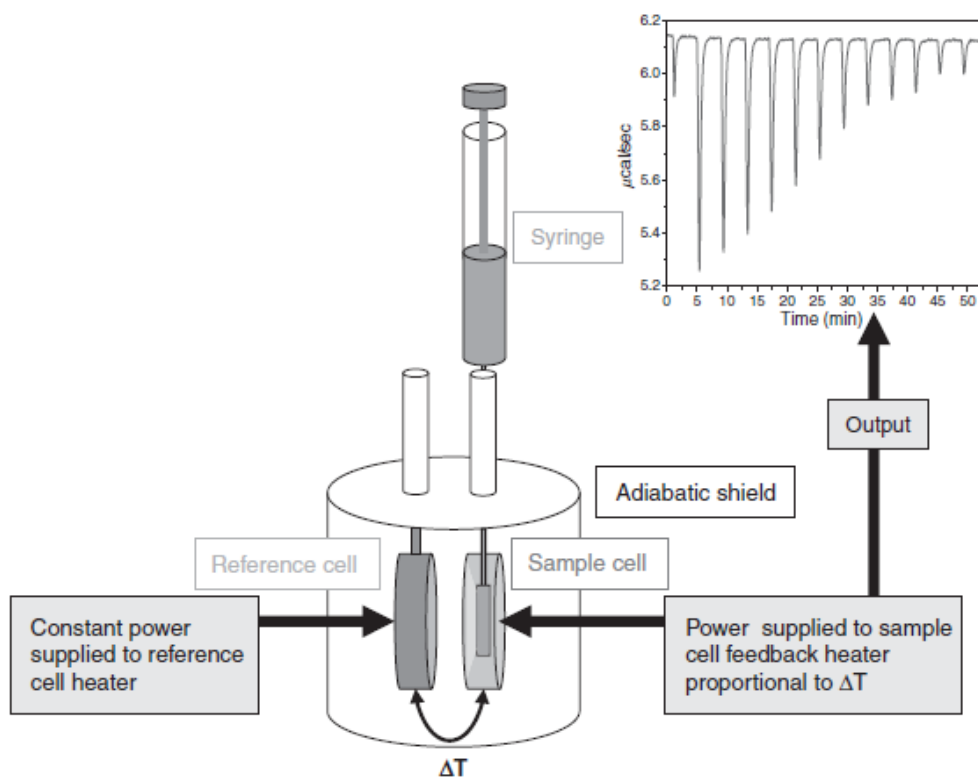


Fig. 5 Schematizare a unui calorimetru de titrare izotermă (ref: 21).

3.1.3 Optimizarea experimentului ITC

În planificarea unui experiment ITC, este important să alegem concentrații rezonabile pentru macromoleculă și ligand. Aceasta este cel mai ușor de făcut prin simularea termogramei presupunând sau făcând aprecieri rezonabile pentru K_{eq} și ΔH (cu toate că aprecierea lui ΔH este mai puțin critică).

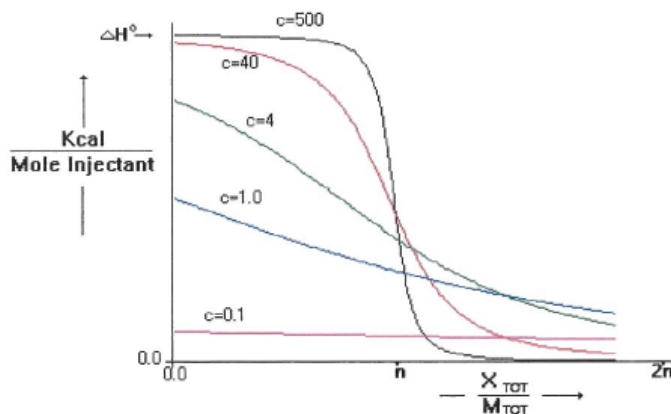


Fig. 8 Dependența formei izotermei de valoarea parametrului c (ref. 26).

Parametrul critic care determină forma izotermei de legare este o constantă adimensională c , stabilită de Wiseman et al în 1989 și care este produsul concentrației totale de macromoleculă din celula calorimetrică, $[M_{tot}]$, cu constanta de legare K_{eq} și parametrul stoechiometric n reflectând numărul situsurilor de legare ale macromoleculei.

$$c = K_{eq}[M_{tot}]n \quad (14)$$

Parametrul c trebuie să fie în intervalul $1 \leq c \leq 1000$, pentru ca reacția să poată fi măsurată direct prin ITC. Acest interval mai este denumit "fereastra K experimentală". Peste aceste valori titrările își pierd curbura lor caracteristică, devin indistinctibile una de cealaltă și lipsesc informațiile necesare pentru determinarea constantei de legare [22, 26].

3.3 METODE TEORETICE APLICATE

3.3.1 Metoda DFT

Metoda DFT (density functional theory – metoda funcționalei de densitate) pornește de la premiza că energia unei molecule poate fi determinată din densitatea de electroni în loc de o funcție de undă [45].

3.3.2 Metoda TDDFT

Metoda DFT se poate aplica numai stărilor fundamentale ale unui sistem molecular. Pentru simularea spectrelor electronice este necesară tratarea tranzițiilor de la starea fundamentală la o stare excitată, pentru care se folosește metoda dependentă de timp. Metoda TDDFT (time-dependent density functional theory – metoda funcționalei de densitate dependentă de timp) are o importanță majoră în studiul teoretic al spectrelor electronice, de absorbție, de dicroism circular electronic și de emisie și în studiul stărilor excitate, fiind probabil cea mai utilizată metodă [46-49].

Procedura de lucru începe cu optimizarea geometriei de echilibru a stării fundamentale printr-un calcul DFT. În urma unui calcul TDDFT la această geometrie, se obțin energiile de tranziție și tăria oscilatorului pentru un număr de tranziții $S_0 \rightarrow S_n$ (ales de utilizator), cât și puterea rotatorie corespunzătoare. Pornind de la acestea se pot reprezenta spectrele cu ajutorul unui program specializat, spre exemplu Gabedit [50].

3.3.3 Simularea de dinamică moleculară

În simulările de dinamică moleculară, un sistem de N atomi, interacționează între ei conform unei funcții de potențial $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$ iar mișcarea acestor atomi este redată prin ecuațiile de mișcare ale lui Newton: $M_i \partial^2 r_i / \partial t^2 = F_i$, $i=1 \dots N$.

Forțele sunt derivatele negative ale funcției de potențial: $F_i = -\partial V / \partial r_i$.

Ecuațiile sunt rezolvate simultan în pași mici de timp. Sistemul este executat astfel pentru o perioadă de timp, în care temperatura și presiunea să rămână la valorile cerute, iar coordonatele sunt scrise într-un fișier de ieșire la intervale regulate. Coordonatele ca o funcție de timp reprezintă o traiectorie a sistemului. După modificările inițiale, sistemul va ajunge, de obicei, la o stare de echilibru. Prin mediere pe o traiectorie de echilibru, multe proprietăți macroscopice poate fi extrase din fișierul de ieșire [51-54].

PARTEA a II-a (rezultate originale)

Capitolul 4

METODE EXPERIMENTALE UTILIZATE ÎN STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND–CICLODEXTRINE ȘI LIGAND–ALBUMINĂ

4.1 TITRAREA CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ

Experimentele de titrare au fost efectuate utilizând un microcalorimetru iTC200 (MicroCal Inc, Northampton, MA, S.U.A). Acest calorimetru este de tip compensare de putere și este proiectat pentru volume mici de soluții [31].

Celula pentru probă a fost încărcată cu 280 μL din soluția de titrat și seringă de titrare a fost încărcată cu 40 μL din soluția de titrant. Probele au fost degazate sub vid, înainte de a fi încărcate în ITC. Celula de referință a fost încărcată cu apă deionizată și degazată [33].

4.2 SPECTROSCOPIA DE DICROISM CIRCULAR

Spectrele de dicroism circular indus ICD au fost înregistrate la temperatura camerei cu un spectrofotometru Jasco J-815 CD. Constanta de legare a fost determinată din variația elipticității molare cu ajutorul metodei fitării celor mai mici pătrate a unor modele liniare și neliniare. Modelul liniar este bazat pe ec. (15) cunoscută sub numele de ecuația Scott [43]:

$$\frac{[G][CyD]d}{\Delta\theta} = \frac{[CyD]}{\Delta\psi} + \frac{1}{K\Delta\psi} \quad (15)$$

unde $\Delta\theta$ este diferența între elipticitățile experimentale ale ligandului în absența și în prezența CyD, d este lungimea cuvei, $\Delta\psi$ reprezintă diferența între coeficienții molari de elipticitate ai ligandului în starea complexată și liberă, $[CyD]$ este concentrația totală a ciclodextrinei, $[G]$ este concentrația totală a ligandului iar K este constanta de legare.

Modelul neliniar descris de Zsila *et al.* [44], corespunde ec. (16)

$$\Delta\theta = \frac{k}{2} \left([CyD] + [G] + K^{-1} - \sqrt{([CyD] + [G] + K^{-1})^2 - 4 \times [CyD] \times [G]} \right) \quad (16)$$

unde $\Delta\theta$ și K au același înțeles ca în ec. (16) iar k este corelat cu semnalul dicroic la complexare totală.

4.3 MODELAREA TEORETICĂ A INTERACȚIEI LIGAND– CICLODEXTRINE

4.3.1 MODELAREA LIGANZILOR PRIN METODELE DFT ȘI TDDFT

Geometriile cu cea mai joasă energie și structura liganzilor au fost obținute prin metoda DFT folosind programul Gaussian 03 [56], cu funcționala B3LYP sau PBE și câteva seturi de orbitale atomice de bază: 6-31G [57], 6-311G++(d,p) [58] și aug-cc-pVDZ [59].

Optimizările au fost efectuate luând în considerare apa ca solvent, în cadrul Modelului Continuum Polarizabil, PMC [60]. Calculele de orbitale moleculare (O.M.) au fost efectuate prin metodele DFT și TDDFT considerând diferiți conformeri posibili, caracterizați prin conformația planară sau îndoită a heterociclului și prin unghiul diedru τ care descrie poziția substituenților în raport cu heterociclul. Calculele TDDFT au fost efectuate pe geometria optimizată anterior.

4.3.2 SIMULAREA DE DINAMICĂ MOLECULARĂ A COMPLECȘILOR DE INCLUZIUNE.

Simularea de dinamică moleculară a fost efectuată folosind pachetul de programe Gromacs. Structura inițială pentru complexul 2:1 CyD-ligand a fost obținută prin docare cu Autodock. Câmpul de forță utilizat a fost OPLSAA (Optimized Potential for Liquid Simulations - All Atoms), cu sarcinile atomice parțiale calculate prin metoda Gasteiger. În simulare toți atomii și moleculele de apă sunt tratate în mod explicit. Traectoria a fost colectată peste 2000 ps și structura echilibrată a complexului solvatat într-o traectorie finală de 1000 ps a fost extrasă.

Capitolul 5

STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND–CICLODEXTRINE PRIN SPECTROSCOPIE DE DICROISM CIRCULAR

În acest capitol, se prezintă un studiu comparativ al procesului de incluziune a trei derivați din clasa fenoxatiinei, **10,10-dioxid-fenoxatiina**, derivatul 2-CH₂Br substituit **2-brommetil-10,10-dioxid-fenoxatiina** și derivatul derivatul 2-COCH₃ substituit **2-acetil-10,10-dioxid-fenoxatiina** cu α -, β -, γ - și 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina, folosind ca metodă experimentală spectroscopia de dicroism circular. Mai întâi, dependența de concentrația gazdei a semnalului dicroic indus, a fost analizată în termenii unui model neliniar care permite estimarea stoechiometriei și a constantelor de asociere ale complexului. Apoi, semnul benzilor dicroice induse, în corelație cu calculele TDDFT de polarizare a tranzițiilor electronice au fost folosite pentru a stabili modul axial sau ecuatorial de includere a oaspetelui în cavitatea gazdă.

5.1 Date experimentale

5.1.2 MATERIALE ȘI METODE

10,10-dioxid-fenoxatiina a fost achiziționată de la Aldrich iar 2-acetil-10,10-dioxid-fenoxatiina și 2-brommetil-10,10-dioxid-fenoxatiina au fost sintetizate după cum a fost descris anterior [95]. β - și γ -CyD au fost achiziționate de la Aldrich și 2-hidroxiopropil- γ -CyD (2-HP- γ -CyD) a fost un cadou de la Prof. Szejtli (CycloLab). Soluțiile au fost preparate folosind o soluție stoc de aproximativ 10^{-4} M derivat de fenoxatiină în metanol:apă (1:9 v/v), la care au fost adăugate părți din soluția de CyD. Concentrația de fenoxatiină a fost păstrată constantă. Spectrele de dicroism circular au fost înregistrate la spectrometrul JASCO J-815-CD în următoarele condiții: 1nm lățimea de bandă, timp de răspuns de 8 s, viteza de scanare de 50 nm/min, numărul de acumulări 5.

5.1.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII

10,10-dioxid-fenoxatiina (Phx-SO₂)

Spectrul de absorbție electronică al Phx-SO₂ în apă este prezentat în Fig. 10.

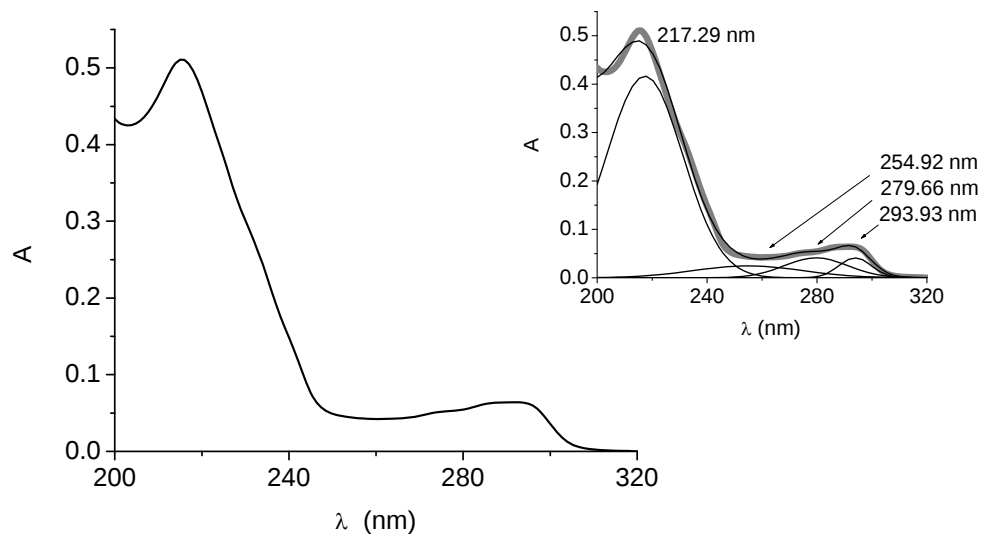


Fig. 10 Spectrul de absorbție al Phx-SO₂ și deconvoluția acestuia (în inserție, spectrul experimental în gri).

Phx-SO₂ prezintă în spectrul de absorbție electronică o bandă largă, nu foarte intensă, în intervalul 290-270 nm și o a doua bandă foarte intensă, la 220 nm. Deconvoluția spectrului UV (inserția A din Fig. 10), arată că prima bandă este de fapt, o suprapunere de trei benzi, cu maxime la 293.93, 279.66 și 254.92 nm.

Phx-SO₂ liberă în soluție nu prezintă semnal dicroic. Cu toate acestea, în prezența β-, γ- și 2-HP-γ-CyD, a fost înregistrat un semnal dicroic complex, generat de confinarea ligandului în cavitatea CyD și de asimetria cavității și care atestă procesul de incluziune. Ca un exemplu, spectrul ICD obținut în prezența β-CyD este prezentat în Fig. 11. În cazul α-CyD, ciclodextrina cu cavitatea cea mai mică, semnalul ICD înregistrat a fost foarte scăzut și nu a fost considerat în continuare. Constantele de asociere au fost estimate cu ajutorul unui model neliniar caracterizat prin ec. 16 [44]. Cele mai bune fitări obținute pentru Phx-SO₂ sunt prezentate în Fig. 14 folosind valorile experimentale de la 267 nm și 218 nm. Rezultatul atestă formarea de complecși 1:1. Constantele de asociere obținute pentru interacția Phx-SO₂ cu β-, γ- și 2-HP-γ-CyD sunt incluse în Tab. 3.

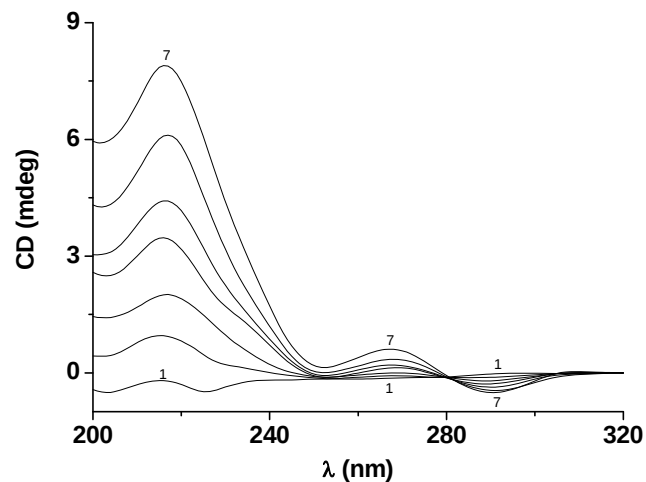


Fig. 11 Spectrele ICD ale Phx-SO₂ în prezența unei concentrații crescătoare a β-CyD: 1) 0,0 M; 2) $2,41 \times 10^{-4}$ M; 3) $5,57 \times 10^{-4}$ M; 4) $1,07 \times 10^{-3}$ M; 5) $1,49 \times 10^{-3}$ M; 6) $2,27 \times 10^{-3}$ M; 7) $4,57 \times 10^{-3}$ M. [Phx-SO₂] = $4,15 \times 10^{-5}$ M.

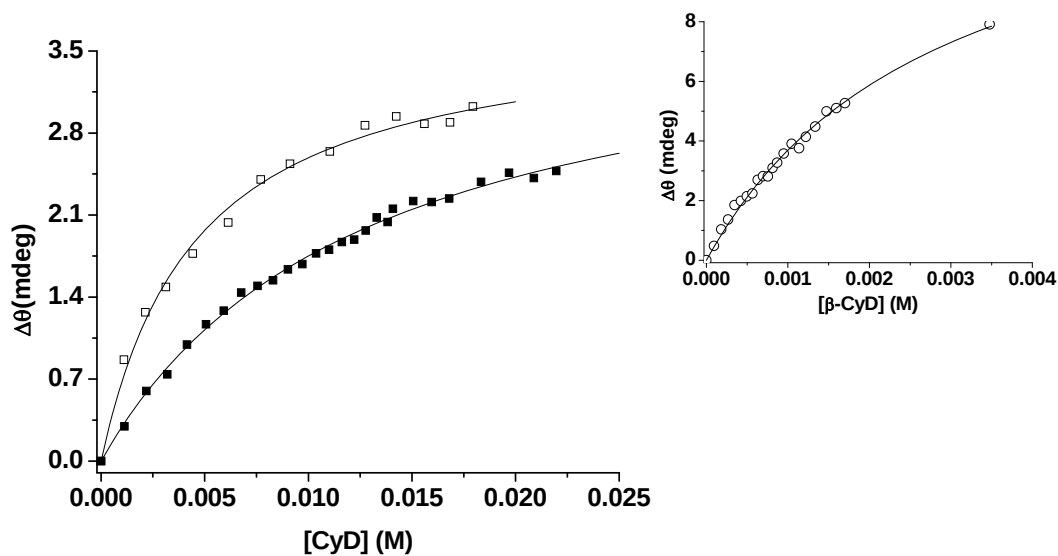


Fig. 14 Cele mai bune fitări obținute pentru complexii de incluziune 1:1 ai Phx-SO₂ cu γ-CyD (□) și 2-HP-γ-CyD (■) utilizând modelul neliniar (citiri experimentale la 267 nm). Inserție: cele mai bune fitări obținute pentru complexii 1:1 ai Phx-SO₂ cu β-CyD (○) (citiri experimentale la 218 nm).

Tab. 3 Constante de asociere (K) ale Phx-SO₂ cu β -, γ - și 2-HP- γ -CyD. R²-coeficient de corelație.

CyD	Phx-SO ₂	
	K (M ⁻¹)	r ²
β	357 ± 28	0.991
γ	223 ± 17	0.993
2-HP- γ	80 ± 4	0.997

Datele din Tab. 3 arată că, pentru fenoxatiinsulfona nesubstituită, constanta de asociere scade de la β -CyD la γ - și 2-HP- γ -CyD, ciclodextrinele cu cavitatea mai mare.

2-brommetil-10,10-dioxid-fenoxatiina (Phx-SO₂-CH₂Br)

Spectrul de absorbție electronică al Phx-SO₂-CH₂Br în apă arată că atât substituentul cât și poziția substituită, perturbă doar foarte puțin sistemul electronic al ciclului.

Ca și în cazul Phx-SO₂ nu avem semnal dicroic pentru compusul liber în soluție, ca urmare a medierii rapide la zero a mișcării flip-flap a heterociclului. În cazul compusului Phx-SO₂-CH₂Br, lipsa unui semnal dicroic reflectă de asemenea și rotația liberă a grupării CH₂Br. Aceste observații experimentale vor fi corelate cu calculele teoretice. În prezența β -, γ - și 2-HP- γ -CyD, a fost înregistrat un semnal dicroic complex. Spectrele ICD obținute în prezența β -CyD sunt prezentate în Fig 16. În cazul α -CyD, ciclodextrina cu cavitatea cea mai mică, semnalul ICD înregistrat a fost foarte scăzut și nu a fost considerat în continuare. Rezultatele atestă formarea de complexi 1:1. Constantele de asociere sunt incluse în Tab. 4.

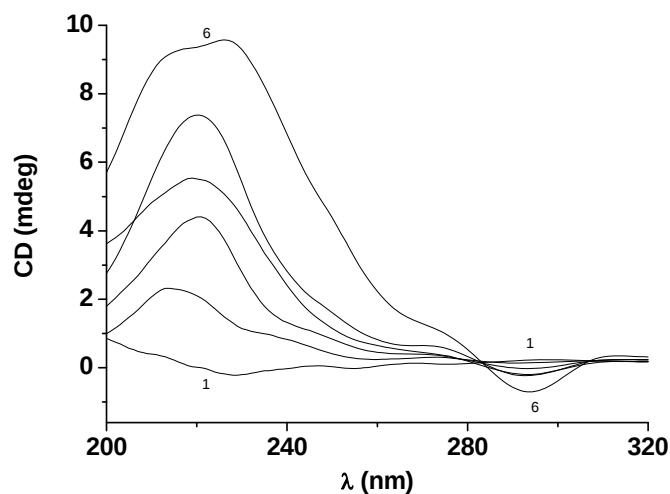


Fig. 16 Spectrul ICD al Phx-SO₂-CH₂Br în prezența unei concentrații crescătoare a β-CyD: 1) 0,0 M; 2) 1,42×10⁻⁴ M; 3) 4,05×10⁻⁴ M; 4) 7,52×10⁻³ M; 5) 1,05×10⁻⁴ M; 6) 5,26×10⁻³ M. [Phx-SO₂-CH₂Br] = 7,36×10⁻⁵ M.

Tab. 4 Constante de asociere (*K*) ale Phx-SO₂-CH₂Br cu β-, γ- și 2-HP-γ-CyD. R²-coeficient de corelație.

CyD	Phx-SO ₂ -CH ₂ Br	
	<i>K</i> (M ⁻¹)	r ²
β	363 ± 25	0.994
γ	113 ± 5	0.996
2-HP-γ	198 ± 26	0.987

Datele din Tab. 4 arată următoarele aspecte. Constanta de asociere a Phx-SO₂-CH₂Br în prezența β-CyD este destul de asemănătoare cu cea a Phx-SO₂, în timp ce o inversare a tendinței valorilor au fost obținute pentru celelalte două ciclodextrine, adică o valoare mai mare pentru interacția cu 2-HP-γ-CyD în comparație cu cea cu γ-CyD.

2-acetil-10,10-dioxid-fenoxatiina (Phx-SO₂-COCH₃)

Spectrul de dicroism al Phx-SO₂-COCH₃ în prezența unei concentrații crescătoare de CyD este dat de β-CyD în Fig. 20. La o creștere treptată a concentrației β-CyD, sunt evidențiate două benzi pozitive la 280 nm și 259-262 nm, ultima fiind mult mai intensă. Benzile de dicroism au fost obținute pentru toate cele trei CyD utilizate, dar principalele caracteristici ale benzilor au fost oarecum diferite, reflectând probabil efectul dimensiunii cavității hidrofobe a CyD. Spectrele ICD înregistrate pentru concentrații similare ale celor trei CyD sunt prezentate în Fig. 21. Se poate observa că, în prezența 2HP-β-CyD, spectrul ICD se caracterizează prin două benzi pozitive, ca și în cazul β-CyD. Cu toate acestea, la aceeași concentrație de CyD, intensitățile relative ale acestor două benzi sunt diferite. În prezența 2HP-β-CyD doar banda de la 262 nm are o intensitate semnificativă, cealaltă bandă fiind observată doar ca un umăr. În același timp, un semnal de intensitate foarte scăzută este evidențiat în jurul valorii de 300 nm. O deconvoluție a spectrului de frecvențe ICD (fig. 21, inserție), conduce la pozițiile exacte ale celor trei benzi la 260 nm, 284 nm și 309 nm.

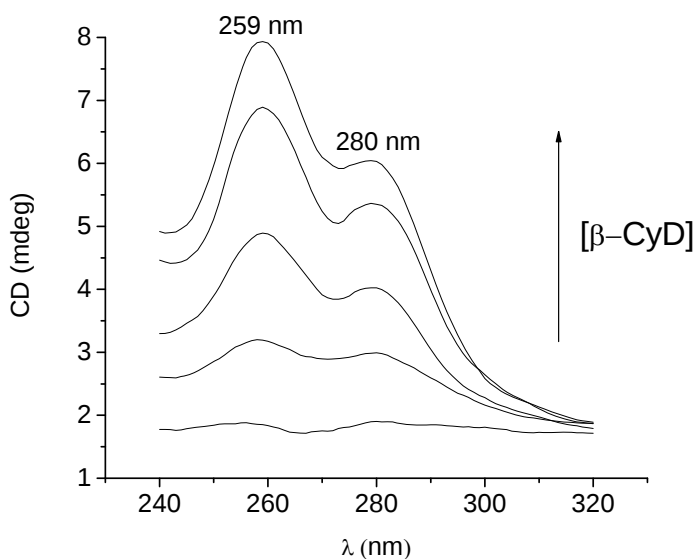


Fig. 20 Spectrul ICD al Phx-SO₂-COCH₃ în prezența unei concentrații crescătoare a β-CyD.

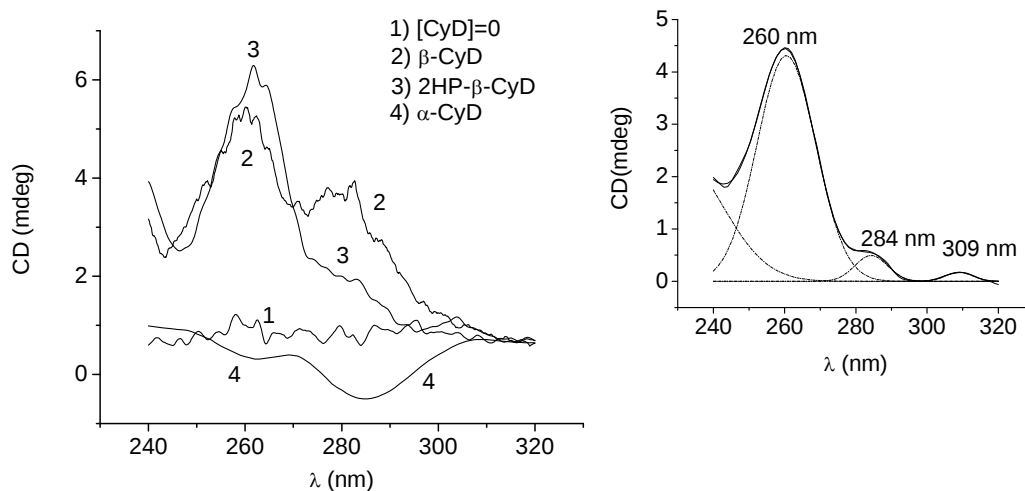


Fig. 21 Benzile de dicroism circular ale Phx-SO₂-COCH₃ în absența (1) și în prezența unor concentrații egale ale CyD (2, 3, 4). Inserție: deconvoluția spectrelor ICD netezite înregistrate în prezența 2HP-β-CyD.

În cazul α-CyD, ambele benzi principale ICD sunt evidențiate, dar cu semn negativ și intensități relative diferite, banda de la 285 nm fiind cea mai intensă.

Constantele de legare K, pentru complexii de incluziune cu β- și 2HP-β-CyD, enumerate în Tab. 5, au fost estimate utilizând modele de regresie liniară și neliniară [43, 44, 100-104] pentru un complex cu stoechiometrie 1:1.

Tab. 5 Constantele de asociere ale Phx-SO₂-COCH₃, K (M⁻¹), obținute prin fitarea datelor experimentale cu ec. (15) și (16) și r coeficientul de corelare al fitării.

CyD	β-CyD		2HP-β-CyD	
	Ec. 15	Ec. 16	Ec. 15	Ec. 16
K	276.2	260.4	588.1	569.3
r	0.976	0.986	0.972	0.977

Constanta de legare pentru complexul de incluziune cu α-CyD nu a fost estimată datorită variației scăzute a elipticității cu concentrația CyD și a incertitudinii privind stoechiometria complexului.

5.2 MODELAREA TEORETICĂ A LIGANZILOR LA NIVEL DFT. SIMULAREA SPECTRULUI DE DICROISM INDUS PRIN METODA TDDFT

În acest subcapitol, se prezintă un studiu comparativ al celor trei derivați din clasa fenoxatiinei, **10,10-dioxid-fenoxatiina** (Phx-SO_2), derivatul 2- CH_2Br substituit, **2-brom-metil-10,10-dioxid-fenoxatiina** ($\text{Phx-SO}_2\text{-CH}_2\text{Br}$) și derivatul 2- COCH_3 substituit **2-acetil-10,10-dioxid-fenoxatiina** ($\text{Phx-SO}_2\text{-COCH}_3$), folosind ca metodă modelarea teoretică și simularea spectrelor de absorbție și de dicroism circular la nivel DFT și TDDFT.

Datele experimentale sunt raționalizate având în vedere rezultatele TDDFT pentru trei modele conformaționale ale liganzilor: cele două modele cu formă de acoperiș, concav (I) și convex (II), prezentate în Fig. 24 și una complet plană. În ceea ce privește substituenții CH_2Br și COCH_3 , calculele au fost efectuate variind unghiul τ (Fig. 24), în intervalul 0-360 grade, adică presupunând rotația completă a grupării.

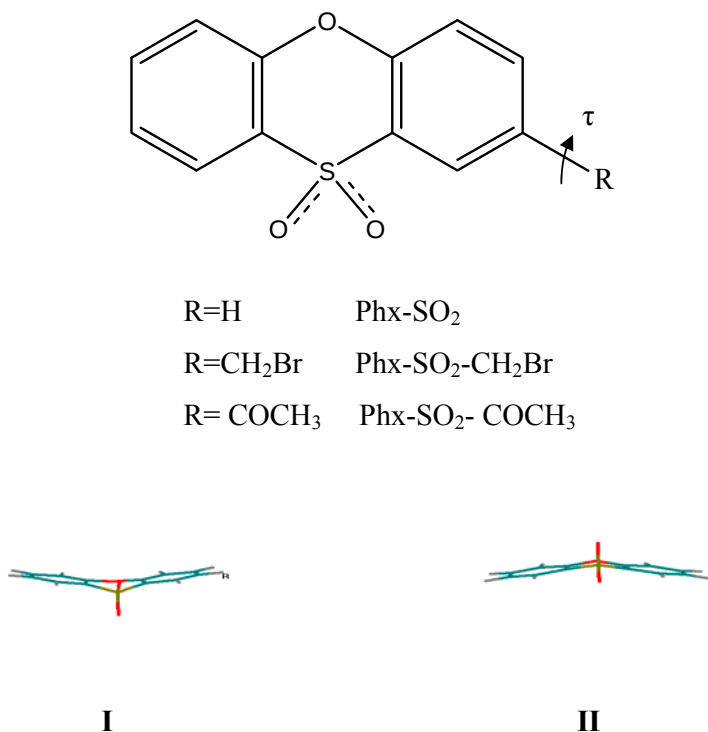


Fig. 24 Structura liganzilor; cele două posibile conformații în formă de acoperiș ale heterociclului, concavă și convexă, sunt notate cu **I** și respectiv **II**; τ reprezintă unghiul de torsiune al grupărilor CH_2Br și COCH_3 în raport cu heterociclul.

Polarizarea calculată a tranzițiilor electronice în conexiune cu datele experimentale permit stabilirea modului de includere a compuşilor în cavitatea CyD.

5.2.2 REZULTATE ŞI DISCUȚII

10,10-dioxid-fenoxatiina

Având în vedere cele trei modele deja menționate pentru structura heterociclului, o estimare a barierei de energie de inversiune, a fost făcută ca diferența dintre structura complet plană și una în formă de acoperiș.

Valorile obținute (Tab. 7), au fost $0.53 \text{ kcal mol}^{-1}$ cu ajutorul setului de bază 6-31G(d) și $0.11 \text{ kcal mol}^{-1}$ folosind baza mai extinsă 6-311++G(d,p). Folosind ambele seturi de bază, spectrele calculate ECD pentru conformațiile (modelele) în formă de acoperiș, prezintă unul față de celălalt relația obiect-imagine în oglindă, cum se poate observa în Fig. 25 pentru setul de bază 6-31G. Semnalele au intensitate scăzută, cea mai mare fiind în intervalul 220-230 nm, unde calculele O.M. prezic tranziții care implică în principal O.M. legate de ciclul fenilic.

Tab. 7 Energiile totale (ha) pentru conformațiile planară și concavă ale Phx-SO₂ și bariera de inversie, ΔE (kcal mol^{-1}).

Set Atomic de Bază	Energia (Ha)		$\Delta E = E_{\text{pl}} - E_{\text{I}}$ (kcal mol^{-1})
	Conformația I	Conformația planară	
6-31G(d)	-1085.8831888	-1085.8823479	0.53
6-311++G(d,p)	-1086.1061656	-1086.1059956	0.11

Deși conformațiile înghețate sunt chirale, valorile mici ale barierei de energie între cei doi enantiomeri sprijină observația experimentală asupra achiralității fenoxatiinsulfonei în soluție. Polarizările tranzițiilor electronice I, II, IV și V sunt prezentate în Fig. 26.

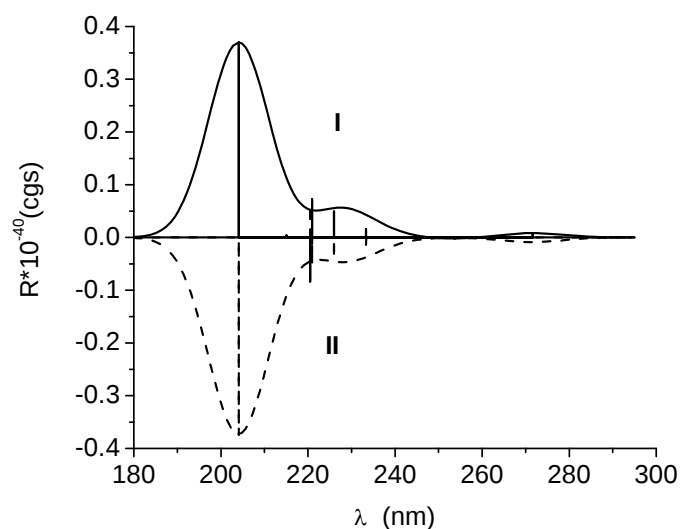


Fig. 25 Spectrele ECD calculate (B3LYP/6-31G(d)) pentru conformațiile **I** și **II** ale Phx-SO₂.

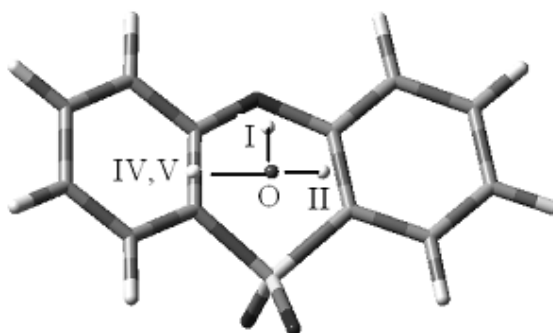


Fig. 26 Direcția momentelor de tranziție pentru principalele tranziții electronice ale Phx-SO₂ (B3LYP/6-31G(d)); O – originea sistemului; I, II, IV, V – tranzițiile cu valoare *f* semnificativă.

Compararea spectrelor electronice experimentale și teoretice, permite următoarele remarci. Pozițiile celor două benzi în regiunea de lungime de undă cea mai lungă sunt prezise la valori ușor mai scăzute decât cele experimentale, cea mai intensă fiind calculată la 272 nm (set de bază 6-31G (d)) și 280 nm (set de bază 6-311++G(d,p)) în loc de 290 nm. Intensitățile relative ale celorlalte două grupe de benzi (225 nm vs 260 nm) sunt prezise corect.

Prin corelarea semnelor benzilor dicroice induse cu direcțiile momentelor de tranziție, regulile Kodaka-Harata [41,42], reflectă includerea axială a acestui ligand în cavitatea CyD. Polarizarea primei tranziții electronice (272 nm) este ortogonală la axa moleculară lungă, în timp ce celelalte trei tranziții (254, 226 și 221 nm, II, IV și V) sunt polarizate de-a lungul axei moleculare majore, reprezentând secvența de semne -, +, +, + a semnalului ICD.

2-brommetil-10,10-dioxid-fenoxatiina

Acest compus, (Phx-SO₂-CH₂Br), prezintă două elemente posibil chirale: mișcarea flip-flap a heterociclului în ansamblu și rotația substituentului. Curba de potențial pentru calculul B3LYP/6-31G este prezentată în Fig. 28. Punctele minime de energie au fost găsite la ± 90 grade, la optimizarea totală valoarea fiind -92.7 grade.

Estimând bariera de energie ca diferența dintre valorile la $\tau = 180$ grade și $\tau = 90$ grade, vom obține 3.33 kcal mol⁻¹. Folosind baza lărgită de orbitali atomici, bariera de rotație a fost ceva mai mare, 3.92 kcal mol⁻¹ (Tab. 8). Curba de energie potențială, în raport cu unghiul de torsiune al substituentului în raport cu ciclul fenilic (τ în Fig. 24) a fost construită pentru valori fixe ale τ ($0 < \tau < 360$ grade, cu un pas de 30 de grade).

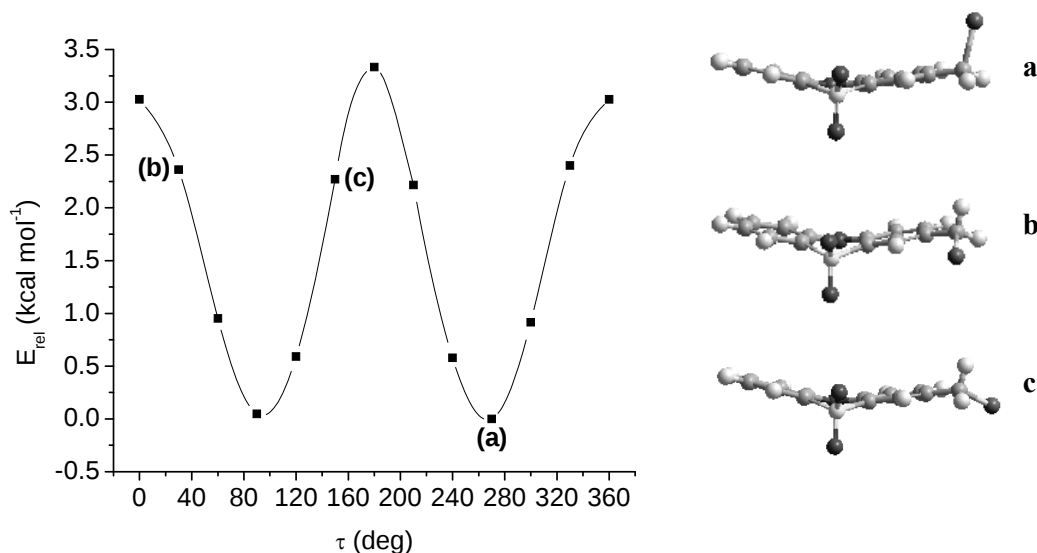


Fig. 28 Curba de energie potențială construită în funcție de unghiul de torsiune τ al grupării CH₂Br, având în vedere conformația I a heterociclului (B3LYP/6-31G (d)).

Tab. 8 Energii totale (Ha) ale Phx-SO₂-CH₂Br pentru conformațiile utilizate pentru estimarea barierei de rotație a grupării CH₂Br, ΔE (kcal mol⁻¹).

Set Atomic de Bază	Energia (Ha)		ΔE = E _{τ=180°} - E _{τ=-90°} (kcal mol ⁻¹)
	τ = -90°	τ = -180°	
6-31G(d)	-3696.0036200	-3695.99830000	3.34
6-311++G(d,p)	-3698.9793045	-3698.97305924	3.92

Putem presupune prin urmare că, în absența CyD, grupul se rotește liber, adică are proprietăți achirale. Valorile mici ale barierei de energie calculate pentru ambele procese arată că, în soluție toate conformațiile sunt posibile, conferind moleculei achiralitatea observată. Cu toate acestea, am constatat sensibilitatea la poziția atomului de brom, în raport cu gruparea SO₂ și cu forma heterociclului. Reprezentarea spectrelor ECD simulate pentru cei trei conformeri este dată în Fig. 29.

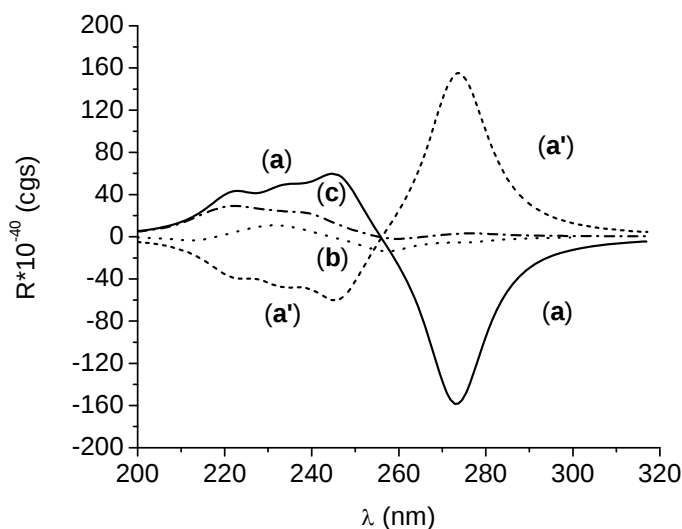


Fig. 29 Spectrele ECD calculate (B3LYP/6-31G(d)) pentru Phx-SO₂-CH₂Br; **a**, **b**, **c** – conformerii prezentați în Fig. 9, diferind prin poziția grupării CH₂Br (conformația **I** a heterociclului); **a'** - enantiomer al lui **a**, conformația **II**.

Spectrul electronic calculat al Phx-SO₂-CH₂Br este similar cu cel al compusului nesubstituit, sprijinind astfel observația experimentală asupra ușoarei influențe produse de substituent asupra sistemului global. Momentele de tranziție ale principalelor tranziții pentru acești conformeri sunt reprezentate în Fig. 31.

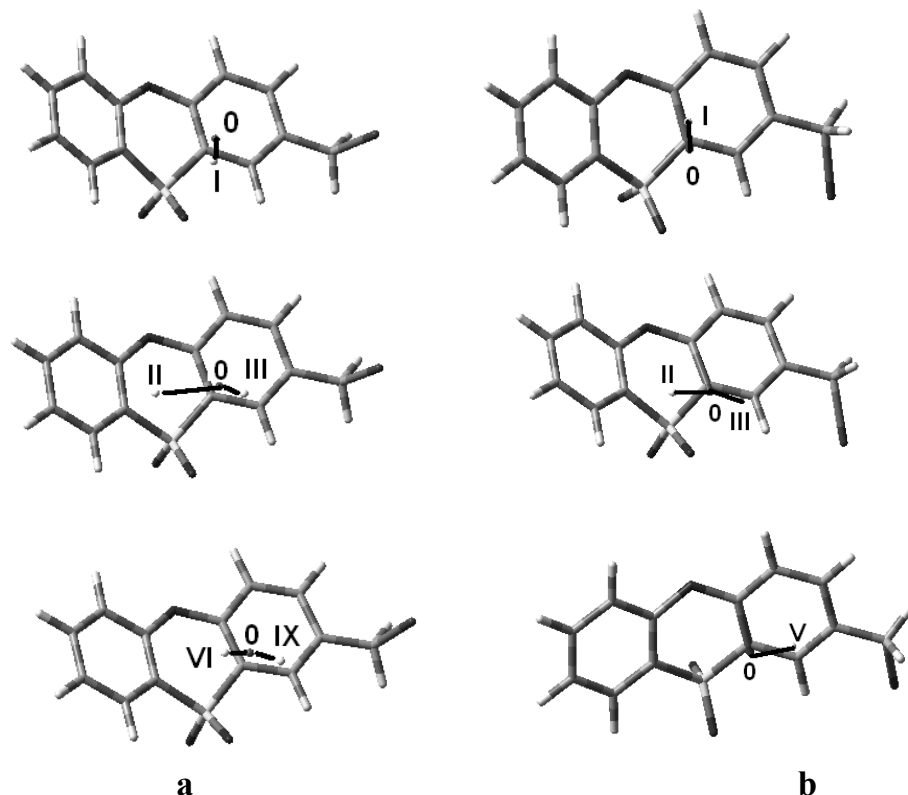


Fig. 31 Direcția momentelor de tranziție pentru principalele tranziții electronice ale Phx-SO₂-CH₂Br (B3LYP/6-31G(d)), conformerii **a** și **b**; O - Originea sistemului; I-IX tranzițiile cu valori *f* semnificative.

Pentru ambii conformeri, prima tranziție, deși atribuită la O.M. diferite, este polarizată de-a lungul axei moleculare scurte. În ceea ce privește celelalte tranziții, cele mai intense, sunt polarizate paralel cu axa moleculară lungă. Prin urmare, corelarea regulilor Harata-Kodaka cu rezultatele TDDFT cu direcțiile momentelor de tranziție permite de a se considera că cele două molecule sunt incluse în cavitățile CyD într-un mod axial.

2-acetil-10.10-dioxid-fenoxatiina

Tranzițiile electronice pentru Phx-SO₂-COCH₃ au fost calculate pentru mai mulți conformeri caracterizați prin valori τ diferite. Astfel τ a fost variat cu un pas de 30° în intervalul 0°–180°. Spectrele experimental și cel calculat pentru conformațiile planare, $\tau = 0^\circ$ și ortogonală, $\tau = 90^\circ$, sunt prezentate în Fig. 32.

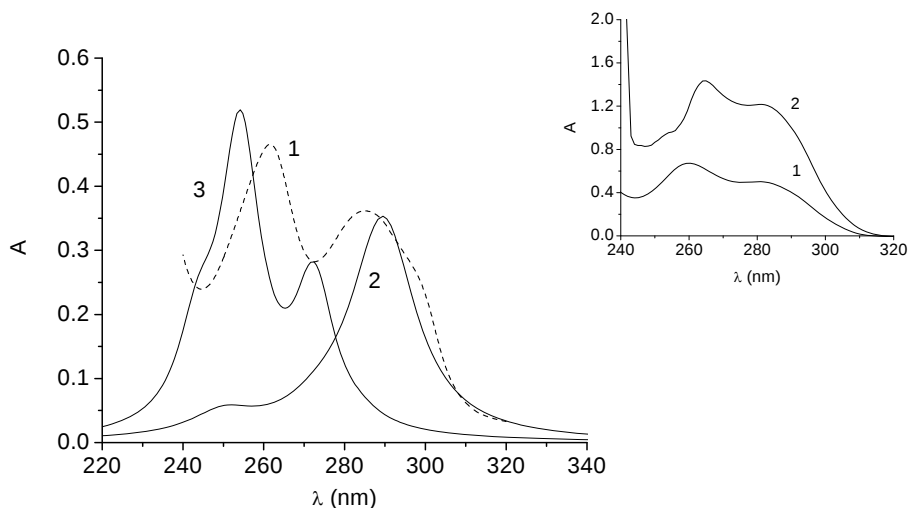


Fig. 32 Spectrele de absorbție experimental și calculat TDDFT (B3LYP/6-31G) ale Phx-SO₂-COCH₃: 1) experimental; 2) calculat, $\tau = 0^\circ$; 3) calculat, $\tau = 90^\circ$. Inserție: spectrele experimentale în metanol (1) și etilen glicol (2).

Câteva rezultate relevante sunt enumerate în Tab.9, iar direcțiile momentelor de tranziție pentru cele mai intense ($f > 0.0030$) benzi electronice în gama 230-350 nm sunt afișate în Fig. 33, pentru trei conformeri (τ : 0°; 60°; 90°).

Compararea spectrelor în Fig. 32 conduce la următoarele observații. Deși pozițiile estimate ale benzilor corespund într-un mod satisfăcător cu spectrul experimental, lărgimea spectrului este mai mare decât în spectrul calculat, reflectând probabil prezența în soluție de conformeri diferiți.

Tab. 9

Lungimi de undă (λ), tăria oscilatorului (f) și atribuire ($h = \text{homo}$; $l = \text{lumo}$) a benzilor de absorbție electronice calculate la nivel B3LYP/6-31G, pentru conformerii Phx-SO₂-COCH₃ total planari, $\tau=0^\circ$ și 180° și ortogonal, $\tau = 90^\circ$.

τ	$0^\circ; 180^\circ$			τ	90°		
E	-1238.5291566 Ha ; -1238.5294281Ha			E	-1238.51806 Ha		
Nr	λ (nm)	f	Atribuire	Nr	λ (nm)	f	Atribuire
1	324.99	0.0002	$h-l \rightarrow l$	1	286.43	0.0021	$h-l \rightarrow l+2$
2	289.51	0.3448	$h \rightarrow l$	2	273.57	0.0569	$h \rightarrow l$
3	273.63	0.0230	$h \rightarrow l+l$	3	255.55	0.1169	$h \rightarrow l+l$
4	250.07	0.0332	*	4	244.37	0.0310	$h-l \rightarrow l$

*Contribuții ale mai mult decât două tranziții.

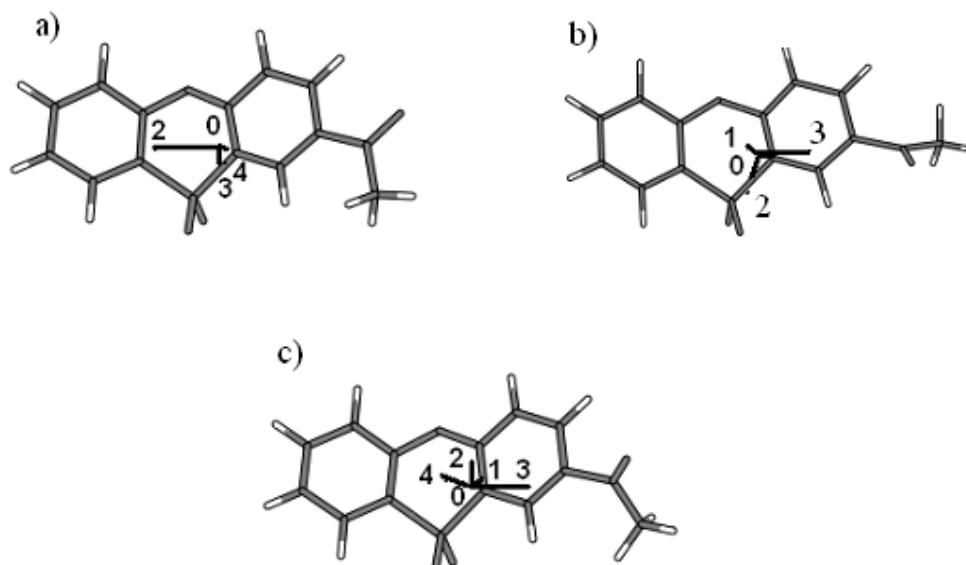


Fig. 33 Direcții momentelor de tranziție relevante ($f > 0.0030$) pentru benzile în intervalul de 230-350 nm, pentru conformerii Phx-SO₂-COCH₃: a) $\tau = 0^\circ$ b) $\tau = 90^\circ$ c) $\tau = 60^\circ$; 0 reprezintă originea axelor moleculare, iar numerele corespund tranzițiilor în Tab. 9.

Calculule DFT prezic ca fiind mult mai stabile conformațiile planare. O estimare a barierei de rotație considerând diferența dintre energia pentru $\tau = 90^\circ$ (punctul maxim

pe suprafața de energie potențială, construită în raport cu unghiul de torsiune τ) și energia pentru conformația planară ($\tau = 180^\circ$), valorile sunt 6.93 kcal/mol și 6.42 kcal/mol pentru funcționalele B3LYP și PBE, respectiv. Analizând rezultatele pentru cei doi conformeri limită, planar și ortogonal (Tab. 9), se poate observa că spectrul calculat diferă prin pozițiile și intensitățile relative ale benzilor.

Examinând Fig. 33 se observă că pentru conformerul planar, momentul corespunzător tranzițiilor 2 și 4 (289.51 nm și 257 nm) sunt polarizate de-a lungul axei moleculare lungi și tranziția 3 este polarizată de-a lungul axei moleculare scurte.

O comparație a spectrului experimental ICD în prezența β -CyD cu tranzițiile electronice calculate pentru acești doi conformeri arată că un mod de includere paralelă (axială) este susținut de calcule.

Pentru 2HP- β -CyD putem să concluzionăm că astfel cavitatea acesteia permite un mod de includere axial, dar determină de asemenea, o selecție a conformerilor incluși, conformerii cu τ în jurul 60° fiind favorizați.

În cazul α -CyD, se observă aceleași benzi de ICD, dar semnul este negativ. Putem presupune, prin urmare, o poziție ortogonală a liganzilor în raport cu axa cavității. Aceasta corespunde mai bine unei stoechiometрии 1:2 ligand: α -CyD.

5.3 Modelarea teoretică a complexelor de incluziune prin simularea de dinamică moleculară.

Simularea de dinamică moleculară a complexului 2:1 solvatat în apă, arată preponderent o structură în care una din ciclodextrine se poate afla într-o orientare cvasi-ortogonală față de axa lungă a ligandului, Fig. 36.



Fig. 36 Dispoziții preponderente ale ciclodextrinelor în complexul de incluziune al Phx-SO₂-COCH₃ cu α -CyD într-o traiectorie de 1000 ps (apa nu este arătată).

5.4 CONCLUZII

Rezultatele prezentate în acest capitol conduc la următoarele concluzii. Constantele de legare pentru complexii ciclodextrinelor cu unii compuși achirali, pot fi estimate cu suficientă credibilitate folosind datele experimentale ICD ale liganzilor pentru cazurile în care elipticitățile induse sunt suficient de mari, de până la 8-10 mdeg.

Pentru liganzii **Phx-SO₂** și **Phx-SO₂-CH₂Br**, analiza spectrelor experimentale ICD arată că stoechiometria complexilor de incluziune pentru β -, γ - și 2-HP- γ -CyD a fost 1:1 oaspete:gazdă. Interacția mai mică cu α -CyD determină o chiralitate indusă scăzută, făcând dificilă estimarea constantelor de asociere.

Substituentul afectează nesemnificativ spectrele ICD, poziția benzilor, alternanța de semne, fiind similare. Pentru ambii compuși, constantele de asociere mai mari au fost obținute în prezența β -CyD.

Calculule teoretice efectuate au condus la două rezultate principale. În primul rând, estimarea barierelor de energie pentru cele două procese, mișcarea flip-flap a heterociclului și rotația grupării CH₂Br, bariere care explică achiralitatea liganzilor liberi, în ciuda posibilității unor conformeri, corelată cu poziția bromului în raport cu heterociclul și gruparea sulfonă care prezintă o tărie de rotație semnificativă. În al doilea rând, liganzii aleși reprezintă un caz favorabil pentru testarea calculelor TDDFT în care polarizările tranzițiilor electronice sunt diferite și explică bine alternanța de semne în spectrul experimental ICD. Direcțiile momentelor de tranziție calculate, prezic un mod de includere axială în cavitatea CyD.

O comparație a spectrului ICD experimental în prezența β -CyD cu tranzițiile electronice calculate pentru acești doi conformeri arată că modul de includere paralel (axial) este justificat de calcule. Pentru aceste conformații, tranzițiile mai intense (2 pentru $\tau = 0^\circ$; 3 pentru $\tau = 90^\circ$) sunt polarizate de-a lungul axei moleculare lungi și pozițiile lor sunt în acord cu benzile experimentale. Cu toate acestea, este dificil să se facă o predicție asupra conformerilor celor mai favorizați, dar intensitatea mare a semnalului dicroic pozitiv la 280 nm, sugerează o predominanță a conformerilor cvasi-planari.

Interacția 2HP- β -CyD cu Phx-SO₂-CH₂Br permite un mod de includere axial al ligandului în cavitate, dar determină, de asemenea, o selecție a conformerilor incluși, conformerii cu τ în jurul valorii de 60° fiind favorizați.

În cazul sistemelor Phx-SO₂: α -CyD și Phx-SO₂-CH₂Br: α -CyD, sunt observate aceleași benzi de ICD ca și în cazul celorlalte CyD, dar semnul este negativ. Putem presupune, prin urmare, o poziție ortogonală a liganzilor în raport cu axa cavității care corespunde mai bine unei stoechiometriei 1:2 ligand: α -CyD.

În cazul interacției **Phx-SO₂-COCH₃** cu CyD estimarea constantei de legare a fost posibilă pentru β - și 2HP- β -CyD, care formează complexe 1:1, dar nu și pentru α -CyD. Constanta de legare pentru sistemul Phx-SO₂-COCH₃: β -CyD este în acord cu cea obținută prin măsurători de fluorescență (manuscris în pregătire). Corelarea regulilor empirice Harata și Kodaka cu calcule TDDFT furnizează o explicație rațională pentru diferențele dintre semnalele induse de β -CyD și 2HP- β -CyD, având în vedere că asimetria produsă de procesul de incluziune este reprezentată de torsiunea grupării acetil, în raport cu sistemul π al ciclului heteroaromatic și de includerea preferențială de conformeri diferiți, dependent de dimensiunea cavității. În cazul α -CyD, atât rezultatele teoretice cât și cele experimentale sprijină formarea unui complex cu stoechiometria 1:2 Phx-SO₂-COCH₃: α -CyD

Studiul din prezenta lucrare arată că spectroscopia de dicroism circular reprezintă un instrument fiabil și util pentru studierea complexilor de incluziune ai CyD. Analiza semnalelor de ICD, în prezența CyD, permite estimarea constantelor de asociere și oferă informații cu privire la modul de includere în cavitate. Informațiile structurale obținute prin corelarea datelor experimentale ICD cu date TDDFT sunt un punct de plecare în modelarea complexilor supramoleculari ligand-ciclodextrină.

Simularea de dinamică moleculară evidențiază o structură a complexului de incluziune 2:1 CyD:ligand, în care una din ciclodextrine se afla într-o poziție cvasi-ortogonală față de axa lungă a ligandului, ceea ce poate fi o explicație a spectrelor ICD ale complexilor de incluziune ai α -CyD, în care apar benzi dicroice cu semn negativ.

Capitolul 6

STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND–CICLODEXTRINE PRIN TITRARE CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ

În cadrul acestui capitol sunt prezentate, rezultatele studiului prin titrare calorimetrică izotermă a interacției α -, β -, γ -ciclodextrinelor cu o serie de liganzi.

10.10-dioxid-fenoxatiina (Phx-SO₂)

Pentru interacția Phx-SO₂ cu α -, β -, γ -CyD fitarea datelor experimentale s-a făcut cu fixarea parametrului stoechiometric n . Rezultatele obținute sunt redată în Tab. 11.

Tab. 11 Parametrii termodinamici ai interacției FxSO₂ cu α -, β -, γ -CyD la 25°C.

CyD	n^*	K (M ⁻¹)	ΔH (cal·mol ⁻¹)	ΔS (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG (cal·mol ⁻¹)
α	1	371±24.9	-4578±230.3	-3.59±0.78	-3502.78±39.73
β	1	357±24.1	-4708±240.2	-4.11±0.81	-3480.0±39.96
γ	1	250±20.6	-3215±219.3	0.189±0.75	-3269.07±48.78

*stoechiometrie impusă.

Variația parametrilor termodinamici a indicat că procesul de incluziune decurge spontan ($\Delta G < 0$), fiind însoțit de eliberare de căldură ($\Delta H < 0$) și scăderea entropiei ($\Delta S < 0$). Forțele de legare a Phx-SO₂ cu α - și β -CyD au, conform parametrilor termodinamici ($\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ și $\Delta G < 0$), ca principale contribuții legăturile de hidrogen și van`der Waals. Scăderea de entropie poate fi dată de schimbări conformaționale și de confinarea ligandului în cavitatea CyD. Constantele de legare scad de la α - la β - și γ -CyD. Pentru γ -CyD procesul de legare a Phx-SO₂ decurge cu o variație mai mică de entalpie decât în cazul celorlalte două CyD, iar variația de entropie este foarte mică și pozitivă, reflectând astfel interacția Phx-SO₂, cu cavitatea mai mare a γ -CyD.

Atenololul (ATE)

Interacția ATE cu α -, β -, γ -CyD a fost studiată la temperatura de 25°C, atât pentru soluții în apă pură cât și în soluții tampon de pH 4.5, 7.4 și 10. În Fig. 40 este redată fitarea datelor experimentale pentru titrarea β -CD cu ATE în apă pură.

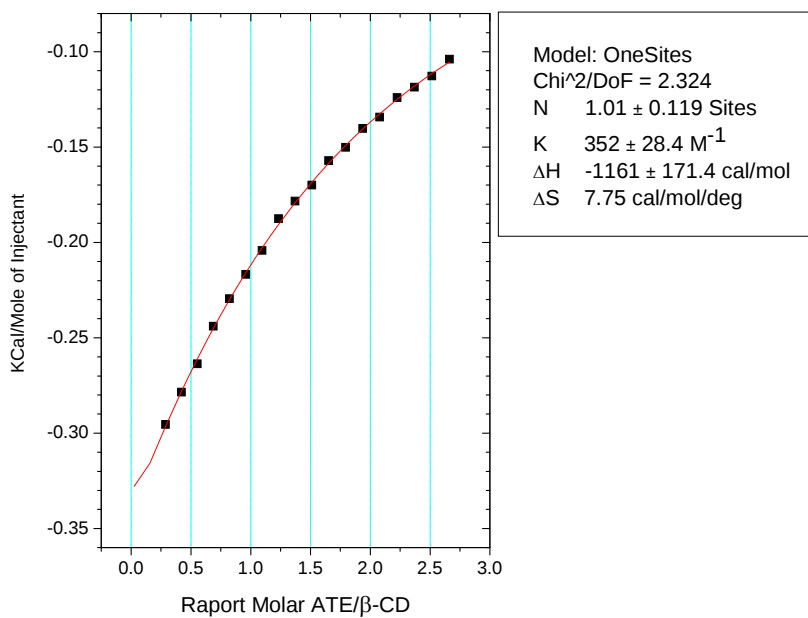


Fig. 40 Termograma titrării unei soluții 1.122×10^{-3} M β -CD cu o soluție 20.38×10^{-3} M ATE în apă pură și fitarea datelor experimentale pentru un model de legare la un singur set de situsuri independente.

Măsurătorile în soluțiile tampon de pH au avut ca scop evidențierea interacției diverselor specii ale atenololului cu CyD.

Variația mărimilor termodinamice cu pH-ul soluției arată influența mediului asupra speciei participante majoritar la interacție. Considerând valoarea $pK_a=9$ a atenololului, se poate presupune ca la $pH=10$ specia activă în soluție este cea deprotonată. Rezultatele fitărilor obținute pentru titrările calorimetrice atenolol: β -CyD efectuate în apă și în soluții tampon cu valori $pH=4.5$, 7 și 10, sunt date în Tab. 12. Efectul termic al interacției γ -CD cu ATE în apă pură a fost prea mic și nu a putut fi analizat. Pentru titrările α - și γ -CyD cu ATE în soluții la $pH=10$, nu s-a putut evidenția un efect termic al interacției ATE cu CyD.

Tab. 12 Valorile parametrilor de legare pentru atenolol: β -CyD în diferite medii apoase obținute prin fitarea datelor experimentale.

	apa pură	pH=4.5	pH=7.4	pH=10
n	1.01 $\pm$ 0.11	1*	1.47 $\pm$ 0.28	1*
K (M ⁻¹)	352 $\pm$ 28.4	222 $\pm$ 25.9	263 $\pm$ 44.5	294 $\pm$ 11.6
ΔH (cal/mol)	-1161 $\pm$ 171.4	-745.2 $\pm$ 59.69	-824,5 $\pm$ 213.2	-840.7 $\pm$ 18.4
ΔS (cal/mol/deg)	7.75	8.24	8.31	8.48

*parametru impus

3-carboxi-5,6-benzocumarina (BzCum)

Pentru interacția BzCum cu β -CyD, fitarea datelor experimentale este prezentată în Fig. 44, în care este redată și fitarea realizată pentru modelul de legare secvențială la două situsuri independente.

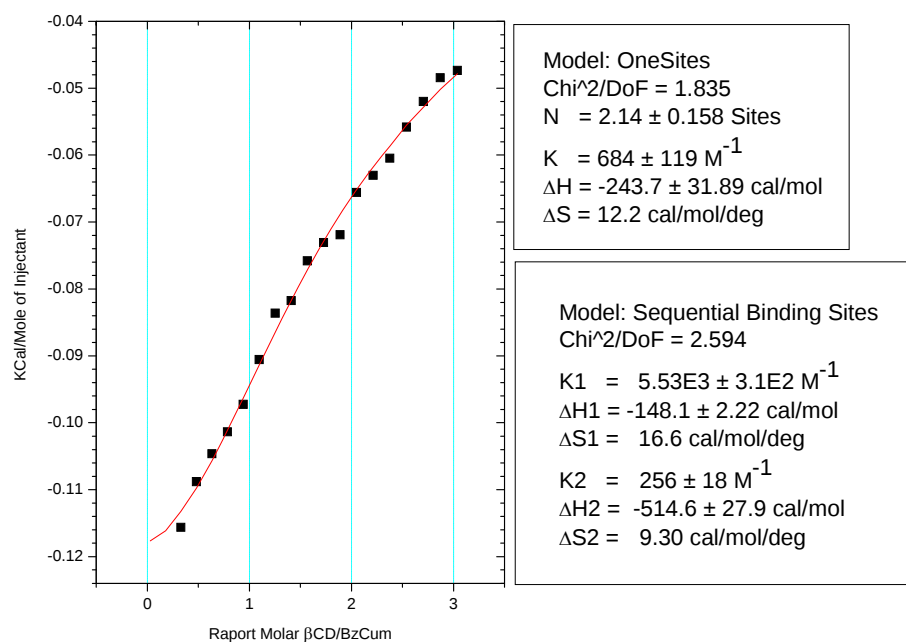


Fig. 44 Datele experimentale ale titrării unei soluții $0.7055 \times 10^{-3} \text{ M}$ BzCum cu o soluție $1.59 \times 10^{-2} \text{ M}$ β -CD și fitarea datelor experimentale pentru interacția β -CyD cu BzCum pentru cele două modele de legare.

6.4 CONCLUZII

Pentru interacția **FxSO₂** cu α -, β - și γ -**CyD** constantele de legare obținute au variat de la $371 \pm 24.9 \text{ M}^{-1}$ pentru ciclodextrina mai mică, la $250 \pm 20.6 \text{ M}^{-1}$ pentru ciclodextrina mai mare.

Deoarece constantele de legare a Phx-SO₂ cu β - și γ -CyD au fost determinate și prin măsurători de dicroism circular indus, putem constata că pentru sistemul Phx-SO₂: β -CyD constantele obținute coincid, având valoarea $357 \pm 24.1 \text{ M}^{-1}$. Pentru sistemul Phx-SO₂: γ -CyD constanta de legare obținută prin dicroism circular a fost de $223 \pm 17 \text{ M}^{-1}$ față de $250 \pm 20.6 \text{ M}^{-1}$, cea obținută calorimetric.

În interacția **ATE** cu α -, β - și γ -**CyD** sau obținut date fiabile doar pentru interacția cu β -CyD. Rezultatele fitărilor obținute pentru titrările calorimetrice β -CyD-atenolol efectuate în apă și în soluții tampon cu valori de pH = 4.5, 7 și 10 au arătat o stoechiometrie 1:1 pentru măsurătorile efectuate în apă și 1,4:1 la pH=7.4, valoarea lui n fiind obținută prin fitare liberă. În celelalte medii, datele obținute sunt mai puțin clare. Impunând stoechiometria 1:1 pentru complexul de incluziune, rezultatele experimentale au putut fi fitate cu parametri statistici convenabili, dar prin fitarea liberă a stoechiometriei rezultatele nu au fost acceptabile. Constantele de legare au fost, de la cea mai mică, $222 \pm 25.9 \text{ M}^{-1}$ la pH=4.5, la $352 \pm 28.4 \text{ M}^{-1}$, cea mai mare, în apă pură.

În cazul interacției **BzCum** cu **CyD**, datele de titrare calorimetrică relevă o stoechiometrie de 2:1 β -CyD:BzCum în modelul de fitare OneSites, obținându-se o constanta de afinitate $K=684 \pm 119 \text{ M}^{-1}$. Pentru fitarea datelor experimentale, modelul legării secvențiale la două situsuri independente ar putea fi mai plauzibil, deoarece cele două capete ale BzCum ce intră fiecare în câte o β -CyD, nu sunt indentice și ca urmare este mai firesc de a avea două valori ale constantelor de legare ce ar ilustra această diferență între grupările BzCum incluse în fiecare β -CyD și în plus interacția între cele două ciclodextrine în complex.

Pentru interacția **BzCum** cu γ -**CyD** a rezultat o stoechiometrie $N=0,298 \pm 0,01$ ceea ce înseamnă că un număr de 3 molecule de BzCum interacționează cu γ -CyD, în cadrul fie a unui complex de incluziune fie a unui complex mixt de incluziune și neincluziune. Parametrii termodinamici ai interacției arată o constantă de afinitate $K = 3.86 \text{E}3 \pm 151 \text{ M}^{-1}$ și variațiile de entalpie și entropie $\Delta H = -8255 \pm 339.7 \text{ cal/mol}$ și $\Delta S = -11.3 \text{ cal/mol/deg}$.

Capitolul 7

STUDIUL INTERACȚIEI LIGAND–ALBUMINĂ PRIN TITRARE CALORIMETRICĂ IZOTERMĂ

În cadrul acestui capitol este prezentat, studiul prin titrare calorimetrică izotermă a interacției unor derivați carboxilici ai cumarinei cu albumina serică umană.

7.2 MATERIALE ȘI METODE

Albumina serică umană a fost obținută de la Sigma Chemical (St Louis, MO, S.U.A). Compușii 3-carboxi-5,6-benzocumarina și 3-carboxi-7-metoxicumarina au fost procurați de la ABCR (Germania).

Substanțele au fost utilizate fără purificare suplimentară. Soluțiile au fost preparate prin cântărire. Soluția stoc de tampon fosfat pH 7,4 a fost preparată cu apă distilată și deionizată. Soluțiile de BzCum și MtCum au fost preparate în soluție tampon fosfat pH 7,4.

7.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII

3-carboxi-5,6-benzocumarina (BzCum)

Termogramele pentru interacția BzCum cu HSA, obținute prin titrare calorimetrică secvențială și titrare calorimetrică continuă, la temperatura de 25°C, sunt prezentate Fig. 45.

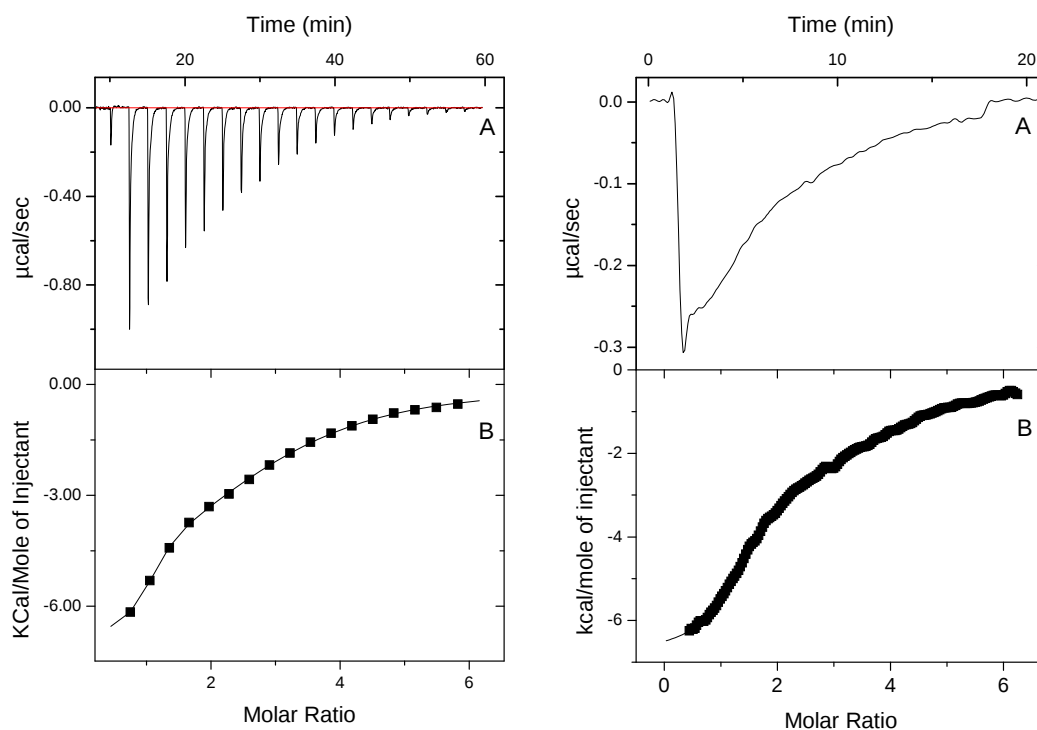


Fig. 45 A) Puterea diferențială ($\mu\text{cal/sec}$) în funcție de timp pentru titrarea HSA cu BzCum la 25°C în tampon pH 7,4 fosfat, indicând răspunsul calorimetrului la: I) injectarea succesivă a ligandului în celula de reacție; II) injectarea continuă a ligandului în celula de reacție. B) Căldura integrală a picurilor din panoul (A) pe mol de injectant versus raportul molar injectant/HSA. Linia continuă reprezintă fitarea celor mai mici pătrate a datelor experimentale pentru modelul cu două seturi de situsuri independente.

Cele mai bune fitări ale datelor experimentale pentru cele trei temperaturi, prezentate în Tab. 13 și 14, au fost obținute pentru modelul de legare la două seturi de situsuri independente (TwoSites), model implementat în software-ul Origin pentru ITC [105].

Tab. 13 Parametrii termodinamici pentru legarea BzCum la HSA din datele ITC secvențial.

Temp °C	n_1 Sites	K_1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal·mol ⁻¹)	ΔS_1 (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG_1 (cal·mol ⁻¹)	ΔC_{p1} (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)
15	0,82±0,02	2,54E6±5,15E5	-6890±231	5,39±0,89	-8438,74±116,01	-89,7±23,3
25	0,84±0,02	1,55E6±3,44E5	-7383±299	3,56±1,09	-8439,17±131,4	
35	0,85±0,04	5,25E5±9,63E4	-8684±337	-2,01±1,15	-8059,74±112,24	
Temp °C	n_2 Sites	K_2 (M ⁻¹)	ΔH_2 (cal·mol ⁻¹)	ΔS_2 (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG_2 (cal·mol ⁻¹)	ΔC_{p2} (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)
15	2,44±0,07	9,97E4±8,56E3	-3609±231	10,3±0,81	-6586,07±49,12	-153,4±58,7
25	2,67±0,13	5,87E4±5,88E3	-4125±376	7,98±1,27	-6501±59,3	
35	2,28±0,2	2,80E4±2,35E3	-6676±966	-1,32±3,13	-6266,07±51,35	

Tab. 14 Parametrii termodinamici pentru legarea BzCum la HSA din datele ITC continuu.

Temp °C	n_1 Sites	K_1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal·mol ⁻¹)	ΔS_1 (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG_1 (cal·mol ⁻¹)	ΔC_{p1} (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)
15	0,90±0,01	2,38E6±2,12E5	-6456±114	6,78±0,43	-8401,51±50,96	-104,8±27,5
25	0,76±0,02	1,59E6±4,14E4	-7028±306	4,80±1,03	-8454,25±15,41	
35	1,08±0,01	7,19E5±4,00E4	-8552±96,4	-0,95±0,33	-8252,17±34,04	
Temp °C	n_2 Sites	K_2 (M ⁻¹)	ΔH_2 (cal·mol ⁻¹)	ΔS_2 (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG_2 (cal·mol ⁻¹)	ΔC_{p2} (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)
15	2,15±0,04	8,03E4±3,38E3	-3414±130	10,6±0,46	-6462,24±24,08	-161,15±35,5
25	2,47±0,11	6,04E4±5,21E3	-4410±367	7,08±1,24	-6517,9±51,07	
35	2,34±0,09	2,80E4±1,16E3	-6637±413	-1,19±1,34	-6266,07±25,35	

Valorile $\Delta H < 0$ și $\Delta S > 0$ la 15°C și 25°C, arată că atât entalpia cât și entropia contribuie favorabil la energia liberă de legare astfel încât, interacția este condusă entalpic și entropic. Forțele de legare a BzCum la HSA au, conform parametrilor termodinamici ($\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ și $\Delta G < 0$) ca principale contribuții legăturile de hidrogen și van`der Waals și forța hidrofobă.

Energia liberă de legare prezintă fenomenul de compensare între contribuțiile entalpiei și entropiei cu creșterea temperaturii. Entropia scade cu temperatura, dar efectul este compensat de entalpia de legare (Fig. 47), relația liniară entalpie-entropie indicând participarea apei în procesele de legare ligand-proteine [107].

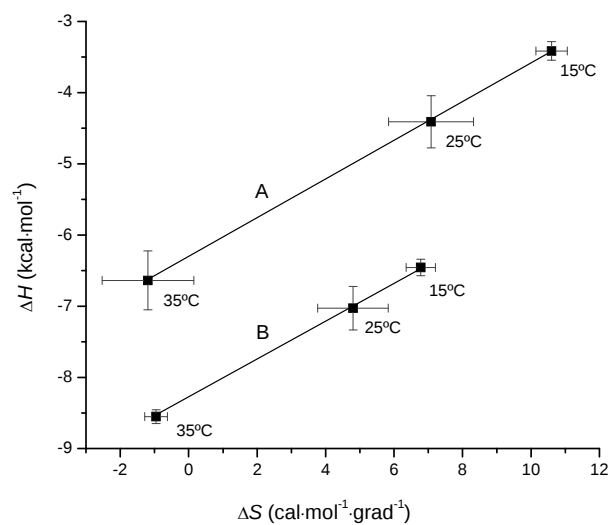


Fig. 47 Relația liniară entalpie-entropie (valorile din Tab. 14, împreună cu erorile) pentru: A. situsurile cu afinitate joasă și B. situsul cu afinitate înaltă.

Entalpia dominant negativă poate sugera că există un număr mare de contacte favorabile, prin legături de hidrogen fie între ligand și proteină și/sau între apa de solvatare eliberată dintre interfețele hidrofobe și apa în soluție.

$\Delta C_p < 0$, de obicei este corelată cu suprapunerea suprafețelor hidrofobe. Un ΔC_p negativ înseamnă că la creșterea temperaturii, forța termodinamică motrice netă pentru asociere se va deplasa de la entropică la entalpică [108].

3-carboxi-7-metoxicumarina (MtCum)

Pentru interacția MtCum cu HSA la 15, 25 și 35°C, rezultatele sunt prezentate în Tab. 15.

Tab. 15 Parametrii termodinamici pentru legarea MtCum la HSA din datele ITC la temperaturile 15, 25 și 35°C, pentru un model de legare secvențială la trei situsuri.

Temp °C	Situsul Nr.	K_1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal·mol ⁻¹)	ΔS_1 (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG_1 (cal·mol ⁻¹)	ΔC_{p1} (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)
15	1	3,35E4±3,6E3	-1,672E4±1,22E3	-37,3±4,23	-5962,01±61,49	162,5±29,7
25	1	4,49E4±6,1E3	-1,458E4±1,22E3	-27,6±4,1	-6342,32±80,43	
35	1	4,92E4±1,8E3	-1,347E4±326	-22,3±1,06	-6611,01±22,38	
Temp °C	Situsul Nr.	K_2 (M ⁻¹)	ΔH_2 (cal·mol ⁻¹)	ΔS_2 (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG_2 (cal·mol ⁻¹)	ΔC_{p2} (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)
15	2	4,88E4±2,9E3	1,860E4±1,79E3	86,0±6,21	-6177,26±34,0	407±148,95
25	2	2,90E4±4,4E3	1,711E4±1,83E3	77,8±6,14	-6083,51±89,83	
35	2	2,87E4±1,7E3	1,046E4±539	54,3±1,75	-6281,18±36,24	
Temp °C	Situsul Nr.	K_3 (M ⁻¹)	ΔH_3 (cal·mol ⁻¹)	ΔS_3 (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)	ΔG_3 (cal·mol ⁻¹)	ΔC_{p3} (cal·mol ⁻¹ ·grad ⁻¹)
15	3	6,34E4±5,0E3	-1,136E4±695	-17,4±2,41	-6327,03±45,12	-206,5±96,7
25	3	4,79E4±3,6E3	-1,51E4±1,03E3	-29,5±3,46	-6380,62±71,69	
35	3	1,66E4±8,5E2	-1,549E4±284	-31,0±0,92	-5946,16±31,33	

7.4 CONCLUZII

Afinitatea de legare a acizilor 3-carboxi-5,6-benzocumarinic (BzCum) și 3-carboxi-7-metoxicumarinic (MtCum) la albumina serică umană (HSA), a fost investigată la pH 7,4 în soluție tampon fosfat, prin titrare calorimetrică izotermă la mai multe temperaturi. Legarea BzCum a fost studiată utilizând atât metoda de titrare secvențială cât și metoda titrării continue. Din fitarea datelor ITC, a rezultat că BzCum se leagă la HSA la două clase de situsuri independente. Prima clasă conține un singur situs cu afinitate mare de legare, caracterizat printr-o constantă de legare de aproximativ $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ la 25°C. Clasa a doua se caracterizează prin cel puțin două situsuri cu o constantă de legare de aproximativ $5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Legarea a fost un proces exoterm, caracterizat printr-o variație de entalpie de aproximativ $-7 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ pentru situsul cu afinitate mare și de $-4 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ pentru situsurile cu afinitate mai mică. Variațiile de entalpie și entropie au scăzut cu temperatura, astfel încât, interacția a fost entalpic și entropic determinată la 15 și 25°C și a devenit în întregime entalpic determinată la

35°C. ΔC_p a fost mai mic pentru situsul cu afinitate mare și negativ pentru ambele seturi de situri.

Pentru legarea MtCum la HSA cele mai bune fitări ale datelor experimentale au fost pentru un model de legare secvențială la trei situsuri independente. Afinitățile de legare ale MtCum la HSA sunt de ordinul celor pentru legarea BzCum la HSA la situsurile cu afinitate mică. Astfel la 25°C constantele de legare la cele trei situsuri au valorile $4,95 \times 10^4$, $2,51 \times 10^4$ și $3,41 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ la cele trei situsuri, respectiv. Legarea a fost un proces exoterm, caracterizat printr-o variație de entalpie de aproximativ -18 și -16 Kcal·mol⁻¹ pentru primul și al treilea situs respectiv. Pentru cel de al doilea situs legarea a fost un proces endoterm, caracterizat printr-o variație de entalpie de aproximativ 18 Kcal·mol⁻¹. Variația de entropie a fost de -41,4 și -34,3 cal·mol⁻¹·grad⁻¹ pentru primul și al treilea situs și de 83,3 cal·mol⁻¹·grad⁻¹ pentru al doilea situs. Interacția a fost entalpic determinată pentru primul și al treilea situs și determinată în întregime entropic pentru al doilea situs. Variația de capacitate calorică a fost pozitivă pentru primul și al doilea situs și negativă pentru cel de al treilea situs.

CONCLUZII GENERALE

Teza elaborată a cuprins studiul interacțiilor moleculare în mai multe sisteme supramoleculare de tipul ligand-ciclodextrină și ligand-albumină serică umană, scopul fiind estimarea parametrilor termodinamici (stoechiometria, afinitatea de legare, entalpia și entropia) și structurali (modul de incluzie în ciclodextrine și modificările conformaționale în urma procesului de legare). Metodele folosite au fost titrarea calorimetrică izotermă și spectroscopia de dicroism circular, iar liganzii au fost aleși astfel încât să aparțină unor clase diferite structural și anume derivați de cumarină, derivați de fenoxatiină și un medicament cardiovascular, atenololul, moleculă cu o flexibilitate deosebită.

Dezvoltarea obiectivelor propuse pentru această teză de doctorat a condus la elaborarea mai multor concluzii referitoare la fiecare sistem studiat în parte, concluzii analizate la sfârșitul capitolelor respective. Urmărirea în ansamblu a rezultatelor obținute a permis stabilirea următoarelor concluzii generale:

- Cele două metode folosite, metoda calorimetrică (titrarea calorimetrică izotermă) și metoda spectrală (spectroscopia de dicroism circular indus) prezintă un caracter total diferit și de aceea, pot conduce în unele cazuri la rezultate diferite.
- Astfel, diferența principală dintre cele două metode constă în faptul că metoda calorimetrică investighează un efect termic global, al tuturor proceselor ce au loc în sistem, în momentul interacției ligand-macromoleculă, în timp ce metoda spectrală aleasă, bazată pe înregistrarea spectrului de dicroism circular indus, reflectă numai efectul exercitat de înconjurarea macromoleculei asupra ligandului aflat în situsul de afinitate maximă al proteinei sau în cavitatea asimetrică a ciclodextrinelor. Privite prin această prismă, rezultatele pot fi văzute ca fiind complementare. Deși unele sistemele din cadrul tezei, au fost abordate prin ambele metode, din cauza efectului termic foarte mic înregistrat pentru unele dintre acestea, nu s-a reușit a se reda o imagine comparativă legată de abordarea acestor sisteme prin cele două metode. În cazul interacției FxSO_2 cu β - și γ -CyD, care a putut fi studiată prin ambele metode, rezultatele obținute au fost similare în ceea ce privește stoechiometria și constanta de legare.
- Cuplarea metodelor teoretice (DFT, TDDFT) cu analiza spectrelor experimentale de dicroism circular indus în cazul sistemelor liganzi–ciclodextrină a permis obținerea de informații asupra structurii complexului format, asupra modului de incluziune în cavitatea ciclodextrinei și, totodată, a evidențiat elementul structural care conferă chiralitate ligandului aflat într-un mediu asimetric sau în care mișcările intramoleculare sunt restricționate.
- Corelarea rezultatelor mai multor metode experimentale și teoretice cu caracter diferit și care, deaceia, înregistrează aspecte diferite ale interacțiilor moleculare conduce la o imagine mai completă a sistemului supramolecular, ligand-ciclodextrină și ligand-proteină și este esențială pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor moleculare ale interacțiilor medicament–receptor.

LISTA LUCRĂRILOR ELABORATE ÎN CADRUL TEZEI

Lucrări publicate

- Phenoxathiinsulphone derivatives–cyclodextrin interactions: Induced Chirality and TDDFT Calculations. Romică Sandu, Cristina Tableț, Mihaela Hillebrand. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, (in press), available on-line, DOI 10.1007/s10847-012-0232-7.

- Binding affinity of the 3-carboxy-5,6-benzocoumarinic acid to human serum albumin: an isothermal titration calorimetry study. Romică Sandu, Mihaela Hillebrand, *Rev. Roum. Chim.*, 5, (2012), (in press).

- Circular dichroism characterization of the inclusion complexes of 2-acetyl-phenoxathiin sulphone with cyclodextrines: experimental data and TDDFT calculations. Romică Sandu, Mihaela Hillebrand, *Rev. Roum. Chim.*, 56, 363-371, (2011).

Participări la conferințe-postere

- Calorimetric study of interaction of some beta-blocker drugs with α -, β -, γ -cyclodextrins and human serum albumin, R. Sandu, C. Tableț, V.T. Popa, S. Tanasescu, M. Hillebrand, Al 21-lea Simpozion anual de comunicări științifice al Comisiei de Analiză Termică și Calorimetrie, 17 Februarie 2012, București.

- The use of the isothermal titration calorimetry method in analysis of the inclusion processes in cyclodextrins, R. Sandu, C. Tableț, V.T. Popa, S. Tănăsescu, M. Hillebrand, Al 20-lea Simpozion anual de comunicări științifice al Comisiei de Analiză Termică și Calorimetrie, 11 Februarie 2011, București.

- Investigation of the relationships between thermodynamics of binding interaction and therapeutical effects in drug delivery systems Iulia Contineanu, Ana Neacsu, Romică Sandu, Andreea Neacșu and Speranța Tănăsescu, *ETP Nanomedicine General Assembly & Annual Forum*, 14-15 October 2010, Milan, Italy.

- Circular dichroism and fluorescence study of inclusion complexes of some phenoxathiine sulphones derivates with cyclodextrins, Romică Sandu, Mihaela Hillebrand, *13th International Conference on Physical Chemistry*, 3-5 Sept. 2008, Bucharest, Romania, (Poster).

- Thermodynamic properties of 3-formilphenoxathiin and β -cyclodextrin aqueous solution mixtures, Romică Sandu, Anca Sofronia, Tatiana Pascu, Mihaela

Hillebrand, *12th International Conference on Physical Chemistry*, 6-8 Sept. 2006, Bucharest, Romania, (Poster).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. A. Cooper, C. M. Johnson. Introduction to Microcalorimetry and Biomolecular Energetics in C. Jones, B. Mulloy and A. H. Thomas (Eds.), *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques*. Humana Press, Totowa, NJ, (1994), 109-124.
2. O'Brien R., Haq I., Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics; Biocalorimetry 2. by Ladbury J. E., Doyle M. L. (Eds). Wiley, UK, (2004), pp. 276.
9. R. Singh, N. Bharti, J. Madan, S. N. Hiremath, Journal of Pharmaceutical Science and Technology Vol. 2 (3), (2010), 171-183.
10. H. Dodziuk, Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications, John Wiley & Sons, (2006).
14. J. Szejtli, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 76, No. 10, pp. 1825–1845, (2004).
16. Sudlow, G., Birkett, D. J. and Wade, D. N., *Mol. Pharmacol.* (1975), 11, 824-832.
17. Hiroshi Watanabe, Ulrich Kragh-Hansen, Sumio Tanase, Keisuke Nakajou, Maki Mitarai, Yasunori Iwao, Toru Maruyama, Masaki Otagiri, *Biochem. J.* (2001), 357, 269-274, 269.
18. Petitpas I, Bhattacharya A A, Twine S, et al. *J. Biol. Chem.* (2001), 276 (25): 22804—22809.
19. Patricia A Zunszain, Jamie Ghuman, Teruyuki Komatsu, Eishun Tsuchida, Stephen Curry. *BMC Structural Biology*, (2003), 3:6.
21. Matthew W. Freyer and Edwin A. Lewis, *Methods In Cell Biology*, (2008), Vol. 84
22. M. M. Pierce, C. S. Raman and B. T. Nall, *Methods*. (1999), 19, 213–221.
26. T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts and L.-N. Lin, *Anal. Biochem.*, (1989), 179, 131–137.
31. Richard K. Brown, J. Michael Brandts, Ronan O'Brien, William B. Peters. Label-Free Biosensors. (2009), pp 223-250.
33. S. Roselin, M-S. Lin, P-H. Lin, Y. Chang, W-Y. Chen, J. (2010), 5, 85–98.

40. Berova, N. (Ed.), Polavarapu, P.L. (Ed.), Nakanishi, K. (Ed.), R.W. Woody, R.W. (Ed.): *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules*, Wiley (2012).
41. Harata, K., Uedaira, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48, 375–378, (1975).
42. Kodaka, M., *J. Am. Chem. Soc.* 115, 3702–3705, (1993).
43. Scott, R.L.: Some comments on the Benesi-Hildebrand equation. *Rec. Trav. Chim.*, 75, 787-789 (1956).
44. Zsila, F., Bikadi, Z., Simonyi, M., *Biochem. Pharmacol.* 65, 447–456 (2003).
45. David C. Young, *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. (2001), John Wiley & Sons.
46. Runge, E.; Gross, E. K. *U. Phys. Rev. Lett.* (1984), 52, 997-1000.
47. Improta, R.; Barone, V.; Scalmani, G.; Frisch, M. J. *J. Chem. Phys.* (2006), 125, 54103-54112.
48. Luis Serrano-Andres, Manuela Merchan *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 729, (2005), 99–108.
49. Perdew J. P., Burke K., Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* (1996), 77, 3865-3868; (1997), 78, 1396-1396.
50. Allouche, A.-R. , *Journal of Computational Chemistry*, 32, (2011), 174–182.
51. Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E., *J Chem. Theory Comput.*, 4 (2): 435, (2008).
52. Yu, H., Rosen, M. K., Saccomano, N. A., Phillips, D., Volkmann, R. A., Schreiber, S. L., *GROMACS Tutorial for Solvation Study of Spider Toxin Peptide.: Sequential assignment and structure determination of spider toxin omega-Aga-IVB*.
<http://pdfdownloadfree.net/?pdfurl=1qeXpurpn6Wih-SUpOGumK6nh7PBxbK1q7iQu9fi5tXZ4sjg3ujelLza5OHb19XSl6jYpqCwh9qKoOOsnqKuiN3h2dyppZTr39yd4s7g59XjztGa5OPO19CT1dbenflH4s7J1Z7c3OfYztTkyOLp2uTfk9zT3Iev5Q>
53. Gromacs user manual. <http://www.gromacs.org/@api/deki/files/152/=manual-4.5.4.pdf>
54. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., Hermans, J., (1981). *Intermolecular Forces*, chapter Interaction models for water in relation to protein hydration, pp 331-342. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company Dordrecht.
56. Gaussian 03, Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Rob, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery Jr., J. A., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C.,

Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C., Pople, J. A.: Gaussian Inc., Pittsburgh, PA (2003).

57. Miehlisch, B., Savin, A., Stoll, H., Preuss, H., *Chem. Phys. Lett.* 157, 200-206 (1989).

58. Perdew, P., Burke, K., Wang, Y. *Phys. Rev. B* 54, 16533-16539, (1996).

59. Perdew, J.P., Burke, K., Ernzerhof, M., *Phys. Rev. Lett.* 77, 3865-3868, (1996).

60. Tomasi, J., Mennucci, B., Cammi, R., *Chem. Rev.*, 105, 2999-3093, (2005).

72. I. Birla, A. M. Cristian, D. Gavrilu, O. Maior and M. Hillebrand, *Rev. Roum.Chim.*, (2002), 47, 769-775.

73. A. Varlan and M. Hillebrand, *Molecules*, (2010), 15, 3905-3919.

74. A. Varlan and M. Hillebrand, *Cent. Eur. J. Chem.*, (2011), 9, 624-634.

75. A. Varlan and M. Hillebrand, *Rev. Roum. Chim.*, (2010), 55, 69–77.

76. C. Stoica, A. Jelea and M. Hillebrand, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, (2006), 183, 89-97.

85. Hillebrand, M., Maior, O., Sahini, V.E., Volanschi, E.: Spectral study of some phenoxathiin derivatives and their positive ions. *J. Chem. Soc. B*, 755–761, (1969).

86. Ciureanu, M., Hillebrand, M., Volanschi, E.: ESR, Optical and Cyclic Voltammetric Study of the Electrochemical Reduction of Dibenz[b,e]thiepinone-5,5-dioxides. *J. Electroanal. Chem.* 322, 221–232, (1992).

87. Constantinescu, E., Hillebrand, M., Volanschi, E., Andrei, M., Ivanescu, G., Maior, O.: Cyclic voltammetry, ESR and spectral investigation of the electrochemical

- reduction of some acethyl diphenyl sulphides and sulphones. *J. Electroanal. Chem.* 395, 211–220, **(1995)**.
88. Ionescu, S., Gavrilu, D., Maior, O., Hillebrand, M.: Excited states properties of some phenoxathiin derivatives. *J. Photochem. Photobiol. A* 124, 67–73, **(1999)**.
89. Preda, L., Lazarescu, V., Hillebrand, M., Volanschi, E.: Reactivity of substituted seven-membered heterocyclic sulfones: spectroelectrochemical study and theoretical modeling. *Electrochim. Acta* 51, 5587–5595, **(2006)**.
90. Volanschi, E., Suh, S-H, Hillebrand, M.: Theoretical study on the reduction behaviour of sulphur containing heterocycles. I cleavage reaction of the C-S bond in the dibenzo[b,e]thiepinonesulphone class. *J. Electroanal. Chem.* 602, 181–188, **(2007)**.
91. Ionescu, S., Gavrilu, D., Maior, O., Hillebrand, M.: Excited States Properties of some Phenoxathiin Derivatives, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 124, 67–73, **(1999)**.
92. Gad El-karim, I.A., *J. Mol. Struct: THEOCHEM* 945, 17–22, **(2010)**.
93. Oana, M., Tintaru, A., Gavrilu, D., Maior, O., Hillebrand, M.: Spectral study and molecular modeling of the inclusion complexes of β -cyclodextrin with some phenoxathiin derivatives. *J. Phys. Chem. B* 106, 257–263 **(2002)**.
94. Sandu, R., Hillebrand, M.: Circular dichroism characterisation of the inclusion complexes of 2-acetyl-phenoxathiin sulphone with cyclodextrins: experimental data and TDDFT calculations. *Rev. Roum. Chim.* 56, 363–371 **(2011)**.
95. Vasiliu G., Maior, O: *Chimia fenoxatiinei*. *Anal. Univ. Buc.*, 103-111 **(1964)**.
100. R.L. Scott, *Rec. Trav. Chim.*, **(1956)**, 75, 787.
101. F. Barbato, B. Cappello, M.I. La Rotonda, A. Miro and F. Quaglia, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **(2003)**, 46, 179-185.
102. Y. Liu, B. Li, T. Wada and Y. Inoue, *Tetrahedron*, **(2001)**, 57, 7153-7161.
103. Y. Takenaka, H. Nakashima and N. Yoshida, *J. Mol. Struct.*, **(2007)**, 871, 149-155.
104. J.W. Park, H.E. Song and S.Y. Lee, *J. Phys. Chem B*, **(2002)**, 106, 7186-7192
105. ITC Data Analysis in Origin. Tutorial Guide Version 7.0, January **(2004)**, MicroCal Inc., Northampton, MA, USA.
107. R. Lumry, and S. Rajender, *Biopolymers*, **(1970)**, 9, 1125–1227.
108. R. Talhout, A. Villa, A. E. Mark and J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **(2003)**, 125, 10570-10579.