

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ “PETRU PONI” DIN
IAȘI

Tehnici RMN pentru caracterizarea ciclodextrinelor și a complecșilor de incluziune ai acestora

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător Doctorat:
Acad. Bogdan C. Simionescu

Doctorand:
Biochim. Mihaela Balan
(căs. Balan-Porcărașu)

IAȘI, 2017

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" DIN IAȘI

Nr 6857 / 10 X 2017

Domnului/Doamnei

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **30 octombrie 2017**, ora **12:30**, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată "**Tehnici RMN pentru caracterizarea ciclodextrinelor și a complexilor de incluziune ai acestora**", autor **Mihaela Balan (căs. Balan-Porcărașu)**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

Președinte:

Dr. Anton Airinei, Cercetător Științific gradul I, Director al Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

Conducător științific:

Acad. Bogdan C. Simionescu, Cercetător Științific gradul I, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

Referenți:

Prof. Dr. Gabi Drochioiu, Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași

Dr. Mircea Bogdan, Cercetător Științific gradul I, Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare INCDTIM din Cluj-Napoca

Dr. Luminița Marin, Cercetător Științific gradul II, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica în scris aprecierile și observațiile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



Director,
Anton Airinei

Mulțumiri

Adresez sincere mulțumiri conducătorului științific, **Acad. Bogdan C. Simionescu**, pentru îndrumare și sfaturile oferite pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Deosebite mulțumiri și recunoștință **dr. Călin Deleanu** pentru sfaturi și pentru implicarea de care a dat dovadă în fomarea mea ca om de știință și în elaborarea tezei de doctorat.

Mulțumesc **dr. Alina Nicolescu** pentru sfaturile și ajutorul oferit pe parcursul stagiului de doctorat. De asemenea, îi mulțumesc și pentru cunoștințele pe care mi le-a transmis cu privire la spectroscopia RMN și pentru încurajările pe care mi le-a oferit de-a lungul anilor.

Mulțumesc **Academiei Române** pentru suportul financiar acordat.

Mulțumesc **Unității Executive pentru Finanțarea în Învățământul Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării - UEFISCDI** pentru sprijinul financiar prin intermediul proiectului "Polirotaxani pe bază de polimeri conjugați pentru aplicații în micro-optoelectronică" (PN-II-ID-PCE-2011-3-0035, în perioada ianuarie 2012 – noiembrie 2016).

Mulțumesc **dr. Anton Airinei, prof. Gabi Drochioiu, dr. Mircea Bogdan și dr. Luminița Marin**, președinte și referenți în comisia de doctorat, pentru analizarea tezei și sugestiile oferite.

Calde mulțumiri colegilor din colectivul RMN: **Mihaela, Gabriela, Ana-Maria, Anișoara și Liviu** pentru susținerea morală, pentru răbdarea și înțelegerea de care au dat dovadă pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Mulțumesc colegilor din colectivul **Fizica Polimerilor și Materialelor Polimere** dar și tuturor colegilor din **Institutul "Petru Poni"** pentru sfaturi și pentru crearea unei atmosfere plăcute de lucru. De asemenea, doresc să mulțumesc pentru colaborare **dr. Aurica Farcaș și dr. Cristian Peptu** dar și multor altor colegi alături de care am obținut și publicat rezultate deosebite care însă nu au făcut obiectul acestei teze.

Mulțumesc prietenilor și familiei mele, îndeosebi tatălui meu, surorii mele și soțului meu, **Sergiu**, pentru susținerea necondiționată, răbdarea și dragostea de care au dat dovadă pe tot parcursul acestor ani.

Cuprins

PARTEA 1 – STUDIU DE LITERATURĂ	4
Capitolul 1. Spectroscopia RMN	5
1.1. Istoric	5
1.2. Principiul fizic al metodei	5
1.3. Efectul pulsurilor de radiofrecvență	8
1.4. Relaxarea	9
1.5. Efectul NOE (Nuclear Overhauser Effect)	10
1.6. Informații obținute dintr-un spectru RMN	11
1.6.1. Deplasarea chimică și compuși de referință	11
1.6.2. Intensitatea semnalelor din spectrele RMN.....	14
1.6.3. Forma semnalelor din spectrele RMN	14
1.7. Tipuri de experimente folosite în spectroscopia RMN.....	16
1.7.1. Spectroscopia RMN unidimensională	16
1.7.2. Spectroscopia RMN bidimensională	18
Capitolul 2. Ciclodextrine	23
2.1. Descoperirea ciclodextrinelor	23
2.2. Obținerea ciclodextrinelor	23
2.3. Structura ciclodextrinelor	24
2.4. Complecși de incluziune	27
2.5. Caracterizarea ciclodextrinelor prin spectroscopia RMN	31
2.6. Alte metode de caracterizare a ciclodextrinelor	37
2.6.1. Spectrometria de masă	37
2.6.2. Spectrometria UV-VIZ	38
PARTEA 2 – CERCETĂRI ORIGINALE	40
Capitolul 3. Caracterizarea RMN a ciclodextrinelor și cuantificarea unor zaharide în amestecuri	41
3.1. Ciclodextrine și zaharide native	41
3.1.1. Ciclodextrine native în D ₂ O și DMSO-d ₆	41
3.1.2. Zaharide native în matrici apoase complexe	53
3.2. Ciclodextrine substituie	63
3.3. Influența condițiilor experimentale asupra aspectului spectrelor RMN ale ciclodextrinelor	75
3.3.1. Standarde interne	75
3.3.2. Standard extern	76
3.3.3. Standard intern și standard extern	76
3.3.4. Influența temperaturii	78
3.3.5. Influența pH-ului	85

3.4. Concluzii	86
Capitolul 4. Complecși ai ciclodextrinelor cu derivați halogenați aromatici.....	87
4.1. Caracterizarea RMN a derivaților clorofenolici și a complecșilor de incluziune	87
4.2. Studii privind stoechiometria complecșilor dintre derivaților clorofenolici și β -ciclodextrină	93
4.3. Determinarea constantei de asociere a complecșilor derivaților clorofenolici cu β -ciclodextrină	100
4.4. Complecși de incluziune cu 2,7-dibromofluoren	104
4.5. Concluzii	109
Capitolul 5. Complecși ai ciclodextrinelor cu benzimidazoli	110
5.1. Caracterizarea RMN a benzimidazolilor și a complecșilor de incluziune	110
5.2. Studii privind complexarea Bz1255-BCD	115
5.3. Studii privind complexarea derivaților p-halogenați Bz1a-c cu ciclodextrine.....	123
5.4. Studii privind complexarea BzB122 cu ciclodextrine	132
5.4.1. Studiul complexului BzB122-BCD	132
5.4.2. Studiul complecșilor BzB122 cu ciclodextrine substituie	144
5.5. Concluzii	157
Capitolul 6. Partea Experimentală	158
Diseminarea Rezultatelor	175
Bibliografie	177

Anexa 1 – Caracterizarea RMN a ciclodextrinelor

Anexa 2 – Complecși ai ciclodextrinelor cu derivați halogenați aromatici

Anexa 3 – Complecși ai ciclodextrinelor cu benzimidazoli

Cuvinte cheie: RMN, ciclodextrine, complecși de incluziune, zaharide, ciclodextrine modificate, benzimidazol

Prescurtări utilizate în text:

RMN – Spectroscopie de rezoanță magnetică nucleară

CD – ciclodextrină

NOE – efect nuclear Overhauser

PCA – analiza componentului principal

2HPBCD – 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrină

MeBCD – metil- β -ciclodextrină

CD-LA – ciclodextrină esterificată cu oligolactidă

TSP – sarea de sodiu a acidului 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-d₄ propionic

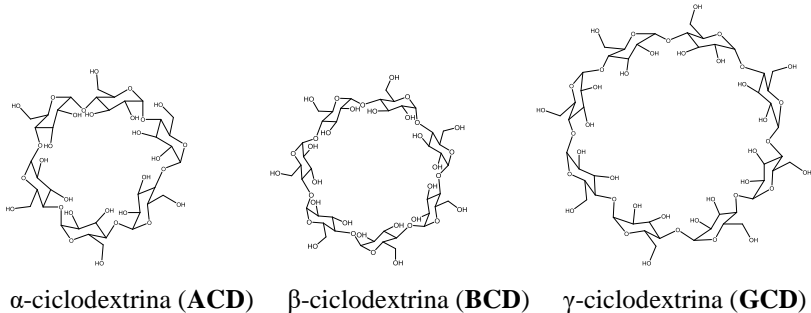
TMS – tetrametilsilan

DBF – dibromofluoren

Prima parte a tezei de doctorat cuprinde un studiu de literatură și este structurată în 2 capitole. **Capitolul 1** se referă la generalități despre principiul fizic al spectroscopiei RMN, informații obținute din spectre și descrierea experimentelor uzuale de care se folosește această tehnică. În **capitolul 2** al studiului de literatură sunt prezentate generalități despre ciclodextrine și complexii lor de incluziune, despre folosirea spectroscopiei RMN dar și a altor metode de caracterizare în studierea acestora.

În *partea a 2-a* a tezei de doctorat sunt prezentate rezultatele cercetărilor originale care sunt cuprinse în 4 capitole. **Capitolul 3** se referă la caracterizarea RMN a ciclodextrinelor și cuantificarea unor zaharide în amestecuri. S-au caracterizat structural prin RMN 3 ciclodextrine native: α -, β - și γ -ciclodextrine în soluții în D₂O și DMSO-d₆ și 4 zaharide înrudite cu acestea. Cele 4 zaharide au fost indentificate în matrici apoase complexe (sucuri de fructe) și cuantificate cu ajutorul tehnicii PCA. Au fost caracterizate structural 10 ciclodextrine substituie: sulfobutil eter- β -ciclodextrină, sare de sodiu, monoclorotriazinil- β -ciclodextrina, sare de sodiu, metil- β -ciclodextrină, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrină și șase α -, β - și γ -ciclodextrine substituie cu resturi de oligolactat pentru care s-a determinat poziția preferată de legare a substituentului. Tot în acest capitol s-a studiat influența condițiilor experimentale: temperatură, pH, folosirea standardelor interne și externe asupra aspectului spectrelor RMN ale ciclodextrinelor.

Unul dintre studiile incluse în acest capitol a urmărit caracterizarea prin spectroscopie RMN a celor trei ciclodextrine native folosite în mod uzual pentru obținerea complexilor de incluziune: α -ciclodextrina (**ACD**), β -ciclodextrina (**BCD**) și γ -ciclodextrina (**GCD**). Scopul urmărit a fost obținerea parametrilor spectrali (deplasările chimice, multiplicitatea semnalelor și valorile constantelor de cuplaj) corespunzători acestor ciclodextrine, în doi solvenți deuterați, D₂O și DMSO-d₆. Criteriile pentru alegerea acestor solvenți au fost: solubilitățile, atât a ciclodextrinelor cât și a complexilor de incluziune, și aplicațiile complexilor de incluziune. Majoritatea complexilor de incluziune au aplicații în medicină, cele mai multe teste fiind specifice industriei farmaceutice pentru acreditarea unui medicament realizându-se pe soluții apoase sau în dimetilsulfoxid.



Moleculile ciclodextrinelor sunt alcătuite din unități de α -(+)-glucopiranoză în conformație 4C_1 . Unitățile de glucoză sunt legate între ele prin legături $\alpha(1\rightarrow4)$ -glicozidice rezultând macrocicluri cu formă toroidală care prezintă o cavitate interioară.

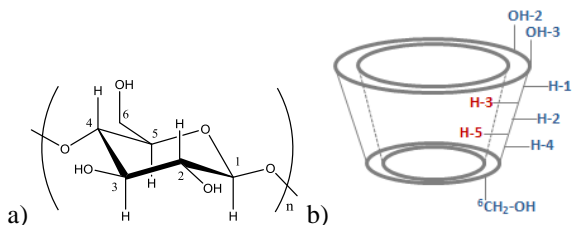


Figura 1. a) Structura unităților de glucopiranoză din ciclodextrine și numerotarea atomilor de carbon ai acestora, b) reprezentarea schematică a macrociclului unei ciclodextrine și a poziționării atomilor de hidrogen

Pentru caracterizarea celor trei ciclodextrine în D_2O și $DMSO-d_6$, au fost înregistrate experimente RMN uni și bidimensionale de tipurile: 1H -RMN, ${}^{13}C$ -RMN, H,H-COSY, H,C-HMQC, H,C-HMBC și H,C-HSQC fără decuplare de proton.

În spectrele 1H -RMN pentru cele trei ciclodextrine, prezentat în **figura 2**, se observă semnale izolate pentru protonii din pozițiile H-1, H-2, H-3 și H-4, iar semnalele pentru protonii din pozițiile H-5 și H-6 sunt suprapuse. Deși ciclodextrinele analizate în această teză conțin un număr variabil de unități glucopiranozice (între 5 și 8 unități, conform structurilor chimice prezentate mai sus), numărul de semnale obținute în spectrele 1H RMN este același. Această caracteristică este o consecință a simetriei structurale, specifică ciclodextrinelor nesubstituite. În spectrele 1H -RMN, obținute în D_2O drept solvent, lipsesc semnalele pentru protonii grupelor hidroxilice primare și secundare. Acest lucru se datorează schimbului foarte rapid dintre protonii labili și atomii de deuteriu din D_2O . Spre deosebire de spectrele înregistrate în D_2O , în spectrele 1H -RMN înregistrate în $DMSO-d_6$ apar semnalele pentru protonii din grupele hidroxil primare și secundare.

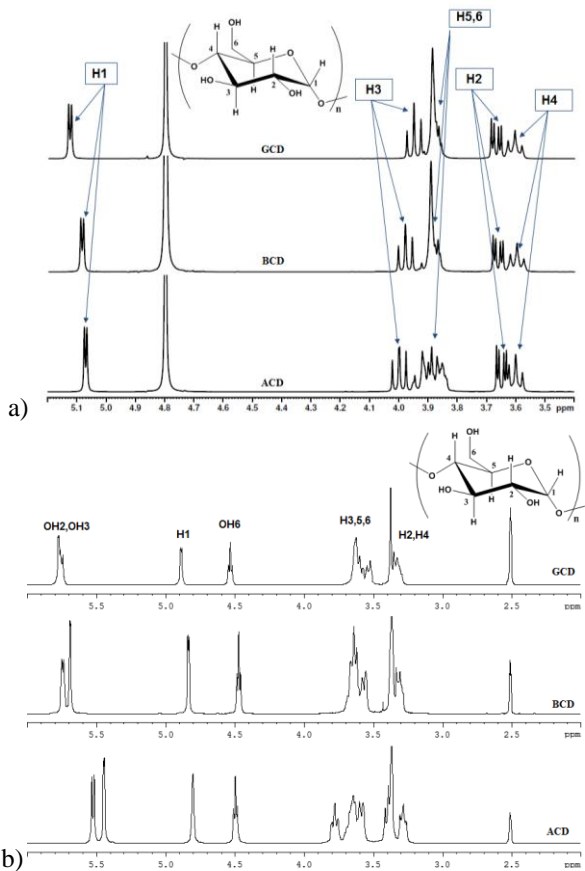


Figura 2. Spectrele ^1H -RMN pentru ACD, BCD și GCD în D_2O (a) și DMSO-d_6 (b)

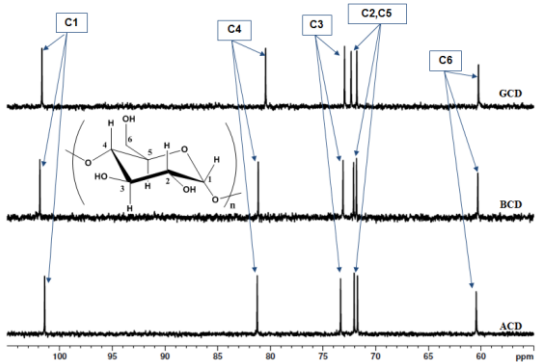


Figura 3. Spectrele ^{13}C -RMN pentru ACD, BCD și GCD înregistrate în D_2O și atribuirea semnalelor

Un alt studiu inclus în această teză este analiza unor zaharide native în matrici apoase complexe, cum sunt sucurile de fructe. Deși este o metodă de analiză mai puțin sensibilă, spectroscopia RMN are avantajul că oferă profilul global al probei analizate. Astfel, în amestecurile complexe analizate pot fi observați compuși necunoscuți sau neașteptați. Spectrele RMN în stare lichidă, corespunzătoare matricilor apoase complexe, conțin zeci de semnale care se suprapun. Din cauza acestei complexități, este aproape imposibil să se atribuie fiecare semnal prezent în spectru.

S-au cuantificat 4 zaharide native (glucoză, zaharoză, fructoză și galactoză) prezente în sucuri de fructe naturale și comeciale.

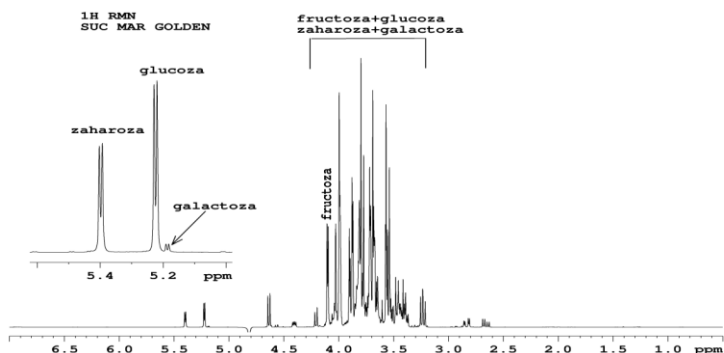


Figura 4. Spectrul ^1H -RMN corespunzător unei probe de suc de măr Golden, cu atribuirea semnalelor zaharidelor

Un alt studiu cuprins în acest capitol s-a referit la caracterizarea ciclodextrinelor modificate. Pentru a schimba solubilitatea și proprietățile de incluziune ale ciclodextrinelor, este interesantă introducerea unor substituenți în structura acestora. S-au caracterizat complet 10 ciclodextrine modificate: patru dintre ele în soluții apoase: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrină, metil- β -ciclodextrină, monoclorotriazinil- β -ciclodextrină și sulfobutile eter β -ciclodextrină, și 6 dintre ele (α -, β - și γ -ciclodextrine substituie cu resturi de oligolactat) în soluții de DMSO- d_6 . În cazul ciclodextrinelor substituie cu resturi de oligolactat s-a determinat poziția în care se leagă substituentul cu ajutorul informațiilor din spectrele de carbon, corelate cu cele din experimentele bidimensionale.

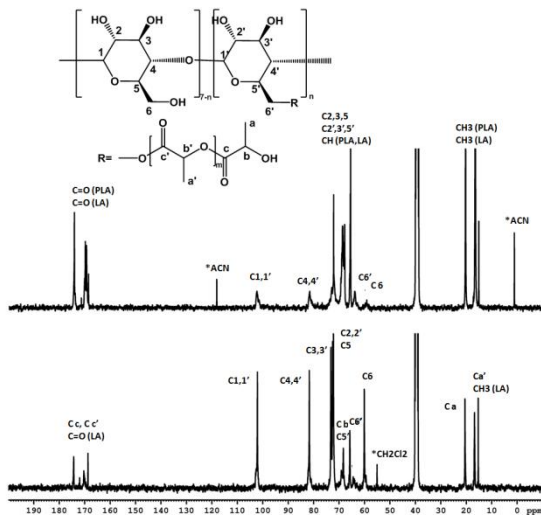


Figura 5. Spectrele ^{13}C -RMN pentru **BCD-LA-F2** (sus) și **BCD-LA-F1** (jos), înregistrate în DMSO-d_6 , cu atribuirea semnalelor

S-a studiat influența unor factori experimentali asupra spectrelor RMN ale ciclodextrinelor, cum sunt folosirea standardelor interne și externe, influența variației temperaturii la care se înregistrează experimentele sau a pH-ului soluției.

Concluziile capitolului 3

- Au fost caracterizate complet prin RMN, 3 ciclodextrine native (α -, β - și γ -ciclodextrinele), 4 zaharide native (glucoză, zaharoză, fructoză și galactoză) și 10 ciclodextrine modificate: sulfobutileter- β -ciclodextrină, monoclorotriazinil- β -ciclodextrină, metil- β -ciclodextrină, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrină și α -, β - și γ -ciclodextrine esterificate cu resturi de oligolatidă (ACD-LA-F1, BCD-LA-F1, GCD-LA-F1, ACD-LA-F2, BCD-LA-F2, GCD-LA-F2).

- Pe baza atribuțiilor din probele individuale, cele 4 zaharide au fost cuantificate în matrici complexe de sucuri de fructe și a fost dezvoltat un model statistic tip PCA pentru separarea chemometrică a probelor.

- În cazul α -, β - și γ -ciclodextrinelor esterificate cu resturi de oligolatidă a fost demonstrată legarea restului oligolatidă în poziția 6 a unităților de glucopiranoză.

- Au fost studiate exhaustiv influența standardelor de tip intern și extern, a temperaturii și a pH-ului asupra spectrelor RMN ale ciclodextrinelor.

În **capitolul 4** s-au studiat complecși ai ciclodextrinelor cu derivați halogenați aromatici. S-au determinat stoechiometriile și constantele de asociere pentru complecșii dintre BCD și 3 derivați de fenol: 2-clorofenol, 4-clorofenol și 2,4-diclorofenol. În urma interacțiunilor se formează complecși cu stoechiometria 1:1 și stabilitatea complecșilor scade în ordinea: 2,4-diclorofenol>4-clorofenol>2-clorofenol.

De exemplu, în cazul complexării dintre 24-diclorofenol (24DCP) și β -ciclodextrină (BCD), o parte din spectrele ^1H -RMN înregistrate pentru determinarea stoechiometriei sunt:

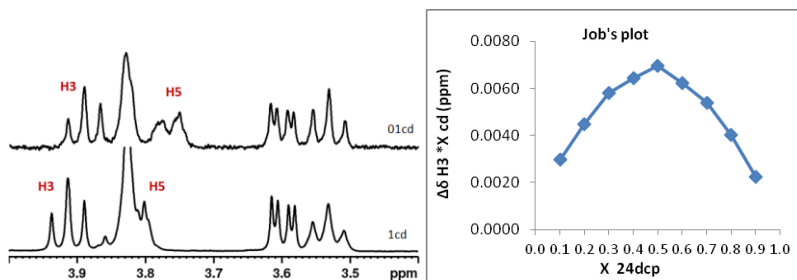


Figura 6. Spectre ^1H -RMN pentru 24DCP-BCD în D_2O , detaliu cu zona semnalelor BCD din spectrele pentru probele 1cd ($C_{\text{BCD}}=1 \text{ mM}$ și $C_{24\text{cp}}=0 \text{ mM}$) și 01cd ($C_{\text{BCD}}=0,1 \text{ mM}$ și $C_{24\text{cp}}=0,9 \text{ mM}$) și curba Job din care reiese stoechiometria 1:1

Tot în acest capitol s-a studiat incluziunea dintre 2,7-dibromoflouren și respectiv un polimer derivat de la acesta și 3 macrocicli: β -ciclodextrină permetilată total, γ -ciclodextrină permetilată parțial și cucurbit[7]uril. S-a determinat că afinitatea atât a 2,7 dibromoflourenului cât și a polimerului lui este mai mare pentru cavitățile ciclodextrinelor decât pentru cavitata cucurbit[7]uril-ului.

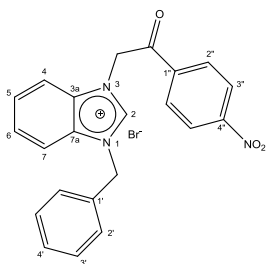
Concluziile capitolului 4

- În cazul interacțiunilor cu cei 3 clorofenoli, semnalul pentru H5 din ciclodextrină se deplasează mai mult decât cel pentru H3. Prezența 2,4-diclorofenolului produce cele mai mari diferențe de deplasare chimică asupra semnalelor ciclodextrinelor, apoi 4-clorofenolul iar 2-clorofenolul provoacă deplasările cele mai mici.

- Stoechiometria complecșilor dintre cei 3 fenoli și BCD este 1:1 și a fost determinată prin metoda variațiilor continue.

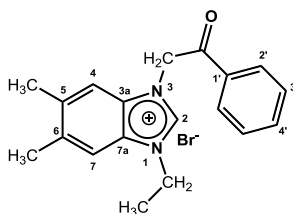
- Stabilitatea complecșilor variază în ordinea 2,4-diclorofenol>4-clorofenol>2-clorofenol.

Capitolul 5 cuprinde rezultatele obținute din caracterizarea unor complecși de incluziune dintre ciclodextrine și săruri de 1-benzil-3-[2-(aryl)-2-oxoetil]-5,6-dimetilbenzimidazol. S-a determinat care parte a moleculelor de compus oaspete este preferată pentru complexare.



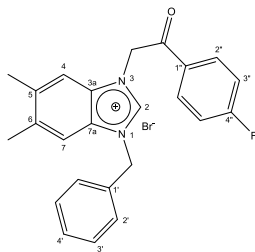
Bz1255

Bromura de (N-benzil), N-(4-nitrobenzil) benzimidazol



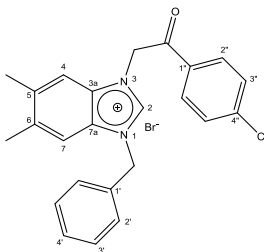
BzB122

Bromura de 1-etil-3-[2-fenil-2-oxoetil]-5,6-dimetilbenzimidazol



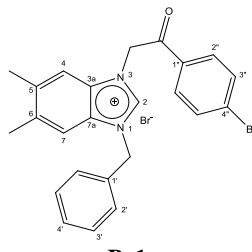
Bz1a

Bromura de 1-benzil-3-[2-(4-fluorofenil)-2-oxoetil]-5,6-dimetilbenzimidazol



Bz1b

Bromura de 1-benzil-3-[2-(4-clorofenil)-2-oxoetil]-5,6-dimetilbenzimidazol



Bz1c

Bromura de 1-benzil-3-[2-(4-bromofenil)-2-oxoetil]-5,6-dimetilbenzimidazol

Pentru sărurile Bz1a-c s-a determinat cu ajutorul experimentelor ROESY că puterea interacțiunilor dintre săruri și α - și β -ciclodextrine depinde de substituentul din poziția *para*-fenil și crește în ordinea $F < Cl < Br$. Cavitatea β -ciclodextrinei poate acomoda substituenții din pozițiile N3 și N1 iar în cavitatea α -ciclodextrinei poate pătrunde parțial doar substituentul din poziția N3.

Pentru un alt complex studiat, cel dintre bromura de (N-benzil), N-(4-nitrobenzil) benzimidazol (Bz1255) și β -ciclodextrină, din interpretarea experimentelor ROESY s-a determinat că există mai multe geometrii de incluziune posibile:

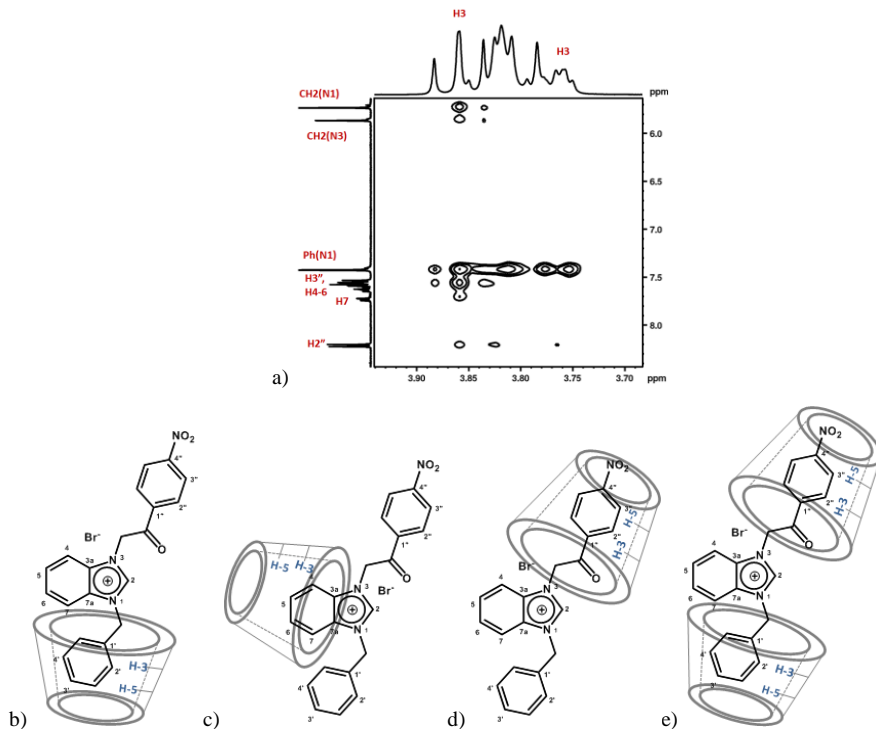


Figura 7. a) detaliiul spectrului ROESY pentru **Bz1255-BCD** cu evidențierea cuplajelor între semnalele **Bz1255** și H3 și H5 din **BCD** și reprezentarea schematică a geometriilor de incluziune posibile: b) cu nucleul fenilic de la N1 în cavitate, c) cu nucleul benzimidazolic parțial în cavitate; d) cu nucleul p-nitrofenil în cavitate; e) structură de tip 1:2, cu ambii substituenți în câte o cavitate de ciclodextrină

Stoichiometria complexului dintre Bz1255 și β -ciclodextrină a fost determinată cu ajutorul metodei variațiilor continue și este 1:2. Pentru acest complex s-au studiat și efectul unor factori asupra complexării: efectul temperaturii, al pH-ului, influența prezenței standardului intern TSP și a prezenței DMSO- d_6 în soluție cu rol de cosolvent. Odată cu creșterea temperaturii complexul disociază însă după răcire echilibrul se restabilește și în spectrul ROESY apar aceleași cuplaje ca înainte de încălzire. Complexul este stabil într-un interval mare de pH, observându-se interacțiuni între cavitatea ciclodextrinei și sare atât la pH acid (pH=2,5) cât și la pH bazic (pH=10). În prezența standardului intern TSP complexul dintre Bz1255 și β -ciclodextrină disociază și se formează exclusiv complex de incluziune între β -ciclodextrină și TSP. Această competiție este observată în spectrele ROESY prin dispariția semnalelor de corelație dintre sare și interiorul cavității ciclodextrinei și

apariția semnalelor de corelație dintre ciclodextrină și TSP. Decomplexarea apare și în cazul folosirii a 6% DMSO- d_6 cu rol de cosolvent.

Un alt studiu a vizat complexarea dintre bromura de 1-etil-3-[2-fenil-2-oxoetil]-5,6-dimetilbenzimidazol (BzB122) și β -ciclodextrină și ciclodextrine modificate chimic. În spectrele ^1H -RMN apar modificări ale deplasărilor chimice în urma complexării, atât la nivelul semnalelor protonilor din ciclodextrină cât și pentru cei din BzB122:

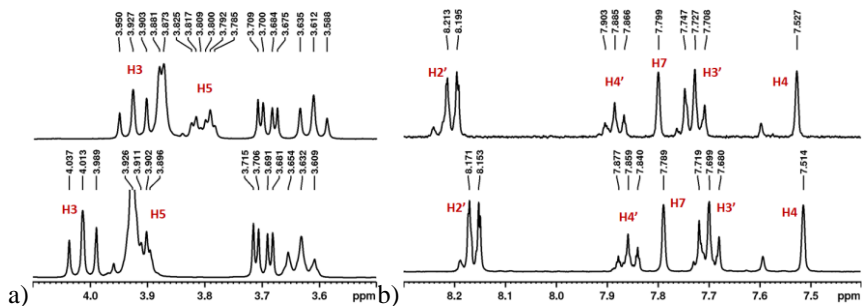


Figura 8. a) Detaliu cu zona semnalelor ciclodextrinei din spectrele ^1H -RMN pentru BCD 10 mM BCD (jos) comparativ cu 1,25 mM BCD/8,75 mM BzB122 (sus) și b) Detaliu cu zona semnalelor ciclodextrinei din spectrele ^1H -RMN pentru BzB122 din probele 10 mM BzB122 (jos) comparativ cu 1,25 mM BzB122/8,75 mM BCD (sus)

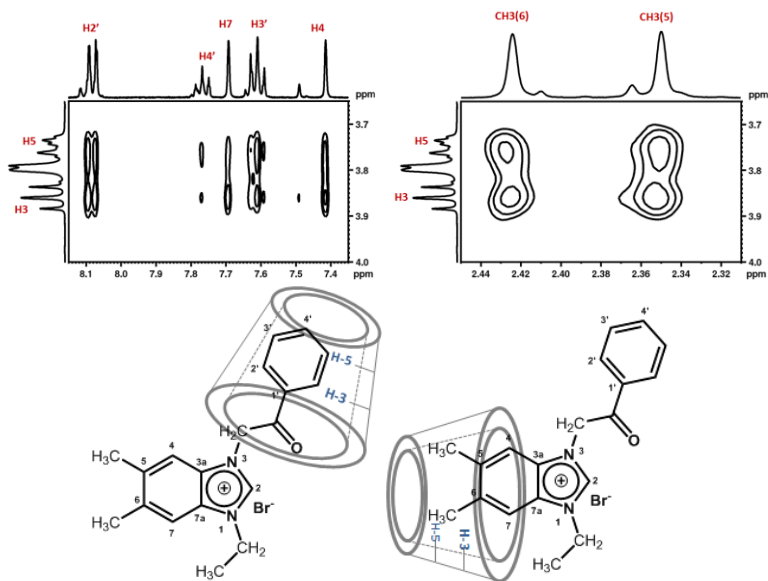


Figura 9. Spectrul ROESY pentru complexul **BzB122-BCD** în D_2O și reprezentările schematice ale geometriilor de incluziune posibile

Stoichiometria complexului este 1:1 și a fost determinată cu ajutorul metodei variațiilor continue prin RMN și UV-VIZ.

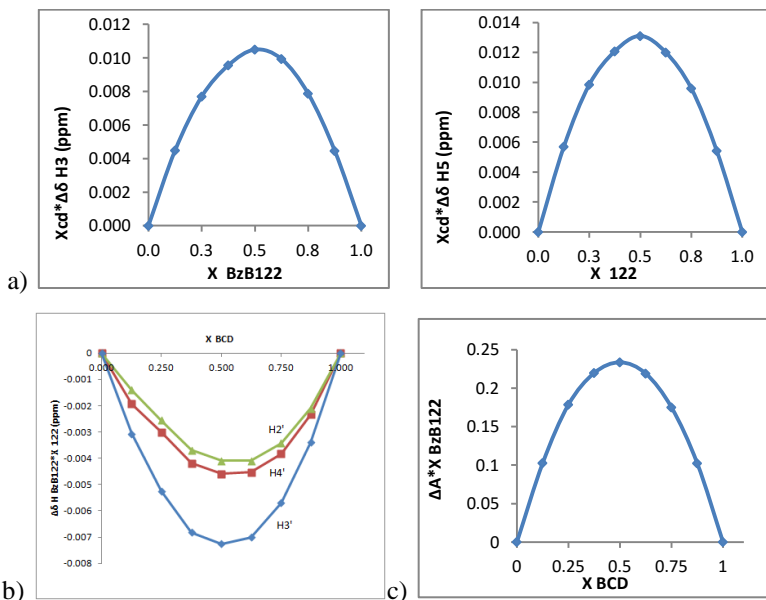


Figura 10. Graficele Job folosind ecuația $X_{cd} * \Delta\delta_{Hcd} = f(X_{BzB122})$ pentru protonii H3 și H5 din BCD (a) $X_{BzB122} * \Delta\delta_{HBzB122} = f(X_{BCD})$ pentru protonii H3', H4' și H2' din sarea BzB122 (b), și (c) $X_{BzB122} * \Delta A_{BzB122} = f(X_{BCD})$ pentru absorbanta sării BzB122, cu punctele de inflexiune la valoarea 0,5 (stoichiometrie 1:1)

Pentru acest complex s-a determinat constanta de asociere prin titrare RMN. Datele au fost prelucrate cu ajutorul metodei Benesi-Hildebrand și cu ajutorul a 2 programe mai elaborate, Conseq și WinEqNMR. În cazul complexelor dintre BzB122 și ciclodextrine modificate s-a determinat că stoichiometria lor este de 1:1 și s-a determinat constanta de asociere pentru complexările cu 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrină, metil- β -ciclodextrină și sulfobutyl eter- β -ciclodextrină.

Concluziile capitolului 5

- Au fost caracterizați complet din punct de vedere 1H - și ^{13}C -RMN 5 derivați noi de benzimidazol. Toate atribuțiile spectrale sunt dovedite experimental prin tehnicile COSY, HSQC, HMQC și HMBC.

- A fost realizat primul studiu de incluziune a unor săruri de benzimidazoliu în ciclodextrine.

- Au fost determinate stoechiometriile reacțiilor de complexare ale sărurilor de benzimidazoliu studiate și constantele de asociere ale complexelor formați.

- A fost dovedită competiția cosolventului DMSO cu derivații benzimidazolici la complexarea cu ciclodextrine atunci când acest cosolvent este folosit în amestec cu apa.

- A fost dovedită competiția standardului intern TSP cu derivații de benzimidazol la complexarea cu ciclodextrine și necesitatea folosirii standardelor externe pentru aceste studii.

- a arătat că puterea interacțiunilor dintre sărurile de benzimidazoliu și α -ciclodextrină și β -ciclodextrină depind de substituentul din poziția para-fenil și crește în ordinea $F < Cl < Br$. Cavitatea β -ciclodextrinei poate acomoda substituenții din pozițiile N3 și N1 iar în cavitatea α -ciclodextrinei poate pătrunde parțial doar substituentul din poziția N3.

Concluzii generale

- A fost realizat un studiu de literatură privind fenomenul RMN și ciclodextrinele, cu accent pe studiul complexelor de incluziune prin RMN.

- Au fost caracterizate complet prin RMN, 3 ciclodextrine native (α -, β - și γ -ciclodextrine), 4 zaharide native (glucoză, zaharoză, fructoză și galactoză) și 10 ciclodextrine modificate: sulfobutileter- β -ciclodextrină, monoclorotriazinil- β -ciclodextrină, metil- β -ciclodextrină, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrină și α -, β - și γ -ciclodextrine esterificate cu resturi de oligolactidă (ACD-LA-F1, BCD-LA-F1, GCD-LA-F1, ACD-LA-F2, BCD-LA-F2, GCD-LA-F2).

- Pe baza atribuțiilor din probele individuale, cele 4 zaharide au fost cuantificate în matrici complexe de sucuri de fructe și a fost dezvoltat un model statistic tip PCA pentru separarea chemometrică a probelor.

- În cazul și α -, β - și γ -ciclodextrinelor esterificate cu resturi de oligolactidă a fost demonstrată legarea restului oligolactidă are loc în poziția 6 a unităților de glucopiranoză.

- Au fost studiate exhaustiv influența standardelor de tip intern și extern, a temperaturii și a pH-ului asupra spectrelor RMN ale ciclodextrinelor.

- În cazul interacțiunilor β -ciclodextrinei cu cei 3 clorofenoli, semnalul pentru H5 din ciclodextrină se deplasează mai mult decât cel pentru H3. Prezența 2,4-diclorofenolului produce cele mai mari diferențe de deplasare chimică asupra semnalelor ciclodextrinelor, apoi 4-clorofenolul iar 2-clorofenolul provoacă

deplasările cele mai mici.

- Stoechiometria complexșilor dintre cei 3 clorofenoli și β -ciclodextrină este 1:1 și a fost determinată prin metoda variațiilor continue.

- Stabilitatea complexșilor variază în ordinea 2,4-diclorofenol > 4-clorofenol > 2-clorofenol. Valoarea constantei de asociere nu este influențată de prezența capilarei cu TMS.

- În cazul interacțiunilor dintre 2,7-dibromofluoren și β -ciclodextrină permetilată total, γ -ciclodextrină permetilată parțial și cucurbit[7]uril oaspetele are afinitate mai mare pentru cavitățile ciclodextrinelor decât pentru cea a cucurbit[7]urilului. Aceeași diferență de afinitate se observă și în cazul interacțiunilor dintre aceste macrocicluri și polimerul derivat de 2,7-dibromofluoren.

- Au fost caracterizați complet din punct de vedere ^1H - și ^{13}C -RMN 5 derivați noi de benzimidazol. Toate atribuțiile spectrale sunt dovedite experimental prin tehnicile COSY, HSQC, HMQC, și HMBC.

- A fost realizat primul studiu de incluziune a unor săruri de benzimidazoliu în ciclodextrine.

- Au fost determinate stoechiometriile reacțiilor de complexare ale sărurilor de benzimidazoliu studiate și constantele de asociere ale complexșilor formați.

- A fost dovedită competiția cosolventului DMSO- d_6 cu derivații benzimidazolici la complexarea cu ciclodextrine atunci când acest cosolvent este folosit în amestec cu apa.

- A fost dovedită competiția standardului intern TSP cu derivații de benzimidazol la complexarea cu ciclodextrine și necesitatea folosirii standardelor externe pentru aceste studii.

- S-a arătat că puterea interacțiunilor dintre sărurile de benzimidazoliu și α -ciclodextrină și β -ciclodextrină depind de substituentul din poziția para-fenil și crește în ordinea $\text{F} < \text{Cl} < \text{Br}$. Cavitatea β -ciclodextrinei poate acomoda substituenții din pozițiile N3 și N1 iar în cavitatea α -ciclodextrinei poate pătrunde parțial doar substituentul din poziția N3.

- În cazul complexșilor cu ciclodextrine substituie, suplimentar față de interacțiunile cu protonii din interiorul cavității, oaspetele interacționează și cu substituenții atașați de ciclodextrine.

Rezultatele descrise în Partea Originală au fost publicate parțial în 4 articole ISI, și au fost prezentate la manifestări științifice sub forma a 6 comunicări și 5 postere.

Diseminarea rezultatelor

Articole

1. **M. Balan**, A. Nicolescu, C. Stavarache, M. Ciobanu, C. Deleanu, "Fast NMR juice identification based on sugars and other plant metabolites from fruits", *Rev. Roum. Chim.*, 2013, 58, 175-182
2. A. Nicolescu, **M. Balan**, E. Georgescu, F. Georgescu, L. Ursu, B. Simionescu, P. Flip, C. Deleanu, "Benzimidazolium-cyclodextrin Inclusion Complexes", *Rev. Chim. (Bucharest)*, 2013, 64 (4), 451-455
3. A. Farcas, K. Assaf, A. M. Resmerita, S. Cantin, **M. Balan**, P.-H. Aubert, W. Nau, "Cucurbit[7]uril-based fluorene polyrotaxanes", *Eur. Polymer J.*, 2016, 83, 256-264
4. C. Peptu, **M. Balan-Porcarasu**, A. Šišková, L. Škultéty, J. Mosnáček, "Cyclodextrins tethered with oligolactides – green synthesis and structural assessment", *Beilstein J. Org. Chem.*, 2017, 13, 779-792

Comunicări

1. **M. Balan**, A. Nicolescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, „NMR characterization of cyclodextrins in various media”, *Comunicare*, 16th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, 9–12 Septembrie, **2009**, Sinaia, Romania.
2. **M. Balan**, A. Nicolescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, „Influence of experimental factors on the NMR spectra of cyclodextrins”, *Comunicare*, Zilele Academice Iesene, 8-10 Octombrie **2009**, Iasi, Romania.
3. **M. Balan**, A. Nicolescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, "Influence of temperature and solvents on the NMR spectra of cyclodextrins", *Comunicare*, The XXXI-st Romanian Chemistry Conference, 6-8 Octombrie **2010**, Ramnicu-Valcea, Romania, Abstract book ISBN 978-973-750-194-3, p 29.
4. M. Ciobanu, **M. Balan**, C. Stavarache, A. Nicolescu, „Discriminarea rapida a sucurilor de fructe prin analiza statistica a spectrelor 1H-RMN”, *Comunicare*, Zilele Academice Iesene, a XXIV-a Sesiune de Comunicari Stiintifice a Institutului de Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iasi, 3-5 Octombrie **2013**, vol. rezumate p. 76.
5. **M. Balan**, A. Nicolescu, C. Deleanu, B. C. Simionescu, "Caracterizarea RMN a unor complexi de incluziune ai ciclodextrinelor", *Comunicare*, Zilele Academice Iesene, a XXV-a Sesiune de Comunicari Stiintifice a Institutului de Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iasi, 24-26 Septembrie **2015**, vol. rezumate p. 59.
6. **M. Balan-Porcarasu**, A. Nicolescu, E. Georgescu, F. Georgescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, "NMR Characterization of imidazolium-cyclodextrine inclusion complexes", *Comunicare*, The 3rd International Conference on Analytical Chemistry, 28-31 August **2016**, Iasi, vol. rezumate p. 42.

Postere

1. A. Danila, M. Deleanu, A. Iorgu, C. Moise, **M. Balan**, C. Stavarache, A. Nicolescu, "NMR discrimination of fruits based on plant metabolites present in natural plant metabolites present in natural or industrial processed mixtures", *Poster*, a XXXII-a Conferința Națională de Chimie, Calimanesti-Caciulata, 03-05 Octombrie **2012**, vol. rezumate pag. 30.
2. M. Ciobanu, **M. Balan**, C. Stavarache, A. Nicolescu, „Discriminarea rapida a sucurilor de fructe prin analiza statistica a spectrelor 1H-RMN”, *Poster*, Zilele Academice Iesene, a XXIV-a Sesiune de Comunicari Stiintifice a Institutului de Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iasi, 3-5 Octombrie **2013**, vol. rezumate p. 76.
3. A. Nicolescu, **M. Balan**, C. Stavarache, E. Georgescu, F. Georgescu, B. C. Simionescu, P. Filip, C. Deleanu, „Benzimidazolium-Cyclodextrin Inclusion Complexes”, *Poster*, A XXXIII-a Conferinta Nationala de Chimie, 1-3 Octombrie **2014**, Calimaneati-Caciulata, Valcea, Romania, vol rezumate pag. 15.
4. **M. Balan**, C. Stavarache, E. Georgescu, F. Georgescu, A. Nicolescu, C. Deleanu, “Inclusion Complexes of Natural Cyclic Oligosaccharides”, International Workshop “Food Chemistry & Engineering” 15 May **2015**, vol. rezumate p27.
5. **M. Balan-Porcarasu**, A. Nicolescu, C. Deleanu, B. C. Simionescu, „NMR Characterization of inclusion complexes between different cyclodextrins and benzimidazolium derivatives”, *Poster*, 19th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users’ Meeting, 5-8 Septembrie **2017**, Timișoara, vol. Rezumate pag. 43.

Articole în domeniul zaharidelor și ciclodextrinelor care nu au fost incluse în teză

1. A. M. Pana, L. M. Rusnac, G. Bandur, C. Deleanu, **M. Balan**, M. Silion, „Synthesis and characterization of new glycopolymers based on monosaccharides and maleic anhydride II. Mannose derivatives”, *Materiale Plastice*, **2010**, 47, 299-305
2. A. M. Pana, L. M. Rusnac, G. Bandur, M. Silion, C. Deleanu, **M. Balan**, „Novel D-glucose and D-mannose based oligomers: Synthesis and characterization” *e-Polymers*, **2011**, 4, 1-14
3. L. M. Stefan, A. M. Pana, M. Silion, **M. Balan**, G. Bandur, L. M. Rusnac, “Efficient preparation and characterization of carbohydrate based monomers. D-mannose derivatives”, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 76, 356-360
4. A. Farcas, A.-M. Resmerita, A. Stefanache, **M. Balan**, V. Harabagiu, “Synthesis and characterization of low-molecular-weight pi-conjugated polymers covered by persilylated beta-cyclodextrin”, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 8, 1505-1514
5. S. Bucatariu, G. Fundueanu, I. Prisacaru, **M. Balan**, I. Stoica, V. Harabagiu, M. Constantin, “Synthesis and characterization of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethylacrylamide) microgels as potential carriers for drug delivery”, *Journal of Polymer Research*, **2014**, 21, no. 580

6. A. Stefanache, **M. Balan**, V. Harabagiu, P. H. Aubert, P. Guegan, "Electro-optical properties of aromatic oligoazomethine/permethylated α -cyclodextrin main-chain polyrotaxanes", *Chemical Physics Letters*, **2014**, 599, 104-109.

7. V. Popescu, A. Muresan, G. Popescu, **M. Balan**, M. Dobromir, „Ethyl chitosan synthesis and quantification of the effects acquired after grafting it on a cotton fabric, using ANOVA statistical analysis”, *Carbohydrate Polymers*, **2016**, 138, 94–105.

Bibliografie selectivă

1. D. J. Wood, F. E. Hruska, W. Saenger, "1H NMR Study of the Inclusion of Aromatic Molecules in α -Cyclodextrin", *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 1735-1740.

2. T. Usui, N. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, "13C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Glucobioses, Glucotrioses, and Glucans", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, **1973**, 2425-2432.

3. P. Colson, H.J. Jennings, I. C. P. Smith, "Composition, Sequence, and Conformation of Polymers and Oligomers of Glucose as Revealed by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance", *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 8081-8087.

4. M. Vincendon, "Spectres de RMN de 1H et 13C des cyclodextrines en solution dans le DMSO: effets de solvant et de temperature", *Bull. Chim. Soc. Fr.*, **1981**, Part II, 129-134.

5. R. Gelb, L. Schwartz, D. Laufer, "Acid Dissociation of Cyclooctaamylose", *Bioorg. Chem.*, **1982**, 274-280.

6. J. C. Christofides, D. B. Davies, "1H and 13C N.M.R. Observation of 2H Isotope Effects transmitted through Hydrogen Bonds", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1982**, 560-562.

7. A. J. Andreu-Sevilla, J. M. López-Nicolás, A. A. Carbonell-Barrachina, F. García-Carmona, "Comparative effect of the addition of α -, β -, or γ -cyclodextrin on main sensory and physico-chemical parameters", *J. Food Sci.* **2011**, 76 (5), S347-S353.

8. Y. Takashima, M. Osaki, A. Harada, "Cyclodextrin-Initiated Polymerization of Cyclic Esters in Bulk: Formation of Polyester-Tethered Cyclodextrins", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13588-13589.

9. J. Shen, A. Hao, G. Du, H. Zhang, H. Sun, "A convenient preparation of 6-oligo(lactic acid)cyclomaltoheptaose as kinetically degradable derivative for controlled release of amoxicillin", *Carbohydr. Res.*, **2008**, 343, 2517-2522.

10. H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, "NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities", *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7512-7515.

11. R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral De Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, "NMR nomenclature. nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC Recommendations 2001)", *Pure Appl. Chem.*, **2001**, 73, 1795-1818.

12. R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral De Menezes, P. Granger, R. E. Hoffman, K. W. Zilm, "Further conventions for NMR shielding and chemical shifts (IUPAC Recommendations 2008)", *Pure Appl. Chem.*, **2008**, 80, 59-84.

13. Z.-Z. Li, Q.-X. Guo, T. Ren, X.-Q. Zhu, Y.-C. Liu, "Can TMS and DSS be Used as NMR References for Cyclodextrin Species in Aqueous Solution?", *J. Incl. Phenom. Molec. Rec. Chem.*, **1993**, 15, 37-42.

14. N. Funasaki, M. Nomura, S. Ishikawa, S. Neya, "NMR Chemical Shift References for

- Binding Constant Determination in Aqueous Solutions”, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 7361-7365.
15. R. E. Hoffman, “Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents”, *Magn. Reson. Chem.*, **2006**, *44*, 606-616.
16. R. E. Hoffman, E. D. Becker, “Temperature dependence of the ^1H chemical shift of tetramethylsilane in chloroform, methanol, and dimethylsulfoxide”, *J. Magn. Reson.*, **2005**, *176*, 87-98.
17. E. Gaidamauskas, E. Norkus, E. Butkus, D. C. Crans, G. Grinciene, “Deprotonation of β -cyclodextrin in alkaline solutions”, *Carbo. Res.*, **2009**, *344*, 250-254.
18. A. Gadr, K. A. Connors, “Binding of Substituted Acetic Acids to α -Cyclodextrin in Aqueous Solution”, *J. Pharm. Sci.*, **1997**, *11*, 1210-1214.
19. **M. Balan**, A. Nicolescu, C. Stavarache, M. Ciobanu, C. Deleanu, “Fast NMR juice identification based on sugars and other plant metabolites from fruits”, *Rev. Roum. Chim.*, **2013**, *58*, 175-182.
20. C. Peptu, **M. Balan-Porcarasu**, A. Šišková, L. Škultéry, J. Mosnáček, “Cyclodextrins tethered with oligolactides – green synthesis and structural assessment”, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2017**, *13*, 779-792.
21. **M. Balan**, A. Nicolescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, „NMR characterization of cyclodextrins in various media”, *Comunicare*, 16th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, 9–12 Septembrie, **2009**, Sinaia, Romania.
22. **M. Balan**, A. Nicolescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, „Influence of experimental factors on the NMR spectra of cyclodextrins”, *Comunicare*, Zilele Academice Iesene, 8-10 Octombrie **2009**, Iasi, Romania.
23. **M. Balan**, A. Nicolescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, “Influence of temperature and solvents on the NMR spectra of cyclodextrins”, *Comunicare*, The XXXI-st Romanian Chemistry Conference, 6-8 Octombrie **2010**, Ramnicu-Valcea, Romania, Abstract book ISBN 978-973-750-194-3, p 29.
24. A. Danila, M. Deleanu, A. Iorgu, C. Moise, **M. Balan**, C. Stavarache, A. Nicolescu, “NMR discrimination of fruits based on plant metabolites present in natural plant metabolites present in natural or industrial processed mixtures”, *Poster*, a XXXII-a Conferinta Nationala de Chimie, Calimanesti-Caciulata, 03-05 Octombrie **2012**, vol. rezumate pag. 30.
25. M. Ciobanu, **M. Balan**, C. Stavarache, A. Nicolescu, „Discriminarea rapida a sucurilor de fructe prin analiza statistica a spectrelor ^1H -RMN”, *Poster*, Zilele Academice Iesene, a XXIV-a Sesiune de Comunicari Stiintifice a Institutuluide Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iasi, 3-5 Octombrie **2013**, vol. rezumate p. 76.
26. **M. Balan**, C. Stavarache, E. Georgescu, F. Georgescu, A. Nicolescu, C. Deleanu, “Inclusion Complexes of Natural Cyclic Oligosaccharides”, International Workshop “Food Chemistry & Engineering” 15 May **2015**, vol. rezumate p27
27. A. Farcas, K. Assaf, A. M. Resmerita, S. Cantin, **M. Balan**, P.-H. Aubert, W. Nau, “Cucurbit[7]uril-based fluorene polyrotaxanes”, *Eur. Polymer J.*, **2016**, *83*, 256-264.
28. **M. Balan**, A. Nicolescu, C. Deleanu, B. C. Simionescu, “Caracterizarea RMN a unor complexi de incluziune ai ciclodextrinelor”, *Comunicare*, Zilele Academice Iesene, a XXV-a

- Sesiune de Comunicari Stiintifice a Institutului de Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iasi, 24-26 Septembrie **2015**, vol. rezumate p. 59.
29. A. Nicolescu, C. Deleanu, E. Georgescu, F. Georgescu, A.-M. Iurascu, S. Shova, P. Filip, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 1486.
30. E. Georgescu, M. R. Caira, F. Georgescu, B. Draghici, M. M. Popa, F. Dumitrascu, *Synlett*, 2009, p. 1795.
31. M. R. Caira, E. Georgescu, F. Georgescu, M. M. Popa, F. Dumitrascu, *ARKIVOC*, *xii*, **2009**, 242.
32. F. Dumitrascu, M. T. Caproiu, F. Georgescu, B. Draghici, M. M. Popa, E. Georgescu, *Synlett*, **2010**, 2407.
33. F. Dumitrascu, M. R. Caira, E. Georgescu, F. Georgescu, C. draghici, M. M. Popa, *Heteroat. Chem.*, *22*, **2011**, 723.
34. E. Georgescu, F. Georgescu, M. M. Popa, C. Draghici, L. Tarko, F. Dumitrascu, *ACS Comb. Sci.*, *14*, **2012**, 101.
35. Y. Lu, T. Guo, J. Qi, J. Zhang, W. Wu, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, *13*, **2013**, 1222.
36. Y. Rojas-Aguirre, L. Yépez-Mulia, I. Castillo, F. López-Vallejo, O. Soria-Arteche, A. Hernández-Campos, R. Castillo, F. Hernández-Luis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *19*, **2011**, 789.
37. E. Lipka, J. Charton, M.-P. Vaccher, M. Folly-Klan, J.-P. Bonte, C. Vaccher, *J. Sep. Sci.*, *32*, **2009**, 1907.
38. M. J. Hynes, EQNMR: A computer program for the calculation of stability constants from nuclear magnetic resonance chemical shift data, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1993**, 311-312.
40. C. G. Floare, M. Bogdan, „CONSTEQ - a program for association constants determination using solution NMR data”, *AIP Conf. Proc.*, **2013**, *1565*, 48-52.
41. A. Nicolescu, M. Balan, E. Georgescu, F. Georgescu, L. Ursu, B. Simionescu, P. Filip, C. Deleanu, “Benzimidazolium-cyclodextrin Inclusion Complexes”, *Rev. Chim. (Bucharest)*, **2013**, *64* (4), 451-455.
42. M. Balan-Porcarasu, A. Nicolescu, E. Georgescu, F. Georgescu, B. C. Simionescu, C. Deleanu, “NMR Characterization of imidazolium-cyclodextrine inclusion complexes”, *Comunicare*, The 3rd International Conference on Analytical Chemistry, 28-31 August **2016**, Iasi, vol. rezumate p. 42.
43. A. Nicolescu, M. Balan, C. Stavarache, E. Georgescu, F. Georgescu, B. C. Simionescu, P. Filip, C. Deleanu, „Benzimidazolium-Cyclodextrin Inclusion Complexes”, *Poster*, A XXXIII-a Conferinta Nationala de Chimie, 1-3 Octombrie **2014**, Calimaneati-Caciulata, Valcea, Romania, vol rezumate pag. 15.
44. M. Balan-Porcarasu, A. Nicolescu, C. Deleanu, B. C. Simionescu, „NMR Characterization of inclusion complexes between different cyclodextrins and benzimidazolium derivatives”, *Poster*, 19th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users’ Meeting, 5-8 Septembrie **2017**, Timișoara, vol. Rezumate pag. 43.
45. S. Simova, *Magn. Reson. Chem.*, 1998, **36**, 505