

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

**TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMAT**

**STUDIUL UNOR COMPUSI BIOLOGICI
CU RECEPTORI MACROCICLICI**

Doctorand:

Ana Delia STANCU

Conducător doctorat:

Prof.dr. Lucia MUTIHAC

Comisia de doctorat:

Președinte: Prof. Dr. Camelia Bala

Conducător doctorat: Prof.Dr. Lucia Mutihac

Referenți oficiali:

1. Prof. Dr. Mihaela Hillebrand, de la Universitatea din București
2. Prof. Dr. Elena Diacu, de la Universitatea POLITEHNICA din București
3. C.S.1 Dr. Jaques Vicens, de la CNRS, Universitatea Strasbourg, Franța

2013

CUPRINS

Introducere.....	5
PARTEA GENERALA. DATE DIN LITERATURA	
PARTEA EXPERIMENTALA	
<i>I. Studiul comparativ al complexilor formați între p-sulfonatocalix[n]arene, ciclodextrine și cucurbit[n]uril cu compuși biologici</i>	
Capitolul 4. Aspecte termodinamice ale complexării unor aminoacizi și dipeptide cu p-sulfonatocalix[n]arenele, n = 4,6.....	7
4.1 Considerații generale.....	7
4.2 Condiții experimentale.....	7
4.2.1. Aparatura și reactivii utilizați.....	7
4.2.2. Modul de lucru.....	8
4.2.3 Rezultate și discuții.....	9
4.2.3.1 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexilor unor aminoacizi cu p-sulfonatocalix [4]arena în soluție apoasă.....	9
4.2.3.2 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexilor unor peptide cu p-sulfonatocalix [4]arena în soluție apoasă.....	9
4.2.3.3 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexilor unor dipeptide cu p-sulfonatocalix[6]arena.....	9
4.2.3.4 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexilor unor nucleobaze cu p-sulfonatocalix [4]arena	10
4.3 Concluzii.....	10
Capitolul 5. Studiul complexării unor aminoacizi și dipeptide cu α-ciclodextrina.....	11
5.1 Considerații generale.....	11
5.2 Studiul complexilor aminoacizilor și dipeptidelor cu α -ciclodextrina prin metoda calorimetrică.....	11
5.2.1. Aparatura și reactivii utilizați.....	11
5.2.2. Modul de lucru.....	11
5.2.3. Rezultate și discuții.....	11
5.2.3.1. Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexilor unor aminoacizi și dipeptide cu α -ciclodextrina.....	11
5.3 Concluzii.....	11
Capitolul 6. Aspecte termodinamice ale complexării cucurbit [n]urilului, n = 6,7 cu unele dipeptide și nucleobaze prin metoda calorimetrică, UV-Vis și RMN..	11
6.1 Considerații generale.....	11
6.2 Studiul complexilor cucurbit [6]urilului (CB[6]) cu dipeptide și nucleobaze prin titrare calorimetrică.....	12
6.2.1 Aparatura și reactivii utilizați	12
6.2.2 Modul de lucru.....	12
6.2.3 Rezultate și discuții.....	12
6.2.3.1 Determinarea constantelor de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexilor cucurbit[6]urilului cu dipeptide în soluție acidă.....	12

6.2.3.2	Determinarea constantelor de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexșilor cucurbit[6]urilului cu nucleobaze în soluție acidă.....	12
6.3	Studiul complexării cucurbit [7]urilului (CB[7]) cu unele nucleobaze prin RMN.....	13
6.3.1	Aparatură utilizată.....	13
6.3.2	Modul de lucru.....	13
6.3.3	Rezultate și discuții.....	13
6.4	Studiul UV-VIS al complexșilor nucleobazelor cu CB[7].....	15
6.4.1	Aparatură utilizată.....	15
6.4.2	Modul de lucru.....	15
6.4.3	Rezultate și discuții.....	15
6.5	Concluzii.....	16
II.	<i>Aspecte privind posibilitățile de separare ale aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β-ciclodextrina funcționalizată.....</i>	17
Capitolul 7	Extracția și transportul aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β-ciclodextrina funcționalizată.....	17
7.1	Considerații generale.....	17
7.2	Studiul extracției aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată.....	17
7.2.1	Echilibre de repartiție în extracția lichid-lichid.....	17
7.2.2	Condiții experimentale.....	19
7.2.2.1	Reactivi utilizați.....	19
7.2.2.2	Modul de lucru.....	19
7.3	Rezultate și discuții.....	20
7.3.1	Extracția aminoacizilor nativi: L-Trp, L-Phe și L-Tyr.....	20
7.3.2	Extracția aminoacizilor metilesteri : L-TrpOMe, L-PheOMe și L-TyrOMe.....	20
7.3.3	Relația între extractibilitatea aminoacizilor aromatici și hidrofobicitatea lor.....	22
7.3.4.	Determinarea constantelor de extracție ale aminoacizilor studiați cu β -ciclodextrina funcționalizată.....	23
7.3.4.1	Determinarea coeficientului de extincție ϵ	23
7.3.4.2	Determinarea constantelor de extracție K_{ex}	23
7.4	Studiul transportului aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată.....	24
7.4.1	Condiții experimentale.....	25
7.4.1.1	Reactivi utilizați în procesul de transport.....	25
7.4.1.2	Dispozitive utilizate în procesul de transport.....	25
7.4.1.3	Modul de lucru.....	25
7.4.2	Rezultate și discuții.....	25
7.4.2.1	Transportul L-aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată.....	25
7.4.2.1.1	Etapele care stau la baza transportului prin membrane lichide.....	25
7.4.2.1.2	Transportul L -aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri.....	26
7.4.2.1.3	Relația între transportul aminoacizilor aromatici și hidrofobicitatea lor.....	27
7.4.2.2	Transportul D -aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată.....	28

7.4.2.3 Mecanisme de transport prin membrana lichidă.....	30
7.5 Concluzii.....	30
Capitolul 8. Studiul separării enantiomerilor unor aminoacizi aromatici utilizând β -ciclodextrina funcționalizată prin dicroism circular.....	31
8.1 Considerații generale.....	31
8.2 Condiții experimentale.....	31
8.3 Rezultate și discuții.....	31
8.4 Concluzii.....	33
Concluzii generale.....	33
Bibliografie.....	36
Anexă.....	37

Introducere

Aplicațiile chimiei supramoleculare în diverse domenii ale chimiei, biochimiei și mediului înconjurător au constituit și constituie interesante provocări ale cercetătorilor în rezolvarea unor probleme de actualitate din domeniile mai sus menționate [1].

Teza de față prezintă aspecte ale aplicațiilor unor receptori macrociclici în studiul unor compuși cu relevanță biologică. Astfel sunt studiați receptorii macrociclici calixarenici, α - și β -ciclodextrine și cucurbit[n]uril, $n = 6, 7$ în procese de complexare și separare a unor aminoacizi, dipeptide și nucleobaze. Mai mult se studiază posibilitatea separării enantiomerilor aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri prin membrane lichide de volum utilizând β -ciclodextrina funcționalizată ca transportor chiral. Principalele obiective ale tezei sunt următoarele:

a) Caracterizarea și studiul comparativ al complexilor formați între compușii de importanță biologică și anume aminoacizi, dipeptide și nucleobaze cu: p-sulfonatocalix[n]arene, $n = 4, 6$, α -ciclodextrina și β -ciclodextrina funcționalizată (heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina), cucurbit[6]uril (CB[6]) și cucurbit[7]uril (CB[7]) prin metode spectrofotometrice UV-Vis, calorimetrice, rezonanță magnetică nucleară și spectroscopie de dicroism circular;

b) Studii privind posibilitățile de separare ale compușilor biologici (aminoacizi aromatici în formă nativă și metilesteri) utilizând receptori macrociclici. Pentru aceasta au fost studiate aspecte ale extracției lichid-lichid privind separarea unor aminoacizi aromatici cu receptorul chiral heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina și anume: echilibre de repartiție prezente în sistem bifazic și trifazic, efectul parametrilor care influențează procesul de extracție (pH, timp de agitare, temperatura, determinarea randamentelor de extracție ale aminoacizilor și a constantelor de extracție ale aminoacizilor);

c) Studii privind transportul aminoacizilor aromatici în formă nativă și metilesteri prin membrana lichidă de cloroform cu receptorul chiral heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina în scopul separării enantiomerilor. În acest caz s-au studiat următoarele aspecte: etapele care stau la baza transportului prin membrana lichidă, factorii care influențează transportul prin membrana lichidă (pH-ul, timpul de agitare al fazelor, solventul membranar, anionul pereche, temperatura), mecanismul de transport al aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri prin membrana lichidă de cloroform cu receptorul ciclodextrinic funcționalizat, posibilități de separare ale enantiomerilor aminoacizilor aromatici prin membrane lichide de volum utilizând receptorul chiral heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina.

Lucrarea cuprinde opt capitole principale dintre care primele trei capitole (receptori macrociclici utilizați în chimia analitică, aspecte termodinamice ale complexilor gazdă-oaspete formați cu compuși biologici, aplicații analitice ale receptorilor macrociclici în procesele de separare) se referă la partea teoretică iar următoarele cinci capitole la partea experimentală (originală).

În partea teoretică sunt prezentate sintetic aspecte generale privind importanța implicării receptorilor macrociclici în recunoașterea compușilor chimici și biologici precum și aspecte privind aplicațiile acestora în procesele de separare ale compușilor de interes. Sunt evidențiate cele mai recente studii referitoare la aplicațiile analitice ale receptorilor macrociclici pentru compuși chimici, biochimici și de interes pentru mediul înconjurător.

Partea originală este împărțită în cinci capitole dintre care primele trei capitole prezintă rezultatele obținute în urma studiilor privind procesele de complexare ale cucurbiturilului,

calixarenelor și ciclodextrinelor cu aminoacizi, nucleobaze și dipeptide prin tehnici calorimetrice, spectrometrie UV-Vis, și rezonanță magnetică nucleară. În capitolul 7 sunt prezentate aplicații ale receptorului macrociclic chiral, β -ciclodextrina funcționalizată (heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina) în procese de extracție și transport ale unor aminoacizi nativi și metilesteri prin membrane lichide în vederea separării acestora. În capitolul 8, pentru completarea informațiilor privind posibilitățile de separare ale enantiomerilor aminoacizilor aromatici se folosește spectroscopia de dicroism circular.

Capitolul de concluzii cuprinde o sinteză a rezultatelor obținute pe parcursul acestei lucrări. Lucrarea de față se încheie cu prezentarea referințelor bibliografice și a contribuțiilor publicate rezultate în urma experimentelor efectuate.

PARTEA EXPERIMENTALA

(numerotarea capitolelor, subcapitolelor, figurilor și a tabelelor este cea din teza de doctorat)

I. Studiul comparativ al complexilor formați între p-sulfonatocalix[n]arene, ciclodextrine și cucurbit[n]uril cu compuși biologici

Capitolul 4. Aspecte termodinamice ale complexării unor aminoacizi și dipeptide cu p-sulfonatocalix[n]arena, $n = 4,6$

4.1. Considerații generale

Este binecunoscut faptul că în cadrul chimiei supramoleculare, parametrii termodinamici caracteristici formării complexului reprezintă date indispensabile recunoașterii moleculare. Pentru studiul acestora se utilizează (așa cum s-a menționat și în capitolul 1.5) tehnici ca de exemplu: spectrometria UV-Vis, RMN, titrări calorimetrice, potențimetrice și conductimetrice, precum și metodele cromatografice.

Aminoacizii ca și constituenți fundamentali ai unei largi și variate categorii de macromolecule biologice reprezintă ținte atractive în cadrul chimiei supramoleculare. De aceea, cunoașterea proprietăților aminoacizilor în soluție apoasă, prezintă o mare importanță atât în dezvoltarea procedeele de sinteză, purificare și de separare ale acestora cât și în elucidarea principiilor de transport prin membrane biologice. Mai mult, reactivitatea și activitatea biologică a proteinelor în faza apoasă depinde de hidratarea fragmentelor lor structurale cât și a reziduurilor aminoacizilor [9].

Pe de altă parte, investigarea naturii interacțiilor implicate în cadrul formării complexelor ligand-peptidă este importantă în înțelegerea interacțiilor biomoleculare specifice în regularizarea proceselor celulare, iar studiul factorilor care contribuie la formarea complexului prezintă, de asemenea, importanță în chimia peptidelor [25]. Grupul de cercetare a lui A. W. Hamilton a studiat recunoașterea moleculară a proteinelor stabilind principiile ce guvernează recunoașterea acestora de către macrociclici funcționalizați [30].

Calix[n]arenele solubile în apă pot forma complexe cu numeroase specii biologice, iar proprietățile de incluziune ale oaspeților investigați sunt corelate cu proprietățile lor structurale [64,133,151,181,182]. Arena și colab. au demonstrat prin studii RMN și computaționale posibila formare a complexelor între α -aminoacizi (L-alanina, L-valina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tirozina, L-triptofan) și p-sulfonatocalix[4]arene prin inserarea grupării aromatice sau alifatice în interiorul cavității hidrofobice a calixarenei [183].

În acest capitol am studiat prin metoda calorimetrică posibilitatea formării complexului p-sulfonatocalix[n]arenelor, $n = 4,6$ cu o serie de aminoacizi, dipeptide și nucleobaze în soluție apoasă.

4.2. Condiții experimentale

4.2.1. Aparatura și reactivii utilizați

Studiile termodinamice s-au făcut prin titrări calorimetrice cu ajutorul unui calorimetru TRONAC 450 (Tronac Company). Pentru înregistrarea semnalului termic în funcție de timp se utilizează un microvoltmetru, model 197 (GmbH Company) și un plotter -x,y, model SE 130 (Goertz Company).

Reactivii utilizați

Aminoacizii: L-prolină (L-Pro), L-arginină (L-Arg), L-lizină (L-Lys), L-histidină (L-His), L-aspartic acid (L-Asp), L-serină (L-Ser), L-isoleucină (L-Ile) și L-tirozină (L-Tyr) de puritate > 99% au fost obținuți de la Sigma-Aldrich (fig.4.2) iar dipeptidele au fost obținute de la Fluka. A fost utilizată apă distilată obținută printr-un sistem de filtrare Milli-Q (Millipore). *p*-Sulfonatocalix[4]arena (fig. 4.3) și *p*-Sulfonatocalix[6]arena (fig. 4.4) de puritate analitică (>98 %) au fost obținute de la Acros Organics .

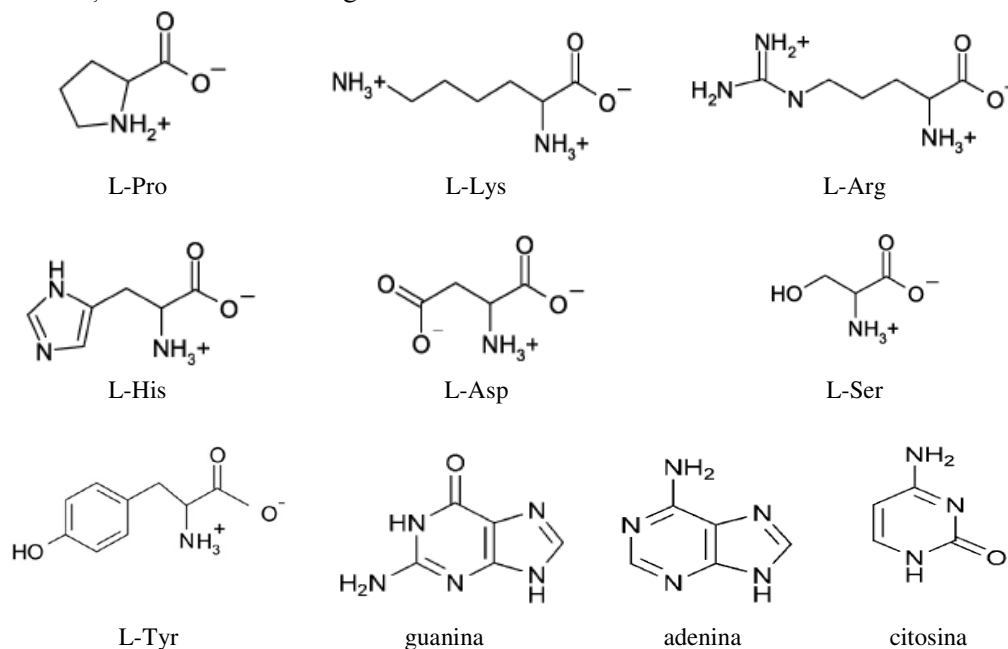


Fig. 4.2 Structura compuşilor utilizați în experimente.

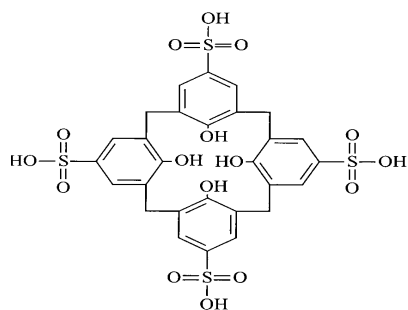


Fig. 4.3 Structura chimică a *p*-sulfonatocalix[4]arenei

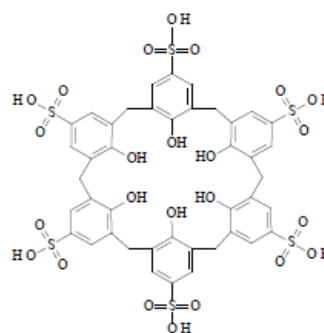


Fig.4.4 Structura chimică a *p*-sulfonatocalix[6]arenei

4.2.2. Modul de lucru

În timpul titrărilor calorimetrice o soluție de ligand corespunzător (0,01 – 0,02 mol/L) a fost adăugată în mod continuu soluției de aminoacid sau peptidă (0,001-0,002 mol/L). Căldura măsurată Q este legată de reacția de entalpie ΔH și de numărul de moli al complexelor formați Δn .

$$Q = \Delta n \cdot \Delta H \quad (4.1)$$

De asemenea, Δn este funcție de constanta de stabilitate care se calculează prin utilizarea unui program specializat.

4.2.3 Rezultate și discuții

4.2.3.1 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexelor aminoacizilor cu *p*-sulfonatocalix[4]arena în soluție apoasă

Valorile constantelor de stabilitate și ale parametrilor termodinamici studiați pentru complecși formați între *p*-sulfonatocalix[4]arena și o serie de aminoacizi în soluție apoasă sunt prezentate în tabelul 1. Studiul a fost făcut în soluție apoasă fără soluție tampon pentru a se evita orice influență a acestuia asupra formării complexului. Se cunoaște faptul ca aminoacizii există în mediu neutru sub formă amfionică (zwitterionică). Rezultatele obținute sunt comparate cu cele obținute în literatura de specialitate prin studii RMN. După cum se observă acestea diferă în cazul unor complecși. Din rezultatele prezentate în tabelul 4.1 se observă că *p*-sulfonatocalix[4]arena formează complecși cu aminoacizii studiați iar complexarea este favorizată de contribuții entalpice și defavorizată de contribuții entropice.

Tabel 4.1. Constantele de stabilitate $\log K$ (K în M^{-1}) și valorile parametrilor termodinamici ΔH și $T\Delta S$ pentru complecșii unor aminoacizi cu *p*-sulfonatocalix[4]arena în soluție apoasă la 25°C.

Aminoacizi	Log K	$-\Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta S$ (kJ/mol)
L-His	$1,8 \pm 0,02$ $1,3^{183}$	$20,1 \pm 0,3$ 15^{183}	- $28,2 \pm 2,4$ - 26^{183}
L-Pro	$3,5 \pm 0,1$ $3,1^{184}$	$36,2 \pm 0,2$ 30^{184}	- $28,5 \pm 1,3$ - 25^{184}
L-Tyr	$2,9 \pm 0,05$ $2,3^{185}$	$31 \pm 2,1$ 27^{185}	- $26,5 \pm 1,4$ - 25^{185}
L-Ser	$1,9 \pm 0,1$ $2,08^{184}$	$22,5 \pm 1,3$ $25,4^{184}$	- $28,7 \pm 1,5$ - 24^{184}
L-Asp	$3,3 \pm 0,07$ $2,7^{184}$	$30,5 \pm 1,4$ $30,1^{184}$	- $25,7 \pm 1,2$ - 24^{184}
L-Ile	$3,07 \pm 0,04$	$46,3 \pm 1,2$	- $32,5 \pm 1,6$
L-Lys	$3,2 \pm 0,02$ $3,08^{185}$	$33,7 \pm 1,2$ $30,9^{185}$	- $28,4 \pm 2,1$ - $35,6^{185}$
L-Arg	$3,01 \pm 0,02$ $3,19^{184}$	$31,6 \pm 2,1$ 30^{184}	- $29,6 \pm 2,1$ - 28^{184}

$C_{L-His} = 1,1 \times 10^{-3} M$; $C_{L-Pro} = 1,2 \times 10^{-3} M$; $C_{L-Tyr} = 1,5 \times 10^{-3} M$; $C_{L-Ser} = 1,1 \times 10^{-3} M$;
 $C_{L-Ser} = 1,8 \times 10^{-3} M$; $C_{L-Asp} = 1,3 \times 10^{-3} M$; $C_{L-Ile} = 2,0 \times 10^{-3} M$; $C_{L-Lys} = 1,6 \times 10^{-3} M$;
 $C_{L-Arg} = 1,4 \times 10^{-3} M$; $C_{L-His} = 1,1 \times 10^{-3} M$; $C_{calix4} = 1,5 \times 10^{-2} M$.

4.2.3.2 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexelor peptidelor cu *p*-sulfonatocalix [4]arena în soluție apoasă

Studiul a fost făcut în soluție apoasă fără soluție tampon. Se observă din rezultatele obținute că este cazul unei complexări favorizate de contribuții entalpice. Prin compararea cu rezultatele obținute prin alte tehnici, în cazul de față cu tehnica RMN, nu se observă diferențe semnificative între valorile constantelor de stabilitate pentru complecșii studiați.

4.2.3.3 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexelor dipeptidelor cu *p*-sulfonatocalix[6]arena

În cazul *p*-sulfonatocalix[6]arenei datorită posibilităților conformaționale ale acesteia există posibilitatea formării atât a complexelor de incluziune cât și a celor de excluziune. Valorile entalpiei de reacție sunt mari sugerând formarea unui complex dar mai sunt necesare studii prin alte tehnici pentru a stabili exact tipurile de interacții prezente în formarea complexului. Ca o concluzie, *p*-sulfonatocalix[6]arena formează complexe cu dipeptidele cu valori ale constantelor de stabilitate cuprinse între $\log K = 3,00$ (L-Leu-L-Ala) și $\log K = 3,36$ (Gly-L-Ala) dar receptorul nu prezintă selectivitate față de dipeptidele studiate.

4.2.3.4 Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexelor unor nucleobaze cu *p*-sulfonatocalix[4]arena

Folosind titrarea calorimetrică am studiat în continuare posibilitatea formării complexelor între *p*-sulfonatocalix[4]arenă și câteva nucleobaze : guanina, citozina și adenina (fig.4.2). Astfel, o soluție apoasă de *p*-sulfonatocalix[4]arenă ($2,0 \times 10^{-2}$ M) a fost adăugată în mod continuu soluției de nucleobază ($1,5 \times 10^{-3}$ M). Modul de lucru a fost cel descris la punctul 4.2.2.

Tabel 4.2. Constantele de stabilitate $\log K$ (K în M^{-1}) și valorile parametrilor termodinamici ΔH și $T\Delta S$ pentru complexii unor nucleobaze cu *p* – sulfonatocalix[4]arene în soluție apoasă la 25⁰ C.

Nucleobaze	Log K	$-\Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta S$ (kJ/mol)
Adenina	$2,2 \pm 0,02$	$22,1 \pm 0,1$	- $15,2 \pm 2,4$
Citozina	$1,5 \pm 0,1$	$18,2 \pm 0,2$	- $11,5 \pm 1,3$
Guanina	$2,1 \pm 0,03$	$20,1 \pm 0,2$	- $10,2 \pm 1,6$

$C_{\text{calix4}} = 2,0 \times 10^{-2}$ M ; $C_{\text{nucleobaze}} = 1,5 \times 10^{-3}$ M.

4.3 Concluzii

Din rezultatele prezentate se observă că *p*-sulfonatocalix[4]arena formează complexe cu aminoacizii studiați iar complexarea este favorizată de contribuții entalpice și defavorizată de contribuții entropice. Valorile constantelor de stabilitate și ale parametrilor termodinamici studiați pentru complexii formați între *p*-sulfonatocalix[4]arena și dipeptide au valori mari sugerând formarea complexului favorizat de contribuții entalpice. Rezultatele obținute sunt comparate cu cele obținute în literatura de specialitate prin alte tehnici, în cazul de față cu tehnica RMN. De asemenea nu se observă diferențe semnificative între valorile constantelor de stabilitate pentru complexii studiați. Din studii în stare solidă pentru complexul gazdă-oaspete format de *p*-sulfonatocalix[4]arena cu histidina s-a constatat că responsabile sunt legăturile de hidrogen (N-H...O) formate între gruparea amino a aminoacidului și grupările SO_3^- ale calixarenei [186].

Ca o concluzie, *p*-sulfonatocalix[6]arena formează complexe cu dipeptidele cu valori ale constantelor de stabilitate cuprinse între $\log K = 3,00$ (L-Leu-L-Ala) și $\log K = 3,36$ (Gly-L-Ala) dar receptorul nu prezintă selectivitate față de dipeptidele studiate. Deci există posibilitatea formării atât a complexelor de incluziune cât și a celor de excluziune. Valorile constantelor de stabilitate obținute în cazul studiului nucleobazelor au valori mici cuprinse între $\log K = 1,1$ și $\log K = 2,2$ pentru citozina și respectiv adenina.

Capitolul 5. Studiul complexării unor aminoacizi și dipeptide cu α -ciclodextrina

5.1 Considerații generale

5.2 Studiul complexelor aminoacizilor și dipeptidelor cu α -ciclodextrina prin metoda calorimetrică

5.2.1. Aparatura și reactivii utilizați

5.2.2. Modul de lucru

5.2.3. Rezultate și discuții

5.2.3.1. Determinarea constantei de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexelor unor aminoacizi și dipeptide cu α -ciclodextrina

Toți aminoacizii și peptidele studiate (L-leucină, L-izoleucină, L-valină, L-alanină, glicină, L-fenilalanină, L-triptofan, L-tirozină și peptidele: glicil-leucină, glicil-valină, glicil-triptofan) formează complexe cu α -ciclodextrina. După cum s-a observat din rezultatele obținute complexarea aminoacizilor este caracterizată de valori mici ale entalpiei de reacție și prin contribuții ale entropiei de reacție. Complexarea dipeptidelor cu α -ciclodextrina este favorizată de asemenea de entropia de reacție. Ca și în cazul aminoacizilor, îndepărtarea celor două molecule de apă din cavitatea α -ciclodextrinei [189] influențează entropia de reacție. Valorile entalpiilor de reacție sunt apropiate de zero.

5.3 Concluzii

Ca o concluzie, reacțiile de complexare ale ciclodextrinelor în fază apoasă sunt caracterizate de valori mici ale entalpiei de reacție, pentru anumiți componenți aproape egale cu cele ale entropiei de reacție. Se poate menționa că reacția de complexare a unor aminoacizi și dipeptide cu α -ciclodextrina este favorizată de contribuții entalpice și contribuții entropice iar în formarea complexelor sunt implicate interacțiile hidrofobe.

Capitolul 6. Aspecte termodinamice ale complexării cucurbit[n]urilului, $n = 6,7$ cu unele dipeptide și nucleobaze prin metoda calorimetrică

6.1 Considerații generale

În ultimii ani familia receptorilor sintetici numiți cucurbit[n]uril cu $n = 5-11$ a fost și este din ce în ce mai mult implicată în procese chimice și biologice datorită afinității acestor compuși de a complexa molecule de natură organică, anorganică și biologică. Așa cum s-a menționat în partea de literatură, acești receptori au cavități hidrofobe de diferite mărimi ceea ce le permite prinderea diversilor compuși oaspete precum și diferite solubilități în apă sau solvenți organici.

În acest capitol vor fi prezentate câteva aspecte privind posibilitățile de complexare ale cucurbit[6]uril și cucurbit[7]uril cu dipeptide și nucleobaze prin tehnici calorimetrice și rezonanță magnetică nucleară.

6.2 Studiul complexelor cucurbit [6]urilului (CB[6]) cu dipeptide și nucleobaze prin titrare calorimetrică

6.2.1 Aparatura și reactivii utilizați

Dipeptidele și nucleobazele utilizate în experimente: glicil-leucină, glicil-valină, glicil-triptofan, glicil-alanină, glicil-histidină, adenina, citozina, guanina și uracilul au fost obținute de la firma Fluka și au fost de puritate analitică. Receptorul cucurbit[6]uril (figura 6.2) a fost sintetizat și purificat în lab. Universității Duisburg-Essen. Complexarea dipeptidelor cu CB[6] a fost studiată în soluție apoasă acidă (acid formic 50%) datorită solubilității mici a ligandului în apă.

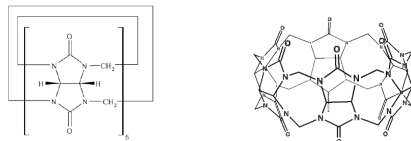


Fig. 6.2 Cucurbit[6]uril (CB[6])

6.2.2 Modul de lucru

6.2.3 Rezultate și discuții

6.2.3.1 Determinarea constantelor de stabilitate și a parametrilor termodinamici

ai complexelor cucurbit[6]urilului cu dipeptide în soluție apoasă acidă (acid formic 50%)

Se observă că valorile constantelor de stabilitate sunt aproape identice între ele și sunt cuprinse între $\log K = 2,64$ (Gly-His) și $\log K = 2,90$ (Gly-Trp). Se presupune că interacțiile implicate în complexii formați de cucurbit[6]uril cu dipeptidele studiate sunt interacții de tip ion dipol formate între gruparea amino protonată a dipeptidei și gruparea carbonil a cucurbit[6]urilului. De asemenea se observă că structura diferitelor peptide examinate nu au influență asupra valorii constantei de stabilitate. Chiar și entropia de reacție are valori apropiate pentru toți complexii studiați. Aceste rezultate pot fi explicate prin formarea complexelor de excluziune.

6.2.3.2 Determinarea constantelor de stabilitate și a parametrilor termodinamici ai complexelor cucurbit[6]urilului cu nucleobaze în soluție acidă

În tabelul 6.2 sunt prezentate valorile constantelor de stabilitate și a parametrilor termodinamici, entalpie și entropie ce caracterizează complexii formați între CB[6] și câteva nucleobaze în soluție apoasă acidă. Rezultatele demonstrează că CB[6] formează complexe cu nucleobazele studiate.

Tabel 6.2. Constantele de stabilitate $\log K$ (K în M^{-1}) și valorile parametrilor termodinamici ΔH și $T\Delta S$ pentru complexii unor nucleobaze cu CB[6] în soluție apoasă apoasă acidă (acid formic 50%) la 25°C.

Nucleobaze	$\log K (M^{-1})$	$-\Delta H (kJ/mol)$	$T\Delta S (kJ/mol)$
Adenina	$4,30 \pm 0,1$	$2,88 \pm 0,2$	$21,8 \pm 0,9$
Guanina	$3,30 \pm 0,05$	$2,32 \pm 0,6$	$20,4 \pm 1,2$
Citozina	$2,65 \pm 0,06$	$3,2 \pm 0,4$	$11,9 \pm 1,0$
Uracil	$2,64 \pm 0,01$	$2,57 \pm 0,1$	$12,5 \pm 0,8$

$C_{CB[6]} = 5,0 \times 10^{-2} M$; $C_{adenina} = 3,0 \times 10^{-3} M$; $C_{guanina} = 2,7 \times 10^{-3} M$; $C_{uracil} = 2,8 \times 10^{-3} M$.

Constantele de stabilitate sunt cuprinse între $\log K = 2,64$ pentru uracil și $\log K = 4,30$ pentru adenină. În cazul bazelor nucleice studiate se observă valori mici ale entalpiei de reacție iar complexarea este caracterizată atât de contribuții entalpice cât și de contribuții entropice.

6.3 Studiul complexării cucurbit [7]uril (CB[7]) cu unele nucleobaze prin RMN

Experimentele au continuat cu studiul posibilităților de complexare a cucurbit[7]urilului cu nucleobazele. Cucurbit[7]urilul în comparație cu cucurbit[6]uril este solubil în apă ceea ce îi conferă aplicații interesante în studiul compușilor cu relevanță biologică. Cucurbit[7]uril prezintă o solubilitate moderată în apă și anume $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L care este similară cu cea a β -ciclodextrinei, $1,6 \times 10^{-2}$ mol/L. Mai jos sunt prezentate rezultatele obținute prin studii de rezonanță magnetică nucleară referitoare la posibilitatea formării complexelor lui CB[7] cu adenina și citozina. Din motive de solubilitate în apă, guanina nu a fost încă studiată.

6.3.1 Aparatură utilizată

Pentru obținerea spectrelor ^1H -RMN s-a utilizat un spectrometru Spectrometrul Varian Inova 400 (Institutul de Chimie Organică "C.D. Nenițescu"), operând cu 9,4 Tesla corespunzător unei frecvențe de rezonanță de 300 MHz pentru ^1H . Probele au fost studiate în tuburi RMN de 5 mm (Norell 507).

6.3.2 Modul de lucru

O probă de 1 mg (adenină sau citozină) a fost dizolvată în 650 μL D_2O . Probele au fost sonificate 5 minute pentru degazare și amestecare.

6.3.3 Rezultate și discuții

În figura 6.4 este prezentat spectrul ^1H -RMN al cucurbit[7]uril în D_2O (6 mg CB[7] în 650 μL D_2O) iar în figura 6.5 spectrul ^1H -RMN al adeninei în prezența CB[7] cu concentrații diferite. Din spectrul ^1H -RMN al adeninei prezentat în fig.6.5 în absența și în prezența unor cantități crescătoare de CB[7] se semnalează prezența a doi protoni H_x și H_y ai adeninei. Ei prezintă o deplasare chimică odată cu creșterea cantității de CB[7] de la bază către partea de sus a spectrului. Acest lucru sugerează posibilitatea formării unui complex de incluziune adică adenina poate fi inclusă în cavitatea receptorului CB[7]. Acest aspect evident trebuie corelat și cu alte tehnici pentru a demonstra formarea complexului. S-au continuat experimentele pentru studiul posibilității formării unui complex între CB[7] și citozină.

Spectrul ^1H -RMN al citozinei în absența și în prezența unor cantități crescătoare de CB[7] este prezentat în figura 6.6. Si în cazul spectrului citozinei în absența și în prezența unor cantități crescătoare de CB[7] se semnalează prezența a doi protoni H_x și H_y ai citozinei. Aceștia prezintă o deplasare chimică odată cu creșterea cantității de CB[7] de la bază către partea de sus a spectrului. Acest lucru sugerează posibilitatea formării unui complex de incluziune adică citozina ar putea fi inclusă în cavitatea receptorului CB[7].

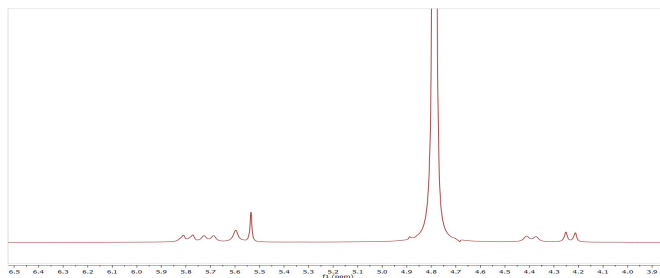
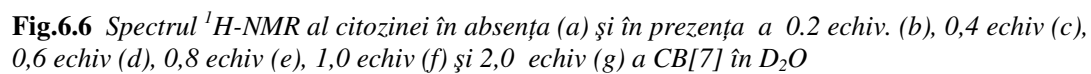
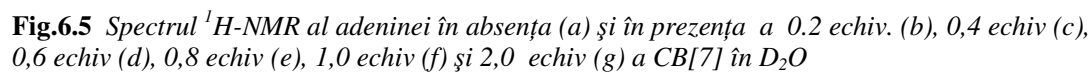


Fig.6.4 Spectrul RMN al cucurbit[7]uril în D_2O



6.4 Studiul UV-Vis al complexelor nucleobazelor cu CB[7]

Bazându-ne pe rezultatele obținute prin studii RMN privind posibilitatea formării unui complex de incluziune sau excluziune între CB[7] și adenină sau citozină s-a studiat în continuare comportamentul spectrofotometric al nucleobazelor în prezența cucurbit[7]urilului.

6.4.1 Aparatură utilizată

Pentru citirea absorbanțelor s-a folosit spectrofotometrul UV-Vis Jasco V-530 iar pH-ul soluțiilor de aminoacizi s-a măsurat cu un pH-metru Pracitronic MV-870 cu electrod de sticlă și electrod de calomel.

6.4.2 Modul de lucru

S-au cântărit la balanța analitică cantitățile necesare de adenină, citozină și CB[7]. Astfel s-au preparat soluții apoase de CB[7] cu concentrații crescătoare cuprinse între $2,0 \times 10^{-4}$ M - $1,0 \times 10^{-3}$ M, soluție de adenină $1,0 \times 10^{-4}$ M, soluție apoasă de citozină de concentrație $1,0 \times 10^{-3}$ M. Adenina absoarbe în domeniul ultraviolet la $\lambda = 256$ nm, iar citozina la $\lambda = 265$ nm. CB[7] nu absoarbe în domeniul ultraviolet.

6.4.3 Rezultate și discuții

În figura 6.7 este prezentat spectrul UV-Vis al adeninei în absența și în prezența diferitelor concentrații crescătoare de CB[7]. Din spectrele UV-Vis se observă o scădere a absorbției adeninei în funcție de creșterea cantității de CB[7] ($2,0 \times 10^{-4}$ – $7,0 \times 10^{-4}$ M). Din reprezentarea grafică a absorbției în funcție de concentrația cucurbit[7]urilului se obține o dreaptă. Corelând rezultatele obținute prin spectrometrie în UV-Vis cu cele obținute prin RMN se poate spune că este posibilă formarea unui complex de incluziune al CB[7] cu adenina.

Același experiment a fost efectuat și pentru citozină. Astfel în figura 6.8 este prezentat spectrul UV-Vis al citozinei în absența și în prezența diferitelor concentrații crescătoare de CB[7]. La fel ca și în cazul adeninei din spectrele UV-Vis se observă o scădere a absorbției citozinei în funcție de creșterea cantității de CB[7]. Totuși apar unele diferențe. Astfel pe măsură ce crește concentrația de CB[7] peste $6,0 \times 10^{-4}$ M se observă deplasarea maximumului de absorbție al citozinei de la 265 nm cum era inițial către 271,5 nm. Deci, în cazul citozinei scăderea absorbției acesteia în prezența CB[7] este liniară în domeniul de concentrație $2,0 \times 10^{-4}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M iar peste această concentrație a receptorului probabil se formează alt tip de complex.

Corelând rezultatele obținute prin spectrometrie în UV-Vis cu cele obținute prin RMN se poate spune că este posibilă formarea unui complex de incluziune al CB[7] cu citozina respectând condițiile de concentrație ale receptorului.

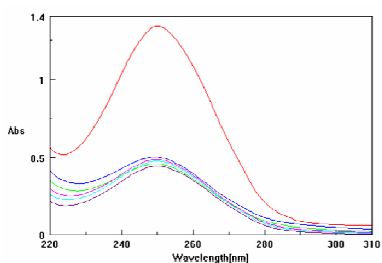


Fig. 6.7 Spectrul UV-Vis al adeninei în soluție apoasă în prezența unor cantități crescătoare de CB[7] ($2,0 \times 10^{-4}$ - $7,0 \times 10^{-4}$ M) ; $\lambda = 256$ nm.

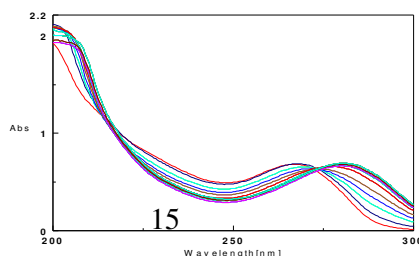


Fig. 6.8 *Spectrul UV-Vis al citozinei în apă în prezența unor cantități crescătoare de CB[7] ($2,0 \times 10^{-4}$ - $9,0 \times 10^{-4}$ M); $\lambda = 265$ nm.*

6.5 Concluzii

Valorile constantelor de stabilitate în cazul complexării lui CB[6] cu dipeptidele sunt aproape identice între ele și sunt cuprinse între $\log K = 2,64$ (Gly-His) și $\log K = 2,90$ (Gly-Trp). De asemenea, interacțiile implicate în complexii formați de cucurbit[6]uril cu dipeptidele studiate se sugerează a fi interacții de tip ion dipol între gruparea amino protonată a dipeptidei și gruparea carbonil a cucurbit[6]urilului. În cazul nucleobazelor studiate cu CB[6] se observă valori mici ale entalpiei de reacție iar complexarea este caracterizată atât de contribuții entalpice cât și de contribuții entropice.

Din spectrul ^1H -RMN al adeninei prezentat în absența și în prezența unor cantități crescătoare de CB[7] s-a semnalat deplasarea chimică a celor doi protoni H_x și H_y ai adeninei odată cu creșterea cantității de CB[7] de la bază către partea de sus a spectrului. Acest lucru sugerează posibilitatea formării unui complex de incluziune adică adenina poate fi inclusă în cavitatea receptorului CB[7].

Corelând rezultatele obținute prin RMN cu cele obținute prin spectrometrie în UV-Vis se poate spune că este posibilă formarea unui complex de incluziune al CB[7] cu adenina. La fel ca și în cazul adeninei din spectrele UV-Vis se observă o scădere a absorbției citozinei în funcție de creșterea cantității de CB[7] dar cu unele diferențe sugerându-se posibilitatea formării și a altor tipuri de complexe. Astfel prin rezultatele obținute prin spectrometrie în UV-Vis și cu cele obținute prin RMN se poate spune că este posibilă formarea unui complex de incluziune al CB[7] cu citozina respectând condițiile de concentrație ale receptorului.

II. Aspecte privind posibilitățile de separare ale aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată

Capitolul 7. Extracția și transportul aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată

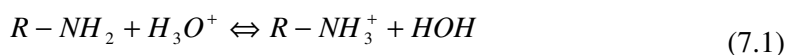
În acest capitol au fost studiate posibilitățile utilizării β -ciclodextrinei funcționalizate, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină (fig.7.1) ca extractant al unor aminoacizi din faza apoasă în faza organică și ca transportor prin membrane lichide în scopul separării unor aminoacizi aromatici în stare nativă sau metilesteri (190, 191).

7.1. Considerații generale

7.2 Studiul extracției aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată

7.2.1 Echilibre de repartitie în extracția lichid-lichid

Este binecunoscut că în funcție de pH, aminoacizii pot fi transferați în soluție apoasă în forma protonată $R - \text{NH}_3^+$ conform echilibrului:



caracterizat de constanta de aciditate K_a ,

$$K_a = \frac{[R - \text{NH}_2][\text{H}_3\text{O}^+]}{[R - \text{NH}_3^+]} \quad (7.2)$$

Această formă cationică a aminoacidului, există în soluție la un pH dependent de valoarea constantei K_a și poate fi complexată de receptorii macrociclici neutri pe baza echilibrului:



caracterizat de constanta de stabilitate β_1 :

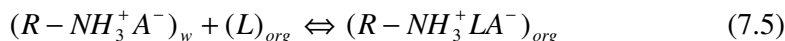
$$\beta_1 = \frac{[R - NH_3^+ L]}{[R - NH_3^+][L]} \quad (7.4)$$

$[R - NH_3^+ L]$ - concentrația complexului după extracție (mol/L);

$[R - NH_3^+]$ - concentrația aminoacidului în faza apoasă înainte de extracție (mol/L);

$[L]$ - concentrația ligandului în faza organică (mol/L).

Complexul cationic format se poate extrage din apă într-un solvent organic sub forma unei perechi de ioni, dacă anionul A^- va avea dimensiunea și structura compatibilă cu ligandul. În acest caz complexul format va fi de forma $(R - NH_3^+ LA^-)$ conform echilibrului:



cu constanta de extracție K_{ex} :

$$K_{ex} = \frac{[R - NH_3^+ LA^-]_{org}}{[R - NH_3^+ A^-]_w [L]_{org}} \quad (7.6)$$

în care: w - faza apoasă a sistemului

org - faza organică

$[R - NH_3^+ LA^-]$ - reprezintă concentrația complexului (mol/L);

$[R - NH_3^+ A^-]$ - reprezintă concentrația aminoacidului sub formă de pereche de ioni;

$[L]$ - concentrația ligandului (mol/L);

Anionul A^- poate fi baza conjugată a unui acid organic HA și se formează în soluție pe baza echilibrului:



caracterizat de constanta de aciditate K_a' :

$$K_a' = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (7.8)$$

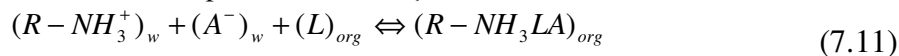
Constanta de aciditate K_a' va determina domeniul pH-ului în care predomină anionul A^- în soluție. În baza echilibrului, ligandul macrociclic L se va repartiza între cele două faze lichide ale sistemului, fiind caracterizat de constanta de repartitie K_L :



Constanta de repartitie K_L :

$$K_L = \frac{[L]_{org}}{[L]_w} \quad (7.10)$$

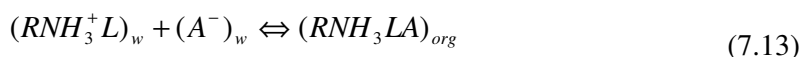
Se poate astfel determina echilibrul global al extracției perechii de ioni pe baza echilibrelor individuale prezentate în relațiile de mai sus:



Având constanta globală de extracție K_{ex} :

$$K_{ex} = \frac{[R - NH_3^+ LA]_w}{[R - NH_3^+]_w [A^-]_w [L]_{org}} \quad (7.12)$$

Deoarece valorile constantelor care implică specii încărcat în solventul organic sunt foarte mici, echilibrul semnificativ al extracției se definește astfel:



cu constanta de extracție K'_{ex} :

$$K'_{ex} = \frac{[RNH_3^+ LA]_{org}}{[RNH_3^+ L]_w [A^-]_w} \quad (7.14)$$

Raportul de distribuție al aminoacidului în sistem apă-solvent

Se definește raportul de distribuție (D) al aminoacidului între cele două faze (org) și (w) ca fiind raportul dintre concentrația aminoacidului la echilibru în fază organică și în fază apoasă:

$$D = \frac{[R - NH_3^+ LA]_{org}}{[R - NH_2]_w + [R - NH_3^+]_w} \quad (7.15)$$

Raportul de distribuție D mai sus definit reprezintă în fapt o măsură a extractibilității și a stabilității complexului format între ligand și aminoacid în faza organică.

7.2. 2 Condiții experimentale

7.2.2.1. Reactivi utilizați

Toți aminoacizii utilizați (fig. 7.1): L-, D-fenilalanina, L-, D-triptofan, L-,D-tirozina, L-,D-triptofan metilester (L-TrpOMe, D-TrpOMe), L-, D-fenilalanina metilester (L-PheOMe, D-PheOMe) și L-, D-tirozina metilester (L-TyrOMe, D-TyrOMe) au fost de puritate > 98% și de proveniență Fluka. Receptorul heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină a fost obținut de la firma Ciclolab (Ungaria) și a fost utilizat fără purificare prealabilă. A fost folosită apă distilată (Millipore). Cloroformul (Merck) a fost saturat cu apă distilată.

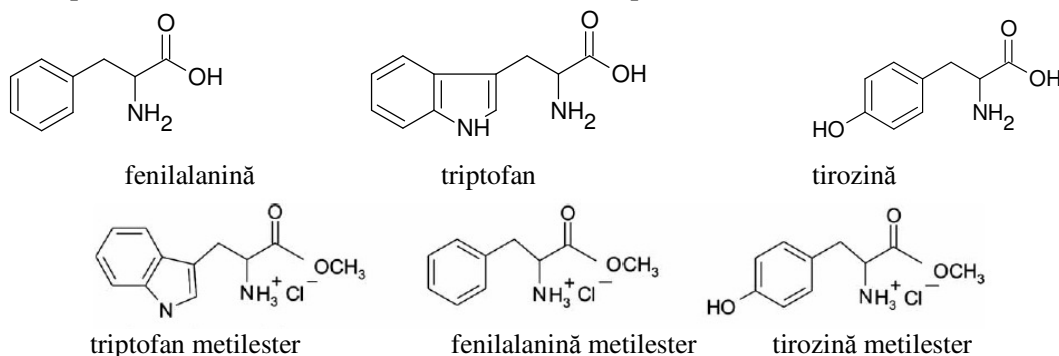
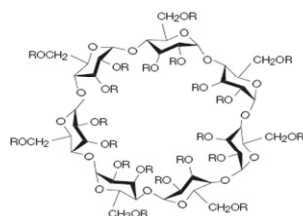


Fig. 7.1 Aminoacizii utilizați în experimente



Heptakis(2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină

Fig. 7.2 *β -ciclodextrina funcționalizată utilizată în experimente.*

Pentru măsurătorile spectrofotometrice s-a folosit spectroforometru UV-Vis, JASCO V-530.

7.2.2.2 Modul de lucru

Extracția lichid-lichid

Pentru extracția lichid-lichid a aminoacizilor nativi și derivați s-au preparat soluții stoc de aminoacizi în apă saturată cu cloroform de concentrații cuprinse între $2,5 \times 10^{-4}$ și $5,0 \times 10^{-4}$ M și heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina în cloroform saturat cu apă, de concentrație $1,0 \times 10^{-3}$ M folosind baloane cotate de 25 sau 50 ml. Extracția aminoacizilor din faza apoasă în faza organică s-a realizat în pâlnii de separare.

S-au luat volume egale (10 mL) de soluție apoasă de aminoacid în formă nativă sau metilester la pH = 5,5 (NaOAc/HAc) și soluție de heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina în cloroform (10 mL) și s-au agitat 30 minute la $T = 25^{\circ}\text{C}$. pH-ul fazei apoase a fost ajustat cu HCl. Absorbanțele aminoacizilor aromatici au fost citite la spectrofotometru la lungimile de undă $\lambda = 278$ nm (L-Trp și L-TrpOMe), $\lambda = 258$ nm (L-Phe și L-PheOMe) și $\lambda = 274$ nm (L-Tyr și L-TyrOMe). Extracția procentuală a fost calculată cu ajutorul formulei lui Pedersen[192]:

$$E\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (7.20)$$

În care: A_0 - absorbanța fazei apoase înainte de extracție;

A - absorbanța fazei apoase după extracție;

sau considerând concentrațiile soluțiilor, expresia de mai sus, poate fi scrisă:

$$E\% = [(C_0 - C) / C_0] \times 100 \quad (7.21)$$

în care: C_0 și C sunt concentrațiile inițiale și finale, înainte și după extracție. Fiecare experiment a fost repetat de 5 ori.

7.3 Rezultate și discuții

7.3.1 Extracția aminoacizilor nativi : L-Trp, L-Phe și L-Tyr

Rezultatele experimentale demonstrează că pH-ul optim al soluției de aminoacid în procesul de extracție este 5,5. De asemenea, s-a stabilit că timpul optim de agitare al fazelor pentru toți aminoacizii luați în studiu este de 30 de minute. Așa cum s-a menționat mai sus, aminoacizii aromatici nativi și derivați (L-Trp, L-TrpOMe, L-Phe, L-PheOMe, L-Tyr, L-TyrOMe) au fost extrași din faza apoasă la un pH $\approx 5,5$ (NaOAc/HAc) într-o fază organică folosind ca extractant receptorul chiral heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina cu o concentrație $1,0 \times 10^{-3}$ M, în cloroform. Modul de lucru este asemănător cu cel descris la cap. 7.2.2.2. Extracția procentuală s-a calculat conform relației (7.20). Absorbanțele fazelor apoase înainte și după extracție au fost citite spectrofotometric la Spectrofotometrul UV-Vis Jasco V-530. Valorile extracției procentuale obținute pentru L-Trp, L-Phe, și L-Tyr au fost 17,5%, 15,3% și 8%. În acest caz extractantul, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina, nu manifestă o afinitate mare pentru aminoacizii în formă nativă.

7.3.2 Extracția aminoacizilor metilesteri : L-TrpOMe, L-PheOMe și L-TyrOMe

În cazul extracției aminoacizilor metilesteri, L-TrpOMe, L-PheOMe și L-TyrOMe cu receptorul chiral heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina în condițiile menționate la cap.

7.2.2.2, valorile extracției procentuale calculate conform relației (7.20) pentru L-TrpOMe, L-PheOMe și L-TyrOMe au fost: 50,2%, 35,1% și 17%. Spre deosebire de valorile extracției procentuale obținute pentru aminoacizii nativi în acest caz valorile sunt mult mai mari. Deci, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina manifestă o afinitate mai mare pentru aminoacizii metilesteri.

Spectrele UV-Vis obținute în urma extracției aminoacizilor metilesteri cu β -ciclodextrina funcționalizată sunt prezentate în figura 7.6.

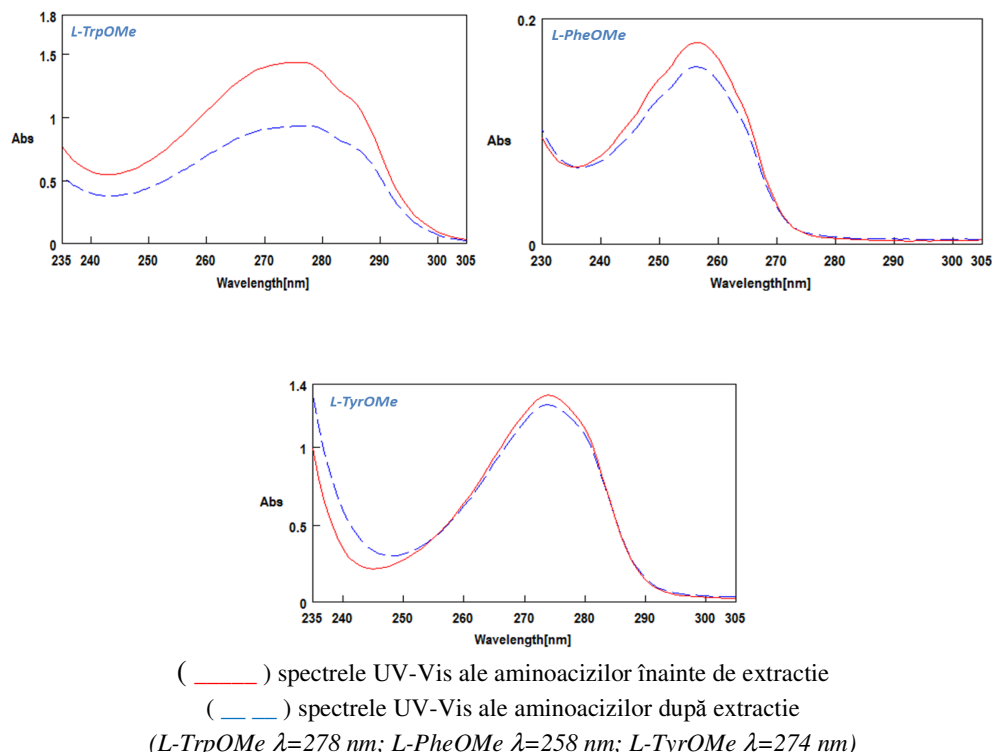


Fig. 7.6. Spectrele UV-Vis obținute în procesul de extracție al aminoacizilor metilesteri cu β -ciclodextrina funcționalizată

Rezultatele obținute în cazul extracției aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri cu receptorul chiral heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina sunt prezentate în tabelul 7.1, iar reprezentarea grafică a extractibilității aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri din fază apoasă în cloroform cu ciclodextrina modificată este prezentată în figura 7.7.

Tabelul 7.1 Extracția procentuală a aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri cu heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina

Aminoacid	Randament de extracție	RDS (%)
L-TrpOMe $2,5 \times 10^{-4}$ M	50,2	2,5
L-Trp 5×10^{-4} M	17,5	1,3
L-PheOMe $2,5 \times 10^{-4}$ M	35,1	2,1
L-Phe 5×10^{-4} M	15,3	1,2
L-TyrOMe $2,5 \times 10^{-4}$ M	17,0	1,3
L-Tyr 5×10^{-4} M	8,0	0,9

Din tabelul 7.1, se observă că aminoacidul L-TrpOMe este extras de β -ciclodextrina funcționalizată cu un randament de 50,2 %. Urmează extracția aminoacidului L-PheOMe (35,1 %) și apoi L-TyrOMe cu un procent de 17,0 %. Valori mici ale randamentului de extracție au fost obținute pentru aminoacizii nativi după cum urmează: L-TrpOMe > L-PheOMe > L-TyrOMe. Același aspect se poate observa și în cazul extracției D-aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri privind valorile randamentelor de extracție ale aminoacizilor în forma L obținute în aceleași condiții folosind ca extractant heptakis (2,3,6-tri-O-acetil) - β -ciclodextrina. În tabelul 7.2 sunt prezentate valorile concentrațiilor aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri în forma L și D extrași cu β -ciclodextrina funcționalizată.

Tabel 7.2 Valorile concentrațiilor molare și a randamentelor de extracție pentru aminoacizii studiați cu β -CD

Aminoacid	Concentrație inițială $M \times 10^{-4}$	Concentrație L- aminoacid extras $M \times 10^{-4}$	η_L (%)	Concentrație D- aminoacid extras $M \times 10^{-4}$	η_D (%)
TrpOMe	2,5	1,26	50,2	1,22	48,9
Trp	5,0	0,88	17,5	0,48	9,5
PheOMe	2,5	0,88	35,1	0,80	32
Phe	5,0	0,77	15,3	0,68	13,5
TyrOMe	2,5	0,43	17	0,37	15
Tyr	5,0	0,40	8	0,45	9

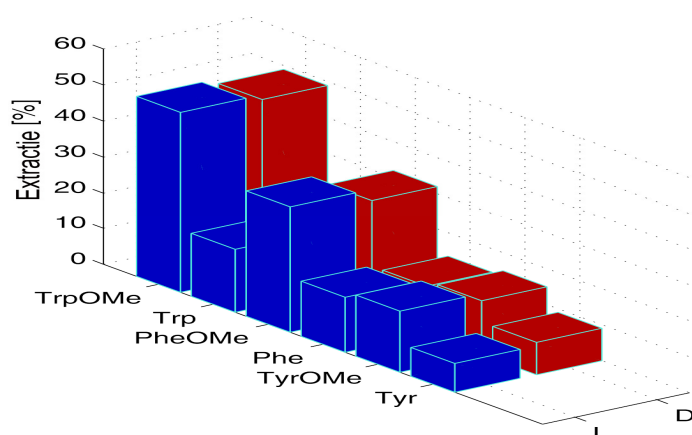


Fig. 7.8 Reprezentarea grafică a extractibilității aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri din fază apoasă în cloroform cu β -ciclodextrina funcționalizată.

7.3.3 Relația între extractibilitatea aminoacizilor aromatici și hidrofobicitatea lor

Din figura 7.9, în care este reprezentată relația între extracția procentuală a aminoacizilor aromatici studiați și hidrofobicitatea lor se observă o corelație între acestea și anume, aminoacizii cu hidrofobicitate mai mare sunt extrași cu randamente mai mari. Astfel L-Trp (- 1,16) > L-PheOMe (- 1,45) > L-TyrOMe (- 2,11).

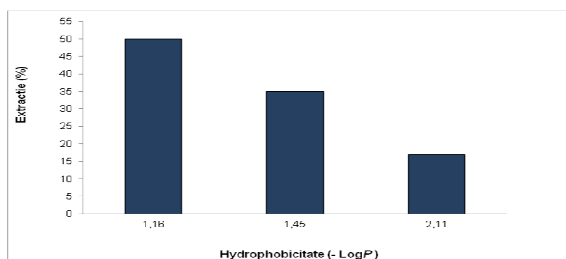


Fig. 7.9 Relația între extractibilitatea și hidrofobicitatea aminoacizilor ($-\text{Log } P^{191}$), *L-TrpOMe* (-1,16); *L-PheOMe* (-1,45); *L-TyrOMe* (-2,11).

7.3.4. Determinarea constantelor de extracție ale aminoacizilor studiați cu β -ciclodextrina funcționalizată

7.3.4.1. Determinarea coeficientului de extincție ε

7.3.4.2. Determinarea constantelor de extracție K_{ex}

Pentru determinarea constantelor de extracție, s-au efectuat extracții la $\text{pH} = 5,5$ (NaOAc/HAc) menținându-se concentrația aminoacidului constantă și variind concentrația β -ciclodextrinei funcționalizate. Măsurând absorbția și cunoscând coeficientul de extincție s-a calculat concentrația de RNH_3L în faza organică și s-au putut calcula concentrațiile la echilibru, aspect ce a permis calculul constantelor de extracție K_{ex} .

Constanta de extracție este reprezentată prin următoarea relație:

$$K_{ex} = \frac{[R - \text{NH}_3^+ \text{L}]_o}{[R - \text{NH}_3^+]_w [L]_o} \quad (7.25)$$

în care: $[R - \text{NH}_3^+ \text{L}]_o$ - concentrația complexului după extracție (mol/L);

$[R - \text{NH}_3^+]_w$ - concentrația aminoacidului în faza apoasă (mol/L);

$[L]_o$ - concentrația β -ciclodextrinei funcționalizate în faza organică (mol/L);

Pentru fiecare aminoacid în parte, s-au determinat trei constante de extracție pentru concentrații diferite de β -ciclodextrină funcționalizată și s-a prezentat o medie a acestora. Valorile constantelor de extracție obținute sunt prezentate în tabelul 7.3.

Tabelul 7.3. Constantele de extracție ale aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri cu β -ciclodextrina funcționalizată

Aminoacid	ε (L/mol·cm)	Log K_{ex}
L-TrpOMe	5427	$3,50 \pm 0,06$
L-Trp	3274	$2,07 \pm 0,10$
L-PheOMe	4780	$2,94 \pm 0,08$
L-Phe	2750	$1,70 \pm 0,09$
L-TyrOMe	2573	$1,50 \pm 0,07$
L-Tyr	2428	-

$C_{\text{aminoacid}} = 3,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\beta\text{-CD}} = 1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ (în cloroform);
 $\text{pH} = 5,5$ (NaOAc/HAc), $T = 25^\circ \text{ C}$.

Valorile constantelor de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri (L-TrpOMe, L-PheOMe, L-TyrOMe) sunt mai mari decât cele ale aminoacizilor aromatici nativi (L-Trp, L-Phe, L-Tyr) așa cum se observă din tabelul 7.3. Se observă de asemenea că valorile constantelor de

extracție depind de hidrofobicitatea aminoacidului luat în studiu. Astfel L-TrpOMe fiind cel mai hidrofob dintre aminoacizi studiați are valoarea constantei de extracție cea mai mare ($\text{Log } K_{\text{ex}} = 3,50$). Pentru tirozină, în forma metilată valoarea constantei de extracție ($\text{Log } K_{\text{ex}} = 1,50$) este mică iar pentru tirozina în forma nativă nu se poate calcula constanta de extracție în condițiile menționate în studiu. Deci atât structura ligandului folosit ca extractant cât și structura aminoacidului influențează determinarea constantelor de extracție.

7.4 Studiul transportului aminoacizilor nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată

Studiul selectivității și transportului aminoacizilor prin membrane lichide este important pentru separarea și concentrarea aminoacizilor și pentru înțelegerea procesului de transport al aminoacizilor printr-o membrană celulară. Dezvoltarea chimiei supramoleculare, sinteza de noi transportori macrociclici constituie o etapă de referință în dezvoltarea transportului facilitat al aminoacizilor.

Chiralitatea este o trăsătură fundamentală a tuturor organismelor vii, atât la nivel molecular cât și la scară macroscopică. Preferința extraordinară a organismelor vii doar pentru unul dintre cei doi enantiomeri, denumită homochiralitate este un fenomen complex și enigmatic, încă neînțeles pe deplin. Majoritatea moleculelor implicate în structura sistemelor vii sunt molecule optic active iar procesele biochimice adesea prefera un enantiomer sau altul. Înțelegerea principiilor moleculare care stau la baza mecanismelor care guvernează recunoașterea chirală constituie un subiect de vârf în cercetarea științifică atât națională cât și internațională [1]. Pentru enantiomeri s-au observat diferențe mari în acțiunea lor biologică, în special pentru produșii farmaceutici sau aditivii alimentari. În funcție de chiralitatea lor acești compuși manifestă o activitate sau funcționalitate specifică. Separarea enantiomerilor este un aspect important în studiul compușilor optic activi în special în industria medicamentelor. Prin utilizarea receptorilor macrociclici chirali acest lucru este posibil.

În acest subcapitol sunt prezentate rezultatele cercetării privind transportul prin membrana lichidă a unor aminoacizii în forma L- și D- utilizând ca transportor un receptor chiral, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină în scopul studiului posibilității de separare a celor doi enantiomeri (191).

7.4.1 Condiții experimentale

7.4.1.1 Reactivi utilizați în procesul de transport

Toți aminoacizii utilizați (fig. 7.1): L-fenilalanina, L-triptofan, L-tirozina, L-triptofan metilester (L-TrpOMe), L-fenilalanina metilester (L-PheOMe) și L-tirozina metilester (L-TyrOMe) au fost de puritate $> 98\%$ și de proveniență Fluka. Receptorul heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină (figura 7.2) a fost obținut de la firma Ciclolab (Ungaria) și a fost utilizat fără purificare prealabilă. A fost folosită apă distilată (Millipore). Cloroformul (Merck) a fost saturat cu apă distilată.

7.4.1.2 Dispozitive utilizate în procesul de transport

Dispozitivele utilizate în experimentele de transport al aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri dintr-o fază apoasă sursă într-o fază apoasă receptoare folosind ca transportor, receptorul heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină în cloroform sunt prezentate în figura 7.10. Este folosit un dispozitiv format din două tuburi concentrice și un tub în formă de U..

7.4.1.3 Modul de lucru

Experimentele privind transportul prin membrana lichidă de cloroform s-au efectuat într-un dispozitiv de tip tub în tub: tubul din interior conține faza sursă, 5 mL aminoacid în soluție apoasă de concentrație $5,0 \times 10^{-4}$ M și acționează și ca agitator pentru faza receptoare și cea membranară. În tubul exterior se găsește faza receptoare, 5 mL soluție apoasă, pH = 1,5, împreună cu faza membranară, 35 mL soluție cloroformică heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină de concentrație $1,0 \times 10^{-3}$ M. Viteza de rotație utilizată în timpul experimentelor de transport a fost de aproximativ 180 rot/min iar timpul de transport a fost de 24 de ore. Temperatura de lucru a fost $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Experimente de transport similare au fost efectuate fără utilizarea transportorului pentru studii de referință.

Concentrația aminoacidului în cele două faze apoase (sursă și receptoare) s-a determinat spectrofotometric prin citirea absorbanțelor la spectrofotometrul UV-Vis Jasco V-530. Apa distilată și cloroformul au fost saturate, una cu cealaltă, înainte de transport iar pH-ul soluției apoase s-a măsurat cu un pH-metru Pracitronic MV-870 cu electrod de sticlă și electrod saturat de calomel și a fost ajustat cu soluție de HCl. Fiecare experiment a fost repetat de trei ori.

Randamentul de transport s-a determinat astfel:

$$T\% = \frac{A_r}{A_0} \times 100 \quad (7.26)$$

unde: A_r - absorbanta fazei apoase din faza receptoare, după transport;

A_0 - absorbanta fazei apoase inițiale din faza sursă, înainte de transport.

7.4.2 Rezultate și discuții

7.4.2.1 Transportul L -aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată

7.4.2.1.1 Etapele care stau la baza transportului prin membrane lichide

În general există trei etape care caracterizează transportul prin membranele lichide. În cazul de față acestea sunt: extracția aminoacidului (complexarea) la interfața fază sursă-faza membrană, transportul aminoacidului prin membrană (difuzie) și decomplexarea la interfața faza membrană-faza receptoare.

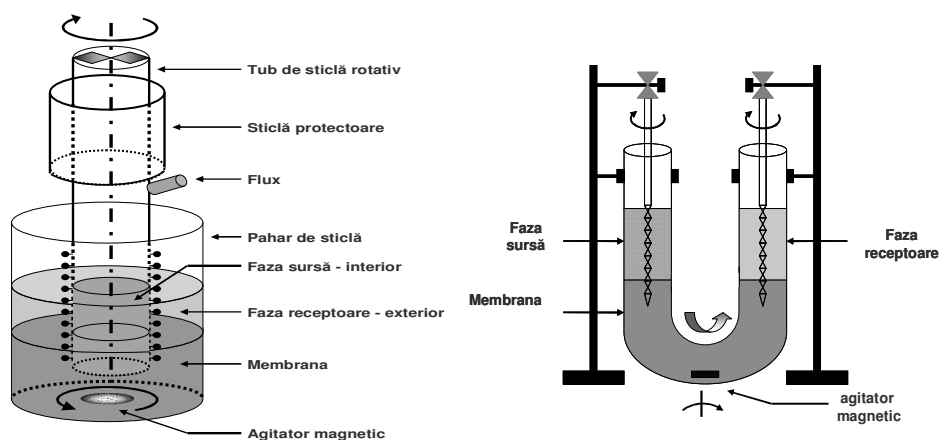
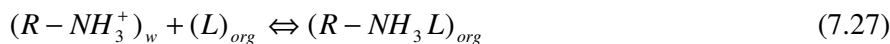


Fig.7.10 Dispozitive utilizate pentru transportul aminoacizilor prin membrane.

1. Extracția aminoacidului din fază apoasă în fază organică (membrană)

Aminoacidul în fază sursă prin difuzie ajunge la interfața fază sursă-fază membranară unde întâlnește receptorul din fază membranară formându-se complexul: aminoacid-receptor conform echilibrului de mai jos:



cu constanta de extracție, K_{ex} :

$$K_{ex} = \frac{[R - NH_3 L]_{org}}{[R - NH_3^+]_w \cdot [L]_{org}} \quad (7.28)$$

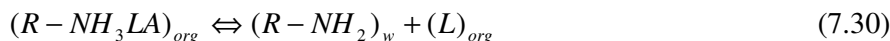
2. Transportul aminoacidului prin membrana lichidă

Aminoacidul prezent în membrana lichidă sub forma unui complex receptor-aminoacid, este transportat prin difuzie către interfața cu faza receptoare apoasă conform următorului echilibru:



3. Decomplexarea aminoacidului în fază receptoare.

La interfața membrană-fază receptoare, complexul se desface datorită condițiilor create în faza receptoare (pH = 1,5) și astfel aminoacidul trece în faza receptoare iar receptorul se întoarce prin difuzie către interfața cu faza sursă:



7.4.2.1.2 Transportul L-aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri

Spectrele UV-Vis obținute în urma extracției aminoacizilor metilesteri cu β -ciclodextrina modificată sunt prezentate în figura 7.12.

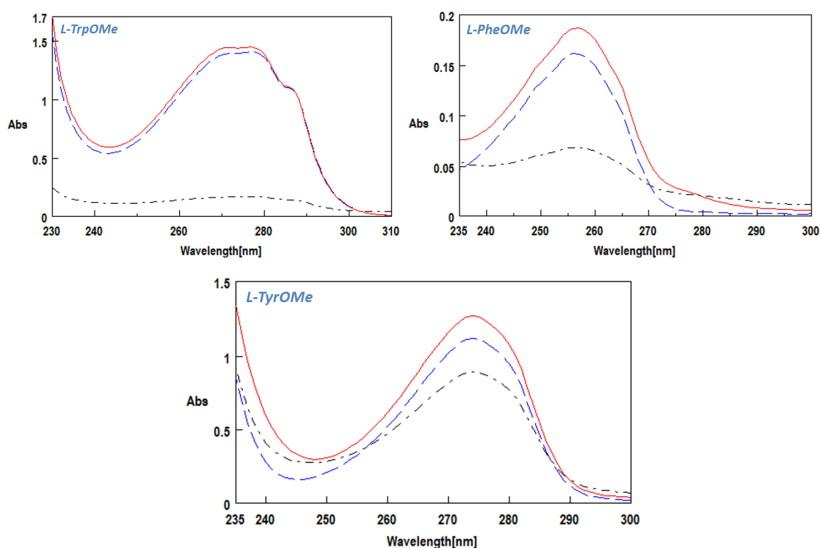


Fig. 7.12 Spectrele UV-Vis obținute în procesul de transport al aminoacizilor L-aromatici metilesteri cu β -ciclodextrina modificată

- (—) spectrele UV-Vis ale aminoacizilor înainte de transport ;
 - (- - -) spectrele UV-Vis ale aminoacizilor în fază receptoare după transport;
 - (. . .) spectrele UV-Vis ale aminoacizilor în fază sursă după transport.
- (L-TrpOMe $\lambda=278$ nm; L-PheOMe $\lambda=258$ nm; L-TyrOMe $\lambda=274$ nm)

Rezultatele obținute în urma transportului L-aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri dintr-o fază apoasă sursă într-o fază apoasă receptoare folosind ca transportor, receptorul

heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină în cloroform sunt prezentate în figura 7.16. Ca și în cazul extracției aminoacizilor, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina ca transportor prin membrana lichidă manifestă o afinitate mai mare pentru L-TrpOMe. De aici un randament de transport mai mare pentru acest aminoacid. Secvența transportului prin membrana lichidă este următoarea: L-TrpOMe > L-PheOMe > L-TyrOMe cu randamente între 20% pentru L-TyrOMe și 96 % pentru L-TrpOMe. Determinarea cantității de aminoacid transportate din faza sursă în faza receptoare utilizând β -ciclodextrina funcționalizată ca transportor s-a realizat prin măsurători spectrofotometrice la lungimea de undă specifică fiecărui aminoacid. S-au citit absorbanțele aminoacidului prezent în faza sursă, faza membranară și faza receptoare. Se cunoaște faptul că β -ciclodextrina funcționalizată nu prezintă absorbție în domeniul ultraviolet de absorbție al aminoacidului.

7.4.2.1.3 Relația între transportul aminoacizilor aromatici și hidrofobicitatea lor

Ca și în cazul extracției și în procesul de transport se constată dependența randamentului de transport al aminoacizilor de hidrofobicitatea acestora (figura 7.14) și anume, aminoacizii cu hidrofobicitate mai mare sunt extrași cu randamente mai mari.

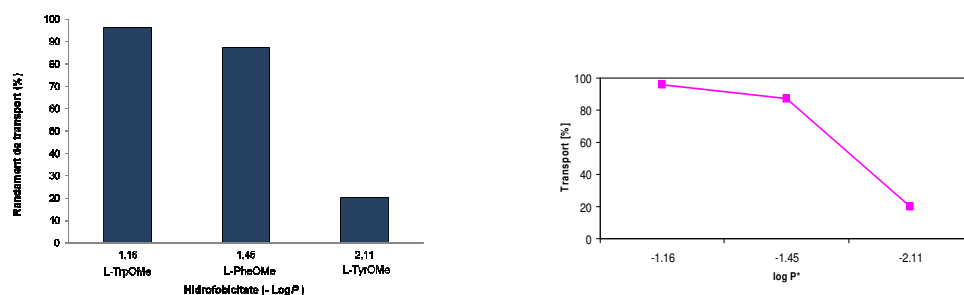


Fig.7.14 Relația între randamentul de transport și hidrofobicitatea aminoacizilor ($-\log P^{191}$).

7.4.2.2 Transportul D -aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri utilizând β -ciclodextrina funcționalizată

Rezultatele obținute în urma transportului D-aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri dintr-o fază apoasă sursă într-o fază apoasă receptoare folosind ca transportor, receptorul heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină în cloroform sunt prezentate în figura 7.13. Secvența transportului prin membrana lichidă este la fel ca în cazul L-aminoacizilor dar cu alte valori pentru unii D-aminoacizi următoarea: D-TrpOMe > D-PheOMe > D-TyrOMe cu randamente între 22% pentru L-TyrOMe și 85 % pentru L-TrpOMe. Pentru D-aminoacizii nativi secvența este D-Trp > D-Tyr > D-Phe cu valori între 8% D-Phe și 10% pentru D-Trp. Se observă diferențe în cazul L-TrpOMe și D- TrpOMe, L-PheOMe și D- PheOMe și de asemenea pentru L-TyrOMe și D- TyrOMe. Raportul $\alpha = \eta_L/\eta_D$ reprezentând randamentele de transport ale celor doi enantiomeri L- și D-aminoacid este prezentat în Tabelul 7.4.

Tabel 7.4 Raportul randamentelor de transport ale celor două forme L și D ale aminoacizilor studiați

Aminoacid	η_L (%) [130]	η_D (%)	α_r
TrpOMe	96	80	1,20 (L)
Trp	12	10	1,20 (L)
PheOMe	87	75	1,16 (L)
Phe	11	8	1,38 (L)
TyrOMe	20	25	1,25 (D)
Tyr	9	9	1,00 (L)

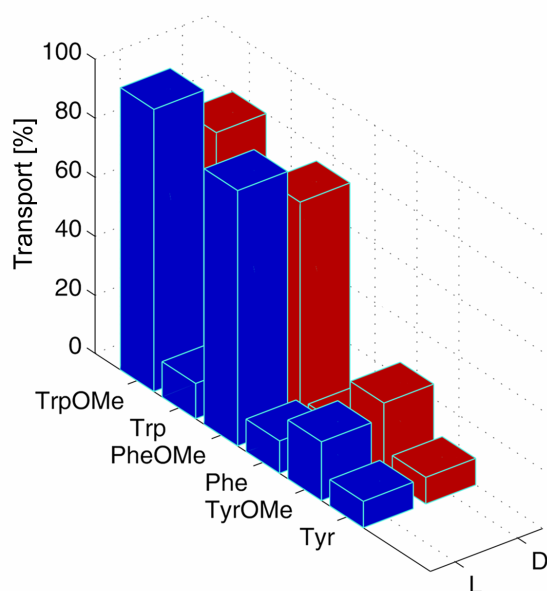


Fig. 7.13 Randamentele de transport ale celor două forme L- și D-aminoacid aromatic prin membrana lichidă cu heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina la $pH \approx 5.5$, $T = 25^0$ C.
 Faza sursă apoasă (5 mL): $c_{L,D-aminoacid} = 5 \times 10^{-4}$ M; $pH = 5,5$ (NaOAc/HAc)
 Membrana (35 mL): $c_{transportor} = 1 \times 10^{-3}$ M în cloroform;
 Faza receptoare (5 mL): apă distilată ($pH = 1,5$; HCl 0,5N)

După cum se vede din Tabelul 7.4 și figura 7.13 randamentul de transport al L-TrpOMe este mai mare decât al D-TrpOMe. La fel și în cazul L-PheOMe comparativ cu D-PheOMe. Comparativ cu cei doi aminoacizi, randamentul de transport al L-TyrOMe este mai mic decât al D-TyrOMe. În concluzie, în studiile de transport realizate forma L a aminoacizilor studiați prezintă un randament de transport mai mare decât cel al formei D, excepție făcând D- TyrOMe care are un randament mai mare decât L-TyrOMe. În tabelul 7.5 sunt prezentate valorile concentrațiilor molare pentru aminoacizii studiați. Pentru aprofundarea studiului separării celor doi enantiomeri L și D ai aminoacizilor utilizați în capitoul 8 sunt prezentate experimentele realizate folosind dicroismul circular.

Tabel 7.5 Valorile concentrațiilor molare și ale randamentelor de transport pentru aminoacizii studiați cu β -CD.

<i>Aminoacid</i>	<i>Concentrație aminoacid</i> $M \times 10^{-4}$	<i>Concentrație L-aminoacid transportat</i> $M \times 10^{-4}$ [130]	η_L (%)	<i>Concentrație D-aminoacid transportat</i> $M \times 10^{-4}$	η_D (%)
TrpOMe	5,0	4,8	96	4,00	80
Trp	5,0	0,60	12	0,05	10
PheOMe	5,0	4,35	87	3,75	75
Phe	5,0	0,55	11	0,40	8
TyrOMe	5,0	1,00	20	1,25	25
Tyr	5,0	0,45	9	0,45	9

7.4.2.3 Mecanisme de transport prin membrana lichidă

Transportul aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri studiați cu heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină ca transportor printr-o membrană lichidă de cloroform este un transport activ realizat pe baza unui gradient de pH între faza sursă și faza receptoare.

Modelul de mecanism de transport activ în cazul experimentelor studiate este prezentat în figura 7.15

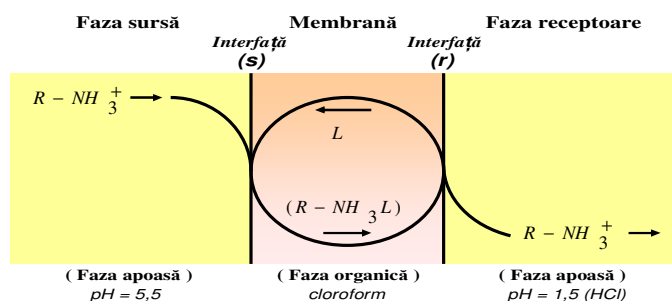


Fig. 7.15 Transport activ sub acțiunea gradientului de pH[106].

La interfața fază sursă/fază membranară are loc un proces de complexare între receptorul prezent în faza membranară și compusul de interes din faza apoasă sursă (pH = 5,5). Acest complex este extras în faza membranară (deci un proces de extracție) și printr-un proces de difuzie ajunge la interfața cu faza receptoare. Aici datorită condițiilor realizate în această fază (pH = 1,5) are loc procesul de decomplexare (re-extracție). Astfel, aminoacidul eliberat din complex trece în faza apoasă receptoare iar ligandul se reîntoarce la interfața cu faza sursă printr-un proces de difuzie și astfel procesul continuă.

De remarcat este faptul că în cazul compusului chiral heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină ca transportor printr-o membrană lichidă nu este nevoie de un anion pentru formarea unei perechi de ioni între aminoacid-receptor-anion pentru transportul aminoacidului caz întâlnit frecvent pentru alți receptori.

7.5 Concluzii

Din rezultatele transportului prin membrana lichidă de cloroform a celor două forme L- și D-aminoacid utilizând heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină s-au observat diferențe în cazul L-TrpOMe și D-TrpOMe, L-PheOMe și D-PheOMe și de asemenea pentru L-TyrOMe și

D- TyrOMe. Din raportul $\alpha = \eta_L/\eta_D$ reprezentând randamentele de transport ale celor doi enantiomeri L- și D-aminoacid se observă faptul că forma L a aminoacizilor prezintă un randament de transport mai mare decât cel al formei D, excepție făcând D- TyrOMe care are un randament mai mare decât L-TyrOMe. S-a realizat un transport activ al aminoacizilor prin membrana lichidă sub acțiunea gradientului de pH.

Capitolul 8. Studiul separării enantiomerilor unor aminoacizi utilizând β -ciclodextrina funcționalizată prin dicroism circular

8.1 Considerații generale

Scopul determinărilor efectuate a constat în evidențierea capacității ciclodextrinei nou sintetizate, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina de a discerne între doi enantiomeri ai unor aminoacizi, folosind spectroscopia de dicroism circular. În cazul de față s-au folosit doi aminoacizi aromatici, fenilalanina și triptofanul în formele: D-, L- și DL-fenilalanina și L-, DL-triptofanul.

8.2 Condiții experimentale

Spectrele CD au fost înregistrate la spectrometrul JASCO-815 în domeniul 240-350 nm folosind: cuve cu drum optic de 1cm, o acumulare, viteza de scanare de 50 nm/s și timp de răspuns 8 s. Soluțiile stoc au fost preparate în metanol având o concentrație de: $5,0 \times 10^{-3}$ M heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina și $2,5 \times 10^{-4}$ M L-Trp și $2,5 \times 10^{-4}$ M DL-Trp. Soluțiile stoc pentru studiul fenilalaninei în metanol au fost preparate cu următoarele concentrații: $5,0 \times 10^{-3}$ M L-Phe, $5,0 \times 10^{-3}$ M D-Phe, $5,0 \times 10^{-3}$ M D L-Phe și $1,0 \times 10^{-2}$ M pentru heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină în metanol.

8.3 Rezultate și discuții

Înregistrarea spectrelor de absorbție și dicroism pentru heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina (fig.8.1) a arătat că, în domeniul de interes, aceasta nu prezintă semnale, deci nu sunt de așteptat interferențe cu spectrele celor doi aminoacizi.

Spectrele de dicroism circular și absorbție ale enantiomerilor D, L și a amestecului racemic (DL) al fenilalaninei sunt prezentate în fig.8.2. Se poate observa că racemicul este total achiral, în timp ce spectrele celor doi enantiomeri prezintă spectre cu maxime situate la aceleași lungimi de undă ca cele din spectrul de absorbție și sunt caracterizate prin relația obiect: imaginea în oglindă; enantiomerul D prezintă în domeniul 240-280 nm, un semnal pozitiv cu maxime la 249, 255, 262, 269 nm, celalalt enantiomer fiind caracterizat de un semnal dicroic negativ.

Spectrele obținute sunt în acord cu cele găsite în literatură [201, 202].

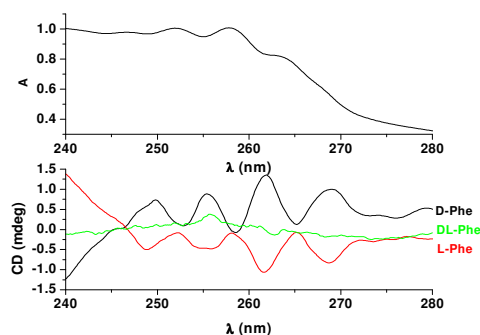


Fig.8.2 Spectrul de absorbție și spectrele de dicroism circular pentru D-Phe, L-Phe și DL-Phe în metanol.

Spectrele de dicroism circular obținute în prezența heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrinei sunt prezentate în fig.8.3 în comparație cu cele ale enantiomerilor liberi. Din examinarea spectrelor se pot face următoarele observații:

- În cazul enantiomerului D se observă o scădere a semnalului dicroic în prezența ciclodextrinei funcționalizate, aceasta fiind o indicație asupra interacției cu ciclodextrina și deci a includerii D-Phe în cavitate. Totuși, diferențele observate sunt mici și nu permit o evaluare cantitativă a constantei de legare (fig. 8.3A).
- Considerând rezultatele obținute pentru L-Phe s-au constatat diferențe practic nesemnificative ale semnalului dicroic în prezența ciclodextrinei funcționalizate.
- Compararea spectrelor celor doi conformeri arată o interacțiune privilegiată a enantiomerului D-Phe (fig. 8.3A).
- Pentru amestecul racemic (fig.8.3B) nu se poate sesiza un semnal clar de dicroism circular indus.

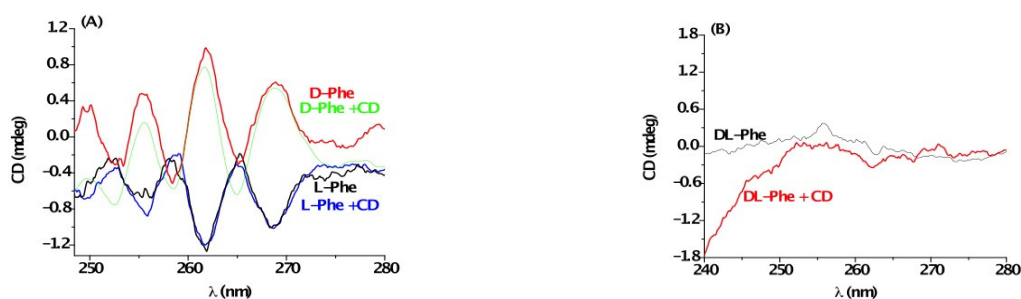


Fig. 8.3 Spectrele de dicroism circular în absența și în prezența ciclodextrinei pentru: (A) D-Phe, L-Phe și (B) DL-Phe.

Date din literatură de specialitate arată că și în cazul folosirii β -CD și a unei ciclodextrine funcționalizate cu o sare de amoniu [203, 204] diferențele între constantele de asociere ale D- și L-Phe sunt foarte mici, la limita erorilor experimentale. Spectrele de absorbție și dicroism circular înregistrate pentru sistemele heptakis-CD –L-Trp sunt prezentate în fig. 8.4. Din ambele spectre se poate observa o creștere a semnalelor (absorbanța și semnalul dicroic) indicând procesul de includere al aminoacidului. La fel ca și în cazul DL-Phe, DL-Trp nu a condus la un semnal de dicroism circular indus (fig.8.5).

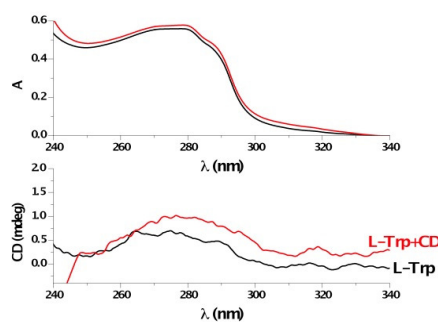


Fig. 8.4 Spectrele de absorbție și de dicroism circular ale L-Trp în absența și în prezența ciclodextrinei.

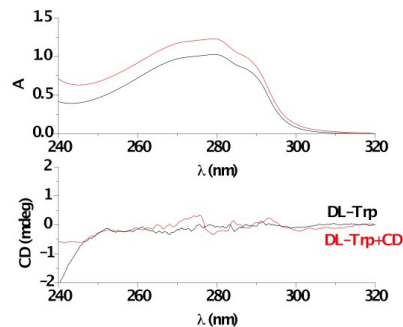


Fig.8.5 Spectrele de absorbție și de dicroism circular ale DL-Trp în absența și în prezența ciclodextrinei.

8.4 Concluzii

În acest capitol au fost studiate posibilitățile ciclodextrinei funcționalizate, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina de a discerne între doi enantiomeri ai fenilalaninei și triptofanului folosind spectroscopia de dicroism circular. Studiile efectuate confirmă rezultatele obținute prin transportul aminoacizilor aromatici prin membrana lichidă utilizând ca transportor receptorul chiral heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina.

Concluzii generale

Obiectivul principal al tezei *Studiul unor compuși biologici cu receptori macrociclici* a constatat în studiul posibilităților aplicative al unor receptori macrociclici din clasa calixarenelor, ciclodextrinelor și cucurbiturilului în procese de separare (extracție lichid-lichid și membrane lichide de volum) a unor compuși de interes biologic: aminoacizi, dipeptide și nucleobaze. Separarea enantiomerilor aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri prin membrane lichide de volum utilizând β -ciclodextrina funcționalizată ca transportor chiral constituie un alt aspect studiat în lucrarea de față.

Rezultatele experimentale obținute permit formularea următoarelor concluzii:

- Receptorul calixarenic, *p*-sulfonatocalix[4]arena formează complecși cu aminoacizii studiați (L-prolină, L-arginină, L-lizină, L-histidină, Acid L-aspartic, L-serină, L-isoleucină, L-tirozină) iar complexarea este favorizată de contribuții entalpice și defavorizată de contribuții entropice. Valorile constantelor de stabilitate și ale parametrilor termodinamici studiați pentru complecșii formați între *p*-sulfonatocalix[4]arena și dipeptide (Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys) au valori mari sugerând formarea complexului favorizat de contribuții entalpice.
- Receptorul calixarenic *p*-sulfonatocalix[6]arena formează complecși cu dipeptidele (Gly-Gly, Gly-L-Val, Gly-L-Leu, L-Leu-Gly, L-Leu-L-Ala, Gly-L-Phe) cu valori ale constantelor de stabilitate cuprinse între $\log K = 3,00$ (L-Leu-L-Ala) și $\log K = 3,36$ (Gly-L-Ala) dar receptorul nu prezintă selectivitate față de dipeptidele studiate. Deci există posibilitatea formării atât a complecșilor de incluziune cât și a celor de excluziune.
- Valorile constantelor de stabilitate obținute în cazul studiului nucleobazelor (adenină, citozina și guanina) au valori mici cuprinse între $\log K = 1,1$ și $\log K = 2,2$ pentru citozina și respectiv adenină.
- Reacțiile de complexare ale α -ciclodextrinei în fază apoasă cu o serie de aminoacizi și dipeptide (L-leucină, L-isoleucină, L-valină, L-alanină, glicină, L-fenilalanină, L-triptofan, L-tirozină, glicil-leucină, glicil-valină, glicil-triptofan) sunt caracterizate de valori mici ale entalpiei de reacție, pentru anumiți componenți aproape egale cu cele ale entropiei de reacție. Se poate afirma că reacția de complexare a unor aminoacizi și dipeptide cu α -ciclodextrina este favorizată de contribuții entalpice și contribuții entropice iar în formarea complecșilor sunt implicate interacțiunile hidrofobe.
- Valorile constantelor de stabilitate în cazul complexării lui CB[6] cu dipeptidele (glicil-leucină, glicil-valină, glicil-triptofan, glicil-alanină, glicil-histidină) sunt aproape identice între ele și sunt cuprinse între $\log K = 2,64$ (Gly-His) și $\log K = 2,90$ (Gly-Trp). Interacțiunile implicate în complecșii formați de cucurbit[6]uril cu dipeptidele studiate se sugerează a fi interacții de tip ion dipol între gruparea amino protonată a dipeptidei și gruparea carbonil a cucurbit[6]urilului. Aceste rezultate pot fi explicate prin formarea complecșilor de excluziune.

- În cazul nucleobazelor studiate (adenina, citozina, guanina și uracilul) cu CB[6] se observă valori mici ale entalpiei de reacție iar complexarea este caracterizată atât de contribuții entalpice cât și de contribuții entropice.
- Din spectrul ^1H -RMN al adeninei s-a sugerat posibilitatea formării unui complex de incluziune, adenina prezentând posibilitatea de a fi inclusă în cavitatea receptorului CB[7].
- Prin corelarea rezultatelor obținute prin RMN cu cele obținute prin spectrometrie UV-Vis se poate afirma că este posibilă formarea unui complex de incluziune al CB[7] cu adenina.
- Ca și în cazul adeninei din spectrele UV-Vis se observă o scădere a absorbției citozinei în funcție de creșterea cantității de CB[7] dar cu unele diferențe sugerându-se posibilitatea formării și a altor tipuri de complecși. Astfel prin rezultatele obținute prin spectrometrie UV-Vis și cu cele obținute prin RMN se poate sugera posibilitatea formării unui complex de incluziune al CB[7] cu citozina respectând condițiile de concentrație ale receptorului.
- Rezultatele experimentale obținute în cazul extracției lichid-lichid a unor aminoacizi aromatici nativi și metilesteri cu receptorul chiral heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina sugerează faptul că structura receptorului și hidrofobicitatea aminoacidului influențează procesul de extracție. L-aminoacizii aromatici nativi cât și cei derivatizați sunt extrași din faza apoasă în faza organică de heptakis (2, 3, 6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina cu randamente cuprinse între 17,0 % (L-TyrOMe) – 50,2 % (L-TrpOMe) în cazul aminoacizilor aromatici metilesteri și 8,0% (L-Tyr) – 17,5 % (L-Trp) pentru aminoacizi în stare nativă.
- Valorile constantelor de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri (L-TrpOMe, L-PheOMe, L-TyrOMe) sunt mai mari decât cele ale aminoacizilor aromatici nativi (L-Trp, L-Phe, L-Tyr) și depind de hidrofobicitatea aminoacidului luat în studiu. Deci atât structura ligandului folosit ca extractant cât și structura aminoacidului influențează determinarea constantelor de extracție.
- Rezultatele obținute în urma transportului L-aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri dintr-o fază apoasă sursă într-o fază apoasă receptoare folosind ca transportor, receptorul chiral heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină în cloroform indică faptul că acesta manifestă o afinitate mai mare pentru L-TrpOMe. Secvența transportului prin membrana lichidă este următoarea: L-TrpOMe > L-PheOMe > L-TyrOMe cu randamente între 20% pentru L-TyrOMe și 96 % pentru L-TrpOMe.
- În urma rezultatelor obținute pentru transportul D-aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri dintr-o fază apoasă sursă într-o fază apoasă receptoare folosind ca transportor, receptorul heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină în cloroform se constată aceeași secvență de transport ca și în cazul L-aminoacizilor: D-TrpOMe > D-PheOMe > D-TyrOMe cu randamente între 25% pentru D-TyrOMe și 80 % pentru D-TrpOMe. Pentru D-aminoacizii nativi secvența este D-Trp > D-Tyr > D-Phe cu valori între 8% D-Phe și 10% pentru D-Trp.
- Din rezultatele transportului prin membrana lichidă de cloroform a celor două forme L- și D-aminoacid utilizând heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină s-au observat diferențe în cazul L-TrpOMe și D-TrpOMe, L-PheOMe și D-PheOMe și de asemenea pentru L-TyrOMe și D-TyrOMe. Raportul $\alpha = \eta_L/\eta_D$ reprezentând randamentele de transport ale celor doi enantiomeri L- și D-aminoacid din studiile de transport realizate

indică faptul că forma L a aminoacizilor studiați prezintă un randament de transport mai mare decât cel al formei D, excepție făcând D- TyrOMe care are un randament mai mare decât L-TyrOMe. Deci, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină poate fi utilizat ca transportor chiral pentru compușii optic activi prin optimizarea condițiilor de transport.

- În experimentele efectuate privind transportul aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri studiați cu heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrină ca transportor printr-o membrană lichidă de cloroform s-a realizat un transport activ pe baza unui gradient de pH.
- Din studiile posibilităților ciclodextrinei funcționalizate, heptakis (2,3,6-tri-O-acetil)- β -ciclodextrina de a discerne între cei doi enantiomeri ai aminoacizilor aromatici: DL-fenilalanina și DL-triptofanul, folosind spectroscopia de dicroism circular s-au observat următoarele aspecte:
 - a) În cazul enantiomerului D al fenilalaninei s-a observat o scădere a semnalului dicroic în prezența ciclodextrinei funcționalizate, aceasta fiind o indicație asupra interacției cu ciclodextrina și deci a includerii D-Phe în cavitate. Totuși, diferențele observate sunt mici și nu permit o evaluare cantitativă a constantei de legare. În schimb pentru L-Phe s-au constatat diferențe practic nesemnificative ale semnalului dicroic în prezența ciclodextrinei funcționalizate. Prin compararea spectrelor celor doi conformeri se constată o interacțiune privilegiată a enantiomerului D-Phe. Mai mult pentru amestecul racemic DL-Phe nu s-a sesizat un semnal clar de dicroism circular indus.
 - b) Din spectrele de absorbție și dicroism circular înregistrate pentru sistemul heptakis-CD – L-Trp s-a observat o creștere a semnalelor (absorbanța și semnalul dicroic) indicând procesul de includere al aminoacidului, L-Trp. La fel ca și în cazul DL-Phe, DL-Trp nu a condus la un semnal de dicroism circular indus.

Bibliografie selectivă

- [1]. J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, 1995.
- [9] L. Stryer *Biochemistry*, Fourth Edition, W. H. Freeman & Company, New York, 1995.
- [25]. H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 44, 4130, 2005.
- [30]. T. Schrader, A. D. Hamilton, *Functional Synthetic Receptors*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005.
- [64]. C. D. Gutsche, *Calixarenes Revisited in Monographs in Supramolecular Chemistry*, J.F. Stoddard, Royal Society of Chemistry, 1998.
- [130]. L. Kim, **A.-D. Stancu**, E. Diacu, H.-Jürgen Buschmann, L. Mutihac, *Supramol. Chem.* 21, 1-2, 131, 2009.
- [133]. D. A. Fulton, J. F. Stoddart: *Bioconjugate Chem.* 12, 655, 2001.
- [151]. L. Kim, A. Hamdi, **A. D. Stancu**, R. Souane, L. Mutihac, J. Vicens *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 66, p. 55–59, 2010.
- [181]. A. W. Coleman, F. Perret, A. Mousa, M. Dupin, Y. Guo, H. Perron, *Top. Curr. Chem.* 277, 31, 2007.
- [182] F. Perret, A. N. Lazar, A. W. Coleman, *Chem. Commun.* 2425, 2006.
- [183]. Arena, A. Casnati, A. Contino, A. Magri, F. Sansone, D. Sciotto, R. Ungaro, *Org. Biomol. Chem.* 4, 243, 2006.
- [184]. E. Da Silva, A. W. Coleman, *Tetrahedron Lett.* 59, 7357, 2003.
- [185]. O. I. Kalchenko, F. Perret, N. Morel-Desrosiers, A. W. Coleman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 258
- [186]. O. Danylyuk, K. Suwinska, *Chem. Commun.* 5799, 2009.
- [187]. N. Douteau-Guevel, F. Perret, A. W. Coleman, J.-P. Morel, N. Morel-Desrosiers, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 524, 2002.
- [189]. W. Saenger, M. Noltemeyer, P. C. Manor, B. Hingerty, B. Klar, *Bioorg. Chem.* 5, 187, 1976. C. More, B. C. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 562, 1964.
- [190]. **A. D. Stancu**, H.-J. Buschmann, L. Mutihac, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* 2012, Doi :10.1007/s10847-012-0137-5/acceptată/on line.
- [191]. **A. D. Stancu**, M. Hillebrand, C. Tablet, L. Mutihac, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* 2012, Doi: 10.1007/s10847-012-0271-0/ acceptată/on line.
- [192]. C. J. Pedersen, *J. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 1305, 1968.
- [201]. L. X. Zeng, Y. J. He, Z. F. Dai, J. Wang, C. Q. Wang, Y. G. Yang, *Sci China Ser B-Chem.* 52, 1227, 2009.
- [202]. I. Matei, A. Nicolae, M. Hillebrand, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57, 597, 2007.
- [203]. C. Tablet, M. Hillebrand, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 70, 740, 2008.
- [204]. Z. Sebestyen, A. Buvári-Barcza, J. Rohonczy, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* 73, 199, 2012.

Lucrări științifice publicate sau în curs de publicare

1. **Ana Delia Stancu**, Mihaela Hillebrand, Cristina Tablet, Lucia Mutihac
 β -cyclodextrin derivative as chiral carrier in membrane transport of some aromatic amino acids

Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry/ Doi: 10.1007/s10847-012-0271-0/ **acceptată**, on line.

2. L. Kim, **A.D. Stancu**, E. Diacu, H.-J. Buschmann, L. Mutihac
Extraction and transport behavior of aromatic amino acids by modified cyclodextrin
Supramolecular Chemistry, 21, 131-134, 2009.
3. **A. D. Stancu**, H.-J Buschmann, L. Mutihac
Survey on thermodynamic properties for the complexation behavior of some calixarene and cucurbituril receptors. Review
Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry/ DOI :10.1007/s10847-012-0137-5/**acceptată**/on line.
4. L. Kim, A. Hamdi, **A. D. Stancu**, R. Souane, L. Mutihac, J. Vicens
Selective membrane transport of amino acids by functionalized calix[4]arenes
Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 66, 55-59, 2010.
5. **A.D. Stancu**, M. Ceausescu, L. Kim, E. Diacu, L. Mutihac
Cyclodextrins involved in separation of amino acids by liquid membranes
Trends in membranology, EMS-XXVII Summer School 14-19 June 2010, Eds. Printech, București

Participări la manifestări științifice

1. *Some analytical applications of modified cyclodextrins*, L. Kim, C. Baltariu, **A. D. Stancu**, E. Diacu, H.-J. Buschmann, L. Mutihac, **II International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry**, June 24-29, 2007, Salice Terme, Italy, poster, PSB 19.
2. *Functionalized calixarenes as transporters through liquid membrane* **A. D. Stancu**, L. Kim, P. Z. Iordache, L. Mutihac, **ISMSC** 13-18, July, 2008, Las Vegas, SUA, poster, p. 14.
3. *Extraction aspects of functionalized receptors upon biological compounds*, **A.D. Stancu**, A. Taqi, A. Hamdi, R. Souane, J. Vicens, L. Mutihac, **ISMSC**, 21-25 June, 2009, Maastricht, The Netherlands, poster, p.297
4. *Selective membrane transport of amino acids by functionalized calix[4]arenes*. L.Kim, **A. D. Stancu**, A. Hamdi, J. Vicens, L. Mutihac, **10th ICC**, July 13-16, 2009, Seoul, South of Korea, poster, P-102.
5. *Aspects of recognition and transport of amino acids and peptides by synthetic receptors*, L.Mutihac, L. Kim, **A. D. Stancu**, H.-J. Buschmann, J. Vicens, **10th ICC**, July 13-16, 2009, Seoul, South of Korea, invited lecture, IL-6.
6. *Functionalized calixarenes involved in electrochemical recognition of some anions*, E. Diacu, M. M. Ceausescu, **A. D. Stancu**, L. Mutihac, **NOMARES** Juin 18-19, 2010, Bucarest, Roumanie, Poster, p. 22.
7. *Cucurbit[n]urils in the molecular recognition of small biomolecules*, L. Mutihac, **A. D. Stancu**, H.-J. Buschmann, **ICCB 2011**, June 29-July 2, 2011, University of Cambridge, invited lecture, Q-27.

8. *Cyclodextrins involved in separation of amino acids by liquid membranes*, **A. D. Stancu**, M. Ceașescu, E. Diacu, L. Mutihac, **EMS- XXVII Summer School** 14-19 June 2010, Bucharest, poster, p.12.
9. Participare: *Seminar de laborator I*, ABL&E-JASCO România Comerț și Servicii SRL, 17 martie, 2009, București, România (Prof.dr. M. Hillebrand conferinta Spectroscopia de Dicroism Circular)

Contracte de cercetare

PN2- Parteneriate Sistem mobil de detecție, identificare și monitorizare biologică și chimică, 81-002/2007, 2007-2010, Responsabil proiect (director proiect Dr. V. Somoghi, CCSANBCE și Prof. L. Mutihac din partea Universității București).

PN2- Parteneriate Sistem mobil de monitorizare rapidă a agenților biologici și chimici pentru obiective de importanță strategică, 31-001/2007, 2007-2010, Responsabil proiect (director proiect Dr. V. Somoghi, CCSANBCE) și Prof. L. Mutihac din partea Universității București).