



**Universitatea Babeş-Bolyai**  
**Facultatea de Fizică**



**Raluca-Andreea Luchian**

**Spectroscopie experimentală și computațională  
aplicată unor medicamente  
antiepileptice și anticancerigene**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**Conducător de doctorat**

**Prof.dr. Vasile Chiș**

**Cluj-Napoca**

**2018**

---

---

## **Cuvinte cheie**

Ingrediente active farmaceutic

Antiepileptice

Anticancerigene

Spectroscopie

DFT

Levetiracetam

Diphenylhydantoin

Imatinib

---

---

## Mulțumiri

Mulțumesc conducătorului meu științific, Prof. dr. Vasile Chiș, pentru faptul că mi-a permis să mă alătur grupului său de cercetare și să intru în fascinanta lume a cercetării, pentru încurajările sale continue, coordonarea răbdătoare și sfaturile acordate în timpul efectuării stagiului de doctorat.

Finalizarea acestei teze nu ar fi fost posibilă fără ajutorul și prietenia arătată de către ceilalți membri ai grupului profesorului Chiș și de către ceilalți membri ai Departmentului de Fizică Biomoleculară de la Universitatea Babeș-Bolyai. Mulțumiri d-lui Dr. Nicolae Leopold pentru ghidarea mea în timpul măsurătorilor UV-Vis și Raman în laboratoarele SETA și Raman-SPM. Mulțumesc d-lui Dr. Mihai Vasilescu pentru măsurătorile RMN pe LEV și IMT și doamnei Dr. Dana Maniu pentru măsurătorile de ultim moment pe probele sub formă de tablete ale LEV.

Mulțumiri speciale domnului Dr. Major Zoltan de la UMF Iuliu Hațieganu din Cluj-Napoca, pentru furnizarea probelor de medicamente LEV.

Vreau să exprim mulțumiri speciale d-lui Dr. Mircea Oltean, post-doc în grupul prof. Chiș, pentru sfaturile prețioase legate de calculele de chimie cuantică. Sfaturile și ajutorul său au venit întotdeauna când am avut cea mai mare nevoie.

Vreau să mulțumesc, de asemenea, colegilor de laborator: dr. Alexandra Falamas, drd. Istvan Toth și drd. Reka Domomkos, pentru că au făcut ca experiența mea în laborator să fie captivantă și distractivă.

Nu în ultimul rând, mulțumesc familiei mele pentru dragostea arătată și pentru încurajările continue. Mulțumesc foarte mult!

Cercetările efectuate pentru elaborarea acestei teze au fost efectuate folosind infrastructura de cercetare a Universității Babeș-Bolyai, finanțată de către guvernul României prin programul PN II – Capacități – titlul proiectului Rețea Integrată pentru Cercetări Interdisciplinare – RICI și proiectul MADECIP (POSCEE COD SMIS CSNR 48801/1862).

## Lista de publicații

**Raluca Luchian**, Emil Vințeler, Cosmina Chiș, Mihai Vasilescu, Nicolae Leopold, João P. Prates Ramalho, Vasile Chiș, "Conformational preference and spectroscopical characteristics of the active pharmaceutical ingredient Levetiracetam", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106 (2017) 3564-3573, DOI: 10.1016/j.xphs.2017.08.008.

**Raluca Luchian**, Emil Vințeler, Cosmina Chiș, Mihai Vasilescu, Nicolae Leopold, Vasile Chiș, "Molecular structure of phenytoin: NMR, UV-Vis and quantum chemical calculations", *Croatica Chemica Acta*, 88 (2015) 511-522, DOI: 10.5562/cca2767.

Emil Vințeler, Nicoleta-Florina Stan, **Raluca Luchian**, Călin Căinap, Joao P. Prates-Ramalho, Vasile Chiș, "Conformational landscape and low lying excited states of imatinib", *Journal of Molecular Modeling*, 21 (2015) 84, DOI: 10.1007/s00894-015-2639-8.

**Raluca Luchian**, Réka-Anita Domokos, Cosmina Chiș, Mihai Vasilescu, Emil Vințeler, Vasile Chiș, "Methods and models for calculating NMR spectra: Levetiracetam as a test case", *Studia UBB Physica*, 59 (LIX), 2 (2014) 85-98.

---

---

## Cuprins

<b>Introducere</b> .....	1
<b>Capitolul 1</b>	
<b>Metode DFT pentru calculul structurii electronice a moleculelor</b> .....	3
1.1 Bazele DFT .....	3
1.2 Seturi de bază pentru calcule <i>ab initio</i> și DFT .....	5
1.3 Metodologia ONIOM .....	7
<b>Capitolul 2</b>	
<b>Detalii experimental și computaționale</b> .....	8
2.1 Spectrometrul Raman .....	8
2.2 Detalii experimentale generale .....	8
2.3 Detalii computaționale generale .....	9
<b>Chpitoul 3</b>	
<b>Preferința conformațională și caracteristici spectroscopice ale ingredientului farmaceutic activ levetiracetam</b> .....	10
3.1 Introducere .....	10
3.2 Detalii experimentale și computaționale .....	10
3.3 Spațiul conformațional al moleculei Levetiracetam .....	11
3.4 Spectrele UV-Vis ale moleculei Levetiracetam .....	15
3.5 Analiza RMN a moleculei Levetiracetam în apă .....	16
3.6 Trăsături vibraționale ale moleculei Levetiracetam .....	17
3.6.1 Spectrele vibraționale ale ingredientului farmaceutic activ Levetiracetam ....	17
3.6.2 Spectrele Raman ale medicamentelor Levetiracetamului .....	19
3.7 Concluzii .....	21
<b>Capitolul 4</b>	
<b>Structura moleculară și trasăturile vibraționale ale moleculei difenilhidantoin</b> 23	
4.1 Introducere .....	23
4.2 Detalii experimentale și computaționale .....	23
4.3 Interacțiuni de tip hydrogen bonding ale moleculei difenilhidantoin .....	24
4.4 Tranziții electronice ale moleculei difenilhidantoin .....	27
4.5 Analiza RMN a moleculei difenilhidantoin .....	28
4.6 Trasături vibraționale ale moleculei difenilhidantoin .....	29
4.7 Concluzii .....	33
<b>Capitolul 5</b>	
<b>Spațiul conformațional și stările excitate de joasă energie ale moleculei imatinib</b> .....	34
5.1 Introducere .....	34
5.2 Detalii experimentale și computaționale .....	34
5.3 Spațiul conformațional al moleculei Imatinib .....	35
5.4 Tranziții electronice și spectrul UV-Vis al moleculei Imatinib .....	40
5.5 Concluzii .....	41
<b>Bibliografie</b> .....	42

---

---

## Introducere

Proprietățile fizico-chimice ale ingredientelor active farmaceutic (APIs) sunt puternic influențate de către aranjamentul moleculelor în cristal, aranjament care este determinat la rândul său de către spațiul conformational al moleculelor componente [Dat04]. Așadar, structura API, precum și mediul molecular al acestora joacă un rol dominant asupra proprietăților fizico-chimice precum: solubilitatea, viteza de dizolvare, stabilitatea, absorbția, higroscopicitatea și biodisponibilitatea. Pentru aceste motive este clar că înțelegerea relației dintre structura fizică și proprietățile unui API particular este crucială pentru dezvoltarea acestuia ca și medicament.

O problemă importantă pentru industria farmaceutică o constituie falsificarea medicamentelor, atât pentru produsele originale (brand) cât și pentru cele generice [Deg14, Ora15]. Riscurile asociate cu înlocuirea medicamentelor brand cu substituenți generici sunt importante datorită faptului că ultimele pot să prezinte efecte adverse în timpul terapiei [Kra07, Bia10, Vai15, Ati16].

Caracterizarea spectroscopică a APIs este de importanță deosebită pentru industria farmaceutică. În ultimul timp, pentru determinarea structurii API, dar și pentru a releva transformări structurale subtile la trecerea din faza solidă în cea lichidă, se folosesc sinergic diferite metode experimentale și computaționale [Pin17, Hig17, Buc17]. Combinarea metodelor experimentale și computaționale de chimie cuantică poate aduce informații noi și utile legate de geometria și structura electronică a APIs. Luând în considerare probleme menționate mai sus, în timpul cercetărilor pentru această teză de doctorat ne-am propus obținerea de informații noi referitoare la structura și proprietățile electronice ale unei serii APIs folosite pentru producerea de medicamente antiepileptice și anticancerigene. Pentru aceasta am corelat rezultate obținute prin folosirea tehnicilor experimentale (Raman, IR, UV-Vis, NMR) și computaționale.

Teza este împărțită în două mari părți. Prima parte include această introducere precum și primele două capitole. În primul capitol am făcut o introducere generală în teoria funcționalei de densitate (DFT).

Cel de-al doilea capitol al tezei prezintă detaliile experimentale și computaționale valabile pentru toți compușii investigați. Detalii particulare referitoare la fiecare compus sunt prezentate în secțiunea corespunzătoare din capitolul dedicat acestuia.

Partea a doua a tezei conține trei capitole, câte unul pentru fiecare API investigat. În capitolul 3 am prezentat rezultatele obținute din analiza conformerilor posibili (în fază gazoasă și lichidă) și a schimbărilor conformaționale la trecerea din faza solidă în cea lichidă a compusului levetiracetam (LEV). Scopul urmărit a fost descrierea structurii 3D și stabilității energetice a conformerilor moleculei, pentru înțelegerea mai bună a farmacodinamicii compusului.

---

În prima fază am urmărit descrierea diferențelor dintre geometria în stare solidă a LEV și structura acestuia în fază lichidă și gazoasă

Spectrele experimentale UV-Vis și RMN ale LEV au fost explicate ținând cont de contribuțiile spectroscopice (ponderate după populațiile Boltzmann) ale monomerilor și dimerilor posibili ai moleculei. Tranzițiile electronice cele mai intense au fost determinate ca fiind de tip transfer intra-molecular de sarcină, de la grupul oxopyrrolidin la grupul amidă pentru monomer și de la grupul butanamidă la unitatea carbonil din inelele oxopyrrolidin în cazul dimerilor [Luc17].

Spectrele RMN  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  ale LEV au fost atribuite pe baza datelor teoretice și rezultatele noastre arată faptul că este evidentă formarea dimerilor la concentrația folosită pentru aceste studii [Luc14].

În plus, pentru acest compus am fost interesați să verificăm potențialul spectroscopiei Raman pentru discriminarea diferitelor formulări ale unui producător de medicamente bazate pe LEV, precum și discriminarea între diferiți producători ale aceleași formulări.

Capitolul 4 prezintă un studiu combinat, experimental și computațional, asupra moleculei diphenylhydantoin (DPH), care este unul dintre componentii activi nesedativi cei mai folosiți pentru tratamentul epilepsiei. În ciuda faptului că acest compus este folosit extensiv ca și API, trăsăturile sale biologice nu sunt încă pe deplin elucidate [Tie08]. Din cauza prezenței grupurilor carbonil și imidă în structura sa, acest compus poate participa foarte ușor la legături de hidrogen inter-moleculare. În consecință, folosind metode de chimie computațională am studiat procesul de dimerizare prin legături de hidrogen al DPH. Mai mult, combinând tehnicile experimentale UV-Vis și RMN cu calcule de chimie cuantică am investigat și efectul acestor interacțiuni asupra tranzițiilor electronice, precum și asupra deplasărilor chimice ale DPH [Luc15].

În capitolul 5 am investigat medicamentul anticancerigen Imatinib (IMT), care este un inhibitor tirozin-kinază (TKI) de primă generație, folosit în principal pentru tratamentul leucemiei cronice mielogene și a tumorilor stromale gastro-intestinale. Acest API acționează selectiv asupra receptorilor de tirozin kinază Abl/factorul de creștere a celulelor stem (c-Kit) și a receptorilor factorului de creștere derivat din plachetele sanguine.

Pentru clarificarea mecanismului său de acțiune este crucială descrierea structurii 3D, precum și a proprietăților moleculare ale conformerilor IMT accesibili la temperatura camerei. Din acest motiv am studiat conformerii posibili ai IMT, precum și ordinea energetică a acestora și am reușit să identificăm 22 de conformeri unici în apă, într-un domeniu de energii relative de  $1.69 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . În continuare am folosit cei mai stabili 9 conformeri, a căror energii relative sunt în domeniul temperaturii camerei, pentru calculul energiilor de tranziție electronică. Aceste date au fost apoi folosite pentru explicarea rezultatelor obținute pe cale experimentală [Vin15].

## Capitolul 1

### METODE DFT FOLOSITE PENTRU CALCULUL STRUCTURII ELECTRONICE A MOLECULELOR

Avantajele metodologiei computaționale bazată pe teoria funcționale de densitate (DFT) se datorează, pe de o parte, acurateții ridicate a rezultatelor furnizate, dar și resurselor computaționale mai scăzute, necesare calculelor efectuate asupra moleculelor cu număr mare de atomi. Datorită impactului deosebit al rezultatelor computaționale în spectroscopie, în ultimii 10 ani a apărut în literatura de specialitate termenul de "spectroscopie computațională".

#### 1.1 Bazele DFT

Versiunea moleculară modernă a DFT a fost dezvoltată de către Hohenberg, Kohn și Sham și se bazează pe cele două teoreme ale lui Hohenberg-Kohn (HK) [Hoh64]. Prima teoremă HK reprezintă așa-numitul "proof of principle", în timp ce cea de a doua furnizează principiul variațional pentru obținerea densității electronice a unui sistem pe baza metodei variaționale. Densitatea electronică determină în mod unic Hamiltonianul sistemului și toate proprietățile acestuia.

În cadrul DFT, expresia energiei este separată în două părți, una care depinde de sistem - energia potențială datorată atracției dintre electroni și nuclee și una universală, a cărei formă este independentă de  $N$ ,  $R_\alpha$  și  $Z_\alpha$ :

$$E_0[\rho_0] = \underbrace{\int \rho_0(\vec{r}) V_{ne} d\vec{r}}_{\text{system dependent}} + \underbrace{T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0]}_{\text{universally valid}} \quad (1.1.7)$$

Ultimii doi termeni formează funcționala Hohenberg-Kohn  $F_{HK}[\rho_0]$ :

$$F_{HK}[\rho] = T[\rho] + E_{ee}[\rho] = \langle \Psi | \hat{T} + \widehat{V}_{ee} | \Psi \rangle \quad (1.1.8)$$

$F_{HK}[\rho]$  conține funcționala pentru energia cinetică  $T[\rho]$  și cea pentru interacțiunea electron-electron,  $E_{ee}[\rho]$ . Determinarea expresiilor explicite pentru funcționalele necunoscute  $T[\rho]$  și  $E_{ee}[\rho]$  reprezintă provocarea majoră în DFT.

Kohn și Sham (KS) au introdus conceptul unui sistem fictiv de electroni liberi pentru care cea mai mare parte a energiei cinetice poate fi calculată cu mare acuratețe [KS65]. Partea rămasă din energia cinetică se include în termenul neclasic  $E_{ncl}$ .

Ideea lui Kohn și Sham a fost de a considera că pentru fiecare sistem de electroni în interacțiune aflat în potențialul extern  $v(r)$  există un sistem corespondent de electroni liber cu potențialul local  $v_S(r)$  astfel încât acest sistem furnizează aceeași densitate

electronică ca și sistemul real. Presupunând că un astfel de potențial există se pot calcula orbitalii Kohn-Sham și densitatea electronică exactă pe baza ecuațiilor:

$$\hat{H}_S = \sum_i \hat{h}_S(i) = \sum_i \left( -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_S(r_i) \right) \quad (1.1.12)$$

$$\hat{h}_S(1)\Phi_i(1) = \varepsilon_i(1)\Phi_i(1) \quad (1.1.13)$$

$$\Psi_S = |\Phi_1(1)\Phi_2(2) \dots \Phi_N(N) \rangle \quad (1.1.14)$$

$$\rho_S(r) = \sum_{i=1}^N \sum_S |\Phi_i(r, s)|^2 = \rho_{exact}(r) \quad (1.1.15)$$

Energia cinetică exactă a sistemului de electroni liberi poate fi obținută folosind orbitalii corespunzătorii sistemului:

$$T_{KS} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \langle \Psi_i | \nabla^2 | \Psi_i \rangle \quad (1.1.17)$$

și în formularea KS, energia cinetică poate fi scrisă sub forma:

$$T[\rho] = T_{KS} + (T - T_{KS}) \quad (1.1.19)$$

unde funcționala  $F[\rho]$  este:

$$F[\rho] = T_{KS}[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad (1.1.20)$$

Așa-numita funcțională de schimb-corelare ( $E_{XC}$ ) conține efectele non-clasice de schimb și corelare, care contribuie la energia potențială a sistemului, dar și o parte care reprezintă corecția la energia cinetică a sistemului.

Metoda generală pentru obținerea energiei stării fundamentale a sistemului poate fi rezumată astfel: întâi se alege o densitate electronică de start, care permite determinarea potențialului efectiv folosind o formă adecvată pentru funcționala de schimb-corelare. Apoi se determină o nouă densitate prin rezolvarea ecuațiilor Kohn-Sham și se compară cu densitatea precedentă. Dacă cele două sunt egale se poate calcula energia stării fundamentale, altfel, procesul iterativ se reia.

Energia electronică în aproximația KS poate fi scrisă sub forma:

$$E = T_S[\rho] + \int v(r)\rho(r)dr + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} drdr' + E_{XC}[\rho] \quad (1.1.24)$$

În implementarea inițială a DFT a fost folosită aproximația densității locale (LDA), dezvoltată pornind de la cazul sistemului omogen de electroni. În continuare a fost dezvoltată corecția gradientului generalizat (GGA), care a dus la o îmbunătățire semnificativă a rezultatelor calculate. Progresul ulterior al DFT a fost adus prin dezvoltarea funcționalelor hibride, care includ o parte a energiei de schimb calculate exact pe baza teoriei HF.

Recent, au fost dezvoltate noi funcționale aproximative, de tip meta-GGA, prin includerea energiei cinetice a electronilor și Laplacian-ul densității electronice.



Funcționalele hibride sunt cel mai des folosite la ora actuală în calcule DFT și dau rezultate teoretice foarte bune în comparație cu funcționalele de tip LDA sau GGA. Acest lucru se datorează faptului că includ o parte din energia de schimb calculată exact la nivel Hartree-Fock, pe baza funcției de undă monodeterminantale. Una dintre cele mai cunoscute și utilizate funcționale de acest tip este funcționala B3LYP – o funcțională cu 3 parametri, care folosește funcționala de corelare LYP [Bec93, Lee88, Vos80, Ste94]:

$$E_{xc}^{B3LYP} = aE_{xc}^{Slater} + (a - 1)E_{xc}^{LDA} + bE_c^B + (1 - c)E_c^{LDA} \quad (1.3.37)$$

unde  $a=0.20$ ;  $b=0.72$  și  $c=0.81$

Succesul funcționalei B3LYP se datorează faptului că această permite obținerea cu acuratețe ridicată a mai multor proprietăți moleculare precum: geometrii, momente de dipol, polarizabilități, spectre IR, Raman, RES, RMN sau UV-Vis, potențiale de ionizare, potențiale electrostatice moleculare, etc.

O altă funcțională hibridă bine-cunoscută, folosită cu succes în particular pentru predicția tranzițiilor electronice în molecule este funcționala PBE0 [Ada99]. În acest caz nu s-au folosit parametri de fit, iar contribuția energiei exacte de schimb este de 25% [Per96, Per97].

De-a lungul timpului au apărut multe articole de tip review legate de DFT, având în vedere mai multe aspecte, incluzând teoria, dezvoltări metodologice și aplicații practice ale DFT pentru probleme specifice [Sou07]. Tipurile esențiale de funcționale de densitate pot fi aranjate pe o scară a acurateții (scara DFT a lui Jacob [Mat02]) și acestea se bazează pe aproximațiile LDA, GGA, meta-GGA, hybrid DF, hybrid-meta GGA și metode complet ne-locale.

## 1.2 Seturi de bază pentru calcule *ab initio* și DFT

Una dintre aproximațiile inerente tuturor metodelor de tip *ab-initio* constă în introducerea unui set de bază, adică a unui set de funcții cunoscute, folosite pentru construirea orbitalilor moleculari. Dacă funcțiile de bază sunt  $\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_N$ , atunci, pe baza acestora, orbitalii moleculari se scriu sub forma:

$$\Phi_i = \sum_{\mu=1}^K c_{\mu i} \varphi_{\mu} \quad (1.2.1)$$

unde  $c_{\mu i}$  sunt coeficienții de expansiune ai orbitalului molecular  $\Phi_i$ .

Astfel, problema găsirii orbitalilor moleculari se reduce la găsirea unui set de coeficienți pentru fiecare orbital.

Două tipuri principale de primitive sunt folosite în mod current în calculele de chimie cuantică. Prima categorie este aceea a orbitalilor de tip Slater (STO), care su forma generală:

$$\varphi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \varphi) = NY_{l,m}(\theta, \varphi)r^{n-1}\exp(-\zeta r) \quad (1.2.2)$$

A doua categorie este bazată pe orbitalii de tip Gauss (GTO), cu forma generală:

$$g_{\alpha,n,l,m,f}(r, \theta, \varphi) = NY_{l,m}(\theta, \varphi)r^{2n-2-l}\exp(-\alpha f^2 r^2) \quad (1.2.3)$$

unde constanta  $\alpha$  determină extensia spațială a primitive și constanta  $f$  este un factor de scalare care ține cont de modificată a primitive centrate pe un anumit atom din moleculă, comparative cu cea corespunzătoare atomului liber.

La ora actuală, marea majoritate a calculelor de structură electronică moleculară folosesc orbitali GTO pentru expandarea orbitalilor moleculari.

Pentru îmbunătățirea rezultatelor computaționale, orbitalii de valență de scriu ca o combinație de două sau mai multe funcții, seturile respective fiind cunoscute sub numele de seturi de bază cu valență dublu, triplu sau cuadruplu despicate.

Seturile de bază extinse includ funcții de polarizare și funcții difuze. Funcțiile de polarizare descriu influența (distorsionarea, polarizarea) asupra densității electronice centrate pe nucleele vecine unui nucleu dat. Pentru a lua acest efect în considerare se folosesc orbitali care au o formă mai flexibilă în moleculă decât orbitalii s, p, d, etc. ai atomilor liberi. În practică, se adaugă un set de funcții Gaussiene de polarizare, de moment cinetic  $> 1$  decât funcțiile corespunzătoare stării fundamentale a atomului respective.

Pentru stări moleculare excitate și anioni, pentru care densitatea electronică este mai extinsă peste întreaga moleculă sunt necesare funcții de bază care să fie și ele mai extinse. Astfel de funcții se numesc funcții difuze și, în mod normal, constau dintr-o singură GTO.

Pentru aplicații practice, cele mai folosite seturi de bază sunt cele cunoscute sub numele de seturi de tip Pople, cu notația general:

$$k-nlm++G(idf,jpd)$$

unde:

$k$  este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor de miez,  $n$  este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor interiori de valență,  $l$  este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor medii de valență,  $m$  este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor externi de

valență; + înseamnă că se adaugă 1 set de funcții difuze de tip P (SP) pe atomii grei, ++ înseamnă că se adaugă 1 set de funcții difuze de tip P (SP) pe atomii grei și o funcție de tip s pe atomii de hydrogen.

idf înseamnă că pe atomii grei se adaugă i seturi de funcții de tip d și un set de funcții de polarizare de tip f.

idf,jpd înseamnă că pe atomii grei se adaugă i seturi de funcții de tip d și un set de funcții de polarizare de tip f, iar pe atomii de hydrogen se adaugă j seturi de funcții de tip p și un set de funcții de tip d ca și funcții de polarizare.

### 1.3 Metodologia ONIOM

Calcululele de chimie cuantică pe sisteme moleculare cu număr mare de atomi sunt extrem de consumatoare de resurse computaționale. Pentru a face fezabile astfel de calcule, au fost propuse metode hibride de către Honig și Karplus [Hon71], dezvoltate ulterior de către Warshel și Karplus [War72], Warshel și Levit [War76] și Morokuma și colaboratorii [Hum96] (vezi ref. [Chu15] pentru un review recent).

La ora actuală, metoda folosită este cunoscută sub numele de metoda ONIOM și constă în faptul că sistemul investigat este partiționat în două sau mai multe straturi, tratate la nivele diferite de teorie. Uzual, sistemul real este descompus în două părți, stratul "low" (cea mai mare parte a sistemului real) și stratul "high" (partea cea mai mică), iar pentru stratul low se folosesc metode rapide de tip MM, în timp ce pentru stratul "high" se folosesc metode de tip QM. Pentru calculul stratului "low" pot fi folosite și metode semiempirice sau de tip *ab initio*.

Dacă se folosesc metode *ab initio* pentru ambele straturi, metodologia de calcul este denumită ONIOM(QM1:QM2). În acest caz, energia extrapolată a sistemului real investigat se obține ca și suma dintre energia sistemului model tratat la nivelul QM1 ( $E_{QM1, model}$ ) și energia sistemului real tratat la nivelul QM2 ( $E_{QM2, real}$ ) minus energia sistemului model calculat la nivelul QM2 ( $E_{QM2, model}$ ):

$$E_{QM1:QM2} = E_{QM1,model} + E_{QM2,real} - E_{QM2,model} \quad (1.3.1)$$

Această metodologie și-a găsit numeroase aplicații, pentru o varietate largă de molecule organice, macromolecule și complecși moleculari.

În această teză am folosit metodologia ONIOM(QM:QM) pentru calculul spectrului Raman al unui cluster de 5 molecule de diphenylhydantoin. La nivel QM complet, un astfel de sistem ar fi necesitat un timp de calcul prohibitiv de lung.

---

## Capitolul 2

### DETALII EXPERIMENTALE ȘI COMPUTAȚIONALE

#### 2.1 Spectrometrul Raman

Măsurătorile Raman au fost efectuate folosind spectrometrul Raman InVia Reflex (Renishaw) de la Centrul de Fizică Biomoleculară Physics, Institutul Ioan Ursu, Universitatea Babeș-Bolyai. Spectrometrul este echipat cu șase linii laser de excitare, acoperind un domeniu spectral în regiunea NUV - NIR: 325, 442, 532, 633, 785 și 830 nm. Alte caracteristici ale echipamentului folosit pot fi găsite la adresa web [www.phys.ubbcluj.ro/raman](http://www.phys.ubbcluj.ro/raman).

#### 2.2 Detalii experimentale generale

Ingredientele farmaceutice active investigate în această teză au fost obținute de la surse comerciale standard și au fost folosite fără purificări ulterioare. Spectrele electronice au fost înregistrate la temperatura camerei, folosind un spectrometru de tip Jasco V-670 UV-Vis-NIR, cu lățimea fantei de 2 nm și o cuvetă de cuarț de 1 cm grosime.

Spectrele FT-IR ale probelor sub formă de pulbere au fost înregistrate la temperatura camerei folosind un spectrometru Equinox 55 FT-IR echipat cu detector InGaAs, cu probele tabletate în pastile de KBr (Merck UVASOL). Rezoluția spectrometrului a fost de  $2\text{ cm}^{-1}$  și în fiecare caz au fost efectuate 40 de scanări. Spectrele FT-Raman au fost înregistrate în geometrie "backscattering", folosind un spectrometru Bruker FRA 106/S cu detector cu Ge răcit cu azot. Laserul de 1064 nm Nd:YAG a fost folosit ca și sursă de excitație în acest caz, iar puterea laserului a fost de 350 mW și spectrele au fost înregistrate cu o rezoluție de  $2\text{ cm}^{-1}$  prin însumarea semnalului provenit de la 200 de scanări.

Spectrele Raman dispersive ale LEV sub formă de pulbere au fost înregistrate la temperatura camerei cu spectrometrul multilaser confocal Renishaw inVia Reflex Raman echipat cu detector CCD de tip RenCam. Pentru excitare au fost folosiți laserii de 325, 532, 633 și 785 nm laser.

Spectrele RMN  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  NMR au fost înregistrate la temperatura camerei cu un spectrometru Bruker AVANCE NMR (400.13 MHz pentru  $^1\text{H}$  și 100.63 MHz pentru  $^{13}\text{C}$ , standard intern TMS, solvent  $\text{D}_2\text{O}$ ). S-a folosit un singur puls de excitare de 11  $\mu\text{s}$  pentru

$^1\text{H}$  și  $7.5 \mu\text{s}$  pentru  $^{13}\text{C}$ . Spectrele RMN [ $1\text{H}$ ,  $1\text{H}$ ] COSY au fost înregistrate folosind secvența standard de pulsuri COSY45 d1 -  $\pi/2$  - d2 -  $\pi/4$ .

### 2.3 Detalii computaționale generale

Optimizarea geometriilor și calculele de frecvență au fost efectuate cu pachetul software Gaussian09 [Gau09] folosind metode DFT. În general a fost folosită funcționala hibridă B3LYP [Bec93, Lee88, Vos80, Ste94], împreună cu seturi de bază de tip Pople: 6-31G(d), 6-31G+(2d,2p) și 6-311+G(2d,p) [Heh72, Fri84]. În unele cazuri, pentru a lua în considerare interacțiunile dispersive, am folosit și funcționala APFD [APFD].

Am folosit criterii implicite pentru analiza convergenței densității electronice și a geometriilor moleculare. În toate cazurile am efectuat calcule de frecvență pe structurile optimizate pentru a confirma faptul că acestea corespund unor minime pe suprafața de energie potențială.

Factorii Boltzmann de ponderare pentru conformeri au fost calculați la temperatura camerei ( $T=298 \text{ K}$ ) folosind energiile libere relative ( $\Delta G$ ). Acestea au fost obținute din calcule de frecvențe de vibrație prin includerea corecțiilor termice la energiile SCF [Duc07, Wil14, Jes15, Hal15].

Spectrele de absorbție au fost calculate folosind formalismul "time-dependent" DFT (TD-DFT) [Cas98]. Benzile de absorbție UV-Vis au fost obținute prin convoluție cu funcții Gaussiene cu lărgimea totală la semi-înălțime (FWHM) dedusă din spectrele experimentale. Natura stărilor excitate a fost analizată folosind formalismul orbitalilor naturali de tranziție (NTO) propus de către Martin [Mar03]. Acest formalism oferă o descriere compactă a excitațiilor electronice, având avantajul că sunt suficiente doar una sau două perechi de orbitali moleculari ocupați/virtuali pentru interpretarea clară a naturii stărilor excitate implicate în procesele de absorbție și emisie [Cla06, Lac12, Vel14, Eti14, Mar15].

Calculul spectrelor RMN au fost efectuate folosind metoda GIAO (Gauge-Including Atomic Orbital) [Dit74, Wol90], implementată în pachetul Gaussian09. Pentru a exprima deplasările chimice din tensorii de ecranare calculați, au fost deduși factori de scalare și de referință prin regresie liniară a datelor, conform studiului publicat de Willoughby și colaboratorii [Wil14].

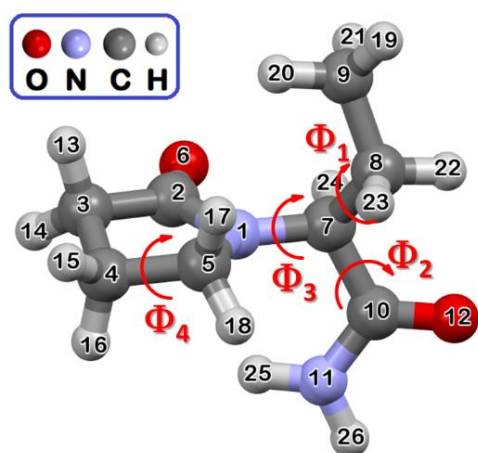
Efectele de solvent au fost considerate folosind modelul implicit de solvatare Polarizable Continuum Model (PCM) [Tom05], varianta (IEFPCM) variant [Sca10].

## Capitolul 3

# PREFERINȚA CONFORMAȚIONALĂ ȘI CARACTERISTICI SPECTROSCOPICE ALE INGREDIENTULUI FARMACEUTIC ACTIV LEVETIRACETAM

### 3.1 Introducere

LEV este un medicament nootropic de a doua generație folosit pentru tratamentul pacienților cu epilepsie [Geo14, Gua02, Kha90, Ull09] și al altor boli [Far09]. Proprietățile sale farmacocinetice, împreună cu structura sa chimică distinctă și mecanismul de acțiune fac ca LEV să fie unic între medicamentele antiepileptice existente pe piață [Ull09, Pit05, Son11, Kli16].



**Fig. 3.1** Structura moleculară a celui mai stabil conformer LEV în apă (5) obținută la nivelul de teorie PCM-B3LYP/6-31+G(2d,2p).

Pentru o înțelegere mai bună a farmacodinamicii LEV, caracterizarea sa structurală în fază lichidă și solidă este crucială. Anterior a fost arătat că forma polimorfică I a LEV este caracterizată de o rețea extinsă de interacțiuni de tip H-bonding (HB) [Son03]. Pentru acest motiv, este necesar un model potrivit care să includă astfel de interacțiuni, pentru o atribuire corectă a spectrelor LEV în stare solidă.

Pe lângă analiza spațiului conformațional și a proprietățile spectroscopice ale LEV, în acest studiu am investigat și posibilitatea de a discrimina între diferite formulări brand sau generice ale medicamentelor bazate pe compusul LEV.

### 3.2 Detalii experimentale și computaționale

Spectrele Raman dispersive ale LEV sub formă de pulbere au fost înregistrate la temperatura camerei folosind spectrometrul Raman Renishaw inVia Reflex și utilizând 4 linii laser de excitare. Pentru a verifica posibilitatea discriminării între diferite formulări ale LEV prin spectroscopie Raman am folosit medicamentul brand Keppra™ (1000 mg tabletă, soluție orală – 100 mg/ml și soluție injectabilă – 100 mg/ml), soluția orală (100 mg/ml) Actavis, precum și tablete produse de către firmele Actavis,

Aurobindo și Terapia. Toate probele au fost obținute din surse comerciale de pe piața liberă.

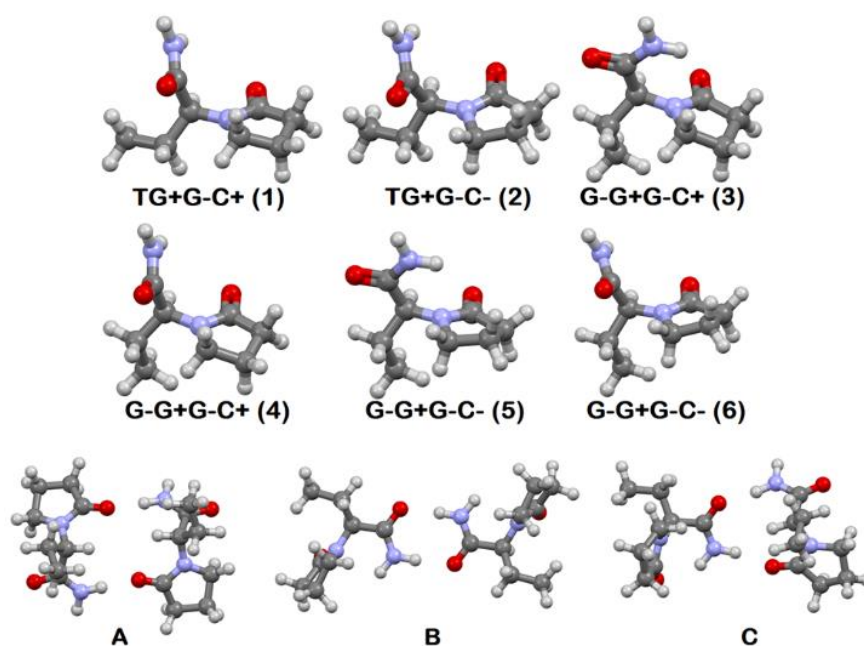
Spațiul conformațional al LEV în gaz fost explorat folosind câmpul de forțe de mecanică moleculară MMFF94 și calcule de chimie cuantică cu formalismul DFT.

Spectrele de absorbție ale LEV au fost calculate atât pentru speciile monomere cât și dimere la nivelul de teorie B3LYP/6-31G+(2d,2p). Pentru descrierea tranzițiilor electronice au fost utilizați orbitalii naturali de tranziție (NTO) [Mar03].

Spectrele vibraționale ale LEV înregistrate pe probe sub formă de pulbere au fost atribuite folosind date calculate pentru monomer dar și pe un model de cluster de 5 molecule, capabil să includă cele mai importante interacțiuni de tip HB.

### 3.3 Spațiul conformațional al moleculei Levetiracetam

Primul nostru scop a fost să descriem diferența dintre geometriile cunoscute în fază solidă ale LEV [Her13, Son03] și structurile sale în fază lichidă și gazoasă. Au fost



**Fig. 3.3** Structurile optimizate la nivel B3LYP/6-31+G(2d,2p) pentru monomerii și dimerii LEV în apă: șase cei mai stabili monomeri ((1)-(6)) și trei tipuri de dimeri (A, B, C). (reprodusă din ref. [Luc17])

identificați 22 de conformeri, iar energiile relative Gibbs ale acestora și statistica Boltzmann au fost folosite pentru a prezice populațiile de echilibru la temperatura camerei. Unghiurile diedre  $\Phi_1 - \Phi_4$  (vezi Fig. 3.1) care caracterizează cei 6 cei mai stabili



conformerii arătați în Fig. 3.3 sunt date în Tabelul 3.1. Conformerii **(1)** - **(6)** sunt dominanți, cu o populație Boltzman totală de 85.8% în gaz și 89.5% în apă.

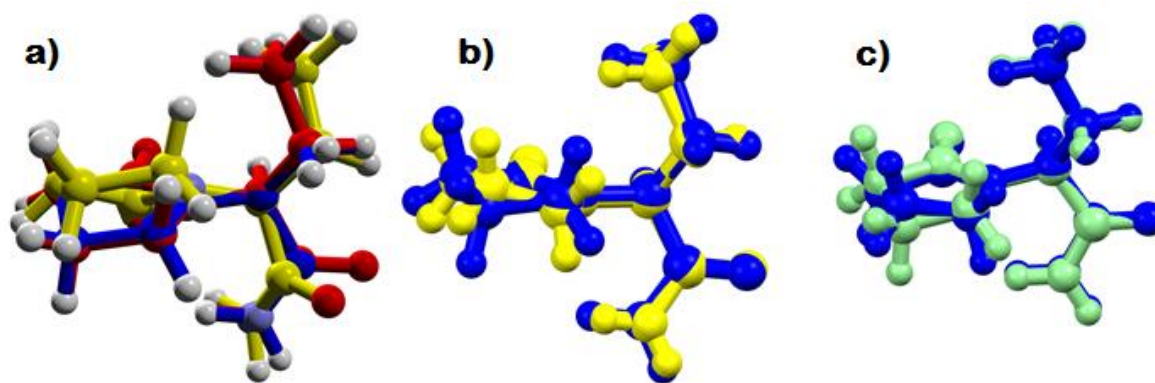
**Tabelul 3.1** Unghiurile diedre calculate la nivel B3LYP/6-31+G(2d,2p) pentru conformerii LEV în gaz, apă și etanol (prima, a doua și a treia intrare). Pentru comparație sunt incluse datele experimentale pentru structurile cunoscute ale LEV în stare solidă

Conformer	$\Phi_1$	$\Phi_2$	$\Phi_3$	$\Phi_4$	Corespondența cu ref. [Li11]
<b>TG+G-C+ (1)</b>	-167.1	79.2	-45.6	26.6	Ib
	-170.9	103.6	-57.3	25.9	
	-170.3	100.6	-56.0	26.0	
<b>TG+G-C- (2)</b>	-168.9	79.1	-36.0	-21.8	IIb
	-172.3	104.9	-50.3	-25.5	
	-172.7	105.4	-50.8	-26.2	
<b>G-G+G-C+ (3)</b>	-61.3	77.5	-47.7	27.0	negăsit
	-59.0	22.3	-55.7	22.2	
	-59.0	23.5	-56.3	22.3	
<b>G-G+G-C+ (4)</b>	-61.4	77.5	-47.6	27.0	Ia
	-59.5	107.2	-56.0	26.2	
	-59.9	91.6	-55.2	25.7	
<b>G-G+G-C- (5)</b>	-65.2	77.0	-40.9	-20.5	IIe
	-62.0	18.7	-50.9	-26.7	
	-62.0	19.4	-51.3	-26.9	
<b>G-G+G-C- (6)</b>	-65.2	77.0	-40.8	-20.6	IIc
	-63.0	115.0	-49.0	-25.6	
	-63.4	111.1	-50.0	-25.7	
Date experimentale					
LEV [Son03]	-54.46	13.65	-58.23	12.92	indisponibil
Etiracetam FI [Her13]	-58.15	33.81	-62.47	-25.13	indisponibil
Etiracetam FII [Her13]	-56.06	39.22	-65.54	-13.95	indisponibil
Etiracetam Hydrate [Her13]	-57.15	20.47	-53.78	-21.54	indisponibil

Merită menționat faptul că cel mai stabil conformer în apă **(5)** este identic cu cel rezultat prin optimizarea formei hidrate a LEV [Her13], în timp ce al de-al doilea cel mai stabil conformer **(3)** este identic cu cel obținut prin optimizarea structurii LEV obținută experimental prin difracție de raze X [Son03]. Dacă se folosesc ca și structuri de start conformațiile corespunzătoare celor două forme polimorfice ale LEV, în apă, ambele converg, prin optimizare, la conformerul **(5)**.

Față de studiul lui Li și Si [Li11], singurul acord este observat pentru conformerul **(1)** care a fost identificat și în studiul nostru ca fiind cel mai stabil în gaz. În schimb, pentru structurile solvate în apă, Li și Si au găsit conformerul lor **Ia** ca fiind cel mai stabil, în timp ce conformerul nostru similar **(4)** este destabilizat cu 0.55 kcal mol<sup>-1</sup> față de cel mai stabil conformer **(5)** identificat în studiul de față.





**Fig. 3.5** **a)** Structurile moleculare optimizate la nivel B3LYP/6-31+G(2d,2p) pentru conformerul (5) al LEV în gaz (galben), apă (albastru) și etanol (roșu). **b)** Comparatie între geometriile de raze X ale LEV (galben) și conformerul (5) în apă (albastru). **c)** Structurile suprapuse ale conformerilor (3) (albastru) și (5) (verde deschis) în apă. (reprodusă din ref. [Luc17])

Spațiul conformațional al LEV în gaz este destul de diferit față de cele determinate în soluții de apă și etanol. Pentru un conformer particular, unghiul diedru  $\Phi_4$  care definește conformația "chair" sau "boat" a inelului oxopyrrolidin se modifică apreciabil între faza gazoasă și cea lichidă numai pentru conformerii (2), (3), (5), (6) și (11). Probabil, efectele de împachetare a cristalului sunt mai puternice decât interacțiunile HB intramoleculare în stare solidă. Acest lucru se poate întâmpla deoarece pentru LEV, atât grupul amino cât și grupul carbonil preferă formarea de legături HB intermoleculare cu moleculele vecine în stare solidă.

Merită menționat de asemenea că structurile celui mai stabil conformer (5) în apă și etanol sunt aproape identice geometriei LEV în fază solidă, atât în ceea ce privește conformația cât și parametrii geometrici (vezi Fig. 3.5 a) și b)) [Son03]. Cel mai probabil, acest fapt explică profilurile farmacocinetice similare pentru formulările lichidă și solidă ale LEV observate de Coupez *et al.* [Cou03]. Mai mult, conform datelor prezentate în Tabelul 3.1, cei doi conformeri cei mai stabili în apă, (5) și (3), sunt aproape identici, cea mai mare diferență între aceștia fiind observată în conformația inelului oxopyrrolidin (vezi Fig.3.5 c).

Pentru LEV au fost raportate până acum 4 forme polimorfice [Par04, Tha09, Xu14]. Folosind datele de difracție de raze X din măsurători pe monocristal ale lui Song *et al.* [Son03] și utilizând programul ReX [Bor09] noi am calculat difractograma de raze X pe pulbere, care este în acord excelent cu cea corespunzătoare formei polimorfice IV [Tha09], precum și cu cea raportată de către Xu *et al.* [Xu14]. Acest rezultat confirmă

faptul că aceste forme polimorfice determinate experimental sunt identice și că forma IV este determinată de conformerul (3).

Pentru a investiga posibila clusterizare a moleculelor LEV, am testat, prin metode computaționale, posibilitatea dimerizării enantiomerilor S (atât cei ne-hidrați cât și cei hidrați). Am demonstrat că dimerii de tip A se formează ca rezultat a două legături de hidrogen de același tip (H26N11...O6'), adică prin grupul amidă de la un monomer și oxigenul grupului pyrrolidin de la cel de-al doilea monomer. Dimerii de tip B se formează prin două legături de hidrogen de tip amidă-amidă (O12...H25'N11'), în timp ce dimerii de tip C apar ca rezultat a două legături de hidrogen diferite amidă-amidă și amidă-pyrrolidin (O6...H25'N11' and O12'...H26N11).

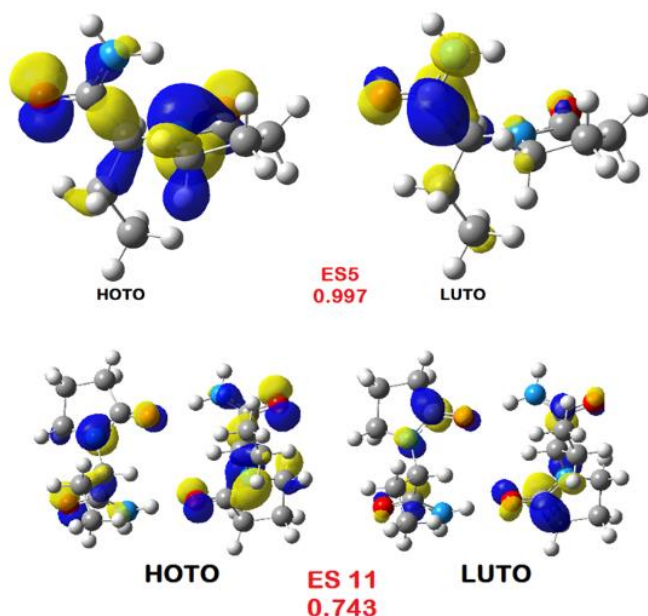
Energiile libere relative și populațiile Boltzmann ale celor 11 dimeri investigați în apă sunt date în Tabelul 3.6. Interesant, cel mai stabil dimer homo-chiral ne-hidrat este cel de conformație A, compus din monomeri de conformație (1), chiar dacă acest monomer nu este cel mai stabil în apă ci în fază gazoasă. Următorii cei mai stabili dimeri homochirali, cu populații Boltzmann relative mai mari de 10% sunt: doi dimeri de tip C compuși din monomerul (5) respectiv (3), și un dimer de tip B compus din monomeri (5). De asemenea, merită menționat faptul că dimerii homo-chirali ne-hidrați sunt cu cel puțin 0.36 kcal·mol<sup>-1</sup> mai puțin stabili decât dimerii hetero-chirali. Această diferență crește la 4.76 kcal mol<sup>-1</sup> în cazul dimerilor hidrați.

**Tabelul 3.6.** Energiile libere relative și populațiile Boltzmann ale dimerilor investigați în apă la temperatura camerei, calculate la nivelul de teorie B3LYP/6-31+G(2d,2p).

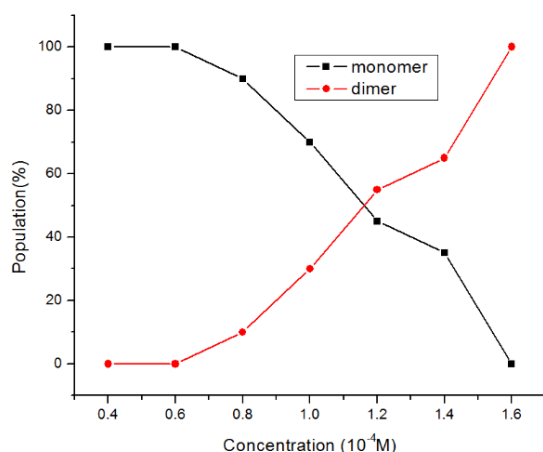
	$\Delta G(\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1})^*$	Populații Boltzmann relative (%)
<i>Dimeri SS non-hidrați</i>		
A_m1_SS	0.00	25.38
A_m3_SS	1.43	2.28
A_m5_SS	0.88	5.72
B_m1_SS	0.87	5.88
B_m3_SS	1.07	4.18
B_m5_SS	0.51	10.77
C_m1_SS	0.61	9.03
C_m3_SS	0.41	12.68
C_m5_SS	0.03	24.09
<i>Dimeri SS hidrați</i>		
SS c1	0.07	47.14
SS c2	0.00	52.86

După cum se observă în Tabelul 3.6, cele două conformații ale dimerilor SS homo-chirali sunt separate energetic prin doar  $0.07 \text{ kcal mol}^{-1}$ , configurația **c2** fiind cea mai stabilă. Astfel, conform datelor computaționale, dimerizarea homo-chirală este posibilă într-un ansamblu lichid enantiomeric pur de monomeri, dar în amestecuri racemice este evidentă preferința pentru dimerizare hetero-chirală.

### 3.4 Spectrele UV-Vis ale moleculei Levetiracetam



**Fig. 3.8** Orbitali HOTO și LUTO ai LEV implicați în tranzițiile electronice cu intensitate apreciabilă pentru starea excitată 5 a monomerului LEV (sus) și starea excitată 11 a dimerului SS de tip  $A_{m1}$  (jos) în apă, calculați la nivelul B3LYP/6-31+G(2d,2p), precum și coeficienții corespunzători.



**Fig. 3.9** Evoluția estimată a populațiilor monomerilor și dimerilor LEV în funcție de concentrație, în apă (reprodusă din ref. [Luc17])

Este observată o deplasare spre roșu a peak-ului de absorbție, de la 191 nm la 195 nm, ca urare a creșterii concentrației în intervalul  $0.4 \text{ M} \div 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . Spectrele UV-Vis simulate au fost obținute pentru amestecuri de monomeri și dimeri. Energiile relative Gibbs ( $\Delta G$ ) și populațiile Boltzmann sugerează contribuția predominantă la spectrele UV-Vis provenită de la cei 6 cei mai stabili monomeri **(1)-(6)**, care contribuie cu mai mult de 89% la populația totală.

Conform datelor calculate, pentru concentrații mai mici de  $0.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , este presupus că în soluție există doar monomeri. Pentru concentrații în intervalul  $0.8 \div 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , fracția de

monomeri descrește în detrimentul creșterii populației dimerilor, trecând de la 89% monomeri în soluție la concentrație de  $0.8 \cdot 10^{-4}$  M prin valori intermediare de 69%, 40%, 35% până la 0% la  $1.6 \cdot 10^{-4}$  M. La maximum concentrației de  $1.6 \cdot 10^{-4}$  M, în soluție există doar dimeri, iar peak-ul de absorbție este situat la 195 nm.

Fig. 3.8 arată orbitalii NTOs pentru tranzițiile electronice principale ale celui mai stabil monomer (5) și dimer (A\_m1 SS) a lui LEV în apă. După cum se observă, cea mai intensă tranziție pentru monomer poate fi atribuită unui transfer de sarcină intra-molecular între grupurile oxopyrrolidin și amidă. Forma NTOs corespunzătoare celei mai intense tranziții electronice pentru dimer sugerează un transfer de la grupul butanamidă la grupul carbonil din inelul oxopyrrolidin, pentru ambii monomeri constituenți.

### 3.5 Analiza RMN a moleculei Levetiracetam în apă

Deplasările chimice experimentale și teoretice ale LEV (spectrele  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  RMN) sunt prezentate în Tabelul 3.9 [Luc14]. Pentru calculul deplasărilor chimice au fost luați în considerare primii 6 cei mai stabili monomeri în apă, constituind 89.5 % din populația totală. Pe lângă aceștia, am considerat și 4 cei mai stabili dimeri homo-chirali ne-hidrați (A\_m1, C\_m3, B\_m5 și C\_m1 a căror populație Boltzmann relativă este 72.44 %), precum și cei doi dimeri SS c1 și c2.

**Table 3.9** Deplasări chimice experimentale și calculate (în ppm) pentru Levetiracetam în  $\text{D}_2\text{O}$ . Datele teoretice corespund celor 6 cei mai stabili monomeri în apă, 4 cei mai stabili dimeri ne-hidrați homochirali în apă și cei doi dimeri SS hidrați în apă.

Nucleu	Date experimentale	Monomeri în apă	Dimeri ne-hidrați în apă	Dimeri hidrați în apă
C2	178.53	178.81	178.47	178.95
C10	174.27	173.89	174.16	173.28
C7	55.91	56.24	55.81	56.73
C5	44.04	43.46	44.39	44.81
C3	30.40	30.86	30.72	29.58
C8	20.89	21.30	21.73	20.54
C4	17.13	17.70	17.76	17.10
C9	9.43	8.33	7.57	6.97
H26	7.61, s	7.34	8.04	6.79
H25	7.10, s	6.75	6.60	7.40
H24	4.49, 1H, dd	5.40	4.64	5.08
H17, H18	3.49, 2H, t	3.82	3.47	3.91
H13, H14	2.48, 2H, t	2.48	2.38	2.39
H15, H16	2.08, 2H, quin	1.97	2.04	2.06

H23	1.90, 1H, m	2.15	2.11	1.45
H22	1.72, 1H, m	1.40	1.58	2.00
H19-H21	0.86, 3H, t	0.42	0.97	0.36

Cele mai mari discrepante între datele experimentale și cele calculate (ponderate după populația Boltzmann) pentru speciile monomere sunt observate pentru nucleele C9 și H19-21 din lanțul etil, precum și pentru protonul H24. După cum se observă în Tabelul 3.9, modelul dimerilor ne-hidrați îmbunătățește semnificativ acordul dintre experiment și teorie pentru aproape toate nucleele. Pe de altă parte, dimerii hidrați furnizează rezultate teoretice mai puțin satisfăcătoare comparativ cu dimerii ne-hidrați sau cu monomerii. Erorile în acest caz sunt de 0.83 și 0.36 ppm pentru nucleele  $^{13}\text{C}$ , respectiv  $^1\text{H}$ .

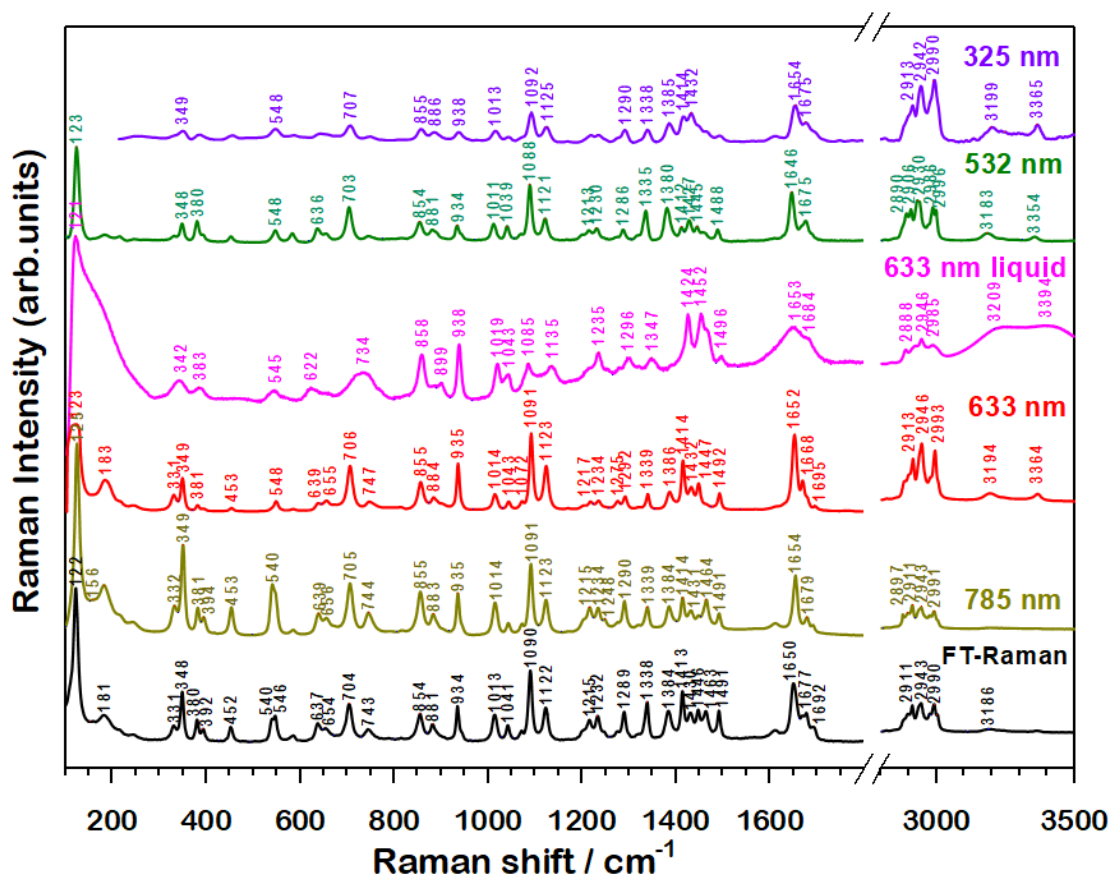
Spectrul RMN 1D conține peak-uri sub formă de triplet corespunzătoare perechilor H13-14 și H17-18, datorate cuplajului vicinal  $^3\text{J}$  cu protonii H15-16, în timp ce peak-ul corespunzător ultimei perechi este un quintet datorat cuplajului aproape echivalent cu cei patru protoni din unitățile de metilen vecine.

În spectrul 2D COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  RMN, cele mai intense peak-uri ne-diagonale sunt atribuite corelării dintre perechea de protoni (H22, H23), urmat de perechile de protoni cu cuplaje  $^3\text{J}$ : (H13-14, H15-16), (H15-16, H17-18), (H22-H19-21) și (H23-H19-21). Așadar, pe baza acestor rezultate putem concluziona că spectrul RMN al LEV în apă, la concentrația de lucru ( $5 \cdot 10^{-2}$  M) poate fi atribuit cu siguranță pe baza modelului de dimeri. Aceste date RMN se corelează calitativ cu datele UV-Vis care, de asemenea, conduc la concluzia că structurile dimere sunt dominante la concentrații mai mari de  $1.5 \cdot 10^{-4}$  M. În plus, rezultatele noastre indică faptul că dimerizarea directă a monomerilor LEV este preferabilă formării de dimeri hidrați în care monomerii sunt interconectați prin intermediul moleculelor de apă.

### 3.6 Vibrational features of Levetiracetam

#### 3.6.1 Vibrational spectra of the pure Levetiracetam pharmaceutical ingredient

Spectrele Raman experimentale ale LEV sunt prezentate în Fig. 3.12. Atribuirea modurilor normale de vibrație a fost făcută prin compararea directă a spectrelor experimentale cu cele calculate, considerând atât poziția peak-urilor cât și intensitatea acestora și pe baza comparației cu spectrele vibraționale a unor compuși asemănători, precum piracetamul [Kha90, Kse10], butiramida [Lin91] sau pirolidina [Gog01]. Pentru modelarea corespunzătoare a interacțiunilor HB intermoleculare pentru LEV în stare



**Fig. 3.12.** Spectrele Raman FT- și dispersive ale LEV sub formă de pulbere. Spectrul Raman al LEV în soluție apoasă (concentrație: 1 M) este inclus pentru comparație.

solidă, am construit un cluster format din 5 molecule LEV, în care molecula internă a fost complet optimizată, iar celelalte 4 molecule LEV din jurul ei fixate.

După cum se observă în Fig. 3.12, Spectrele Raman ale LEV sunt dominate de peak-uri foarte intense la cca.  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , datorate vibrațiilor amidă I, aceste benzi fiind cele mai intense și în spectrul FT-IR. Alte benzi Raman caracteristice sunt observate în jurul valorilor de  $1414$ ,  $1123$ ,  $1091$ ,  $935$ ,  $855$ ,  $706$ ,  $348$  și  $123 \text{ cm}^{-1}$  în spectrul excitat cu laserul de  $633 \text{ nm}$ . Există discrepanțe semnificative între datele noastre (atât cele experimentale cât și cele teoretice) și cele raportate în ref. [Ren14]. Cel mai probabil, discrepanțele dintre datele experimentale sunt datorate diferenței dintre puritățile probelor folosite, iar dezacordul datelor teoretice poate fi datorat faptului că autorii menționați nu au folosit pentru analiza vibrațională conformerul LEV de cea mai joasă energie.

Aproape toate benzile vibraționale ale LEV au fost re-atribuite în studiul de față, bazându-ne pe compararea datelor IR și Raman, luând în considerare și intensitățile



relative din spectrele experimentale și cele calculate. În plus, comparația spectrelor pentru probele în stare solidă și lichidă a ajutat în mod decisiv la atribuirea corectă a modurilor normale corespunzătoare diferitelor grupuri funcționale ale LEV.

Comparând spectrele probei lichide și a celei solide se observă diferențe importante între cele două faze. Pentru faza lichidă, putem concluziona implicarea grupului amidă în interacțiuni HB intermoleculare cu moleculele de apă. Pe de altă parte, există evidențe clare care sugerează că grupurile oxopyrrolidin și ethyl nu sunt afectate de aceste interacțiuni.

Datele experimentale sunt reproduse teoretic foarte bine pe baza modelului de cluster care ia în considerare interacțiunile HB intermoleculare, interacțiuni ce sunt așteptate să influențeze semnificativ vibrațiile grupurilor funcționale implicate. Pentru întregul spectru Raman, modelul cluster furnizează o valoare RMSD semnificativ mai bună decât modelul de monomer, ( $23.6 \text{ cm}^{-1}$  față de  $33.2 \text{ cm}^{-1}$ ). Dacă se exclud cele două vibrații de stretching ale grupului  $\text{NH}_2$ , valoare RMSD scade la  $10.6 \text{ cm}^{-1}$  pentru monomer, respectiv la  $10.3 \text{ cm}^{-1}$  în cazul modelului cluster.

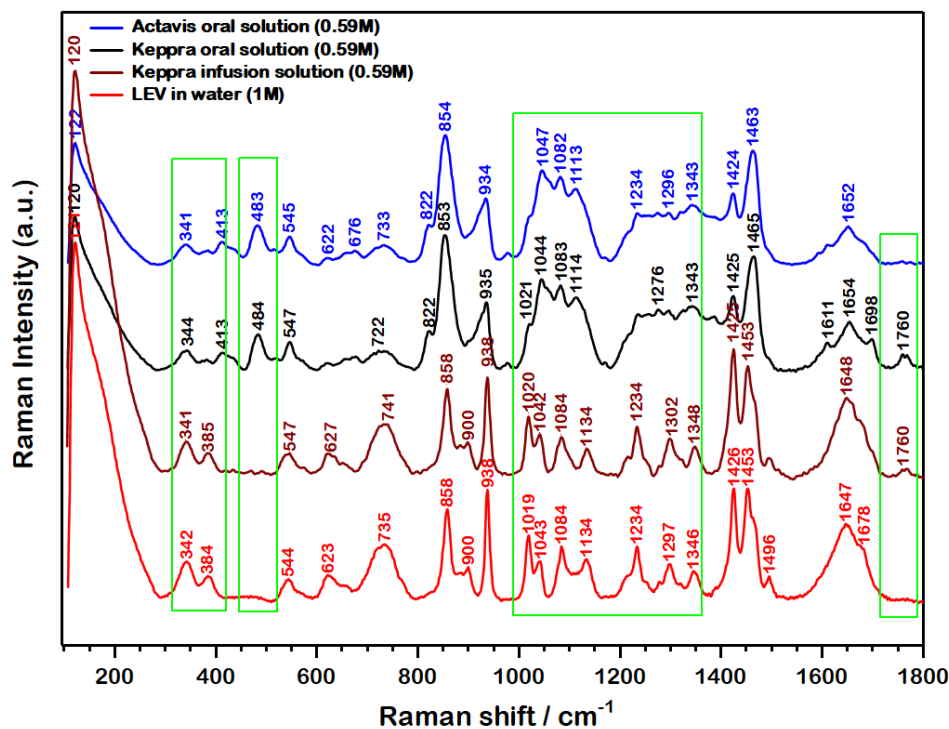
Incheiem această secțiune subliniind necesitatea unui model corespunzător pentru calculul spectrelor vibraționale atunci când se dorește simularea spectrelor vibraționale pentru probe în diferite stări. Modelul trebuie adaptat astfel încât să ia în considerare cele mai importante interacțiuni, într-o manieră rezonabilă.

Validitatea atribuirii modurilor normale ale moleculei LEV este susținută nu numai de acordul dintre numerele de undă calculate și cele experimentale ci și acordul rezonabil între intensitățile relative ale benzilor de vibrație experimentale și calculate.

### **3.6.2 Spectrele Raman ale medicamentelor Levetiracetamului**

Pentru testarea posibilității discriminării între diferite formulări ale LEV prin spectroscopie Raman am folosit medicamentul Keppra™ sub formă de tabletă de 1000 mg, Keppra™ soluție orală- 100 mg/ml și soluție pentru injecție – 100 mg/ml, precum și medicamentele Actavis sub formă de soluție orală (100 mg/ml), respectiv tabletă de 1000 mg. Spectrele Raman pentru probele lichide sunt prezentate în Fig. 3.15.

În primul rând se observă un grad mare de similitudine între soluția apoasă a LEV și formularea injectabilă Keppra™. Deși foarte similare în general, totuși pentru formulările orale Keppra™ și Actavis) există, o diferență clară care constă în dubletul observat la  $1768/1760 \text{ cm}^{-1}$  numai pentru medicamentul Keppra™.



**Fig. 3.15** Spectrele Raman ale medicamentelor LEV investigate (excitare: 633 nm). De jos în sus: LEV în apă (1M); soluția injectabilă Keppra™ (0.59M); soluția orală Keppra™ (0.59M); soluția orală Actavis (0.59M)

Un astfel de dublet nu este observat nici pentru proba LEV sub formă de pulbere nici pentru soluția apoasă a compusului LEV pur, dar poate fi observat ca un semnal foarte slab pentru soluția Keppra injectabilă. Datele noastre teoretice efectuate pe excipienții folosiți pentru cele două formulări arată că aceste benzi pot fi atribuite acidului citric monohidrat pentru care a fost calculat un dublet de benzi intense la 1765 și 1740  $\text{cm}^{-1}$ , corespunzătoare vibrațiilor de stretching simetric și antisimetric ale grupurilor C=O. În plus, peak-urile observate la 1611 și 1698  $\text{cm}^{-1}$  în spectrul Raman al soluțiilor orale, observate mai clar în spectrul medicamentului Keppra™, sunt atribuite excipientului methyl-paraben pentru care au fost calculate două benzi Raman foarte intense corespunzătoare vibrațiilor  $\nu(\text{C}=\text{O})$  la 1680  $\text{cm}^{-1}$  și  $\nu(\text{C}=\text{C})$  la 1588  $\text{cm}^{-1}$ , în excelent acord cu datele experimentale.

Comparând formulările orale Keppra™ și Actavis cu formularea Keppra™ injectabilă observăm diferențe care, cel mai probabil, sunt datorate excipienților folosiți pentru cele două formulări. Considerând atribuirea modurilor normale de vibrație, toate diferențele observate sugerează faptul că grupul oxopyrrolidin este afectat în mod diferit în cazul celor două formulări investigate ale LEV.



Spectrul Raman pentru tableta Keppra™ a fost înregistrat focalizând fasciculul laser pe suprafața tabletei și în interiorul acesteia. Benzile Raman observate în cazul învelișului tabletei sunt caracteristice fazei anatase a  $\text{TiO}_2$  (395, 514 și 638  $\text{cm}^{-1}$ ) [Ohs80, Bal82] și compusului polyethylene glycol 3350 (1480, 1442, 1278, 1231, 1141, 1125, 859 and 843  $\text{cm}^{-1}$ ) [Vei09, Ict15]. Pe de altă parte, spectrele Raman colectate în puncte diferite din interiorul tabletei sunt foarte similare între ele și de asemenea cu spectrul compusului LEV pur. Din comparația acestor spectre se poate concluziona că nu există nici un fel de interacțiune între API LEV și excipienții folosiți pentru formularea solidă a medicamentului.

Spectrele Raman înregistrate în interiorul tabletelor provenite de la diferiți producători nu arată diferențe semnificative în cazul folosirii aceleași cantități de substanță activă. Pe de altă parte, spectrul Raman al tabletei Actavis de 500 mg prezintă un semnal intens de fluorescență. De asemenea, spectrul tabletei Aurobindo prezintă un peak Raman slab la 476  $\text{cm}^{-1}$ , semnal care nu este observat nici în spectrul compusului LEV pur, nici în cazul tabletelor Keppra™ sau Actavis.

După cunoștințele noastre, spectrul Raman de frecvență joasă al LEV nu a fost raportat în literatură până acum. Conform rezultatelor noastre, 5 benzi distincte pot fi observate în acest spectru la 32, 64, 75 și 97  $\text{cm}^{-1}$ . Astfel de benzi sunt atribuite de obicei vibrațiilor intermoleculare sau vibrațiilor de rețea [Kin11, Hed13] și sunt extrem de utile pentru a distinge între diferite forme polimorfice ale medicamentelor [Dat04]. Chiar dacă atribuirea acestor benzi nu face scopul studiul nostru, spectrul de frecvență joasă pentru LEV ar putea fi folosit ca și referință a API LEV în formulări solide ca și amprentă unică pentru discriminarea între polimorfi diferiți sau pentru controlul cristalinității farmaceuticelor bazate pe LEV și controlul transformării în timpul procesării medicamentelor.

### 3.7 Concluzii

Au fost identificați 22 de conformeri ai LEV, iar 6 cei mai stabili dau o populație Boltzmann de 89.5%. Cel mai stabil conformer este identic cu cel rezultat prin optimizarea formei hidrate a LEV, iar următorul în ordinea stabilității este identic cu cel obținut prin optimizarea structurii LEV obținute prin difracție de raze X. Geometriile celor doi conformeri sunt similare și foarte apropiate de geometria de raze X. Cel mai

---

probabil acest lucru explică profilul farmacocinetic similar al formulărilor lichide și solide ale LEV.

Pentru dimerii hidrați au fost identificate două conformații diferite separate prin energia liberă Gibbs de  $0.07 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , iar rezultatele computaționale precum și datele RMN sugerează faptul că dimerizarea directă a monomerilor LEV este preferabilă formării dimerilor hidrați.

Cele mai intense excitații electronice sunt dominate de tranziții de transfer intramolecular de sarcină, de la grupul oxopyrrolidin la grupul amidă în cazul monomerului și de la grupurile butanamidă la unitățile carbonyl ale inelului oxopyrrolidin, în cazul dimerilor.

Modelul dimerilor ne-hidrați îmbunătățește semnificativ acordul dintre datele RMN experimentale și cele teoretice.

Comparativ cu investigațiile precedente referitoare la vibrațiile moleculei LEV, cele mai multe dintre benzile Raman au fost re-atribuite în acest studiu pe baza calculelor DFT efectuate pe model de monomer și cluster. Conform rezultatelor noastre teoretice, cele mai afectate benzi la trecerea din faza solidă în cea lichidă sunt cele asociate cu vibrațiile grupului amidă, confirmându-se implicarea acestui grup în interacțiuni intermoleculare și în fază lichidă, la fel ca în cea solidă.

Folosind spectroscopia Raman am reușit să distingem între formulări farmaceutice diferite ale aceluși producător dar și între aceeași formulare de la producători diferiți de medicamente având LEV ca și substanță activă. Datele noastre sugerează că grupul oxopyrrolidin este afectat diferit în cazul celor două formulări lichide ale medicamentului Keppra™.

Urmărind atât faza lichidă cât și cea solidă a LEV, rezultatele noastre pot fi utile pentru o înțelegere mai bună a transformărilor structurale ale moleculei LEV între cele două stări și a transformării polimorfice a etiracetamului mediată de către solvent. În plus, am demonstrat că acel conformer obținut prin optimizarea structurii hidrate este cel mai stabil în apă și acest rezultat poate fi util pentru căutarea unei forme hidrate a compusului enantiomeric S pur.

Furnizând trăsături spectroscopice detaliate pentru medicamente brand și generice sub diferite formulări, rezultatele noastre pot fi de asemenea utile în analiza Raman a falsificării medicamentelor bazate pe compusul LEV.

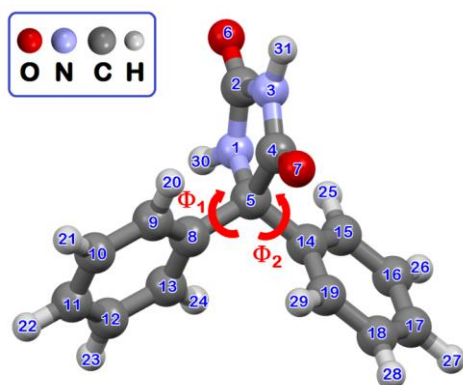
## Capitolul 4

# STRUCTURA MOLECULARĂ ȘI TRĂSĂTURILE VIBRAȚIONALE ALE MOLECULEI DIFENILHIDANTOIN

### 4.1 Introducere

Difenilhidantoinul (DPH) este unul dintre cele mai vechi medicamente antiepileptice [Cam71, Huq07] indicat pentru tratamentul epilepsiei [Cha78]. Acesta acționează prin reducerea neurotransmisiei excitatorii și potențarea inhibiției mediate de acidul  $\gamma$ -aminobutyric. Totuși, în ciuda faptului că este folosit extensiv ca și API pentru medicamente antiepileptice, trăsăturile sale biologice nu sunt încă pe deplin elucidate [Tie08].

Ca și în cazul altor medicamente anticonvulsante, distanța dintre centrele celor două inele fenil și oxigenul grupului carbonil este importantă, deoarece ambele grupuri



**Fig. 4.1** Structura optimizată la nivel B3LYP/6-31+G(2d,2p) a celui mai stabil conformer al DPH în fază gazoasă

sunt presupuse că se leagă la site-ul receptorului [Mar06]. Modificarea

grupurilor responsabile pentru legăturile HB poate descrește sau chiar stopa activitatea anticonvulsantă [Pou84, Cor85]. Interesul deosebit asupra proprietăților compusului DPH ne-a impulsionat să studiem procesul său de dimerizare prin legături de hidrogen.

Astfel, în acest studiu prezentăm o analiza detaliată a conformației speciilor dimere ale

DPH, pe baza adistribuției Boltzmann. În plus, combinând tehnicile experimentale UV-Vis și RMN cu metode computaționale de mecanică cuantică am investigat efectul acestor interacțiuni asupra tranzițiilor electronice și al spectrelor RMN ale compusului. În ultima parte a acestui studiu am investigat trăsăturile vibraționale ale DPH.

### 4.2 Detalii experimentale și computaționale

Spectrele de absorbție optică ale DPH în ethanol au fost înregistrate la temperatura camerei, folosind un spectrometru Jasco V-670 UV-Vis-NIR cu lărgimea fantei de 2 nm. Spectrele  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  RMN au fost înregistrate la temperatura camerei folosind un spectrometru Bruker AVANCE NMR (400.13 MHz pentru  $^1\text{H}$  și 100.63 MHz pentru  $^{13}\text{C}$ , standard intern TMS). Probele au fost preparate prin dizolvarea DPH în DMSO (semnalul  $^1\text{H}$  la 2.51 ppm și la 39.45 ppm pentru  $^{13}\text{C}$ ). Spectrele Raman au fost

înregistrate pe pulbere DPH, la temperatura camerei, folosind spectrometrul Renishaw inVia Reflex, echipat cu detector CCD RenCam. În acest studiu au fost folosite liniile laser excitatoare de 325, 532, 633, 785 și 1064 nm.

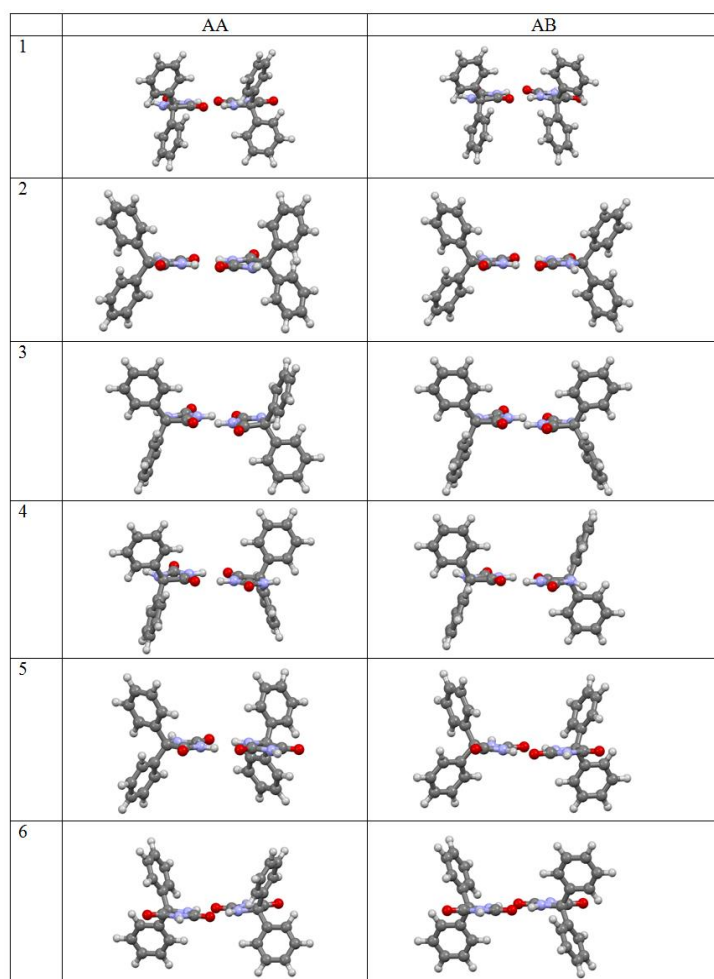
Optimizarea geometriei DPH și calculele "single point" au fost efectuate cu programul Gaussian 09, rev. C.01 [Gau09] folosind metode DFT. Funcționalele hibride B3LYP [Bec93, Lee88, Vos80, Ste94] și APFD [APFD] au fost folosite împreună cu seturi de baza de tip Pople [Heh72, Fri84].

Spectrele de absorbție au fost calculate la nivelul de teorie TD-B3LYP/6-31+G(2d, 2p). Calculul deplasărilor chimice a fost efectuat folosind metoda GIAO [Dit74, Wol90], cu funcționala B3LYP și setul de bază 6-31+G(2d,2p).

Pentru modelarea spectrelor vibraționale ale DPH am folosit un model de cluster compus din 5 molecule. Pentru aceasta am utilizat metoda ONIOM QM:QM, tratând molecula care a fost optimizată complet (stratul "high") la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2d,p), iar cele 4 molecule vecine care au format stratul "low", la nivelul B3LYP/3-21G. În plus, pentru monomer am testat performanța aproximației anarmonice în reproducerea spectrului Raman.

### 4.3 Interacțiuni de tip "hydrogen bonding" ale moleculei difenilhidantoin

Pentru monomerul DPH sunt posibile două structuri de energie minimă și anume structura prezentată în Fig.4.1 (conformerul A) și imaginea sa în oglindă (conformerul B). Chiar dacă cele două structuri sunt echivalente din punct de vedere energetic și spectroscopic, ambele trebuie luate în considerare la formarea posibililor dimeri ai DPH [Luc15]. Astfel, pentru conformerul A, inelul din stânga (C8-C9) este aproape coplanar cu legătura C4-C5 din unitatea hidantoin, în timp ce al doilea inel fenil (C14-C15) este aproximativ coplanar cu legătura C5-N1. Din cauza prezenței celor două grupuri NH ca și donoare de hidrogen și a doi atomi de oxigen ca și acceptori în legături HB, pot fi formați diferiți dimeri legați prin HBs. În acest studiu am fost interesați numai de acest tip de dimeri deoarece aceștia sunt semnificativ mai stabili decât alte tipuri, formați de exemplu prin interacțiuni dispersive. În plus, numai dimerii formați prin două legături HB au fost luați în considerare.



**Fig. 4.2** Structurile optimizate B3LYP/6-31+G(2d,2p) pentru dimerii DPH în gaz.

Un total de 12 dimeri formați prin duble legături HB pot fi formați (vezi Fig. 4.2), din care 6 sunt de tip AA și 6 de tip AB. Dimerii de tip BB și BA nu au fost considerați deoarece aceștia sunt imagini în oglindă ai celor de tip AA, respectiv AB. Geometriile celor 12 dimeri au fost complet optimizate fără a impune nici un fel de constrângere și fiecare dintre acestea corespund unor minime pe suprafața de energie potențială.

Vom discuta mai întâi caracteristicile structurale ale monomerului, pentru care parametrii geometrici au fost

**Tabelul 4.2.** Valorile calculate ale unghiurilor diedre și distanțelor între centroizii inelelor fenil și atomii de oxigen pentru monomerul DPH în gaz, etanol și DMSO

Paramtru <sup>a)</sup>	gaz	etanol	DMSO	date de raze X [Cam71]
$\angle(\text{Ph1,Ph2})$	81.59	76.03	77.57	89.56
$\angle(\text{Ph1,Hyd})$	73.32	73.87	73.73	65.67
$\angle(\text{Ph2,Hyd})$	66.98	70.86	69.87	65.95
d(X1O7)	4.263	4.250	4.253	4.226
d(X2O7)	4.012	4.002	4.003	3.968
d(X1O6)	5.473	5.531	5.528	5.513
d(X2O6)	5.779	5.711	5.715	5.677

<sup>a)</sup> Ph1, Ph2 și Hyd sunt planele definite de inelele fenil C8-C13 și C14-C19 cu inelul hidantoin; X1 și X2 sunt centroizii celor două inele fenil.

raportați de către Camerman *et al.* [Cam71] și discutați de asemenea de Tamir *et al.* [Tam80].

Unghiurile dintre planele definite de cele două inele fenil și unitatea hidantoin sunt prezentate în Tabelul 4.2. Cel mai bun acord între datele experimentale și cele calculate

se observă în cazul moleculei în gaz, în particular pentru diedrul (Ph<sub>2</sub>,Hyd). În fază lichidă, unghiul dintre planele Ph<sub>1</sub> și Hyd se modifică foarte puțin comparativ cu cazul fazei gazoase. Pe de altă parte, unghiul diedru (Ph<sub>1</sub>,Ph<sub>2</sub>) scade în soluție, concomitent cu o creștere ușoară a unghiului (Ph<sub>2</sub>,Hyd). Conform datelor din Tabelul 4.2, distanța dintre centroizii inelelor fenil și atomii de oxigen din grupul carbonil nu este afectată semnificativ de trecerea din faza gazoasă în cea lichidă. Observăm de asemenea că nu există diferențe calitative între parametrii geometrici ce caracterizează orientarea relativă a inelelor fenil față de grupul hidantoin, pentru structurile dimere în fază gazoasă și în etanol.

**Tabelul 4.3** Energii relative (kcal mol<sup>-1</sup>, corectate ZPE) și populații Boltzmann (%) ale celor 12 dimeri DPH în gaz (nivel de teorie B3LYP/6-31+G(2d,2p)) și în etanol și DMSO (nivel de teorie PCM-B3LYP/6-31+G(2d,2p)), la temperatura camerei

Dimer	Gaz		Etanol		DMSO	
	$\Delta E_{ZPE}$	Populație	$\Delta E_{ZPE}$	Populație	$\Delta E_{ZPE}$	Populație
1AA	1.22	3.62	0.98	5.75	1.04	5.54
2AA	0.00	14.26	0.02	14.46	0.06	14.19
3AA	1.09	4.50	0.46	13.85	0.46	14.41
4AA	2.07	0.44	1.28	1.73	1.27	1.83
5AA	0.24	19.13	0.53	12.28	0.58	11.81
6AA	0.36	7.77	1.28	1.74	1.36	1.58
1AB	1.47	2.39	1.02	5.36	1.03	5.50
2AB	0.01	14.02	0.00	15.07	0.00	15.66
3AB	1.20	3.79	0.47	13.63	0.48	13.93
4AB	2.11	0.40	1.23	1.90	1.21	2.03
5AB	0.22	19.72	0.54	12.17	0.59	11.63
6AB	0.21	9.97	1.18	2.06	1.26	1.88

Este rezonabil să presupunem că tăria interacțiunilor de tip HB va juca un rol major în stabilitatea dimerilor. Acest lucru este adevărat pentru dimerii solvatați, caz în care structurile dimere cu lungimea mediată a legăturile HB mai scurtă (dimerul 2AB) sunt cele mai stabile, situația fiind oglindită pentru structurile în fază gazoasă. Pentru acestea din urmă, cei mai stabili, dimerii aproape isoenergetici 2AA și 2AB au o lungime medie a legăturile HB de 2.837 Å, semnificativ mai scurtă decât dimerii imediat următori în ordinea creșterii energiei (6AB și 5AB).

Legăturile HB intermoleculare în cel mai stabil dimer 2AA duc la creșterea lungimii legăturilor N-H și C=O cu 0.021, respectiv 0.014 Å, față de monomer. Diferențele apar din cauză că molecula DPH este implicată în două legături HB în toți

dimerii investigați, în timp ce în stare solidă fiecare monomer este conectat cu 4 molecule vecine, formând două perechi de legături HB echivalente de 2.784 și 2.884 Å.

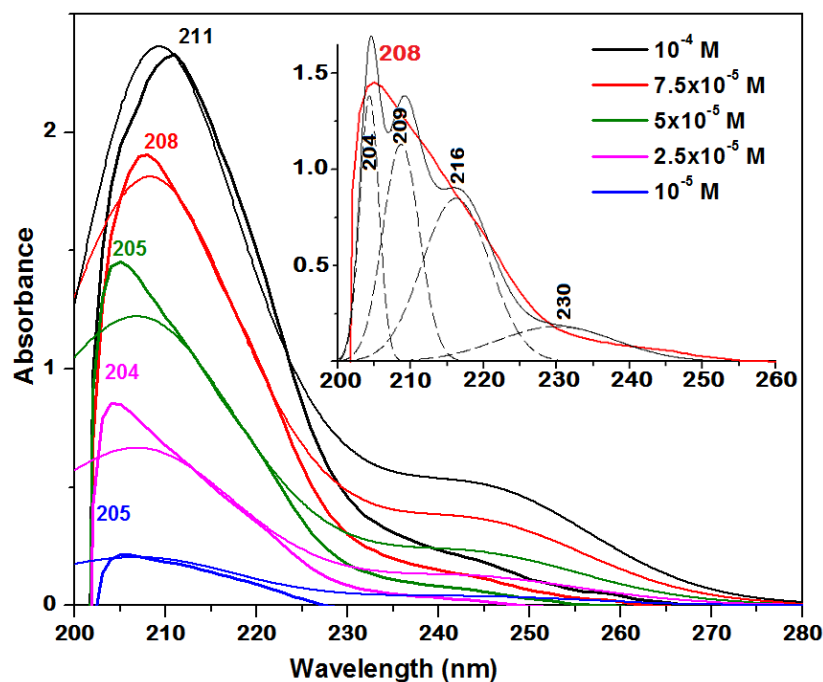
După cum se observă în Tabelul 4.3, calculele noastre prezic o modificare dramatică a energiilor relative ale unor dimeri la trecerea din fază gazoasă în fază lichidă. Totuși, cei doi dimeri 2AA și 2AB sunt cei mai stabili atât în gaz cât și în fază lichidă. În particular, dimerii 2AB și 2AA contribuie împreună cu aproape 30 % din populația totală în soluție. În etanol și DMSO, dimerii 2AB, 2AA, 3AA, 3AB, 5AA și 5AB au energiile relative în intervalul 0.59 kcal·mol<sup>-1</sup>, care este mai mic decât energia termică corespunzătoare temperaturii camerei. Chiar dacă sunt semnificativ mai destabilizați energetic, datorită degenerării de simetrie, dimerii 1AA și 1AB au populații apreciabile, mai mari de 5%.

#### 4.4 Tranziții electronice ale moleculei difenilhidantoin

Spectrele UV-Vis ale DPH în etanol (vezi Fig. 4.4) au fost înregistrate la 5 concentrații, de la 10<sup>-5</sup> M la 10<sup>-4</sup> M. Se observă un ușor shift, de la 204 nm la 211 nm pentru  $\lambda_{\max}$ , odată cu creșterea concentrației. Conform rezultatelor teoretice, cele mai intense tranziții electronice ale monomerului DPH sunt prezise în regiunea UV, în foarte bun acord cu datele experimentale. Contribuția principală la tranziția S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub> este datorată excitației HOMO-LUMO. Am atribuit această tranziție unui transfer intramolecular de sarcină între inelele fenil și grupul hidantoin. Inset-ul din Fig. 4.4 arată deconvoluția spectrului UV experimental pentru concentrația de 7.5·10<sup>-5</sup> M, cu peak-uri la 204 nm, 209 nm, 216 nm și 230 nm. Primele 3 peak-uri rezultate prin deconvoluție pot fi puse în corespondență cu primele 3 benzi de absorbție simulate. Ultimul peak deconvolutat, de la 230 nm, este deplasat apreciabil spre albastru comparativ cu banda de absorbție simulată de la 247 nm.

Pe baza calculelor DFT presupunem că pentru concentrații mai mici de 5·10<sup>-5</sup> M contribuția dominantă la spectrul de absorbție este datorată monomerilor și peak-ul experimental este datorat tranziției calculate pentru monomeri la 201-208 nm. Se observă o asimetrie clară a curbelor de absorbție pentru toate concentrațiile. Acestea maschează un umăr la cca. 230 nm, care poate fi identificat prin deconvoluție.





**Fig. 4.4** Spectrele UV-Vis experimentale (linia continuă) și simulate (linia întreruptă) ale DPH în ethanol, la 5 concentrații. Spectrele simulate au fost calculate pentru monomerul DPH și 8 cei mai stabili dimeri în etanol, a căror populație Boltzmann cumulată este de 92.6 %. În inset este ilustrat spectrul experimental deconvoluat înregistrat la  $7.5 \cdot 10^{-5}$  M.

Deplasarea spre roșu a  $\lambda_{\max}$  (de la 205 nm la 211 nm), observată ca rezultat al creșterii concentrației, poate fi explicată prin creșterea populației dimerilor, datorată creșterii concentrației de la  $5 \cdot 10^{-5}$  la  $10^{-4}$  M. Conform energiilor libere relative calculate, dimerii DPH 2AB și 2AA sunt cei mai stabili și mai abundenți în etanol. În mod așteptat, spectrele UV ale celorlați 7 dimeri au absorbții similare cu cele ale dimerului 2AB. Pe baza calculelor efectuate pe modele de monomer și dimer considerăm că peak-ul experimental de la  $\lambda=205$  nm indică o absorbție de 100% a monomerilor. De asemenea, populația monomerilor este dominantă pentru concentrații mai mici de  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Curba UV intermediară cu peak-ul la  $\lambda=208$  nm apare ca rezultat al absorbției mixte, 50% populație de monomeri și 50% de dimeri. Peak-ul experimental de la  $\lambda=211$  nm este datorat în proporție de 100% dimerilor.

#### 4.5 Analiza RMN a moleculei difenilhidantoin

Deplasările chimice experimentale și cele calculate (ponderate după populații) pentru monomer și pentru cei 12 dimeri investigați ai DPH în DMSO sunt listate în Tabelul 4.6.



Conform datelor din tabel, diferențele principale între valorile experimentale și cele calculate pentru monomer se observă pentru nucleul C5, precum și pentru protonii H30 și H31. Interacțiunile HB pot afecta ecranarea celor doi protoni. Acesta este cazul, într-adevăr, și calculele efectuate pentru dimeri arată că aceste interacțiuni intermoleculare

**Tabelul 4.6** Deplasări chimice experimentale și calculate (în ppm) pentru DPH în DMSO

Atom	Date experimentale <sup>a)</sup>	Date calculate <sup>b)</sup>	
		Monomer	Dimer
<b>C4</b>	174.81	174.73	174.40
<b>C2</b>	156.00	153.99	156.32
<b>C8,C14</b>	139.90	138.87	139.71
<b>C10,C12,C16,C18</b>	128.45	126.89	126.46
<b>C11,C17</b>	127.98	126.70	126.48
<b>C9,C13,C15,C19</b>	126.57	126.14	126.11
<b>C5</b>	70.22	77.70	76.96
<b>H31</b>	11.18	8.40	11.50
<b>H30</b>	9.39	6.67	5.64
<b>H22,H27</b>	7.35	7.99	7.75
<b>H20,H21,H23-H26, H28,H29</b>	7.41	7.84	7.70
<b>MAE</b>	-	1.86	1.49

a) Date RMN <sup>1</sup>H și <sup>13</sup>C pentru DPH în DMSO față de TMS.

b) Deplasările chimice calculate la nivelul de teorie B3LYP/6-31+G(2d,2p); datele pentru dimer au fost deduse ca medie ponderată a deplasărilor chimice calculate pentru 8 cei mai stabili dimeri ai DPH în DMSO, a căror populație Boltzmann cumulate este de 92.7 %.

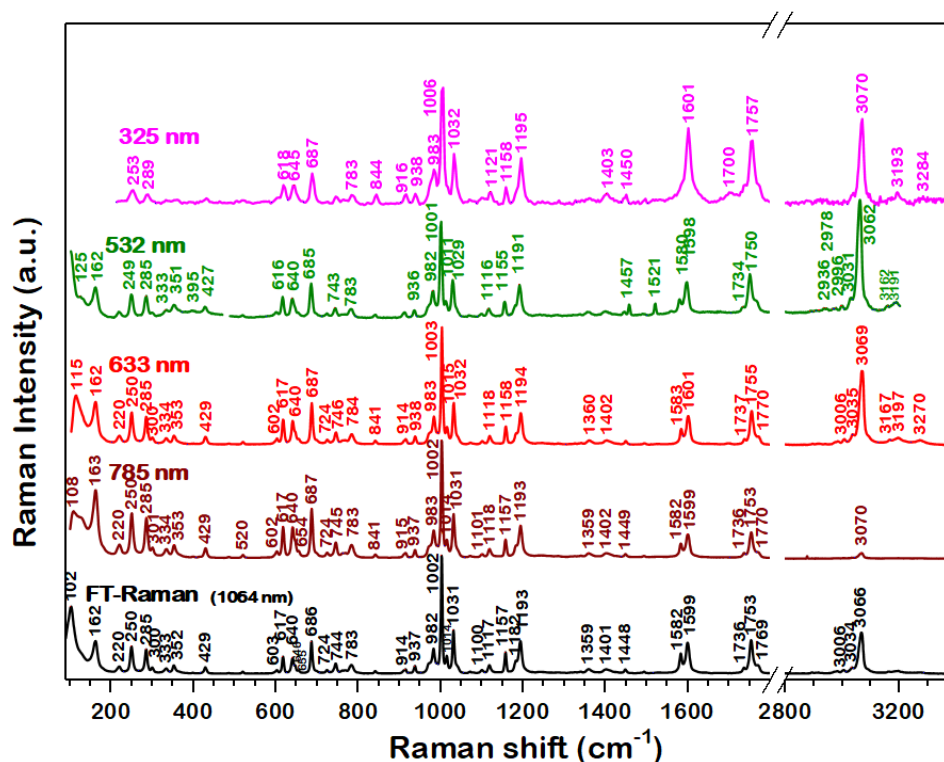
modifică densitatea de sarcină a grupării hidantoin, având ca rezultat o modificare semnificativă a deplasării chimice pentru nucleele C2 și H31 și într-o măsură mai mică pentru nucleul H30. Valoarea deplasării chimice pentru nucleul C5 în dimer se îmbunătățește foarte puțin comparativ cu cazul monomerului. Motivul poate fi acela că nucleul C5 este ecranat de către inelele fenil mult mai puternic decât poate fi prezis de către modelul continuu de solvatare PCM. Dimerii 5AB și 1AB dau un acord îmbunătățit între datele experimentale și cele calculate pentru protonul H30, în detrimentul unui acord mai slab pentru protonul H31. Cu toate acestea, valorile calculate corespunzătoare pentru dimerii individuali, precum și media ponderată sunt inacceptabil de departe de valorile experimentale. Această discrepanță poate fi atribuită ne-includerii interacțiunilor specifice solut-solvent în modelul computațional.

#### 4.6 Trăsături vibraționale ale moleculei difenilhidantoin

Pentru o atribuire corectă a spectrului Raman al DPH, în acest studiu ne-am bazat pe comparația cu spectrul Raman al compusului 2,4-imidazolidinedione [Biorad],

precum și pe spectrul Raman calculat prin metode DFT a unui cluster compus din 5 molecule DPH și pe spectrul calculat în aproximația anarmonică al dimerului DPH.

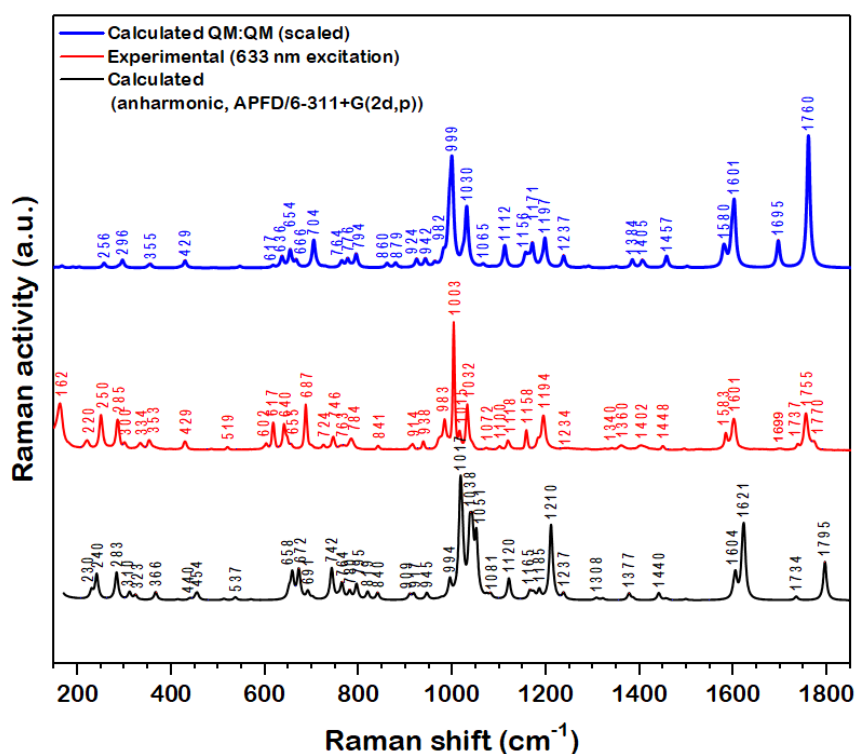
În Fig. 4.6 este dat spectrul Raman experimental al DPH. Fig. 4.8 arată spectrul Raman calculat al DPH folosind două modele și două metodologii computaționale. Curba de sus reprezintă spectrul calculat bazat pe metodologie QM:QM unde pentru stratul "low" compus din 4 molecule vecine am folosit nivelul de teorie B3LYP/3-21G, în timp ce pentru stratul "high" care conține o singură moleculă complet optimizată, am folosit nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2d,p). Pentru cea de-a doua metodologie computațională am folosit modelul de monomer model solvatat în apă și calculele au fost efectuate în aproximația anarmonică [Bar14, Cor16], bazată pe teoria perturbativă vibrațională de ordin doi (VPT2) [Pic15], la nivelul de teorie APFD/6-311+G(2d,p).



**Fig. 4.6** Spectrul Raman experimental al DPH sub formă de pulbere la temperatura camerei. După cum se observă în Fig. 4.8, spectrul experimental este mult mai bine reprodus de către modelul cluster tratat cu metoda ONIOM, în întreg domeniul spectral. În particular, poate fi notat excelentul acord între benzile Raman asociate cu vibrațiile de stretching ale grupului carbonil, dar și trăsăturile spectrale observate în domeniul spectral 1072-1234  $\text{cm}^{-1}$  și 602-784  $\text{cm}^{-1}$ . Merită menționat că pe lângă faptul că furnizează un acord mult mai bun cu datele experimentale, calculele pe modelul cluster

oferă avantajul că sunt cu două ordine de mărime mai rapide (24 ore și 23 minutes, comparativ cu 3182 hours și 43 minutes) decât cele anarmonice.

Atribuirea modurilor de vibrație a fost făcută prin compararea directă a spectrelor experimentale și calculate considerând atât numerele de undă cât și



**Fig. 4.8** sus: Spectrul Raman calculat QM:QM al DPH; mijloc: Spectrul Raman experimental al DPH la temperatura camerei (linia laser 633 nm); jos: Spectrul Raman calculat anarmonic la nivelul de teorie APFD/6-311+G(2d,p) al monomerului DPH în gaz

intensitățile relative ale benzilor, dar și prin compararea cu spectrele vibraționale ale unor compuși similari: hidantoinul [Kim03, Ild12, Biorad] și radicalul fenil [Lap01].

În primul rând notăm faptul că benzile IR observate pentru DPH la 1774 și 1717  $\text{cm}^{-1}$  corespund celor mai intense benzi IR experimentale de la 1779 și 1717  $\text{cm}^{-1}$  pentru hidantoin. Alte benzi IR ale hidantoinului (3265, 1296, 641 și 440  $\text{cm}^{-1}$  [Biorad]) observate în spectrul DPH sunt cele de la 3272, 1285, 641 și 453  $\text{cm}^{-1}$ .

Există de asemenea benzi Raman caracteristice pentru hidantoin (2977, 1735, 1698, 1071, 1000, 908, 642 și 414  $\text{cm}^{-1}$  [Biorad]) care pot fi observate în spectrul DPH foarte apropiate în poziție, dar cu intensitate semnificativ mai mică (2976, 1737, 1698, 1072, 1003, 914, 640 și 429  $\text{cm}^{-1}$ ). Pe de altă parte, două benzi Raman intense din spectrul hidantoinului de la 1422 și 580  $\text{cm}^{-1}$  nu sunt observate în spectrul DPH.

După cum se observă în Fig. 4.6, cel puțin 3 peak-uri pot fi identificate în spectrele Raman și IR al DPH în domeniul spectral caracteristic pentru vibrațiile de stretch ale grupului carbonil.

Datorită grupurilor sale NH și C=O, molecula DPH este disponibilă pentru formarea de legături HB, atât în stare solidă cât și în stare lichidă. Am atribuit aceste benzi din jurul valorii de  $1750\text{ cm}^{-1}$  vibrațiilor de stretch simetric și asimetric ale moleculei libere și respectiv moleculei implicate în legături HB.

Alte benzi Raman caracteristice DPH sunt observate la  $1601$  și  $1583\text{ cm}^{-1}$ , ambele corespunzând vibrațiilor stretch CC din grupurile fenil. Banda de la  $1194\text{ cm}^{-1}$  este datorată vibrațiilor de stretching între grupurile hidantoin și fenil.

Banda de la  $1003\text{ cm}^{-1}$  (cea mai intensă în spectrul Raman al DPH) este datorată unui mod care implică vibrații CCC bendings în grupurile fenil dar și CNC bendings în grupul hidantoin. Spectrul Raman al hidantoinului pur conține o bandă slabă la  $1000\text{ cm}^{-1}$ .

Merită menționată prezența unei benzi intense la  $1422\text{ cm}^{-1}$  în spectrul Raman al hidantoinului, corespunzătoare vibrațiilor  $\beta(\text{CH}_2)$ . O altă bandă a hidantoinului care dispare în spectrul Raman al DPH este observată la  $580\text{ cm}^{-1}$  (deformare out-of-plane a grupului hidantoin cuplată cu vibrația  $\text{CH}_2$  rocking). Această deformare este împiedicată în DPH datorită conectării cu grupurile fenil și aceasta explică extincția benzii corespunzătoare. Subliniem că atribuirea corectă a benzilor de vibrație în cazul structurilor complexe precum ingredientii activi farmaceutic poate fi făcută numai prin analiza spectrelor grupurilor componente.

Menționăm de asemenea că deși spectrele Raman înregistrate cu diferite linii laser excitatoare sunt foarte asemănătoare, o modificare semnificativă este observată în ceea ce privește intensitățile benzilor atunci când se schimbă linia excitatoare de la  $325\text{ nm}$  la  $785\text{ nm}$ . Astfel, laserul de  $785\text{ nm}$  dă benzi Raman mai intense în domeniul spectral  $100\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ , în timp ce în domeniul  $800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ , cele mai intense benzi se obțin cu linia excitatoare de  $325\text{ nm}$ . O creștere semnificativă a intensităților este observată în particular pentru benzile de la  $1601$ ,  $1757$  și  $1195\text{ cm}^{-1}$ .

Modificări asemănătoare au fost observate anterior de către Thorley et al. [Tho06]. La fel ca și în cazul nostru, studiul menționat anterior demonstrează că laserul UV produce benzi Raman mai intense în regiune de numere de undă mai mari. Nergui et al. [Ner16] au propus că pentru adenină, dependența intensităților Raman de lungimea de undă a laserului folosit poate fi explicată pe baza condiției de pre-rezonanță, chiar dacă laserul excitator este departe de rezonanță. Cel mai probabil aceeași presupunere este valabilă pentru creșterea activităților Raman ale benzilor din regiunea numerelor de undă mari pentru DPH. O altă explicație poate fi dependența polarizabilității DPH de lungimea de undă a laserului excitator. Investigații suplimentare sunt necesare pentru clarificarea acestui comportament.

## 4.7 Concluzii

Structurile geometrice ale monomerului și a 12 dimeri unici ai moleculei 5,5-diphenylhydantoin au fost investigate la nivelul de teorie B3LYP/6-31+G(2d,2p). Energiile relative corectate ZPE pentru dimerii DPH arată că aceeași doi dimeri (2AA and 2AB) sunt cei mai stabili atât în gaz cât și în soluție, dar o importantă modificare se produce în ceea ce privește stabilitatea relativă a celorlalte 10 dimeri. Pentru monomerul DPH, unghiul diedru care definește orientarea relativă a celor două inele fenil în soluție scade apreciabil comparativ cu structura din stare solidă, simultan cu o creștere similară a diedrelor dintre grupurile fenil și grupul hidantoin. Pe de altă parte, se obține un acord aproape cantitativ între distanțele calculate dintre centroizii grupurilor fenil și cei doi atomi de oxigen ai moleculei în fază lichidă și solidă.

Spectrele experimentale UV-Vis și RMN ale DPH au fost explicate pe baza contribuțiilor ponderate prin populațiile Boltzmann datorate monomerilor și dimerilor. Toate excitațiile electronice permise sunt dominate de tranziții de transfer de sarcină între subunitățile moleculei.

Deplasările chimice  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  ale DPH în DMSO au fost explicate prin considerarea datelor calculate și ponderate prin populațiile Boltzmann corespunzătoare celor 6 dimeri. Singura discrepanță între datele experimentale și cele calculate poate fi explicată prin faptul că nu sunt luate în considerare interacțiunile solut – solvent.

Spectrul Raman experimental a fost obținut utilizând 5 linii laser excitatoare și atribuirea modurilor de vibrație a fost făcută pe baza spectrului calculat pentru un cluster de 5 molecule DPH. În acest scop am folosit metodologie QM:QM (două straturi, nivelul de teorie B3LYP/3-21G pentru stratul "low" și nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2d,p) pentru stratul "high"). Această metodologie a fost demonstrată ca fiind mult mai convenabilă comparativ cu calculele anarmonice, datorită timpului de calcul necesar mult mai scurt pentru rularea job-urilor.

Benzile Raman în spectrul înregistrat cu laserul de 325 nm sunt de intensitate mai mare comparativ cu celelalte lasere, în domeniul de numere de undă mai mari de 800  $\text{cm}^{-1}$ . Pentru domeniul numerelor de undă mai mici, laserul de 785 nm conduce la obținerea de benzi Raman mai intense. Acest comportament ar putea fi explicat pe baza condițiilor de pre-rezonanță și de dependența polarizabilității moleculei de laserul folosit pentru excitare.

## Capitolul 5

# SPAȚIUL CONFORMAȚIONAL ȘI STĂRILE EXCITATE DE JOASĂ ENERGIE ALE MOLECULEI IMATINIB

### 5.1 Introducere

Imatinib, (IMT, vezi Fig. 5.1), este un inhibitor al tyrosin-kinazei (TKI) de primă generație, folosit în principal în tratamentul leucemiei mielogene cronice și pentru tumorile stromale gastrointestinale [Mul09, Ksi11, Had14]. Acesta acționează selectiv asupra tirozin-kinazei Abl [Sch09, Zha09, Zha10], asupra receptorului factorului de creștere al celulelor Mast/stem (c-Kit) și a receptorilor factorului de creștere derivat din plachetele sanguine (PDGF-R) [Rub02, Mak02].

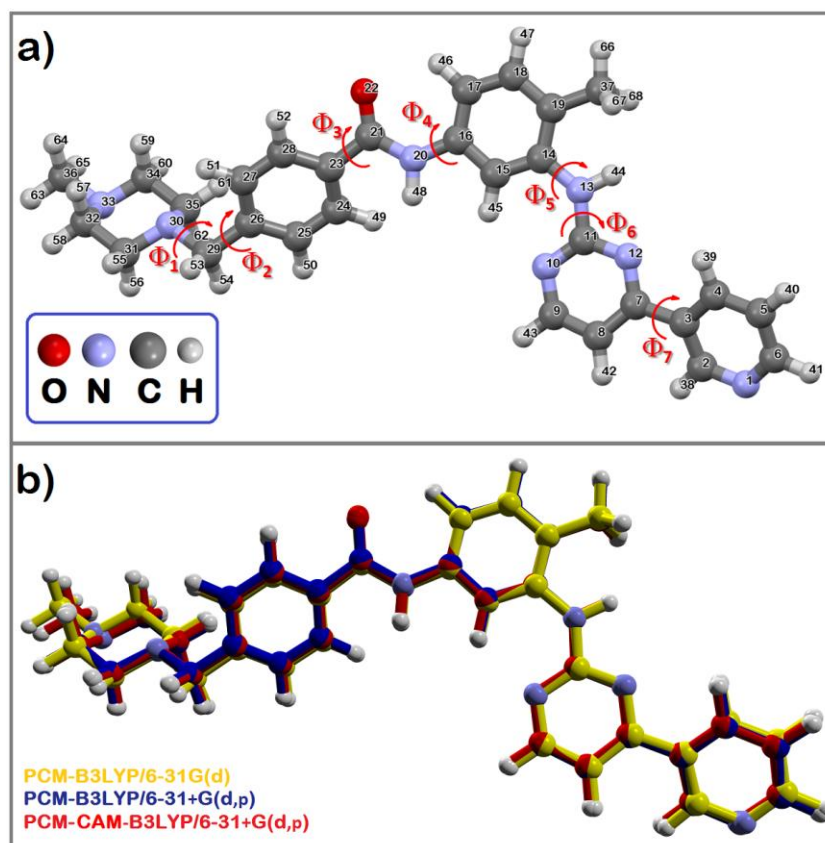
Descrierea cu acuratețe a aranjamentului 3D și a proprietăților moleculare ale stărilor conformaționale accesibile termic ale IMT este crucială pentru înțelegerea interacțiunilor sale cu receptorii [Ale10, Che11, Lop12, Pis14].

Surprinzător, în ciuda importanței spațiului conformațional, există foarte puține date raportate în literatură referitoare la conformerii IMT [Muc11, Che11]. Pentru acest motiv, pe lângă spațiul conformațional, un alt interes în studiul de față a fost acela de a compara structura 3D a conformațiilor bioactive găsite pentru IMT în diferiți complecși IMT-tirozin-kinază [Sch09, Zha09, Xio08, Che11] cu alte conformații posibile.

### 5.2 Detalii experimental și computaționale

Spectrele UV-Vis ale IMT în apă au fost înregistrate la temperatura camerei, folosind un spectrometru de tip Jasco V-670 UV-Vis-NIR, cu lățimea fantei de 2 nm și o cuvetă de cuarț de 1 cm grosime.

Spațiul conformațional al IMT a fost explorat folosind programul Tinker, cu câmpul de forțe de mecanică moleculară MMFF94 [Shi13]. În acest mod au fost identificați 4024 conformeri, într-un domeniu energetic de 34 kcal·mol<sup>-1</sup>. Pentru următoarea parte a studiului am folosit funcționala hibridă B3LYP [Bec93, Lee88, Vos80, Ste94] împreună cu setul de bază "spectroscopic" 6-31G(d) (BS1) și cu setul 6-31+G(d,p) (BS2). Pe lângă cei 45 de conformeri cei mai stabili determinați prin calcule MM și ale căror energii libere relative sunt în intervalul 0-3.5 kcal·mol<sup>-1</sup>, am optimizat de asemenea geometriile structurilor IMT corespunzătoare celor două forme polimorfice din complecșii c-Abl kinase. Astfel, un total de 49 de conformeri au fost optimizați, cu energii relative în intervalul 0 - 4.80 kcal·mol<sup>-1</sup>. În sfârșit, structurile astfel



**Fig. 5.1 a)** Structurile optimizate ale celui mai stabil conformer al IMT în apă (**5**) la nivelul de teorie (PCM)-B3LYP/6-31+G(d,p); **b)** Structurile optimizate suprapuse ale celui mai stabil conformer IMT în apă (**5**) optimizat la 3 nivele de teorie diferite.

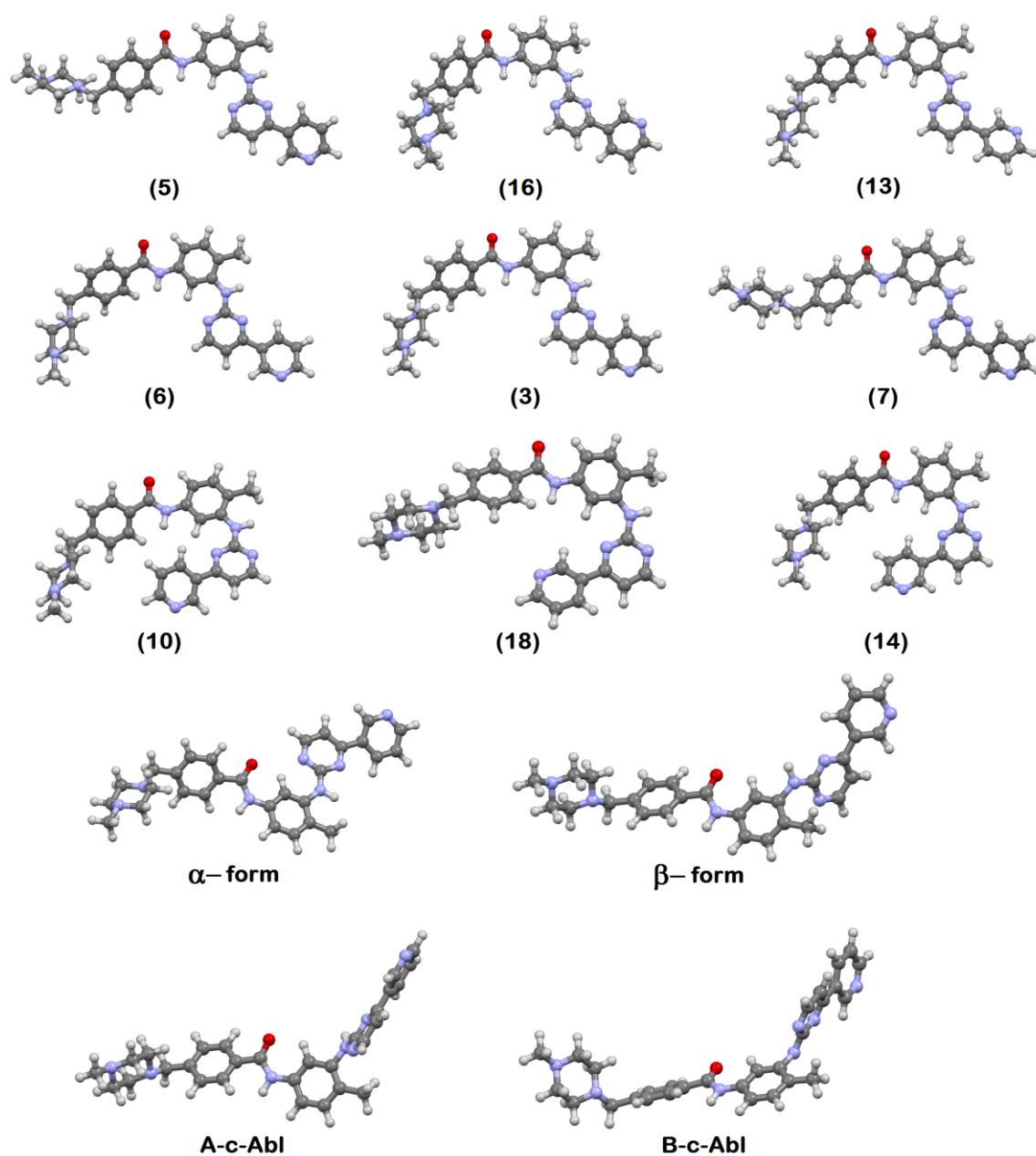
obținute în fază gazoasă au fost reoptimizate în apă la nivelele de teorie B3LYP/BS1 și B3LYP/BS2, folosind modelul de solvatare PCM [Tom05]. Fig. 5.2 prezintă primii 9 cei mai stabili conformeri cu energii relative în domeniul energiei temperaturii camerei ( $0.592 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Pentru comparație am inclus de asemenea și cele două structuri optimizate și experimentale corespunzătoare conformerilor din complexul c-Abl kinază și în polimorfii  $\alpha$  și  $\beta$  ai IMT.

Spectrele de absorbție au fost calculate folosind funcționala CAM-B3LYP [Yan04] cu setul de bază 6-31+G(d,p) și spectrul UV-Vis simulat a fost obținut prin însumarea contribuțiilor tranzițiilor în primele 80 de stări electronice excitate de singlet.

### 5.3 Spațiul conformațional al moleculei Imatinib

Cea mai vizibilă diferență dintre conformerii de tip C și T poate fi observată între cei care diferă prin unghiul de rotație în jurul legăturii N13-C14.





**Fig. 5.2** Structurile optimizate la nivelul de teorie PCM-B3LYP/6-31+G(d,p) a celor mai stabili 9 conformeri ai IMT în apă, împreună cu formele cristaline  $\alpha$  și  $\beta$  [Gri13], precum și cele două forme A și B din complexul c-Abl [Nag02]. (reprodsă din ref. [Vin15])

Conformerii conținând în notația lor în al șaselea dublet simbolurile C- și C+ (vezi Tabelul 5.2) au o structură sub formă de V, [Nag02], iar cei care conțin dubletul T- și T+ au structură de formă U (vezi Fig. 5.2). Numai conformerul (15) are o formă de tip S, cea mai apropiată de formele polimorfice  $\alpha$  și  $\beta$  și de structurile din complexii IMT-c-Abl. Am acordat atenție specială fragmentului piperazine al IMT. În forma a N,N'-dimetil-piperazină, care, conform calculelor noastre, este mai stabilă decât forma "skewed boat"



cu 8.23 kcal·mol<sup>-1</sup>, cele două legături N-CH<sub>3</sub> pot rămâne ecuatorial sau axial, conducând la 3 conformații diferite, eq-eq, eq-ax și ax-ax, cu energii Gibbs relative de 0.00, 6.47 și respectiv 7.69 kcal·mol<sup>-1</sup>.

Cel mai stabil conformer în gaz (1) are fragmentul piperazină sub formă "chair" cu conformație eq-eq. Conform datelor din Fig. 5.2, această conformație este menținută pentru toți conformerii considerați în domeniul de energii relative 0-0.49 kcal·mol<sup>-1</sup>.

După cum se observă în Tabelul 5.2, primii 9 cei mai stabili conformeri în apă sunt dominanți, cu o populație Boltzmann totală mai mare de 68%. Cel mai stabil în gaz este conformerul (1), iar conformerul (5) este cel mai stabilizat în apă; diferențele principale între structurile celor doi conformeri constă în orientarea relativă a grupului piperazină față de restul moleculei. O astfel de diferență este de așteptat dacă se ține cont de faptul că acest grup reprezintă partea hidrofobică a IMT [Nag02]. Unghiul diedru  $\alpha$  dintre inelele piridină și metilbenzen are valori între 50° și 90° în complexii inhibitor-proteină de tip II, dar pentru primii 9 cei mai stabili conformeri IMT, unghiul  $\alpha$  oscilează între 35° ÷ 32°. Unghiul  $\beta$  dintre grupurile piperazină și metilbenzen este distribuit între 0° și 90° în complexii proteină-imatinib și la fel se întâmplă pentru conformerii a căror unghiuri  $\beta$  sunt între 42° și 77°.

Tabelul 5.4 conține unghiurile diedre experimentale ale IMT pentru complexul c-Abl kinase [Nag02], dar și cele pentru formele polimorfice  $\alpha$  și  $\beta$  [Gri13]. Unghiul diedru  $\Phi_5$  pentru IMT în complexul tirozin kinază este de 97.5° ceea ce rezultă într-o valoare de 92.6° pentru unghiul  $\alpha$ , caracteristic pentru inhibitorii de tip II.

Merită notat că numai conformerul (15) are o structură de formă S, asemănătoare conformației din starea solidă a polimorfilor [Gri13] și din complexul c-Abl-IMT [Nag02]. În plus, din Fig. 5.2 este evident că diferența majoră dintre structurile conformerilor liberi de formă V și conformerul bioactiv legat de c-Abl kinază constă în orientarea relativă a grupurilor pirimidină-piridină, partea prin care ligandul IMT se leagă la site-ul ATP al TK.

Pentru a încheia discuția despre trăsăturile structurale ale conformerilor IMT, mai evidențiem faptul că setul de bază BS1 reprezintă un bun compromis pentru obținerea geometriilor optimizate, a energiilor relative și chiar a energiilor de excitare, cel puțin pentru molecule mici și medii [Jua13, Per13, Sur14, Chi14, Sjo14].

**Table 5.2** Energii libere relative și populații Boltzmann ale celor 20 cei mai stabili conformeri ai IMT în gaz [nivel de teorie B3LYP/6-31G(d)] și în apă [nivele de teorie PCM-B3LYP/6-31G(d) și PCM-B3LYP/6-31+G(d,p)] la temperatura camerei

Conformer	Gaz B3LYP/6-31G(d)		Apă PCM-B3LYP/6-31G(d)		Apă PCM-B3LYP/6-31+G(d,p)	
	$\Delta G^a$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Populație (%)	$\Delta G^b$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Populație (%)	$\Delta G^c$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Populație (%)
G-A+C-C-C+C-T- <b>(1)</b>	0.00	16.24	0.31	6.15	1.06	1.85
G-A+C-C-C+C+T- <b>(2)</b>	0.40	8.38	0.35	5.75	1.07	1.83
T-G+C-C-C-C-T- <b>(3)</b>	0.40	8.37	0.26	6.64	0.27	7.07
G-A+C-C-C+C+T+ <b>(4)</b>	0.44	7.82	0.14	8.12	0.66	3.67
T-A-C-C-C-C+T- <b>(5)</b>	0.48	7.28	0.00	10.33	0.00	11.13
T-G+C-C-C+C+T+ <b>(6)</b>	0.69	5.16	0.35	5.74	0.26	7.22
G-A+C+C+C+C-T- <b>(7)</b>	0.71	4.95	0.51	4.38	0.34	6.29
G-G-C-C-C+C+T- <b>(8)</b>	0.72	4.84	0.85	2.49	0.65	3.72
T-G+C+C+C-C+T- <b>(9)</b>	0.74	4.72	0.83	2.58	0.94	2.28
T-G+C-C-C-T+T+ <b>(10)</b>	0.97	3.22	0.16	7.86	0.41	5.57
G-A+C-C-C+C-C- <b>(11)</b>	0.97	3.20	0.29	6.31	0.63	3.87
T-G+C+C+C+T-T- <b>(12)</b>	0.97	3.19	1.18	1.45	0.78	3.00
T-G+C+C+C-C+C- <b>(13)</b>	1.02	2.97	0.42	5.14	0.03	10.59
T-G+C-C-C+T-T- <b>(14)</b>	1.04	2.87	0.47	4.73	0.49	4.84
T-G+C-T+C-T+T- <b>(15)</b>	1.04	2.84	1.12	1.59	1.69	0.64
T-G+C+C+C-C+C+ <b>(16)</b>	1.05	2.83	0.15	8.07	0.03	10.63
G-A+C-C-C+C-C+ <b>(17)</b>	1.05	2.81	0.43	5.05	1.09	1.76
T-G+C-C+C+T-T- <b>(18)</b>	1.05	2.79	0.48	4.66	0.49	4.86
T-A-C+C-C-T-C+ <b>(19)</b>	1.06	2.77	1.13	1.56	0.98	2.13
G-A+C-C-C+T-T- <b>(20)</b>	1.06	2.76	1.20	1.38	0.72	3.30

<sup>a</sup>relativ la conformerul **(1)**<sup>b</sup>relativ la conformerul **(5)**<sup>c</sup>relativ la conformerul **(5)**

Pe de altă parte, setul de bază afectează drastic stabilitatea relativă a conformerilor. Este posibil să estimăm diferența entalpiilor de fuziune dintre cele două forme polimorfice ca și diferența dintre entalpiile conformerilor în fază gazoasă [Pol01, Kla00].

**Table 5.4** Unghiuri diedre experimentale și calculate și energii libere relative ale formelor cristaline  $\alpha$  și  $\beta$  ale IMT [Dic09] și ale formelor A și B în complexul tyrozin kinază [Ste94] și conformerii lor optimizați în apă. *Exp.* date experimentale, *Opt.* Optimizat; A, B. Cele două forme din complexul c-Abl kinază cu IMT [Ste94];  $\alpha$ ,  $\beta$  – cele două structuri ale polimorfilor  $\alpha$  și  $\beta$  ai IMT [Che11]

	$\Delta G^a$	$\Phi_1$	$\Phi_2$	$\Phi_3$	$\Phi_4$	$\Phi/5$	$\Phi_6$	$\Phi_7$
Exp. A [Nag02]	n.a.	-179.0	49.4	15.7	-176.6	97.5	-0.5	170.3
Opt.-A water	1.77	-166.6	46.0	27.3	-175.4	112.8	5.3	156.6
Exp. B [Nag02]	n.a.	-179.8	49.4	24.6	-179.8	97.5	-0.5	-12.1
Opt.-B water	1.60	-168.0	53.4	27.6	-176.3	112.3	5.4	-23.7
Exp. $\alpha$ [Gri13]	n.a.	-165.7	43.5	-25.8	-164.6	77.9	-26.9	36.6
Opt. $\alpha$ water	1.19	-167.7	48.8	-29.2	-168.7	-6.1	-0.8	24.4
Exp. $\beta$ [Gri13]	n.a.	-168.3	23.7	35.3	-129.2	-113.3	-3.9	-13.2
Opt. $\beta$ water	1.47	-167.5	52.2	27.8	-0.6	-111.0	-6.8	-24.1
a) relativ la conformerul (5) n.a. – not available								

Astfel, pentru o soluție ideală, fracția molară  $x$  a solutului la saturație depinde de entalpia de fuziune  $\Delta H$ , capacitatea calorică molară  $\Delta C_p$ , temperatura de topire  $T_m$  și temperatura  $T$  a soluției [Pol01]:

$$x = \exp(-(\Delta H/R) \cdot (\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}) + (\Delta C_p/R) \cdot ((T_m - T)/T + \ln(T/T_m))) \quad (5.1)$$

Pentru IMT, diferența entalpiilor de fuziune am estimat-o ca și  $H_\beta - H_\alpha = 2.45$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  și diferența capacităților calorice  $\Delta C_p$  este aproximată ca și diferența entropiilor de fuziune ( $\Delta S_\beta - \Delta S_\alpha = -3.67$   $\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) pentru tranziția de la forma cristalină la forma lichidului superrăcit ( $\Delta S = S_{\text{gas}} - S_{\text{water}}$ ). Raportul  $x_\alpha/x_\beta$  a fost obținut pe baza ecuației:

$$x_\alpha/x_\beta = \exp\left(\frac{H_\beta - H_\alpha}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{mm}}\right) - \frac{\Delta S_\beta - \Delta S_\alpha}{R} \cdot \left(\frac{T_m - T}{T} + \ln\left(\frac{T}{T_{mm}}\right)\right)\right) \quad (5.2)$$

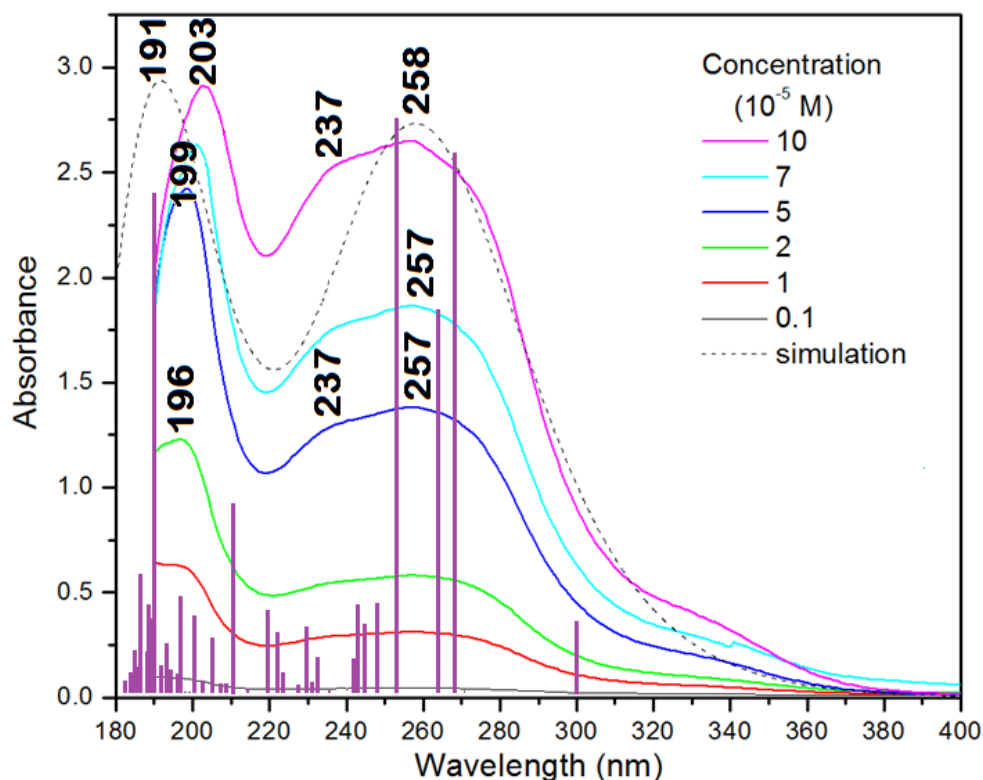
unde  $T_{mm} = 494.5$  K este valoarea medie a temperaturilor de topire ale celor doi polimorfi [Gri13]. La temperatura camerei ( $T=298$  K) am obținut o valoare de 2.26 pentru raportul fracțiilor molare, în acord excelent cu datele experimentale, conform cărora polimorful  $\alpha$  este de 2.5 mai solubil decât forma  $\beta$ .

În plus, considerând diferența entalpiilor de fuziune experimentale dintre formele  $\alpha$  și  $\beta$  ( $3.18$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) [Gri13] calculele noastre arată că o parte de  $2.45$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  din aceasta

este datorată diferenței conformaționale și  $0.73 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  este datorată interacțiunilor de tip Van der Waals din cristal.

## 5.4 Tranziții electronice și spectrul UV-Vis al moleculei Imatinib

Figura 5.4 arată evoluția spectrului UV-Vis al IMT în apă în funcție de concentrație, în domeniul  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M. În timp ce pentru peak-ul de la cca. 195-203 nm se observă o



**Fig. 5.4** Dependența de concentrație a spectrului de absorbție al IMT în apă la temperatura camerei. Spectrul simulat a fost obținut ca și media ponderată prin populațiile Boltzmann ale spectrelor celor 9 cei mai stabili conformeri în apă. Spectrul de linii corespunde conformerului (5).

ușoară deplasare spre roșu prin creșterea concentrației, celelalte două peak-uri de absorbție de la 237 nm și 257 nm nu-și schimbă pozițiile.

Spectrul UV-Vis al IMT a fost calculat la nivelul de teorie CAM-B3LYP/BS2//B3LYP/BS2. Pentru concentrații mai mici de  $10^{-4}$  M este presupus că monomerii contribuie predominant la spectrul de absorbție în soluție. Energiile Gibbs relative ( $\Delta G$ ) și populațiile date în Tabelul 5.2 sugerează o contribuție predominantă la spectrele UV-Vis ale IMT în apă provine de la cei 9 cei mai stabili monomeri (5), (16), (13), (6), (3), (7), (10), (18) și (14) ale căror energii sunt în domeniul  $0.49 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  și împreună dau o populație mai mare de 68% din populația totală. După cum se observă în Fig. 5.4, pozițiile și intensitățile benzilor experimentale sunt reproduse foarte bine prin calcul.

Conform calculelor DFT, fiecare dintre cei 9 cei mai stabili conformeri ai IMT dau în principal 4 benzi de absorbție calculate: în jur de 190 nm, datorată în principal tranziției HOMO-6→LUMO+4; la 254 nm, datorată tranziției HOMO-2→LUMO+1; la 265 nm, datorată tranziției HOMO→LUMO+1 și la 270 nm datorată tranzițiilor HOMO→LUMO+1 și HOMO→LUMO+2.

Analiza formei orbitalilor moleculari implicați în tranzițiile menționate pentru conformerul **(5)** în apă arată că tranziția de cea mai mare energie observată în apă (HOMO-6→LUMO+4) de la 190 nm se datorează în principal unei redistribuiri a sarcinii electronice în grupul fenil. Tranziția electronică HOMO-2→LUMO+1 de la 254 nm apare ca rezultat al unui transfer de sarcină de la grupurile metilbenzen și piperazină la grupul fenil, simultan cu o redistribuire a sarcinii în inelul metilbenzen. Orbitalul HOMO este delocalizat peste grupurile metilbenzen, pirimidină și amidă. Tranzițiile de cea mai joasă energie HOMO→LUMO+1 și HOMO-LUMO+2 simulate în apă la 258 nm și observate experimental la 257 nm este datorată transferului de sarcină de la grupurile metilbenzen și pirimidină la inelul fenil.

## 5.5 Concluzii

Combinând calcule de mecanică moleculară și de tip DFT am reușit să caracterizăm 20 de conformeri ai IMT, toți fiind confirmați ca și minime pe suprafața de energie potențială. Energiile Gibbs relative ale celor 9 cei mai stabili monomeri ai IMT în apă sunt în domeniul 0 - 0.49 kcal·mol<sup>-1</sup> și împreună dau o populație de peste 68% din populația totală.

În soluție apoasă IMT prezintă trei peak-uri de absorbție UV-Vis în domeniul 195-203 nm, 237 nm și 257 nm. Am făcut atribuirea tranzițiilor electronice pe baza spectrelor calculate și mediate prin populațiile Boltzmann ale monomerilor IMT în apă. În timp ce setul de bază 6-31G(d) pare a fi o alegere optimă pentru optimizarea geometriilor conformerilor IMT și pentru compuși asemănători, pentru calculul energiilor relative și a energiilor de excitare electronică este necesar setul de bază 6-31+G(d,p). Reproducerea cantitativă a peak-ului de absorbție electronică de cea mai joasă energie a fost posibilă numai prin folosirea funcționalei CAM-B3LYP.

Pe baza datelor termochimice calculate am estimat o valoare de 2.26 pentru raportul fracțiilor molare  $x_{\alpha}/x_{\beta}$  corespunzătoare celor două forme polimorfice cunoscute ale IMT, în excelent acord cu datele experimentale existente în literatura de specialitate.

---

**Bibliografie**

- [Ada99] C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.*, 110 (1999) 6158-6169.
- [Ale10] A. Aleksandrov, T. Simonson, *J. Comput. Chem.*, 31 (2010) 1550-1560.
- [APFD] A. Austin, G. Petersson, M. J. Frisch, F. J. Dobek, G. Scalmani, and K. Throssell, *J. Chem. Theory and Comput.*, 8 (2012) 4989-5007.
- [Ati16] M. Atif, M. Azeem, M. Rehan Sarwar, SpringerPlus, 5 (2016) 182.
- [Bal82] U. Balachandran, N. G. Eror, *J. Solid State Chem.*, 42 (1982) 276-282.
- [Bar14] V. Barone, M. Biczysko, J. Bloino, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 1759-1787.
- [Bar15] V. Barone, E. Benassi, I. Carnimeo, in J.L. Rivail, M. Ruiz-Lopez, X. Assfeld X., *Quantum Modeling of Complex Molecular Systems. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*, vol 21, 2015, Springer, Cham.
- [Bec93] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 98 (1993) 5648-5652.
- [Bia10] M. Bialer, K.K. Midha, *Epilepsia*, 51 (2010) 941–950.
- [Biorad] Bio-Rad Laboratories, Inc. SpectraBase; SpectraBase Compound ID=UhBVhrEdKp <http://spectrabase.com/compound/UhBVhrEdKp> (accessed Jul 21, 2017).
- [Bor09] M. Bortolotti, L. Lutterotti and I. Lonardelli, *J. Appl. Cryst.*, 42 (2009) 538-539.
- [Buc17] K. Buckley, A.G. Ryder, *Appl. Spectrosc.*, 71 (2017) 1085-1116.
- [Cam71] A. Camerman, N. Camerman, *Acta Cryst. B27* (1971) 2205.
- [Car03] M. Carter, V. Stephenson, D. Weaver, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 638 (2003) 57-62.
- [Cas98] M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R. Salahub, *J. Chem. Phys.*, 108 (1998) 4439-4449.
- [Che11] I.-J. Chen, N. Foloppe, *Drug. Dev. Res.*, 72 (2011) 85-94.
- [Chi14] S. Chibani, D. Jacquemin, A.D. Laurent, *Comput. Theor. Chem.*, 1040–1041 (2014) 321–327
- [Chu15] L. W. Chung, W. M. C. Sameera, R. Ramozzi, A. J. Page, M. Hatanaka, G. P. Petrova, T. V. Harris, X. Li, Z. Ke, F. Liu, H.-B. Li, L. Ding, K. Morokuma, *Chem. Rev.*, 115 (2015) 5678–5796.
- [Cla06] A.E. Clark, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 3790-3796.
- [Cor16] Y. Cornaton, M. Ringholm, O. Louant, K. Ruud, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 (2016) 4201-4215.
- [Cou03] R. Coupeze, R. Straetemans, G. Sehgal, A. Stockis, Z.S. Lu, *J. Clin. Pharm.* 43 (2003) 1370–1376.
- [Dat04] S. Datta, D.J.W Grant, *Nat. Rev. Drug Disc.*, 3 (2004) 42-57.
- [Deg14] K. Dégardin, Y. Roggo, P. Margot, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 87 (2014) 167– 175.
- [Dic09] Diculescu VC, Chiorcea-Paquima A-M, Tugulea L, Vivan M, Oliveira-Brett A-M, *Bioelectrochemistry*, 74 (2009)278–288.
- [Dit74] R. Ditchfield, *Mol. Phys.* 27 (1974) 789-807.
- [Duc07] L. Ducasse, F. Castet, A. Fritsch, I. Huc and T. Buffeteau, *J. Phys. Chem. A*, 111 (2007) 5092-5098.
- [Eti14] T. Etienne, C. Michaux, A. Monari, X. Assfeld, E.A. Perpète, *Dyes Pigm.*, 100 (2014) 24-31.
- [Far09] M.U. Farooq, A. Bhatt, A. Majid, R. Gupta, A. Khasnis, M.Y. Kassab, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 66 (2009) 541–561.
- [Fri84] M.J. Frisch, J.A. Pople and J.S. Binkley, *J. Chem. Phys.*, 80 (1984) 3265-3269.
- [Gau09] Gaussian 09, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.
- [Geo14] F. George, N. Tumanov, B. Norberg, K. Robeyns, Y. Filinchuk, J. Wouters, T. Leyssens, *Cryst. Growth Des.*, 14 (2014) 2880-2892.
- [Gog01] T.M. El-Gogary, M.S Soliman, *Spectrochim. Acta A*, 57 (2001) 2647 – 2657.
- [Gri13] Grillo D, Polla G, Vega D, *J. Pharm. Sci.*, 101 (2013) 541–551.
- [Gua02] F. Gualtieri, D. Manetti, M.N. Romanelli, C. Ghelardini, *Curr. Pharm. Des.*, 8 (2002) 125–138.
- [Had14] Al-Hadiya BMH, Bakheit AHH, Abd-Elgalil AA, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Chapter Six - Imatinib Mesylate, 39 (2014) 265-298.
- [Hal15] A. Halasa, L. Lapinski, I. Reva, H. Rostkowska, R. Fausto and M. J. Nowak, *J. Phys. Chem. A*, 119 (2015) 1037–1047.
- [Hed13] A. Hédoux, Y. Guinet, L. Paccou, F. Danède, P. Derollez, *J. Pharm. Sci.*, 102 (2013) 162-170.
-



- [Heh72] W.J. Hehre, R. Ditchfield, J.A. Pople, *J. Chem. Phys.*, 56 (1972) 2257-2261.
- [Her13] C. Herman, V. Vermeylen, B. Norberg, J. Wouters and T. Leyssens, *Acta Cryst. B*69 (2013), 371-378.
- [Hig17] K. Higashi, K. Ueda, K. Moribe, *Adv. Drug. Delivery Rev.*, 117 (2017) 71-85.
- [Hoh64] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.*, 136 (1964) B864.
- [Hon71] B. Honig, M. Karplus, *Nature*, 229 (1971) 558-560.
- [Hum96] S. Humbel, S. Sieber, K. Morokuma, *J. Chem. Phys.*, 105 (1996) 1959-1967.
- [Ict15] E. İçten, A. Giridhar, Z. K. Nagy, G. V. Reklaitis, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 17 (2015) 284-293.
- [Ild12] G.O. Ildiz, I.Boz, O. Unsalan, *J. Optics and Spectroscopy*, 112 (2012) 665-670
- [Jes15] A.J. Lopes Jesus, S. Jarmelo, R. Fausto and I. Reva, *Spectrochim. Acta A*, 140 (2015) 54-64.
- [Jua13] Juaristi E, Notario R, *Struct. Chem.*, 24 (2013) 1855-1862.
- [Kha90] Y.D. Khamchukov, S.N. Shashkov, I.V. Lukomskii, *J. Appl. Spectrosc.* 53 (1990) 1281-1286.
- [Kim03] T. Kimura and Y. Nagao, *Bull. Fac. Sci. Tech. Hirosaki Univ.* 5, 11 (2003).
- [Kin11] M.D. King, W.D. Buchanan, T.M. Korter, *J. Pharm. Sci.*, 100 (2011) 1116-1129.
- [Kla00] Klamt A, Eckert F, *Fluid. Phase Equilibr.*, 172 (2000) 43-72.
- [Kli16] H. Klitgaard, A. Matagne, J.M. Nicolas, M. Gillard, Y. Lamberty, M. De Ryck, R.M. Kaminski, K. Leclercq, I. Niespodziany, C. Wolff, M. Wood, J. Hannestad, S. Kervyn, B. Kenda., *Epilepsia*, 57 (2016) 538-48.
- [Kra07] G. Krämer, A. Biraben, M. Carreno, A. Guekht, G.J.de Haan, J. Jedrzejczak, D. Josepchs, K. van Rijckevorsel, G. Zaccara G, *Epilepsy Behav.*, 11 (2007) 46-52.
- [KS65] W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.*, 140 (1965) A1133.
- [Kse10] D.N. Ksenafontov, N.F. Moiseeva, L.V. Khristenko, N.M. Karasev, I.F. Shishkov, L.V. Vilkov, *J. Mol. Struc.*, 984 (2010) 89-95.
- [Ksi11] D. Ksienski, *Clin. Med. Insights Oncol.*, 5 (2011) 365-379.
- [Lac12] F. Lachaud, C. Jeandon, M. Beley, R. Ruppert, P.C. Gros, A. Monari and X. Assfeld, *J. Phys. Chem. A* 116 (2012) 10736-10744.
- [Lap01] A Łapiński, J. Spanget-Larsen, M. Langgård, J. Waluk, J. G. Radziszewski, *J. Phys. Chem. A*, 105 (2001) 10520-10524.
- [Lee88] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B*, 37 (1988) 785.
- [Li11] L. Li, Y.-K. Si, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 56 (2011) 465-470.
- [Lin91] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, 1991.
- [Lop11] F.Lopez-Vallejo, M. Fragoso-Serrano, G. A. Suarez-Ortiz, A.C. Hernandez-Rojas, C.M. Cerda-García-Rojas, R. Pereda-Miranda, *J. Org. Chem.*, 76 (2011) 6057-6066.
- [Luc14] **R. Luchian**, R.-A. Domokos, C. Chiş, M. Vasilescu, E. Vințeler, V. Chiş, *Studia UBB Physica*, 59 (LIX), 2 (2014) 85-98.
- [Luc15] **R. Luchian**, E. Vințeler, C. Chiş, M. Vasilescu, N. Leopold, V. Chiş, *Croat. Chem. Acta*, 88 (2015) 511-522.
- [Luc17] **R. Luchian**, E. Vințeler, C. Chiş, M. Vasilescu, N. Leopold 1, J.P. Prates Ramalho, V. Chiş, *J. Pharm Sci.*, 106 (2017) 3564-3573.
- [Mak02] Maki RG, Awan RA, Dixon RH, Jhanwar S, Antonescu CR, *Int. J. Cancer*, 100 (2002) 623-626.
- [Mar03] R.L. Martin, *J. Chem. Phys.* 118 (2003) 4775-4777.
- [Mar15] S. Marković and J. Tošović, *J. Phys. Chem. A* 119 (2015) 9352-9362.
- [Mat02] A.E. Mattsson, *Science*, 298 (2002) 759-760.
- [Muc11] Mucs D, Bryce RA, Bonnet P, *J. Comput. Aid Mol. Des.*, 25 (2011) 569-581.
- [Mul09] Muller BA, *Curr. Pharm. Des.*, 15 (2009) 120-133.
- [Nag02] N. Naga, Master Thesis, *An investigation into the possible neuroprotective properties of phenytoin*, Rhodes University 2002.
- [Nag02b] Nagar B, Bornmann W, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J, *Cancer. Res.*, 62 (2002) 4236-4243.
- [Ner16] N. Nergui, M.-J. Chen, J.-K. Wang, Y.-L. Wang, C.-R. Hsing, C.-M. Wei, Kaito Takahashi, *J. Phys. Chem. A*, 120 (2016) 8114-8122.
- [Ohs80] T. Ohsaka, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 48 (1980) 1661-1668.
- [Ora15] V. Oral, S.Ç. Andaç, *J. Pharm. Istanbul Univ.*, 45 (2015) 253-266.
- [Par04] R.B. Parthasaradhi, R.K. Rathnakar, R.R. Raji, R.D. Muralidhara, C.R.K. Subash, "Novel crystalline forms of levetiracetam", Patent WO2004083180 A1, September 30, 2004.
- [Per13] Perrier A, Maurel F, Browne WR, Jacquemin D, *Chem. Comm.*, 49 (2013) 4247-4249.
- [Per96] J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.*, 77 (1996) 3865.
- [Per97] J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.*, 78 (1997) 1396.



- [Pic15] M. Piccardo, J. Bloino, V. Barone, *Int. J. Quantum Chem.*, 115 (2015) 948–982.
- [Pin17] E. Pindelska., A. Sokal., W. Kolodziejski, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 117 (2017) 111-146.
- [Pis14] P. Pisani, P. Piro, S. Decherchi, G. Bottegoni, D. Sona, V. Murino, W. Rocchia, A. Cavalli, *J. Chem. Theory Comput.*, 10 (2014) 2557–2568.
- [Pit05] A. Pitkanen, *Epilepsy Curr.*, 5 (2005) 14-16.
- [Pol01] Poling BE, Prausnitz JM, O’Connell JP (2001) *The Properties of Gases and Liquids*, McGraw-Hill, New York
- [Ren14] S. Renuga, S. Muthu, *Spectrochim. Acta A*, 118 (2014) 702–715.
- [Rub02] Rubin BP, Schuetze SM, Eary JF, Norwood TH, Mirza S, Conrad EU, Bruckner JD, *J. Clin. Oncol.*, 20 (2002) 3586–3591.
- [Sca10] G. Scalmani and M.J. Frisch, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 114110.
- [Sch09] Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J, *Science*, 289 (2009) 1938–1942.
- [Shi13] Y. Shi, Z. Xia, J. Zhang, R. Best, C. Wu, J. W. Ponder, P. Ren, *J. Chem. Theory Comput.*, 9 (2013) 4046-4063.
- [Sjö14] J. Sjöqvist, R.C. González-Cano, J.T. López Navarrete, J. Casado, M.C. Ruiz Delgado, M. Linares, P. Norman, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16 (2014) 24841-24852.
- [Son03] J. Song, K.X. Lou, X.J. Li, X.P. Wu, R.X. Feng, *Acta Cryst.* E59 (2003) 1772-1773.
- [Son11] H.H. Sonmez Turk, N.J. Azar, *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.*, 3 (2011) 17-25.
- [Sou07] S.F. Sousa, P. Fernandes, and M. Joao Ramos, *J. Phys. Chem. A*, 111 (2007) 10439-10452.
- [Ste94] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 11623-11627.
- [Sur14] Suresh Kumar NV, Singh H, *J. Phys. Chem. A*, 118 (2014) 2120-2137.
- [Tha09] R.K. Thaper, M.D. Prabhavat, *A novel polymorph of levetiracetam and a process for its preparation*, Patent WO2009050735A1, April 23, 2009.
- [Tho06] F.C. Thorley, K.J. Baldwin, D.C. Lee, D.N. Batchelder, *J. Raman Spectrosc.*, 37 (2006) 335-341.
- [Tie08] K.E. Tiedje and D.F. Weaver, *Can. J. Neurol. Sci.*, 35 (2008) 232-236.
- [Tom05] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.*, 105 (2005) 2999-3093.
- [Ull09] C.M. Ulla, A. Towfigh, J. Safdieh, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 5 (2009) 467-476.
- [Vai15] S. Vaithianathan, S. Raman, W. Jiang, T.Y. Ting, M.A. Kane, J.E. Polli, *Mol. Pharmaceutics.*, 12 (2015) 2436–2443.
- [Vei09] M. de Veij, P. Vandenabeele, T. De Beer, J.P. Remon, L. Moens, *J. Raman Spectrosc.*, 40 (2009) 297–307.
- [Vel14] G. Velmurugan, B. K. Ramamoorthi and P. Venuvanalingam, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16 (2014) 21157-21171.
- [Vin15] E. Vințeler, N.-F. Stan, **R. Luchian**, C. Căinap, J.P. Prates-Ramalho, V. Chiș, *J. Mol. Model.*, 21 (2015) 84.
- [Vos80] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.*, 58 (1980) 1200-1211.
- [War72] A. Warshel, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 5612; A. Warshel, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974) 5677.
- [War76] A. Warshel, M. Levitt, *J. Mol. Biol.*, 103 (1976) 227.
- [Wil14] P.H. Willoughby, M.J. Jansma, T.R. Hoye, *Nat. Protoc.*, 9 (2014) 643–660.
- [Wol90] K. Wolinski, J.F. Hilton, P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 8251-8260.
- [Xio08] Y.Z. Xiong, P.-Y. Chen, *J. Mol. Model.*, 14 (2008) 1083-1086.
- [Xu14] K.L. Xu, B. Liang, X.Q. Wu, L.L. Zhang, P.X. Tang, H. Li, *Powder Diffraction*, 29 (2014) 51-52.
- [Yan04] Yanai T, Tew D, Handy N, *Chem. Phys. Lett.*, 393 (2004) 51-57.
- [Zha09] Zhang J, Yang PL, Gray NS, *Nat. Rev. Cancer*, 9 (2009) 28-39.
- [Zha10] Zhang J, Adrián FJ, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Li AG, Iacob RE, Sim T, Powers J, Dierks C, Sun F, Guo G-R, Ding Q, Okram B, Choi Y, Wojciechowski A, Deng X, Liu G, Fendrich G, Strauss A, Vajpai N, Grzesiek S, Tuntland T, Liu Y, Bursulaya B, Azam M, Manley PW, Engen JR, Daley GQ, Warmuth M, Gray NS, *Nature*, 463 (2010) 501-507.