

Universitatea “Babeş-Bolyai”, Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică
&
Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Ştiinţe

STUDIUL UNOR COMPUŞI BIOLOGIC ACTIVI

Rezumatul tezei de doctorat

Mureşan-Pop Marieta

Coordonator ştiinţific:

Prof. dr. Simon Simion

Februarie 2012

Cuprins

Abstract.....	1
1 Introducere și motivație	3
1.1 Ambazona: Istoric. Proprietăți.	3
1.2 Noțiuni fundamentale: Polimorfism. Săruri. Cocristale.....	3
2 Forme solide. Metode de preparare. Metode de investigare	5
3 Rezultate experimentale	6
3.1 Ambazona monohidrat și anhidră	6
3.1.1 Analiza DTA și TGA	7
3.1.2 Difracția de raze X pe pulberi (PXRD).....	7
3.1.3 Difracție de raze X cu variație de temperatură (VTPXRD).....	8
3.1.4 Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	9
3.1.5 Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solid (CP/MAS NMR)	10
3.1.6 Microscopie electronică de baleaj (SEM)	10
3.1.7 Determinarea structurii cristaline și moleculare prin difracție de raze x pe monocristale	10
3.2 Ambazonă cu acid acetic	13
3.2.1 Difracția de raze X pe pulberi	13
3.2.2 Analize DTA și TGA	14
3.2.3 Difracția de raze X cu variație de temperatură.....	16
3.2.4 Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier.....	16
3.2.5 Determinarea structurii cristaline și moleculare prin difracție de raze X pe monocristale	17
3.3 Ambazonă cu acid clorhidric.....	18
3.3.1 Analize DSC, DTA și TGA.....	18
3.3.2 Difracția de raze X pe pulberi	19
3.3.3 Analiza Spectroscopică în Infraroșu cu Transformata Fourier	20
3.3.4 Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solide.....	20
3.4. Ambazonă cu acid glutamic	21
3.4.1. Analize DSC, DTA și TGA.....	22
3.4.2. Difracția de raze X pe pulberi	22

3.4.3.	Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier	23
3.4.4.	Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solide	24
3.5.	Ambazonă cu acid p-Aminobenzoic	25
3.5.1.	Analize DSC, DTA și TGA.....	25
3.5.2.	Difracția de raze X pe pulberi	26
3.5.3.	Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier	26
3.5.4.	Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solide	27
3.6.	Ambazonă cu acid aspartic.....	27
3.6.1.	Analize DTA și TGA	27
3.6.1.	Difracția de raze X pe pulberi	28
3.6.2.	Difracția de raze X pe pulberi cu variație de temperatură	29
3.6.3.	Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier	29
3.6.4.	Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solid ¹³ C RMN	30
3.7.	Ambazonă cu acid nicotinic	31
3.7.1.	Analize DSC, DTA și TGA.....	32
3.7.2.	Difracția de raze X pe pulberi	33
3.7.3.	Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier	33
3.8.	Ambazona cu acid lactic	34
3.8.2.	Difracția de raze X pe pulberi	35
3.8.3.	Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier	36
4.	Concluzii, contribuții originale, publicații, perspective	38
	Bibliografie selectivă	41

Cuvinte cheie: ambazona, forme solide, monocristale, solvent drop grinding, slurry, difuzie de vapori, vapor digestion, difuzie de lichide, difracție de raze X, FT-IR.

ABSTRACT

Compusul biologic activ investigat în cadrul acestui studiu este substanța antimicrobiană numită ambazona. Acest compus face parte din clasa de medicamente antimicrobiene, și este substanța activă din Faringosept, fiind des utilizată în tratamente locale ale cavității bucale și faringiale. Până în prezent, ambazona a fost puțin studiată din punct de vedere al proprietăților structurale și al posibilității de a forma noi forme solide. Formele solide, care includ polimorfi, solvați, săruri hidrate și co-cristale, pot îmbunătăți în mare măsură solubilitatea, biodisponibilitatea și viteza de dizolvare a compusului activ.

Acest studiu este focusat pe obținerea și caracterizarea structurală a unor noi forme solide ale ambazonei. Necesitatea obținerii de noi forme solide ale ambazonei s-a impus datorită faptului ca e foarte puțin solubilă în apă, fapt ce afectează calitatea compusului farmaceutic.

Teza este structurată în 3 capitole și se încheie cu concluzii generale și perspective. În primul capitol sunt prezentate proprietățile fizico-chimice și farmaceutice ale ambazonei. Capitolul 2 conține o scurtă descriere a metodelor utilizate pentru obținerea formelor solide și pentru creșterea monocristalelor. De asemenea, în această secțiune sunt prezentate metodele de investigare a formelor solide și a monocristalelor: metode termice (DSC, DTA-TGA), tehnici spectroscopice (FT-IR, RMN) și tehnicile de difracție (pe pulberi și monocristale). Capitolul 3 conține rezultatele obținute pentru compușii pe bază de ambazonă obținuți în cadrul acestui studiu. Pornind de la ambazona monohidrat, s-a obținut forma anhidră a ambazonei prin diferite metode de preparare. De asemenea, atât pentru ambazona monohidrat, cât și pentru cea anhidră, s-a reușit obținerea de monocristale prin difuzia de lichide (LDif), fiind astfel posibilă o caracterizare completă a structurii cristaline prin difracție de raze X pe monocristale. Mai mult, au fost stabilite condițiile de transformare între aceste două forme ale ambazonei (monohidrat și anhidră).

O altă abordare a fost aplicarea a diferite metode de preparare pentru obținerea de noi forme ale ambazonei în amestec cu acidul acetic. S-a reușit astfel obținerea a 3 forme solide diferite prin metodele: Solvent Drop Grinding (SDG), Slurry (SL) și Vapor Digestion (VDig); de asemenea, s-au obținut monocristale prin metoda Vapor Diffusion (VDif). Toți acești compuși au fost caracterizați cu ajutorul tehnicilor prezentate în capitolul 2. Mai mult, metoda SDG utilizată în combinație cu diferiți alți compuși (acid clorhidric, acid glutamic, acid

aspartic, acid p-Aminobenzoic, acid nicotinic și acid lactic) a dus la obținerea a noi forme de ambazonă.

Investigările structurale au arătat că toți compușii obținuți în cadrul acestui studiu sunt săruri. Acest aspect este de o deosebită importanță pentru industria farmaceutică, ținând cont că sărurile au o mai mare solubilitate, biodisponibilitate și rată de dizolvare. Astfel, ca o continuare a acestui studiu se impune investigarea acestor proprietăți, pentru evaluarea compușilor obținuți în perspectiva utilizării lor în industria farmaceutică.

CAPITOLUL 1

1 Introducere și motivație

1.1 Ambazona: Istoric. Proprietăți.

Ambazona este compusul activ al medicamentului Faringosept, are aspect de pulbere microcristalină de culoare brun-închis; este inodoră și insipidă și este utilizată în tratamentele locale la nivelul cavității buco-faringiale dar și în tratamente oncostatice. Ulterioarele studii efectuate cu ambazona au evidențiat faptul că are un spectru antibacterial similar cu cel al sulfamidelor [Löber *et Hoffman* 1990] dar și că este lipsită de reacțiile adverse caracteristice medicamentelor oncostatice [Kuhnel *et al* 1988, Baumgart *et al* 1990, Amlacher *et al* 1990]. Deși ambazona a fost descoperită încă din anii '50 de către Domagk, este puțin caracterizată din punct de vedere al proprietăților structurale și a posibilității de formare de noi forme solide. Necesitatea obținerii și a caracterizării de forme solide rezultă din aceea că, acestea pot să îmbunătățească foarte mult proprietățile compusului activ din medicamente în ceea ce privește solubilitatea, biodisponibilitatea și viteza de dizolvare a acestuia. În cazul ambazonei nu au fost raportate forme solide, iar structura cristalină și moleculară a acesteia a fost determinată doar din pulberi [Mocuta *et al* 2008]. Necesitatea obținerii de forme solide pentru ambazonă rezultă din faptul că aceasta este foarte puțin solubilă în apă iar formele solide noi pot contribui la creșterea solubilității acesteia și implicit la îmbunătățirea calității acestui compus farmaceutic. Prezentul studiu are ca obiectiv principal obținerea a cât mai multor forme solide ale ambazonei, caracterizarea acestora din punct de vedere structural prin diferite tehnici, precum și determinarea structurii cristaline și moleculare pe monocristale de ambazonă și pentru formele noi obținute.

1.2 Noțiuni fundamentale: Polimorfism. Săruri. Cocristale.

În termeni științifici, „polimorfism” reprezintă abilitatea unui material – cu aceeași compoziție chimică – de a exista în mai multe tipuri de structură cristalină cu caracteristici fizico-chimice diferite și este un fenomen de larg interes în industria farmaceutică [Bernstein 2006]. Pe plan mondial, cercetările referitoare la polimorfism și obținerea de noi forme solide se axează pe sinteza și caracterizarea fizico-chimică și structurală a formelor solide, în vederea îmbunătățirii calității medicamentelor și reducerea efectelor secundare. Identificarea a cât mai

multe forme solide are un impact major în domeniul tehnologiei, deoarece diferite forme cristaline pot genera o gamă largă de proprietăți fizico-chimice diferite care pot afecta utilizarea materialelor solide. Formele solide includ: polimorfi (aceleși compus cu structura cristalină diferită), solvați (în structura cristalină a compusului este inclus solventul), hidrați (în structura cristalină a compusului sunt incluse și molecule de apă), săruri sau co-cristale care includ în structura cristalină doi componenți diferiți. Diferitele forme solide care se pot obține pentru un compus sunt reprezentate în Figura 1.1. Este posibilă obținerea de sare în cazul în care diferența dintre pK_a pentru compusul de pornire și pK_a pentru compusul cu care se combină acesta este mai mare cu două unități. În acest caz are loc un transfer de proton de la acid la bază. Co-cristalele sau „multi-componente moleculare cristaline” [Bond 2007], sunt structuri moleculare care se leagă în general prin legături de hidrogen. Mult timp co-cristalele s-au considerat a fi cristale multicomponente ce conțin unități moleculare diferite din punct de vedere chimic în unitate asimetrică [Etter *et al* 1993].

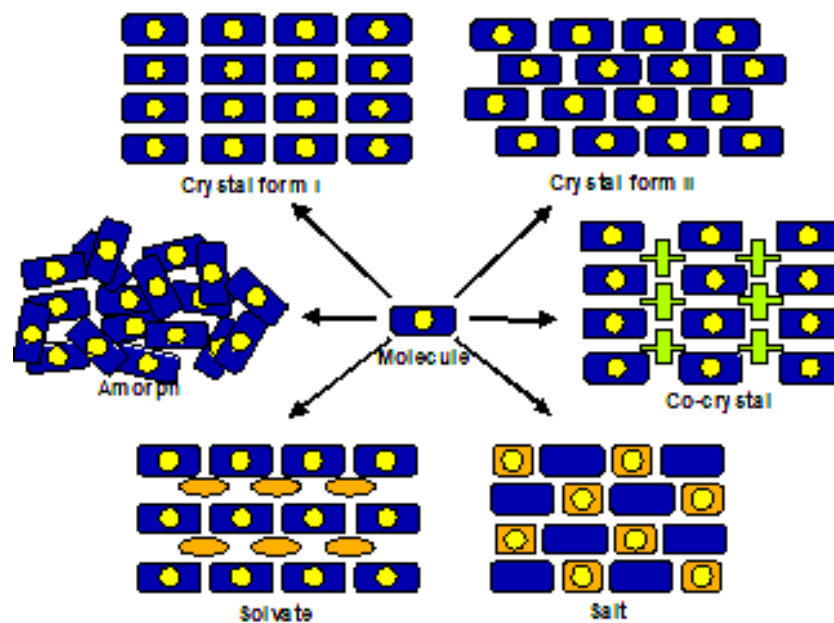


Figura 1.1. Reprezentarea schematică a relației structurale dintre polimorfi (solvați, co-cristale, săruri) și faze amorfe.

CAPITOLUL 2

2 Forme solide. Metode de preparare. Metode de investigare

Metodele cele mai utilizate în obținerea de noi forme solide sunt: recristalizarea din soluție (RC), "solvent-drop" grinding (SDG), expunerea la vapori de solvent sau digestie de vapori (VDig) și slurring (SL) [Brittain 2009].

Recristalizarea (RC): Este metoda cea mai uzuală aplicată în vederea obținerii de noi forme solide sau pentru creșterea de monocristale. Se prepară o soluție saturată a compusului cu un solvent și lasă să se evapore solventul.

Metoda solvent drop grinding (SDG): Probele în formă solidă se amestecă manual într-un mojar de agat împreună cu câteva picături de solvent până când devin uscate.

Metoda Slurring (SL): Materialul solid împreună cu o cantitate de solvent insuficientă pentru a-l dizolva complet, se lasă în agitație pentru o anumită perioadă de timp. Acest experiment se realizează de obicei pentru o perioadă de 2-4 săptămâni sau mai mult.

Digestie de vapori (VDig): Materialul solid se expune pentru diferite perioade de timp la vapori de solvenți sau amestecuri de solvenți.

În scopul obținerii de monocristale dintr-o substanță, se folosesc diferite metode cum ar fi: cristalizare prin evaporare lentă din lichid sau amestecuri de solvenți (RC), expunerea substanței solide la diferite condiții de umiditate sau regimuri de temperatură, difuzie de vapori de lichid (VDif) și difuzie de lichide sau cristalizare multistrat (LDif) [Brittain 2009]. Procesul de cristalizare constă în doi pași succesivi care includ procesul de nucleație și procesul de creștere a cristalului.

Difuzie de vapori (VDif): Este nevoie de două incinte dispuse una în interiorul celeilalte: în prima incintă (vas Berzelius) se pune substanța dizolvată într-un solvent care se evaporă mai greu iar în a doua incintă se pune un solvent volatil în care substanța este insolubilă. Cei doi solvenți trebuie să fie miscibili.

Difuzie lichid-lichid (Ldif): În această tehnică se pot utiliza doi (sau trei) solvenți, primul în care substanța să fie solubilă iar în al doilea solvent trebuie să fie insolubilă. Primul solvent este mai volatil decât al doilea.

CAPITOLUL 3

3 Rezultate experimentale

3.1 Ambazona monohidrat și anhidră

Ambazona monohidrat $C_8H_{11}N_7S \cdot H_2O$ ([4-(2-(Diaminomethylidene)hydrazinyl) phenyl] iminothiourea) (AMB) este un compus cu o solubilitate relativ joasă, are masa moleculară de 255.3 g/mol și punctul de topire între 192°C și 194°C, însoțit de descompunere [Fichtner *et al* 1983, Kuhnel *et al* 1988], Formula structurală este prezentată în Figura 3.1.1.

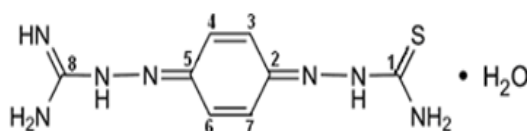


Figura 3.1.1. Formula structurală a Ambazonei

Ambazona anhidră (AMBanh) a fost obținută prin expunerea ambazonei monohidrate la tratament termic timp de 30 minute, la temperatura de 140°C, urmată de o răcire lentă la 25°C. Aplicând metodele descrise în Capitolul 2 au fost preparate diferite probe, și ulterior investigate prin metodele analitice recomandate pentru studiul formelor solide, anume: analize termice (DTA și TGA), difracția de raze X pe pulberi (PXRD) și pe monocristale, spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR), rezonanță magnetică nucleară pe solide (RMN) și microscopie electronică de baleaj (SEM). În Tabelul 3.1.1 sunt prezentate informații referitoare la prepararea probelor.

Tabelul 3.1.1. Prepararea probelor

Precursori	Metode
AMBanh : Acetonă	<i>Recristalizare (RC)</i> 2zile, 25°C
AMB : H ₂ O	<i>Solvent drop grinding (SDG)</i> , mojarare manuală în mojar de agat 5 minute
AMB : AMBanh : Dichl (10mg:70mg:2ml) AMB : AMBanh : Dichl : H ₂ O (10mg:70mg:2ml:0.04ml) AMBanh : Dichl : H ₂ O (90mg:2ml:0.04ml)	<i>Slurrying (SL)</i> 5 zile

3.1.1 Analiza DTA și TGA

Măsurătorile termice pentru AMB și AMBanh au fost efectuate de la temperatura camerei până la temperatura de 400°C, cu o rată de încălzire de 10°C/min.

Analizele simultane DTA-TGA pentru AMB (Figura 3.1.2.a) au arătat două evenimente termice bine-definite: unul endoterm la ~ 135°C asociat cu o pierdere de masă TGA de ~ 6,5%, care corespunde cel mai probabil pierderii apei de cristalizare; un eveniment exoterm la ~215°C, asociat cu o pierdere de masă de ~30,7% datorată procesului de descompunere termică. Datorită descompunerii puternice, evenimentul de topire a AMB, nu este clar definit. În cazul AMBanh, este vizibilă pe curba DTA doar descompunerea evidențiată prin semnalul exoterm și nu există nici un semnal endoterm vizibil caracteristic pierderii de apă.

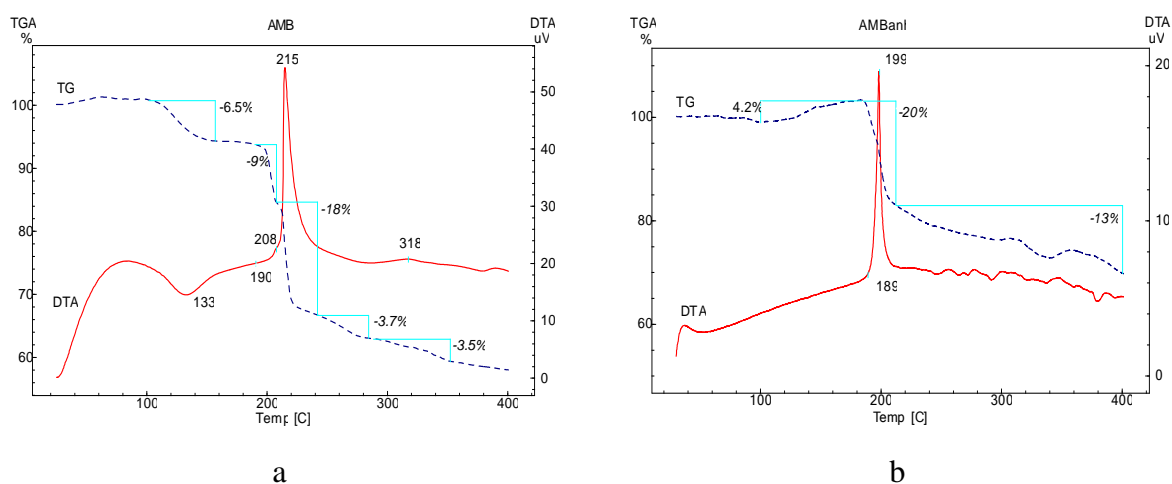


Figura 3.1.2. Termogramele DTA și TGA pentru: AMB (a) și AMBanh (b).

3.1.2 Difrakția de raze X pe pulberi (PXRD)

Analiza PXRD arată că prin aplicarea unor metode diferite de recristalizare și folosirea de solvenți diferiți, forma de ambazonă monohidrat se transformă în formă anhidră și vice-versa. Prin recristalizarea ambazonei anhidre cu acetonă se obține ambazonă monohidrat iar prin recristalizare cu cloroform rezultă forma anhidră (Figura 3.1.3.a). Prin aplicarea metodei slurry s-a pregătit o soluție saturată din ambazonă monohidrat și anhidră cu diclormethan (Dichl) și altă probă identică, dar la care s-a adăugat apă (AMB: AMBanh: Dichl), (AMB: AMBanh: Dichl: H₂O). Probele au fost lăsate în suspensie timp de 5 zile. (Figura 3.1.3.b.)

Din analiza probelor prin difracție de raze X pe pulberi, s-a constatat că proba AMB+AMBanh+Dichl_SL este identică cu AMBanh, dar este diferită de proba la care s-a adăugat și apă AMB+AMBanh+Dichl+H₂O_SL, care este identică cu ambazona monohidrat.

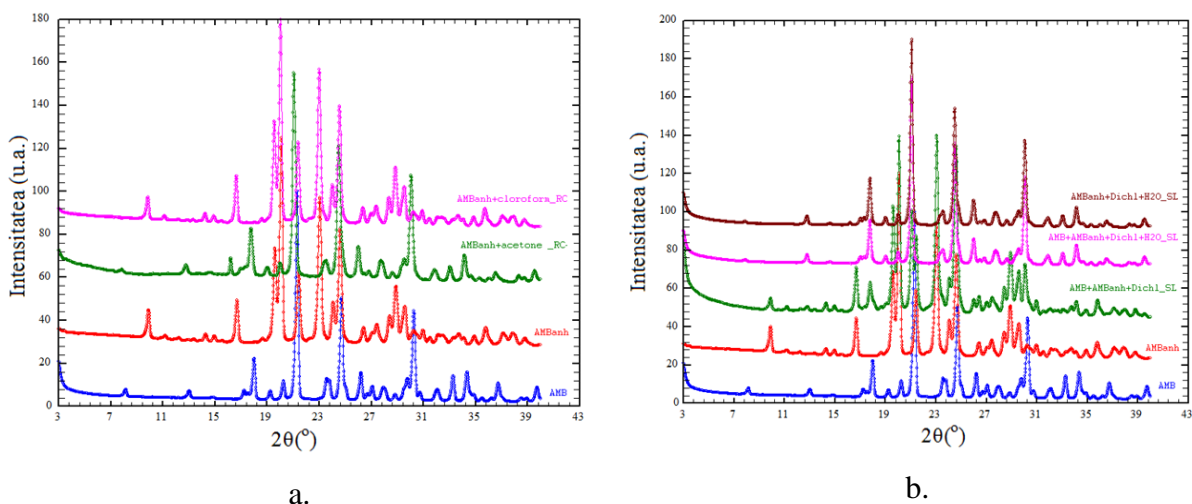


Figura 3.1.3. Difractogramele de raze X pentru formele obținute prin recristalizare din clorofর্ম și acetona (a), Slurry timp de 5 zile (b), comparate cu AMB și AMBanh.

În Figura 3.1.3.c sunt prezentate transformările structurale care au loc în urma recristalizării prin diferite metode. Se observă că în funcție de metoda de cristalizare ambazona monohidrat se transformă în ambazonă anhidră și invers.

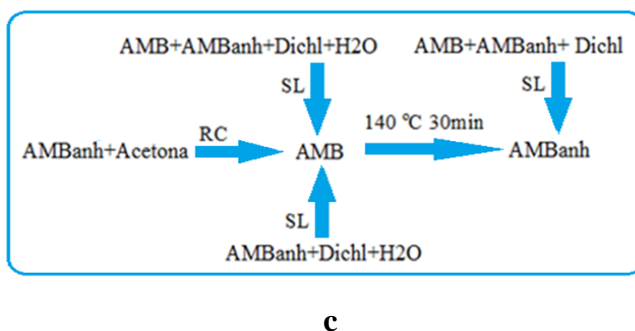


Figura 3.1.3. Diagrama transformărilor datorate proceselor aplicate probelor (c).

3.1.3 Difracție de raze X cu variație de temperatură (VTPXRD)

Pentru a urmări posibilele modificări în forma solidă a ambazonei monohidrate s-au efectuat măsurători prin difracție de raze X cu variație de temperatură prin încălzire (VDPXRD). A fost încălzit un eșantion de AMB la temperaturi diferite, în intervalul de temperatură 90-210°C și s-au colectat informațiile din difractogramele de raze X înregistrate, la temperaturile respective (Figura 3.1.4.). În intervalul de temperatură de 25-90°C difractogramele obținute pentru AMB sunt similare deci prin urmare, nu există modificări în forma solidă. La 100°C,

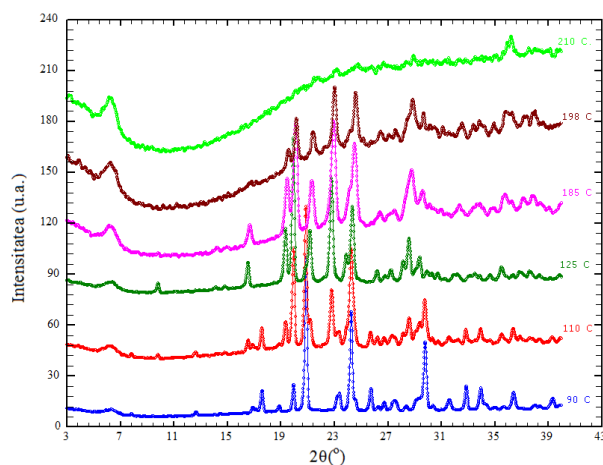


Figura 3.1.4. Difractogramele de raze X pentru AMB la diferite temperaturi.

apare forma anhidră de ambazonă și își menține cristalinitatea până la 198°C. După această temperatură la 210°C materialul este complet amorf. Putem concluziona că ambazona monohidrat este stabilă termic în stare solidă de până la 198°C, după care structura colapsează în faza amorfă.

3.1.4 Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Spectrele de absorbție FTIR au fost înregistrate pentru ambazona monohidrat (AMB) și pentru forma anhidră (AMBanh) (Figura 3.1.5.a,b). Analiza FTIR a evidențiat faptul că diferența dintre spectrele obținute pentru forma monohidrat respectiv anhidră a ambazonei, se datorează modificărilor structurale care se reflectă în benzile de absorbție caracteristice aminelor primare și secundare.

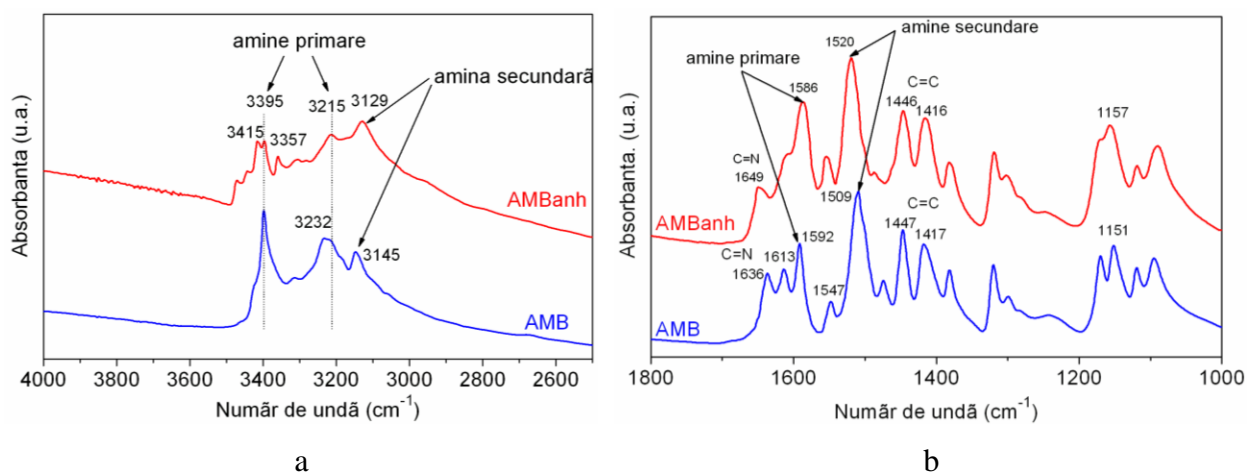


Figura 3.1.5. Spectrele FTIR obținute pentru ambazona monohidrat și anhidră în intervalul spectral 4000-2500 cm⁻¹ (a) și 1800-1000 cm⁻¹ (b).

Pentru AMB au fost identificate vibrațiile de întindere ale aminelor primare în jurul valorilor de ~3398 și 3232 cm⁻¹, respectiv la ~3397, 3415 și 3214 cm⁻¹ pentru AMBanh (Figura 3.1.5.a). Vibrațiile de întindere ale aminelor secundare au fost identificate la ~3145 cm⁻¹ pentru AMB, respectiv ~3129 cm⁻¹ pentru AMBanh [Socrates 2001].

Pentru AMB, benzile de intensitate medie, de la ~1636 și 1613 cm⁻¹ sunt atribuite vibrațiilor de deformare C = N [Stilinovic *et al* 2008], aceste vibrații conducând la o bandă relativ largă în jurul valorii de ~1649 cm⁻¹ în spectrul obținut pentru AMBanh. Vibrațiile de la ~1592, 1586 cm⁻¹ pentru AMB respectiv AMBanh sunt atribuite vibrațiilor de deformare din amine primare NH₂ [Koleva *et al* 2009, Socrate 2001]. Vibrațiile de deformare din aminele secundare de la ~1509 cm⁻¹ corespunzătoare ambazonei monohidrate, sunt deplasate la ~1520 cm⁻¹, în spectrul de formă anhidră AMBanh.

3.1.5 Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solid (CP/MAS NMR)

În spectrele ^{13}C CP/MAS NMR (Figura 3.1.6.), s-au identificat opt linii de rezonanță, corespunzătoare celor opt carboni care se găsesc în structura moleculei de ambazonă: (i) liniile de rezonanță din regiunea 110-140 ppm corespund atomilor de carbon protonați din inelul aromatic C3, C4, C6, C7, (ii) cele două linii de la ~ 146 ppm sunt atribuite atomilor de carbon neprotonați C2, C5, iar (iii) liniile de rezonanță de la 162 ppm și 175 ppm sunt atribuite carbonului C8, respectiv carbonului C1.

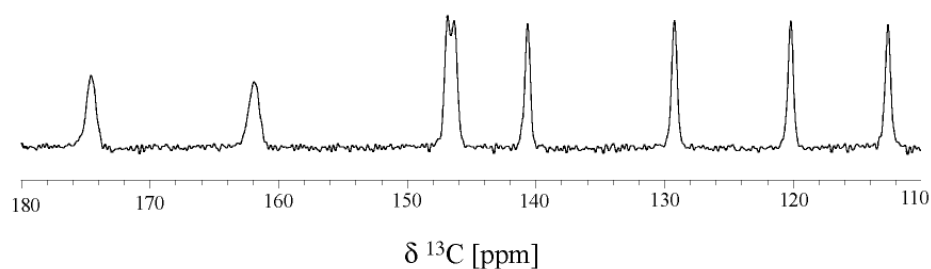


Figura 3.1.6. Spectrul ^{13}C CP/MAS NMR ale AMB ($\nu\text{R} = 15$ kHz, CP = 2 ms).

3.1.6 Microscopie electronică de baleaj (SEM)

În Figura 3.1.7.a,b, sunt prezentate imaginile SEM obținute pentru ambazona monohidrat, respectiv anhidră sub formă de pulbere cristalină. Se observă morfologia diferită a celor doi compuși AMB și AMBanh.

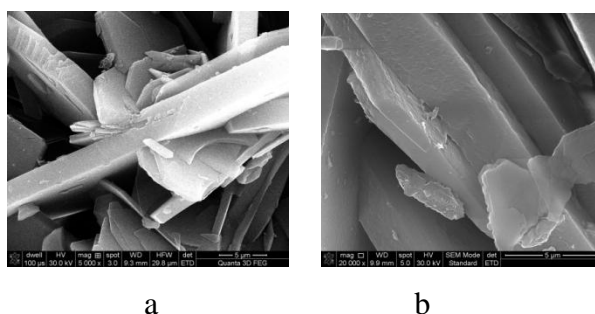


Figura 3.1.7. Imaginile SEM pentru AMB (a) și AMBanh (b).

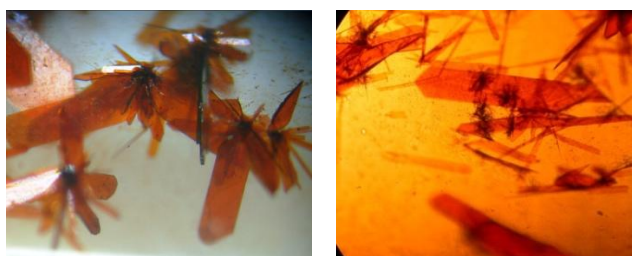
3.1.7 Determinarea structurii cristaline și moleculare prin difracție de raze x pe monocristale

Monocristalele de ambazonă monohidrat și ambazonă anhidră au fost obținute prin aplicarea metodei de cristalizare multi-strat (sau difuzie de lichide). Au fost folosite trei straturi de lichid, suprapuse și lăsate să difuzeze.

AMB: Din ambazona monohidrat cu acetonă s-a preparat o soluție saturată. Din această soluție 2 ml a fost plasată într-o eprubetă apoi s-a adăugat pentan 2 ml și eter 2 ml.

AMBanh: Din ambazonă monohidrat cu acid p-Aminobenzoic și nitromethan s-a preparat o soluție saturată. Din această soluție s-a plasat 2ml într-o eprubetă apoi s-a adăugat al doilea strat de 2ml tetrahydrofuran și al treilea strat cu 2ml de hexan.

Sistemele închise, au fost lăsate să reacționeze timp de 5 zile la temperatura camerei. Monocristalele de ambazonă monohidrat și anhidră au fost vizualizate cu microscopul în lumină polarizată. S-au obținut cristale în formă de plachete de dimensiuni ~0.08-0.3 mm, acceptabile pentru



a b

Figura 3.1.8. Monocristalele de AMB (a) și AMBanh (b).

măsurători de difracție pe monocristale (Figura 3.1.8.a, b).

Din analiza de difracție de raze X pe monocristale s-a stabilit sistemul cristalografic, parametrii celulei elementare și grupul spațial. De asemenea, s-a stabilit configurația moleculară, legăturile de hidrogen și împachetarea moleculară pentru ambazona monohidrat (Figura 3.1.9, 3.1.10). Există patru unități asimetrice în celula elementară, și o moleculă de ambazonă monohidrat în unitatea asimetrică. În structura monocristalului de ambazonă monohidrat sunt prezente următoarele legături de hidrogen: S1-N1: S1-N12: N14-O15 (apa): O15-S1: N2-O15 (apa). Molecula de apă face legătura dintre cele două molecule de ambazonă prin punțile de hidrogen care se formează.

Date cristalografice pentru ambazona monohidrat

Formula moleculară	$C_8 H_{11} N_7 S \cdot H_2O$
Masa molară	255.30 g/mol
Sistemul cristalografic	monoclinic
Grupul spațial	$P2_1/c$
Parametrii celulei elementare	$a = 7.2008(10) \text{ \AA}, b = 7.2753(9) \text{ \AA}, c = 22.363(2) \text{ \AA}$ $\alpha = 90.00^\circ, \beta = 90.00^\circ, \gamma = 90.00^\circ.$
Volumul celulei	$1171.55(20) \text{ \AA}^3$
Z (Nr. Molecule pe celulă)	4 (1 moleculă pe unitatea asimetrică)
Densitatea calculată	1.368 g/cm^3
R	0.08
Goodness-of-fit on F^2	1.272.

Deși toate unghiurile sunt de 90° , sistemul cristalografic este monoclinic.

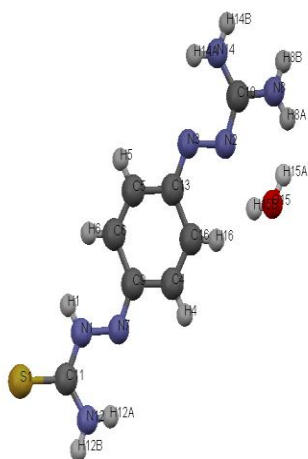


Figura 3.1.9. Configurația moleculară pentru ambazona monohidrat

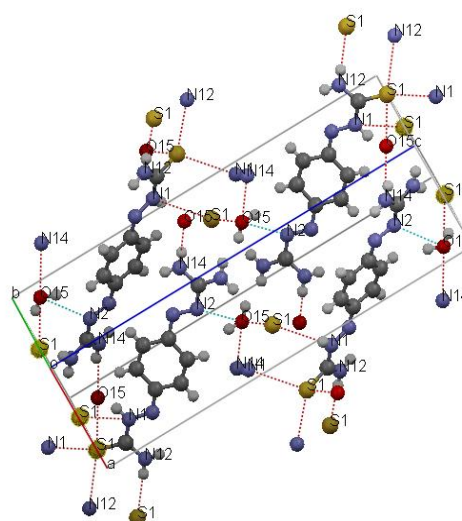


Figura 3.1.10. Împachetarea moleculară și legăturile de hidrogen pentru ambazona monohidrat.

Analiza pe monocristale de ambazonă anhidră a condus la determinarea sistemului cristalografic, parametrii celulei elementare și a grupului spațial. De asemenea s-a determinat configurația moleculară, legăturile de hidrogen și împachetarea moleculară pentru ambazona anhidră (Figura 3.1.11, 3.1.12.). Există două unități asimetrice în celula elementară, și două molecule de ambazonă anhidră în unitatea asimetrică. S-au identificat următoarele legături de hidrogen: S1-N11, S1-N12, N6-N15. Moleculele de ambazonă se leagă între ele prin punți de hidrogen.

Date cristalografice pentru ambazona anhidră

Formula moleculară	$C_8 H_{11} N_7 S$
Masa molară	237.30 g/mol
Sistemul cristalografic	monoclinic
Grupul spațial	$P 1 21 1$ (no. 4)
Parametrii celulei elementare	$a = 7.847(10) \text{ \AA}$, $b = 17.856(2) \text{ \AA}$, $c = 8.365(2) \text{ \AA}$ $\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 109.45(2)^\circ$, $\gamma = 90.00^\circ$
Volumul celulei	$1105.2(3) \text{ \AA}^3$
Z (Nr. Molecule pe celulă)	4 (cu 2 molecule pe unitatea asimetrică)
Densitatea calculată	1.426 g/cm^3
R	0.0995
Goodness-of-fit on F^2	1.141

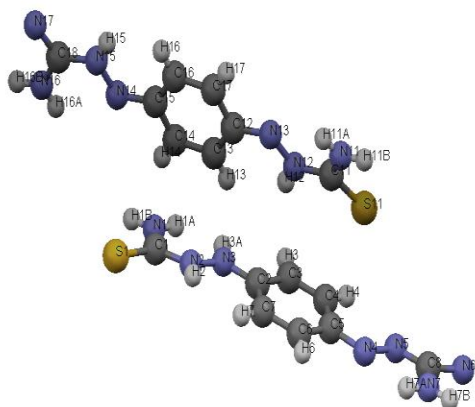


Figura 3.1.11. Configurația moleculară pentru ambazona anhidră

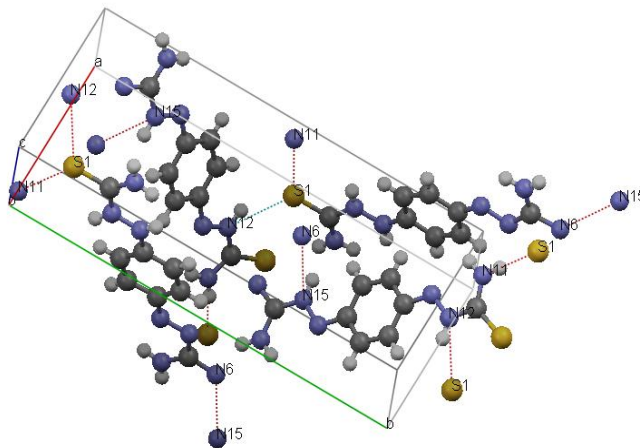


Figura 3.1.12. Împachetarea moleculară și legăturile de hidrogen pentru ambazona anhidră.

3.2 Ambazonă cu acid acetic

Ambazona monohidrat are valorile lui $pK_a(B)$: 6.27; 7.37; 10.67 [Kuhnel *et al* 1988], [Löber *et Hoffmann* 1990, Petersen *et al* 1955] iar acidul acetic ($C_2H_4O_2$) are $pK_a(A)$ în jur de 4.76, motiv pentru care s-a încercat obținerea unui compus de tip sare, din ambazonă cu acid acetic. Probele au fost preparate prin trei metode: SDG, SL și VDig. În scopul identificării diferitelor forme solide obținute, probele au fost investigate cu PXRD (3.2.1.). Pentru caracterizarea lor ulterioară pentru fiecare formă solidă au fost aplicate metode suplimentare de analiză (3.2.2-3.2.4).

3.2.1 Difrakția de raze X pe pulberi

În urma analizelor PXRD s-au constatat următoarele:

1. Difractogramele obținute pentru probele de ambazonă (AMB) cu acid acetic (ACE) preparate prin metoda SDG în raport molar (1:1) și (2:1) sunt diferite între ele și față de ambazona pură. Aceste două forme ale ambazonei cu acid acetic au fost notate notate cu F1 (proba cu raportul molar 1:1), respectiv F2 (proba cu raportul molar 1:2), (Figura 3.2.1.).

2. Probele obținute prin metoda SL, preparate cu acid acetic sau cu amestec din acid acetic și diclorometan au fost identificate prin PXRD ca fiind identice cu forma F2.

3. Au fost preparate trei probe prin metoda Vdig, anume prin expunerea ambazonei monohidrate sub formă solidă la vapori de acid acetic pentru timpi diferiți. Analiza PXRD a arătat că proba obținută după 32 ore este o formă nouă și a fost notată cu F3. Probele expuse la vapori de acid acetic timp de 14 zile și 30 de zile au difractogramele identice cu cea obținută pentru forma F2. Proba obținută după 5 zile de Vdig este o sumă dintre formele solide F2 și F3

(Figura 3.2.2.). În concluzie se poate preciza că după 32 de ore de expunere la vapori de acid acetic apare prima fază F3, după care începe să se transforme parțial în F2 după 5 zile (este un amestec dintre F2 și F3) și este complet transformată după 14 zile. Forma identificată ca fiind cea mai stabilă este forma F2. Forma F2 rămâne stabilă chiar și după expunerea la vapori de 30 de zile.

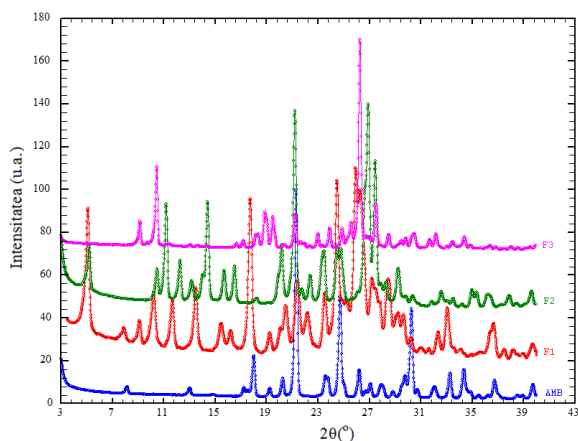


Figura 3.2.1. Difractogramele de raze X pentru formele obținute cu acid acetic, comparate cu difractograma ambazonei.

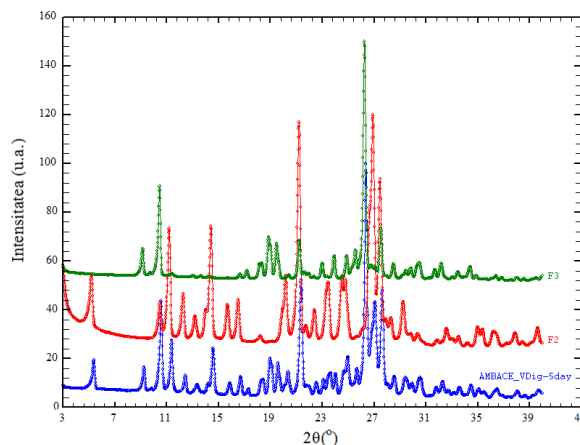


Figura 3.2.2. Difractogramele de raze X pentru proba AMBACE_VDig-5Day și probele F2 și F3.

Din indexarea difractogramelor pentru formele F2 și F3 s-au obținut următoarele rezultate:

- forma F2 cristalizează în sistemul monoclinic având grupul spațial este C_2 și parametri de rețea: $a = 16.548 \text{ \AA}$, $b = 7.1592 \text{ \AA}$, $c = 16.5713 \text{ \AA}$, $\beta = 96.521^\circ$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$.

- forma F3 cristalizează în sistemul monoclinic cu grupul spațial $C_{2/c}$ având parametri de rețea: $a = 19.0198 \text{ \AA}$, $b = 9.2478 \text{ \AA}$, $c = 17.8843 \text{ \AA}$, $\beta = 92.535^\circ$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$.

3.2.2 Analize DTA și TGA

Termogramele obținute pentru formele solide noi F1, F2 respectiv F3 sunt ilustrate în Figura 3.2.3.(b-d). Termograma obținută pentru AMB a fost inclusă pentru comparare (Figura 3.2.3.a) dar o analiză detaliată a acesteia a fost expusă anterior.

Analiza termogravimetrică pentru F1 (Figura 3.2.3.b.) arată că F1 prezintă o stabilitate termică până la temperatura de 60°C deoarece nu este detectată o variație în masă a probei pe curba TGA. În intervalul de temperatură $60\text{--}158^\circ\text{C}$ apare un eveniment endotermic, cu maximum la 115°C și se înregistrează pe curba TGA o pierdere de masă $\sim 15\%$. Această pierdere în masă este atribuită fenomenului de deshidratare și eliminarea de acid acetic, concomitent cu topirea probei. Cel de al doilea eveniment exotermic se observă în intervalul de temperatură de $158\text{--}205^\circ\text{C}$, cu un maxim situat la aproximativ 172°C , asociat în TGA cu o

pierdere de masă de 10%. Acest eveniment este probabil legat de descompunerea termică a probei, având în vedere faptul că pierderile suplimentare de masă de 7.5% și 11% sunt observate în intervalul de temperatură de 205-400°C.

Analiza DTA-TGA obținută pentru proba F2 (Figura 3.2.3.c) arată trei evenimente majore bine definite. Primul eveniment este unul endotermic situat în jurul valorii de ~65°C asociat pe curba TGA cu o pierdere de masă de 2%, atribuită eliminării apei. Al doilea eveniment este de asemenea endotermic, localizat în jurul valorii de ~130°C, cu o pierdere de masă TGA de 25% datorat cel mai probabil pierderii de acid acetic și topirii formei solide. Trebuie remarcat faptul că, în forma F3 aceste două evenimente se suprapun. Mai mult, un al treilea eveniment exotermic se observă și este asociat cu descompunerea termică a formei solide.

Trebuie remarcat faptul că, în forma F3 aceste două evenimente se suprapun. Mai mult, un al treilea eveniment exotermic se observă și este asociat cu descompunerea termică a formei solide.

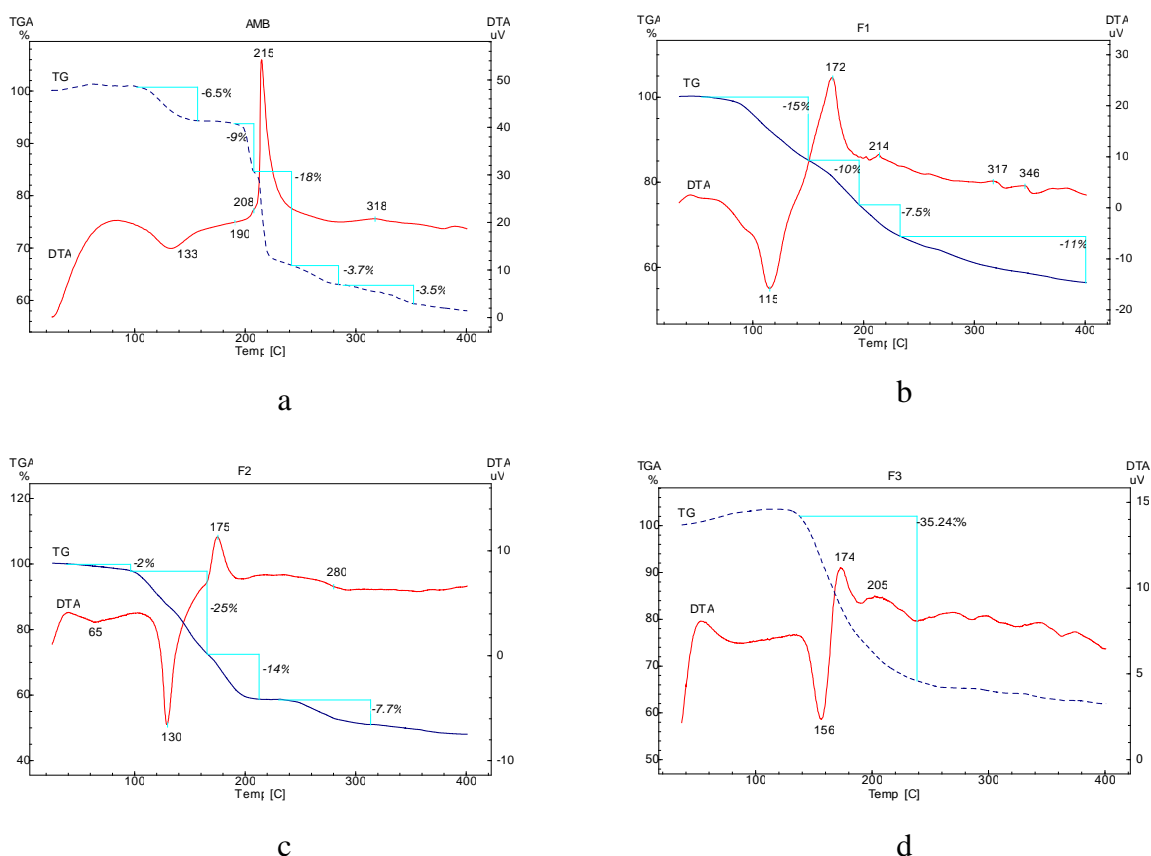


Figura 3.2.3. Termogramele DTA și TGA pentru: AMB (a) și formele F1 (b), F2 (c), F3 (d).

Analiza DTA-TGA pentru F3 (Figura 3.2.3.d.) evidențiază două evenimente majore: Primul eveniment endotermic situat în jurul valorii de ~156°C corespunde pierderii de acid acetic (indicat prin pierderea de masă pe curba TGA) și topirii formei solide. Al doilea eveniment exotermic și la care îi corespunde o pierdere de masă este legat de procesul de descompunere termică, la fel ca și în cazul formelor F1 și F2.

3.2.3 Difracția de raze X cu variație de temperatură

Difracția de raze X cu variație de temperatură a fost aplicată formei F1 în vederea evidențierii eventualelor transformări ale formei solide atunci când este încălzită. Proba F1 a fost încălzită la diferite temperaturi, în intervalul 25-110°C iar difractogramele de raze X au fost înregistrate pentru fiecare temperatură (Figura 3.2.4.). În intervalul de temperatură 25-82°C difractogramele arată similar deoarece nu au loc transformări de fază. La temperatura de 100°C predomină forma amorfă în timp ce la 110°C compusul devine complet amorf. Se poate concluziona că forma F1 este relativ stabilă termic în stare solidă până la 100°C, după care structura colapsează în fază amorfă.

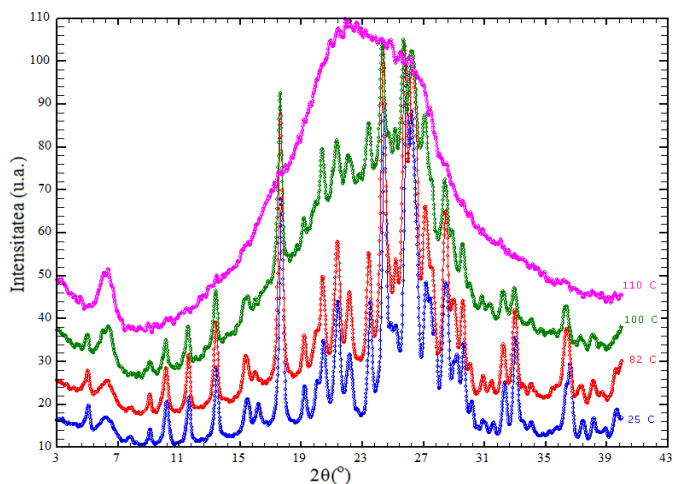


Figura 3.2.4. Difractogramele PXRD obținute pentru forma F1, cu variație de temperatură în intervalul 25-110°C.

3.2.4 Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier

Spectrele de absorbție au fost înregistrate pentru ambazona monohidrat și pentru noile forme solide F1, F2 și F3. (Figura 3.2.5 a, b).

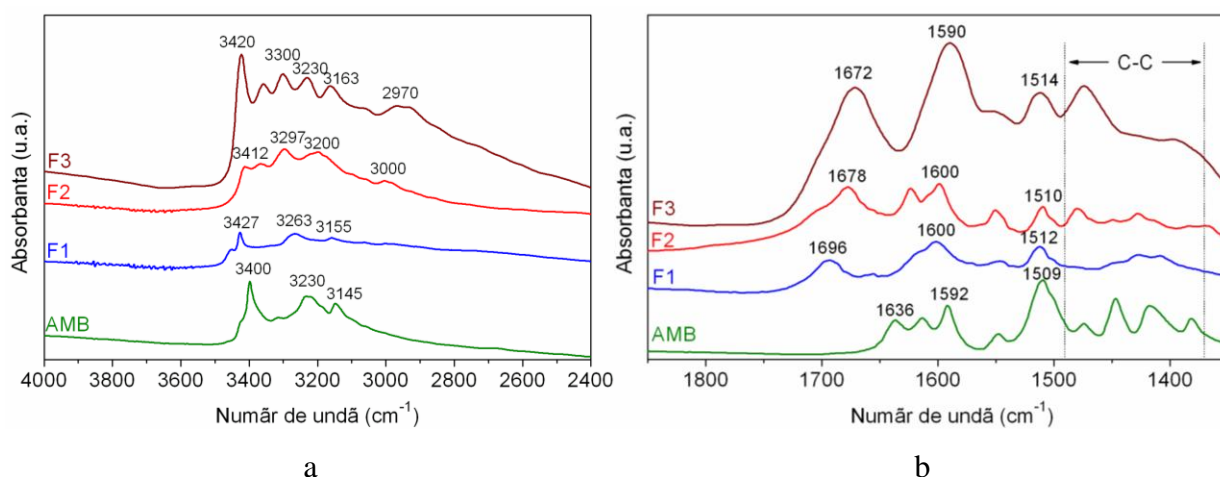


Figura 3.2.5. Spectrele FTIR în intervalul spectral 4000-2400 cm⁻¹ (a) și 1850-1300 cm⁻¹ (b) pentru AMB, F1, F2 și F3.

Analiza spectrală a benzilor de absorbție arată că apare o modificare a benzilor de vibrație caracteristice aminelor primare respectiv secundare, din structura ambazonei. Aceste

schimbări pot fi explicate ca urmare a protonărilor la grupările amino din structura ambazonei (Tabelul 3.2.1.).

Tabelul 3.2.1. Analiza FTIR pentru AMB și formele F1, F2, F3.

AMB	~3400, 3230 cm^{-1} NH ₂	~3145 cm^{-1} NH ~ 1592, 1509 cm^{-1}	~1636 cm^{-1} C=N	C-C ~1447, 1417 cm^{-1}
F1	~3427, 3263 cm^{-1} NH ₃ ⁺	~3155 NH ₂ ⁺ ~1512, 1600 cm^{-1}	~1696 cm^{-1} C=N	C-C ~1429, 1408 cm^{-1}
F2	~3412, 3297 NH ₃ ⁺	~3200 NH ₂ ⁺ ~1510, 1600 cm^{-1} vibrație nouă la 3000 cm^{-1}	~1678 cm^{-1} C=N	C-C ~1480, 1427 cm^{-1}
F3	~3420, 3300 NH ₃ ⁺	~3163 NH ₂ ⁺ ~1514, 1590 cm^{-1} , vibrație nouă la 3230 și 2970 cm^{-1}	~1672 cm^{-1} C=N	C-C ~1476, 1396 cm^{-1}

3.2.5 Determinarea structurii cristaline și moleculare prin difracție de raze X pe monocristale

Monocristalele de acetat de ambazonă au fost obținute prin metoda difuziei de vapori (VDif). S-au obținut monocristale cu forma de plăchete (Figura 3.2.6.), de dimensiuni între 0.08-0.3 mm care au fost analizate prin difracție de raze X pe monocristale.

S-a determinat structura cristalină a compusului conform metodologiei de difracție de raze X pe monocristale. Corecția de absorbție s-a făcut utilizând metoda analitică corespunzătoare unui model de cristal cu mai multe fețe. S-au determinat sistemul cristalografic, parametrii de rețea și din reflexiile interzise a rezultat grupul spațial. S-a stabilit configurația moleculară, legăturile de hidrogen și împachetarea moleculară în celula elementară pentru acetat de ambazonă (Figura 3.2.7, 3.2.8).

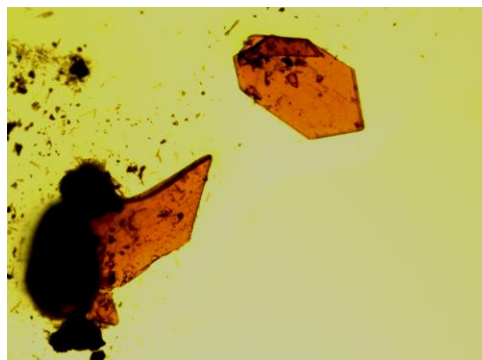


Figura 3.2.6. Monocristalele de acetat de ambazonă văzute cu microscopul în lumină polarizată.

Există opt unități asimetrice în celula elementară, iar o unitatea asimetrică conține o moleculă de ambazonă și două molecule de acid acetic. Pentru acetat de ambazonă s-au identificat următoarele legături de hidrogen: N6-O1, N5-O2, N5-O3, N4-S1, N1-O2, O4-O1.

Date cristalografice pentru acetat de ambazonă

Formula moleculară	C ₁₂ H ₁₈ N ₇ O ₄ S
Masa molară	356.39 g/mol
Sistemul cristalografic	monoclinic
Grupul spațial	C 2/c (no. 15)
Parametrii celulei elementare	$a = 19.1681(16) \text{ \AA}$, $b = 9.3693(17) \text{ \AA}$, $c = 17.976(3) \text{ \AA}$ $\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 94.00(1)^\circ$, $\gamma = 90.00^\circ$
Volumul celulei	3220.48(80) Å ³
Z (Nr. Molecule pe celulă)	8 (1 moleculă de ambazonă și două molecule de acid acetic pe unitatea asimetrică).
Densitatea calculată	1.470 g/cm ³
R	0.0877
Goodness-of-fit on F ²	1.272

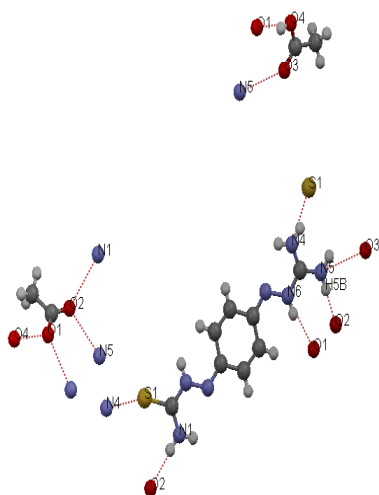


Figura 3.2.7. Configurarea moleculară și legăturile de hidrogen pentru acetat de ambazonă.

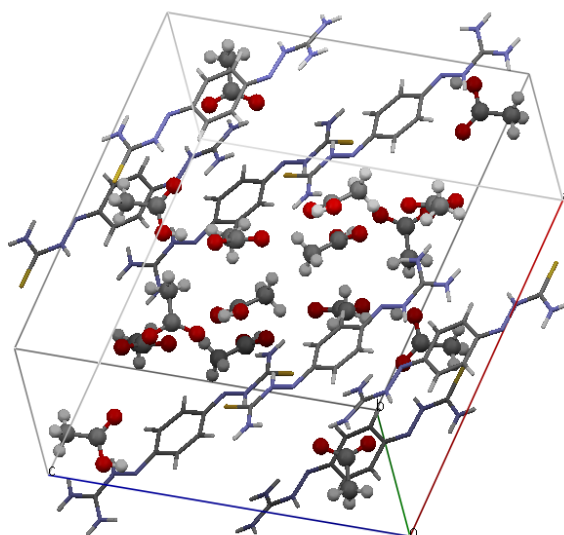


Figura 3.2.8. Împachetarea moleculară pentru acetat de ambazonă..

3.3 Ambazonă cu acid clorhidric

Prin metoda SDG, s-a preparat o probă de ambazonă monohidrat (AMB) cu acid clorhidric (HCl), în raport molar de 1:1, la temperatura camerei, timpul de lucru fiind de 4 ore. S-a observat schimbarea culorii AMB din brun roșiatic în maro-gălbui.

3.3.1 Analize DSC, DTA și TGA

Curbele DSC obținute pentru AMB respectiv pentru compusul obținut prin SDG (AMBHCl_SDG) arată diferit (Figura 3.3.1.). Curba obținută prntru ambazonă, conține un semnal larg endothermic între 105 - 143°C, cu maximul la 125°C și $\Delta H = 36 \text{ kJ/mol}$, la care

corespunde pierderea de molecule de apă, urmat de al doilea semnal larg, exotermic la 204°C, $\Delta H = 75$ kJ/mol datorat descompunerii ambazonei.

Curba DSC obținută pentru AMBHCl_SDG prezintă trei semnale: un semnal larg endotermic cu maximul la 77°C, $\Delta H=38$ kJ/mol, atribuit pierderii moleculelor de apă care apare în curba DSC pentru AMB la ~ 125°C; al doilea semnal larg endotermic situat între 121-160°C, cu maximul la 144°C și $\Delta H=18$ kJ/mol, datorat probabil pierderii de acid clorhidric și care nu se regăsește în curba DSC obținută pentru ambazonă. Al treilea semnal este unul exotermic care are maximul la 190°C, cu $\Delta H=185$ kJ/mol, corespunzător fenomenului de topire însoțită cu descompunerea probei. Acest semnal exotermic apare pentru ambazonă la temperatură mai ridicată, respectiv la ~ 204°C.

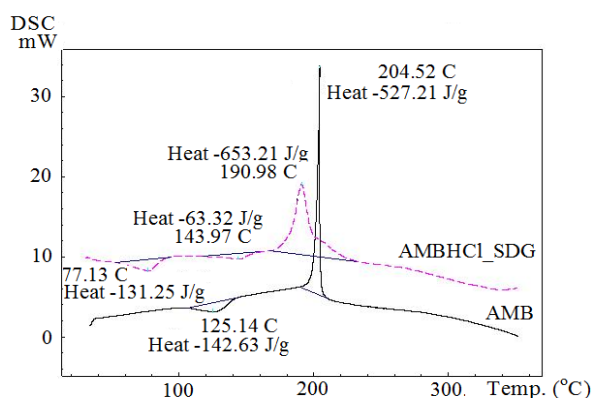


Figura 3.3.1. Termogramele DSC pentru AMB și AMBHCl_SDG.

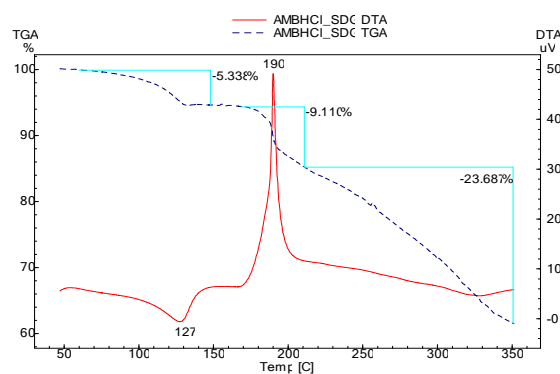


Figura 3.3.2. Termogramele DTA și TGA pentru AMBHCl_SDG.

Din măsurătorile simultane DTA-TGA realizate pentru AMB (Figura 3.1.2.a) și respectiv pentru compusul AMBHCl_SDG (Figura 3.3.2.), s-a constatat că apar pierderi de masă datorate eliminării de apă și de acid clorhidric. Aceste pierderi de masă corespund fenomenelor care au fost identificate și în măsurătorile DSC.

3.3.2 Difrakția de raze X pe pulberi

În urma difracției de raze X pe pulberi pentru AMB și AMBHCl_SDG (Figura 3.3.3.) s-au evidențiat diferențe semnificative între cele două difractograme.

În urma indexării [Boultif *et al* 2004] difractogramei de raze X obținute pentru AMBHCl_SDG s-a stabilit sistemul dr cristalizare ca fiind monoclinic, având următorii parametri de rețea: $a = 7.006 \text{ \AA}$, $b = 13.017 \text{ \AA}$, $c = 16.959 \text{ \AA}$, $\beta = 107.17^\circ$ și volumul celulei elementare $V = 1477 \text{ \AA}^3$. Cel mai probabil grup spațial este $P_{21/c}$, având doar o moleculă pe unitatea asimetrică.

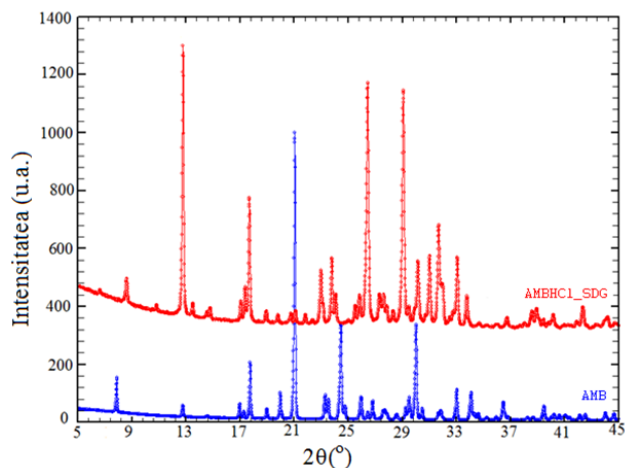


Figura 3.3.3. Difractogramele de raze X pentru AMB și pentru AMBHCl_SDG.

3.3.3 Analiza Spectroscopică în Infraroșu cu Transformata Fourier

Prin compararea frecvențelor de vibrație caracteristice grupărilor funcționale din spectrul AMB cu cele din spectrul obținut pentru compusul AMBHCl_SDG (Figura 3.3.4.a, b), se observă că acestea apar deplasate spre valori mai înalte. Acest fapt se datorează protonării la aminele secundare $\sim 2980 \text{ cm}^{-1}$ respectiv la amine primare la $\sim 1686 \text{ cm}^{-1}$. Formarea unui compus de tip sare este argumentată prin apariția noii benzi de la $\sim 3267 \text{ cm}^{-1}$ [Socrates 2001]. Datele obținute din analiza FTIR indică formarea hidroclorurii de Ambazonă prin identificarea frecvențelor caracteristice protonării la aminele primare NH_2^+ .

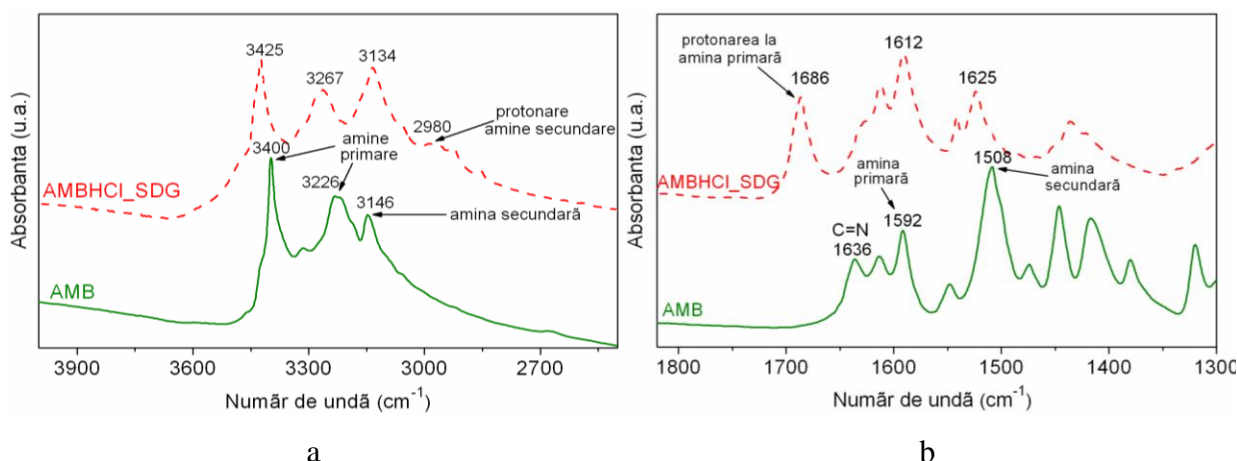


Figura 3.3.4 Spectrele FTIR pentru AMB și AMBHCl_SDG în regiunea spectrală $4000\text{--}2500 \text{ cm}^{-1}$ (a) respectiv $1800\text{--}1300 \text{ cm}^{-1}$ (b).

3.3.4 Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solide

Spectrele ^{13}C CP/MAS NRM ale AMB și AMBHCl_SDG (Figura 3.3.5.a.), conțin opt linii de rezonanță corespunzătoare pozițiilor atomilor de carbon din structura moleculară

acompușilor. În cazul compusului AMBHCl_SDG se observă o modificare importantă a poziției liniilor de rezonanță comparativ cu pozițiile liniilor de rezonanță pentru AMB. Aceste deplasări sunt atribuite efectului de inel aromatic [Gomes *et* Mallion 2001] și prezentei Cl⁻ care perturbă o posibilă aranjare $\pi - \pi$ în AMB. Întrucât toate liniile de rezonanță pentru AMB și AMBHCl_SDG nu sunt multiplicare, se poate concluziona că există doar o singură moleculă pe unitatea asimetrică, rezultat în concordanță cu rezultatele PXRd.

Spectrul ¹⁵N CP/MAS NMR (Figura 3.3.5.b) pentru AMBHCl_SDG sunt formate din șapte linii de rezonanță. Aceste linii se pot atribui după cum urmează: două grupări NH₂ cu liniile de rezonanță la 44.3 și 45.8 ppm; linia de rezonanță la 105.6 ppm se atribuie aminelor secundare protonate NH₂⁺; două grupări NH la 141 și respectiv 171.5 ppm, și două legături de azot non-protonate la inelul aromatic, cu liniile de rezonanță la 266 și 282.8 ppm.

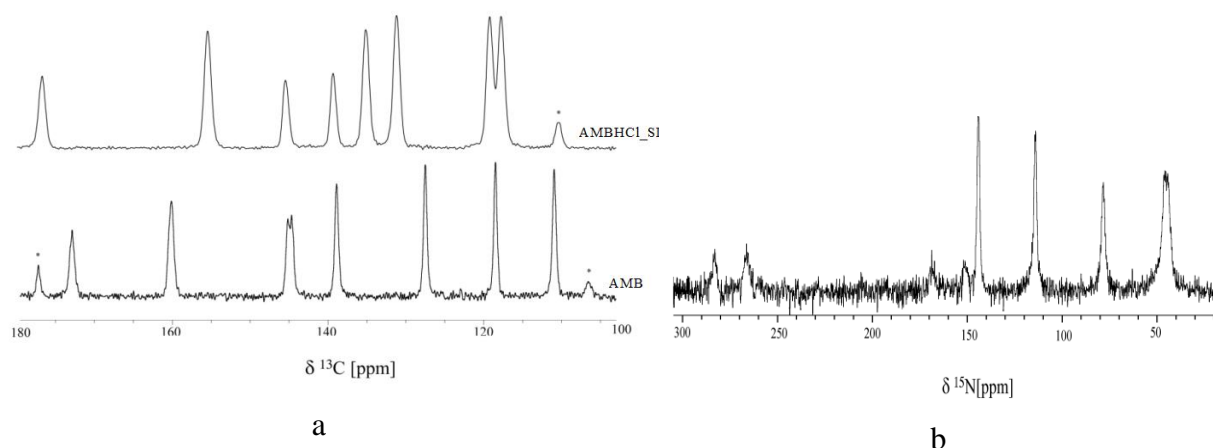


Figura 3.3.5. Spectrele ¹³C CP/MAS NMR pentru AMB și AMBHCl_SDG, înregistrate la o frecvență de rotație $\nu_R = 10$ kHz, CP = 1,5 ms (a). Spectrele ¹⁵N CP/MAS NMR pentru AMBHCl_SDG (b).

3.4. Ambazonă cu acid glutamic

Acidul L-Glutamic (C₅H₉NO₄) este un aminoacid non-esențial care datorită proprietăților deosebite pe care le posedă are aplicații și în terapia cancerului [Otsuka *et al* 1994]. Ambazona, conține mai multe grupări amino de unde rezultă proprietatea ei de a capta electroni și ca urmare poate să formeze săruri cu diferiți acizi. Acidul glutamic (Glu) prezintă valoarea pKa = 2.01 pentru COOH, iar ambazona are valorile pKa de: 6.27; 7.37; 10.67, ceea ce indică posibilitatea obținerii de săruri prin combinarea acestora. În acest scop, s-a preparat ambazona (AMB) cu Glu prin metoda SDG, în raport molar de 1:1 folosind ca solvent apă bidistilată. S-a observat o schimbare în culoarea produsului.

3.4.1. Analize DSC, DTA și TGA

În urma comparării termogramelor DSC obținute pentru compusul AMBGlu_SDG și pentru AMB (Figura 3.4.1.a) s-a evidențiat că pierderea de apă nelegată, are loc la 97°C în compusul AMBGlu_SDG și $\Delta H = 19$ kJ/mol spre deosebire de AMB unde semnalul endotermic este la 125°C. Semnalul exotermic ascuțit cu maximul la 204.5°C și $\Delta H = 75$ kJ/mol în cazul AMB apare deplasat pentru compusul preparat prin SDG la 187.8°C și $\Delta H=106$ kJ/mol, fenomen atribuit descompunerii suprapuse cu topirea probei.

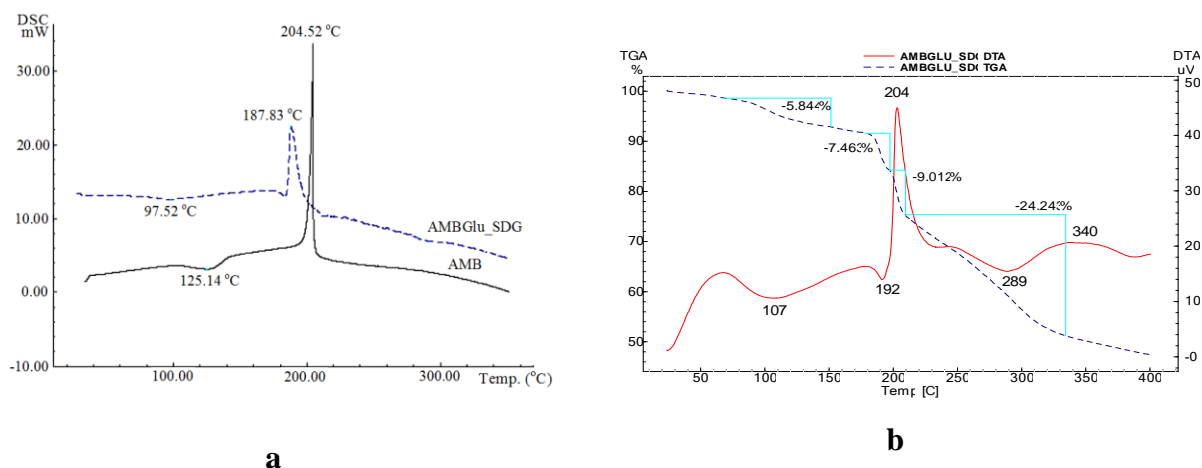


Figura 3.4.1. Termogramele DSC pentru AMB și AMBGlu_SDG (a), Termogramele DTA și TGA pentru AMBGlu_SDG (b).

Analiza termogramelor DTA și TGA obținute pentru AMB (Figura 3.1.2.a) și pentru compusul rezultat prin metoda SDG, AMBGlu_SDG (Figura 3.4.1.b) scoate în evidență diferențele dintre comportările termice ale acestora. Termograma DTA pentru AMBGlu_SDG arată trei evenimente bine definite: primul eveniment endotermic cu maximul la o temperatură de ~107°C corespunzător eliminării de apă printr-o pierdere de masă mai mică decât în cazul ambazonei, respectiv de ~5.84 %; al doilea eveniment endotermic cu maximul la 192°C și o temperatură de $T_{\text{onset}} = 189$ °C, este atribuit începutului topirii compusului AMBGlu_SDG fiind evidențiat și printr-o pierdere de masă de 7,46%. În intervalul de 195 – 210°C se continuă descompunerea ambazonei și a acidului glutamic ($T_{\text{onset Glu}} = 198$ °C) fenomene evidențiate prin semnalul exotermic larg cu maximul la 204°C. Informațiile rezultate din analizele DSC și DTA-TGA sunt în bună concordanță și indică formarea unui compus de tip sare de ambazomă cu acid glutamic.

3.4.2. Difracția de raze X pe pulberi

Difractogramele obținute pentru AMB, Glu și AMBGlu_SDG (Figura 3.4.2.) sunt total diferite ceea ce indică formarea unei noi forme solide între ambazonă și acid glutamic.

Din indexarea difractogramei s-a stabilit sistemul cristalografic al compusului ca fiind monoclinic și parametrii de rețea: $a = 9.8352 \text{ \AA}$, $b = 4.7014 \text{ \AA}$, $c = 40.0987 \text{ \AA}$, $\beta = 94.5050^\circ$, $V = 1844 \text{ \AA}^3$. Din absențele sistematice a rezultat că grupul spațial cel mai probabil este $P2_1$.

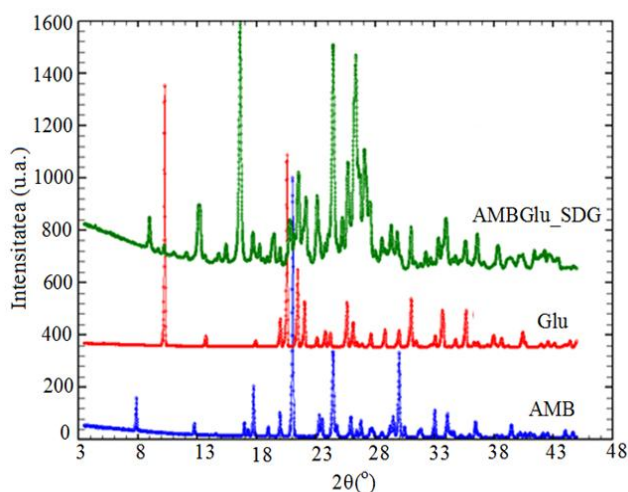


Figura 3.4.2. PXRD pentru AMB, Glu și AMBGlu_SDG.

3.4.3. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier

Spectrele FTIR obținute pentru AMB, Glu și AMBGlu_SDG sunt prezentate în Figura 3.4.3.a,b. Pentru noul AMBGlu_SDG vibrația de la $\sim 3426 \text{ cm}^{-1}$ se atribuie grupării amine primare. Vibrația de la $\sim 3258 \text{ cm}^{-1}$ corespunde protonării aminei primare NH_3^+ [Socrates 2001]. Banda localizată la 3145 cm^{-1} în spectrul pentru AMB este deplasată în spectrul compusului AMBGlu_SDG la $\sim 3158 \text{ cm}^{-1}$ ceea ce confirmă protonarea aminelor secundare [Ivanova *et al* 2010].

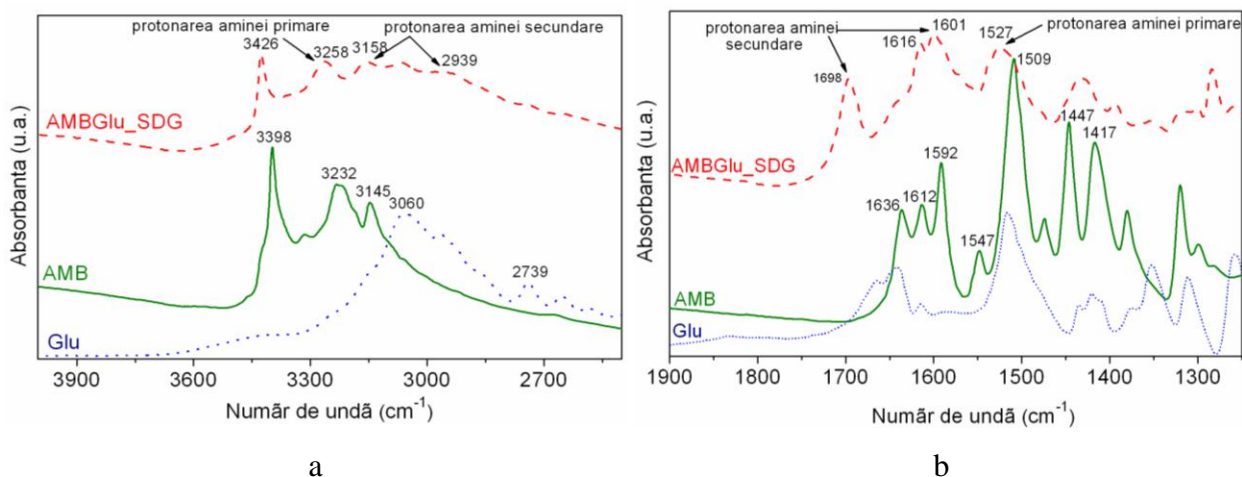


Figura 3.4.3. Spectrele FTIR pentru AMB, Glu și AMBGlu_SDG în regiunea spectrală $4000\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$ (a) respectiv $1800\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ (b).

Banda localizată la 2930 cm^{-1} poate fi atribuită la vibrațiilor de întindere NH_2^+ din aminele secundare protonate. Banda ascuțită de intensitate medie de la 1698 cm^{-1} poate fi

atribuită vibrațiilor de deformare NH_2^+ din solid [Socrates 2001]. Amina secundară prezintă o bandă de intensitate medie la 1616 cm^{-1} , corespunzătoare vibrației de deformare a aminei secundare protonate NH_2^+ . În domeniul spectral $1650\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ benzile de la 1601 respectiv 1527 cm^{-1} pot fi atribuite vibrațiilor de deformare asimetrice NH_3^+ , δ_{as}^+ and δ_{as}^- [Ivanova *et al* 2010]. Pe baza frecvențelor vibraționale și a benzilor noi înregistrate în spectrele IR, se poate concluziona că s-a format o nouă formă solidă de ambazonă cu acid glutamic.

3.4.4. Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solide

Spectrele ^{13}C CP/MAS NMR obținute pentru AMB, Glu și AMBGlu_SDG sunt prezentate în Figura 3.4.4. Ambazona și acidul glutamic prezintă opt, respectiv cinci linii de rezonanță, corespunzătoare pozițiilor neechivalente ale carbonului din structurile moleculare ale compușilor. Deplasările chimice ale liniilor de rezonanță corespunzătoare spectrelor ^{13}C CP/MAS NMR obținute pentru cei trei compuși sunt prezentate în Tabelul 3.4.1.

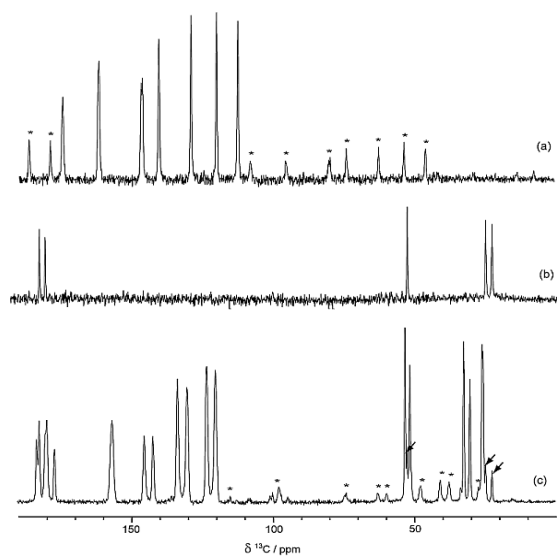


Figura 3.4.4. Spectrele ^{13}C CP/MAS NMR pentru AMB (a), Glu (b) și AMBGlu_SDG (c).

	δ AMB [ppm]	δ Glu [ppm]	δ AMBGlu_SDG [ppm]
Protonarea inelului aromatic (C3, C4, C6, C7)	112.9 120.5 129.5 140.9	- - - -	120.1 123.1 129.7 133
Non- protonarea inelului aromatic (C2, C5)	146.7 147.1	- - - -	141.4 144.3
C8	162.1		155.2
C1	174.8		174.9
C1a	-	25.6	28.9; 29.2
C2a	-	27.7	33.4; 35.5
C3a	-	54.4	53.8; 55.5
C4a	-	177.8	177.5; 178.1
C5a	-	178.8	180.1; 181.0

Tabelul 3.4.1. Deplasările chimice ^{13}C CP/MAS NMR pentru AMB, Glu și AMBGlu_SDG.

Din analiza poziției liniilor de rezonanță, se poate concluziona că: (i) există două conformații neechivalente pentru moleculele de acid glutamic în unitatea asimetrică a compusului AMBGlu_SDG, (ii) linia de la 180.1 ppm (și, respectiv, 181.0 ppm) indică prezența grupării COO , ceea ce dovedește că AMBGlu_SDG este o sare. Prezența unei mici cantități de acid glutamic rămas nereacționat după reacția chimică cu ambazona este indicată prin săgeți în Figura 3.4.4. [SDBS 2007].

3.5. Ambazonă cu acid p-Aminobenzoic

Acidul p-Aminobenzoic (PABA) sau vitamina B₁₀ este un compus organic cu formula chimică (NH₂O₂C₇H₇), puțin solubil în apă, cu masa molară de 137.14 g/mol, iar temperatura de topire de 187°C și PH de 3.5, este non-toxic și folosit în tratarea cancerului melanotic precum și în activitatea antitumorală de radiații ionizante [Chakrapani *et al* 2008]. Deoarece atât ambazona cât și PABA au efecte pozitive în tratamentele antitumorale, s-a încercat obținerea de noi forme solide prin combinarea ambazonei C₈H₁₁N₇S·H₂O (AMB) cu acidul p-Aminobenzoic (PABA). În prezentul studiu s-a obținut o formă nouă formă solidă de ambazonă cu PABA, aplicând metoda SDG unei probe din ambazonă cu acid aminobenzoic în raport molar de 1:1, folosind ca solvent apa, timp de 30 minute.

3.5.1. Analize DSC, DTA și TGA

Analiza termică DSC pentru AMB, PABA și pentru compusul obținut prin metoda SDG, AMBPABA_SDG (Figura 3.5.1) prezintă: un semnal endotermic între 80 și 100°C, care corespunde pierderii de molecule de apă, respectiv un semnal ascuțit exotermic în intervalul 165-195°C, datorat probabil descompunerii și topirii compusului. Semnalul ascuțit endoterm de pe curba DSC obținută pentru PABA la 191°C, corespunde procesului de topire, ca urmare a degradării substanței.

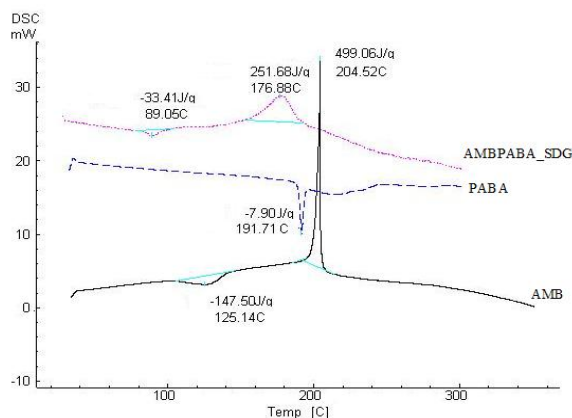


Figura 3.5.1. Termogramele DSC pentru AMB, PABA și AMBPABA_SDG

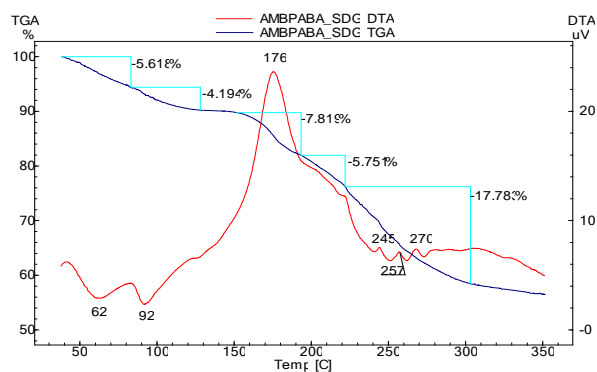


Figura 3.5.2. Termogramele DTA-TGA pentru AMBPABA_SDG

Termogramele obținute pentru compusul AMBPABA_SDG (Figura 3.5.2) indică eliminarea apei la temperatură mai joasă, datorită prezenței acidului PABA. Acest eveniment este evidențiat prin două pierderi de masă de 5.6 respectiv 4,2% (TGA), cărora le corespund două semnale largi endoterme (DTA) cu maximele la 62°C și 93°C. Începutul topirii și procesul de descompunere are loc între 140 și 185°C cu o pierdere de masă de 7.8%, care este asociat cu un vârf exotermic larg cuprins în intervalul de temperatură 100-186°C, cu maximul

la 176°C. Pierderea de masă finală de 23.5%, are loc în intervalul de 190-300°C, când se elimină componente volatile și se continuă descompunerea compusului AMBPABA_SDG.

3.5.2. Difrakția de raze X pe pulberi

Difractogramele comparate evidențiază formarea unui compus diferit față de compușii de pornire (Figura 3.5.4.). Din indexarea difractogramei compusului AMBPABA_SDG au fost determinați parametrii celulei elementare:

$$a = 14.294 \text{ \AA}, b = 9.162 \text{ \AA}, c = 8.777 \text{ \AA},$$

$\alpha = 95.90^\circ, \beta = 100.63^\circ, \gamma = 91.73.15^\circ$ și sistemul de cristalizare triclinic.

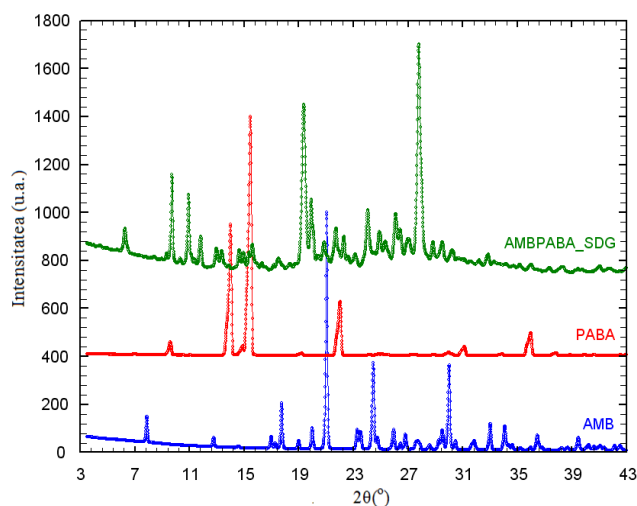


Figura 3.5.3. Difractogramele de raze X ale AMB, PABA și AMBPABA_SDG.

3.5.3. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier

Din analiza benzilor de absorbție pentru AMB și AMBPABA_SDG (Figura 3.5.4) s-au atribuit vibrațiile de întindere și de deformare (Tabelul 3.5.1) datorate grupării amine primare NH₂ care apar modificate în spectrul compusului AMBPABA_SDG obținut prin SDG. Formarea de sare de ambazonă cu acid p-aminobenzoic a fost demonstrată prin modificarea vibrațiilor de întindere a grupării NH în amine [Otsuka *et al* 1994] și prin identificarea benzilor de absorbție protonate (Tabelul 3.5.1.).

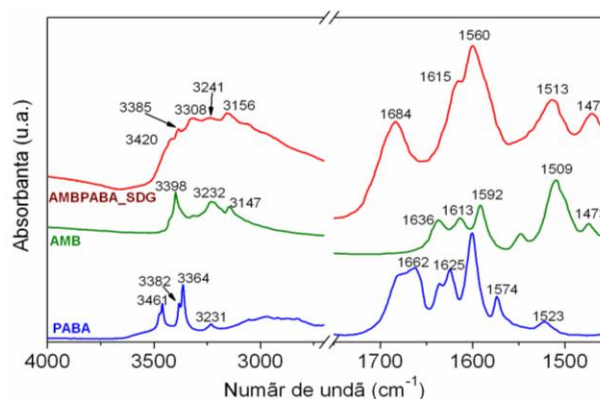


Figura 3.5.4. Spectrele FTIR pentru AMB, PABA și AMBPABA_SDG în intervalul spectral 4000-1450 cm⁻¹.

Tabelul 3.5.1. Frecvențele de vibrație în IR pentru AMB și AMBPABA_SDG.

Domeniul spectral cm ⁻¹	AMB cm ⁻¹	AMBPABA_SDG cm ⁻¹
3400–3200	~3398, 3232 vibrații de întindere ν_{NH_2}	~3420, 3385, 3308 vibrații de întindere ν_{NH_2} ~3241 vibrații de întindere $\nu_{\text{NH}_3^+}$
3200 - 2700	~3147 vibrații de întindere ν_{NH}	~3156 vibrații de întindere $\nu_{\text{NH}_2^+}$
1800–1500	~1636, 1613 vibrații de întindere C=N ~1592 vibrații de deformare δ_{NH_2}	~1684, 1560 vibrații de deformare $\text{NH}_3^+ \delta_{\text{as-}}, \delta_{\text{as-}}$ ~1615 vibrații de întindere $\nu_{\text{NH}_2^+}$
1600–1500	~1509 vibrații de deformare δ_{NH}	~1513 vibrații de deformare δ_{NH}

3.5.4. Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solide

Din spectrele de rezonanță magnetică nucleară pe solide, ale izotopului ^{13}C , obținute prin CP/MAS pentru AMB, PABA, respectiv AMBPABA_SDG (Figura 3.5.6) s-au stabilit următoarele concluzii:

(i) Analiza calitativă a spectrului de frecvențe pentru compusul AMBPABA_SDG indică formarea unei forme solide noi, diferite față de compușii AMB și PABA (Figura 3.5.6);

(ii) diferența cea mai importantă este schimbarea majoră față de spectrul AMB prin deplasările chimice și lărgimea liniilor de rezonanță în special pentru C1 și C8;

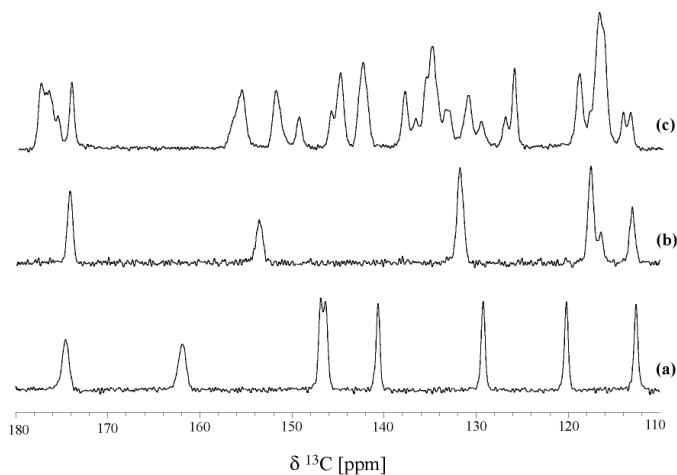


Figura 3.5.6. Spectrele de rezonanță pe solid RMN, pe izotopul ^{13}C pentru AMB (a), PABA (b) și AMBPABA_SDG (c) cu $\nu_R = 15$ kHz și CP = 2 ms.

Măsurătorile ^{13}C RMN pe solide sunt în concordanță cu rezultatele PXRD ceea ce argumentează formarea noii forme solide de ambazonă para-aminobenzoate.

3.6. Ambazonă cu acid aspartic

Acidul Aspartic $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ (ASP) face parte din clasa amino acizilor, este solubil în apă și acționează ca un neuro-transmițător excitator, are rol de generator de energie celulară dar și în stimularea creșterii producției de imunoglobuline și anticorpi. Acidul aspartic are valorile pKa de: 1.88, 3.65, 9.60 iar ambazona are valorile pKa de : 6.27; 7.37; 10.67, ceea ce indică posibilitatea obținerii de săruri prin combinarea acestora. Prin metoda SDG au fost preparate două probe ambazonă cu acid aspartic la temperatura camerei, în raport molar de 1:1, folosind pentru umectarea amestecului solid ethanol: pentru prima probă a fost aplicată SDG timp de 5 minute (AMBASP_SDG 5min) iar pentru a doua probă timpul de lucru a fost de o oră (AMBASP_SDG 1h).

3.6.1. Analize DTA și TGA

Din analiza termogramelor DTA și TGA obținute pentru proba AMBASP_SDG 5min (Figura 3.6.1.a), se constată că prezintă un semnal endoterm cu maximul la 47°C căruia îi

corespunde o pierdere de masă de 3.93%, pierdere care este asociată cu eliminarea apei nelegate. În intervalul de 180-220°C se observă un semnal exoterm cu maximum la 211°C asociat cu o pierdere de masă de 30.23%, fenomen datorat descompunerii probei însoțită de topire.

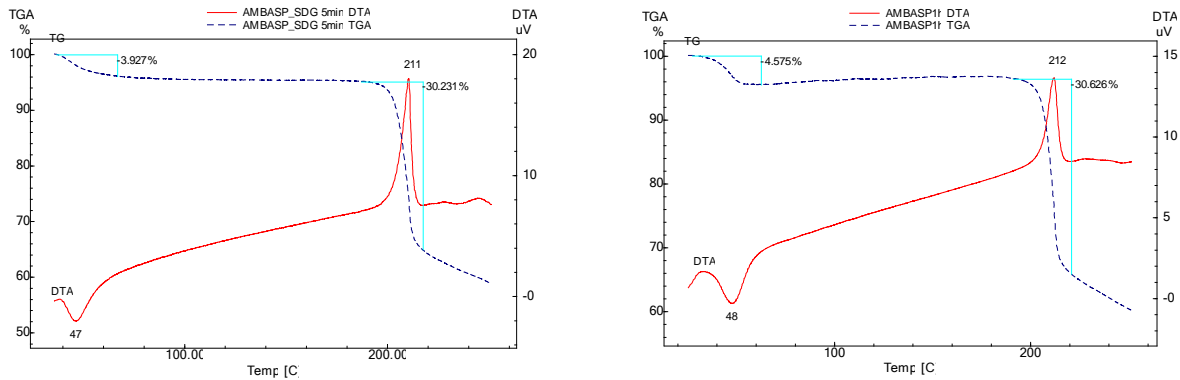


Figura 3.6.1. DTA-TGA pentru: AMBASP_SDG 5 min (a) și AMBASP_SDG 1h (b).

În urma analizei termogramelor DTA-TGA pentru proba mojarată timp de o oră AMBASP_SDG 1h (Figura 3.6.1.b), nu se constată diferențe semnificative față de proba mojarată 5 minute.

3.6.1. Difracția de raze X pe pulberi

Deosebirile dintre difractogramele de raze X pentru AMB, ASP, AMBASP_SDG 5 min și AMBASP_SDG 1h (Figura 3.6.2) evidențiază obținerea a două forme solide pentru ambazonă cu acid aspartic. Cele două forme solide rezultate în urma procesului SDG de 5 minute respectiv o oră, nu conțin linii de difracție de la ambazonă sau de la acid aspartic, dovedind astfel obținerea unor compuși relativ puri. În urma indexării difractogramei pentru compusul AMBASP_SDG 1 oră, s-au determinat parametri de rețea:

$$a = 21.37 \text{ \AA}, b = 6.09 \text{ \AA}, c = 8.55 \text{ \AA}, \alpha = 90^\circ, \beta = 96.65^\circ, \gamma = 90^\circ$$

S-a determinat sistemul de cristalizare ca fiind monoclinic.

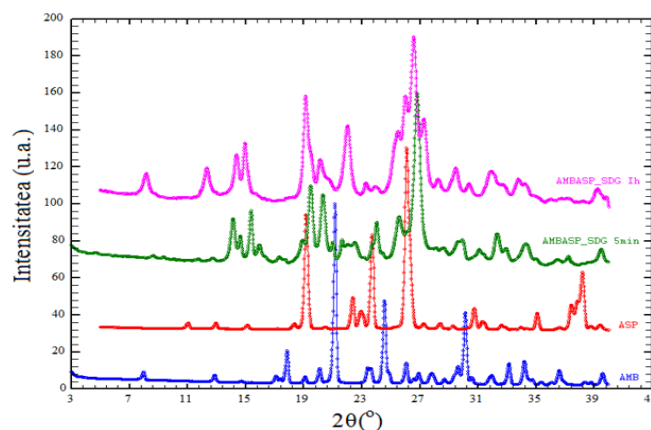


Figura 3.6.2 Difractogramele de raze X pentru probele AMBASP_SDG 5min și AMBASP_SDG 1h.

3.6.2. Difracția de raze X pe pulberi cu variație de temperatură

În scopul verificării rezultatelor obținute prin analize termice, au fost efectuate pe proba mojarată timp de o oră, măsurători de difracție de raze X cu variație de temperatură în intervalul 25-240°C (Figura 3.6.3).

Din analiza difractogramelor obținute se constată că compusul AMBASP_SDG 1h își menține stabilitatea până la temperatura de 198°C. Între 198 și 240°C are loc trecerea de la faza cristalină la o fază amorfă. Acest rezultat este în concordanță cu măsurătorile DTA-TGA, care prezintă un eveniment exotermic la temperatura de 212°C, atribuit descompunerii suprapuse cu topirea compusului.

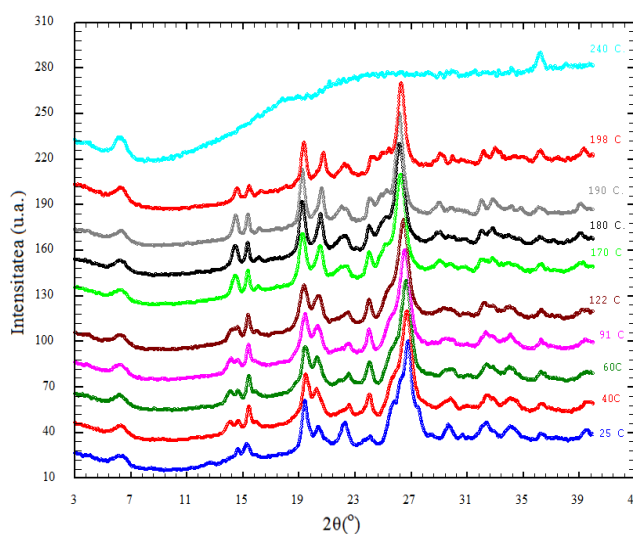


Figura 3.6.3 Difractogramele de raze X pentru proba AMBASP_SDG 1h, încălzită în intervalul de temperatură 25-240°C.

3.6.3. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier

Din analiza spectrelor FTIR obținute pentru AMB, ASP și compușii AMBASP_SDG 5min respectiv AMBASP_SDG 1h, (Figura 3.6.4.a, b) se observă că vibrațiile corespunzătoare grupărilor funcționale amino se modifică în cazul compușilor obținuți prin metoda SDG timp de 5 minute, respectiv o oră.

Vibrația aminei primare de la $\sim 3398\text{ cm}^{-1}$ din spectrul AMB se regăsește în spectrele obținute pentru compușii AMBASP_SDG 5 min, respectiv AMBASP_SDG 1h, dar este deplasată spre valori mai mari, la $\sim 3472\text{ cm}^{-1}$. Vibrațiile localizate în jurul valorii de $\sim 3355\text{ cm}^{-1}$ pentru AMBASP_SDG 5 min respectiv 3357 cm^{-1} pentru AMBASP_SDG 1h, corespund grupării NH_3^+ din aminele primare protonate [Socrates 2001].

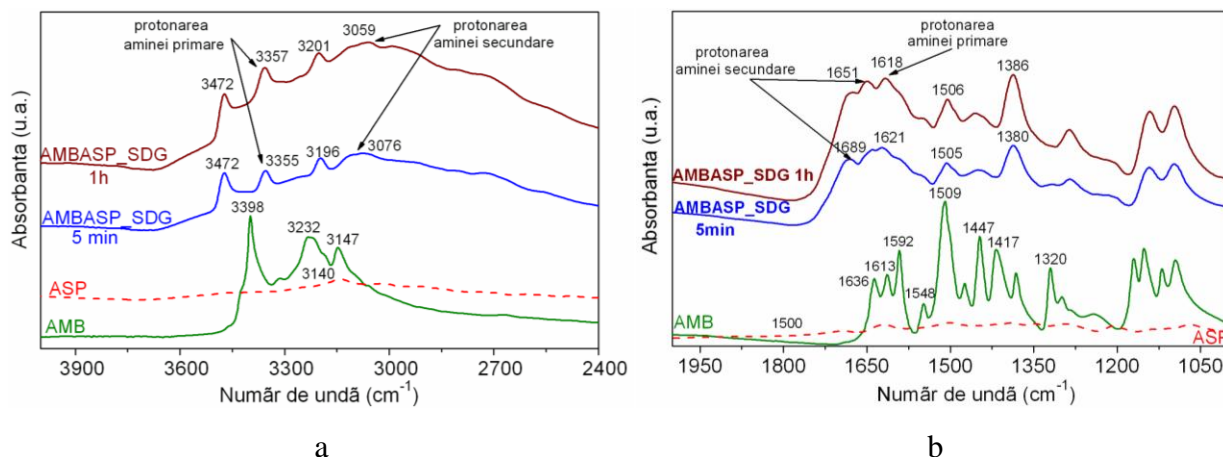


Figura 3.6.4. Spectrele FTIR în domeniul spectral: **a.** $4000\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$ respectiv **b.** $2000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ obținute pentru AMB, ASP, AMBASP_SDG 5 min, AMBASP_SDG 1h.

Vibrația localizată la $\sim 3147\text{ cm}^{-1}$ în spectrul AMB, este deplasată în spectrul compusului obținut prin SDG 5 minute la $\sim 3196\text{ cm}^{-1}$, respectiv la $\sim 3201\text{ cm}^{-1}$ în spectrul compusului obținut prin SDG o oră, ceea ce confirmă protonarea aminei secundare în cazul ambilor compuși [Ivanova *et al* 2010]. Banda nouă de la ~ 3076 respectiv 3059 cm^{-1} poate fi atribuită vibrației de întindere (NH_2^+) datorată protonării la amina secundară [Socrates 2001].

Benzile largi de intensitate medie de la ~ 1689 respectiv 1651 cm^{-1} corespunzătoare probei AMBASP_SDG 5 min respectiv AMBASP_SDG 1h, pot fi atribuite vibrațiilor de deformare din amina secundară protonată NH_2^+ [Socrates 2001]. Benzile de intensitate medie la ~ 1621 respectiv 1618 cm^{-1} identificate în cazul probei AMBASP_SDG 5 min și AMBASP_SDG 1h, corespund vibrației de deformare din amina primară protonată NH_3^+ . Obținerea a două forme solide noi de ambazonă cu acid aspartic este justificată prin protonările din aminele secundare și prin deplasările care se produc în spectrele noilor compuși.

3.6.4. Analiza prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară pe solid ^{13}C RMN

Spectrele ^{13}C CP/MAS NMR (Figura 3.6.5.) obținute constau din opt linii de rezonanță pentru ambazonă, respectiv șase linii de rezonanță pentru acidul aspartic. În cazul probelor AMBASP_SDG 5 min și AMBASP_SDG 1h, se constată că spectrele RMN au un număr diferit de linii de rezonanță atât între ele cât și față de liniile obținute pentru ambazonă.

Din analiza spectrului ^{13}C CP/MAS NMR pentru proba AMBASP_SDG 5 min, rezultă că apare o neechivalență a acidului aspartic în rețea și de aici se poate concluziona că cel mai probabil avem în unitatea asimetrică două molecule de acid aspartic pentru o moleculă de ambazonă.

Deplasările chimice ale liniilor de rezonanță pentru AMB, ASP și cele două probe de ambazonă cu acid aspartic preparate prin SDG 5 minute, respectiv o oră sunt prezentate în Tabelul 3.6.1.

Tabelul 3.6.1. Deplasările chimice ^{13}C CP/MAS NMR pentru AMB, ASP, AMBASP_SDG (5 min, 1oră).

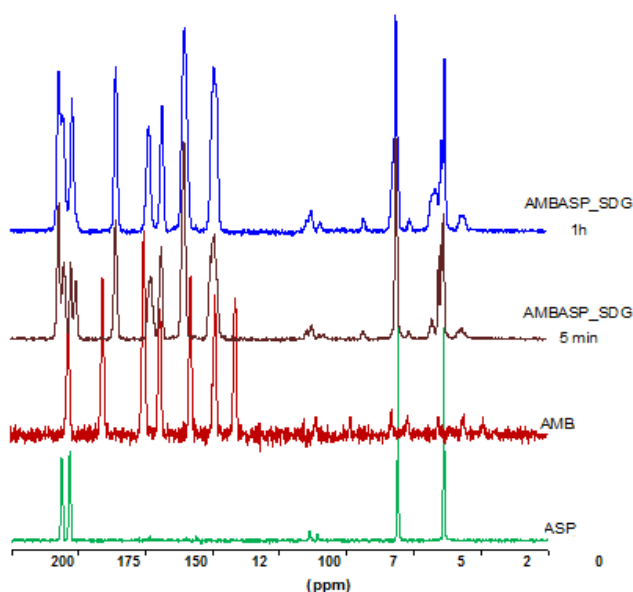


Figura 3.6.5. Spectrele ^{13}C CP/MAS NMR pentru AMB, (ASP), (AMBASP_SDG 5min) și (AMBASP_SDG 1h)

	δ AMB [ppm]	δ AMBASP_SDG 5min [ppm]	δ AMBASP_SDG 1h [ppm]	δ ASP [ppm]
Protonarea la inelul aromatic (C3, C4, C6, C7)	116.7 124.1 133.2 144.6	124.63 125.8 135.7x2	124.63x2 135.7x2	
Non-protonarea la inelul aromatic (C2, C5)	150.6 -	144.13 147.9	143.97 148.93	
C1,C8	165.8 178.7	161 180.2	161.2 180.8	
C9,C11		175.9 177.7 182.15	177.52 182.48	
C9		38.5 39.34 40.33	38.5 39.5	
C10		56.4	56.5 57.5	
C1a C2a C3a C4a C5a				25.6 27.7 54.4 177.8 178.8

3.7. Ambazonă cu acid nicotinic

Acidul nicotinic ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) sau vitamina B₃ este unul dintre nutrienții umani esențiali. un derivat al piridinei, solubil în apă, având rol de vaso-dilatator și este utilizat în medicină în tratamentul tulburărilor tractului gastro-intestinal [Makareyer *et al* 1997]. Prezintă valoarea lui pKa de 4.9 corespunzătoare azotului din grupul aromatic și aproximativ de 2.1 pentru gruparea

COOH [Tim *et al* 1999]. Ținând cont că ambazona are pKa cu valorile: 6.27; 7.37; 10.67 [Günter *et Hoffmann* 1990] iar acidul nicotinic are valoarea 4.9, se constată că diferențele dintre valorile pKa pentru ambazonă și acid nicotinic sunt suficient de mari ca să permită formarea de săruri. Pe baza acestui fapt, s-a procedat la prepararea de săruri din ambazonă cu acid nicotinic (NA), utilizând metoda SDG. S-au amestecat 255.3 mg AMB cu 123.11 mg NA pentru a obține raportul molar de 1:1, utilizând ca solvent apă. Compusul obținut a fost investigat prin mai multe metode: DSC, DTA-TGA, PXRD, FTIR.

3.7.1. Analize DSC, DTA și TGA

Curbele termice obținute pentru AMB, NA și pentru compusul rezultat în urma SDG (AMBNA_SDG), sunt prezentate în Figura 3.7.1.a.

Acidul nicotinic prezintă o tranziție de fază solid-solid evidențiată prin semnalul endoterm din intervalul 180-185°C, cu $\Delta H=1.66$ kJ/mol. Topirea probei este identificată prin semnalul endotermic observat între 236-239°C, $\Delta H= 27.92$ kJ/mol. Între 242-270°C are loc sublimarea acidului nicotinic, eveniment evidențiat prin semnalul endoterm [Jingyan *et al* 2008].

Curba DSC obținută pentru AMBNA_SDG, prezintă patru evenimente termice: primul pic endotermic identificat între 80 și 115°C, cu $\Delta H= 32.37$ kJ/mol, corespunde pierderii de molecule de apă; semnalul exotermic situat între 142 și 158°C, $\Delta H=11$ kJ/mol se datorează unei tranziții de fază solid-solid; între 190 și 197°C cu $\Delta H= 31.61$ kJ/mol, se identifică un semnal exotermic, datorat probabil începerii topirii, urmat de un eveniment exotermic larg între 198 și 204°C, $\Delta H=6.44$ kJ/mol corespunzător descompunerii probei.

Termogramele DTA și TGA obținute pentru AMBNA_SDG (Figura 3.7.1.b) indică o stabilitate termică până în jurul valorii 85°C. În intervalul de temperatură 60–100°C au loc două pierderi de masă de 6.9%, respectiv 3.8%, fenomene evidențiate prin două semnale endotermice în DTA, cu maxime la 87 și respectiv 105°C, asociate cu eliminarea apei nelegate, respectiv a apei legate. Între 180 și 210°C, datorită sublimării și evaporării acidului nicotinic are loc a treia pierdere de masă de 15.6 %.

Această treaptă de pierdere de masă corespunde semnalului exoterm cu T_{onset} la 175°C și maximum la 194°C. În intervalul 210–350°C are loc ultima pierdere de masă de 19%, corespunzătoare eliminării componentelor volatile datorate descompunerii ambazonei și sublimării acidului nicotinic. Aceste semnale termice sunt în bună concordanță cu măsurătorile DSC.

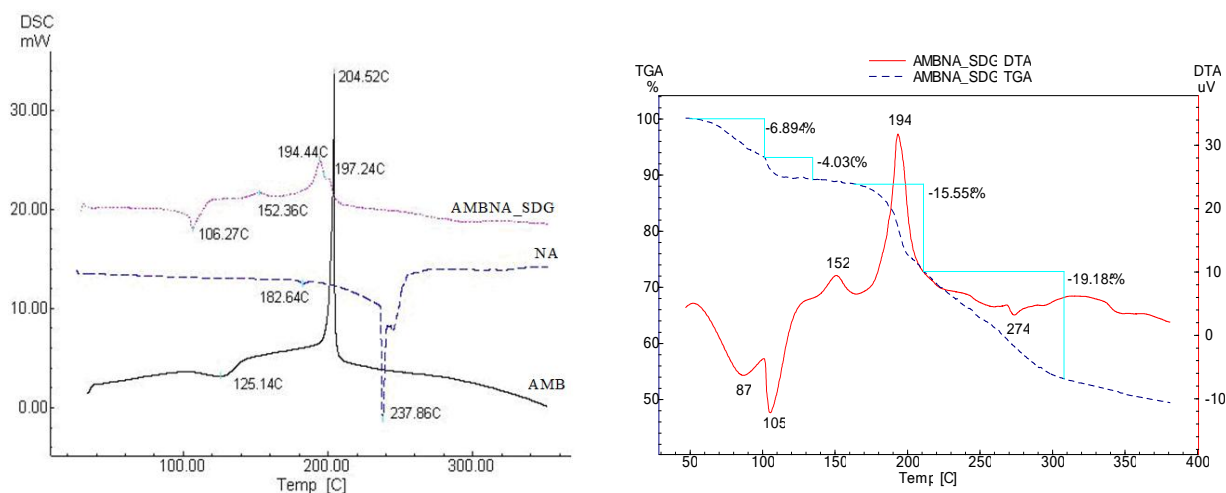


Figura 3.7.1. Termogramele DSC pentru AMB, NA, AMBNA_SDG (a) și DTA și TGA pentru AMBNA_SDG (b).

3.7.2. Difrakția de raze X pe pulberi

Diffractograma obținută pentru AMBNA_SDG este diferită de diffractogramele de raze X pentru AMB, și NA (Figura 3.7.2.). Bazat pe aceasta, se constată că compusul rezultat prin metoda SDG este un compus nou. În urma indexării diffractogramei compusului AMBNA_SDG, s-a obținut că sistemul cristalizează în sistem monoclinic și are următorii parametrii de rețea: $a = 7.422 \text{ \AA}$, $b = 40.439 \text{ \AA}$, $c = 6.905 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 106.43^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

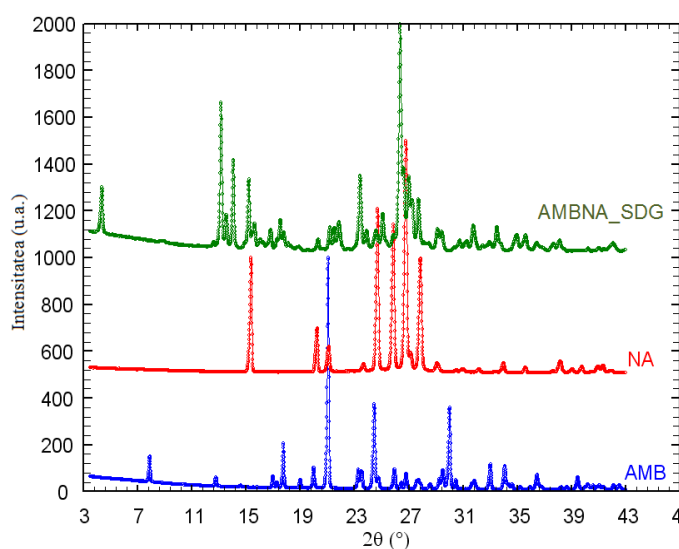


Figura 3.7.2. Difractogramele de raze X pentru AMB, NA și AMBNA_SDG

3.7.3. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier

Din spectrele FTIR obținute pentru AMB, NA și AMBNA_SDG (Figura 3.7.3.a,b) au fost identificate vibrațiile caracteristice grupărilor din acidul nicotinic și anume $\nu(\text{O-H})$ 3431 cm^{-1} , $\nu(\text{C-H})$ 3071 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ 1716 cm^{-1} , $\nu(\text{C=C})$ 1595 și 1416 cm^{-1} , $\delta(\text{C-H})$ (in-plan) 1183 și 1039 cm^{-1} [Jingyan *et al* 2008].

Benzile observate la $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ pot fi atribuite la vibrația N-H de întindere a aminei primare din AMB (Figura 3.7.3.a), care poate fi observată ca un umăr în spectrul obținut pentru

AMBNA_SDG. Vibrația aminei secundare de la $\sim 3226 \text{ cm}^{-1}$ de intensitate ridicată în spectrul AMB, este redusă considerabil în intensitate în spectrul AMBNA_SDG la $\sim 3146 \text{ cm}^{-1}$ [Socrates 2001] și poate fi atribuită vibrațiilor N–H de întindere ale aminelor secundare. Apariția umărului de la $\sim 2970 \text{ cm}^{-1}$ în spectrul noului compus AMBNA_SDG, probabil se datorează protonării la amina secundara [Socrates 2001].

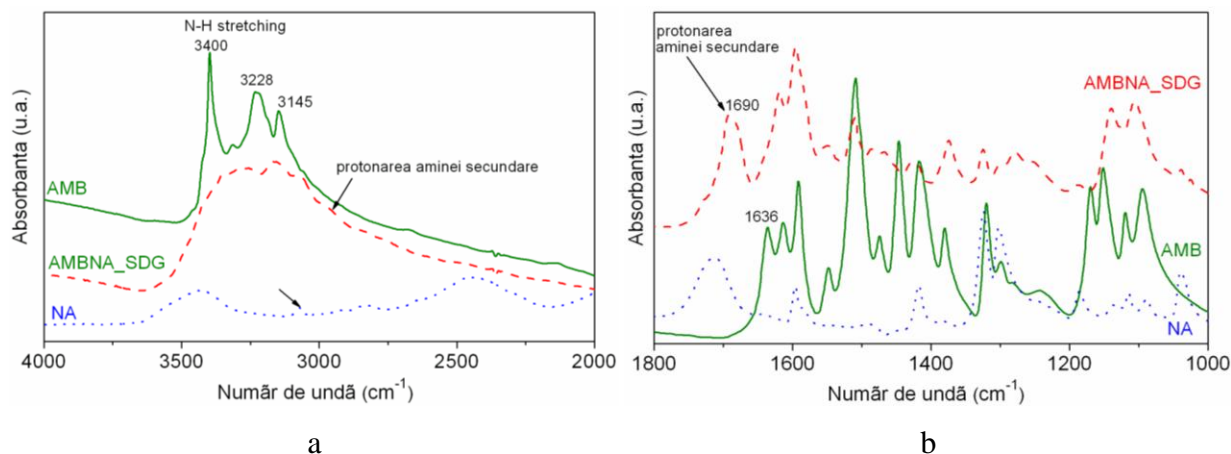


Figura 3.7.3. Spectrele FTIR pentru AMB, NA și AMBNA_SDG în intervalul spectral 4000-2000 cm^{-1} (a), respectiv 1800-1000 cm^{-1} (b).

În intervalul spectral 1800-1000 cm^{-1} (Figura 3.7.3.b) se identifică absorbția benzilor de intensitate medie a aminelor primare la $\sim 1613 \text{ cm}^{-1}$, prezentă în spectrul noului compus la $\sim 1618 \text{ cm}^{-1}$ [Socrates 2001] corelate cu benzile spectrale de la 1625 și 1516 cm^{-1} cu vibrații de deformare. Spectrul FTIR obținut pentru ambazona pură conține vibrațiile aminelor secundare la $\sim 1508 \text{ cm}^{-1}$, care rămân neschimbate în spectrul compusului rezultat prin SDG. Noile vibrații care apar la $\sim 1692 \text{ cm}^{-1}$, sunt atribuite vibrațiilor de deformare a aminei secundare protonate [Muresan-Pop *et al* 2011a,b]. Protonările la amine precum și apariția de noi benzi justifică formarea unui compus de tip sare între ambazonă și acid nicotinic.

3.8. Ambazona cu acid lactic

Acidul lactic, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (2-hydroxypropanoic acid) (notat cu LA) este un compus chimic ce joacă un rol important în diverse procese biochimice, este capabil să elibereze energia pentru resintetizarea ATP fără implicarea oxigenului, proces numit glicoliză anaerobică. Acidul lactic face parte din grupul acizilor slab higroscopici care conțin un alcool în poziția alfa relativ la gruparea carboxilică [Siegfried 1995]. Proba AMBLA_SDG a fost preparată din amestecul de 255.3 mg ambazonă monohidrat (AMB) cu 0.086 ml LA acid lactic, prin aplicarea metodei SDG, la temperatura camerei.

3.8.1. Analize DSC, DTA și TGA

Termogramele DSC pentru AMB, LA și pentru compusului AMBLA_SDG sunt prezentate în Figura 3.8.1.a. Comportarea termică a soluției apoase de acid lactic prezintă două evenimente endoterme cu maximele la 120 și 126°C, probabil datorită eliminării apei și a sublimării compusului. Curba DSC pentru AMBLA_SDG prezintă două evenimente: un eveniment endotermic larg situat între 100 și 140°C, corespunzător pierderii moleculelor de apă și un eveniment exotermic situat în intervalul 170 – 200°C, cu maximumul la 182°C și care se datorează descompunerii probei.

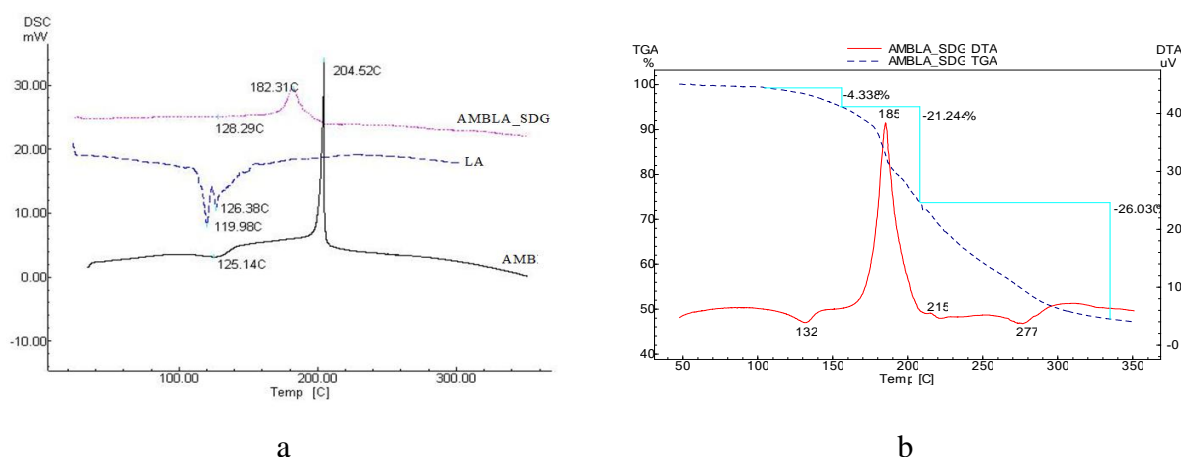


Figura 3.8.1. Termogramele DSC pentru AMB, LA și AMBLA_SDG (a) și termogramele DTA-TGA pentru AMBLA_SDG (b).

Termogramele DTA și TGA pentru AMBLA_SDG (Figura 3.8.1.b) indică în intervalul de temperatură 100–140°C o primă pierdere de masă de 4.4 %, corespunzătoare unui eveniment endotermic larg cu maximumul la 132°C. A doua pierdere de masă are loc între 140 și 210°C de aproximativ 21 %, probabil datorită descompunerii termice și corespunde la un semnal exotermic ascuțit cu maximumul la 185°C. Pierderea finală de masă de 26 % are loc în intervalul 210–330°C și corespunde eliminării altor componente care rezultă prin descompunerea ambazonei și a acidului lactic. Din analizele termice efectuate pentru AMB și AMBLA_SDG, se observă că compusul rezultat prin metoda SDG din ambazonă cu acid lactic este un compus nou.

3.8.2. Difracția de raze X pe pulberi

Deoarece acidul lactic (LA) este lichid, poate fi caracterizat prin difracție de raze X. Cele două difractograme corespunzătoare ambazonei respectiv compusului AMBLA_SDG sunt complet diferite (Figura 3.8.2) ceea ce indică formarea unei noi forme solide.

Din indexarea difractogramei obținute pentru compusul AMBLA_SDG, s-au determinat următorii parametri de rețea: $a=10.781\text{Å}$, $b=9.352\text{Å}$, $c=7.348\text{Å}$, $\alpha=93.65^\circ$, $\beta=92.14^\circ$, $\gamma=98.15^\circ$. S-a stabilit că noul compus de ambazonă cu acid lactic cristalizează în sistemul triclinic.

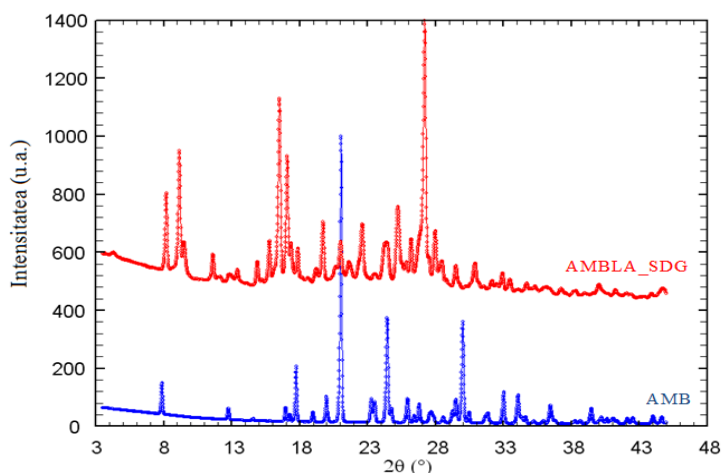


Figura 3.8.2. Difractogramele de raze X pentru AMB și sarea obținută prin metoda SDG din ambazonă cu acidul lactic (AMBLA_SDG).

3.8.3. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier

Din analiza benzilor spectrale din spectrele FTIR obținute pentru Ambazona și pentru compusul rezultat în urma aplicării metodei SDG, s-au identificat vibrațiile caracteristice care apar în structura acestor compuși. Vibrația de întindere de la $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ din amina primară din spectrul AMB (Figura 3.8.3.a) poate fi observată ca un umăr în spectrul AMBLA_SDG. Banda intensă și ascuțită identificată la $\sim 3226\text{ cm}^{-1}$ în spectrul AMB, se deplasează spre numere de undă mai mari ($\sim 3273\text{ cm}^{-1}$) datorită vibrației de întindere a legăturii NH și se reduce în intensitate în spectrul compusului AMBLA_SDG. Formarea de sare determină modificarea benzii de absorbție NH din amine [Socrates 2001]; Banda de la 3147 cm^{-1} care corespunde vibrației NH pentru ambazona pură, se deplasează la 3182 cm^{-1} în cazul spectrului înregistrat pentru noul compus și este atribuită vibrației de întindere a grupării NH_2^+ din amina secundară. De asemenea apare un nou umăr la $\sim 2975\text{ cm}^{-1}$ probabil datorită protonării aminei secundare (Figura 3.8.3.b) Vibrația aminei secundare de la 1508 cm^{-1} din spectrul AMB se regăsește în spectrul AMBLA_SDG, dar se reduce mult în intensitate.

Amina primară care are o bandă de absorbție de intensitate medie la $\sim 1613\text{ cm}^{-1}$ în spectrul compusului pur AMB, se regăsește în spectrul AMBLA_SDG $\sim 1618\text{ cm}^{-1}$, asociată cu formarea unui compus de tip sare. În spectrul înregistrat pentru AMBLA_SDG apare o nouă bandă de absorbție la $\sim 1676\text{ cm}^{-1}$, care este atribuită vibrației de deformare a grupării NH protonate NH_2^+ (Figura 3.8.3.b). Această frecvență nu este prezentă în spectrul FTIR al ambazonei pure, ceea ce dovedește că s-a format o sare între ambazonă și acidul lactic.

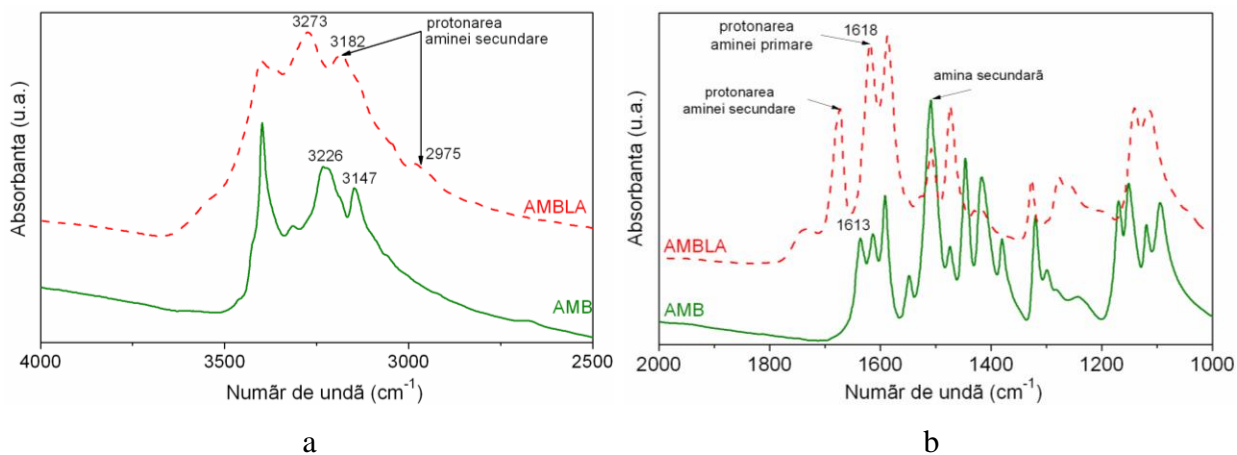


Figura 3.8.3. Spectrele FTIR pentru AMB și AMBLA_SDG în intervalul spectral 4000–2500 cm^{-1} (a) respectiv 2000–1000 cm^{-1} (b).

CAPITOLUL 4

4. Concluzii, contribuții originale, publicații, perspective

4.1. Concluzii generale

În prezentul studiu au fost preparați și investigați un număr mare de compuși biologic activi pe bază de ambazonă. Compușii respectivi sunt forme solide noi ale ambazonei care au fost obținuți și investigați pentru prima dată. În urma investigării probelor preparate prin metode analitice recomandate în studiul de forme solide și de monocristale, s-au desprins următoarele concluzii:

1. În funcție de solventul folosit în urma unor procedee de recristalizare, s-au stabilit condițiile în care ambazona anhidră se transformă în ambazona monohidrat și invers. În urma analizelor DTA-TGA, FTIR, RMN și difracție de raze X pe pulberi s-au evidențiat diferențele structurale și comportamentul termic diferit al ambazonei anhidre față de forma monohidrat. Din difracția de raze X pe pulberi cu variație de temperatură efectuată pe ambazona monohidrat, s-a stabilit că până la temperatura de 90°C se menține forma monohidrată, între 90-125°C se transformă în forma anhidră, între 125-185°C se menține forma anhidră, iar între 185-198°C dispare faza anhidră iar la 210°C se descompune. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute din analizele termice.

2. S-a reușit pentru prima dată obținerea de monocristale de ambazonă monohidrat și determinarea structurii cristaline din difracție de raze X pe monocristale; compusul cristalizează în sistemul monoclinic, având grupul spațial $P2_1/c$, cu o moleculă pe unitatea asimetrică. Au fost determinați parametrii celulei elementare, pozițiile atomilor în celula elementară și factorii de deplasare anizotropici. Din pozițiile atomilor în celula elementară s-au obținut distanțele dintre atomi, unghiurile de legătură și legăturile de hidrogen. S-a obținut monocristalul de ambazonă anhidră și a fost determinată structura cristalină a acestuia; s-a stabilit sistemul de cristalizare ca fiind monoclinic, grupul spațial $P2_1$, cu două molecule pe unitatea asimetrică. Au fost determinați parametrii celulei elementare, factorii de deplasare anizotropici și pozițiile atomilor în celula elementară. Din pozițiile atomilor în celula elementară s-au determinat distanțele dintre atomi, unghiurile de legătură și s-au evidențiat legăturile de hidrogen dintre molecule.

3. Au fost preparate forme solide de ambazonă cu acid acetic prin trei metode și au fost obținute trei forme solide distincte care au fost caracterizate prin difracție de raze X pe pulberi, metode termice și spectroscopice. Tot prin aceste metode s-au stabilit condițiile în care cele trei forme se transformă din unele în altele. De asemenea s-a pus în evidență că formele solide obținute sunt săruri. Din difracția de raze X pe pulberi cu variație de temperatură realizată pe forma solidă de ambazonă cu acid acetic obținută prin SDG în raport molar de 1:1, s-a stabilit temperatura la care compusul este stabil (100°C), după care se transformă în faza amorfă. Din difracția de raze X pe pulberi s-au indexat două dintre difractogramele formelor de ambazonă cu acid acetic obținute, s-a stabilit că ambele cristalizează în sistemul monoclinic, una având grupul spațial $C2$, iar cealaltă $C2/c$ și au fost determinați parametrii de rețea pentru aceste forme solide.

4. S-au preparat monocristale de ambazonă cu acid acetic prin metoda difuziei de vapori. A fost determinată structura cristalină și s-a stabilit că acest compus cristalizează în sistemul monoclinic, având grupul spațial $C2/c$, cu o moleculă de ambazonă și două molecule de acid acetic în unitatea asimetrică. S-au determinat parametrii de rețea, pozițiile atomilor în celula elementară, distanțele dintre atomi și unghiurile dintre legăturile acestora și s-au evidențiat legăturile de hidrogen inter și intramoleculare.

5. A fost obținută o formă solidă nouă din ambazonă cu acid clorhidric și evidențiată prin difracție de raze X pe pulberi și analize termice. Prin FTIR și RMN pe solide s-a stabilit că noul compus este de tip sare. Prin indexarea difractogramele de raze X pe pulberi s-a stabilit că noul compus cristalizează în sistemul monoclinic având grupul spațial $P2_1/c$, cu 4 molecule de ambazonă și 4 atomi de clor pe celula elementară.

6. O altă sare obținută a fost din ambazonă cu acid glutamic. Prin aplicarea metodelor DSC, DTA-TGA s-a evidențiat comportarea termică diferită a noul compus comparativ cu a ambazonei. Prin FTIR s-a identificat protonările la grupările amino din structura ambazonei, stabilindu-se în felul acesta caracterul de sare al compusului. Prin indexarea difractogramelor de raze X s-a ajuns la concluzia că sarea obținută cristalizează în sistemul monoclinic având grupul spațial $P2_1$, două molecule de ambazonă și două de acid glutamic în unitatea asimetrică. Această concluzie a fost susținută și de rezultatele analizei RMN pe solide. Prin difracție de raze X pe pulberi s-au determinat parametrii celulei elementare.

7. Din ambazonă cu acid para-aminobenzoic s-a obținut o formă solidă nouă care a fost investigată de asemenea prin metode termice și spectroscopice (FTIR și RMN) în urma cărora s-a confirmat formarea sării de ambazonă cu acid para-aminobenzoic. În urma indexării

difractogramelor de raze X, a rezultat că sistemul cristalografic al compusului este triclinic și au fost obținuți parametrii de rețea.

8. S-a preparat un nou compus din ambazonă cu acid aspartic prin aplicarea metodei SDG 5 minute respectiv o oră. S-au obținut două forme solide distincte. Din difracția de raze X pe pulberi pentru proba obținută prin SDG o oră s-a stabilit că sistemul de cristalizare este monoclinic și s-au obținut parametrii de rețea. Măsurătorile FTIR pe compușii obținuți prin SDG confirmă obținerea de sare a ambazonei cu acid aspartic. Măsurătorile de difracție cu variație de temperatură arată stabilitatea compusului obținut prin SDG o oră, până la temperatura de 198°C, rezultat care este în concordanță cu măsurătorile termice. Din analiza RMN pe solide s-a ajuns la concluzia că noul compus obținut prin SDG timp de 5 minute are două molecule de acid aspartic la o moleculă de ambazonă în unitatea asimetrică, iar compusul obținut prin SDG o oră are o moleculă de acid aspartic la o moleculă de ambazonă în unitatea asimetrică.

9. Din ambazonă cu acid lactic, s-a preparat un nou compus care a fost investigat prin metodele termice DSC, DTA-TGA. Prin metoda FTIR s-au evidențiat protonările la amine rezultând în felul acesta caracterul de sare al compusului ambazonă cu acid lactic. Din difracția de raze X pe pulberi s-a stabilit că sistemul cristalografic este triclinic și au fost obținuți parametri de rețea pentru acest compus.

10. Pornind de la ambazonă și acid nicotinic a fost obținută o nouă formă solidă care a fost investigată prin metode termice, stabilindu-se comportamentul termic distinct față de cel al ambazonei. În urma analizei FTIR, s-a concluzionat că are loc protonarea la amina secundară din structura ambazonei, ceea ce evidențiază formarea de sare. Din indexarea difractogramei compusului, a rezultat că acesta cristalizează în sistemul monoclinic și au fost determinați parametrii de rețea.

4.2. Contribuții originale

Ca o prezentare sintetică asupra rezultatelor obținute ar fi următoarele concluzii:

- ❖ S-au obținut 11 forme solide noi pe bază de ambazonă;
- ❖ Au fost caracterizate prin PXRD, metode termice (DSC, DTA-TGA) și metode spectroscopice (FTIR, RMN);
- ❖ S-au obținut monocristale pentru forma de ambazonă monohidrat respectiv anhidră și pentru compusul ambazonă cu acid acetic;
- ❖ S-a determinat structura cristalină completă pentru cele trei monocristale.

Bibliografie selectivă

- [Amlacher *et al* 1990a] Amlacher R, Baumgart J, Hartl A, Weber H, Kuhnel HJ, Schulze W, Hoffmann H, Arch Geschwulstforsch 60 (1990) 11–8.
- [Baumgart *et al* 1990] Baumgart J, Gase K, Schulze W, Suehnel J, Gutsche W, Behnke D, Cancer Lett. 54 (1990) 119-24.
- [Bernstein 2006] Bernstein J, Polymorphism and Patents from a Chemist's Point of View, în Polymorphism în the pharmaceutical industry, Wiley-VCH, Weinheim, (2006) 365–82.
- [Bond 2007] Bond AD, Cryst Eng Comm 9 (2007) 833-834.
- [Brittain 2009] Brittain HG, Polymorphism în pharmaceutical solids, (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), Second Edition Informa Healthcare USA Inc.52 Vanderbilt Avenue New York, NY 10017, 192 (2009).
- [Chakrapani *et al* 2008] Chakrapani H, Wilde TC, Citro ML, Goodblatt MM, Keefer LK, Saavedra JE, Bioorg. & Med. Chem., 16 (2008) 2657–64.
- [Etter *et al* 1993] Etter MC, Reutzel SM, Choo CG, J Am Chem Soc 115 (1993) 4411-12.
- [Fichtner *et Arnold* 1983] Fichtner I, Arnold W, Pharmazie, 38(2) (1983) 130–1.
- [Gomes *et Mallion* 2001] Gomes JANF, Mallion RB, Chem Rev 101 (2001) 1349–84.
- [Günter *et Hoffmann* 1990] Gunter L, Hoffmann H, Biophysical Chemistry (1990) 287-300.
- [Ivanova *et al* 2010] Ivanova B and Spitteller M, Spectrochim. ActaA 77 (2010) 849–855.
- [Jingyan *et al* 2008] Jingyan S, Jie L, Yun D, Ling H, Xi Y, Zhiyong W, Yuwen L and Cunxin W, JTAC 93 (2008) 403–9.
- [Koleva *et al* 2009] Koleva BB, Kolev T, Seidel RW, Spitteller M, Mayer-Figge H and Sheldrick WS, J Phys ChemA, 113 3088–95 (2009).
- [Kuhnel *et al* 1988a] Kuhnel HJ, Amlacher R, Baumgart J, Schulze W, Arch Geschwulstforsch 58 (1988) 217–22.
- [Löber *et Hoffmann* 1990] Löber G and Hoffmann H, Biophys Chem 35 (1990) 287–300.
- [Makareyer *et al* 1997] Makareyer EN, Makedonov Yu V and Lozorskaya EL, Russian Chemical Bulletin 46 (1997).
- [Mocuta *et al* 2008] Mocuta H, Borodi G, Simon S, 3rd International Conference Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems”, 7-10 sept Babes-Bolyai University Cluj-Napoca (2008).
- [Mureşan-Pop *et al* 2011a] Mureşan-Pop M, Kacsó I, Tripon C, Moldovan Z, Borodi Gh, Bratu I and Simon S, J. Therm. Anal. Calorim. 104 (2011) 299–306.
- [Mureşan-Pop *et al* 2011b] Mureşan-Pop M, Kacsó I, Filip X, Vanea E, Borodi G, Leopold N, Bratu I, Simon S, Spectroscopy, 26 (2011) 115-28.
- [Otsuka *et al* 1994] Otsuka M, Otsuka K, Kaneniwa N, Drug DevInd Pharm 20 (1994) 1649–60.
- [Petersen *et al* 1955] Petersen S, Gauss W, Urbschat E, Angew. Chem. 67 (1955), on line (2006) 217-231.
- [SDBS 2007] Spectral Database for Organic Compounds SDBS (<http://riodb01.ibase.aist.go.jp>) SDBS 1097 (2007).
- [Siegfried 1995] Siegfried RW, Drug Cosmet Ind 156 (1995) 30-37 104-105.
- [Socrates 2001] Socrates G, Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, 3rd edn, Wiley, West Sussex 332 (2001) 107-13 222-24 332.
- [Stilinic *et al* 2008] Stilinic V, Cincik D and Kaitner B, Acta Chim Slov 55 (2008) 874–79.
- [Tim *et al* 1999] Tim KY and Takacs, Novak K, Pharm Res 16 (1999) 377-81.

MULȚUMIRI

Doresc să-i mulțumesc în mod special coordonatorului științific al acestei lucrări, D-nului Prof. Univ. Dr. Simion Simon, pentru îndrumarea, sprijinul și valoroasele cunoștințe științifice oferite pe parcursul întregul program doctoral.

Mulțumiri grupului de cercetători de la INCDTIM din Cluj-Napoca: Dr. Irina Kacso, Tehn. Sorina Ciupe, Dr. G. Borodi și Dr. I. Bratu, pentru valoroasa colaborare din acești ani.

Mulțumesc colaboratorilor de la Universitatea din Bologna, departamentul “Molecular Crystals Engineering Group, G. Ciamician” Prof. Univ. Dr. Dario Braga, Prof. Univ. Dr. Fabrizia Grepioni, Dr. Lucia Maini din Bologna, pentru sprijinul acordat în cadrul experimentelor de creștere de monocristale.

De asemenea, îmi exprim mulțumirea față de toți colegii din cadrul Institutului de Cercetări Experimentale și Interdisciplinare ICEI (Cristina, Oana, Emilia, Adriana, Monica, Diana, Zsolt, Mihai) care mi-au oferit deopotrivă suport științific și sprijin moral.

Mulțumiri speciale față de cei care au condus proiectul POSDRU 6/1.5/S/3 – “Doctoral Studies: Through Science Towards Society” Babeș-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania, pentru finanțarea acordată în cei trei ani de studiu.

Și nu în ultimul rând,

Mulțumesc părinților mei, fiecei mele Isabelle, surorilor și prietenei mele Iulia Miclăuș, pentru susținerea și încurajările pe care mi le-au dat în acești ani.