

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI

FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

***RECUNOAȘTEREA MOLECULARĂ A UNOR COMPUȘI DE
INTERES BIOLOGIC CU RECEPTORI MACROCYCLICI
FUNCȚIONALIZAȚI***

***MOLECULAR RECOGNITION OF SOME COMPOUNDS OF
BIOLOGICAL INTEREST WITH FUNCTIONALIZED
MACROCYCLIC RECEPTORS***

Lidia KIM

Conducător științific,

Prof. Dr. Lucia MUTIHAC

***BUCUREȘTI
2011***

Mulțumiri

Pentru lucrarea de față, mulțumesc în primul rând d-nei Prof. Dr. Lucia Mutihac pentru răbdarea și înțelegerea pe care le-a arătat față de mine pe toată perioada studiilor de doctorat.

Îi mulțumesc pentru sprijin, încurajare și ajutorul pe care mi l-a oferit în tot acest timp atât ca profesor cât și ca mentor și model de viață. Îi sunt recunoscătoare pentru că m-a introdus în lumea chimiei supramoleculare unde am studiat o latură interesantă a chimiei și am învățat aspecte de bază legate de aplicabilitatea receptorilor macrociclici și a ansamblurilor supramoleculare.

De asemenea, vreau să-i mulțumesc d-lui Prof. Dr. Jacques Vicens de la Universitatea din Strasburg, Franța, pentru compușii macrociclici sintetizați în cadrul laboratorului dumnealui cu care mi-am realizat o parte din experimente și de asemenea pentru suportul și susținerea pe parcursul elaborării prezentei lucrări.

Vreau să mulțumesc, atât profesorilor cât și colegilor de la Departamentul de Chimie Analitică care m-au sprijinit pe toată durata doctoratului prin sfaturi și obiecții constructive.

În egală măsură mulțumesc d-lui Prof. Dr. Andrei Medvedovici pentru studiile spectrometrice de masă efectuate asupra complexilor supramoleculari.

Mulțumesc colegului meu, Dr. Ing. Petrișor Zamora Iordache pentru studiile efectuate prin Microscopie Electronică de Scanare și interpretarea rezultatelor obținute.

Nu în ultimul rând, vreau să mulțumesc soțului meu pentru răbdarea, susținerea și înțelegerea oferite pe întreaga perioadă a doctoratului.

***Recunoașterea moleculară a unor compuși de interes biologic cu
receptori macrociclici funcționalizați***

Elaborată de:

Lidia KIM

în vederea acordării titlului științific de doctor în domeniul fundamental: **ȘTIINȚE EXACTE**
domeniul: **CHIMIE**

Conducător științific

Prof. Dr. Lucia Mutihac

Departamentul de Chimie Analitică,
Facultatea de Chimie
Universitatea din București

COMISIA

Președinte

Acad. Prof. Dr. Marius Andruh

*Director Școala Doctorală în Chimie
Director Departamentul de Chimie
Anorganică, Facultatea de Chimie
Universitatea din București*

Referent

Prof. Dr. Elena Diacu

Departamentul de Chimie Analitică,
Facultatea de Chimie
Universitatea Politehnică din București

Referent

Dr. Jacques Vicens

*Directeur de recherche at CNRS
Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien Curien,
Laboratoire de Conception Moléculaire
Universitatea din Strasburg, CNRS, Franța*

Referent

Prof. Dr. Victor David

*Director Departamentul de Chimie Analitică,
Facultatea de Chimie
Universitatea din București*

CUPRINS

Introducere	6
PARTEA EXPERIMENTALĂ	
4. Caracterizarea complexelor supramoleculare - calix[4]arenă funcționalizată cu grupări carboxilice (1, 4) și cu grupări amidice (2, 3, 5) – aminoacid derivatizat - prin spectrometrie de masă	8
4.1. Considerații generale	8
4.4. Rezultate și discuții	9
4.5. Concluzii	10
5. Studiul extracției aminoacizilor alifatici și aromatici cu receptori calixarenici funcționalizați cu grupări carboxilice (1, 4) și grupări amidice (2, 3, 5)	11
5.1. Considerații generale	11
5.2. Echilibre de repartiție în extracția lichid-lichid	11
5.2.2. Extracția bazată pe formarea unei perechi de ioni la interfața dintre cele două faze	11
5.3. Condiții experimentale	13
5.3.1. Reactivi utilizați în procesele de extracție și re-extracție	13
5.3.2. Dispozitive și aparatura de lucru	14
5.4. Rezultate și discuții	15
5.4.1. Influența pH-ului în procesul de extracție	15
5.4.1.1. Influența pH-ului în cazul aminoacizilor aromatici metilesteri	15
5.4.4. Studiul extracției și re-extracției aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arene funcționalizate	17
5.4.4.1. Extracția și re-extracția aminoacizilor aromatici cu calix[4]arena funcționalizată 1	17
5.4.4.3. Extracția și re-extracția aminoacizilor aromatici cu calix[4]arena funcționalizată 3	18
5.4.4.5. Extracția și re-extracția aminoacizilor aromatici cu calix[4]arena funcționalizată 5	19
5.4.5. Studiul extracției și re-extracției aminoacizilor alifatici metilesteri cu calix[4]arene funcționalizate	20
5.4.5.1. Extracția și re-extracția serinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5	20
5.4.5.3. Extracția și re-extracția leucinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5	22
5.4.5.4. Extracția și re-extracția valinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5	23
5.4.5.5. Extracția și re-extracția cisteinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5	25
5.4.6. Extracția aminoacizilor aromatici metilesteri cu diferite concentrații de compus calixarenic	26
5.4.8. Studiul stoechiometriei aminoacizilor aromatici metilesteri în raport cu	

calix[4]arenele funcționalizate	27
5.4.8.1. Determinarea raportului de distribuție (D)	27
5.4.8.2. Raportul de combinare al L-TrpOMe cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5	28
5.4.8.3. Raportul de combinare al L-PheOMe cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5	28
5.4.9. Determinarea constantelor de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arene funcționalizate	29
5.6. Concluzii	31
6. Studiul transportului aminoacizilor aromatici nativi și derivatizați cu calix[4]arene funcționalizate cu grupări carboxilice (1, 4) și grupări amidice (2, 3, 5)	32
6.1. Considerații generale	32
6.2.2. Dispozitive utilizate în procesele de transport	32
6.5. Rezultate și discuții	33
6.5.2. Transportul aminoacizilor aromatici derivatizați cu calix[4]arene funcționalizate	33
6.5.2.1. Transportul aminoacizilor cu calix[4]arena funcționalizată 1	33
6.5.2.2. Transportul aminoacizilor cu calix[4]arena funcționalizată 2	34
6.7. Aspecte privind corelația între transportul aminoacizilor cu p-terț-butilcalix[4]arena și calix[4]arenele funcționalizate 1-5	35
6.8. Concluzii	36
7. Aspecte privind posibilitatea formării complexului gazdă – oaspete	37
7.1. Studii de interfață apă – solvent organic privind complexarea aminoacidului L-TrpOMe cu calix[4]arena funcționalizată cu grupări carboxilice (1)	37
7.1.1. Considerații generale	37
7.1.2. Modul de lucru și aparatura utilizată	37
7.1.3. Rezultate și discuții	37
7.1.4. Concluzii	39
8. Concluzii generale	40
Bibliografie	41

INTRODUCERE

Procesele biologice au la bază ansambluri moleculare complexe construite prin forțe intermoleculare.

Pionieratul oamenilor de știință din domeniul chimiei supramoleculare a fost acela de a încerca să reproducă în laborator aceleași ansambluri complexe și subtile, astfel încât acestea să poată imita în mod eficient procesele biologice. Forțele care dețin împreună aceste ansambluri moleculare sunt forțe slabe de tip: van der Waals, legături de hidrogen, interacții $\pi - \pi$ și cation - π , coordinarea și interacția hidrofobă. Aceste interacții slabe, necovalente, sunt responsabile pentru plierea proteinelor, transportul selectiv de ioni și molecule prin membrane, reacții enzimatice și formarea de agregate mai mari.

Recunoașterea moleculară (complexarea) și transportul diferitelor specii chimice și biologice, reprezintă un aspect important al chimiei supramoleculare cu implicații în procese biologice, tehnici analitice, procese de reciclare și mediul înconjurător și de asemenea în cataliză și medicină.

De-a lungul anilor, un număr mare de receptori eficienți și selectivi pentru cationi, anioni, săruri și enantiomeri, bazați pe diferite arhitecturi au fost sintetizați și studiați [2].

Alături de ciclodextrine, eteri coroață și criptanzi, calix[n]arenele sunt una dintre cele mai importante clase de receptori macrociclici.

Funcționalizarea calixarenelor are ca scop îmbunătățirea proprietăților de recunoaștere ale substraturilor cationice, anionice și moleculelor neutre, proprietăți care contribuie la creșterea selectivității receptorilor și a stabilității complexilor formați.

Este binecunoscut faptul că aminele biogene, aminoacizii, peptidele și proteinele constituie substraturi fundamentale în procesele biologice și artificiale.

Aminele și aminoacizii sunt printre cele mai importante dintre moleculele naturale ale sistemelor vii. Aminoacizii sunt construcții bloc de bază în structura proteinei și a altor biomolecule.

Aminele sunt formate în timpul proceselor metabolice normale în organism și sunt prezente în produsele alimentare de zi cu zi.

Familia calix[n]arenelor este profund implicată în recunoașterea moleculară a acestor compuși, mai ales în înțelegerea interacțiilor specifice biomoleculare care joacă un rol-cheie în chimia supramoleculară modernă.

Lucrarea de față prezintă ca obiectiv principal, noi aplicații analitice și biologice ale receptorilor calixarenici funcționalizați prin utilizarea acestora în recunoașterea moleculară a aminoacizilor alifatici și aromatici nativi și derivatizați.

Lucrarea cuprinde șapte capitole principale și concluzii dintre care primele trei capitole se referă la partea teoretică iar următoarele patru capitole la partea experimentală (originală).

În partea teoretică sunt prezentate aspecte generale privind recunoașterea compușilor chimici și biologici cu receptori macrociclici și aspecte privind procesele de separare și complexare ale acestor compuși cu calix[n]arene funcționalizate.

Partea originală este împărțită în patru capitole și concluzii dintre care capitolul 4 și capitolul 7 prezintă aspecte referitoare la caracterizarea complexilor formați între receptorii calixarenici studiați și aminoacizii derivatizați.

Capitolele 5 și 6 prezintă rezultatele obținute în urma studiilor privind procesele de extracție lichid – lichid și transport prin membrane lichide pentru o serie de aminoacizi alifatici și aromatici nativi și derivatizați cu calix[4]arene funcționalizate, având grefate la partea inferioară grupări de tip: amidice și carboxilice.

PARTEA EXPERIMENTALA

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

4. CARACTERIZAREA COMPLECȘILOR SUPRAMOLECULARI - CALIX[4]ARENĂ FUNCȚIONALIZATĂ CU GRUPĂRI CARBOXILICE (1, 4) ȘI GRUPĂRI AMIDICE (2, 3, 5) – AMINOACID DERIVATIZAT- PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ

4.1. Considerații generale

Proprietățile de legare ale unui oaspete de receptorul macrociclic, caracterizarea și dovada formării complecșilor gazdă-oaspete în soluție, pot fi obținute prin mai multe metode convenționale incluzând: rezonanța magnetică nucleară, spectrometria UV-Vis și spectrometria de fluorescență, dicroismul circular, difracția cu raze X, calorimetria, conductometria, etc.[2, 166].

Spectrometria de masă este un instrument suplimentar destul de recent, potrivit pentru studiul în fază de gaz al interacțiilor necovalente implicate în recunoaștere moleculară, fiind publicate diverse comentarii pe această temă [167-172].

În capitolul de față, sunt prezentate studii cuplate LC/MS (interfață de tip electrospray) și MS/MS privind formarea complecșilor între calix[4]arene funcționalizate și aminoacizi alifatici și aromatici.

Aceste studii au fost efectuate în scopul de a compara formarea complecșilor în soluție și în vid, precum și pentru a arăta unele efecte posibile de solvatare datorate solvenților din procesele de extracție și transport [177].

4.4. Rezultate și discuții

Modelele de ionizare sunt prezentate în *tabelul 3* [177].

Tabelul 3. Ionizarea ESI a aminoacizilor metilesteri
(valorile *m/z* boldate indică ionii majori)

Nr.	Aminoacid derivatizat (acronim)	Masa exactă	Polaritate	Comportament MS <i>m/z</i> /atribuire
1	L-TyrOMe	195	(+)	119/[MH-NH ₃ -CH ₃ OH-CO] ⁺ 136 /[MH-CH ₃ OCHO] ⁺ 147/[MH-NH ₃ -CH ₃ OH] ⁺ 179/[MH-NH ₃] ⁺ 196/[MH] ⁺ 218/[MNa] ⁺
			(-)	155/[M+OH ⁻ -CO-CHO] ⁻ 194 /[M-H] ⁻
2	L-TrpOMe	218	(+)	132/[MH-CO-CH ₂ O-CH ₂ =NH] ⁺ 143/[MH-OH ⁻ -CH ₃ -CO-NH ₂] ⁺ 159/[MH-CH ₃ OH-CO] ⁺ 170/[MH-OH ⁻ -CH ₃ OH] ⁺ 202 /[MH-OH] ⁺ 219/[MH] ⁺ 241/[MNa] ⁺
3	L-PheOMe	179	(+)	77/[MH-CH ₃ OH-CO-NH ₃ -C ₂ H ₂] ⁺ 103/[MH-CH ₃ OH-CO-NH ₃] ⁺ 120 /[MH-CH ₃ OH-CO] ⁺ 131/[MH-OH ⁻ -CH ₃ OH] ⁺ 163/[MH-OH] ⁺ 180/[MH] ⁺ 202/[MNa] ⁺
4	L-CysOMe	135	(+)	87/[MH-NH ₃ -CH ₃ OH] ⁺ 102/[MH-NH ₃ -OH] ⁺ 119/[MH-NH ₃] ⁺ 136 /[MH] ⁺ 158/[MNa] ⁺ 269/[M ₂ -H ₂ +H] ⁺ 291/[M ₂ -H ₂ +Na] ⁺
5	L-ValOMe	131	(+)	132 /[MH] ⁺
6	L-SerOMe	119	(+)	102 /[MH-H ₂ O] ⁺ 120/[MH] ⁺
7	L-LeuOMe	145	(+)	146 /[MH] ⁺
8	L-IleOMe	145	(+)	146 /[MH] ⁺
9	L-TreOMe	133	(+)	102/[MH-CH ₃ OH] ⁺ 116 /[MH-H ₂ O] ⁺ 134/[MH] ⁺

Aducții cu sodiu sunt observați doar pentru tirozină, triptofan, fenilalanină și derivatul cisteinei.

Ionizarea negativă este produsă de tirozină metilester doar datorită radicalului său fenolic. În scopul evaluării capacității calix[4]arenelor funcționalizate de a găzdui un aminoacid metilester, au fost amestecați împreună un receptor și un aminoacid într-un raport de 1/9.

Se observă din *tabelul 3* că receptorii **1** și **5** pot fi cu ușurință gazde pentru aminocizii metilesteri, că semnalele complexilor protonați sunt majore sau intense în cadrul spectrelor de masă dobândite în polaritatea pozitivă. În cazul calixarenei **5** nu se formează nici un complex gazdă-oaspete (probabil, datorită obstacolului steric al grupărilor fenolice funcționalizate responsabile pentru lipsa de incluziune).

Calix 2 interacționează slab cu aminoacizii metilesteri, excepție făcând L-TrpOMe. *Calix 3* interacționează slab numai cu derivatul triptofanului. Cu toate acestea, compușii înrudiți ai calixarenei **3**, în special **3/A** și **3/C** găzduiesc mai bine aminoacizii derivatizați. Receptorul **3/B** se comportă în mod similar cu produsul mamă. În toate cazurile, semnalele de masă ale calixarenelor libere sunt observabile, în sensul că complexul gazdă-oaspete nu a fost cantitativ sau poate fi defalcat în cadrul sursei de ioni. Ionizarea negativă nu produce nici un semnal care să ateste formarea complexilor gazdă-oaspete.

4.5. Concluzii

Capacitatea calixarenei funcționalizate de a prinde un aminoacid metilester poate fi ușor ecranată, deși observarea formării ionului molecular protonat al complexului gazdă-oaspete este evidentă în temeiul ionizării pozitive.

Deși separarea și caracterizarea calixarenelor de sinteză este posibilă prin intermediul HPLC – ESI/MS, în toate încercările de a efectua izolarea cromatografică a unui complex de incluziune nu s-au obținut rezultate concludente, studiile urmând a fi continuate în acest sens. Izolarea ionilor moleculari, corespunzători complexilor gazdă-oaspete și disocierea indusă colizional a acestora conduce în continuare la concluzia că fragmentarea nu poate să apară la nivelul celor doi parteneri cu o conservare simultană a includerii aminoacizilor.

Deși prin spectrometrie de masă nu s-au obținut rezultate evidente privind formarea complexilor de incluziune ai aminoacizilor cu calixarenele funcționalizate, rezultatele prezentate în continuarea lucrării confirmă calitatea calix[4]arenelor funcționalizate de a acționa ca agenți de extracție și transportori prin membrane lichide în extracția și transportul unor aminoacizi alifatici și aromatici, nativi și derivatizați.

5. STUDIUL EXTRACȚIEI AMINOACIZILOR ALIFATICI ȘI AROMATICI CU RECEPTORI CALIXARENICI FUNCȚIONALIZAȚI CU GRUPĂRI CARBOXILICE (1, 4) ȘI GRUPĂRI AMIDICE (2, 3, 5)

5.1. Considerații generale

α -aminoacizii prezintă o importanță deosebită, fiind utilizați în multe domenii ale industriei farmaceutice, alimentare, cosmetice, etc. În general se obțin prin hidroliza proteinelor și sunt deci produși naturali.

Calixarenele sunt molecule în formă de cupă, conțin 4, 6 sau 8 grupări fenolice unite între ele prin punți de metilen într-un macrociclu și sunt capabile să formeze complecși de incluziune cu o largă varietate de specii oaspete [181 - 183].

Calixarenele funcționalizate în calitate de extractanți s-au dovedit a fi receptori adecvați în extracția cu solvenți, în transportul prin membrane lichide precum și în construcția senzorilor.

Recunoașterea moleculară a compușilor chimici și biologici de către calix[n]arene are la bază interacții multiple necovalente de tipul legăturilor de hidrogen, forțe van Der Waals, legături π - π stacking, cation π și efecte hidrofobe care depind de tipul, forma și flexibilitatea receptorului și a substratului [184].

În ultimii ani, s-au sintetizat o serie de calix[4]arene funcționalizate, având grefate pe ramura inferioară sau superioară ale calixarenei diverse grupări funcționale capabile să mărească proprietățile acestora privind recunoașterea moleculară a compușilor chimici și biologici.

5.2. Echilibre de repartiție în extracția lichid-lichid

Extracția lichid-lichid se utilizează pentru separarea unor amestecuri de compuși și constă în punerea în contact a fazei lichide inițiale în care se găsesc compușii de separat cu un solvent nemiscibil sau greu miscibil.

5.2.2. Extracția bazată pe formarea unei perechi de ioni la interfața dintre cele două faze

Considerăm un sistem eterogen lichid-lichid în care faza apoasă conține atât un aminoacid în forma protonată în funcție de pH cât și un anion A^- , iar faza organică conține un ligand macrociclic, L .

Dacă anionul A^- are dimensiunea și structura compatibilă cu ligandul, aminoacidul se poate extrage din faza apoasă în solventul organic sub forma unei perechi de ioni ($R-NH_3^+A^-$), iar complexul format va fi de forma ($R-NH_3^+LA^-$) conform echilibrului:



cu constanta de extracție K_{ex} :

$$K_{ex} = \frac{[R - NH_3^+ LA^-]_{org}}{[R - NH_3^+ A^-]_w [L]_{org}} \quad (1.6)$$

în care: w – faza apoasă a sistemului

org – faza organică

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

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

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

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



caracterizat de constanta de aciditate K'_a :

$$K'_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (1.8)$$

Această constantă determină domeniul de pH la care predomină A^- în soluție.

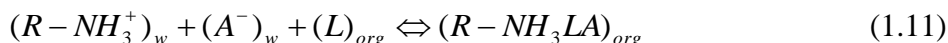
Ligandul macrociclic L se repartizează între cele două faze lichide ale sistemului în baza echilibrului:



Caracterizat de constanta de repartitie K_L :

$$K_L = \frac{[L]_{org}}{[L]_w} \quad (1.10)$$

Pe baza echilibrelor individuale prezentate în relațiile (1.1), (1.3), (1.5) și (1.7) se poate determina echilibrul global al extracției perechii de ioni:



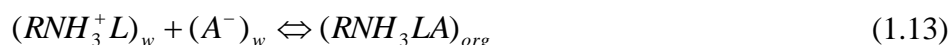
Având constanta globală de extracție K_{ex} :

$$K_{ex} = \frac{[R - NH_3 LA]_w}{[R - NH_3^+]_w [A^-]_w [L]_{org}} \quad (1.12)$$

Din reacția de echilibru (1.11) rezultă că, în faza apoasă trebuie să se realizeze condițiile de pH care, în baza echilibrelor (1.1) și (1.7), să asigure existența simultană a speciilor $R - NH_3^+$ și respectiv A^- .

Aminoacidul, fiind specia care face obiectul studiului asupra extracției sale în solventul organic, rezultă că specia HA care furnizează anionul de cuplaj A^- trebuie aleasă în funcție de valoarea constantei K_a a aminoacidului. Dacă specia HA are constanta de aciditate K_a' de același ordin de mărime cu constanta de aciditate K_a a aminoacidului, la pH-ul respectiv se asigură atât formarea speciei $R - NH_3^+$ cât și a speciei A^- în proporții însemnate (~50%), obținându-se astfel condiții de optimizare a extracției.

Deoarece valorile constantelor echilibrelor care implică specii încărcate și care se desfășoară în solventul organic sunt foarte mici și deci pot fi neglijate, echilibrul semnificativ al extracției se definește astfel:



și constanta de extracție K'_{ex} :

$$K'_{ex} = \frac{[RNH_3LA]_{org}}{[RNH_3^+L]_w [A^-]_w} \quad (1.14)$$

Se definește, de asemenea, raportul de distribuție al aminoacidului între cele două faze (org) și (w), astfel:

$$D = \frac{[R - NH_3LA]_{org}}{[R - NH_2]_w + [R - NH_3^+]_w} \quad (1.15)$$

Raportul de distribuție D , definit ca raportul dintre concentrația aminoacidului la echilibru în fază organică și în fază apoasă, servește ca o măsură a extractibilității și stabilității complexului format între ligand și aminoacid în faza organică.

5.3. Condiții experimentale

5.3.1. Reactivi utilizați în procesele de extracție și re-extracție

- *Calix 1* (25, 27 dihidroxi-26, 28 dicarboxil-*p-terțbutil-calix*[4]arenă);
- *Calix 2* (25, 27 dihidroxi-26, 28 dihidroxi-izopropil-diamidă-*p-terțbutil-calix*[4]arenă);
- *Calix 3* (25, 27 dihidroxi-26, 28 trihidroxi-*terțbutil-diamidă-p-terț-butilcalix*[4]arenă);
- *Calix 4* (25, 26, 27, 28 tetracarboxil-*p-terțbutil-calix*[4]arenă);
- *Calix 5* (25, 26, 27, 28 tetrahidroxietil-etoxi-amidă-*p-terțbutil-calix*[4]arenă).

Calixarenele **1-5** au fost sintetizate în laboratorul Laboratoire de Conception Moléculaire al Universității din Strasbourg, Franța (*fig. 52*) [178, 179].

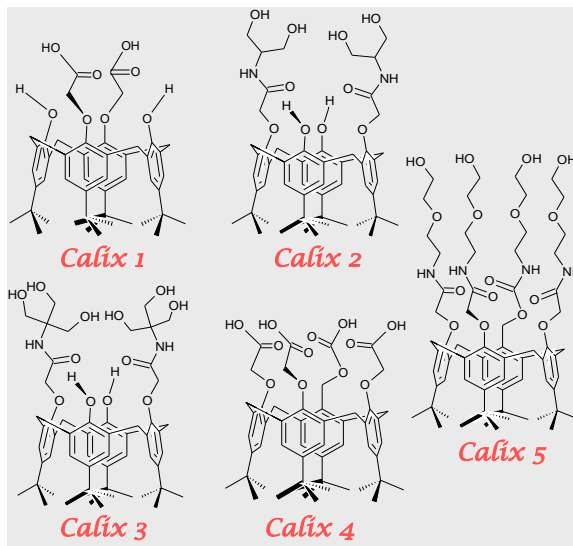


Figura 52. Structurile calix[4]arenelor funcționalizate

- **Aminoacizii alifatici și aromatici metilesteri hidroclorurați și nativi L-amino** (L-leucină (L-Leu), L-serină (L-Ser), L-izoleucină (L-Ile), L-valină (L-Val), L-cisteină (L-Cys), L-treonină (L-Thr) și aminoacizii aromatici; L-triptofan (L-Trp), L-fenilalanină (L-Phe) și L-tirozină (L-Tyr)), puritate > 98%, producător Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germania) (*fig. 49, cap. 4.2.1*);
- **Cloroform**, puritate analitică, producător Merck (Darmstadt, Germania);
- **Soluție tampon** (NaOAc/HCl, MES/NaOH, HEPES/NaOH, TAPS/NaOH și AMP/HCl), puritate analitică, producător Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germania)
- **Apă bidistilată** (Millipore)

5.3.2. Dispozitive și aparatura de lucru

Extracțiile și re-extracțiile aminoacizilor alifatici și aromatici cu calix[4]arnele funcționalizate **1-5** s-au realizat în pâlnii de separare iar soluțiile stoc s-au preparat în baloane cotate de 25 și 50 ml. Pentru cântărirea compușilor s-a utilizat balanța analitică iar pentru citirea absorbanțelor celor două faze s-a utilizat spectrofotometrul UV-VIS Jasco V-530. pH-ul soluțiilor de aminoacizi s-a măsurat cu un pH-metru cu electrod de sticlă și electrod de referință.

Extracția procentuală a fost calculată după relația Pedersen [26], astfel:

$$E\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (1.19)$$

unde: A_0 - absorbanta fazei apoase înainte de extracție;

A - absorbanta fazei apoase după extracție;

sau considerând concentrațiile soluțiilor, expresia (1.19), poate fi scrisă:

$$E\% = [(C_0 - C) / C_0] \times 100 \quad (1.20)$$

unde: C_0 și C sunt concentrațiile inițiale și finale, înainte și după extracție.

Fiecare experiment a fost repetat de 5 ori.

Constantele de extracție s-au calculat conform relației:

$$K_{ex} = \frac{[R - NH_3^+ L]}{[R - NH_3^+][L]} \quad (1.4)$$

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

$[R - NH_3^+]$ - reprezintă concentrația aminoacidului în faza apoasă minus concentrația complexului (mol/L);

$[L]$ - reprezintă concentrația calixarenei în faza organică minus concentrația complexului (mol/L).

Coefficientul de extincție s-a determinat prin legea Beer:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad (1.21)$$

unde: A - reprezintă absorbanta aminoacidului după extracția acestuia cu calixarena derivatizată;

c - reprezintă concentrația inițială a aminoacidului;

l - reprezintă lungimea cuvei utilizate (1 cm).

5.4. Rezultate și discuții

5.4.1. Influența pH-ului în procesul de extracție

5.4.1.1. Influența pH-ului în cazul aminoacizilor aromatici metilesteri

Rezultatele extracției celor patru receptori calixarenici, în funcție de pH-ul soluției apoase de aminoacid aromatic metilester, sunt prezentate în figurile 54, 55 și 56.

L-TrpOMe				
pH	Calix 1 (E%)	Calix 2 (E%)	Calix 3 (E%)	Calix 5 (E%)
1,5	1,4	0	1,2	0
2,2	4,7	2,9	4,1	1,3
3,3	2,7	4,4	6,1	3,4
5,5	42,1	22,1	24,5	34,8
6,4	2,2	13,1	7,1	11,2
7,5	0	5,2	2,1	7,4
8,4	1,5	0	0	1,0
10,7	0	0	3,2	1,7

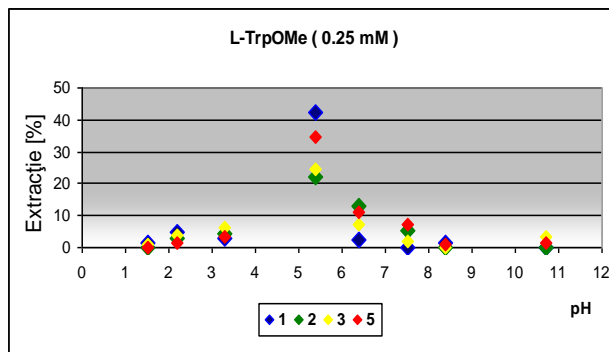


Figura 54. Variația extracției în funcție de pH, pentru L-TrpOMe cu calix[4]arenele 1,2,3 și 5 [186] ($C_{L-TrpOMe}=2,5 \times 10^{-4} M$ în soluție apoasă; $C_{Calix 1}=C_{Calix 2}=C_{Calix 3}=C_{Calix 5}=5 \times 10^{-4} M$ în cloroform; $T=25^{\circ}C$).

L-PheOMe				
pH	Calix 1 (E%)	Calix 2 (E%)	Calix 3 (E%)	Calix 5 (E%)
1,5	0	0,3	0	0,5
2,2	0	0	0	0
3,3	8,1	12,8	0	9,9
5,5	35,8	22,7	16,8	16,8
6,4	8,4	5,1	2,1	4,5
7,5	7,5	1,0	3,5	2,1
8,4	1,0	0	0	0
10,7	0	0	0	1,0

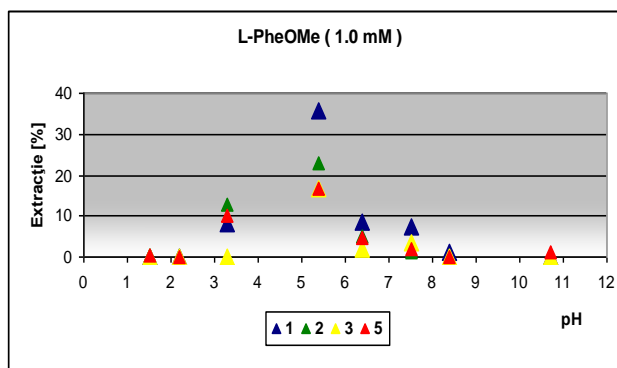


Figura 55. Variația extracției în funcție de pH, pentru L-PheOMe cu calix[4]arenele 1,2,3 și 5 [186] ($C_{L-PheOMe}=1 \times 10^{-3} M$ în soluție apoasă; $C_{Calix 1}=C_{Calix 2}=C_{Calix 3}=C_{Calix 5}=5 \times 10^{-4} M$ în cloroform; $T=25^{\circ}C$).

L-TyrOMe				
pH	Calix 1 (E%)	Calix 2 (E%)	Calix 3 (E%)	Calix 5 (E%)
1,5	4,9	0	4,7	3,0
2,2	4,5	4,1	3,3	2,4
3,3	3,4	3,4	1,2	3,3
5,5	13,9	5,8	9,3	6,4
6,4	7,9	3,2	2,1	3,2
7,5	4,3	1,1	0	2,5
8,4	0	0	0	0
10,7	1,0	0	0	0

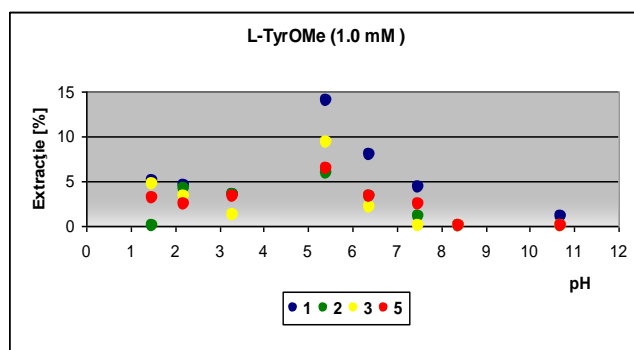


Figura 56. Variația extracției în funcție de pH, pentru L-TyrOMe cu calix[4]arenele 1,2,3 și 5 [186] ($C_{L-TyrOMe}=1 \times 10^{-3} M$ în soluție apoasă; $C_{Calix 1}=C_{Calix 2}=C_{Calix 3}=C_{Calix 5}=5 \times 10^{-4} M$ în cloroform; $T=25^{\circ}C$).

După cum se observă din graficele de mai sus, pH-ul optim al soluției apoase de aminoacid în procesul de extracție este 5,5.

Ordinea randamentelor de extracție pentru cei trei aminoacizi metilesteri la pH \approx 5,5 este:
 L-TrpOMe > L-PheOMe > L-TyrOMe.

Din punct de vedere al ligandului, la pH \approx 5,5, cel mai bun extractant este *Calix 1* pentru toți cei trei aminoacizi cu un randament de extracție de 42,1 % în cazul L-TrpOMe, 35,8 % în cazul L-PheOMe și 13,9 % în cazul L-TyrOMe. Ordinea celorlalți compuși calixarenici este diferită de la un aminoacid la celălalt. Cea mai mică valoare a randamentului de extracție la pH 5,5 este în cazul aminoacidului L-TyrOMe extras de *Calix 2*, având extractibilitatea 5,8 %.

5.4.4. Studiul extracției și re-extracției aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arene funcționalizate

5.4.4.1. Extracția și re-extracția aminoacizilor aromatici cu calix[4]arena funcționalizată 1

Spectrele obținute în urma extracției și re-extracției aminoacizilor aromatici metilesteri cu calixarena derivatizată **1** sunt prezentate în figura 66.

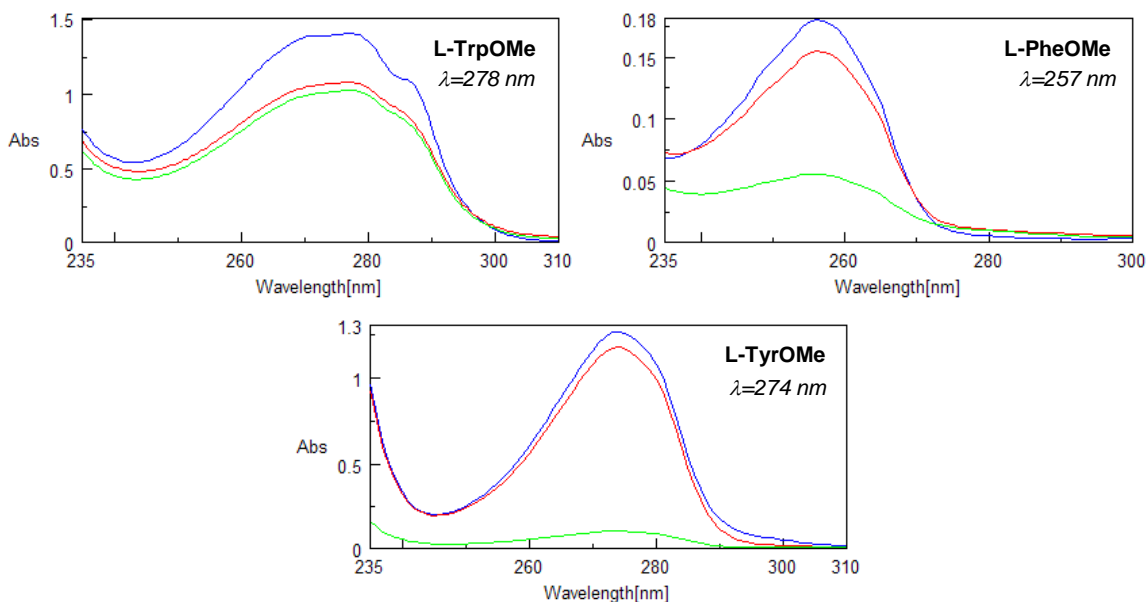


Figura 66. Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție și re-extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu **Calix 1**.

(—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
 (—) spectrul UV-Vis după re-extracție.

Rezultatele obținute în cazul extracției și re-extracției aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arena funcționalizată **1** sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Tabelul 6. *Extracția și re-extracția aminoacizilor aromatici cu Calix 1*
 ($C_{L-TrpOMe}=2,5 \times 10^{-4} M$; $C_{L-PheOMe}=1 \times 10^{-3} M$; $C_{L-TyrOMe}=1 \times 10^{-3} M$ în soluție apoasă;
 $C_{Calix 1}=5 \times 10^{-4} M$ în cloroform, $T = 25^{\circ}C$).

<i>Calix 1</i>				
<i>Aminoacid</i>	<i>Extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Re-extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>L-TrpOMe</i>	50,1	2,4	49,2	1,8
<i>L-PheOMe</i>	23,8	1,5	11,5	0,9
<i>L-TyrOMe</i>	12,4	1,2	10,1	1,3

Din *tabelul 6*, se poate observa că ordinea de descreștere a extracției celor trei aminoacizi este următoarea:

$$L-TrpOMe (50,1\%) > L-TyrOMe (23,8\%) > L-PheOMe (12,4\%)$$

După cum se observă, atât în cazul extracției cât și în cazul re-extracției, cele mai mari valori ale procentelor de extracție și re-extracție se regăsesc la aminoacidul L-TrpOMe.

Atât structura aminoacidului cât și hidrofobicitatea influențează modul de manifestare al acestuia [175].

5.4.4.3. *Extracția și re-extracția aminoacizilor aromatici cu calix[4]arena funcționalizată 3*

Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție și re-extracție ale celor trei aminoacizi cu Calix 3 sunt prezentate în *figura 68*.

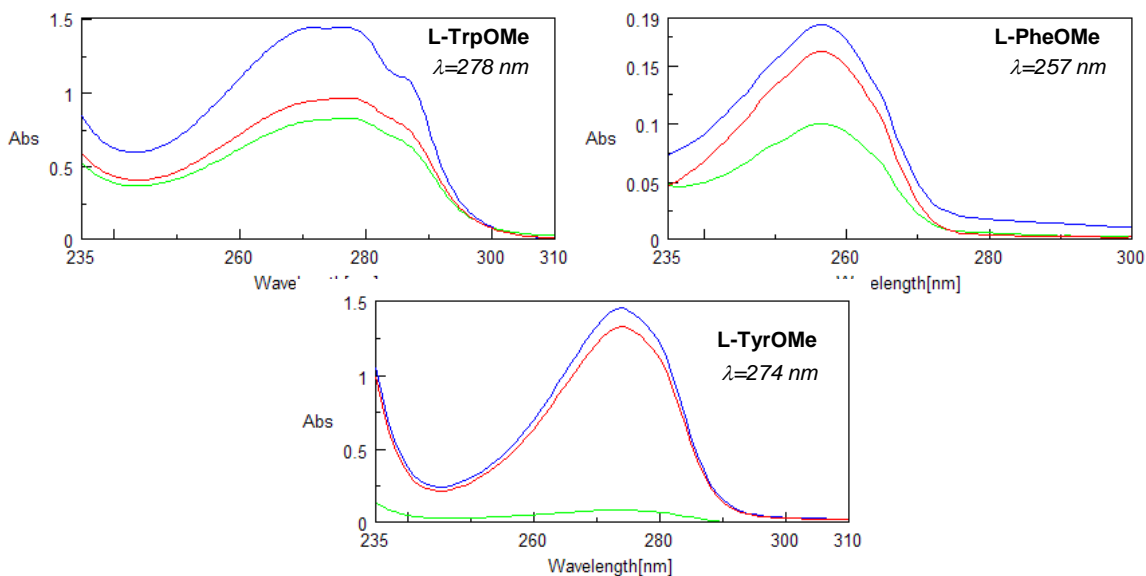


Figura 68. *Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu Calix 3.*

(—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
 (—) spectrul UV-Vis după re-extracție.

Valorile procentelor de extracție și re-extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arena funcționalizată **3** sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Tabelul 8. Rezultatele obținute în cazul extracției și re-extracției aminoacizilor aromatici cu Calix **3**
 ($C_{L-TrpOMe}=2,5 \times 10^{-4} M$; $C_{L-PheOMe}=1 \times 10^{-3} M$; $C_{L-TyrOMe}=1 \times 10^{-3} M$ în soluție apoasă;
 $C_{Calix\ 3}=5 \times 10^{-4} M$ în cloroform; $T = 25^\circ C$).

Calix 3				
Aminoacid	Extracție (%)	RSD (%)	Re-extracție (%)	RSD (%)
<i>L-TrpOMe</i>	61,1	2,7	57,1	3,3
<i>L-PheOMe</i>	21,4	1,6	20,7	2,1
<i>L-TyrOMe</i>	16,7	2,5	8,2	2,2

Din *tabelul 8*, se observă că aminoacidul *L-TrpOMe* este extras de Calix **3** în proporție de 61,1 % și se regăsește după re-extracție în faza apoasă acidă (pH 1,5) în proporție de 57,1 %. În cazul extracției aminoacidului *L-PheOMe* (21,4 %), acesta se regăsește în faza apoasă acidă într-un procent de 20,7 % .

L-TyrOMe este extras de Calix **3** în proporție de 16,7 % și se regăsește în faza apoasă acidă în proporție de 8,2 %. Ca și în cazul calix[4]arenei derivatizată **2**, ordinea extracției este *L-TrpOMe* > *L-PheOMe* > *L-TyrOMe*.

5.4.4.5. Extracția și re-extracția aminoacizilor aromatici cu calix[4]arena funcționalizată **5**

Spectrele UV-Vis obținute în procesul de extracție al aminoacizilor *L-TrpOMe* și *L-PheOMe* cu Calix **5** sunt prezentate în *figura 70*.

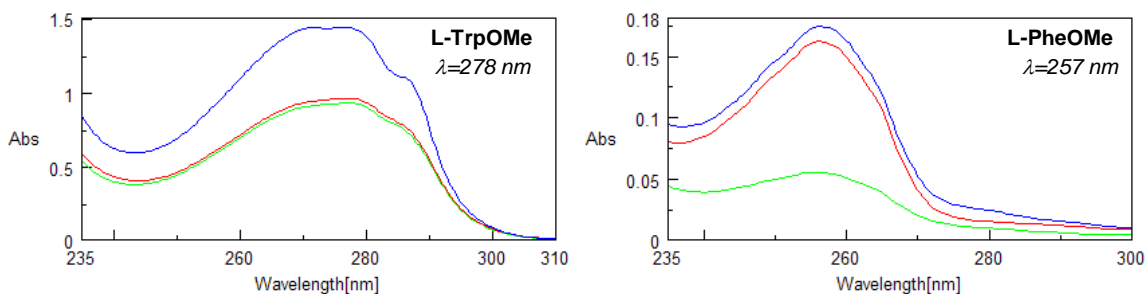


Figura 70. Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu Calix **5**.

(—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
 (—) spectrul UV-Vis după re-extracție.

Randamentele de extracție și re-extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arena funcționalizată **5** sunt prezentate mai jos:

Tabelul 10. Rezultatele obținute în cazul extracției și re-extracției aminoacizilor aromatici cu Calix 5
($C_{L-TrpOMe}=2,5 \times 10^{-4} M$; $C_{L-PheOMe}=1 \times 10^{-3} M$; $C_{L-TyrOMe}=1 \times 10^{-3} M$ în soluție apoasă;
 $C_{Calix\ 4}=5 \times 10^{-4} M$ în cloroform; $T = 25^{\circ}C$)

<i>Calix 5</i>				
<i>Aminoacid</i>	<i>Extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Re-extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>L-TrpOMe</i>	65,8	2,3	62,0	0,9
<i>L-PheOMe</i>	13,5	3,5	10,1	0,7
<i>L-TyrOMe</i>	6,3	1,3	1,9	0,2

Din tabelul 10, se poate vedea ca ordinea de descreștere a extracției celor trei aminoacizi este următoarea: L-TrpOMe (65,8 %) > L-PheOMe (13,5 %) > L-TyrOMe (6,3 %).

Atât extracția, cât și re-extracția variază la fel ca în cazul receptorului **2** în sensul L-TrpOMe > L-PheOMe > L-TyrOMe.

Ca și la ceilalți receptori, atât în cazul extracției cât și în cazul re-extracției, cele mai mari valori ale randamentelor de extracție și re-extracție se regăsesc la aminoacidul L-TrpOMe. Atât structura acestuia cât și hidrofobicitatea influențează modul de legare al acestuia.

5.4.5. Studiul extracției și re-extracției aminoacizilor alifatici metilesteri cu calix[4]arene funcționalizate

5.4.5.1. Extracția și re-extracția serinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5

Serina este unul dintre cei doi aminoacizi hidroxil. Atât serina cât și alanina sunt în general considerate hidrofile datorită capacității de lipire a acestora de hidrogen din gruparea hidroxil. Serina diferă de alanină prin faptul că unul dintre hidrogenii din gruparea metilen se înlocuiește cu o grupă hidroxil.

Structura serinei metilester este prezentată mai jos în figura 71.



Figura 71. Structura serinei metilester

Spectrele UV-Vis obținute în urma extracției L-SerOMe cu receptorii calixarenici **1**, **2**, **3** și **5** sunt prezentate în figura 72.

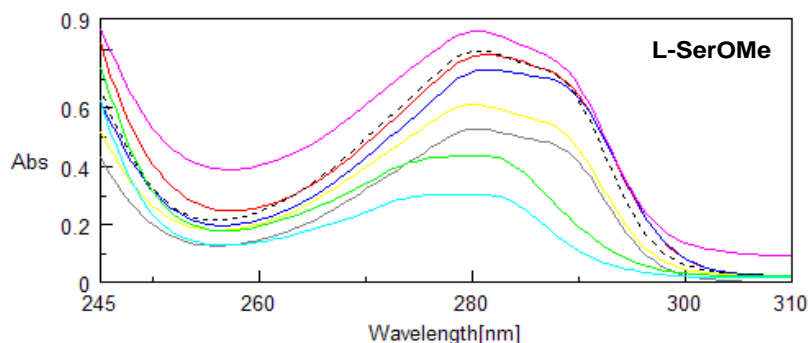


Figura 72. Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție ale *L-SerOMe* cu **Calix 1, 2, 3, 5**.

Calix 1 ($\lambda = 282,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (- - -) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 2 ($\lambda = 281$ nm) (- - - - -) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 3 ($\lambda = 280$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 5 ($\lambda = 280,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;

Rezultatele obținute în cazul extracției și re-extracției serinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate **1, 2, 3 și 5** sunt prezentate în tabelul 11.

Tabelul 11. Rezultatele obținute în cazul extracției și re-extracției serinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate **1, 2, 3 și 5**

($C_{L-SerOMe} = 1 \times 10^{-3}$ M în sol. apoasă); $C_{Calix 1} = C_{Calix 2} = C_{Calix 3} = C_{Calix 5} = 5 \times 10^{-4}$ M în cloroform; $T = 25^\circ C$).

<i>L-SerOMe</i>				
Receptor	Extracție (%)	RSD (%)	Re-extracție (%)	RSD (%)
<i>Calix 1</i>	12,8	0,9	6,2	1,1
<i>Calix 2</i>	17,8	0,7	17,9	2,5
<i>Calix 3</i>	18,2	2,1	3,1	0,4
<i>Calix 5</i>	44,2	2,4	0,8	0,2

Ordinea extracției aminoacidului cu calixarenele derivatizate **1, 2, 3 și 5** este următoarea:

$$Calix 5 (44,2 \%) > Calix 3 (18,2 \%) > Calix 2 (17,8 \%) > Calix 1 (12,8 \%).$$

Gruparea hidroxil din structura serinei metilester, induce acesteia o comportare hidrofilă. În urma extracției aceasta are afinitate mai mare pentru calixarena tetraamidă **5** decât pentru celelalte calixarene legându-se posibil, de lanțurile hidrocarbonate din partea inferioara a calixarenei.

Dacă în cazul extracției, valorile cresc de la receptorul calixarenic **1** la receptorul **5**, în cazul re-extracției, valorile scad de la receptorul **1** la receptorul **5**.

În cazul re-extracției, calixarena **1** cu două grupări carboxil în structura ei, eliberează cel mai ușor aminoacidul în faza apoasă acidă (pH=1,5) iar calixarena **5** cu patru grupări amide rămâne puternic legată de aminoacidul extras din faza apoasă.

5.4.5.3. Extracția și re-extracția leucinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate **1**, **2**, **3** și **5**

Leucina ca și izoleucina și valina, prezintă o ramificație în lanțul alifatic. În comparație cu valina, leucina are o grupare metilen suplimentară, dar ambele sunt hidrofobe și în general înglobate în pliurile proteinei.

Structura leucinei metilester este prezentată în *figura 75*.

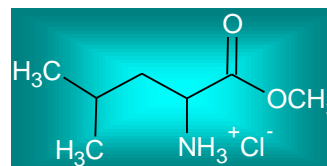


Figura 75. Structura leucinei metilester

Spectrele UV-Vis obținute în urma extracției și re-extracției L-LeuOMe cu Calix **1**, **2**, **3** și **5** sunt prezentate în *figura 76*.

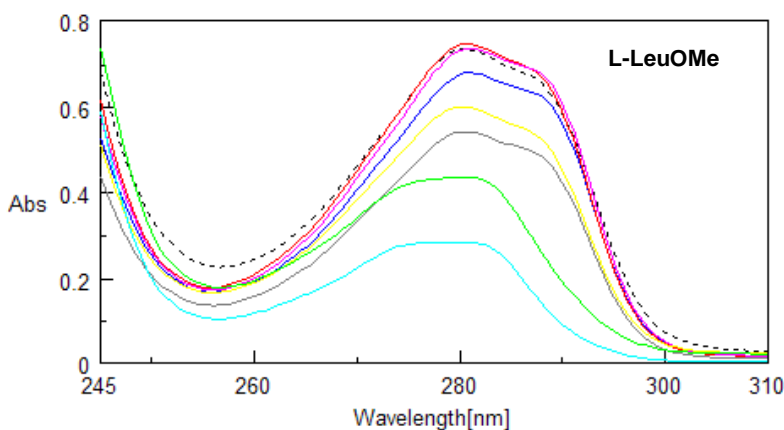


Figura 76. Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție ale L-LeuOMe cu Calix **1**, **2**, **3**, **5**.

Calix 1 ($\lambda = 282,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 2 ($\lambda = 281$ nm) (- - - - -) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 3 ($\lambda = 280$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 5 ($\lambda = 280,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;

Valorile extracției și re-extracției aminoacidului alifatic cu calix[4]arenele funcționalizate sunt prezentate în *tabelul 13*.

Tabelul 13. *Extracția și re-extracția leucinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5*
($C_{L\text{-LeuOMe}}=1 \times 10^{-3} \text{M}$ în sol. apoasă; $C_{\text{Calix } 1} = C_{\text{Calix } 2} = C_{\text{Calix } 3} = C_{\text{Calix } 5} = 5 \times 10^{-4} \text{M}$ în cloroform; $T = 25^\circ\text{C}$.)

<i>L-LeuOMe</i>				
<i>Receptor</i>	<i>Extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Re-extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>Calix 1</i>	33,1	2,7	-	-
<i>Calix 2</i>	-	-	-	-
<i>Calix 3</i>	27,5	3,9	5,0	1,6
<i>Calix 5</i>	73,1	3,5	-	-

În cazul L-LeuOMe, ordinea de descreștere a extracției este aceeași ca și în cazul izoleucinei și anume:

Calix 5 (73,1 %) > *Calix 3* (27,5 %) > *Calix 1* (33,1 %) > *Calix 2* (0,0 %)

În cazul extracției celor doi aminoacizi alifatici izomeri cu calixarena **2** diacidă se poate observa din grafic că leucina nu se extrage, iar randamentul pentru izoleucină este foarte mic (1,7 %).

Cele două grupări carboxil grefate pe structura calixarenei **2** influențează extracția celor doi aminocizi.

Ligandul **3**, este singurul care eliberează aminoacidul în faza apoasă acidă în urma re-extracției cu un randament de 5,0 %.

5.4.5.4. *Extracția și re-extracția valinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5*

Valina, un aminoacid esențial, este hidrofobă și se găsește de obicei în interiorul proteinei. Valina diferă de treonină prin înlocuirea grupării hidroxil cu o grupare metil.

Valina și treonina sunt aproximativ de aceeași formă și volum. Este dificil chiar și într-o structură de înaltă rezoluție a unei proteine pentru a distinge valina de treonină.

Structura valinei metilester este prezentată în *figura 77*.



Figura 77. *Structura valinei metilester*

Spectrele UV-Vis obținute în urma extracției și re-extracției L-ValOMe cu Calix **1**, **2**, **3** și **5** sunt prezentate în *figura 78*.

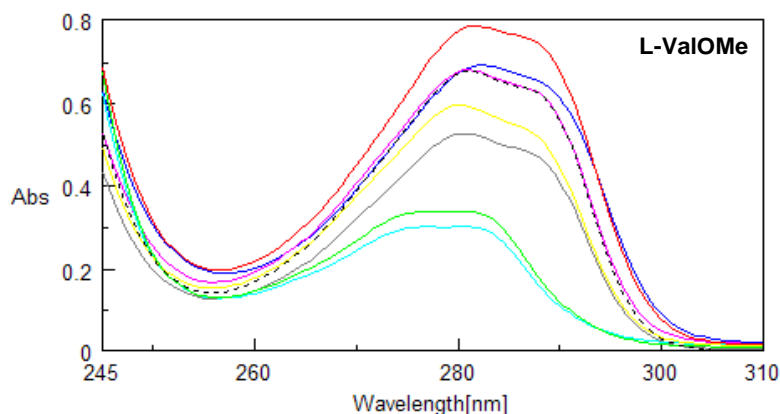


Figura 78. Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție ale *L-ValOMe* cu **Calix 1, 2, 3, 5**.

Calix 1 ($\lambda = 282,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (- - -) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 2 ($\lambda = 281$ nm) (- - - -) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 3 ($\lambda = 280$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 5 ($\lambda = 280,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;

Valorile procentelor de extracție și re-extracție ale aminoacidului valină metilester cu calix[4]arenele funcționalizate **1, 2, 3** și **5** sunt prezentate în *tabelul 14*.

Tabelul 14. Extracția și re-extracția valinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate **1, 2, 3** și **5**

($C_{L-ValOMe} = 1 \times 10^{-3}$ M în sol. apoasă; $C_{Calix 1} = C_{Calix 2} = C_{Calix 3} = C_{Calix 5} = 5 \times 10^{-4}$ M în cloroform; $T = 25^\circ\text{C}$)

<i>L-ValOMe</i>				
Receptor	Extracție (%)	RSD (%)	Re-extracție (%)	RSD (%)
<i>Calix 1</i>	51,4	2,8	-	-
<i>Calix 2</i>	-	-	-	-
<i>Calix 3</i>	45,1	2,2	18,0	2,7
<i>Calix 5</i>	28,2	4,5	1,5	2,1

Ca și în cazul leucinei, receptorul **2** nu extrage aminoacidul din faza apoasă.

Dacă la aminoacizii prezentați anterior, cel mai bun extractant este calixarena derivatizată **5**, în cazul valinei metilester, cel mai bun extractant este calixarena **1** (51,4 %), urmată de calixarena **3** cu un randament de 45,1 % și calixarena **5** cu un randament de extracție de 28,2 %. În cazul re-extracției, receptorul **3** eliberează aminoacidul în faza apoasă acidă cu un randament de 18,0 %.

5.4.5.5. Extracția și re-extracția cisteinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5

Cisteina este unul dintre cei doi aminoacizi care conțin sulf; celălalt este metionina. Cisteina diferă de serină printr-un singur atom – atomul de sulf din gruparea tiol înlocuiește atomul de oxigen din gruparea hidroxil.

Luând în considerare diferențele, de exemplu dintre H₂O și H₂S, cei doi aminoacizi sunt totuși, mult mai diferiți în proprietățile lor fizice și chimice decât ar putea sugera asemănarea lor.

Structura cisteinei metilester este prezentată în figura 79.

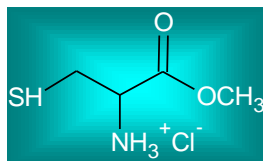


Figura 79. Structura cisteinei metilester

Cisteina, joacă un rol-cheie în stabilizarea proteinei extracelulare. Cisteina poate reacționa cu ea însăși pentru a forma un dimer oxidat de formare a unei obligațiuni disulfid.

Într-o celulă mediul este prea puternic pentru formarea disulfidului, dar în mediul extracelular, disulfidul se poate forma și joacă un rol-cheie în stabilizarea multor astfel de proteine extracelulare, cum ar fi enzimele digestive ale intestinului subțire.

Spectrele UV-Vis obținute în urma extracției și re-extracției L-CysOMe cu Calix 1, 2, 3 și 5 sunt prezentate în figura 80.

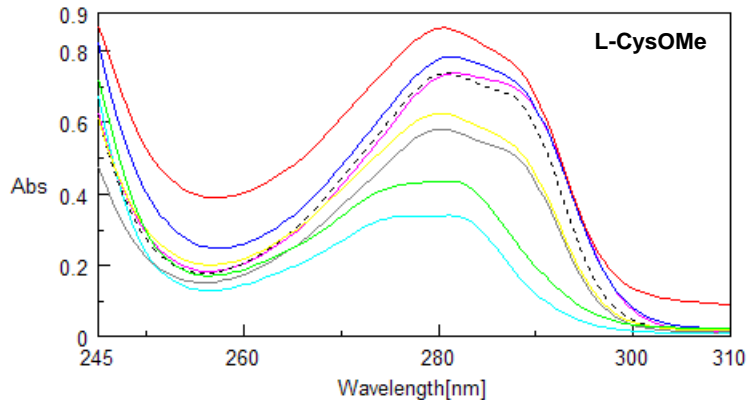


Figura 80. Spectrele UV-Vis obținute în procesele de extracție ale L-CysOMe cu Calix 1, 2, 3, 5.

Calix 1 ($\lambda = 282,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 2 ($\lambda = 281$ nm) (- - -) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 3 ($\lambda = 280$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;
Calix 5 ($\lambda = 280,5$ nm) (—) spectrul UV-Vis înainte de extracție; (—) spectrul UV-Vis după extracție;

Valorile extracției și re-extracției cisteinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate sunt prezentate în tabelul 15.

Tabelul 15. Extracția și re-extracția cisteinei metilester cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5 ($C_{L-CysOMe}=1 \times 10^{-3} M$ în sol. apoasă; $C_{Calix 1}=C_{Calix 2}=C_{Calix 3}=C_{Calix 5}=5 \times 10^{-4} M$ în clorofom; $T = 25^{\circ}C$.)

<i>L-CysOMe</i>				
<i>Receptor</i>	<i>Extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Re-extracție (%)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>Calix 1</i>	28,8	3,3	1,1	0,6
<i>Calix 2</i>	-	-	-	-
<i>Calix 3</i>	22,8	2,8	-	-
<i>Calix 5</i>	30,2	2,5	1,2	0,3

Din tabelul de mai sus, se poate vedea ca ordinea în care are loc extracția aminoacidului este următoarea:

Calix 5 (30,2 %) > *Calix 1* (28,8 %) > *Calix 3* (22,8 %) > *Calix 2* (0,0 %)

În cazul re-extracției, regăsirea aminoacidului în faza apoasă acidă (pH=1,5) are loc cu un randament foarte slab numai în cazul receptorilor 1 (1,1 %) și 5 (1,2 %).

Ca și la ceilalți doi aminoacizi (leucină și valină) și în cazul cisteinei, receptorul 2 diacid nu extrage aminoacidul din faza apoasă.

Atât structura aminoacidului cât și hidrofobicitatea acestuia influențează modul de manifestare al extracției.

5.4.6. Extracția aminoacizilor aromatici metilesteri cu diferite concentrații de compus calixarenic

Pentru a vedea cum variază randamentele de extracție în funcție de concentrația diferită de ligand, s-au realizat extracții pentru cei trei aminoacizi aromatici metilester de concentrație ($1 \times 10^{-3} M$) cu concentrații variate de *Calix 3*, respectiv ($10^{-4} M$; $2 \times 10^{-4} M$; $2,5 \times 10^{-4} M$ și $5 \times 10^{-4} M$).

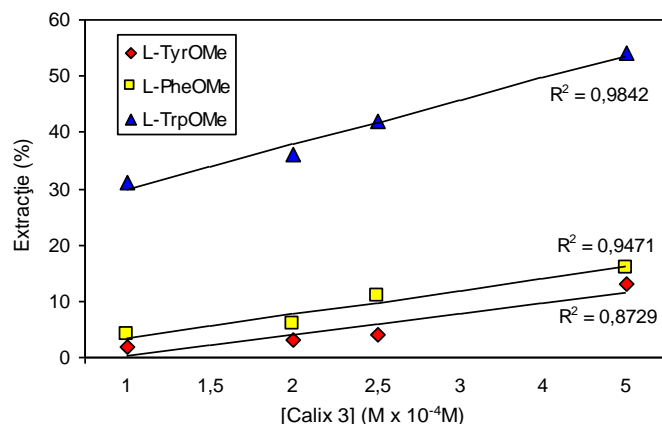


Figura 83. Extracția aminoacizilor aromatici în funcție de concentrația de ligand[175].

Se poate observa că extracția lui L-TrpOME este relativ mai mare decât cea corespunzătoare aminoacizilor L-PheOME și L-Tyr-OME. Ca atare, receptorul **3** se comportă selectiv în extracția aminoacizilor aromatici de mai sus.

5.4.8. Studiul stoechiometriei aminoacizilor aromatici metilesteri în raport cu cali[4]arenele funcționalizate

5.4.8.1. Determinarea raportului de distribuție (*D*)

Raportul de distribuție se calculează cu formula de mai jos:

$$D = \frac{[RNH_3L]_{org}}{[RNH_3^+]_w} \quad (ec. 1.23)$$

unde: $[RNH_3L]_{org}$ - reprezintă concentrația aminoacidului în faza organică

$[RNH_3^+]_w$ - reprezintă concentrația aminoacidului în faza apoasă

Pentru a calcula concentrația aminoacidului în faza organică, s-a determinat întâi concentrația complexului prin legea Beer, astfel:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1.25)$$

$$\text{de unde: concentrația complexului, } [complex] = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (1.26)$$

iar concentrația aminoacidului din faza apoasă $[A]_{(w)}$, este dată de concentrația inițială a aminoacidului minus concentrația complexului $[complex]$.

Raportul de distribuție *D*, va lua forma de mai jos:

$$D = \frac{[complex]}{([AA] - [complex])} \quad (1.27)$$

Raportul de distribuție obținut cu formula de mai sus s-a logaritmat și s-a reprezentat grafic în funcție de logaritmul concentrațiilor de ligand. Din panta dreptei obținută grafic printr-o dependență liniară ligand – aminoacid, s-a determinat stoechiometria formării complecșilor.

5.4.8.2 Raportul de combinare al L-TrpOMe cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5

Reprezentarea grafică a logaritmului coeficientului de distribuție în funcție de logaritmul concentrației de ligand pentru aminoacidul L-TrpOMe, cu calix[4]arenele funcționalizate **1, 2, 3 și 5**, la pH 5,5 (tampon MES/NaOH), este dată în figura 86.

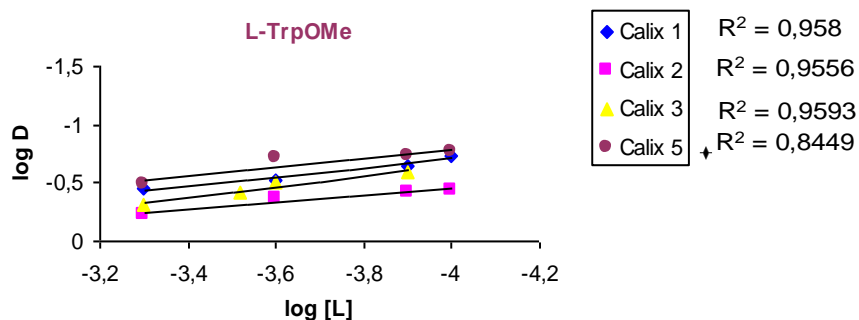


Figura 86. Raportul de combinare al L-TrpOMe cu Calix 1,2,3 și 5

Din figura de mai sus se observă că pentru toți cei patru compuși calixarenici există o dependență între coeficientul de distribuție și concentrația de ligand. Din panta dreptei se obține un raport de combinare de 1:2, aminoacid:calix[4]arenă pentru toți cei patru complecși formați între L-TrpOMe și calixarenele funcționalizate **1-5**.

Grupările funcționale introduse în structura ligandului macrociclic au un rol important în determinarea stoechiometriei formării complecșilor.

5.4.8.3. Raportul de combinare al L-PheOMe cu calix[4]arenele funcționalizate 1, 2, 3 și 5

Reprezentarea grafică a logaritmului coeficientului de distribuție în funcție de logaritmul concentrației de ligand pentru L-PheOMe cu calix[4]arenele **1, 2, 3 și 5** conduce la un raport de combinare de 1:2, aminoacid-ligand.

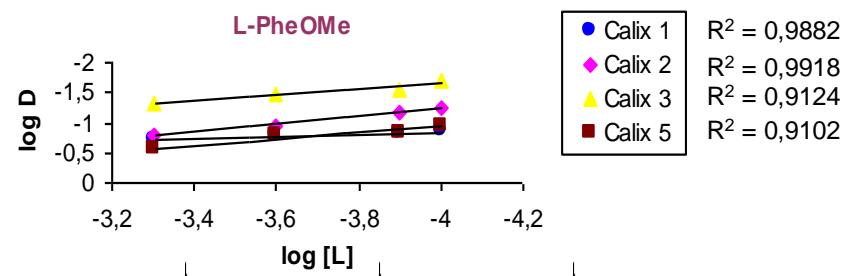


Figura 87. Raportul de combinare al L-PheOMe cu Calix 1,2,3 și 5

Din graficele de mai sus se observă că raportul de combinare este de 1:2 aminoacid-receptor calixarenic.

Se poate concluce că structura aminoacidului și hidrofobicitatea acestuia influențează puternic extracția și modul de combinare al acestuia cu agentul de complexare.

5.4.9. Determinarea constantelor de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arene funcționalizate

Determinarea constantelor de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri dintr-o fază apoasă într-o fază organică s-a realizat în două etape, astfel:

1. Determinarea coeficientului de extincție ε

Pentru a determina coeficientul de extincție ε , s-au făcut extracții la pH = 5,5 folosind o concentrație foarte mică de aminoacid și o concentrație mare de ligand, astfel încât ligandul să extragă întreaga cantitate de aminoacid.

Coeficientul de extincție ε , s-a calculat după legea Beer-Lambert-Bouguer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

de unde:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad (\text{ec. 1.21})$$

A – reprezintă absorbanta aminoacidului după extracția acestuia cu calixarena derivatizată.

c – reprezintă concentrația inițială a aminoacidului

l – reprezintă lungimea cuvei utilizate (1 cm)

2. Determinarea constantelor de extracție K_{ex}

Pentru determinarea constantelor de extracție, s-au realizat extracții la pH = 5,5 (tampon MES/NaOH) menținându-se concentrația aminoacidului constantă și variind concentrația ligandului.

Formarea complexului calixarena-aminoacid are la bază următoarea reacție:



în care: $R - NH_3^+$ - reprezintă aminoacidul aromatic sau alifatic

L - calix[4]arena 1, 2, 3, sau 5

$R - NH_3^+ L$ - reprezintă complexul format în urma extracției

Constanta de extracție este prezentată mai jos, sub forma:

$$K_{ex} = \frac{[R - NH_3^+ L]}{[R - NH_3^+][L]} \quad (\text{ec. 1.4})$$

în care: $[R - NH_3^+ L]$ - reprezintă concentrația complexului după extracție (mol/L)

$[R - NH_3^+]$ - reprezintă concentrația aminoacidului în faza apoasă minus concentrația complexului (mol/L)

$[L]$ - reprezintă concentrația calixarenei în faza organică minus concentrația complexului (mol/L)

Concentrația complexului aminoacid-ligand, după extracție se determină din legea Beer, astfel:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

de unde:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (\text{ec. 1.26})$$

în care: A – reprezintă absorbanta fazei apoase după extracție

ε - reprezintă coeficientul de extincție calculat anterior (ecuația 1.21)

L – lungimea cuvei (1 cm)

Pentru fiecare aminoacid în parte, s-au determinat trei constante de extracție pentru concentrații diferite de ligand și s-a făcut o medie a acestora. Rezultatele obținute sunt prezentate în *tabelul 19*.

Tabelul 19. Constantele de extracție ale aminoacizilor aromatici metilesteri cu calix[4]arenele funcționalizate **1,2,3 și 5**

CALIX	Aminoacid					
	L-TrpOMe		L-PheOMe		L-TyrOMe	
	$\varepsilon_{\lambda=278}$ (L/mol·cm)	Log K_{ex}	$\varepsilon_{\lambda=257}$ (L/mol·cm)	Log K_{ex}	$\varepsilon_{\lambda=274}$ (L/mol cm)	Log K_{ex}
1	4970	3,19 ± 0,05	2320	2,38 ± 0,10	2280	2,21 ± 0,08
2	2348	3,84 ± 0,08	2756	2,93 ± 0,09	-	-
3	5420	3,00 ± 0,06	2427	2,19 ± 0,07	2376	2,24 ± 0,06
5	4780	3,06 ± 0,07	2523	2,90 ± 0,09	-	-

$$C_{\text{aminoacid}} = 3,0 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}; C_{\text{ligand}} = 1,0 \times 10^{-4} - 5,0 \times 10^{-4} \text{ M};$$

$$\text{pH} = 5,5 \text{ (MES/NaOH tampon)}, T = 25^\circ \text{ C. [189]}$$

După cum se observă din *tabelul 19*, există diferențe clare între constantele de extracție ale celor trei aminoacizi aromatici.

Constantele de extracție ale L-TrpOMe sunt mai mari decât ai celorlalți doi aminoacizi pentru toți compușii calixarenici. De menționat este faptul că L-TrpOMe este cel mai hidrofob dintre cei trei aminoacizi și are selectivitatea cea mai mare.

5.6. Concluzii

Din capitolul de mai sus, în urma rezultatelor prezentate se pot obține următoarele concluzii:

Structura ligandului și hidrofobicitatea aminoacidului influențează eficiența extracției.

Rezultatele experimentale sugerează faptul că atât aminoacizii aromatici nativi și derivați cât și aminoacizii alifatici sunt extrași din faza apoasă în faza organică de către calixarenele funcționalizate **1-5** cu randamente cuprinse între 2,3 % (L-Tyr) – 10,2 % (L-Trp) în cazul aminoacizilor aromatici nativi și 1,0 % (L-TyrOMe) – 73,1 % (L-LeuOMe).

Extractibilitatea este esențial controlată de structura calixarenelor funcționalizate, de pH și de natura aminoacidului.

În cazul triptofanului metilester, datorită hidrofobității ridicate a acestuia se obțin randamente de extracție mai ridicate decât în cazul celorlalți aminoacizi.

Raportul de combinare al calix[4]arenelor funcționalizate cu aminoacizii aromatici studiați este 1:2 aminoacid-ligand.

Se presupune că derivatizarea calix[4]arenelor, mai ales grupările OH, lanțurile glicolice și grupările amido, cunoscute pentru abilitatea lor de a forma legături de hidrogen și interacții electrostatice joacă un rol important în legarea aminoacizilor derivați.

6. STUDIUL TRANSPORTULUI AMINOACIZILOR AROMATICI NATIVI SI DERIVATIZAȚI CU CALIX[4]ARENE FUNCȚIONALIZATE CU GRUPĂRI CARBOXILICE (1, 4) ȘI GRUPĂRI AMIDICE (2, 3, 5)

6.1. Considerații generale

Este binecunoscut faptul că pentru calix[4]arenă, cavitatea nu este suficient de mare pentru a include anumite molecule, dar funcționalizarea acesteia permite obținerea de site-uri externe adecvate pentru a forma complecși cu compuși de interes chimic și biologic [45, 185, 189, 191].

Capitolul de față abordează transportul selectiv activ prin membrane lichide asistat de gradientul de pH, al aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri hidroclorurați folosind ca transportori o serie de calix[4]arene funcționalizate cu grupări carboxil și amido, lanțuri glicolice și grupări hidroxil.

Calixarenele funcționalizate folosite ca transportori prin membrane lichide în scopul transportului aminoacizilor aromatici nativi și metilesteri hidroclorurați din faza sursă apoasă (pH = 5,5, MES/NaOH) în faza receptoare (pH = 1,5, NaOAc/HCl), conduc la obținerea unor randamente de transport semnificative.

Rezultatele obținute au fost corelate cu cele obținute la extracția cu solvenți.

6.2.2. Dispozitive utilizate în procesele de transport

Transportul aminoacizilor aromatici nativi și derivați, s-a realizat cu dispozitivele membranare prezentate în figura 95.

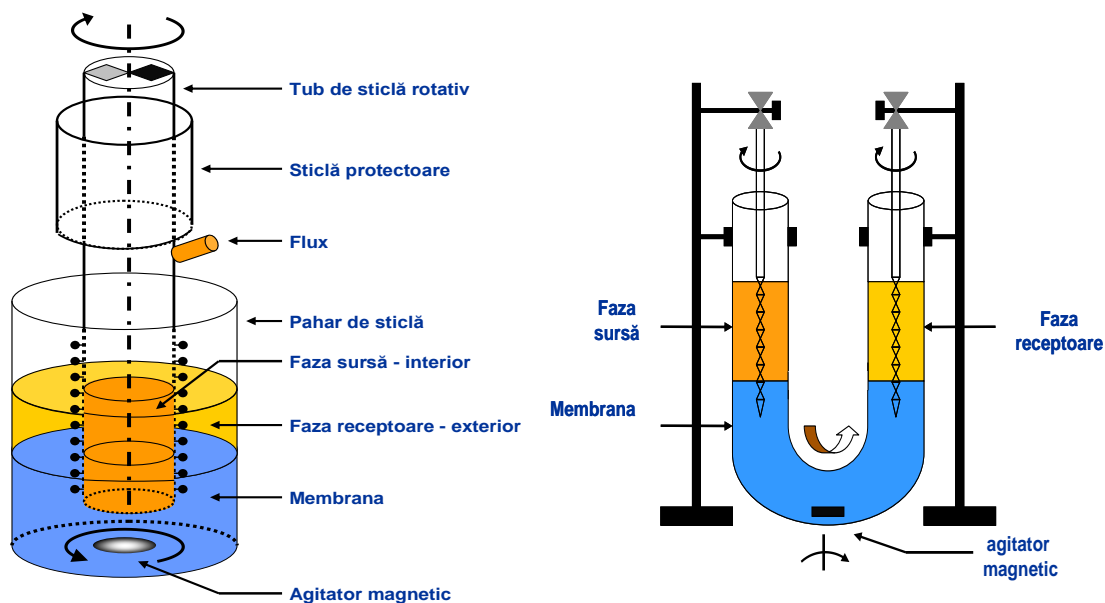


Figura 95. Dispozitive de transport

Componența celor trei faze:

1. **faza sursă:** 10 ml soluție apoasă de aminoacid nativ sau metilester cu concentrații cuprinse între 2.5×10^{-4} și 1.0×10^{-3} M, pH = 5.5 (tampon MES/NaOH), (fig. 95);
2. **membrana:** 25 ml calix[4]arena funcționalizată în cloroform de concentrație 5×10^{-4} M;
3. **faza receptoare:** 10 ml soluție apoasă pH = 1,5 (tampon NaOAc/HCl), (fig. 95).

6.5. Rezultate și discuții

6.5.2. Transportul aminoacizilor aromatici derivatizați cu calix[4]arene funcționalizate

6.5.2.1 Transportul aminoacizilor cu calix[4]arena funcționalizată 1

Derivatizarea aminoacizilor aromatici le conferă proprietatea de a fi mai hidrofobi decât aminoacizii nativi conducând la randamente de transport foarte mari, chiar de 98 %.

Specetrele UV-Vis obținute în urma transportului aminoacizilor aromatici cu Calix 1 sunt prezentate în figura 97.

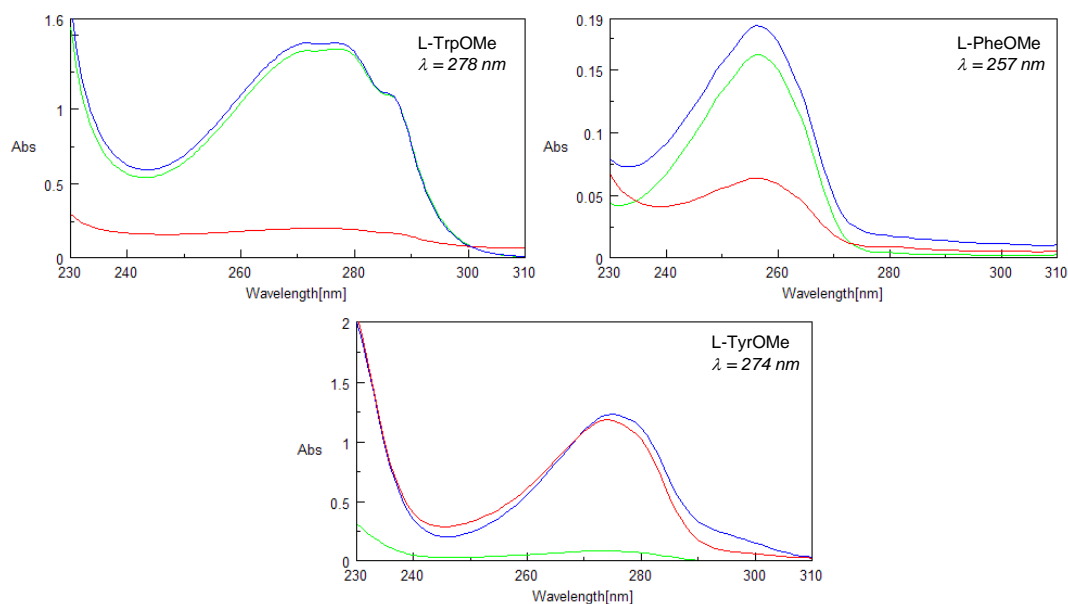


Figura 97. Spectrele UV-VIS pentru transportul aminoacizilor aromatici cu Calix 1.

- (—) spectrele UV-Vis ale aminoacizilor înainte de transport ;
- (—) spectrele UV-Vis ale aminoacizilor în faza sursă după transport;
- (—) spectrele UV-Vis ale aminoacizilor în faza receptoare după transport.

Rezultatele obținute pentru transportul celor trei aminoacizi aromatici cu calix[4]arena funcționalizată 1 sunt prezentate în figura 98.

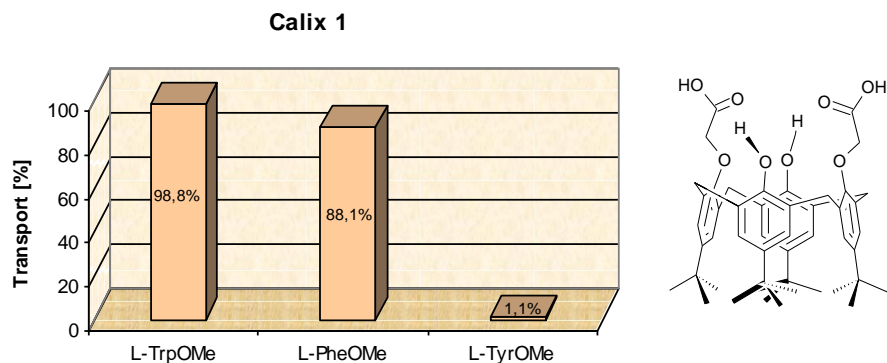


Figura 98. Transportul *L-TrpOMe*, *L-PheOMe* și *L-TyrOMe* cu calix[4]arena funcționalizată **1** [176]

(faza apoasă: [aminoacizii aromatici metilesteri] $1 \times 10^{-3} \text{M}$, pH = 5,5; faza organică: [Calix 1] $5 \times 10^{-4} \text{M}$ în cloroform; faza receptoare: HCl pH = 1,5; T = 25°C.)

După cum se observă din *figura 98*, transportul pentru cei trei aminoacizi scade în ordinea:



Pentru *L-TyrOMe* randamentul de transport este nesemnificativ în comparație cu *L-TrpOMe* unde aminoacidul este transportat din faza sursă în faza receptoare în procent de 98,8%.

6.5.2.2. Transportul aminoacizilor cu calix[4]arena funcționalizată **2**

Rezultatele transportului obținut pentru cei trei aminoacizi cu calix[4]arena funcționalizată **2** sunt prezentate în *figura 99*.

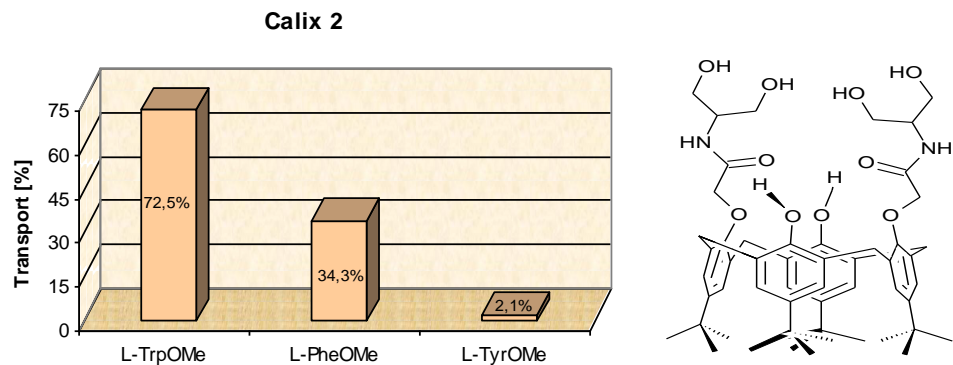


Figura 99. Transportul *L-TrpOMe*, *L-PheOMe* și *L-TyrOMe* cu calix[4]arena funcționalizată **2** [176]

(faza apoasă: [aminoacizii aromatici metilesteri] $1 \times 10^{-3} \text{M}$, pH = 5,5; faza organică: [Calix 2] $5 \times 10^{-4} \text{M}$ în cloroform; faza receptoare: HCl pH = 1,5; T = 25°C.)

Față de *Calix 1*, *Calix 2* manifestă o afinitate mai mică pentru aminoacidul *L*-triptofan metilester, ducând la un randament de transport de 72% față de 98,8 % în cazul calixarenei **1**.

Ordinea de descreștere a transportului rămâne aceeași ca și în cazul receptorului **1**, tirozina regăsindu-se din nou într-un procent foarte mic în faza receptoare.

L-TrpOMe (72,5%) > L-PheOMe (34,3%) > L-TyrOMe (2,1%)

În acest caz, se presupune că structura calixarenei **2**, adică prezența grupărilor glicolice și amide introduse, sunt responsabile de randamentele diferite.

6.7. Aspecte privind corelația între transportul aminoacizilor cu *p*-terț-butilcalix[4]arena și calix[4]arenele funcționalizate 1-5

Randamentele de transport ale aminoacizilor aromatici utilizând ca transportori calix[4]arenele funcționalizate **1-5** comparativ cu *p*-terț-butil-calix[4]arena sunt prezentate în figurile 108 – 112. [80].

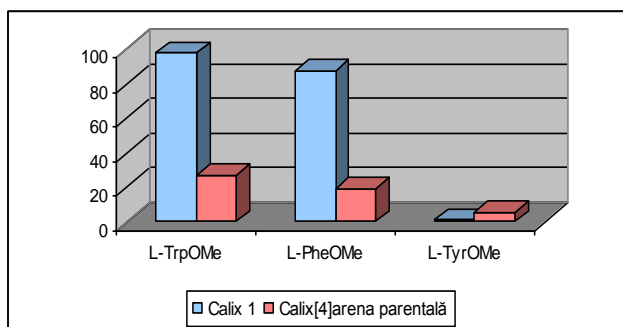


Figura 108. Transportul aminoacizilor aromatici utilizând calix[4]arena parentală comparativ cu Calix I [80]

Calix 1: Faza apoasă: $C_{L-TrpOMe}=C_{L-PheOMe}=C_{L-TyrOMe}=1 \times 10^{-3} M$ ($pH=5,5$); faza organică (Calix 1 în cloroform, $C_{Calix1}=5 \times 10^{-4} M$); faza receptoare HCl ($pH=1,5$)

Calix[4]arena parentală: Faza apoasă: $C_{L-TrpOMe}=C_{L-PheOMe}=C_{L-TyrOMe}=3 \times 10^{-3} M$ ($pH=5,5$); faza organică ($[Calix[4]arena\ parentală]=5 \times 10^{-3} M$ (cloroform)); faza receptoare LiOH ($pH=13$); $T=25^{\circ}C$.

Randamentele de transport ale aminoacizilor atât cu calix[4]arena parentală cât și cu Calix 1, scad în următoarea ordine: L-TrpOMe > L-PheOMe > L-TyrOMe.

Din figura 108, se observă că randamentele de transport obținute la transportul aminoacizilor cu calix[4]arena funcționalizată cu grupări carboxilice sunt mai mari decât în cazul transportului aminoacizilor cu calix[4]arena parentală.

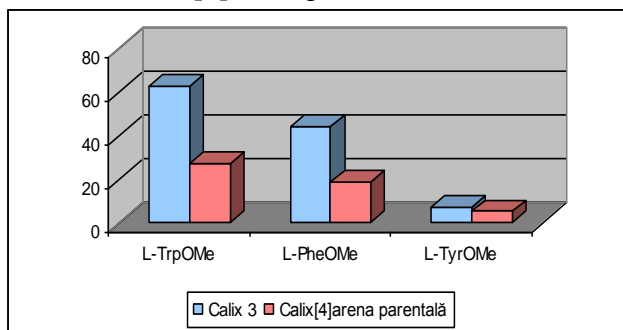


Figura 110. Transportul aminoacizilor aromatici utilizând calix[4]arena parentală comparativ cu Calix 3 [80]

Calix 3: Faza apoasă: $C_{L-TrpOMe}=C_{L-PheOMe}=C_{L-TyrOMe}=1 \times 10^{-3} M$ ($pH=5,5$); faza organică (Calix 3 în cloroform, $C_{Calix3}=5 \times 10^{-4} M$); faza receptoare HCl ($pH=1,5$)

Calix[4]arena parentală: Faza apoasă: $C_{L-TrpOMe}=C_{L-PheOMe}=C_{L-TyrOMe}=3 \times 10^{-3} M$ ($pH=5,5$); faza organică ($[Calix[4]arena\ parentală]=5 \times 10^{-3} M$ (cloroform)); faza receptoare LiOH ($pH=13$); $T=25^{\circ}C$.

Din figurile de mai sus , se observă creșterea semnificativă a randamentului de transport al aminoacizilor în cazul utilizării calixarenelor **1-5** ca transportori, comparativ cu calix[4]arena parentală.

6.8. Concluzii

Receptorii **1 - 5** prezintă o afinitate mai mare de transport față de L-TrpOMe și L-PheOMe comparativ cu L-TyrOMe.

Există o serie de factori care influențează transportul aminoacizilor cum ar fi: complexarea și decomplexarea la interfețele fază sursă/ membrană, respectiv membrană/fază receptoare, reacțiile prezente la interfețele cu cele două faze (membrană și receptoare) și de asemenea un rol important în transportul aminoacizilor îl au solvatarea și desolvatarea aminoacidului la interfețe.

Distribuția complexului la interfața membranaară este o caracteristică importantă care depinde de natura aminoacidului și a solventului, pH-ul fazelor apoase, structura transportorului și stabilitatea complexului.

Valorile randamentelor de transport ale aminoacizilor aromatici cu calix[4]arena parentală, ca transportori sunt mult mai mici decât randamentele de transport ale aminoacizilor aromatici cu calix[4]arenele funcționalizate **1 – 5**.

7. ASPECTE PRIVIND POSIBILITATEA FORMĂRII COMPLEXULUI GAZDĂ - OASPETE

7.1. Studii de interfață apă – solvent organic privind complexarea aminoacidului L-TrpOMe cu calix[4]arena funcționalizată cu grupări carboxilice (1)

7.1.1. Considerații generale

În acest capitol sunt prezentate câteva rezultate experimentale privind distribuția complexilor aminoacizilor cu calix[4]arenele funcționalizate la interfața apă-cloroform obținute cu ajutorul microscopului electronic de scanare (SEM).

7.1.2. Modul de lucru și aparatura utilizată

În microscopia electronică modernă așa cum s-a menționat în *cap. 3.4.* pot fi obținute două tipuri de informații: *imagini optoelectronice* care oferă informații despre morfologia și topologia suprafeței probei și *microanaliza chimică* (spectre de raze X (EDX, WDS) și spectre de fluorescență) care oferă informații calitative și cantitative despre structura chimică a probei.

Modul de lucru: Aminoacidul L-TrpOMe a fost extras din faza apoasă în faza organică (cloroform) cu calix[4]arena funcționalizată **1**. După extracție s-au prelevat pe plăcuțe din sticlă câte 0,5 ml atât din cele două faze (apoasă și organică) cât și de la interfața dintre cele două faze. După evaporarea solvenților, plăcuțele au fost citite la Microscopul electronic de baleiaj (SEM) tip VEGA II LMU al Centrului de Cercetare Științifică pentru Apărare NBC și Ecologie.

7.1.3. Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în urma studiului utilizând SEM și microanaliza chimică (EDX) a fazelor apoasă, organică și interfață pentru L-TrpOMe – *Calix I* sunt prezentate în graficele de mai jos:

Faza apoasă după extracție

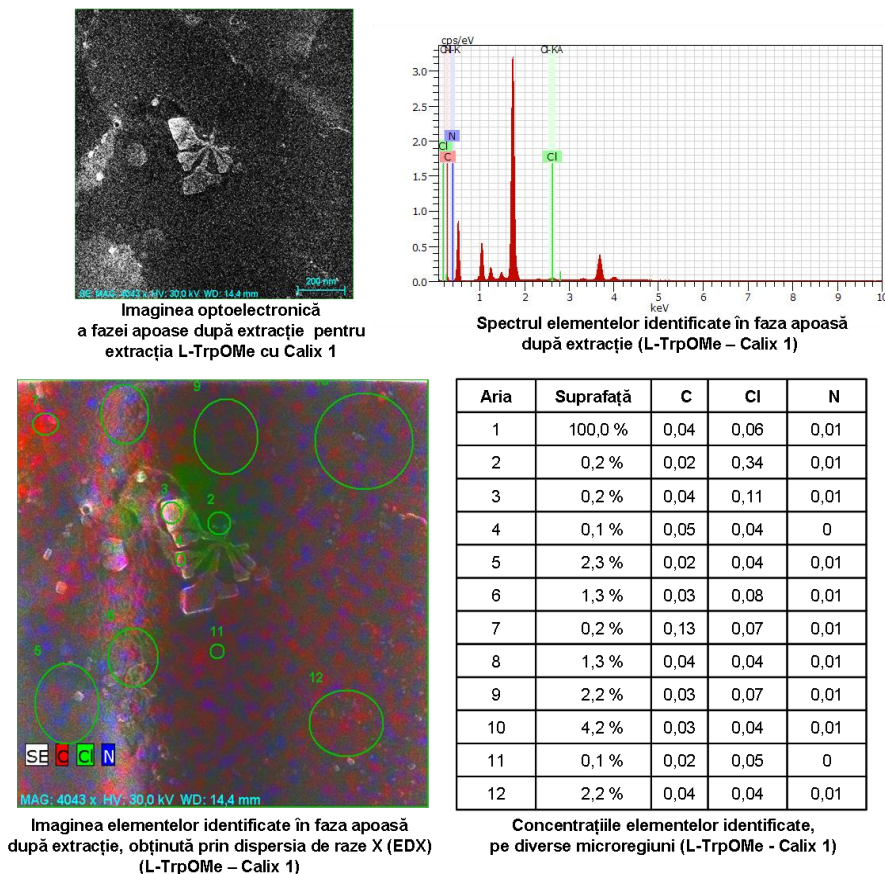


Figura 111. Elementele de interes identificate în faza apoasă după extracția L-TrpOMe-Calix 1
 $[L-TrpOMe] = 2,5 \times 10^{-4} M$; $[Calix 1] = 5 \times 10^{-4} M$.

După cum se poate observa din harta elementelor structurale atașată imaginii optoelectronice a fazei apoase (fig. 111), structura morfologică scoate în evidență prezența a două structuri dominante diferite din punct de vedere morfologic și morfochimic: structura morfologică a clorului (SM-Cl) și structura morfologică a carbonului (SM-C). SM-Cl prezintă o morfologie ramificată, de tip dendrimeric în care raportul între elementele C:N:Cl este 1/17:1/34:1 (microaria 2).

7.1.4. Concluzii

În cazul calix[4]arenei **1**, care este funcționalizată numai cu grupări carboxilice, se poate observa că în faza organică se evidențiază clar aminoacidul L-TrpOMe prin prezența azotului din gruparea aminică.

Din studiile efectuate, se poate spune că există o corelație între rezultatele obținute prin microscopie electronică de scanare și rezultatele obținute la extracția aminoacizilor derivați cu calix[4]arenle funcționalizate **1,3** și

CONCLUZII GENERALE

În urma rezultatelor obținute și prezentate în lucrarea de față se conturează următoarele concluzii generale:

- *Rezultatele experimentale sugerează faptul că atât aminoacizii aromatici nativi și derivatizați cât și aminoacizii alifatici sunt extrași din faza apoasă în faza organică de către calixarenele funcționalizate **1-5** cu randamente cuprinse între 2,3 % (L-Tyr) – 10,2 % (L-Trp) în cazul aminoacizilor aromatici nativi și 1,0 % (L-TyrOMe) – 73,1 % (L-LeuOMe) în cazul aminoacizilor alifatici și aromatici derivatizați. Extractibilitatea este esențial controlată de structura calixarenelor derivatizate, de pH și de natura aminoacidului;*
- *Se presupune că funcționalizarea calix[4]arenelor, mai ales grupările OH, lanțurile glicolice și grupările amido, cunoscute pentru abilitatea lor de a forma legături de hidrogen și interacții electrostatice joacă un rol important în legarea aminoacizilor derivatizați;*
- *În cazul triptofanului metilester, datorită hidrofobității ridicate a acestuia se obțin randamente de extracție mai mari decât în cazul celorlalți aminoacizi;*
- *Timpul de agitare al celor două faze în procesul de extracție al aminoacizilor cu calix[4]arenele studiate s-a constatat a fi 30 de minute;*
- *Raportul de combinare al calix[4]arenelor funcționalizate cu aminoacizii aromatici studiați este 1:2 aminoacid-ligand macrociclic;*
- *În funcție de concentrația ligandului și de timpul de agitare al celor două faze (apoasă și organică) extracția aminoacidului are loc cu randamente de extracție diferite;*
- *Există o serie de factori care influențează transportul aminoacizilor cum ar fi: complexarea și decomplexarea la interfețele fază sursă/ membrană, respectiv membrană/fază receptoare, reacțiile prezente la interfețele cu cele două faze (membrană și receptoare) și de asemenea un rol important în transportul aminoacizilor îl au solvatarea și desolvatarea aminoacidului la interfețe; receptorii calixarenici **1 - 5** prezintă o afinitate mai mare de transport față de L-TrpOMe și L-PheOMe comparativ cu L-TyrOMe;*

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] J. -M. Lehn, *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, (1995).
- [2] H. J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., (2000).
- [26] C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 7017 (1967).
- [80] L. Mutihac and R. Mutihac, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 59, 177, (2007).
- [166] H. -J. Schneider, *Binding mechanisms in supramolecular complexes*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 3924, (2009)
- [167] J. S. Brodbelt, *Int. J. Mass Spectrom.* 200, 57, (2000).
- [172] M. Vicenti, A. Irico, *Int. J. Mass Spectrom.* 214, 23, (2002).
- [175] A. Hamdi, R. Souane, **L. Kim**, R. Abidi, L. Mutihac, J. Vicens, *J. Incl. Phenomen. Macrocycl. Chem.* 64, 95, (2009).
- [176] **L. Kim**, A. Hamdi, A. D. Stancu, R. Souane, L. Mutihac si J. Vicens, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 66, 55, (2010).
- [177] A. Medvedovici, F. Albu, A. Hamdi, R. Souane, **L. Kim**, L. Mutihac, J. Vicens, *J. Incl. Phenomena. Macrocycl. Chem.* (2010). DOI: 10.1007/s10847-010-9860-y
- [178] F. Unob, Z. Asfari, J. Vicens, *Tetrahedron Lett.* 39, 2951, (1998).
- [179] I. Oueslati, R. Abidi, H. Amri, P. Thue'ry, M. Nierlich, Z. Asfari, J. Harrowfield, J. Vicens, *Tetrahedron Lett.* 41, 8439, (2000).
- [181] Z. Asfari, V. Bohmer, J. Harrowfield, J. Vicens, (eds.): *Calixarenes 2001*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2001).
- [182] Z. Asfari, J. Harrowfield, J. Vicens, (eds.): *Calixarenes 50th Anniversary: Commemorative Volume*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1994).
- [183] J. Vicens, J. Harrowfield, (eds.): *Calixarene in the Nanoworld*. Springer, Dordrecht (2006).
- [184] V. Bohmer, J. Vicens, (eds.): *Calixarenes: a Versatile Class of Macrocyclic Compounds*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1991).
- [186] L. Mutihac, **L. Kim**, A. -D. Stancu, H. -J. Buschmann, J. Vicens, *Recognition and transport of amino acids and peptides by synthetic receptors*, invited lecture, 10th International Conference on Calixarenes, Korea University, Seoul, S. Korea, IL 6, July 13-16, (2009).
- [189] A. Hamdi, R. Abidi, J. Vicens, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 60, 193, (2008).
- [191] S. Le Gac, I. Jabin, *J. Eur. Chem.* 14, 548, (2008).