



UNIVERSITATEA
BABEŞ-BOLYAI



UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ

**CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A UNOR
COMPUŞI BIOACTIVI PRIN CRISTALOGRAFIE RMN**

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand
MICLĂUŞ (BORODI) MARIA-OLIMPIA

Conducător de doctorat
PROF. DR. LEONTIN DAVID

CLUJ-NAPOCA
2018



**UNIVERSITATEA
BABEȘ-BOLYAI**



**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ**

**CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A UNOR
COMPUȘI BIOACTIVI PRIN CRISTALOGRAFIE RMN**

Conducător de doctorat
PROF. DR. LEONTIN DAVID

Doctorand
MICLĂUȘ (BORODI) MARIA-OLIMPIA

CLUJ-NAPOCA
2018

CUVINTE CHEIE

Compuși bioactivi

Forme solide

Cristalizare

Difracție de raze X

Cristalografie RMN

Structură cristalină

Biodisponibilitate

Cuprins

INTRODUCERE

1. FORME SOLIDE ALE COMPUȘILOR BIOACTIVI. OBȚINERE ȘI CARACTERIZARE STRUCTURALĂ	8
1.1. Importanța farmaceutică a formelor solide	8
1.2. Forme solide și metode de obținere	10
1.3. Identificare și caracterizare structurală	12
1.4. Parametrii caracteristici ordinii la distanță	13
1.5. Parametrii caracteristici ordinii locale	16
1.6. Cristalografia RMN	18
1.7. Difracție de raze X	24
1.7.1. Determinarea structurii cristaline prin difracție de raze X pe monocristal	28
1.7.2. Determinarea structurii cristaline prin difracție de raze X pe pulberi	29
1.8. Spectroscopie RMN în solide	33
1.9. Modelare moleculară	38
2. METODOLOGIA DE CERCETARE UTILIZATĂ	41
2.1. Experimente de cristalizare	42
2.2. Difracție de raze X pe pulberi	44
2.3. Difracție de raze X pe monocristal	46
2.4. Spectroscopie RMN pe solide și modelare moleculară	47
3. CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A MONOSOLVAȚILOR DE TADALAFIL	51
3.1. Studiu sistematic de polimorfism și cocrystalizare	52
3.2. Rezultate obținute prin difracție de raze X pe monocristale	53
3.3. Caracterizarea prin spectroscopie RMN pe solide și modelare moleculară	59
3.4. Concluzii	62
4. CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A QUERCETINEI ANHIDRE ȘI FORMELOR SOLVATE OBȚINUTE	64
4.1. Studiu sistematic de polimorfism și cocrystalizare	65
4.2. Determinarea structurii cristaline pe pulberi pentru formele de Quercetină	66
4.2.1. Quercetină anhidră	66
4.2.2. Quercetină Etanol și Quercetină Metanol	74
4.2.3. Quercetină dioxan	80
4.2.4. Identificarea componentelor din suplimenturi alimentare pe bază de Quercetină	88
5. CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A COMPUSULUI LISINOPRIL DIHIDRAT	97
5.1. Analiza datelor prin difracție de raze X pe pulberi	98
5.2. Optimizarea geometriei în rețeaua cristalină prin metode DFT	103
5.3. Rezultate obținute prin RMN pe solid	105

5.4. Selectarea structurii finale	108
5.5. Concluzii	110
CONCLUZII GENERALE	111
ANEXE	114
1. Caracterizarea structurală a monosolvaților de Tadalafil	114
2. Determinarea structurii cristaline pe pulberi pentru formele de Quercetină	117
3. Caracterizarea structurală a compusului Lisinopril dihidrat	120
LISTĂ PUBLICAȚII ÎN REVISTE COTATE ISI	126
PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE ȘTIINȚIFICE	127
PARTICIPĂRI LA CURSURI DE FORMARE	128
PROIECTE DE CERCETARE	128
BIBLIOGRAFIE	130

1. INTRODUCERE

Cercetarea și dezvoltarea unui produs farmaceutic sau a unui supliment alimentar comercial sunt procese complexe, costisitoare și de lungă durată. Un compus farmaceutic activ (compus de sinteză) ajunge pe piață după 10-15 ani, în schimb, în cazul suplimentelor alimentare (compuși naturali), dată fiind legislația în vigoare, procesul de dezvoltare durează câțiva ani. În consecință, înțelegerea și controlul chimiei stării solide a unui ingredient bioactiv, atât ca substanță pură cât și ca produs formulat, este important în procesul de dezvoltare a unui medicament sau supliment alimentar. Proprietățile esențiale ale unui compus bioactiv (solubilitatea, stabilitatea, biodisponibilitatea) pot să difere de la o formă solidă la alta (polimorfi, săruri, cocrystal, hidrați/solvați), drept consecință a modurilor de împachetare în structura cristalină și a tipurilor de interacțiuni intra- și intermoleculare. Din acest motiv, *screening*-ul și caracterizarea structurală a compușilor activi farmaceutici și a suplimentelor alimentare este un proces important în dezvoltarea produsului final pentru companiile din aceste domenii. În acest context, prezenta teză își propune să abordeze atât prepararea de forme solide noi prin diferite metode de cristalizare cât și caracterizarea lor structurală.

În Capitolul 1 sunt prezentate, din perspectivă teoretică, aspecte referitoare la obținerea, identificarea și caracterizare structurală a compușilor bioactivi utilizând cele mai avansate metode analitice disponibile în prezent. În studiul unei substanțe bioactive solide este importantă implementarea mai multor metode de cristalizare. După obținerea formelor solide noi, următorii pași sunt identificarea și caracterizarea structurală prin tehnici difractometrice și spectroscopice. Pentru caracterizarea structurală cât mai precisă și mai realistă este necesară cunoașterea parametrilor geometriei stării cristaline, care definesc ordinea la distanță, dar și a parametrilor specifici ordinii locale, în principal legăturile intermoleculare și sintonii supramoleculari.

Metodele standard de determinare a structurii cristaline în condiții de laborator sunt bazate pe difracție de raze X, și anume: difracția de raze X pe monocristale (RX) sau difracția de raze X pe pulberi (DRXP), în funcție de forma în care poate fi obținută proba.

În ultimii ani metodele tradiționale de difracție au fost frecvent utilizate în combinație cu tehnici de analiză structurală complementare, cum ar fi spectroscopia RMN pe solide (RMN-s) și modelarea moleculară prin metode de tip DFT pe sisteme cristaline, în cadrul unor abordări numite generic *cristalografie RMN*. Aceste abordări moderne au o serie de avantaje, toate contribuind la creșterea nivelului de precizie cu care este obținut modelul

structural final, de exemplu: înlăturarea ambiguităților atunci când analiza datelor DRXP conduce la soluții structurale multiple și obținerea de detalii structurale locale legate de pozițiile atomilor de hidrogen, de regulă inaccesibile prin metode de difracție, atât în cazul monocristalelor, cât mai ales în cazul pulberilor policristaline – aceasta deoarece se pot colecta un număr mult mai mic de intensități de difracție comparativ cu numărul de intensități colectate în cazul monocristalelor.

Capitolul al 2-lea cuprinde o descriere detaliată a *Metodologiei de cercetare* implementate și a infrastructurii utilizate, urmând ca în celelalte capitole să fie prezentate rezultatele concrete obținute pentru sistemele studiate și detaliate din punctul de vedere al semnificației lor teoretice, practice și de metodologie implementată.

În Capitolele 3, 4 și 5 sunt prezentate concret rezultatele originale obținute în cadrul stagiului doctoral. Obiectivul principal al studiilor efectuate a fost determinarea structurii cristaline pentru o serie de compuși bioactivi. Din această perspectivă, accentul este pus pe selectarea celor mai adecvate tehnici de caracterizare structurală, care să țină cont de varietatea mare de situații care pot apărea în practica curentă. Situațiile concrete tratate în cadrul tezei se referă la compuși care pot fi obținuți fie sub formă de monocristale, sau doar sub formă de pulberi policristaline. Pentru compușii policristalini diferențele de abordare care au apărut în procesul de determinare a structurii cristaline sunt legate de numărul de grade de libertate ale moleculei, numărul de molecule diferite din celula elementară și gradul de dezordine conformațională/dinamică din rețea.

1. FORME SOLIDE ALE COMPUȘILOR BIOACTIVI. OBTINERE ȘI CARACTERIZARE STRUCTURALĂ

Compuși bioactivi sunt formați din molecule cu efect terapeutic care acționează în tratarea sau ameliorarea unei afecțiuni medicale. Aceștia se împart în două categorii: compuși de sinteză (compuși farmaceutici) și compuși naturali (obținuți, în general din plante). Descoperirea și caracterizarea formelor solide ale ingredientelor bioactive ne oferă opțiuni în selecția formei solide optime. Prin definiție, formele solide ale unui compus reprezintă totalitatea modurilor de împachetare structurală diferite ale aceleiași molecule de bază. Acestea se pot clasifica astfel: polimorfi, săruri, cocristale, hidrați/ solvați (Figura 1.1).

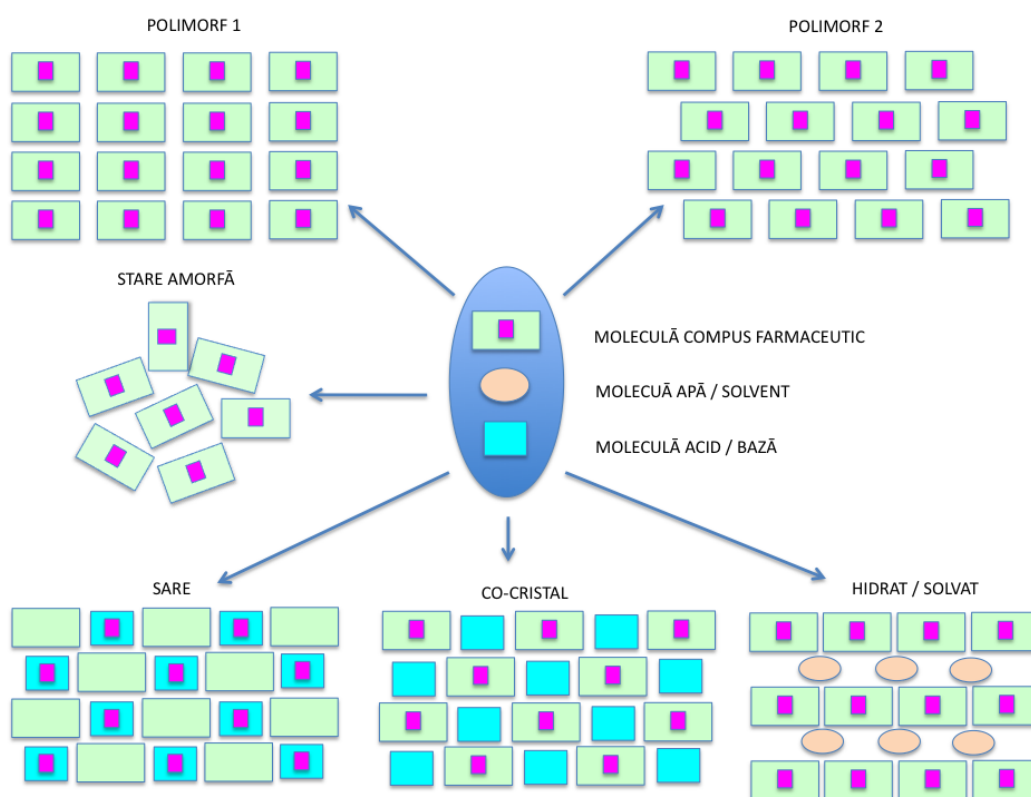


Fig. 1.1. Clasificarea substanțelor bioactive din punctul de vedere al structurii moleculare.

Studiul formelor solide al compușilor bioactivi este extrem de important deoarece diverse forme solide ale unui compus tind să aibă proprietăți esențiale, precum proprietățile fizico-chimice, solubilitatea și viteza de dizolvare, net diferite [1]. Din aceste motive s-au dezvoltat diferite metode de cristalizare cu ajutorul cărora explorarea formelor solide se face mai rapid [2,3]. În cadrul acestei teze am aplicat: *Cristalizarea în regim parallel (high-throughput)* unde se pot varia mai mulți parametrii (metodele de cristalizare, solvetul sau amestecul de solvenți utilizați, temperatura, viteza de încălzire/răcire, concentrația, raportul molar). Fluxul de cristalizare paralelă standard conține următoarele metode de cristalizare:

Cristalizarea prin răcire, Cristalizarea în suspensie (*slurry*), Cristalizarea prin difuzie de vapori în lichide (*VDL*), Cristalizarea prin difuzie de vapori pe solide (*VDS*), Cristalizarea prin amestecare mecanică cu solvent (*solvent-drop grinding*).

După obținerea formelor solide noi următorii pași sunt identificarea și caracterizarea structurală prin tehnici difractometrice și spectroscopice.

Identificarea prin difracție de raze X este o metodă rapidă, nedistructivă și folosește o cantitate mică de probă [4]. În esență ea este o metodă comparativă. În urma identificării printr-una dintre cele două metode de difracție de raze X (monocristal sau pulberi) putem spune doar dacă s-a obținut o formă solidă nouă. Informații mai complexe, de exemplu natura formei solide și structura sa cristalină se obțin doar în etapa de caracterizare structurală. În această teză, pentru a obține o caracterizare structurală completă, pe lângă difracția de raze X voi apela și la tehnici complementare, adică Rezonanță Magnetică Nucleară pe Solid (RMN-s) și modelarea moleculară.

În mod tradițional, caracterizarea structurală a compușilor care prezintă ordonare cristalină se bazează pe difracția de raze X. Fie că este vorba de monocristale, sau doar de pulbere microcristalină, analiza datelor de difracție furnizează de fapt informații cu privire la distribuția de sarcină electronică și nu direct pozițiile atomilor în rețea [**Error! Reference source not found.**]. Așadar în cadrul din Capitolului 1 sunt descrise noțiuni generale de difracție de raze X: cum se produc razele X, Legea lui Bragg, este definită rețeaua reciprocă, relația dintre factorul de structură și densitatea electronică. În cadrul acestui capitol sunt prezentate în detaliu metodologiile de obținerea a structurii cristaline din difracție de raze X pe monocristal și pe pulberi. De aici rezultă și o serie de limitări ale acestei tehnici, dintre care le enumerăm pe scurt pe cele mai importante [6]: (i) structura obținută pe monocristal are gradul cel mai înalt de precizie, însă de multe ori sistemele organice în special nu furnizează monocristale de dimensiune și calitate suficient de bune; (ii) utilizarea în aceste cazuri de probe policristaline conduce la reducerea semnificativă a nivelului de încredere și a gradului de precizie cu care este obținută soluția structurală; (iii) prezența defectelor de rețea, a dezordinii structurale sau dinamice diminuează mult calitatea structurii cristaline determinate atât pe monocristale, cât și din pulberi; (iv) difractogramele de raze X sunt dominate de efectul produs de atomii grei, ceea ce face foarte dificilă localizarea atomilor de hidrogen, iar aceștia au o importanță deosebită la definirea împachetării cristaline a moleculelor în compușii organici. În consecință, apare cu necesitate dezvoltarea de abordări noi care să combine informațiile obținute din analiza datelor de RX cu alte detalii structurale, preferabil

cu caracter local, extrase cu ajutorul unor tehnici complementare și care să fie capabile să înlăture sau să diminueze cât mai multe dintre limitările amintite.

În următoarele secțiuni din capitolul 1 sunt abordate noțiuni teoretice legate de spectroscopia RMN pe solid și metode de calcul utilizate în modelarea moleculară.

Una dintre abordările alternative dezvoltate pe parcursul ultimelor două decenii se numește *cristalografie RMN* [7]. În ciuda a ceea ce sugerează denumirea, *cristalografia RMN* nu presupune determinarea structurii cristaline a unui compus exclusiv prin metode specifice de spectroscopie RMN pe solide (RMN-s). Deși modalitățile concrete de utilizare a *cristalografiei RMN* raportate până în prezent pe compuși organici sunt destul de variate, putem totuși desprinde o schemă de principiu (Fig. 1.2) cu aplicabilitate generală, indiferent de caracteristicile compusului investigat.

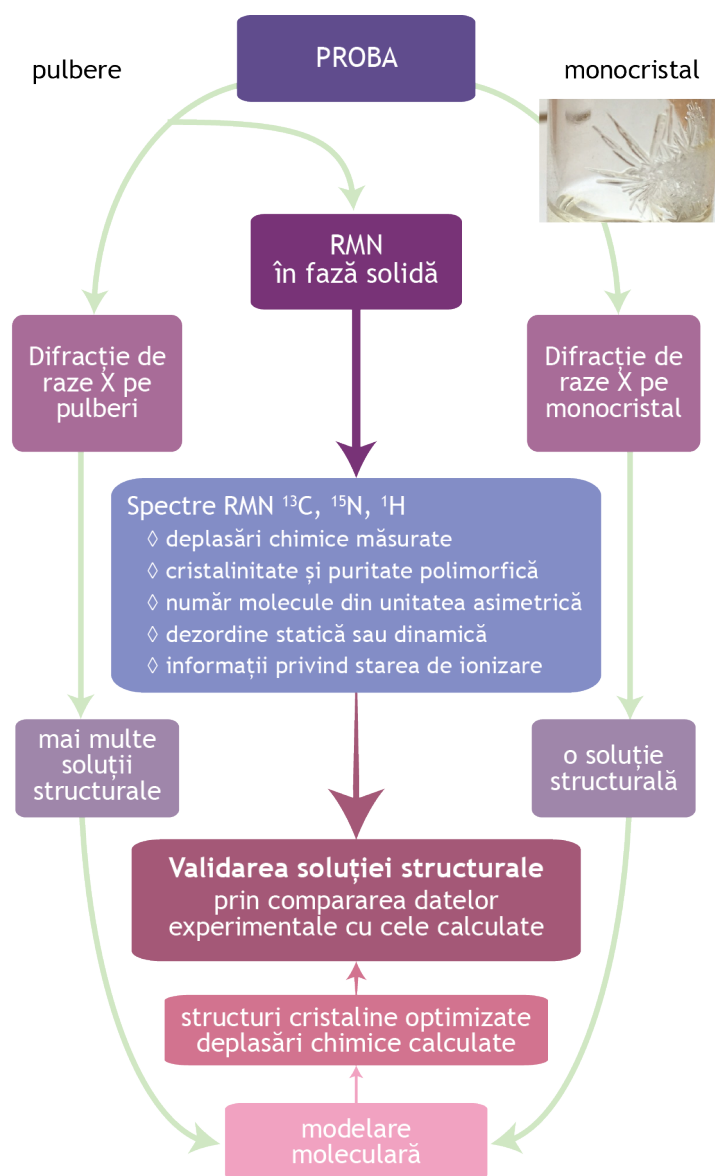


Fig. 1.2. Schema de principiu a cristalografiei RMN.

Conform acestei scheme, soluțiile structurale RX sunt supuse mai întâi unei optimizări prin DFT a pozițiilor atomilor de hidrogen. În solidele organice, cunoașterea cât mai exactă a lor este importantă [8], în special în cazurile în care se formează rețele de legături de hidrogen puternice care asigură stabilitatea cristalului, sau pentru sistemele în care are loc transfer de protoni. Urmează optimizarea geometriei prin aceleași metode, de data aceasta considerând pozițiile tuturor atomilor, inclusiv a celor grei. Această etapă este obligatorie în cazul soluțiilor structurale obținute din pulberi, dar de multe ori este utilă și pentru structurile determinate din monocristal [9]. Diferența dintre energia de rețea a modelului neoptimizat DFT (sau optimizat doar în raport cu atomii de hidrogen) și a celui complet optimizat oferă un prim indiciu asupra gradului de precizie cu care a putut fi determinată soluția structurală în urma analizei datelor de difracție. Rezultatul nu trebuie însă considerat în mod absolut, din cauza aproximațiilor incluse în algoritmi de calcul și a faptului că optimizările DFT se efectuează la $T = 0 \text{ K}$, în timp ce difractogramele experimentale se înregistrează la temperaturi mult mai mari. Totuși, o diferență în valorile energiei mai mare de 10-20 kcal/mol reprezintă deja un indiciu clar că soluția structurală obținută doar din analiza datelor de raze X mai poate fi rafinată suplimentar, de exemplu printr-o abordare de tip *cristalografie RMN* [10].

În etapa finală, rezultatele modelărilor teoretice sunt supuse validării practice pe baza unor date experimentale obținute prin metode RMN-s. Parametrii supuși analizei sunt selectați în funcție de relevanța lor relativ la problema studiată și se împart în două categorii: (i) cei care codifică doar în mod indirect informații structurale locale, cum ar fi deplasările chimice izotrope, constantele interacțiunii quadrupolare, sau constantele de cuplaj J și (ii) parametrii care codifică în mod direct informații structurale, de exemplu distanțele internucleare sau unghiurile de torsiune.

Cel mai des raportați sunt parametrii din prima categorie, în special deplasările chimice izotrope ale unor nuclee precum ^{13}C , ^{15}N și ^1H , deoarece sunt ușor de obținut experimental din spectre simple unidimensionale (1D), pe probe în abundență naturală. O situație mai aparte este cea a nucleelor de ^1H , din cauza rezoluției spectrale încă limitate. Și în acest caz însă deplasările chimice ale protonilor pot fi obținute în totalitate cu ajutorul unor informații suplimentare extrase din spectre bidimensionale (2D) de corelație de tip ^{13}C - ^1H HETCOR (*Heteronuclear Correlation*). Astfel, informații cu privire la cele mai abundente elemente chimice din sistemele cristaline organice (hidrogen, carbon, azot) sunt accesibile prin metode RMN-s rapide și necostisitoare, în concordanță cu cerințele practice ale aplicațiilor din industria farmaceutică. Există însă și un dezavantaj: valorile măsurate ale deplasărilor chimice (la fel ca și constantele interacțiunilor quadrupolare, sau J) nu pot fi

transformate direct în detalii de structură spațială. Ele pot fi luate doar ca elemente de control în validarea soluțiilor de structură cristalină în cadrul unei analize comparative între valorile măsurate experimental și cele simulate teoretic pe modelul structural propus. De exemplu, în cazul deplasărilor chimice izotrope, abaterea pătratică medie (*root mean square deviation*, RMSD) dintre valorile măsurate și cele calculate pentru toate pozițiile chimice distincte din moleculă reprezintă un indicator global asupra gradului în care soluția structurală testată se apropie de structura cristalină reală: cu cât valorile parametrului RMSD sunt mai mici, cu atât putem spune că soluția a fost obținută cu o precizie mai bună. Dacă analizăm în plus diferențele dintre valorile experimentale și cele calculate pentru fiecare nucleu în parte putem obține și informații cu caracter local, de exemplu se pot identifica acele regiuni din moleculă care deviază mai mult sau mai puțin față de structura cristalină reală.

Din motivele expuse mai sus, majoritatea studiilor de *cristalografie RMN* raportate până în prezent în literatură se bazează pe determinarea experimentală a deplasărilor chimice izotrope pentru nucleele de interes și utilizarea lor în scopul de a valida, și eventual de a rafina în continuare, modelele structurale rezultate din analiza datelor de raze X, respectiv din optimizările DFT [11,12]. Abordarea aceasta s-a impus în practica curentă, în special în aplicațiile pe compuși de interes farmaceutic, datorită perfecționării continue a metodelor de calcul DFT, extinse la întreaga rețea cristalină, care permit în prezent analiza unor sisteme cu grad de complexitate și la un nivel de precizie inaccesibile acum 10-20 de ani. Concret, este vorba de creșterea substanțială a sensibilității cu care pot fi urmărite efectele produse asupra parametrilor RMN-s calculați de variații minore în structura cristalină studiată.

2. METODOLOGIA DE CERCETARE UTILIZATĂ

Scopul principal al studiilor efectuate este determinarea structurii cristaline pentru o serie de compuși bioactivi. Din această perspectivă, accentul este pus pe selectarea celor mai adecvate tehnici de caracterizare structurală, care să țină cont de varietatea mare de situații care pot apărea în practica curentă.

Caracterizarea structurală a tuturor compușilor analizați în cadrul tezei a fost efectuată prin cele mai adecvate situației concrete, multe dintre ele apelând la o abordare modernă, de tip *cristalografie RMN*. În afara de determinarea efectivă a structurilor cristaline, teza conține și elemente de dezvoltare metodologică, deoarece fiecare compus a necesitat o abordare particularizată, în funcție de parametrii structurali care trebuiau rafinați suplimentar față de modelul obținut prin tehnici de difracție de raze X.

În vederea obținerii de forme solide noi ale substanțelor active, cu o solubilitate îmbunătățită, compușii investigați au fost supuși la experimente de polimorfism și cocrystalizare. Procedura pe care am urmat-o constă în:

- (i) estimarea solubilității
- (ii) alegerea solvenților de cristalizare
- (iii) *screening* de polimorfi și
- (iv) efectuarea de experimente de cocrystalizare.

Solidele rezultate (monocristale, pulberi policristaline sau amorfe) au fost apoi supuse unei analize de rutină prin difracție de raze X pe monocristal (RX) sau difracție de raze X pe pulberi (DRXP) cu scopul de a verifica dacă au fost sau nu obținute forme solide noi. Analiza de rutină pentru RX constă în alegerea unui monocristal, montarea lui pe goniometru și efectuarea unui preexperiment care ne oferă informații cu privire la parametrii celulei elementare (a , b , c , α , β , γ), iar apoi acești parametri sunt comparați cu parametrii structurilor raportate în literatură. Pentru identificarea formelor solide noi prin DRXP se efectuează o măsurătoare scurtă (intervalul 2θ : 3–30°, pasul de 0.02° și timpul pe pas de 0.4 s/pas), iar difractograma experimentală obținută se compară cu difractogramele simulate sau experimentale ale formelor solide găsite în literatură.

Analiză RX structurală completă pe care am efectuat-o constă în: alegerea monocristalului, montarea lui și efectuarea preexperimentului se trece la înregistrarea experimentului de difracție, ultimul pas fiind prelucrarea datelor înregistrate din care obținem datele cristalografice specifice compusului studiat.

În cazul DRXP, măsurătorile le-am efectuat în intervalul 2θ : $3-40^\circ$, pasul de 0.01° și timpul pe pas de 3 s/pas, care este analizată ulterior în scopul determinării structurii cristaline. Principalele etape în determinarea structurii cristaline din pulberi sunt: (i) înregistrarea difractogramei; (ii) indexarea difractogramei în urma căruia obținem date aproximative legate de parametrii celulei elementare (a , b , c , α , β , γ); (iii) căutarea unui model structural; (iiii) rafinarea parametrilor specifici.

În final, formele solide noi identificate au fost analizate din punct de vedere structural și prin spectroscopie RMN-s și modelare moleculară, în cadrul unor abordări de tip *cristalografie RMN*.

Pentru analiza structurală prin RMN au fost utilizate următoarele tehnici experimentale:

- i. $^{13}\text{C}(^{15}\text{N})$ CP-MAS (*Cross-Polarization under Magic Angle Spinning*): generează spectre ^{13}C RMN-s 1D de înaltă rezoluție, care permit determinarea experimentală a deplasărilor chimice $^{13}\text{C}(^{15}\text{N})$ pentru toate pozițiile distincte de carbon, respectiv azot, din moleculele aflate în rețea.
- ii. ^{13}C CPPI (*Cross-Polarization Polarization-Inversion*): generează de asemenea spectre ^{13}C RMN-s 1D, dar include o perioadă de inversie a transferului de polarizare care permite diferențierea grupărilor chimice pe baza multiplicității atomului de carbon.
- iii. Experimente ^{13}C de tip "one-pulse": furnizează spectrul ^{13}C RMN-s 1D pentru toți atomii de carbon din sistem, nu doar pentru aceia care pot fi implicați în procesul de transfer de polarizare (adică cei care aparțin moleculelor "rigide" din rețeaua cristalină).
- iv. Experimente ^1H de tip "one-pulse": furnizează spectrul ^1H RMN-s 1D în condiții de *ultra-fast MAS* (frecvențe de rotație ale probei de până la 65 kHz).
- v. Experimente 2D de corelație $^1\text{H}-^1\text{H}$ DQ-MAS (*Double-Quantum under Magic Angle Spinning*): pe durata perioadei de mixing se stabilesc corelații între nucleele ^1H apropiați spațial ($< 5-6 \text{ \AA}$).

În cazul modelării moleculare etapele unui calcul obișnuit de ecranare magnetică, folosind metoda GIPAW, sunt:

- pentru o structură cristalină inițială, obținută prin difracție de raze X se calculează energia stării fundamentale și forțele ca acționează asupra atomilor
- dacă există în sistem forțe mari, se realizează o optimizare de geometrie astfel încât aceste forțe să fie minimizate
- pentru geometria optimă obținută, calculul de tip GIPAW va da tensorul RMN.

3. CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A MONOSOLVAȚILOR DE TADALAFIL

Primul compus biologic activ studiat în cadrul prezentei teze de doctorat se numește Tadalafil. Principalele motive pentru alegerea acestei substanțe active, pentru investigația propusă, sunt următoarele: (i) TDF a apărut pe piață destul de recent, el fiind folosit ca substanță activă în compoziția medicamentelor Cialis® din 2003 (tratarea disfuncției erectile), din 2011 pentru hiperplazie benignă de prostată și din 2009 pentru tratarea hipertensiunii arteriale pulmonare; (ii) TDF are solubilitate foarte scăzută, cu consecințe negative asupra biodisponibilității – datele raportate în literatură indicând faptul că TDF este aproape insolubil în apă [13].

Doar o parte dintre formele solide identificate în literatură, adică TDF anhidru (CSD refcode: IQUMAI) [14], identificată ca și forma I [15] și trei co-cristale cu metilparaben, propilparaben și acid hidrocinamic au fost raportate în Cambridge Structural Database (CSD) [16]. În acest context, utilizând metodologia de *screening*, pentru acest compus am efectuat un studiu de polimorfism și cocristalizare al compusului farmaceutic activ Tadalafil (TDF) în vederea obținerii de forme solide noi, cu solubilitate îmbunătățită. În urma acestor experimente am obținut sub formă de monocristale două noi forme solvate (TDF-ACE și TDF-MEK), acestea au fost caracterizate din punct de vedere structural printr-o abordare de tip *cristalografie RMN* [17].

Tabelul 3.1. Datele cristalografice și detaliile structurilor cristaline determinate.

	Compus		
	TDF-ACE	TDF-MEK	TDF ^a
Formula	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₅	C ₂₆ H ₂₇ N ₃ O ₅	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄
Masa moleculară (g/mol)	447.49	461.52	389.40
Temperatura (K)	293	293	293
Sistemul cristalografic	Ortorombic	Ortorombic	Monoclinic
Grupul spațial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
a (Å)	7.7408(3)	7.7842(4)	9.894(2)
b (Å)	13.7341(5)	13.8562(9)	7.782(1)
c (Å)	21.1301(9)	21.4012(12)	12.395(2)
α (°)	90	90	90
β (°)	90	90	99.75(2)
γ (°)	90	90	90
V (Å ³)	2246.38(15)	2308.3(2)	940.570

	Compus		
	TDF-ACE	TDF-MEK	TDF ^a
Z	4	4	2
F(000)	947	979	408
Densitatea calculată g/cm ³	1.3231	1.3279	1.375
θ -range (°)	3.84-70.84	3.80-70.63	4.53-57.26
Număr reflexii colectate	4888	5196	1463
Parametri rafinați	300	309	320
GOF on F ²	1.0316	0.9980	1.019
R1 (F, I>2 Σ (I))	0.0617	0.0564	0,0259
wR ₂ (F ² , toate reflexiile)	0.1698	0.1563	0.0712

^acod CSD: IQUMAI [14]

În urma caracterizării lor s-a constatat că cei doi solvați prezintă o simetrie mai mare, adică ortorombică, decât cea a structurilor raportate în literatură, care sunt monoclinice (Tabelul 3.1). Cu toate că în toate structurile cristaline se observă aceleași lanțuri de molecule de TDF, interacțiunile inter-moleculare dintre TDF și moleculele de solvent din formele solvate induc ușoare modificări conformaționale a moleculelor de TDF (Figura 3.1).

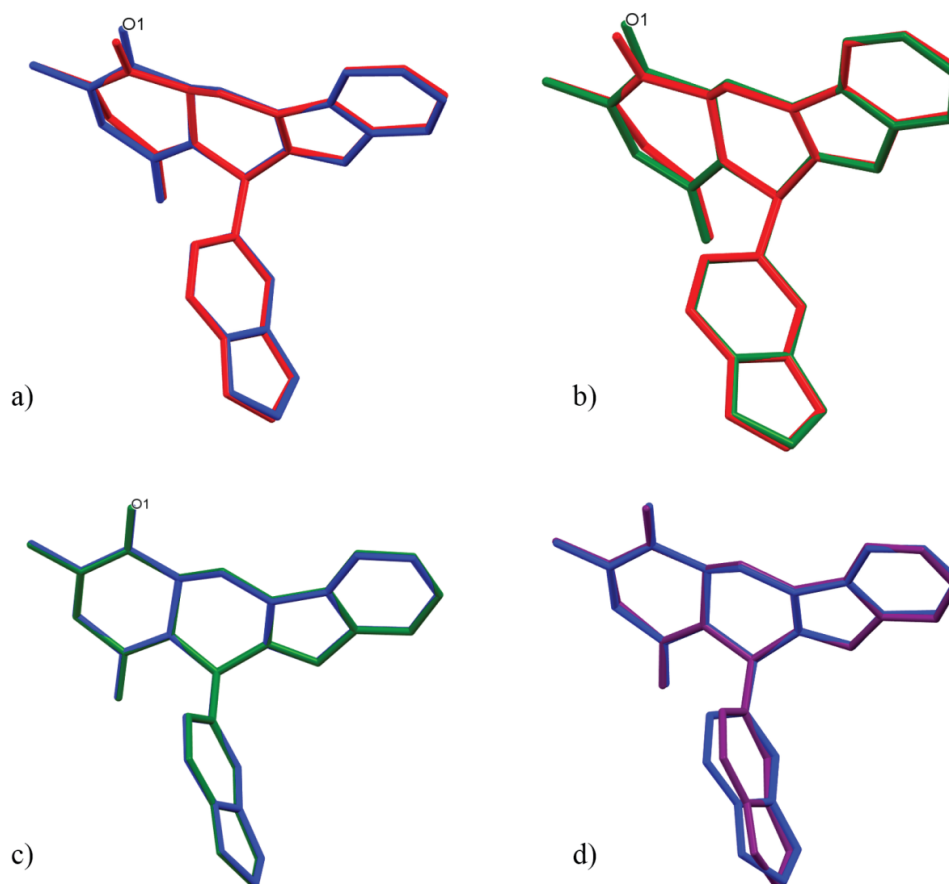


Fig. 3.1. Suprapunerea moleculelor de TDF: a) TDF anhidră (roșu) vs TDF-ACE (albastru), b) TDF anhidră (roșu) vs TDF-MEK (verde), c) TDF-ACE (albastru) vs TDF-MEK (verde), d) TDF-ACE (albastru) vs TDF propilparaben cocristal (magenta).

Solvatul cu MEK prezintă o stabilitate mai mare decât solvatul cu acetonă (Figura 3.2) deși au conformații moleculare și împachetare în celula elementară similare. Considerând solubilitatea scăzută a TDF într-un număr mare de solvenți organici, utilizarea acetonei și metil etil cetonei ca solvenți de cristalizare poate oferi avantajul de a obține concentrații mai mari în procesul de cristalizare a TDF.

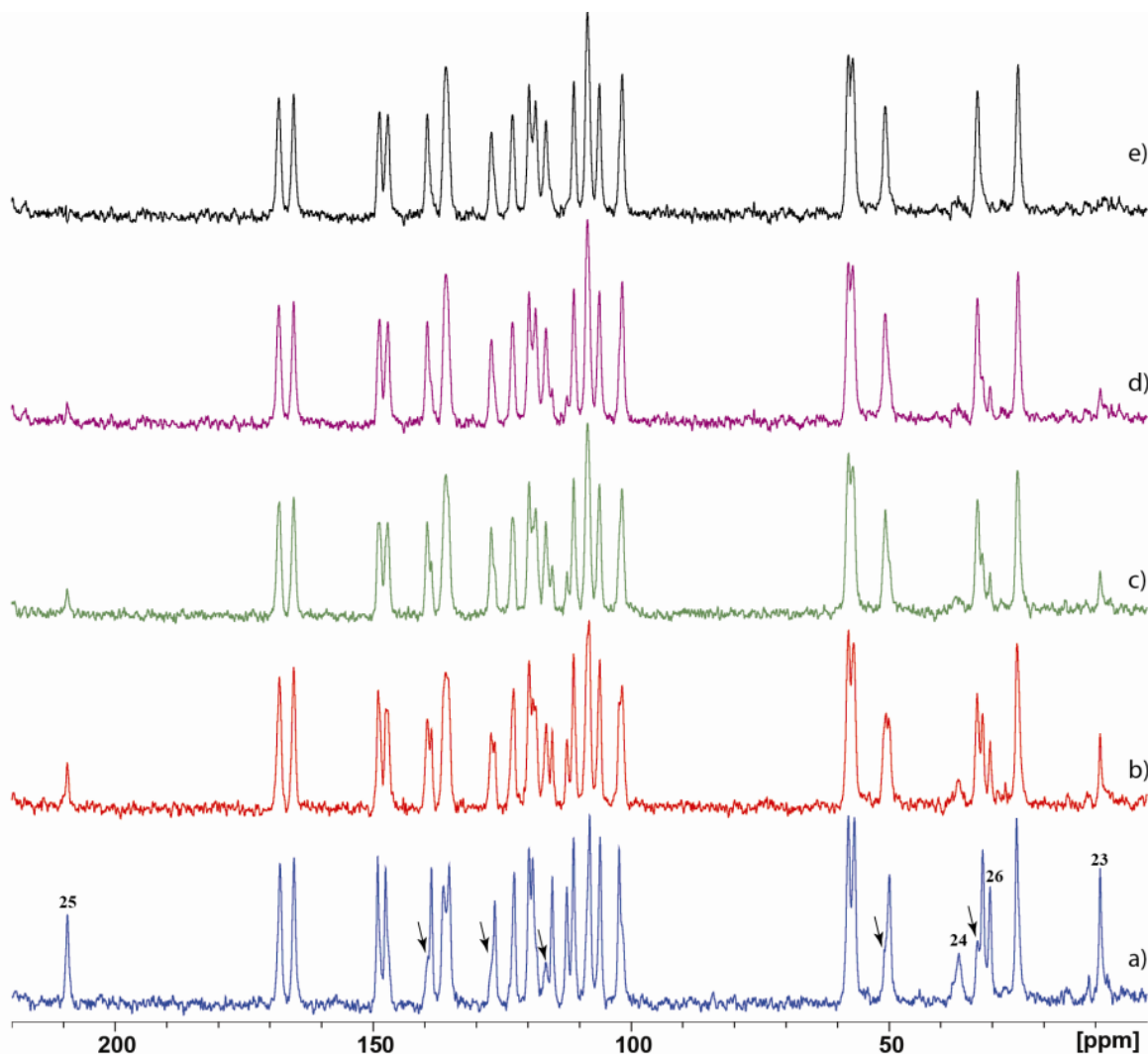


Fig. 3.2. Spectrele ^{13}C CP-MAS ale TDF-MEK înregistrate după: a) o oră, b) 7 ore, c) 14 ore, d) 20 ore, e) 30 ore.

În domeniul farmaceutic solvații sunt folosiți în procesul de purificare [18], ca precursori în obținerea de polimorfi [19] sau pentru a controla dimensiunile particulelor. Dimensiunea particulelor și morfologia se pot controla prin procesul de desolvare obținându-se în același timp și forma polimorfă anhidră dorită [20]. Din acest motiv, desolvarea solvaților produși în cadrul studiului nostru motivează folosirea lor în scopul obținerii formei anhidre. Acest studiu subliniază importanța cunoașterii structurii cristaline pentru a înțelege stabilitatea solvaților și pentru evaluarea riscurilor atunci când aceștia sunt folosiți drept precursori în obținerea formei anhidre.

4. CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A QUERCETINEI ANHIDRE ȘI A FORMELOR SOLVATE OBȚINUTE

Al doilea compus studiat a fost Quercetina, deoarece piața suplimentelor alimentare este în continuă creștere peste tot în lume. Din acest motiv în cadrul tezei de doctorat am inclus un studiu sistematic pe una dintre cele mai cunoscute substanțe biologice active naturale folosită în compoziția suplimentelor alimentare, adică Quercetina.

Studii farmaco-cinetice arată că Quercetina prezintă bio-disponibilitate scăzută, doar 20-30% dintr-o doză orală fiind absorbită [21]. Datorită biodisponibilității scăzute acest flavonoid a fost investigat în ultimii ani din punct de vedere structural, dar s-a încercat și obținerea de forme solide noi care să aibă o biodisponibilitate îmbunătățită. Cu toate că la data efectuării acestui studiu în literatură au fost raportate structurile cristaline pentru Quercetină monohidrat [22] și dihidrat [23], dar și mai multe cocristale și doi complecși metalici, structura Quercetinei anhidre nu era raportată în literatură pentru că nu a putut fi obținută sub formă de monocristal, iar din DRXP nu s-a obținut cel mai probabil datorită ambiguităților care apar în modelele structurale obținute. În acest context, în cadrul acestui studiu mi-am propus drept obiectiv teoretic determinarea structurii cristaline, atât pentru Quercetină anhidră cât și pentru formele solide noi obținute.

În urma experimentelor de *screening* au fost obținute forme solide noi de tip monosolvat, cu etanol și metanol, ambele prezentând însă o cristalinitate redusă. Efectuând experimente de tip *solvent-drop grinding* și *cristalizare prin răcire* s-a reușit obținerea (sub forma de pudră) a formelor solvate cu 1,4 dioxan (Quer_diox) dar și etanol (Quer_EtOH), respectiv, metanol (Quer_MeOH), cu o cristalinitate suficient de bună pentru a putea fi caracterizate din punct de vedere structural.

QUERCETINĂ ANHIDRĂ

În cazul formei anhidre a Quercetinei au fost investigate trei soluții structurale distincte. Structura moleculară inițială folosită în primul model, *Quer_1*, a fost schițată și apoi geometria s-a a fost optimizată prin metode clasice de mecanică moleculară (MM). Al doilea model considerat în cadrul studiului, *Quer_2*, a fost obținut folosind drept structură moleculară de pornire pe cea rezultată din căutarea sistematică în funcție de unghiurile de torsiune θ_1 – θ_5 asociate grupărilor hidroxil aplicată modelului *Quer_1*. Al treilea model molecular considerat, *Quer_3*, a fost obținut folosind o moleculă izolată extrasă din structura cristalină a Quercetinei dihidrat [23] determinată din monocristal. Acest model poate fi folosit pentru a evalua fiabilitatea celorlalte două modele descrise anterior.

Pentru modelul *Quer_1* s-a obținut un factor de fitare R_{wp} nesatisfăcător datorită erorilor induse de aproximarea parametrilor intra-moleculari constrânși în timpul rafinării PXRD (Tabelul 4.1). Optimizarea geometrică aplicată în tot cristalul a corectat majoritatea acestor erori, excepție făcând conformația unei grupări hidroxil. Din cauza acestui parametru se obține o energie de rețea foarte mare pentru modelul *Quer_1* față de energia calculată pentru modelul *Quer_2*. Acest lucru a fost confirmat și de comparația dintre deplasările chimice experimentale $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ cu cele calculate pe modelele optimizate DFT ale *Quer_1/2*.

Tabelul 4.1. Datele cristalografice pentru Quercetină anhidră și informațiile obținute după rafinare pentru cele trei modele

Formula chimică		$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$		
Sistemul cristalografic		Monoclinic		
Grupul spațial		$\text{P2}_1/\text{a}$		
Z		4		
Tipul radiației		$\text{Cu K}\alpha_1, \lambda = 1.54056 \text{ \AA}$		
Modul de colectarea a datelor		Reflexie		
Modul de scanare:		Continuu		
Valorile 2θ (°)		$2\theta_{\min} = 3; 2\theta_{\max} = 40; 2\theta_{\text{step}} = 0.001$		
Modele		<i>Quer_1</i>	<i>Quer_2</i>	<i>Quer_3</i>
Volum ($\text{\AA}^3$)		1202.0	1201.3	1198.8
Factorii R (%)	R_{wp}	10.5	9.1	8.9
	R_p	7.7	6.8	6.6
Parametrii de rețea	a ($\text{\AA}$)	19.98(8)	19.99(1)	19.97(1)
	b ($\text{\AA}$)	3.71(1)	3.71(1)	3.70(9)
	c ($\text{\AA}$)	16.26(2)	16.25(0)	16.24(1)
	β (°)	85.15(5)	85.13(6)	85.15(9)
Densitatea ρ (g/cm^3)		1.670	1.671	1.675

În final, rețeaua de legături de hidrogen formată, precum și analiza spectrului 2D ^1H DQ ne sugerează că modelul *Quer_2* este cel mai realist din punct de vedere al arhitecturii supramoleculare. Formarea celor două suprastructuri moleculare distincte *Quer_2/Quer_3*, depind de inelele care se apropie și între care se stabilesc legături de hidrogen intermoleculare (accentuate de linii punctate îngroșate), după cum este ilustrat în Figura 4.1.

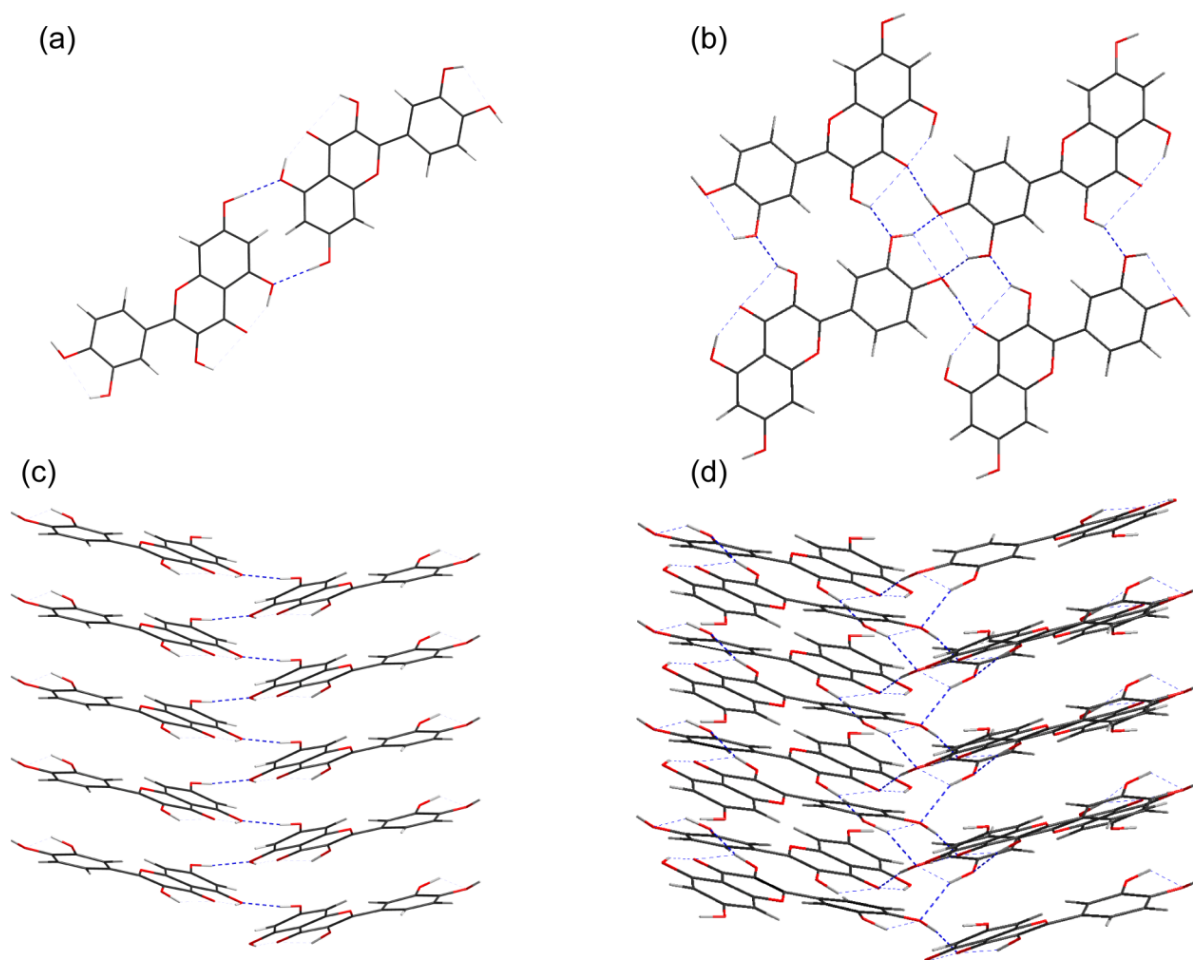


Fig. 4.1. Aranjarea supramoleculară pentru *Quer_2* optimizat geometric (aranjament similar cu *Quer_3*). Modelele propuse de legături de hidrogen în planul (ac) sunt prezentate în (a) și (b), în figurile (c) și (d) se poate vedea aranjarea de-a lungul axei cristalografice b.

Pentru validare, o analiză similară a fost făcută în paralel și pentru *Quer_3*. Soluțiile structurale *Quer_2/Quer_3* optimizate DFT sunt aproape identice, acest lucru confirmând de fapt nivelul mare de acuratețe obținut folosind tehnica *cristalografie RMN* [24], deoarece *Quer_3* pornește de la o structură moleculară determinată prin difracție de raze X pe monocristal.

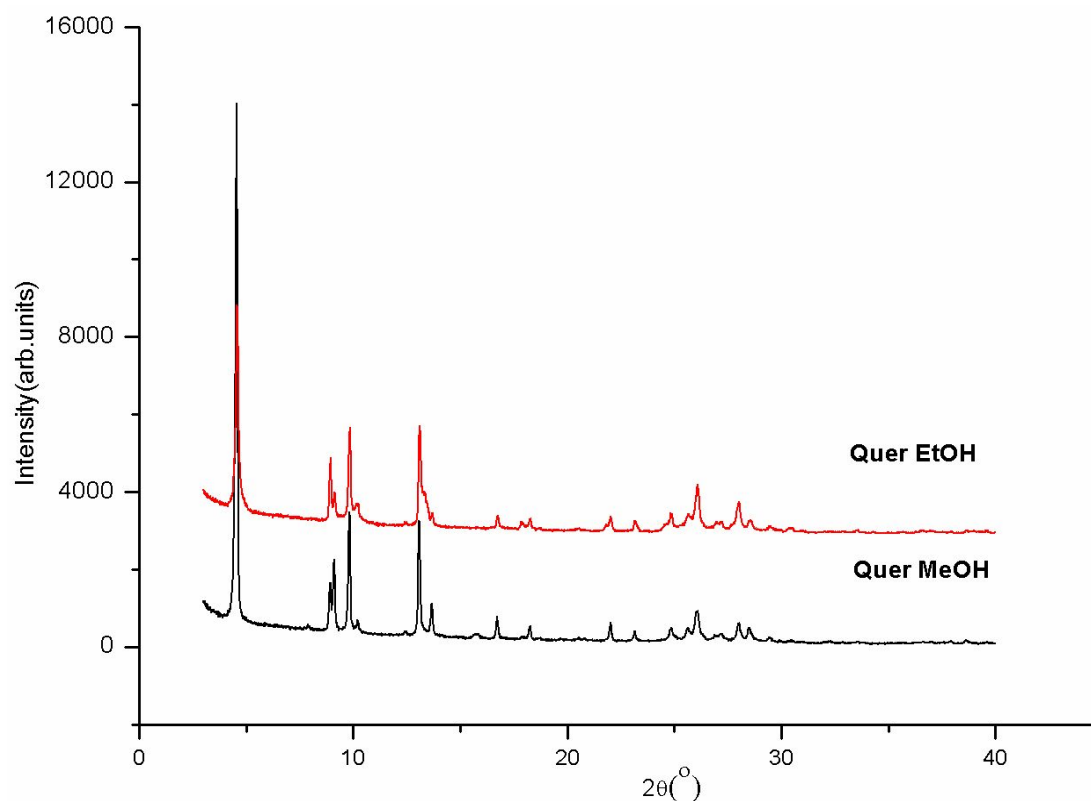
QUERCETINĂ ETANOL ȘI QUERCETINĂ METANOL

Am procedat la determinarea structurii cristaline pentru cei doi solvați cu alcooli (Quercetină etanol și Quercetină metanol) obținuți în urma experimentelor de *cristalizare prin răcire*. Doar în cazul solvatului Quercetină metanol (*Quer_MeOH*) am reușit indexarea difractogramei experimentale, în timp ce pentru *Quer_EtOH* nu am obținut parametrii de rețea satisfăcători cu nici un algoritm de indexare utilizat. Cel mai probabil acest lucru se datorează prezenței unor mici intensități de difracție care aparțin Quercetinei anhidre. Prin urmare, doar structura *Quer_MeOH* a fost determinată (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Datele cristalografice pentru *Quer_MeOH*.

Formula chimică	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ ·CH ₃ OH
Sistemul cristalografic	Triclinic
Grupul spațial	P-1
Z	4
Tipul radiației	Cu Kα ₁ , λ = 1.54056 Å
Modul de colectarea a datelor	Reflexie
Valorile 2θ (°)	2θ _{min} = 3; 2θ _{max} = 40; 2θ _{step} = 0.001
Volum (Å ³)	681.614
R _{wp}	8.74%
R _p	5.96%
a (Å)	19.414(2)
b (Å)	9.981(3)
c (Å)	3.552(3)
α	97.445(8)
β	90.806(6)
γ	92.786(9)
Densitatea ρ (g/cm ³)	1.62

Cu toate acestea, datorită asemănării izbitoare a difractogramelor DRPX (Figura 4.2) și a spectrului ¹³C RMN pe solid a celor doi solvați (ceea ce sugerează că sunt aproape izostructurali), putem considera structura cristalină determinată pentru *Quer_MeOH* ca fiind un model structural acceptabil și pentru solvatul cu etanol.

**Fig. 4.2.** Compararea difractogramelor experimentale DRXP pentru solvații Quercetinei cu metanol și etanol.

Pentru a confirma soluția structurală a *Quer_MeOH* obținută prin DRXP am comparat deplasările chimice experimentale ^{13}C RMN, $\delta^{\text{ex}}(^{13}\text{C})$, cu cele calculate, $\delta^{\text{calc}}(^{13}\text{C})$. Pentru aceasta, structura cristalină obținută prin DRXP a fost mai întâi optimizată geometric (cu parametrii celulei elementare fixați), iar apoi calculați parametrii de ecranare chimică.

Pe lângă dificultatea de a obține cei doi solvați (*Quer_MeOH/EtOH*) cu un grad de cristalinitate și puritate ridicate, necesar pentru a putea determina structura lor cristalină, ei au arătat în plus o stabilitate destul de scăzută. Pentru a stabili comportamentul lor în timp, am efectuat studii de stabilitate, prin spectroscopie RMN pe solide pe o perioadă mare de timp, în cazul solvatului cu metanol ajungând la aproape un an. Rezultatele studiului sunt ilustrate în Figura 4.3 considerând cazul solvatului cu etanol, deoarece desolvarea este mult mai rapidă decât cea observată în solvatul cu metanol.

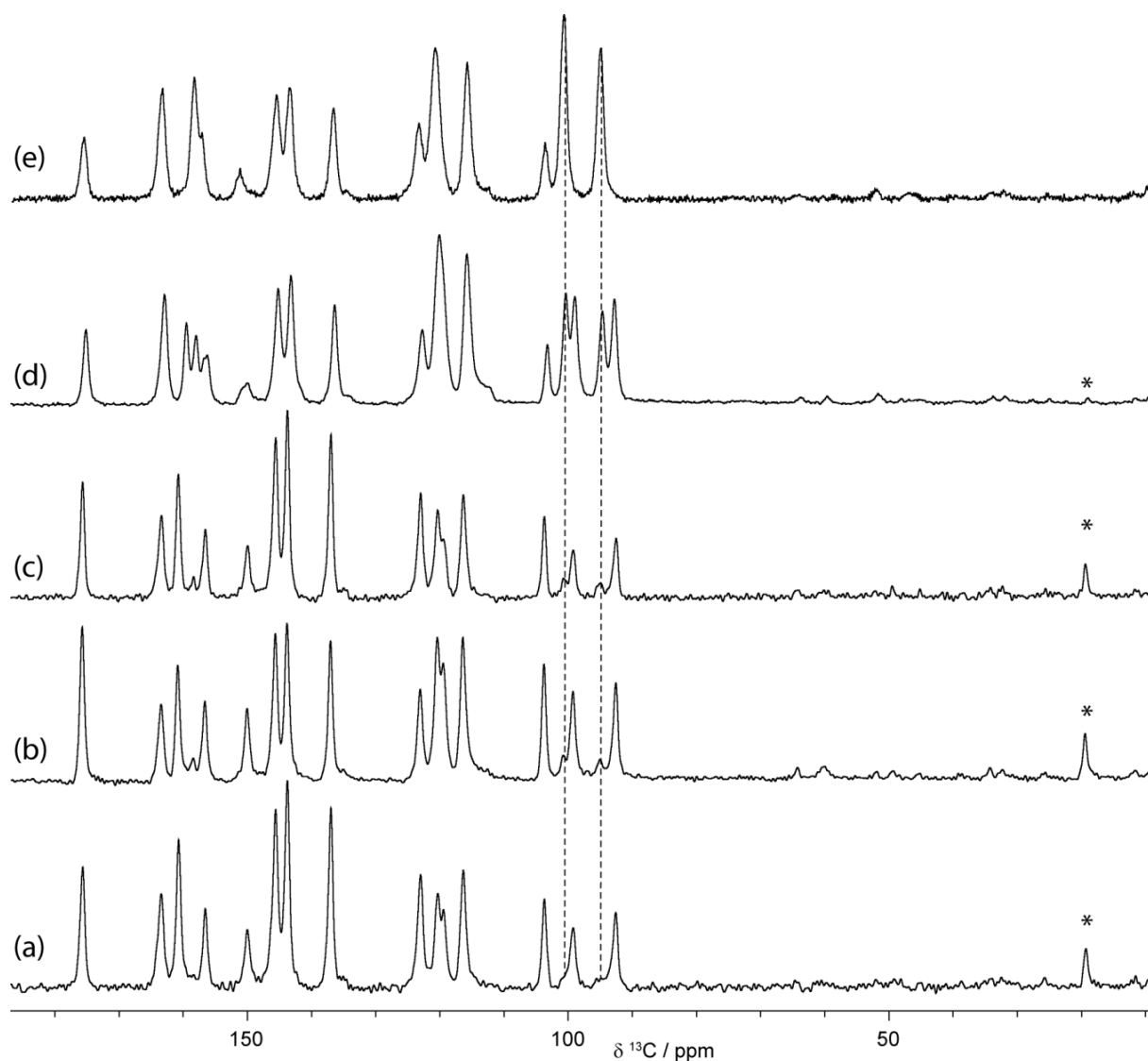


Fig. 4.3. Compararea spectrelor ^{13}C CP-MAS pentru *Quer_EtOH* înregistrat imediat după prepararea probelor (a), după o zi (b), după trei zile (c), după două luni (d), Quercetină anhidră (e).

Concret, am monitorizat evoluția în timp a spectrelor ^{13}C CP-MAS pentru *Quer_EtOH* pe parcursul a două luni (Figura 4.3). Spectrul înregistrat imediat după preparare ne arată că probele conțin o cantitate mică de Quercetină anhidră, această formă a fost identificată prin prezența unor peak-urilor ^{13}C RMN caracteristice Quercetinei anhidre (marcate prin linii punctate în Figura 4.3).

În timp, aceste peak-uri devin tot mai bine definite, indicând o transformare continuă din forma solvată în cea anhidră. Acest lucru se întâmplă cel mai probabil din cauză că fiecare moleculă de etanol face legături slabe de hidrogen în rețea și se leagă doar de molecula vecină de Quercetină, cu alte cuvinte moleculele de solvent nu sunt implicate într-o rețea extinsă de legături de hidrogen așadar pot să “scape” ușor din rețeaua cristalină, ducând în final la formarea Quercetinei anhidre.

QUERCETINĂ DIOXAN

Un nou solvat al Quercetinei, 1,4 dioxan-Quercetină, a fost obținut și structura lui cristalină a fost determinată prin *cristalografie RMN* adaptată sistemelor cu grupări hidroxil multiple [25]. În acest scop am folosit o abordare formată din mai mulți pași, parametrii structurali au putut fi constrânși pas cu pas, la fiecare stadiu adăugând noi rezultate teoretice și experimentale. Urmând acești pași, am ajuns la concluzia că modelul structural *Quer_D_DFT*, se apropie cel mai mult de structura cristalină reală a solvatului.

În acest caz, structura este stabilizată în mare măsură de rețeaua legăturilor de hidrogen: o moleculă de Quercetină se leagă de două molecule de dioxan prin grupări O–H catecol și benzopiran și mai este implicată într-o legătură de hidrogen intermoleculară cu o moleculă de Quercetină vecină (O–H catecol și O cu OH cetonic benzopiran). Invers, o moleculă de 1,4 dioxan formează legături de hidrogen cu două molecule de Quercetină, cu fiecare atom de O ciclic care interacționează cu grupările O–H care aparțin inelului catecol, respectiv benzopiran. După o inspecție mai amănunțită a structurii cristaline a Quer–dioxan se observă formarea unor unități structurale interconectate ierarhic de un nivel de complexitate mare (Figura 4.4).

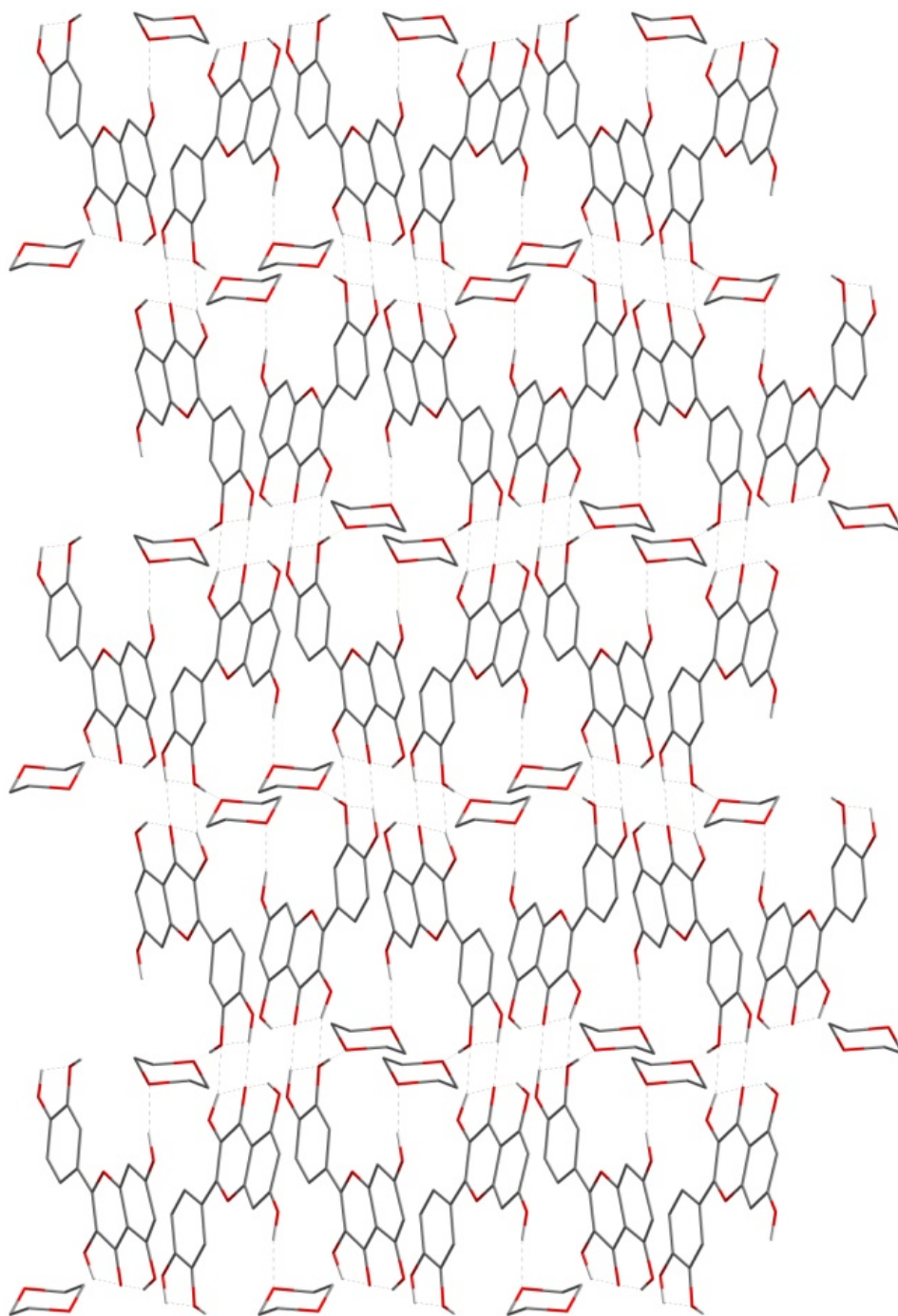


Fig. 4.4. Rețeaua extinsă de legături de hidrogen 2D din planul (bc).

Stabilitatea compusului la temperatura camerei a fost studiată prin RMN pe solide și comparată cu cea a solvaților cu etanol și metanol. Solvatul cu 1,4 dioxan este stabil pentru o perioadă mai mare de timp datorită modului în care moleculele de solvent sunt implicate în rețeaua legăturilor de hidrogen.

IDENTIFICAREA COMPONENTELOR DIN SUPLIMENTI ALIMENTARI PE BAZĂ DE QUERCETINĂ

În ciuda faptului că există numeroase studii care evidențiază importanța consumului de polifenoli, datorită stilului de viață nesănătos, un procent tot mai mare din populație nu consumă o cantitate suficientă de fructe și legume care să asigure aportul necesar de polifenoli. În consecință, suplimentii alimentari care conțin flavonoizi au devenit extremi de populari. Deoarece introducerea pe piață a unui supliment alimentar nu presupune un control atât de strict ca în cazul medicamentelor, producătorii îi pot comercializa fără a fi complet testați asupra eficienței și a efectelor secundare [26], acesta fiind motivul pentru care am considerat că este importantă efectuarea unui studiu. Formele solide cele mai des întâlnite în suplimentii alimentari pe bază de Quercetină sunt Quercetină monohidrat [22] și dihidrat [23], dar un studiu recent [27] arată că produsul final conține și o cantitate mică de Quercetină anhidră, reziduu rezultat în urma procesului de fabricație care implică extragerea Quercetinei cu ajutorul solvenților din diferite surse naturale. Solvenții utilizați cel mai frecvent în procesul de extragere sunt alcoolii (etanol și metanol), dar și acetonitrilul și acetatul de etil.

Formulările solide (tablete, capsule) a suplimentelor alimentare generează un motiv de îngrijorare suplimentar pentru consumatori. Pe de o parte, cunoașterea exactă a formei solide în care se află compusul activ este importantă, deoarece ea influențează în mod direct viteza de dizolvare și bio-disponibilitatea produsului final, în mod analog cu ceea ce se întâmplă în cazul compușilor farmaceutici de sinteză. Pe de altă parte, o astfel de informație este foarte rar prezentată de către producători. Studiul de față își propune să aducă o contribuție exact în această direcție, și reprezintă o aplicație practică directă atât pentru metodele de investigare structurală de tip *cristalografie RMN*, cât și pentru rezultatele discutate anterior cu privire la obținerea și caracterizarea de noi forme solide ale Quercetinei.

Folosind deci o abordare derivată din *cristalografia RMN* am dezvoltat o procedură fiabilă și rapidă pentru caracterizarea suplimentilor alimentari pe bază de Quercetină din punctul de vedere al purității formei solide al extractului de Quercetină încorporat în tablete/capsule. Suplimentii alimentari analizați sunt: Quercetin (producător Natrol Inc, USA) notată cu *Quer_N* și Quercetin (producător Organika, Canada) notată cu *Quer_O*. Provocarea a fost aceea de a distinge forma solidă prezentă în tabletă/capsulă, având în vedere faptul că tableta/capsula este un amestec complex care conține și un număr de excipienți alături de ingredientul (ingredientele) activ(e).

Rezultatele obținute pentru produsele comerciale pe bază de Quercetină investigate demonstrează importanța complementarității dintre cele două tehnici de investigare (RMN și

DRXP) pentru o abordare completă a acestei probleme. În particular, DRXP este foarte utilă pentru o identificare rapidă a componentelor cristaline principale (substanțe active și excipienți) menționate de fabricanți în prospectele celor două produse (Figura 4.5). Limita de detecție a fost una destul de mică, dar acest lucru pare a fi inevitabil atunci când tehnica DRXP este aplicată pe amestecuri complexe de componente sub forma de pudră.

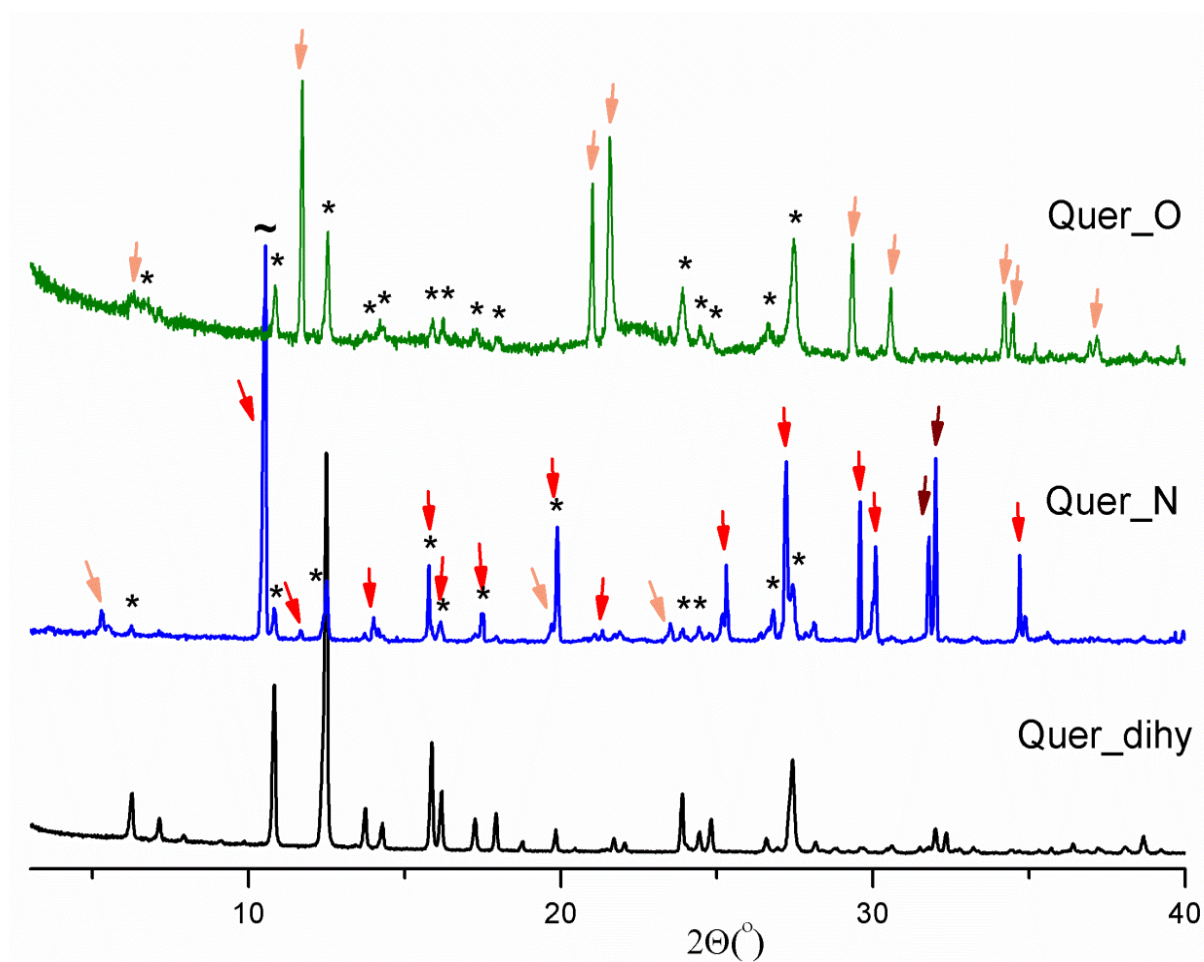


Fig. 4.5. Difractogramele DRXP pentru Quer_2H₂O (negru), Quer_N (albastru) și Quer_O (verde). În Quer_N și Quer_O, Quer_2H₂O este marcat cu (*). Excipienții sunt indicați prin săgeți: portocaliu – stearat de magneziu/acid stearic, roșu – acid ascorbic, maro – dioxid de siliciu.

Prin contrast, spectrele RMN pe solid au arătat o sensibilitate mai bună în distingerea formelor solide ale Quercetinei prezente în formularea comercială, chiar în prezența altor ingrediente active și excipienților. Pe lângă faza majoritară de Quercetină dihidrat, cantități mici care aparțin altei forme solide au fost identificate în ambii suplimenți. Majoritatea semnalelor din ¹³C RMN indică prezența Quercetinei anhidre, dar mici discrepante observate la alte două semnale indică posibilitatea prezenței unei forme solide de Quercetină neraportate. În cazul spectrelor CP-MAS (Figura 4.6), majoritatea liniilor din interiorul dreptunghiului gri, care acoperă regiunea spectrală 90-190 ppm, aparțin Quercetinei. Liniile RMN ale acidului ascorbic (marcate cu săgeți roșii în Fig. 4.6) apar în mod diferit față de

DRXP, intensitățile fiind foarte mici, în ciuda faptului că vitamina C este componentul majoritar al capsulei. Acest lucru este o consecință a faptului că spectrul CP-MAS nu este cantitativ.

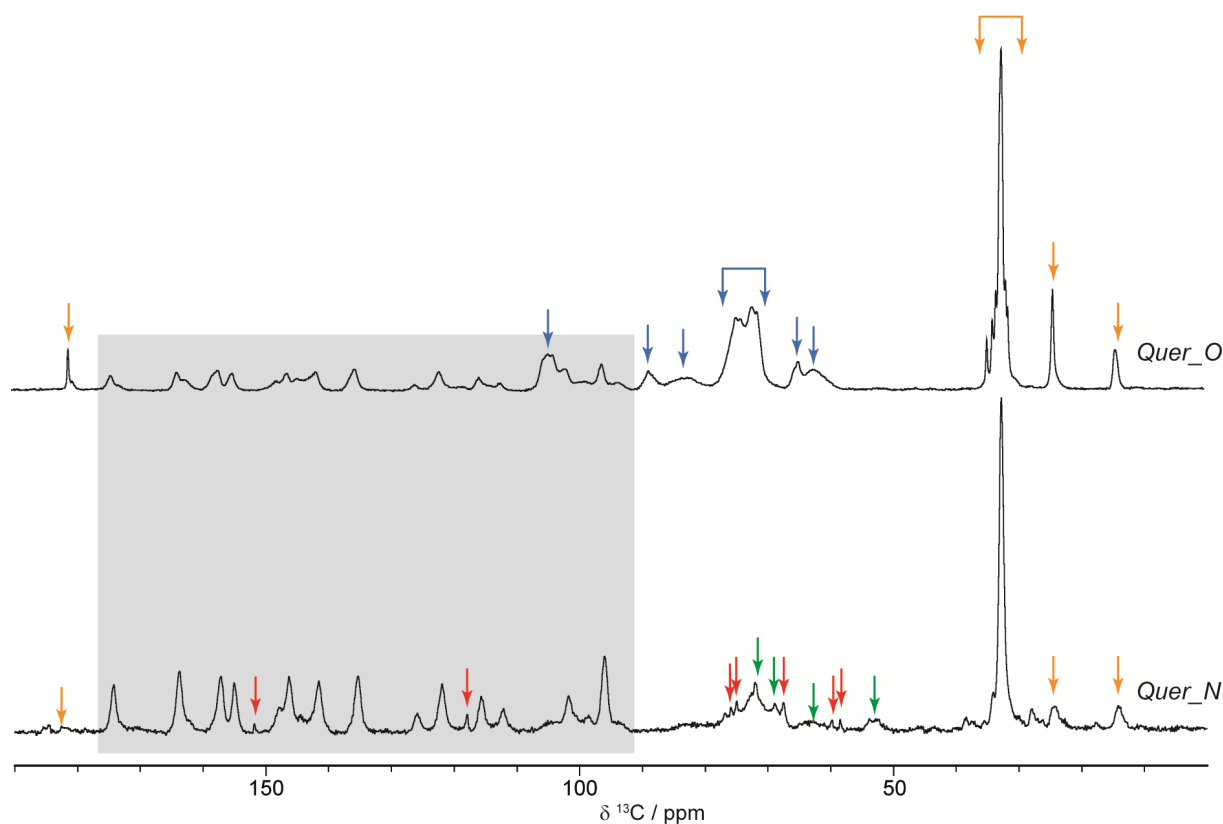


Fig. 4.6. Spectrele ^{13}C CP-MAS ale celor doi suplimente alimentare investigați. Fereastra spectrală unde se așteaptă localizarea liniilor RMN ale Quercetinei este evidențiată de dreptunghiul gri. Liniile caracteristice ale celorlalte componente din probe sunt marcate prin săgeți: portocaliu – stearat de magneziu/acid stearic, roșu – acid ascorbic, verde – complexul citric flavonoid, albastru – celuloză/croscarmeloză sodică.

După studii extinse, această nouă formă a fost identificată ca fiind solvatul cu etanol sau metanol (ambele au prezentat difractograme PXRD și spectrele ^{13}C -RMN aproape identice) al Quercetinei. Deși această abordare a fost testată numai pe două suplimente alimentare ale Quercetinei, poate fi generalizată ușor și la alte produse comerciale care conțin Quercetină/flavonoide.

5. CARACTERIZAREA STRUCTURALĂ A COMPUSULUI LISINOPRIL DIHIDRAT

Ultima dintre substanțele active studiate în cadrul tezei este Lisinopril dihidrat, un medicament cardiovascular care acționează ca inhibitor al enzimei de conversie a angiotensinei (ACE). Structura cristalină din monocristal a fost obținută doar în cazul complexului Lisinopril – ACE [28], iar pentru formele hidrate și cea anhidră au fost raportate doar rezulate din pudră folosind date experimentale colectate la sincrotron [29]. În acest

context, obiectivul principal al investigației a fost acela de a determina în ce măsură utilizarea unei surse de raze X convenționale, de laborator, în cadrul unei abordări de tip *cristalografie RMN* poate conduce la o structură cristalină a Lisinoprilului dihidrat cu un nivel de încredere și un grad de precizie cât mai ridicate. Atingerea acestui obiectiv are o motivare atât de ordin practic, cât și teoretic, fundamental. Importanța practică este legată de tendințele actuale din industria farmaceutică de a utiliza metode analitice rapide și eficiente de caracterizare a substanțelor active, de la stadiul de moleculă nouă la cel de optimizare a formulării finale, și de a scurta astfel cât mai mult posibil întregul proces de dezvoltare de noi medicamente. Din punct de vedere fundamental, Lisinoprilul dihidrat reprezintă o provocare în domeniul caracterizării structurale din pulberi, în primul rând prin numărul mare de grade de libertate care trebuie să fie explorate pentru a obține o soluție structurală, dar și prin dificultatea de a caracteriza o rețea de legături de hidrogen pe care o presupunem foarte complexă, dat fiind numărul mare de grupări din compus capabile să participe la formarea lor – două grupări carboxil, două grupări amino, o grupare carbonil, precum și moleculele de apă.

Pentru obținerea modelului structural din difractograma de raze X au fost efectuate două tipuri de căutări:

- o căutare completă, sugerată de programul utilizat în funcție de numărul de grade de libertate, adică numărul maxim de pași/ciclu
- o căutare restrictivă prin care am explorat posibilitatea reducerii timpului necesar obținerii unui model structural, adică cu un număr de pași/ciclu de 50 de ori mai puțin.

În urma acestor căutări s-au obținut 3 modele structurale notate cu *Lisi_0*, *Lisi_1* și *Lisi_2*. În Figura 5.1 este ilustrată ordinea la distanță și împachetarea moleculelor în rețeaua cristalină. În această figură se pot identifica următoarele trasături caracteristice (care sunt valabile pentru toate cele trei modele): formarea a două canale de-a lungul axei cristalografice *b* în care se găsesc moleculele de apă (A) și (B), și faptul că legarea moleculelor de Lisinopril se face de-a lungul axei *a* prin legături de hidrogen (C).

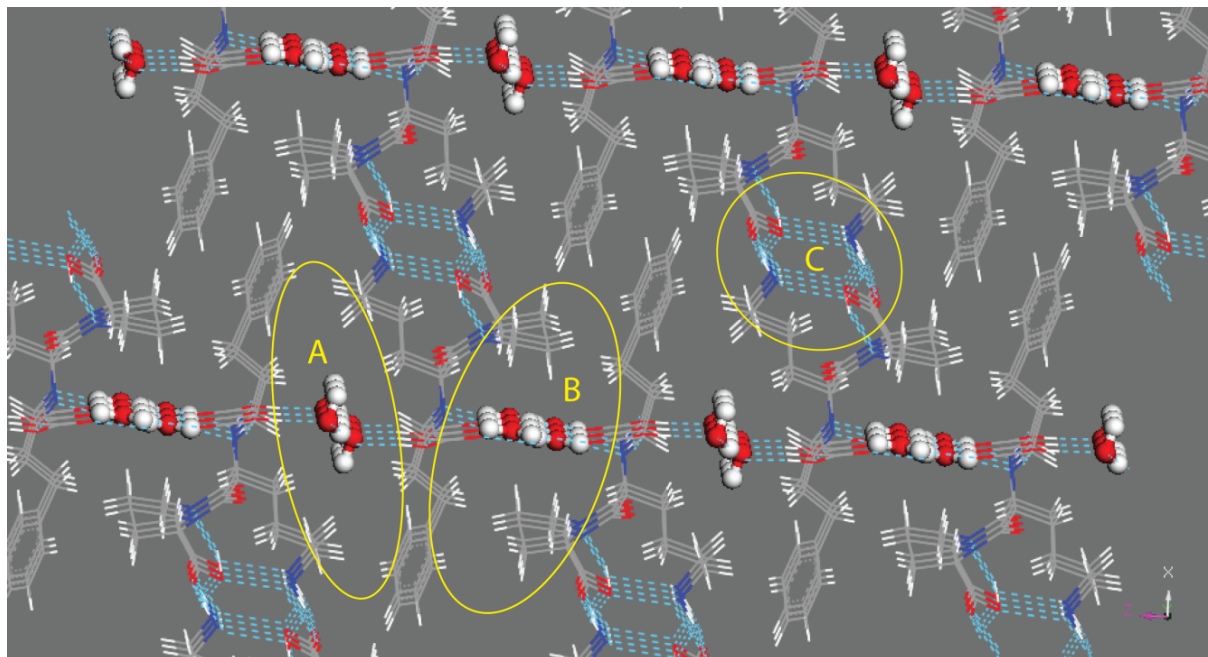


Fig. 5.1 Ordonarea la distanță și modul de împachetare în cristal ilustrate în cazul particular al modelului *Lisi_1*. Aceleași caracteristici generale au fost găsite și pentru modelele *Lisi_0* și *Lisi_2*.

După o analiză mai în detaliu a moleculelor de Lisinopril în cadrul celor trei modele, am observat diferențe notabile privind conformațiile grupărilor carboxil, după cum se observă în Figura 5.2. Aceste diferențe conduc și la diferențe mari între rețelele de legături de hidrogen asociate și ne împiedică să definim un model structural unic. Pentru a înlătura această ambiguitate am apelat la *cristalografia RMN*.

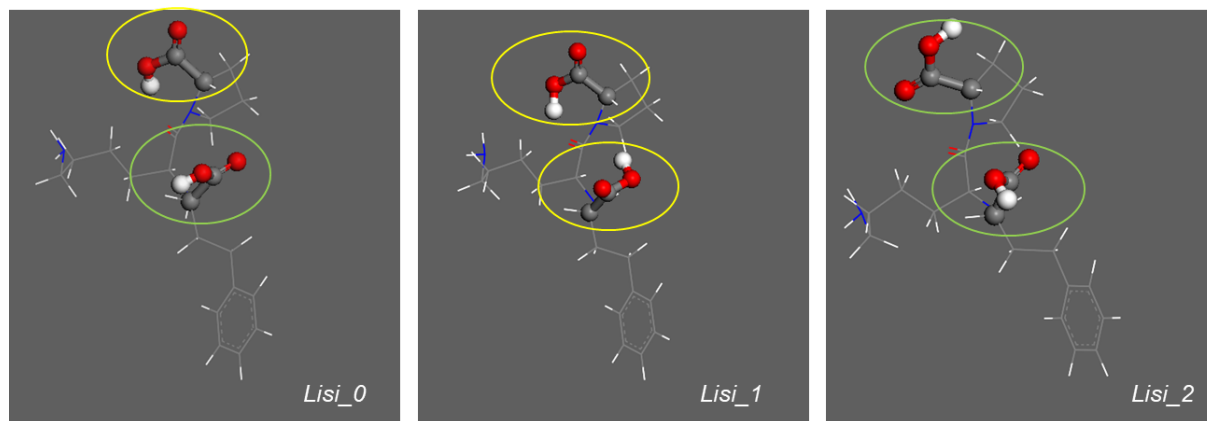


Fig. 5.2. Conformațiile grupărilor carboxil C10–OOH și C21–OOH în modelele selectate pentru analiza structurală *Lisi_0*, *Lisi_1* și *Lisi_2*: *syn* (galben) și *anti* (verde).

Am efectuat o analiză corelată a informațiilor obținute prin modelare moleculară DFT și spectroscopie RMN-s cu scopul de a selecta în final modelul de structură cristalină cel mai realist dintre cele trei soluții structurale rezultate în urma prelucrării datelor DRXP. Optimizarea geometrică DFT a soluțiilor structurale ne-a permis nu doar o ierarhizare a modelelor DRXP, ci și excluderea din analiza ulterioară a modelului *Lisi_2*: energiile de rețea

mult mai mici și legăturile de hidrogen ale N1H_3^+ cu grupările C21-OO^- de la trei molecule vecine din *Lisi_0/Lisi_1*, mult mai realiste în comparație cu *Lisi_2*, ne arată că acesta din urmă este prea departe de structura cristalină reală a Lisinoprilului dihidrat.

Cu ajutorul spectroscopiei RMN pe solide au fost înregistrate spectre de ^{15}N , ^1H și ^{13}C (Figura 5.3).

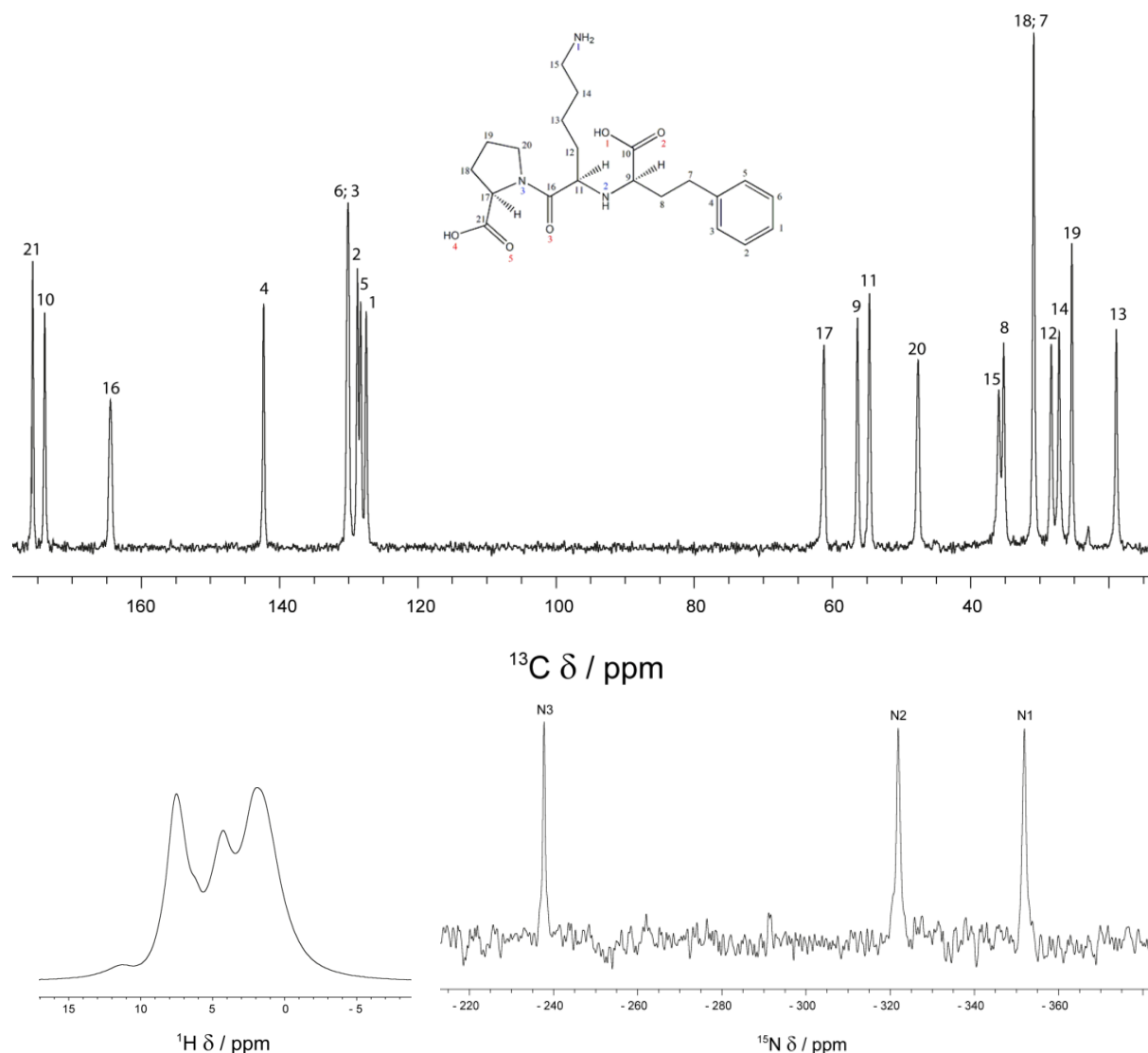


Fig. 5.3. Spectrele ^{13}C / ^{15}N CP-MAS și ^1H la ultra-fast MAS (65 kHz) al Lisinoprilului dihidrat.

Deplasările chimice experimentale au fost comparate cu cele obținute din calcule pentru cele trei modele optimizate geometric prin DFT și s-a constatat că cea mai bună concordanță dintre deplasările chimice calculate și cele observate se obține tot pentru modelul *Lisi_1*. În urma analizei am obținut că modelul *Lisi_1* furnizează cea mai realistă reprezentare a structurii cristaline a Lisinoprilului dihidrat, nu doar din punct de vedere al energiei de rețea, dar și în ceea ce privește parametri RMN-s reprezentativi. În particular, caracteristicile locale legate de grupările carboxil C10-OO^- și C21-OO^- , grupările alifaticе, pozițiile de azot N1 și

N2 și conformațiile inelelor pirolidină/fenil, precum și de lanțul alchil, sunt mai bine descrise în acest model în comparație cu modelul *Lisi_0*. Micile inconsecvente rămase pot fi atribuite efectelor dinamice, care nu sunt luate în considerare în calculele DFT. Legăturile de hidrogen care se formează în modelul *Lisi_1* în jurul grupărilor amino $\text{N}2\text{H}_2^+$ și $\text{N}1\text{H}_3^+$, sunt ilustrate și grafic în Figura. 5.4.

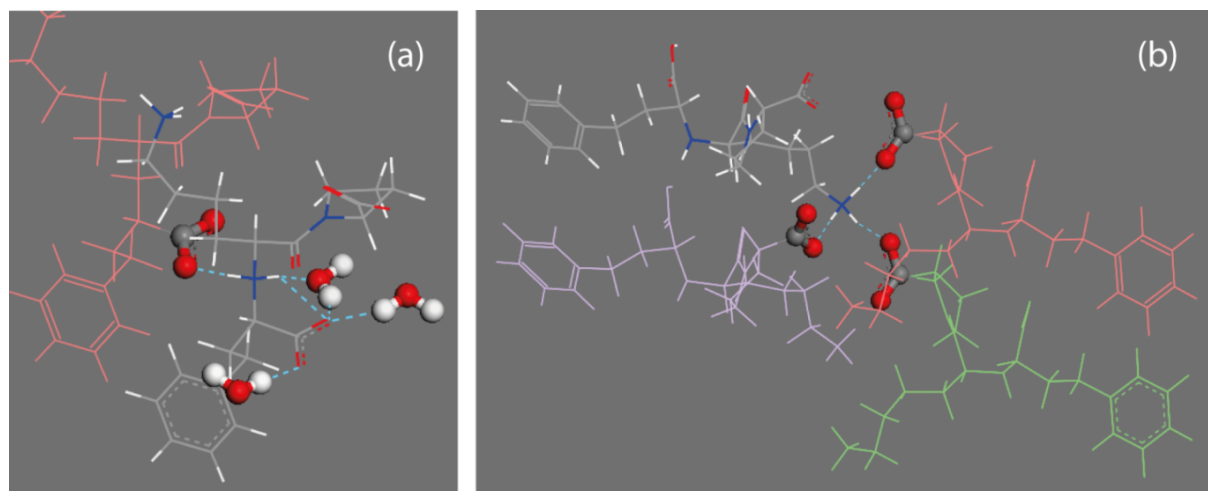


Fig. 5.4. Rețeaua de legături de hidrogen a moleculelor de Lisinopril: (a) în planul median și (b) în jurul aminei N1-H pentru modelul structural *Lisi_1*⁽¹⁾, acesta fiind modelul care se s-a fitat cel mai bine constrângerilor DRXP și RMN.

În concluzie, în studiul de față am demonstrat pe cazul Lisinoprilului dihidrat, un sistem molecular cu 24 de grade de libertate, posibilitatea de a rezolva structura cristalină din pulbere utilizând surse de raze X convenționale, de laborator, cu un nivel de precizie apropiat de cel a difracției de raze X pe monocristal. Deși am avut la dispoziție o difractogramă experimentală de înaltă calitate, am constatat că metoda DRXP furnizează rezultate cu un grad mare de încredere în legătură cu ordonarea la distanță și conformația globală a moleculelor de Lisinopril din rețea, dar nu și pentru o serie de parametri locali importanți precum starea de ionizare a moleculei de Lisinopril, geometria rețelei de legături de hidrogen și parametrii caracteristici pentru aranjarea moleculelor de apă în cele două canale care se formează. Toate aceste caracteristici depind de structura locală din jurul unor grupări carboxil și amino centrate pe doi dintre atomii de azot: datorită limitărilor de ordin fundamental asociate metodei DRXP se obțin conformații multiple ale acestor grupări, iar ambiguitățile structurale generate nu au putut fi rezolvate decât folosind informații complementare obținute prin calcule DFT și spectroscopie RMN pe solid, combinate într-o abordare de tip *cristalografie RMN* [30]. Metodologia aplicată s-a dovedit folositoare atât pentru a obține în final un model de structură cristalină de foarte bună calitate, dar și pentru a caracteriza dinamica moleculară rapidă cu rezoluție la nivel atomic.

CONCLUZII GENERALE

S-au obținut forme solide noi ale unor compuși bioactivi utilizând diverse metode de *screening* și cristalizare și s-a efectuat caracterizarea lor structurală completă. De asemenea, am efectuat o investigație structurală amplă pentru doi compuși bioactivi încorporați în produse existente pe piață. Caracterizarea structurală a tuturor compușilor analizați în cadrul prezentei teze a fost efectuată printr-o abordare modernă, care combină în mod complementar tehnicile de difracție de X cu spectroscopia RMN pe solide și modelarea moleculară, metodologie care este cunoscută sub numele de *cristalografie RMN*.

Au fost studiați mai mulți compuși farmaceutic activi și compuși naturali, dintre care trei au fost tratați exhaustiv în prezenta teză.

Primul compus studiat este Tadalafil, substanța activă din medicamentul Cialis®, un compus cu o solubilitate scăzută. Pentru Tadalafil am efectuat un studiu de polimorfism și cocrystalizare în vederea obținerii de forme solide noi, cu solubilitate îmbunătățită. În urma acestor experimente am obținut monocristale pentru două noi forme solvate (Tadalafil acetonă și Tadalafil metil-etil-cetonă). Aceste două forme solide noi au fost caracterizate structural prin difracție de raze X pe monocristale, rezonanță magnetică nucleară pe solide și modelare moleculară. Acest studiu subliniază importanța cunoașterii, într-un prim pras, deosebit de important, a structurii cristaline pentru a înțelege stabilitatea solvaților și pentru evaluarea riscurilor atunci când aceștia sunt folosiți drept precursori în obținerea formei anhidre.

Al doilea compus studiat a fost Quercetina. Pentru acest compus au fost efectuate experimente de polimorfism și cocrystalizare obținându-se 3 forme solvate ale Quercetinei (cu 1,4 dioxan, etanol și, respectiv, cu metanol), cu o cristalinitate bună ce a permis caracterizarea lor din punct de vedere al structurii cristaline.

Au fost caracterizate structural, printr-o abordare de tip *cristalografie RMN*, toate cele trei forme solvate, precum și Quercetina anhidră (a cărei structură cristalină nu a fost raportată în literatură). Pentru aceste forme solide noi am efectuat și studii de stabilitate la temperatura camerei prin RMN pe solide. Concluzia a fost că solvatul cu 1,4 dioxan este stabil pentru o perioadă mai mare de timp, în comparație cu ceilalți solvați, datorită modului în care moleculele de solvent sunt implicate în rețeaua legăturilor de hidrogen. Pentru forma solidă nouă Quercetină–1,4 dioxan, fiecare moleculă de dioxan se conectează cu două molecule de Quercetină, spre deosebire de solvații Quercetină cu metanol și, respectiv, etanol, fiecare moleculă de solvent se conectează cu o singură moleculă de Quercetină.

O aplicație practică concretă a studiilor structurale ale Quercetinei anhidre și respectiv a noilor solvați o constituie analiza formelor solide existente în suplimenți alimentari comerciali. Folosind o abordare derivată din *cristalografia RMN* am dezvoltat o procedură fiabilă și rapidă de caracterizare a suplimentelor alimentari pe bază de Quercetină, din punct de vedere al purității formei solide a Quercetinei încorporate ca substanță activă în tablete sau în capsule. DRXP a fost utilă pentru o identificare rapidă a componentelor cristaline principale (substanțe active și excipienți) menționate de fabricanți în prospectele produselor aflate pe piață, iar spectrele RMN pe solid au arătat o sensibilitate mult mai bună în distingerea formelor solide ale Quercetinei prezente în formulările comerciale, chiar în prezența altor ingrediente active și a excipienților. Deși această abordare a fost testată doar pentru doi suplimenți alimentari, ea poate fi generalizată ușor și la alte produse comerciale care conțin flavonoide.

O altă substanță activă studiată în cadrul tezei se numește Lisinopril dihidrat, substanță activă care intră în compoziția unor medicamente utilizate pentru tratamentul hipertensiunii arteriale și a altor afecțiuni cardiace. Am demonstrat că în cazul Lisinoprilului dihidrat – un sistem molecular cu 24 de grade de libertate – posibilitatea de a rezolva structura cristalină din pulbere utilizând surse de raze X de laborator (nu doar radiația X obținută la sincrotron), cu un nivel de precizie apropiat de cel a difracției de raze X pe monocristal. Lisinoprilul dihidrat a reprezentat o provocare în domeniul caracterizării structurale din pulberi, în primul rând din cauza numărului mare de grade de libertate care trebuiau explorate pentru a ajunge la o soluție structurală, dar și prin dificultatea de a caracteriza o rețea de legături de hidrogen extrem de complexă. Din cauza limitărilor de ordin fundamental asociate metodei DRXP se obțin conformații multiple ale acestor grupări, iar ambiguitățile structurale generate au putut fi rezolvate doar folosind informații complementare obținute prin calcule DFT și spectroscopie RMN pe solid – *cristalografie RMN*. Metodologia aplicată s-a dovedit folositoare atât pentru a obține în final un model de structură cristalină de foarte bună calitate, dar și pentru a caracteriza dinamica moleculară rapidă cu rezoluție la nivel atomic.

LISTĂ PUBLICAȚII ÎN REVISTE COTATE ISI

Pe subiectul tezei

1. Filip X, **Miclaus M**, Martin F, Filip C, Grosu IG: Optimized multi-step NMR-crystallography approach for structural characterization of a stable quercetin solvate, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS **138**, 22, 2017.
2. **Miclaus M**, Filip X, Filip C, Martin FA, Grosu IG: Highly sensitive solid forms discrimination on the whole tablet of the active ingredients in quercetin dietary supplements by NMR crystallography approaches, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS **124**, 2016.
3. **Miclaus M**, Kacso IE, Martin FA, David L., Pop MM, Filip C, Filip X: Crystal structure and desolvation behaviour of the Tadalafil mono solvates with acetone and methyl ethyl ketone, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES **104**, 3782, 2015.
4. **Miclaus M**, Grosu IG, Filip X, Tripon C, Filip C: Optimizing structure determination from powders of crystalline organic solids with high molecular flexibility: the case of lisinopril dehydrate, CRYSTENGCOMM **16**, 299, 2014.
5. Tripon C, Kacso I, **Miclaus M**, Filip X, Bratu I, Filip C: Molecular structure elucidation of a new anhydrous polymorph of Acyclovir: Experimental and computational approach, REVISTA DE CHIMIE **65**, 657, 2014.
6. Tripon C, **Miclaus M**, Filip X, Filip C: Molecular architecture characterization of a new Acyclovir polymorph, EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS **42**, S207, S1, 2013.
7. Filip X, Grosu IG, **Miclaus M**, Filip C: NMR crystallography methods to probe complex hydrogen bonding networks: application to structure elucidation of anhydrous quercetin, CRYSTENGCOMM **15**, 4131, 2013.
8. Marian E, Jurca T, Kacso I, **Miclaus M**, Bratu I: Interactions Analysis between Furazolidone and Excipients used in Pharmaceutical Forms, REVISTA DE CHIMIE **64**, 1275, 2013.
9. Marian E, Jurca T, Vicas L, Kacso I, **Miclaus M**, Bratu I: Inclusion Compounds of Erythromycin with β -cyclodextrin, REVISTA DE CHIMIE **62**, 1065, 2011.

Alte articole

1. Marutoiu C, Grapini SP, Baciuc A, **Miclaus M**, Marutoiu VC, Dreve S, Kacso I, Bratu I: Scientific investigations of a 16th century stall belonging to the Evangelic Church in Bistrita, Bistrita-Nasaud County, Romania, JOURNAL OF SPECTROSCOPY, 957456, 2013.

2. Toloman D, Popa A, Raita O, Stan M, Suciu R, **Miclaus M**, Biris AR: Luminescent properties of vanadium-doped SnO₂ nanoparticles, *OPTICAL MATERIALS* **37**, 223, 2014.
3. Soancă A, Perhaița I, **Miclaus M**, Florea A, Petruțiu SA, Băciuț M, Roman A: Characterization of some xenogeneic biomaterials for periodontal regeneration, *JOURNAL OF OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS* **17**, 704, 2015.
4. Marconi D, Colnita A, **Miclaus M**, Turcu I: Fabrication of interdigitated electrodes by molecular beam epitaxy technique for molecular detection, *EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS* **44**, S136, S1, 356, 2015.
5. Rednic MI, Varga RA, Bende A, Grosu IG, **Miclaus M**, Hadade ND, Terec A, Bogdan E, Grosu I: Supramolecular anion recognition by beta-HCH, *CHEMCOMM* **52**, 12322, 2016.
6. Marutoiu C, Bratu I, Nemes OF, Dit II, Comes R, Tanaselia C, Falamas A, **Miclaus M**, Marutoiu VC, Moraru R: Instrumental analysis of materials and topology of the Imperial Gates belonging to the Apahida wooden church, Cluj County, *VIBRATIONAL SPECTROSCOPY* **89**, 131, 2017.
7. Grosu IG, Rednic MI, **Miclaus M**, Grosu I, Bende A: The nature of intermolecular interactions in pyridinium-anion-beta-hexachlorocyclohexane molecular crystals, *PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS* **19**, 20691, 2017.
8. Nemes OF, Bratu I, Marutoiu C, Kasco I, **Miclaus M**, Mihali D, Badea DN: Spectroscopy investigation of triptych icon from Borsa Church, Maramures Country, *REVISTA DE CHIMIE* **69**, 76, 2018.

Participări la conferințe științifice

Prezentare orală

Miclaus M, Grosu IG, Filip X, Tripon C, Filip C: *Advanced NMR Crystallography Techniques for structural Characterization of Organic Solids from Powders*, 9th Processes in Isotopes and Molecules International Conference, Cluj-Napoca, Romania, 2013.

Postere conferințe internaționale

1. **Miclaus M**, David L, Martin F, Kacso I: *Structural characterization for Cyclobenzaprine Hydrochloride by X-Ray diffraction and FTIR spectroscopy*, Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems, Cluj-Napoca, Romania, 2014.

2. **Miclaus M**, Grosu I G, Borodi G, David L, M. Pop M: *Polymorfism of fempiverinium bromide*, 9th Processes in Isotopes and Molecules International Conference, Cluj-Napoca, Romania, 2013.
3. **Miclaus M**, Grosu IG, Filip X, Filip C, Muresan-Pop M, David L: *Solvatomorphism of Quercetin*, 9th Processes in Isotopes and Molecules International Conference, Cluj-Napoca, 2013.
4. **Miclaus M**, Grosu IG, Filip X, Martin F, Filip C: *NMR Crystallography techniques for structural characterization of pharmaceutical compounds from powders*, 15th European Powder Diffraction Conference, Bari, Italy, 2016.
5. **Miclaus M**, Filip X, Grosu IG, Filip C: *NMR Crystallography techniques for structural characterization of pharmaceutical compounds*, 17th International Balkan Workshop on Applied Physics and Materials Science, Constanta, Romania, 2017.
6. Tripon C, **Miclaus M**, Filip X, Filip C: *Molecular architecture characterization of a new Acyclovir polymorph*, European Biophysics Congress EBSA, Lisbon, Portugal, 2013.
7. Tripon C, **Miclaus M**, Kacso I, Filip X, Filip C: *Solid-state NMR: a tool for investigating molecular architecture of new pharmaceutical solid forms*, European Conference on Magnetic Resonance, Dublin, Ireland, 2012.
8. Tripon C, **Miclaus M**, Kacso I, Filip X, Filip C: *NMR crystallography for structural investigation of new pharmaceutical solid forms*, Central and East European Bruker User Meeting, Varna, Bulgaria, 2012.

Postere conferințe naționale

1. **Miclaus M**, David L, Filip C, Filip X, Pop M: *Crystal structure determination of quercetin anhydrate by a multi-technique approach*, 32th National Chemistry Conference, Valcea, Romania, 2012.
2. Onija OM, **Miclaus M**, Kacso I, Bratu I: *New solid form of promethazine hydrochloride*, 32th National Chemistry Conference, Valcea, Romania, 2012.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Byrn SR, Pfeiffer RR, Stowell JG, Solid-State Chemistry of Drugs, SSCI, West Lafayette, IN, 1999.
2. Desrosiers P, International Symposium on Polymorphism and Crystallization, 2001.
3. Langevelde van A, Blomsma E, Acta Cryst. A, 58, C9, Supplement, 2002.
4. Marian E, Jurca T, Vicas L, Kacso I, **Miclaus M**, Bratu I, Revista de Chimie, 62, 1065, 2011.
5. Harris KDM, Tremayne M, Kariuki BM, Angew Chem Int Ed, 40, 1626, 2001.
6. McCusker LB, LB von Dreele, Cox DE, Louer D, Scardi P, J Appl Crystallogr, 32, 36, 1999.
7. Harris RK, Wasylishen RE, Duer MJ, NMR Crystallography, Wiley, 2009.
8. Weber AL, Emsley L, Clarmunt RM, Brown SP, J. Phys. Chem., A 114, 10435, 2010.
9. Apperley DC, Batsanov AS, Clark SJ, Harris RK, Hodgkinson P, Jochym DB, J. Mol. Struc., 1015, 192, 2012.
10. Harris RK, Hodgkinson P, Pickard CJ, Yates JR, Zorin V, Magn. Reson. Chem., 45, S174, 2007.
11. Tripon C, Kacso I, **Miclaus M**, Filip X, Bratu I, Filip C, Revista de Chimie, 65, 657, 2014.
12. Tripon C, **Miclaus M**, Filip X, Filip C, European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 42, S207, S1, 2013.
13. Anderson NR, Gullapalli RP, US 6841167 B1, 2005.
14. Daugan A, Grondin P, Ruault C, Le Monnier de Gouville AC, Coste H, Linget JM, Kirilovsky J, Hyafil F, J Med Chem, 46, 4533, 2003.
15. Wizel S, Krochmal B, Givant A, Diller D, Patent US 2006/0111571 A1, 2006.
16. Allen FH, Acta Crystallogr Sect B: Struct Sci B58, 380, 2002.
17. **Miclaus M**, Kacso IE, Martin FA, David L., Pop MM, Filip C, Filip X, Journal of Pharmaceutical Sciences, 104, 3782, 2015.
18. Wirth DD, Stephenson GA., Org Process Res Dev, 1, 55, 1997.
19. Minkov VS, Beloborodova AA, Drebuschak VA, Boldyreva EV, Cryst Growth Des, 14, 513, 2014.
20. Griesser UJ, Wiley VCH, pp. 211, 2006.
21. Hollmanet PCH, FEBS Letters, 418, 152, 1997.
22. Domagala S, Munshi P, Ahmed M, Guillot B, Jelsch C, Acta Crystallogr. Sect. B: Struct Sci., 67, 63, 2011.
23. Jin GZ, Yamagata Y, Tomita KI, Acta Crystallogr. Sect C: Cryst. Struct. Commun., 46, 310, 1990.
24. Filip X, Grosu IG, **Miclaus M**, Filip C, CRYSTENGCOMM, 15, 4131, 2013.
25. Filip X, **Miclaus M**, Martin F, Filip C, Grosu IG, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 138, 22, 2017.
26. Nordeen SK, Bona BJ, Jones DN, Lambert JR, Jackson TA, Hormones and Cancer, 4, 293, 2013.
27. **Miclaus M**, Filip X, Filip C, Martin FA, Grosu IG, J. Pharm. Biomed. Anal., 124, 274, 2016.
28. Natesh R, Schwager SLU, Sturrock ED, Acharaya KR, Nature, 421, 551, 2003.
29. Fuji K, Uekusa H, Hasegawa G, Yonemochi E, Terada K, Acta Cryst. A, 64, C135, 2008.
30. **Miclaus M**, Grosu IG, Filip X, Tripon C, Filip C, CRYSTENGCOMM 16, 299, 2014.

