

Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică

Specializarea Fizică Medicală

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific

Prof. dr. Vasile CHIȘ

Absolvent

Răzvan-Ștefan ANGHELUȚĂ

Cluj-Napoca

2023



Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică

Specializarea Fizică Medicală



LUCRARE DE LICENŢĂ

Studiu experimental și computațional asupra radiosensibilizatorului tirapazamină

Coordonator științific

Prof. dr. Vasile CHIȘ

Absolvent

Răzvan-Ștefan ANGHELUȚĂ

Cluj-Napoca

2022

CUPRINS

Introducere.....	1
Capitolul 1 Metode de calcul de structură electronică a moleculelor	7
1.1 Bazele teoriei funcționalei de densitate (DFT)	7
1.2 Seturi de bază.....	10
1.3 Calculul spectrelor electronice în formalismul TD-DFT.....	11
1.4 Calculul spectrelor electronice cu structură vibronică	13
Capitolul 2 Detalii experimentale	16
Capitolul 3 Rezultate și discuții	18
3.1 Calculul energiilor de ionizare pentru molecula TPZ	18
3.2 Caracteristici vibraționale ale moleculei TPZ	23
3.3 Caracteristici fotofizice ale moleculei TPZ	32
3.3.1 Modificări structurale ale moleculei TPZ	32
3.3.2 Proprietăți fotofizice ale moleculei TPZ.....	35
Concluzii	43
Bibliografie	44

Abstract

The study presented in this paper aimed to characterize the tirapazamine (TPZ) molecule, a radiosensitizer of interest in radiotherapy, from the perspective of its structural and electronic properties. We analyzed and explained the molecule's properties related to its ionization, vibrational, and photophysical properties (electronic absorption, fluorescence emission, and fluorescence radiative lifetimes) using computational and experimental methods.

To achieve this, we employed appropriate experimental techniques and calculation methods based on density functional theory, both independent DFT and time-dependent (TD-DFT), to investigate the geometric parameters of the molecule in its ground and excited states. Additionally, we examined the molecular geometry changes during the transition between the two electronic states and between the gas and liquid phases.

For calculating the ionization energy for TPZ, we explored various approximations (TK, OVGF, EPT) at different levels of theory, in order to identify the most suitable calculation method for this quantity in TPZ or molecules with similar structures.

The Raman spectra of the molecule in the gas phase were calculated using both the harmonic and anharmonic approximations. The computational data were correlated with the experimental data obtained from measurements of the molecule's Raman spectrum to assign the normal modes of vibration.

Another study conducted involved the measurement, calculation, and interpretation of the molecule's photophysical properties. We measured and calculated the UV-Vis absorption and excitation spectra, fluorescence spectra, and fluorescence lifetime. By correlating the experimental data with the computational results, we identified the molecular species responsible for the measured spectroscopic responses.

Rezumat

Studiul prezentat în această lucrare a avut drept scop caracterizarea moleculei de tirapazamină (TPZ), un radiosensibilizator de interes în radioterapie, din punctul de vedere al proprietăților sale structurale și electronice. Am urmărit analiza și explicarea proprietăților moleculei legate de ionizarea acesteia, de proprietățile sale vibraționale și de cele fotofizice (absorbția electronică, emisia de fluorescență și timpii radiativi de fluorescență), folosind metode computaționale și experimentale.

În acest scop am utilizat tehnici experimentale adecvate scopului și metode de calcul al bazate pe teoria funcționalei de densitate, independentă (DFT) și dependentă (TD-DFT) de timp, pentru a investiga parametrii geometrici ai moleculei în stare fundamentală dar și în stare excitată. De asemenea, am investigat modificarea geometriei moleculei la trecerea între cele două stări electronice dar și între faza gazoasă și faza lichidă.

Pentru calculul energiei de ionizare a moleculei am explorat diferite aproximații (TK, OVGF, EPT) la diferite nivele de teorie, cu scopul de a identifica cea mai potrivită metodă de calcul a acestei mărimi pentru molecula TPZ sau pentru molecule cu structuri asemănătoare.

Spectrele Raman ale moleculei în gaz au fost calculate atât în aproximația armonică cât și în cea anarmonică. Datele computaționale au fost corelate cu cele experimentale rezultate din măsurători ale spectrului Raman al moleculei cu scopul de a atribui modurile normale de vibrație.

Un alt studiu efectuat a constatat în măsurarea, calculul și interpretarea proprietăților fotofizice ale moleculei. Astfel am măsurat și calculat spectrele de absorbție și excitație UV-Vis, spectrele de fluorescență, precum și timpul de fluorescență. Corelând datele experimentale cu cele computaționale am identificat speciile moleculare responsabile de răspunsurile spectroscopice măsurate

Introducere

Organizația Mondială a Sănătății a înregistrat aproximativ 10 milioane de decese în 2020 cauzate de cancer, acesta reprezentând una din principalele cauze de deces în întreaga lume, iar IARC (International Agency for Research on Cancer) preconizează creșterea acestui număr la 13 milioane în 2030 [who.int, Liuyun2021]. Pentru combaterea sa s-au dezvoltat diverse strategii precum intervenția chirurgicală, imunoterapia, terapia hormonală, transplantul de celule stem, chimioterapia și radioterapia.

Terapia cancerului se bazează pe diferențierea țesutului sănătos de cel canceros astfel încât tumoarea să poată fi diferențiată și atacată fără a produce daune celulelor sănătoase înconjurătoare [Brown1993]. În tumorile solide proliferarea celulelor cu o rată mai mare față de generarea de noi vase sangvine care prezintă anomalii structurale și funcționale, împreună cu rata consum și de difuzie a oxigenului rezultă în lipsa oxigenului în celulele tumorale (hipoxie). Astfel de tumori prezintă dificultăți și în încercarea tratării lor prin chimioterapie. O explicație a acestui fapt este rata de multiplicare mai lentă a celulelor canceroase lipsite de oxigen față de cele oxigenate, astfel încât chimioterapia care atacă celulele care se divid rapid devine inefficientă. De asemenea, vascularizarea rarefiată a acestor tumori împiedică medicamentele chimioterapice administrate intravenos să ajungă la locul de interes tumoral [Marcu2006].

În radioterapie acest fenomen este de asemenea indezirabil deoarece absența oxigenului duce la scăderea eficacității radiației. În țesuturi oxigenate radicalii liberi induși de către radiația ionizantă interacționează cu oxigenul rezultând în formarea de specii reactive de oxigen care apoi conduc la lizarea celulei, adică la "descompunerea unei celule cauzată de deteriorarea membranei plasmatică a acesteia" [NCI2023].

Hipoxia tumorilor face acest proces ineficient, fiind necesară o doză de radiație de până la 2-3 ori mai mare pentru distrugerea aceluiași număr de celule în absența oxigenului [Danny2001]. Pentru combaterea acestui efect s-au încercat diferite strategii precum: oxigenarea țesutului prin terapie hiperbarică cu oxigen, creșterea capacității țesutului de a absorbi oxigenul sau prin medicamente vasoactive, metode care au demonstrat, totuși, eficacitate limitată [Marcu2006].

Hipoxia tumorilor poate fi însă exploataată ca un avantaj, prin alte mecanisme de atacare a celulelor canceroase lăsând celulele sănătoase intacte. De exemplu, prin utilizarea unor substanțe care, aflate în țesuturi lipsite de oxigen, generează compuși toxici (bioeductanți) se poate realiza distrugerea țesutului bolnav. Printre astfel de substanțe se numără Mitomicina C, nitroimidazenol-ul și clasa de molecule bezotriazine di-N-oxizi din care face parte Tirapazamina [Brown]. Astfel de compuși abili în potențarea efectelor radiației ionizante, numiți radiosensibilizatori, au un efect mai pronunțat asupra tumorilor decât efectul însumat al radiației și al compusului administrate separat [Liuyun2021].

Tirapazamina (TPZ, cu numele IUPAC 1,4-dioxido-1,2,4-benzotriazine-1,4-diium-3-amine [IUPAC] este un astfel de compus cu citotoxicitate selectivă în medii hipoxice care a fost și este supus studiilor clinice în care a dovedit rezultate promițătoare. Încă de la începutul studiilor, TPZ a arătat o capacitate semnificativ mai mare de distrugere a țesutului hipoxic pentru o concentrație dată, cât și o toxicitate bine diferențiată între țesuturile hipoxice și cele normoxice, dovedindu-și eficiența în comparație cu majoritatea celorlalți radiosensibilizatori. Modalitatea prin care TPZ contribuie la distrugerea celulelor este prin reducerea sa la o formă de radical liber, reactiv, care poate interacționa cu lanțurile de ADN din cromozomii celulelor, ducând la lizarea lor, atunci când nu este prezent oxigenul. În prezența oxigenului însă, forma redusă este oxidată într-o formă mult mai puțin toxică decât radicalul său, rezultând în vătămarea minimă a țesutului sănătos. De asemenea, ADN-ul celulelor lipsite de oxigen a fost observat ca necesitând un timp de două ori mai lung pentru a se repara după efectul moleculei de TPZ, în comparație cu cel al celulelor bine oxigenate. Printre

efectele pe care TPZ le poate avea asupra celulelor se numără simpla și dubla rupere a lanțurilor de ADN, ruperea cromozomilor, întreruperea ciclului celular și inducerea apoptozei [Marcu2006].

În combinație cu radiații ionizante TPZ a arătat un efect sinergic în controlul tumorilor, spre deosebire de unul doar aditiv. Încercarea de a oxigena tumoarea înaintea și în timpul iradierii folosind medicamente precum nicotinamida a dus la efecte mai puțin pronunțate față de experimentele în care hipoxia tumorii a fost păstrată și folosită ca avantaj prin administrarea de TPZ. În cadrul aceleiași metode în care în tumoare este menținută o cantitate scăzută de oxigen, molecula de TPZ s-a dovedit mai eficientă și decât alți sensibilizatori precum KU-2285 atunci când au fost administrate doze relevante clinic. Efectul de radiosensibilizator al TPZ este considerat mai important decât cel citotoxic iar pentru eficiența sa clinică se recomandă administrarea sa înainte de iradiere [Marcu2006]

În combinație cu alte medicamente antineoplasmice, TPZ a arătat din nou un caracter sinergetic, în special când este adăugată tratamentului cu cisplatină, demonstrând un mare succes clinic. Spre deosebire de alte medicamente care pot fi administrate împreună cu cisplatina, TPZ prezintă avantajul de a nu amplifica efectele nocive ale cisplatinei asupra țesutului sănătos. În acest mod efectele adverse ale acestui tratament chimioterapeutic sunt mai puțin grave și mai tolerabile decât în alte tratamente, generând în mod nedorit doar crampe musculare și sau amețală. Deși aceste efecte sunt considerabile drept acceptabile deoarece sunt reversibile, ele încă reprezintă un factor limitant al dozei care poate fi administrată. Amplificarea efectului terapeutic al cisplatinei de către TPZ rezultă din caracterul său de chimiosensibilizator. Datorită lipsei de oxigen celulele țesutului normal suferă necroză sau apoptoză, rezultând în moartea celulelor, însă celulele din tumoare pot intra într-un stadiu latent, în care ciclul lor de diviziune este întrerupt. Acest fapt duce la creșterea rezistenței unor astfel de celule care nu se divid la agenții chimioterapeutici, printre care și cisplatina. TPZ are abilitatea de a sensibiliza aceste celule crescând astfel eficacitatea cisplasminei, și deci a tratamentului. Astfel, acest tratament a obținut un răspuns

pozitiv în aproximativ 75% din cazurile testate în tumorile de cap, gât, cervix și plămâni. Este recomandat ca TPZ să fie administrat cu 2-3 ore înaintea cisplatinei [Marcu2006].

Intervalul de concentrații de oxigen necesar pentru a observa citotoxicitatea moleculei de TPZ este mult mai larg decât cel al altor agenți bioreductivi asemănători. În funcție de factori precum distanța de la locul investigat în tumoare până la cea mai apropiată sursă de oxigen, diferite puncte vor avea nivele diferite de concentrații de oxigen. Pot astfel exista regiuni în aceste nivele în care partea investigată a tumorii este suficient de lipsită de oxigen pentru a fi rezistentă radiației, însă nu suficient pentru a activa unii agenți bioreductivi. TPZ oferă astfel mai mult control asupra tratamentului fiind activ într-o plajă mai largă a concentrațiilor de oxigen [Denny2001].

Localizarea specifică în interiorul celulei a radicalului format de TPZ, cât și coeficientul său de difuzie în celulă influențează efectul pe care molecula îl va avea asupra celulei în diferite condiții. S-au observat diferențe în eficiența moleculei de TPZ atât în condiții aerobice cât și anaerobice, în funcție de localizarea în celulă a enzimei care duce la reducerea TPZ. În prezența oxigenului, cea mai mare contribuție la distrugerea ADN-ului de către compușii rezultați prin reducerea TPZ se petrece în cazul în care molecula este activată de către o enzimă din, sau din apropierea nucleului, activarea în restul celulei devenind mai puțin semnificativă. În schimb, în condiții anaerobice, activarea TPZ nu mai necesită o localizare atât de specifică pentru a produce lizarea celulei astfel încât oriunde este localizată în celulă, activarea sa va produce un efect important. De asemenea, molecula TPZ nu este una lipofilă, ceea ce reduce posibilitatea sa de difuzie profundă în celulă astfel încât să poată ajunge până la nucleu pentru a dăuna celulele normoxice [Chris2020].

Prezența altor atomi în celulă merită de asemenea luată în considerare. Chiar dacă molecula de TPZ nu este metabolizată, iar după reducerea sa aceasta este oxidată înapoi fără a produce un efect direct asupra ADN-ului, această reacție poate lăsa în urma sa radicali superoxizi. Enzima detoxifiantă superoxid dismutaza va transforma acești superoxizi în molecule de H_2O_2 care în prezența cuprului se pot transforma în

radicali hidroxili capabili să afecteze lanțuri de la ADN. Un procent de 20% din cuprul care se află într-o celulă se găsește în nucleu, având un rol în menținerea structurii ADN-ului și stabilizarea complexilor formați între ADN și alte proteine din celulă. Astfel, nivelul cuprului din nucleul celulei este considerat ca având un efect direct și important în mecanismul de acțiune al moleculei de TPZ asupra celulei în condiții aerobice, și poate explica necesitatea localizării sale în nucleu atunci când este prezent oxigenul. Alte metale de tranziție prezente în celulă în afara cuprului pot prezenta același efect. Nivele anormal de ridicate de cupru au fost observate în pacienții de cancer, astfel încât pentru tratamentul lor au fost prescrise medicamente menite a suprima metabolismul cuprului în corp, ceea ce a rezultat și în restricționarea generării de vase sangvine noi, facilitând totodată menținerea hipoxiei tumorale. Un astfel de tratament este complementar administrării de TPZ, reducând toxicitatea sa în țesutul sănătos aerobic și menținând țesutul bolnav în hipoxie [Chris2020].

Având în vedere proprietățile interesante ale moleculei TPZ, în această lucrare prezentăm un studiu experimental și computațional în care să obținem informații suplimentare legate de structura geometrică și electronică a moleculei.

Concret, am avut în vedere caracterizarea geometriei moleculei în stare fundamentală și în stare excitată, explicarea caracteristicilor vibraționale ale moleculei și investigarea proprietăților fotofizice ale acesteia.

Teza este organizată în 3 capitole la care se adaugă un capitol introductiv, în care am expus importanța moleculei în practica clinică oncologică, stadiul cunoașterii în acest domeniu și în care am argumentat importanța studiului efectuat în această lucrare.

În primul capitolul am discutat pe scurt metodele de calcul al structurii electronice a moleculelor. Concret, aici am expus bazele teoriei funcționale de densitate (DFT) deoarece este aproximația pe care am folosit-o în acest studiu. Sunt discutate tipurile de funcționale de densitate existente, cu accent pe funcționale B3LYP [B3LYP].

De asemenea, am prezentat anatomia seturilor de bază de tip Pople [Pople1980] folosite în chimia computațională.

În ultima parte a acestui capitol am făcut o prezentare generală legată de calculul structurii vibronice a spectrelor de absorbție electronică (UV-Vis) și de fluorescență ale moleculelor.

În capitolul 2 am prezentat detaliile experimentale și computaționale corespunzătoare tehnicilor folosite în această lucrare.

În capitolul 3 sunt incluse rezultatele originale ale tezei. Acestea conțin date calculate pentru energia de ionizare a moleculei, date experimentale și computaționale referitoare la modurile normale de vibrație ale moleculei investigate folosind spectroscopia Raman și date experimentale și teoretice referitoare la proprietățile fotofizice ale moleculei (spectrele UV-Vis, de excitație și de fluorescență, timpi radiativi de fluorescență). Menționăm că în literatura de specialitate nu am găsit date experimentale referitoare la energia de ionizare, la modurile normale de vibrație sau la structura vibronică a spectrelor electronice ale moleculei.

Așadar, datele prezentate în studiul nostru sunt originale și aduc informații utile legate de structura geometrică și cea electronică a moleculei TPZ și pot fi de ajutor la proiectarea unor sisteme moleculare similare, extrem de utile în practica clinică oncologică.

Ultimul capitol conține concluziile studiului efectuate.

Capitolul 1 Metode de calcul de structură electronică a moleculelor

1.1 Bazele teoriei funcționalei de densitate (DFT)

Căpătând popularitate în anul 1990 teoria funcționalei de densitate a devenit una dintre cele mai importante metode pentru a calculul structurii electronice a atomilor și a moleculelor. Aceasta îmbină acuratețea rezultatelor cu un cost computațional redus, ceea ce permite investigarea unor sisteme moleculare cu un număr mare de atomi obținând rezultate într-un timp rezonabil. Aceasta are ca scop rezolvarea oricărui sistem de interacții prin reducerea sa în mod exact la o problemă mult mai ușor de rezolvat a unui sistem fără interacții. Generalitatea sistemelor care pot fi abordate utilizând această metodă reprezintă de asemenea un avantaj, putând fi folosită în studiul proprietăților moleculelor, solidelor, suprafețelor sau nanoparticulelor. DFT reprezintă un formalism nou, riguros care printre altele poate fi folosit în rezolvarea ecuației lui Schrödinger, poate parametriza rezultate empirice, calcula structura electronică a unui sistem, energii, reactivități sau proprietăți spectroscopice [Burke2007].

În teoria DFT principala mărime de interes nu mai este în mod direct funcția de undă, ci se lucrează cu densitatea de electroni a unui sistem atomic sau molecular din care se pot determina toate proprietățile corespunzătoare stării fundamentale. Densitatea electronică pentru un sistem de N electroni este:

$$\rho(\vec{r}) = N \int \cdots \int |\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \cdots, \vec{x}_N)|^2 ds_1 d\vec{x}_2 \cdots d\vec{x}_N \quad (1.1)$$

unde Ψ este funcția de undă a sistemului, iar integrarea se face după coordonatele spațiale și de spin ale tuturor electronilor, mai puțin unul singur.

Conform primei teoreme Hohenberg-Kohn această funcție determină în mod unic Hamiltonianul sistemului, iar pe baza acestui Hamiltonian pot fi determinate toate celelalte proprietăți ale acestuia, lucru care se poate demonstra prin reducere la absurd. Energia sistemului poate fi împărțită în doi termeni: unul dependent de

sistemul specific considerat și unul universal, care reprezintă aceeași funcțională pentru toate problemele de structură electronică, numită funcționala *Hohenberg-Kohn* [HK1964] și notată cu $F_{HF}[\rho]$, în care nu este menționat nici un potențial extern. Această funcție ar putea duce la rezolvarea exactă a ecuației Schrödinger, însă conține termeni precum energia de corelare pentru care nu există o formă exactă explicită.

Importanța acestei funcționale rezultă din a doua teoremă Hohenberg-Kohn care arată că funcționala $F_{HK}[Q]$ care furnizează energia stării fundamentale a sistemului dă cea mai joasă energie dacă și numai dacă densitatea electronică pe care se bazează corespunde densității electronice exacte a sistemului. Problema poate astfel fi tratată variațional, găsind funcția de densitate electronică pentru care obținem o energie minimă.

Îmbunătățiri semnificative au fost făcute de către ecuațiile *Kohn-Sham*, prin care sunt minimizezate semnificativ erorile și care au o rezolvare exactă furnizând și o densitate exactă. De asemenea, cea mai mare parte a energiei cinetice poate fi calculată în acest mod. Rezolvarea acestor ecuații este apreciabil mai ușoară decât rezolvarea ecuațiilor Schrödinger cuplate. Abordarea sistemului de electroni care interacționează se face considerând un sistem de electroni independenți, aflați într-un potențial local, însă care au aceeași funcție de densitate. Separând termenii non-clasici găsim funcționala $F_{HF}[\rho]$ de forma:

$$F[Q]=T_{KS}[Q]+J[Q]+E_{xc}[Q] \quad (1.2)$$

în care Q este densitatea electronică a sistemului, obținută prin însumarea pătratelor orbitalilor moleculari ocupați, pe baza ecuației:

$$\rho(r) = \sum_i^{occ} |\Phi_i(r)|^2 \quad (1.3)$$

iar $T_{KS}[\rho]$ reprezintă energia cinetică a electronilor sistemului ideal echivalent considerat și $J[\rho]$ reprezintă termenul columbian care poate fi calculat exact. Singurul termen care prezintă dificultăți este $E_{xc}[\rho]$, numit funcționala de schimb-corelare, este datorat efectelor non-clasice și contribuie la energia potențială și a corecția energiei

cinetice. Găsirea unei aproximații satisfăcătoare pentru acest termen reprezintă un interes major pentru obținerea celor mai bune rezultate.

Pentru aproximarea funcționalei de schimb-corelare s-au încercat mai multe aproximații, precum aproximația densității locale care consideră un gaz uniform de electroni și consideră doar valoarea locală a densității pentru fiecare electron, aproximația gradientului generalizat care ține cont și de variația spațială a densității. Partea care poate fi calculată exact în termenul de schimb în teoria Hartree–Fock poate fi îmbinată cu energia de schimb-corelare obținută prin alte metode, rezultând în aproximații hibride care au condus la obținerea unor rezultate mult mai bune decât alte metode individuale. O funcțională hibridă des folosită este numită *B3LYP* de forma [Becke1993, Lee1988, Vosko1980, Stephens1994]:

$$E_{xc}^{B3LYP} = aE_x^{SLATER} + (a - 1)E_x^{LSD} + bE_c^B + (1 - c)E_c^{LSD} \quad (1.4)$$

care reprezintă o combinație între aproximația de gradient generalizat E^B (Becke 88) pentru partea de schimb a funcționalei, iar pentru partea de corelare folosește funcționala Lee, Yang, Parr și o aproximație a densității de spin local VWN, ponderate de parametrii $a = 0.20$, $b = 0.72$ și $c = 0.81$. Succesul acestei funcționale se datorează abilității ei de a prezice numeroase proprietăți ale moleculelor, precum geometria, spectrele UV-Vis, Raman sau de absorbție electronică și de fluorescență, polarizabilități sau momente de dipol, etc. Alte exemple de funcționale hibride sunt *PBE0* (Perdew–Burke–Ernzerhof) care conține 1/4 din energia exactă de schimb Hartree–Fock, sau funcționala *HSE* (Heyd–Scuseria–Ernzerhof) [Heyd2004, Heyd2006] care folosește un potențial Coulomb ecranat de o funcție de eroare pentru o eficiență computațională crescută, în special pentru sisteme metalice.

1.2 Seturi de bază

Funcțiile de undă corespunzătoare orbitalilor moleculari Φ_i pot fi scrise ca o combinație liniară a mai multor orbitali monoelectronici atomici φ_μ :

$$\Phi_i = \sum_{\mu=1}^k c_{\mu i} \varphi_{\mu} \quad (1.5)$$

unde $c_{\mu i}$ reprezintă contribuția orbitalul φ_{μ} la descrierea orbitalului molecular Φ_i .

Orbitalii monoelectronici folosiți alcătuiesc un set de bază care poate fi folosit pentru a descrie orice orbital molecular. Setul de bază poate fi alcătuit din funcțiile de undă ale atomilor care compun molecula (LCAO-MO - linear combination of atomic orbitals), sau poate fi alcătuit dintr-un set de orbitali oarecare (LCBF-MO - linear combination of basis functions). Tipurile principale de orbitali atomici folosiți într-un astfel de set de bază sunt orbitalii de tip Slater (STO), care însă prezintă unele dezavantaje, și cele de tip Gaussian (GTO). Orbitalii de tip gaussian au forma generală:

$$g(\alpha, l, m, n, f; r, \theta, \varphi) = NY_{lm}(\theta, \varphi) \cdot r^{2n-2-l} e^{-\alpha f^2 r^2} \quad (1.6)$$

Funcțiile GTO au avantajul de a fi convenabile în calculele numerice însă pot fi aduse la o formă care oferă rezultate mai corecte, prin combinații liniare de funcții gaussiene Φ_p^{GF} , numită funcție Gaussiană contractată (CGF):

$$\Phi_{\mu}^{CGF}(r - R_A) = \sum_{p=1}^L d_{p\mu} \Phi_p^{GF}(\alpha_{p\mu}, r - R_A) \quad (1.7)$$

unde L este lungimea contracției, iar $d_{p\mu}$ sunt coeficienții contracției.

Aceste funcții pot fi în continuare îmbunătățite prin adăugarea unor termeni care să țină cont de distorsionarea (polarizarea) orbitalilor electronici centrați pe un nucleu datorată prezenței celorlalte nuclee, ceea ce se face prin adăugarea unor funcții de undă de moment cinetic mai mare, sau termeni care să țină cont de împrăștierea pe întreaga moleculă a densității electronice atunci când molecula se află în stare excitată sau de ion.

Pentru aplicații practice, cele mai folosite seturi de bază la ora actuală sunt așa numitele seturi de bază de tip Pople, cu notația generală:

$$k - nlm + +G(idpf, jpqd)$$

unde:

k este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor de miez.

n este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor interni de valență.

l este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor mediani de

valență.

m este numărul de primitive GTO folosite pentru expandarea orbitalilor de valență cei mai exteriori.

+ semnifică faptul că a fost adăugat 1 set de funcții difuze de tip P (SP) pe atomii grei.

++ semnifică faptul că a fost adăugat 1 set de funcții difuze de tip P (SP) pe atomii grei și o funcție difuză de tip s pe atomii H.

idpf semnifică faptul că i seturi de orbitali de tip d și p seturi de orbitali de tip f sunt adăugați pe atomii grei ca și funcții de polarizare

jpqd semnifică faptul că j seturi de orbitali de tip p și q seturi de orbitali de tip d sunt adăugați pe atomii de hidrogen ca și funcții de polarizare

Unul dintre cele mai folosite seturi de bază este setul 6-31G(d), cunoscut și ca "set de bază spectroscopic" deoarece este capabil să furnizeze date spectroscopice calculate de acuratețe ridicată, la un necesar rezonabil de resurse computaționale.

1.3 Calculul spectrelor electronice în formalismul TD-DFT

Teoria DFT este folosită în calculul structurilor electronice ale atomilor sau moleculelor, însă este insuficientă pentru calcularea spectrelor rezultate din interacția cu lumina, motiv pentru care în acest scop folosim extensia sa dependentă de timp TD-DFT (Time-Dependent Density Functional Theory). Baza teoretică a acestui formalism este teorema Runge-Gross, care asigură o relație univocă între un potențial extern dependent de timp (lumina) aplicat moleculei și densitatea sa electronică dependentă de timp, în limita unei funcții aditive dependentă doar de timp al cărei efect este doar modificarea fazei funcției de undă lăsând însă densitatea neschimbată. Putem astfel calcula proprietățile fotofizice ale moleculei și simula spectre precum cele de absorbție, emisie, fluorescență.

Pentru modelarea stărilor excitate ale moleculei este necesar calculul energiilor din posibilele tranziții electronice și vibronice. Fiecare stare electronică are o geometrie

proprie pentru care energia sa este minimă, și totodată fiecare are propriile sale nivele vibraționale.

Notând cu GS (Ground State) și cu ES (Excited State) starea electronică fundamentală, respectiv starea excitată a moleculei, având fiecare minimele de energie la geometriile RGS respectiv RES putem defini anumite energii relevante precum:

Energia verticală de tranziție electronică, în care pornind din starea fundamentală considerăm că geometria sa nu se modifică după excitație, rămânând geometria optimă stării fundamentale:

$$E_{abs}^v = E_{ES}(R_{GS}) - E_{GS}(R_{GS}) \quad (1.8)$$

Energia adiabatică de absorbție, în care pornind din starea fundamentală considerăm că geometria sa în starea excitată este cea optimă stării excitate:

$$E_{abs}^{adiab} = E_{ES}(R_{ES}) - E_{GS}(R_{GS}) \quad (1.9)$$

Energia verticală de emisie, , în care pornind din starea excitată considerăm că geometria sa nu se modifică după relaxare, rămânând geometria optimă stării excitate:

$$E_{emi}^v = E_{ES}(R_{ES}) - E_{GS}(R_{ES}) \quad (1.10)$$

Energia de tranziție 0-0, corespunzătoare tranziției de pe primul nivel vibrațional al unei stări pe primul nivel vibrațional al celeilalte stări.

Pentru a găsi geometriile corespunzătoare minimelor energetice ale stărilor electronice moleculare suntem nevoiți să optimizăm parametrii moleculei pentru a găsi configurația stabilă de energie minimă, atât a stării fundamentale cât și a stării excitate, în solventul considerat. În acest scop trebuie ales cu grijă setul de bază care să ofere rezultate satisfăcătoare, preferabil un set care să conțină și funcții difuze sau de polarizare.

1.4 Calculul spectrelor electronice cu structură vibronică

Proprietățile fotofizice ale moleculei descriu modul în care aceasta interacționează cu un câmp electromagnetic extern (lumina), și în consecință determină forma spectrelor care vor fi obținute prin iradierea moleculei cu radiații

electromagnetice în domeniul UV-Vis. Pot fi astfel calculați parametrii precum energiile necesare excitării moleculei sau energiile fotonilor emiși de moleculă prin fluorescență, din care rezultă deplasări Stokes, timpi radiativi de fluorescență sau geometria moleculei în stare excitată. Pentru un bun acord între spectrele computaționale și cele obținute pe cale experimentală sunt luate în considerare atât tranzițiile electronice ale moleculei cât și cele pe nivele vibraționale, cuplajul dintre ele realizându-se prin coeficienții Franck-Condon.

Interacțiunea dintre o moleculă și un câmp electromagnetic extern poate induce în moleculă o tranziție electronică UV-Vis de la o stare inițială i la o stare finală f . Probabilitatea unei astfel de tranziții este dată de regula lui Fermi:

$$D_{if} = \frac{2\pi}{\hbar} \langle \Psi_i | \vec{\mu}_e \vec{E}_0 | \Psi_f \rangle^2 \rho(E_f) = \frac{2\pi E_0^2}{\hbar} \langle \Psi_i | \vec{\mu}_e \vec{e} | \Psi_f \rangle^2 \rho(E_f) \quad (1.11)$$

unde tranziția se face între stările cu funcțiile de undă Ψ_i și Ψ_f de energii E_i și E_f , $\vec{\mu}_e$ este momentul de dipol electric al moleculei, \vec{e} este direcția câmpului magnetic iar $\rho(E_f)$ este densitatea care descrie distribuția stărilor finale.

Ținând cont de faptul că la o anumită frecvență ω poate fi absorbită sau emisă doar o cantă de energie $\hbar\omega$, distribuția stărilor finale va avea valoarea 0 pentru toate energiile care nu îndeplinesc acest criteriu. De asemenea putem scrie diferența de energie dintre cele două stări $E_f - E_i$ în funcție de diferența dintre minimele suprafețelor energetice ΔE corespunzătoare stărilor, și diferența dintre energiile vibraționale pe aceste stări $|\varepsilon_f - \varepsilon_i|$. Obținem astfel o funcție de distribuție a stărilor finale de forma unei funcții Dirac:

$$\delta(\Delta E + |\varepsilon_f - \varepsilon_i| - \hbar\omega)$$

Obținem astfel secțiunile eficace (rata de absorbție sau emisie a unui foton pe unitatea de energie radiantă) pentru un singur foton de o anumită frecvență de forma:

$$\sigma_{abs}(\omega) = \frac{4\pi^2}{3c} \cdot \omega \cdot \sum_i \rho_i \sum_f |\langle \Psi_i | \mu | \Psi_f \rangle|^2 \delta(E_f - E_i - \hbar\omega) \quad (1.12)$$

$$\sigma(\omega)_{emi} = \frac{4\pi^2}{3\hbar c^3} \cdot \omega^3 \cdot \sum_i \rho_i \sum_f |\langle \Psi_i | \mu | \Psi_f \rangle|^2 \delta(E_f - E_i + \hbar\omega) \quad (1.13)$$

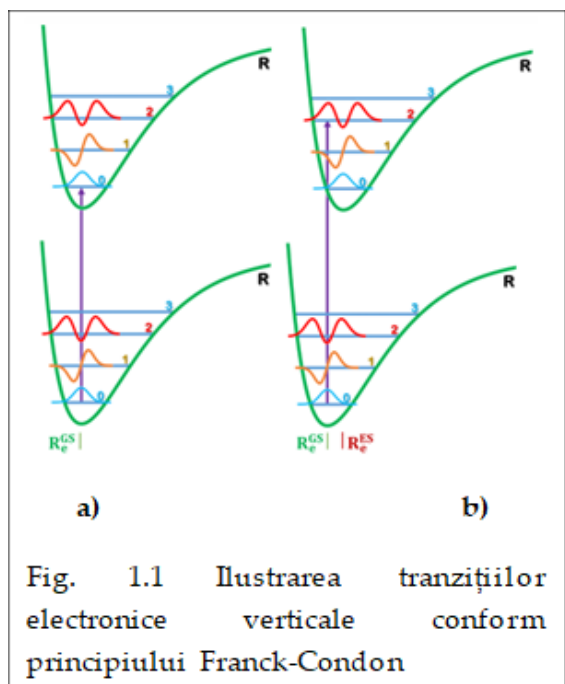
Factorul 1/3 este legat de faptul că orientarea moleculei pe oricare din cele trei direcții Carteziente se face cu aceeași probabilitate.

Pentru evaluarea integralei momentului de dipol al tranziției:

$$\langle \Psi_i | \vec{\mu}_e \vec{e} | \Psi_f \rangle$$

folosim principiul Franck-Condon conform căruia o tranziție electronică moleculară

este semnificativ mai rapidă decât deplasarea nucleelor, astfel încât acestea pot fi considerate ca fiind fixe. Ilustrarea acestui principiu este făcută în Fig. 1.1.



Descompunem funcțiile de undă inițială și finală într-o parte nucleară Ψ_n și una electronică Ψ_e , iar pe cea nucleară o descompunem mai departe într-o parte vibrațională Ψ_v și o parte rotațională care poate fi neglijată, obținând forma finală pentru integrala momentului de dipol de tranziție:

$$\langle \Psi_i | \mu | \Psi_f \rangle = \langle \Psi_n^i | \mu_{if} | \Psi_n^f \rangle \quad (1.14)$$

unde:

$$\mu_{if} = \langle \Psi_e^i | \mu_e | \Psi_e^f \rangle$$

Deoarece nu există o formă analitică a termenului μ_{if} folosim aproximația Franck-Condon în care considerăm termenul ca fiind aproximativ egal cu primul termen din dezvoltarea sa în serie Taylor, care corespunde geometriei de echilibru a stării finale. Această abordare poate însă furniza rezultate eronate în cazul unui dipol slab, astfel încât folosim în schimb aproximația Herzberg-Teller care ține cont și de următorul termen din serie corespunzător variației liniare a momentului de dipol în funcție de variația geometriei moleculei în starea finală în coordonate normale convenabile Q^f . Ajungem la forma integralei momentului de dipol:

$$\langle \Psi_i | \mu | \Psi_f \rangle = \mu_{if}(Q_0^f) \langle \Psi_v^i | \Psi_v^f \rangle + \sum_{k=1}^N \left(\frac{\partial \mu_{if}}{\partial q_k^f} \right)_0 \langle \Psi_v^i | q_k^f | \Psi_v^f \rangle \quad (1.15)$$

care redă suprapunerea funcțiilor vibraționale din starea inițială și cea finală.

În funcție de deplasarea valorii minime a energiei stării finale față cea inițială va exista o mai bună suprapunere între anumite funcții vibraționale. Astfel, în lipsa unei astfel de deplasări vom observa cum cea mai intensă bandă spectrală datorată mișcării de vibrație va corespunde tranziției dintre nivelele vibraționale 0 - 0. Dacă minimum suprafeței energetice se deplasează atunci este posibil ca cea mai intensă bandă să corespundă tranziției de pe nivelul vibrațional cu $v = 0$ pe un alt nivel vibrațional.

Capitolul 2 Detalii experimentale

O probă de Tirapazamină (3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4 dioxide) de puritate mai mare de 98% (testată folosind tehnica HPLC) a fost achiziționată și păstrată într-un mediu rece și întunecat. O cantitate din probă a fost extrasă și cântărită folosind o balanță analitică, iar folosind o micropipetă au fost preparate mai multe soluții de diferite concentrații între $10^{-5} M$ și $5 \cdot 10^{-4} M$ folosind solventul dimetilsulfoxid (DMSO).

Pentru realizarea spectrelor experimentale de absorbție UV-Vis am folosit spectrometrul Perkin Elmer Lambda 35. Am introdus soluțiile de concentrații diferite în cuvete de cuarț iar proba a fost iradiată cu lumină în domeniul ultraviolet și cel vizibil. O lampă cu deuteriu a fost folosită pentru a acoperi intervalul ultraviolet cu lungimea de undă între $185 - 360 \text{ nm}$, complementat de o lampă cu tungsten pentru domeniul vizibil de $340 - 1100 \text{ nm}$. Am efectuat o măsurătoare de referință pe o probă de DMSO pur, iar apoi am măsurat absorbția rezultată în urma iradierii soluțiilor. Pentru lungimi de undă mai mari de 585 nm am obținut valori negative ale absorbției pe care le-am considerat erori.

Pentru spectrele de emisie proba a fost iradiată cu lumină albastră de 470 nm , care este cea mai apropiată lungime de undă de maximumul obținut din spectrul de absorbție. Lumina provine de la led AvaLight-HPLED cu o putere de 3.4 mW , direcționată pe probă printr-un cablu de fibră optică. Lumina rezultantă în urma fluorescenței a fost captată de un spectrometru AvaSpec-HS2048XL-EVO care înregistrează lumină în domeniul $200 - 1160 \text{ nm}$. Am observat cum probele de concentrații mari au rezultat în spectre lipsite de peak-uri discernabile, astfel încât a fost necesară folosirea probelor de concentrații mai mici.

Pentru spectrele de excitație am folosit un spectrometru Perkin Elmer PL 55 folosind diferite lungimi de undă pentru lumina incidentă pe probă în timp ce

lungimea de undă a monocromatorului care captează lumina emisă de probă este menținută la o valoare constantă.

Pentru spectrele Raman, în plus față de soluțiile de TPZ și DMSO am realizat spectre și direct pe TPZ pur sub formă de pudră, și în amestec de TPZ și soluție coloidală cu particule de argint pentru a încerca amplificarea semnalului prin interacțiunea dintre moleculă și suprafața nanoparticulelor. Spectrele au fost realizate folosind un spectrometru Renishaw inVia Reflex. Probele au fost puse pe o lamelă acoperită în folie de aluminiu și au fost aliniată în calea laserului folosind o cameră cu un obiectiv de x20 și o apertură numerică de 0.4 îndreptată înspre proba investigată. Iradierea a fost făcută cu un laser Cobolt DPSS pentru lungimea de undă de 532 nm, un laser cu He-Ne pentru cea de 633 nm și cu o diodă pentru cea de 785 nm. Am folosit diferiți timpi de achiziție și puteri ale laserului încercând să obținem un spectru cât mai relevant, având grijă ca puterea laserului să nu depășească o valoare care să distrugă proba.

Capitolul 3 Rezultate și discuții

În acest capitol vom prezenta rezultatele experimentale și computaționale obținute pentru molecule de tirapazamină, corelarea celor două tipuri de rezultate și interpretarea acestora. Astfel, vor fi discutate proprietăți ale moleculei TPZ legate de:

- energia de ionizare a moleculei, determinată prin calcul bazat pe 4 aproximații diferite
- modurile normale de vibrație, în particular spectrul Raman al moleculei
- fotofizica acestei molecule, în particular spectrul de absorbție electronică, spectrul de emisie, structura vibronică a celor două spectre, precum și timpul radiativ de fluorescență

Menționăm că în literatura de specialitate nu am găsit date experimentale nici pentru energia de ionizare a moleculei, nici pentru spectrul IR sau Raman. La fel, în cazul spectrelor UV-Vis și de fluorescență nu am găsit nici date calculate, nici experimentale pentru structura vibronică a acestora.

3.1 Calculul energiilor de ionizare pentru molecula TPZ

Am calculat energia de ionizare pentru molecula TPZ folosind următoarele metode:

1. aproximația bazată pe teoremă lui Koopmans (TK)
2. aproximația Δ SCF
3. aproximațiile EPT și OVGf

Conform teoremei lui Koopmans [Koopmans1934], energia de ionizare a unui sistem electronic molecular dintr-un anumit orbital din care a fost emis electronul este egală cu opusul energiei respectivului orbital molecular:

$$I_i = -\varepsilon_i \quad (3.1)$$

unde ε_i este energia orbitalului i .

În consecință, pentru estimarea energiei (verticale) de ionizare pe baza teoremei Koopmans este necesar un calcul "single point" (SP) pe geometria optimizată a moleculei, calcul din care rezultă, printre altele, energiile orbitalilor moleculari.

Pentru molecula TPZ, calculată la nivelul de energie B3LYP/6-311+G(2df,p) energia orbitalului HOMO este -0.21647 a.u. (vezi **Fig. 3.1**), ceea ce înseamnă o energie de ionizare calculată pe Baza teoremei Koopmans de 5.89 eV (1 a.u. = 27.2114 eV).

```
The electronic state is 1-A.
Alpha occ. eigenvalues -- -19.14001 -19.11049 -14.52377 -14.46086 -14.37714
Alpha occ. eigenvalues -- -14.36169 -10.31683 -10.25968 -10.25447 -10.21255
Alpha occ. eigenvalues -- -10.21215 -10.20700 -10.20631 -1.18523 -1.12418
Alpha occ. eigenvalues -- -1.01431 -0.95785 -0.91440 -0.86609 -0.82875
Alpha occ. eigenvalues -- -0.79087 -0.73042 -0.71004 -0.65654 -0.62960
Alpha occ. eigenvalues -- -0.59175 -0.56075 -0.54334 -0.54023 -0.52379
Alpha occ. eigenvalues -- -0.49832 -0.49186 -0.48634 -0.46874 -0.46506
Alpha occ. eigenvalues -- -0.41693 -0.41332 -0.38929 -0.37079 -0.34733
Alpha occ. eigenvalues -- -0.30510 -0.29995 -0.29797 -0.28801 -0.27593
Alpha occ. eigenvalues -- -0.21647
```

Fig. 3.1 Extras din fișierul de output al programului Gaussian pentru calculul single point al acionului moleculei TPZ pe geometria moleculei neutre

Calculul SP MP2/6-311+G(d,p) efectuat pe geometria optimizată la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2df,p) furnizează o valoare pentru energia de ionizare a moleculei de 8.32 eV, iar calculul SP MP2/6-311+G(d,p)//B3LYP/6-311+G(2df,p) estimează aceeași energie la 8.285 eV.

Menționăm ca un nivel de teorie de forma MP2/6-311+G(d,p)//B3LYP/6-311+G(2df,p) înseamnă un calcul SP la nivelul MP2/6-311+G(d,p) pe geometria optimizată la nivelul B3LYP/6-311+G(2df,p).

Potențialul vertical de ionizare, pentru care nivelurile energetice electronice ale cationilor diferă de nivelurile energetice electronice ale moleculei neutre se obține și pe baza aproximației Δ SCF. Menționăm că pentru obținerea acestei valori se face un calcul SP pe cationul moleculei, dar geometria cationului este neoptimizată, identică moleculei neutre. Matematic,

$$EI_v = E_{cation}^{neutru} - E_{neutru}^{neutru} \quad (3.2)$$

unde indicii superiori din membrul drept al ecuației precedente semnifică geometria optimizată a moleculei pe care se face calculul energiei sistemului, iar indicii inferiori

semnifică sistemul calculat (molecula neutră sau cationul acesteia). Valoarea energiei de ionizare a moleculei TPZ în această aproximație este de 7.64 eV.

O altă modalitate de calcul a energiei de ionizare a moleculelor se bazează pe teoria propagatorului de electroni (EPT – Electron Propagator Theory) [Ortiz2013]. În cazul de față am folosit două aproximații pentru calculul energiilor de ionizare bazate pe teoria EPT: aproximația OVGF (Outer Valence Green's Functions) [Niessen1984] și aproximația EPT3 (EPT Partial Third Order) [Zakrzewski2014, Martins2019].

Teoria EPT descrie comportamentul electronilor în atomi și molecule [Martins2019], folosind conceptul de funcții Green și ecuației Dyson [Dyson1949, Ortiz1999, Ortiz2020, Pomogaev2021] și de propagator al unui electron într-un sistem cuantic. Calculul propagatorilor electronici [Leeuwen2023] a fost ușurat de folosirea funcțiilor Green [Hedin1965, Kadanoff1962].

Propagatorul electronic se obține prin rezolvarea ecuației Dyson, care include efectele interacțiunilor electron-electron și de corelare a acestora. Analiza polilor propagatorului permite determinarea proprietăților precum energii de ionizare, afinități electronice sau energii de excitare electronică.

Teoria funcțiilor Green de valență (OVGF) este o metodă teoretică folosită pentru studiul structurii electronice și proprietăților moleculelor, care ia în considerare electronii de valență care sunt responsabili, în cea mai mare măsură, de formarea legăturilor chimice și de proprietățile optice ale sistemelor moleculare. Funcțiile Green descriu răspunsul unui sistem cuantic la o perturbație externă și oferă informații despre probabilitatea de a găsi un electron într-o stare particulară dată dacă este cunoscută starea sa inițială și, de asemenea, interacțiunile dintre respectivul electron și cu ceilalți electroni din sistemul investigat. Un calcul de tip OVGF implică rezolvarea ecuației Dyson [24, 25] pentru funcția Green a unei particule.

Un exemplu de fișier de input pentru un calcul de tip EPT/OVGF este dat în Fig.3.2.

```

%rwf=/storage/vchis/TPZ_Ovgf_gas.rwf
%Nosave
%chk=/storage/vchis/TPZ_Ovgf_gas.chk
%nprocshared=30
%mem=30GB
#p ept=ovgf/6-311+g(2df,p) tran=iabc iop(9/11=30100)

TPZ OVGf gas//pe geom B3LYP MO 32 34

0 1
C          -2.62243600   -1.38652800   -0.00000300
C          -1.29207100   -1.72841400    0.00000100
C          -0.32726300   -0.70832000    0.00000400
C          -0.73431100    0.63848500    0.00000500
C          -2.09628100    0.97070400   -0.00000200
C          -3.02951500   -0.03682800   -0.00000500
C          1.88158500    0.04025700   -0.00000200
H          -3.37200400   -2.16825600   -0.00000600
H          -0.94774300   -2.75233900    0.00000100
H          -2.36902900    2.01593600   -0.00000200
H          -4.08397400    0.20673500   -0.00000900
N          3.18253700   -0.27828100   -0.00001500
H          3.87745200    0.44617400    0.00001700
H          3.40645700   -1.26276200    0.00001300
N          1.01476000   -1.00506400    0.00000500
N          1.52150300    1.32883400    0.00000200
N          0.24419200    1.64134200    0.00001400
O          -0.08570500    2.84223100   -0.00001000
O          1.46941100   -2.22091000    0.00000500

32 34

```

Fig.3.2 Exemplu de fișier de input pentru calculul energiei de ionizare a moleculei TPZ pe baza aproximației EPT/OVGF

Rezultatele acestor calcule de tip EPT/OVGF sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Nivelurile de teorie folosite în aceste calcule diferă în calitatea setului de bază folosit. Concret, primul set de bază conține un singur set de orbitali de tip d și un singur set de orbitali de tip p ca și funcții de polarizare adăugate pe atomii grei, respectiv pe atomii ușori.

Tabelul 3.1. Energii de ionizare calculate pentru molecula TPZ folosind aproximațiile OVGF și EPT3, la două niveluri de teorie.

Nivelul de teorie	Aproximația				
	TK	OVGF	P2	P3	P3+
MP2/6-311+G(d,p)// B3LYP/6-311+G(2df,p)	8.320	7.589	6.970	7.883	7.718
MP2/6-311+G(2df,p)// B3LYP/6-311+G(2df,p)	8.285	7.691	7.149	8.080	7.907

Pentru cel de-al doilea set de bază am folosit ca funcții de polarizare pe atomii grei două seturi de orbitali de tip d și un set de orbitali de tip f ca și funcții de polarizare pentru atomii grei ai moleculei și un set de orbitali de tip p ca funcții de polarizare pentru atomii de hidrogen.

În lipsa datelor experimentale este dificil de estimat care dintre aproximațiile folosite furnizează cea mai corectă valoare pentru energia de ionizare a moleculei TPZ. Valoarea calculată pentru această mărime a fost raportată în ref. [Chong2014]. Folosind o variantă a metodei Δ SCF cu funcțională PBE0 și setul de bază et-pVQZ, în referința menționată mai sus s-a raportat o valoare de 7.700 eV, în acord cu valoarea obținută în această lucrare prin metoda Δ SCF la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2df,p). De asemenea, valoarea lui Chong este în acord cantitativ cu valoarea noastră (7.691 eV) obținută pe baza aproximației OVGF cu setul de bază 6-311+G(2df,p).

Remarcăm că valorile calculate pe baza aproximației TK sunt ambele mai mari de 8 eV, iar cele calculate pe baza aproximațiilor EPT/OVGF (în particular OVGF și P3⁺) sunt sistematic sub această valoare. Singura concluzie care poate fi extrasă de aici este că aproximația TK supraestimează energia de ionizare a moleculei TPZ.

Ca și concluzie a acestui capitol, valoarea calculată și propusă de noi pentru energia de ionizare a moleculei TPZ în gaz este de 7.691 eV. O îmbunătățire a acestei valori poate fi făcută, de exemplu, prin utilizarea unor metode bazate pe extrapolarea la setul de bază infinit.

3.2 Caracteristici vibraționale ale moleculei TPZ

În acest subcapitol prezentăm rezultatele experimentale referitoare la modurile de vibrație ale moleculei TPZ. Aceste rezultate sunt corelate cu rezultate computaționale cu scopul de a atribui modurile normale de vibrație și de a identifica cele mai intense benzi Raman, caracteristice acestei molecule.

Proba a fost achiziționată de la o sursă comercială și folosită ca atare, fără purificare. Spectrum Raman al moleculei TPZ a fost înregistrat la temperatura camerei pe o probă de pulbere, folosind spectrometrul Renishaw InVia Reflex, echipat cu un detector CCD RenCam. Pentru achiziția spectrelor am folosit ca surse de excitare liniile laser de 633 și 785 nm. Menționăm că utilizarea laserului de 532 nm a generat un background puternic de fluorescență deoarece molecula TPZ absoarbe puternic la lungimea de undă de 498 nm (vezi subcapitolul 3.3).

Spectrul experimental al moleculei este prezentat în Fig. 3.2.1. Pentru atribuirea modurilor normale de vibrație am calculat spectrum Raman al moleculei folosind atât aproximația armonică cât și aproximația anarmonică.

Aproximația anarmonică se bazează pe teoria perturbațiilor de ordin doi (second-order vibrational perturbation theory - VPT2) prezentată și exemplificată în referința [Barone2014].

Spectrul calculat al moleculei este prezentat în Fig. 3.2.2. Am separat spectrul calculat în diferite regiuni pentru a se putea observa detaliile acestuia, importante pentru discuția referitoare la atribuirea modurilor normale.

Menționăm că spectrul calculat conține benzile corespunzătoare modurilor fundamentale de vibrație dar și benzi datorate armonicelor modurilor fundamentale, precum și benzi de combinare între acestea.

În Tabelul 3.2.1 sunt prezentate valorile experimentale și calculate pentru numerele de undă de vibrație, împreună cu atribuirea modurilor normale ale TPZ.

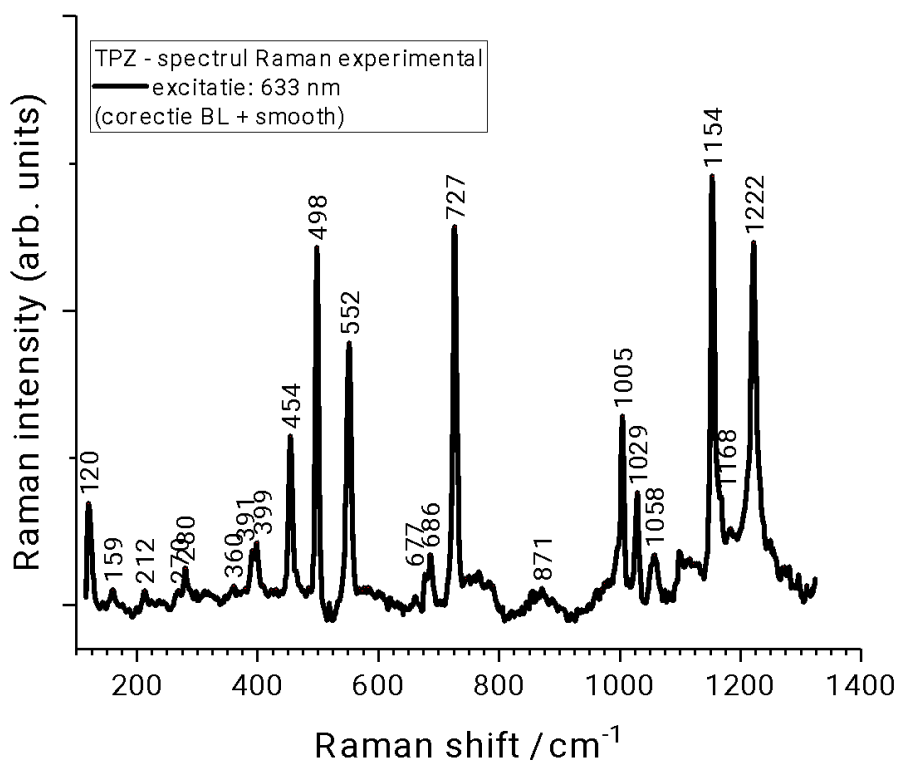


Fig. 3.2.1.a Spectrul Raman experimental al moleculei TPZ înregistrat la temperatura camerei pe o probă de pulbere, folosind linia de excitație laser 633 nm (domeniu spectral: 100 – 1400 cm⁻¹).

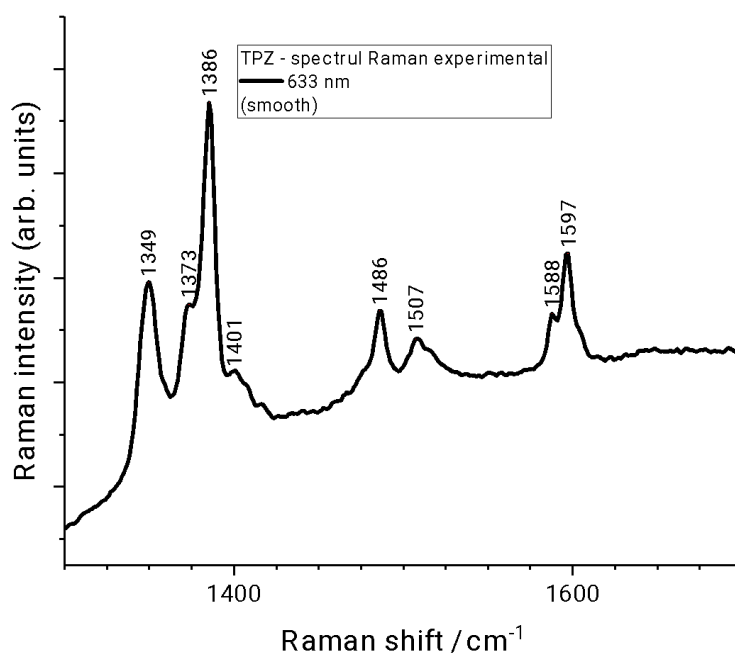


Fig. 3.2.1.b Spectrul Raman experimental al moleculei TPZ înregistrat la temperatura camerei pe o probă de pulbere, folosind linia de excitație laser 633 nm (domeniu spectral: 1300 – 1700 cm⁻¹).

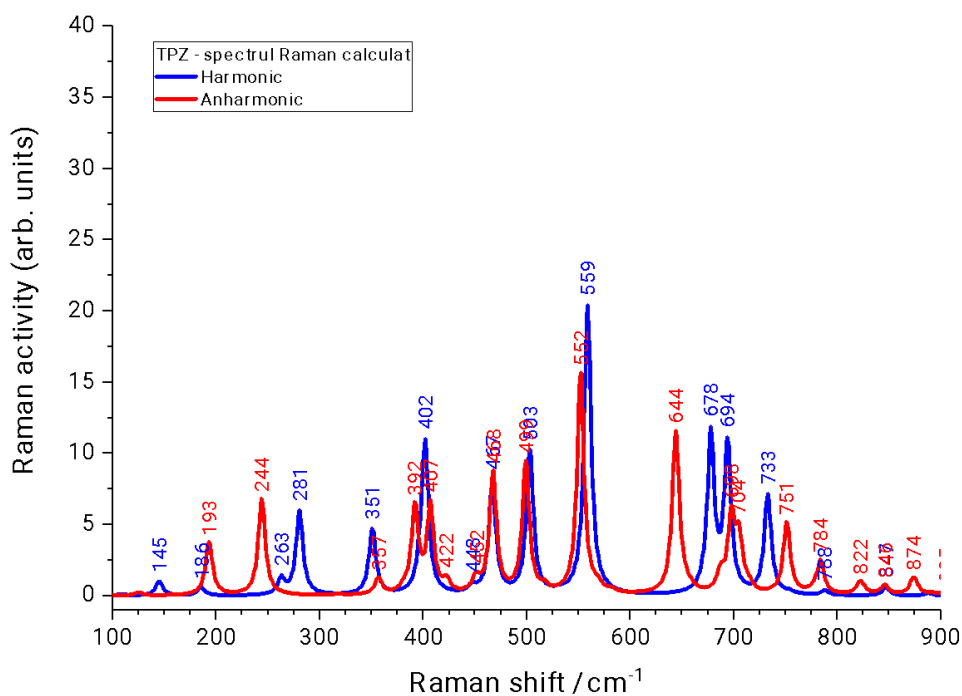


Fig. 3.2.2.a Spectrul Raman al moleculei TPZ calculat în gaz, în domeniu spectral 100 – 900 cm^{-1} , la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2df,p) în aproximația armonică (curba albastră) și în aproximația anarmonică (curba roșie).

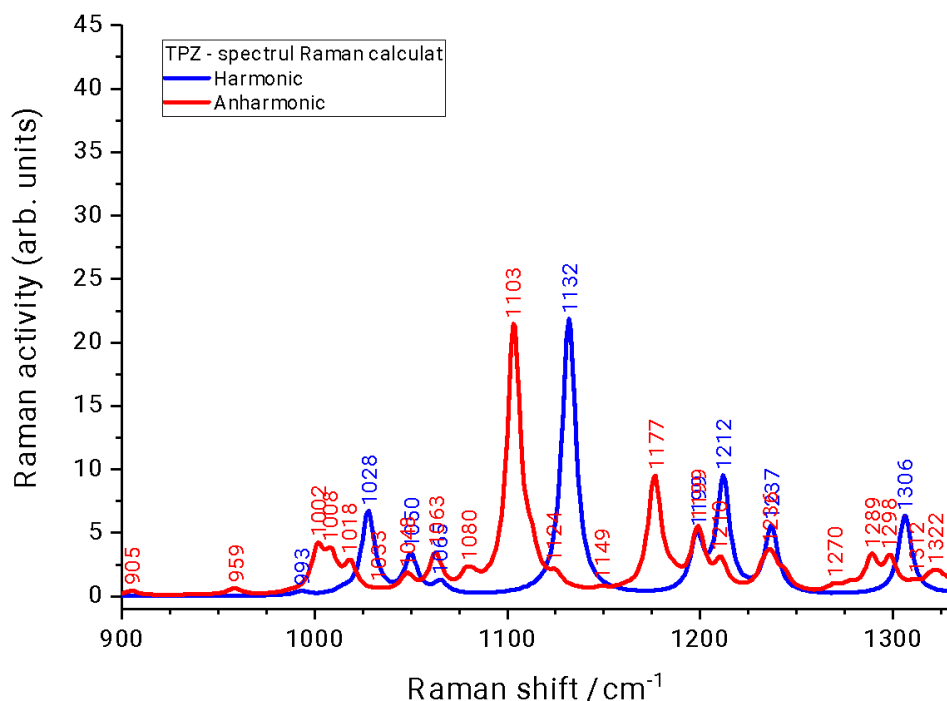


Fig. 3.2.2.b Spectrul Raman al moleculei TPZ calculat în gaz, în domeniu spectral 900 – 1330 cm^{-1} , la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2df,p) în aproximația armonică (curba albastră) și în aproximația anarmonică (curba roșie).

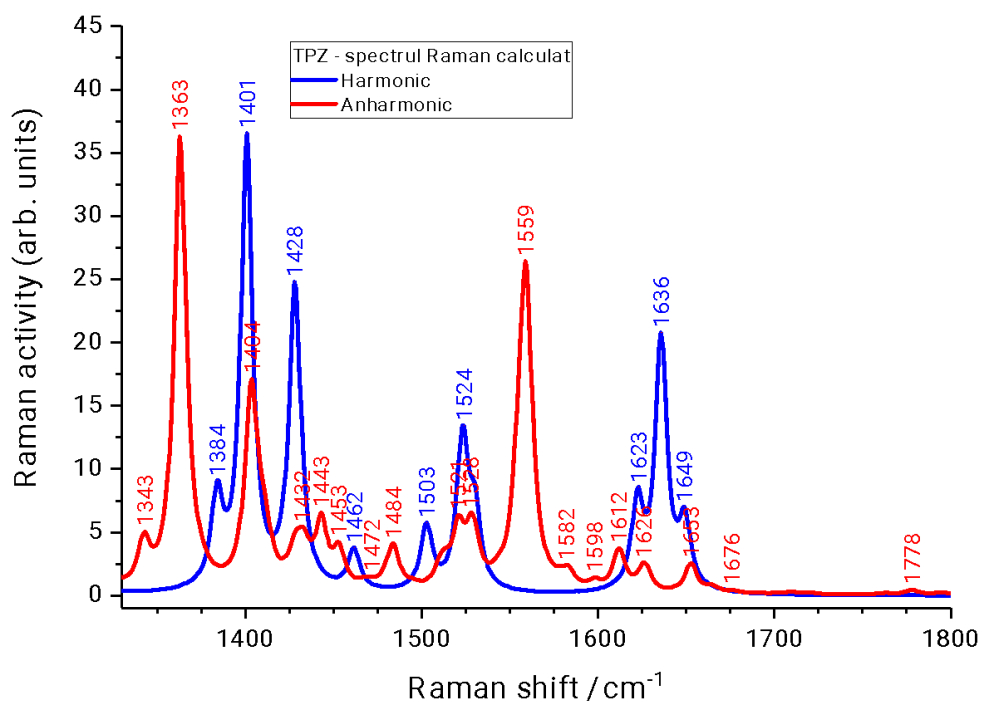


Fig. 3.2.2.c Spectrul Raman al moleculei TPZ calculat în gaz, în domeniul spectral 1330 – 1800 cm^{-1} , la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2df,p) în aproximația armonică (curba albastră) și în aproximația anarmonică (curba roșie).

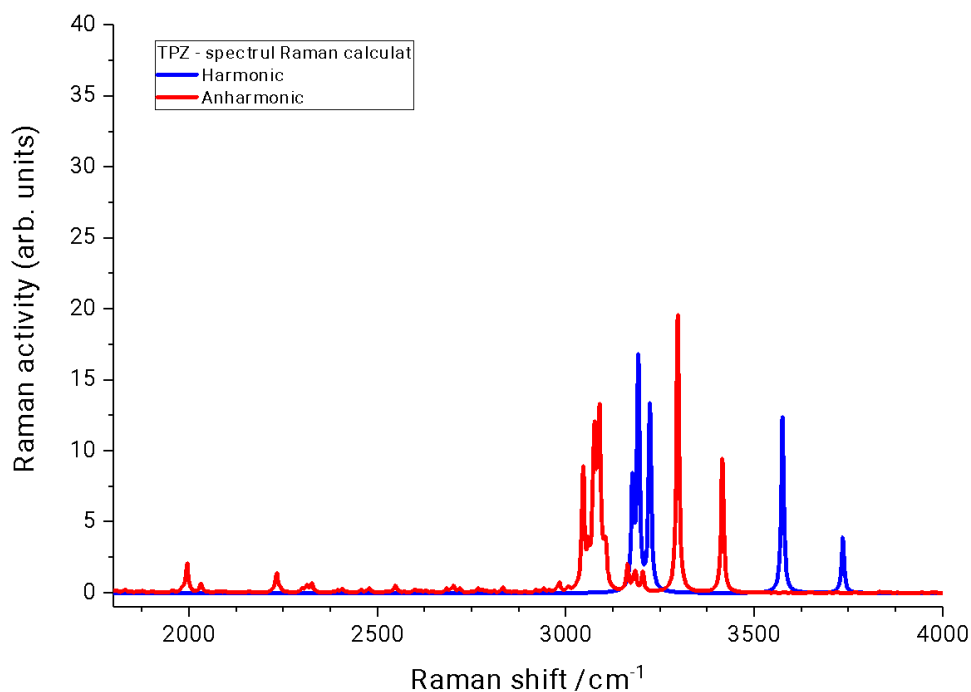


Fig. 3.2.2.d Spectrul Raman al moleculei TPZ calculat în gaz, în domeniul spectral 1800 – 40000 cm^{-1} , la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2df,p) în aproximația armonică (curba albastră) și în aproximația anarmonică (curba roșie).

Tabel 3.2.1. Deplasări Raman experimentale (linia laser de excitare 633 nm) și calculate (armonic și anarmonic) pentru molecula TPZ și atribuirea modurilor normale de vibrație ale acesteia

Mod	$\tilde{\nu}_{\text{Raman}}$	$\tilde{\nu}_{\text{armonic}}$	$\tilde{\nu}_{\text{anarmonic}}$	Atribuirea modurilor de vibrație
Q1	391	351	392	$\beta(\text{NO})_{\text{rB}} + \delta(\text{NC-NH}_2)$
Q2	399	402	407	$\beta(\text{NO})_{\text{rB}}$
Q3	454	467	468	deformare longitudinală
Q4	498	503	499	(ip. def.) _{rA,rB} în fază
Q5	552	559	552	(ip. def.) _{rA,rB} în antifază
Q6	686	678	644	$\delta(\text{CCC})_{\text{rA}} + \delta(\text{ONC}) + \delta(\text{NC-NH}_2)$
Q7	727	733	751	$\delta(\text{NNC})_{\text{rB}} + \delta(\text{CCC})_{\text{rA}}$
Q8	1005	1050	1002	$\beta(\text{CH}) + \delta(\text{NNC}) + \rho(\text{NH}_2)$
Q9	1029	1028	1008	breathing ring A
Q10	1058	1130	1063	$\beta(\text{CH}) + \rho(\text{NH}_2) + \delta(\text{CCC})_{\text{rA}}$
Q11	1154	1132	1103	$\beta(\text{CH}) + \nu(\text{CN})_{\text{interring}} + \delta(\text{CNO}) + \rho(\text{NH}_2)$
Q12	1168	1198	1177	$\delta(\text{CCC})_{\text{rA}} + \nu(\text{NN})_{\text{rB}} + \rho(\text{NH}_2)$
Q13	1222	1065	1236	$\delta(\text{CCC})_{\text{rA}} + \rho(\text{NH}_2)$
Q14	1349	1401	1363	$\nu(\text{CC})_{\text{rA}} + \nu(\text{CO})_{\text{rB}}$
Q15	1373	-	1374	Bandă de combinare (503+847)
Q16	1386	1428	1404	$\nu(\text{CC})_{\text{rA}} + \nu(\text{CN})_{\text{rB}} + \nu(\text{C=O})_{\text{rB}} + \rho(\text{NH}_2)$
Q17	1486	1530	1484	$\nu(\text{CC})_{\text{rA}} + \nu(\text{CN})_{\text{rB}} + \nu(\text{C=O})_{\text{rB}}$
Q18	1588	1623	1583	$\nu(\text{CC})_{\text{rA}} + \nu(\text{C-NH}_2) + \beta(\text{NH}_2)$
Q19	1597	1636	1559	$\beta(\text{NH}_2) + \nu(\text{C-NH}_2) + \nu(\text{CC})_{\text{rA}}$
Q20	1605	1649	1626	$\nu(\text{CC})_{\text{rA}} + \nu(\text{C-NH}_2) + \beta(\text{NH}_2)$
<p>ν – stretch, β – in plane bending, δ – trigonal bending, ρ – rocking rA – inelul benzenic, rB – inelul heterociclic, ip. – în plan, def. - deformation</p>				

Pentru atribuirea modurilor normale de vibrație am luat în considerare diferența între valorile anarmonice și valorile experimentale, dar și corespondența dintre intensitățile relative ale benzilor experimentale și ale celor calculate. În cazurile în care valorile anarmonice calculate diferă substanțial de cele experimentale am luat în considerare valorile armonice pentru atribuirea modurilor normale. Menționăm că nu am folosit factori de scalare nici pentru valorile armonice nici pentru cele anarmonice ale frecvențelor calculate.

În Tabelul 3.2.1 am marcat cu galben cazurile în care s-au observat cele mai mari diferențe în valorile experimentale ale deplasărilor Raman și valorile calculate anarmonic.

Nu vom discuta toate modurile de vibrație include în Tabelul 3.2.1 ci vom prezenta câteva cazuri de benzi care sunt caracteristice moleculei TPZ, precum și cazurile în care aproximația armonică furnizează rezultate calculate mai bune decât aproximația anarmonică.

În primul rând, tripletul de benzi centrat la 1597 cm^{-1} este reprodus foarte bine, din punct de vedere al intensităților relative, de grupul de benzi situate între $1623 - 1649\text{ cm}^{-1}$ (vezi Fig. 3.2.2c). Conform datelor din Tabelul 3.2.1, aproximația anarmonică prezice cele 3 benzi la valorile 1583 , 1559 și 1626 cm^{-1} . Banda centrală din acest grup, care este și cea mai intensă, este reprodusă cu o eroare de 38 cm^{-1} față de valoarea experimentală de la 1597 cm^{-1} , atribuită unui mod de vibrație complex, $\beta(\text{NH}_2)+\nu(\text{C}-\text{NH}_2)+\nu(\text{CC})_{rA}$, cu contribuție majoritară de la vibrația $\beta(\text{NH}_2)$. Pentru celelalte două benzi din acest grup valorile calculate pentru numerele de undă în aproximația anarmonică sunt în mult mai bună concordanță cu valorile experimentale.

Explicăm această discrepanță pe baza faptului că grupul NH_2 este planarizat ca urmare a optimizării geometriei la nivel DFT, ceea ce produce o anarmonicitate mărită pentru acest mod. O posibilitate de a corecta diferența observată constă în folosirea unei metode post-Hartree-Fock pentru optimizarea geometriei moleculei și calculul spectrului anarmonic. Un astfel de calcul necesită resurse computaționale mult mai mari decât calculul DFT, dar acesta rămâne un obiectiv pentru studii viitoare.

Un alt caz în care aproximația anarmonică furnizează rezultate mai slabe decât cea armonică este cel corespunzător benzii experimentale observată la 1154 cm^{-1} . Banda experimentală este intensă și este atribuită modului de vibrație complex care implică o vibrație de stretch inter-inele, dar și cu contribuție de la vibrația $\delta(\text{CNO})$ și $\rho(\text{NH}_2)$. Ambele aproximații prezic acest mod normal ca fiind cel mai intens în această zonă spectrală, acest fiind și motivul pentru care am asociat acestei benzi valorile calculate de 1132 cm^{-1} și 1103 cm^{-1} pentru cazul armonic, respectiv anarmonic.

Aproximația anarmonică furnizează, pe lângă valorile numerelor de undă fundamentale și valorile armonicelor acestora sau a benzilor de combinare. Un exemplu de astfel de bandă pare a fi cea observată în spectrul experimental la 1373 cm^{-1} . Conform datelor calculate această bandă este una de combinare între modurile fundamentale cu valorile armonice ale deplasărilor Raman calculate la 503 și 847 cm^{-1} . Intensitatea calculată a acestei benzi este similară cu cea obținută pentru modul fundamental 30, cu deplasarea Raman calculată anarmonic la 1063 cm^{-1} , iar în aproximația armonică la 1131 cm^{-1} .

Menționăm că în ciuda cazurilor în care aproximația anarmonică furnizează rezultate mai slabe decât aproximația armonică, pentru întregul set de valori calculate, eroarea absolută medie în această aproximație este de 15.3 cm^{-1} , în timp ce pentru aproximația armonică aceeași eroare este de 35.0 cm^{-1} .

Recomandarea noastră este ca aproximația anarmonică să fie folosită când este posibil (pentru molecule de dimensiuni rezonabile și în funcție de resursele computaționale existente), iar atribuirea modurilor de vibrație să fie făcută ținând cont și de valorile calculate în aproximația armonică.

Menționăm de asemenea că nu am găsit în literatura de specialitate spectrul Raman sau IR experimental pentru TPZ. Pe de altă parte, există un studiu computațional din anul 2014 [Chong2014], studiu efectuat pe baza aproximației armonice. Chiar dacă nivelurile de teorie sunt diferite între studiul menționat și studiul nostru cu aproximația armonică, rezultatele sunt comparabile.

În studiul amintit mai sus, autorul a menționat "*Hence, we expect the predicted vibrational spectrum of TPZ in Table 8 may be useful in interpretation of the experimental one when it is recorded*" [Chong2014].

În consecință, rezultatele raportate în acest subcapitol sunt originale, aduc informații noi atât prin spectrul experimental raportat cât și prin spectrul calculat în aproximația anarmonică și pot fi utile pentru proiectarea unor noi medicamente anticancer cu structuri similare.

3.3 Caracteristici fotofizice ale moleculei TPZ

3.3.1 Modificări structurale ale moleculei TPZ

Spre deosebire de proprietățile vibraționale ale moleculei TPZ cele fotofizice au fost investigate de către mai mulți autori de-a lungul timpului. Totuși, în literatura de specialitate nu există date referitoare la geometria moleculei în stare excitată.

În Fig. 3.3.1 sunt prezentate geometriile optimizate ale moleculei TPZ în gaz și în apă pentru starea fundamentală a acesteia și geometria optimizată în apă pentru starea excitată.

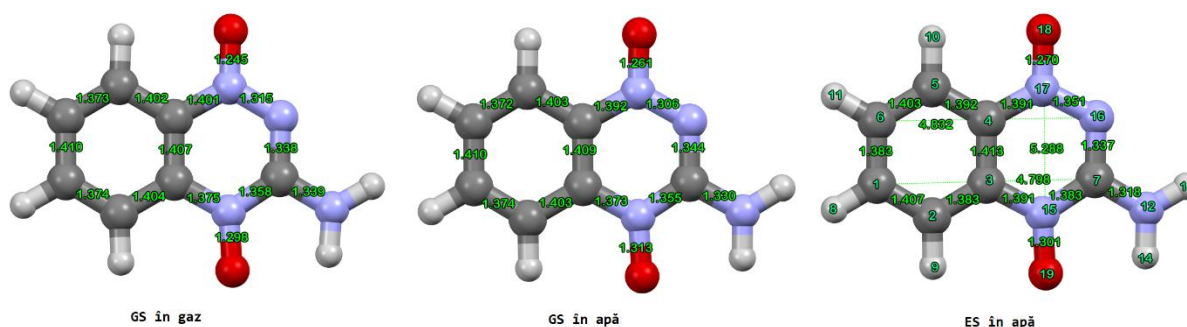


Fig. 3.3.1. Structura moleculei TPZ optimizată în gaz și în apă în stare fundamentală, respectiv în apă în stare excitată, la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(2df,p)

La trecerea din faza gazoasă în fază lichidă se observă modificări structurale în special în inelul heterociclic. Astfel, legăturile atomului de azot din grupurile NO cu atomii adiacenți de C sau de N se micșorează în fază lichidă, concomitent cu alungirea legăturii N=O cu 0.016 Å. O altă modificare importantă se observă în alungirea legăturii N-O cu 0.015 Å. Planaritatea moleculei se păstrează în fază lichidă la fel ca și în fază gazoasă. Grupul NH₂ este coplanar cu restul scheletului moleculei, deși acest lucru pare a fi un artefact al metodelor DFT. Din cauza perechii de electroni neparticipanți, acest grup este așteptat să nu fie coplanar, structura planară fiind mai degrabă asociată unei stări de tranziție corespunzătoare moleculelor care conțin acest grup [Mandal2020].

Totuși, geometriile optimizate au fost verificate prin calcule de frecvențe în fiecare caz și toate corespund unor minime de pe suprafața de energie potențială a moleculei și nu unor structuri de tranziție.

Comparând structurile stării fundamentale și a celei excitate în apă se observă modificări importante ale lungimii legăturilor dintre atomii moleculei.

Sunt afectate ambele inele ale moleculei cu cele mai mari diferențe între lungimi observate pentru legătura C1C6 (vezi schema de numerotare a atomilor în Fig.3.3.1, pentru geometria stării excitate a moleculei) care scade în starea excitată cu 0.027 Å.

Alte modificări importante sunt observate pentru legăturile C5-C6 (alungire cu 0.031 Å), N16-N17 (alungire cu 0.045 Å), C7-N15 (alungire cu 0.028 Å) și C7-N12 (scurtare cu 0.012 Å). Cele două legături NO se modifică în sens diferit, N17=O18 crește cu 0.009 Å, iar legătura simplă N-O scade cu 0.012 Å.

Am considerat trei distanțe care să reflecte în ansamblu modificarea geometriei la trecerea din starea fundamentală în cea excitată. Astfel, distanțele longitudinale suferă următoarele alungiri: distanța C6N16 cu 0.085 Å, iar distanța C1C7 cu 0.064 Å. Pe de altă parte distanța transversală O18O19 se scurtează cu 0.014 Å. În concluzie, în stare excitată, molecula se alungește în lungul direcției longitudinale și se comprimă în lungul direcției transversale. Planaritatea moleculei se păstrează și în stare excitată.

3.3.2 Proprietăți fotofizice ale moleculei TPZ

Referitor la datele de absorbție și emisie ale moleculei, Poole și colaboratorii [Pole2007] au măsurat spectrul UV-Vis în apă și au determinat λ_{\max} pentru spectrul de absorbție la 461 nm în intervalul de pH = 4 - 10, respectiv o valoare de 542 nm la un pH mai mare sau egal cu 12, datorată anionului TPZ produs prin deprotonarea grupului NH₂. Spectrul UV-Vis al TPZ este puternic dependent de pH-ul soluției în care este măsurat așa cum reiese din același studiu, λ_{\max} măsurat în metiltetrahidrofuram fiind de 496 nm, iar emisia de fluorescență observată la $\lambda_{\text{emi}} = 572$ nm. De asemenea, studiul menționat raportează timpi de fluorescență măsurați la 98 ps în apă, la 110 ps în ACN și la 209 ps în formamidă, iar eficiența cuantică de 0.0018. Pe baza acestor date rezultă o valoare pentru timpul radiativ de fluorescență al TPZ în apă de 54 ns.

Studiul lui Shi și colaboratorii [Shi2005] indică o valoare pentru λ_{\max} din spectrul UV-Vis înregistrat în acetonitril de 482 nm și emisia de fluorescență observată la 544 nm, iar timpul de fluorescență de 130 ps.

În soluție de ethanol studiul lui Liu și colaboratorii [Liu2016] arată că absorbția electronică se produce la 469 nm.

Sarlauskas și colaboratorii [Sarlauskas2022] prezintă date fotofizice pentru TPZ în doi solvenți polari și aprotici, etilacetat și acetonitril. În respectivul studiu s-au determinat lungimile de undă de absorbție UV-Vis λ_{\max} la 390 nm, iar lungimea de undă de emisie la $\lambda_{\text{emi}} = 490$ nm, așadar o deplasare Stokes de 100 nm. În plus, tot în acest studiu sunt raportate și valori ale eficienței cuantice (Φ), definită ca și raportul dintre numărul de fotoni emiși și numărul absorbiți de o probă (cromofor). Astfel, Sarlauskas și colaboratorii au măsurat pentru Φ valori de 20% și 33% în etilacetat, respectiv în acetonitril.

Având în vedere diversitatea datelor fotofizice raportate până acum despre molecula de torapazamină, în studiul de față ne-am propus o investigație a moleculei în solventul DMSO, studiu în care să analizăm și dependența de concentrație a spectrelor UV-Vis și de emisie.

În Fig. 3.3.2 prezentăm spectrul UV-Vis al moleculei în acest solvent, iar în Fig. 3.3.3 este reprezentată dependența de concentrație în intervalul $5 \cdot 10^{-5} - 10^{-4}$ M a acestui tip de spectre.

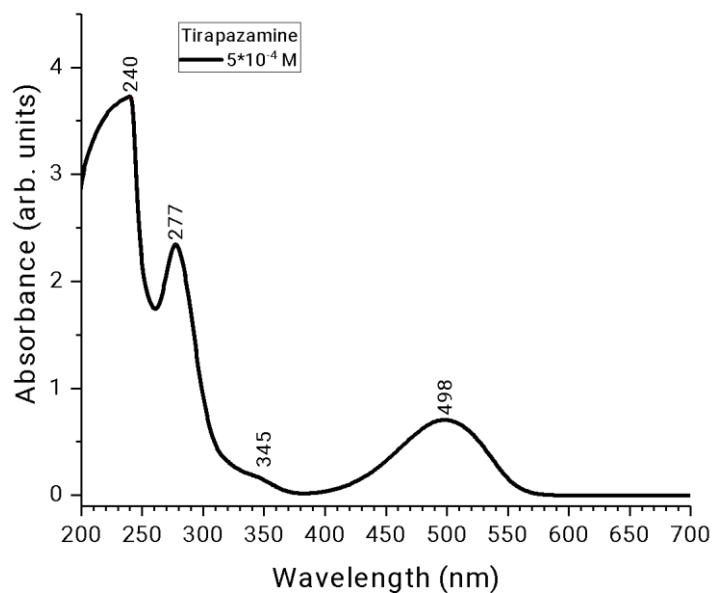


Fig. 3.3.2 Spectrul UV-Vis al moleculei TPZ în DMSO, la o concentrație de $5 \cdot 10^{-4}$ M.

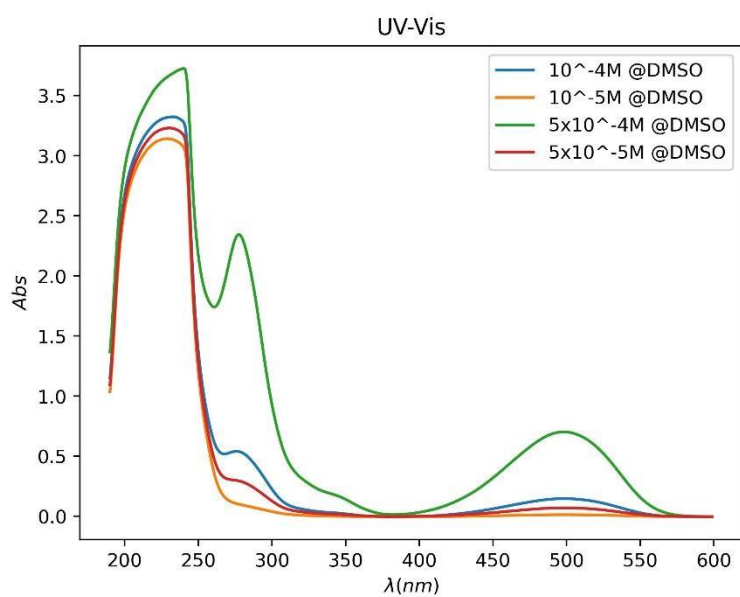


Fig. 3.3.3 Dependența de concentrație a spectrelor UV-Vis ale TPZ în DMSO

În Fig. 3.3.4 sunt reprezentate spectrele de excitație, iar în Fig. 3.3.4 spectrele de emisie pentru molecula TPZ.

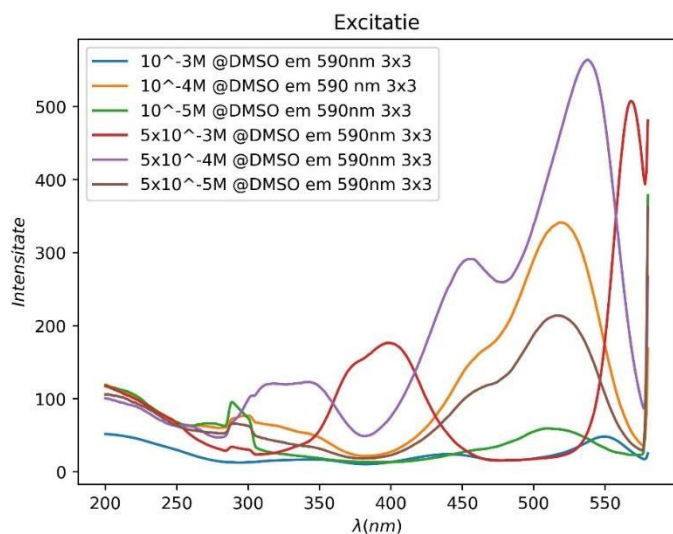


Fig. 3.3.4 Spectrele de excitație ale moleculei TPZ în DMSO înregistrate în domeniul de concentrații $10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3} M$

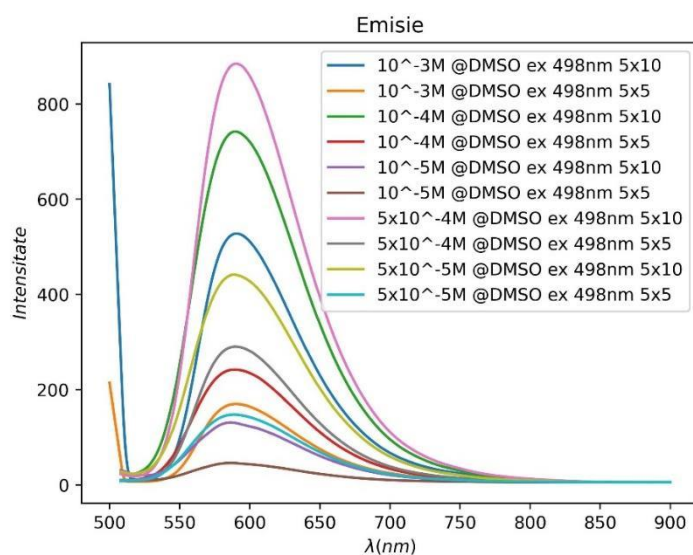


Fig. 3.3.5 Spectrele de emisie de fluorescență ale moleculei TPZ în DMSO înregistrate în domeniul de concentrații $10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3} M$

Din analiza spectrelor de absorbție rezultă o variație liniară a intensității benzii de absorbție cu concentrația probei. Banda λ_{max} apare în domeniul vizibil și este centrată la 498 nm. Pe lângă aceasta, spectrul mai conține două benzi în intense în UV, la 277 și 240 nm.

Pe de altă parte, spectrele de excitație diferă semnificativ de spectrele de absorbție în sensul că banda λ_{\max} suferă o deplasare spre roșu cu creșterea concentrației dar și o desplicare a benzii în două peak-uri, unul centrat la cca. 470 nm, iar celălalt la 520 nm. Această diferență observată între spectrele de absorbție și cele de excitație indică faptul că în proba analizată există mai multe specii absorbante, acestea putând fi fie agregate ale moleculelor TPZ, fie ioni ai moleculei. În studiul lui Poole și colaboratorii [Poole2007] spectrul de absorbție a fost înregistrat în soluție apoasă și s-a arătat că pentru valori ale pH-ului soluției mai mari de 12, banda de absorbție λ_{\max} se deplasează la 542 nm, o valoare apropiată de cea pe care o observăm în spectrele de excitație obținute în studiul de față.

Spectrele de emisie nu variază cu concentrația probei și constau dintr-o bandă largă, ușor asimetrică, centrată la 590 nm. Asimetria benzii poate fi datorată structurii vibronice sau unor specii diferite ale moleculei în soluția analizată.

În Fig. 3.3.6 este reprezentată curba atenuării semnalului de fluorescență pentru molecula TPZ în DMSO la o concentrație de 10^{-4} M. Prin fitarea acestei curbe cu o funcție exponențială compusă din doi termeni se obțin doi timpi de fluorescență: unul cu valoarea $\tau_1 = 0.304$ ns și celălalt $\tau_2 = 3.72$ ns. Prima valoare are o contribuție de 6.6, iar a doua de 0.643, rezultând în valoarea medie pentru timpul de fluorescență măsurat de $\langle \tau \rangle = 2.16$ ns. Evident, și aceste date experimentale susțin ipoteza a două specii emise în soluția DMSO a moleculei de tirapazmină.

Eficiența cuantică a moleculei a fost estimată la o valoare de cca. $2 \cdot 10^{-3}$, în acord foarte bun cu datele din ref. [Poole2007] în care s-a raportat valoarea de $1.8 \cdot 10^{-3}$.

Valoarea calculată de noi pentru timpul de fluorescență al monomerului TPZ este de 7.31 ns, în acord doar calitativ cu datele experimentale.

În continuare vom prezenta datele calculate la nivelul de teorie SMD(apă) – B3LYP/6-311+G(2df,p) pentru această moleculă.

În Fig. 3.3.7 este dat spectrul UV-Vis calculat pe baza formalismului TD-DFT.

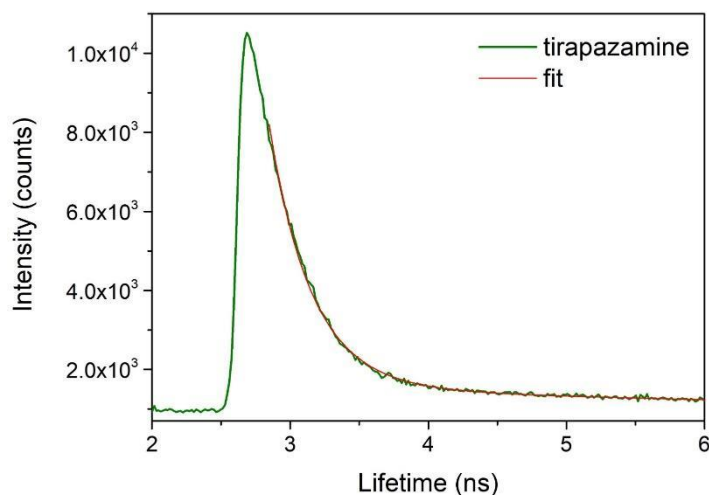


Fig. 3.3.6 Curba de atenuare a fluorescenței pentru molecula TPZ în soluție de DMSO

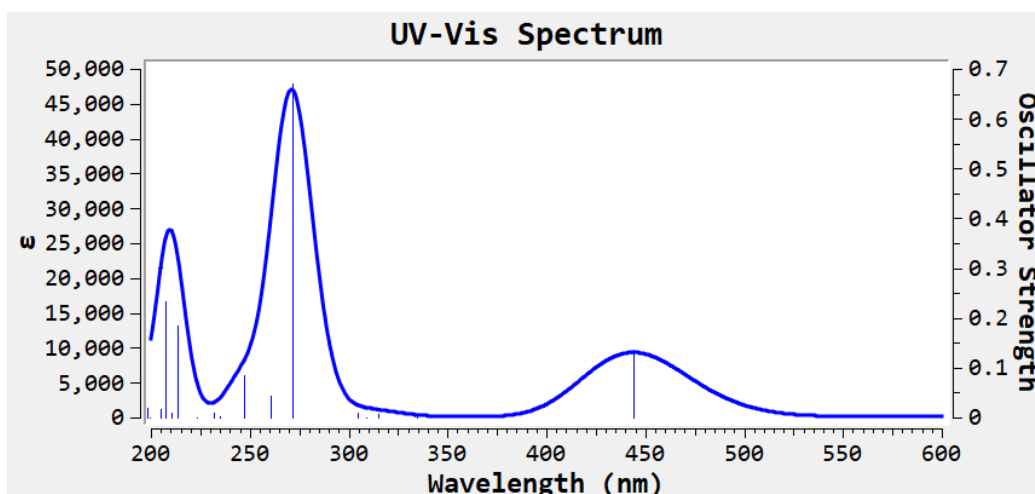


Fig. 3.3.7 Spectrul UV-Vis calculat la nivelul de teorie SMD(water) – B3LYP/6-311+G(2df,p) pentru molecula TPZ

Banda λ_{\max} este prezisă prin calcul la 444 nm, o valoare semnificativ mai mică decât cea observată experimental. Pe de altă parte, forma spectrului este reprodusă corect, a doua bandă cu intensitate semnificativă fiind prezisă la 272 nm, în excelent acord cu datele experimentale. Totuși, având în vedere că de obicei, datele teoretice supraestimează valorile λ_{\max} , iar în cazul de față avem o subestimare a acestei valori, presupunem că spectrul experimental nu este datorat numai monomerilor TPZ și că

acesta rezultă ca și contribuții de la specii diferite, printre care și agregate ale moleculelor TPZ.

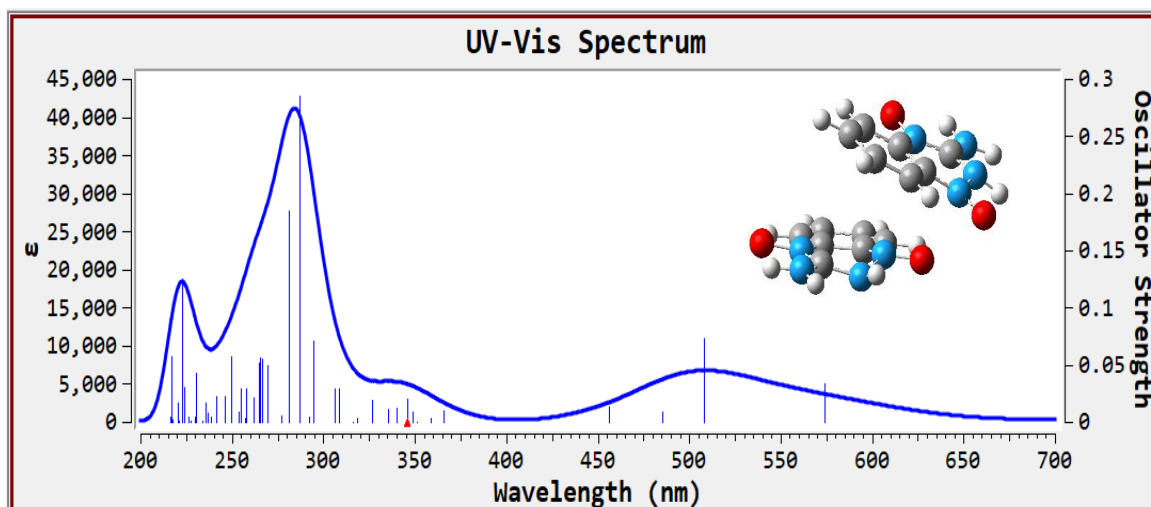


Fig. 3.3.8 Spectrul UV-Vis calculat la nivelul de teorie SMD(apă) – B3LYP/6-311+G(2df,p) pentru dimerul moleculei TPZ.

Pentru a confirma ipoteza menționată anterior am optimizat geometria unui dimer TPZ, format prin suprapunerea a două molecule TPZ în aranjament paralel și cu o deplasare reciprocă a monomerilor atât în lungul axei longitudinale cât și în lungul axei transversate a moleculelor. Geometria optimizată în apă la nivelul de teorie SMD(water) – B3LYP/6-311+G(2df,p) a dimerului este inclusă în Fig. 3.3.8. Pe această geometrie am calculat spectrul de absorbție al dimerului, spectru prezentat în Fig. 3.3.8.

Conform datelor computaționale, pentru acest dimer, peak-ul λ_{\max} este precis la 508 nm, în concordanță aproape perfectă cu valoarea experimentală. Și celelalte detalii ale spectrului sunt reproduse foarte bine, inclusiv umărul observat la 345 nm în spectrul experimental și care este precis prin calcul la 346 nm. Banda calculată de la 508 nm este datorată în esență unei tranziții de între orbitalii HOMO-2 \rightarrow LUMO, cu o contribuție procentuală de 94%.

Menționăm că această specie dimerică prezice și o bandă de absorbție în domeniul IR, la 949 nm, rezultată ca urmare a tranziției HOMO \rightarrow LUMO.

După cum reiese din Fig. 3.3.9, se observă peak-ul intens de la 606 nm dar și posibila apariție a unui peak centrat la 1200 nm și care ar putea fi corelat cu valoarea teoretică a peak-ului de absorbție prezis la 949 nm. Din cauza limitărilor experimentale nu am putut extinde domeniul spectral pentru a înregistra spectrul de fluorescență la lungimi de undă mai mari de 1200 nm. O investigație amănunțită a posibilității originii acestui peak va fi efectuată într-un studiu viitor.

În încheierea acestui studiu prezentăm spectrele calculate, de absorbție și emisie, ale moleculei TPZ, în aproximația FCHT descrisă în referința [Santoro2007], la nivelul de teorie PCM(DMSO)-B3LYP/6-311+G(d,p).

Conform acestora date preliminare, aproximația FCHT reproduce mult mai corect poziția benzii de absorbție la 478 nm, adică o abatere de numai 20 nm față de valoarea experimentală. Totuși, banda de emisie nu este corect reprodusă nici în acest caz, cel mai probabil din cauza diferențelor mici între structurile geometrice calculate pentru starea fundamentală și cea excitată a moleculei.

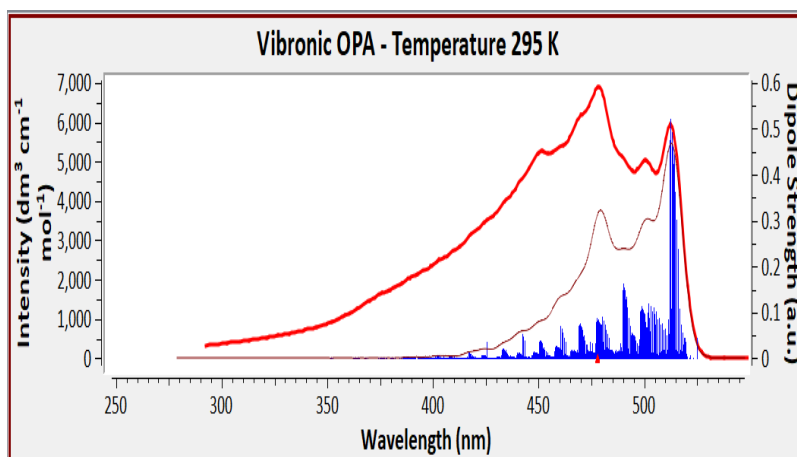


Fig. 3.3.10 Spectrul vibronic de absorbție UV-Vis calculat pentru monomerul TPZ în DMSO la nivelul de teorie PCM(DMSO)-B3LYP/6-311+G(d,p).

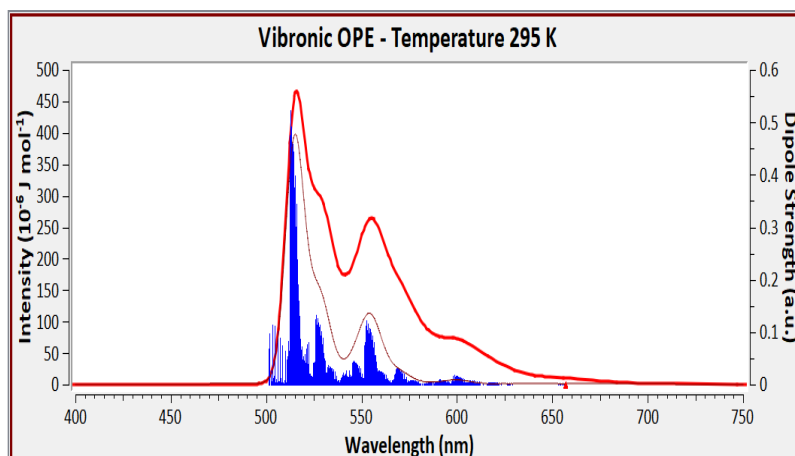


Fig. 3.3.11 Spectrul vibronic de emisie calculat pentru monomerul TPZ în DMSO la nivelul de teorie PCM(DMSO)-B3LYP/6-311+G(d,p).

Este evident că pentru obținerea unui acord cantitativ între datele calculate și cele experimentale este necesar un calcul de tip post-Hartree-Fock al stărilor excitate pentru molecula TPZ.

Concluzii

Studiul a avut ca scop investigarea caracteristicilor structurale, vibraționale și a celor fotofizice pentru molecula de tirapazamină (TPZ) și este motivat de proprietățile interesante ale acestei molecule ca și potențator radioterapeutic și chimioterapeutic, proprietăți datorate citotoxicității sale selective în medii hipoxice. Am folosit metode computaționale și experimentale pentru o descriere cât mai completă a proprietăților moleculei.

Folosind metode bazate pe teoria funcționalei de densitate (DFT) am obținut structura geometrică și cea electronică a moleculei utilizând funcționala B3LYP și aproximația post-Hartree-Fock MP2, împreună cu seturile de bază 6-311+G(d,p) și 6-311+G(2df,p). Folosind geometriile astfel obținute am calculat energia de ionizare a moleculei în diferite aproximații, obținând rezultate în jurul valorii de 7.7 eV (pentru aproximația EPT), aceasta fiind valoarea recomandată de noi, în lipsa datelor experimentale.

Prin simularea spectrelor Raman am atribuit modurile normale de vibrație ale moleculei pe baza corespondenței dintre pozițiile experimentale și calculate ale spectrului Raman înregistrat la temperatura camerei pe o probă sub formă de pulbere, folosind pentru excitare liniile laser de 633 și 785 nm. Menționăm că acesta este primul studiul vibrațional experimental raportat până acum pentru această moleculă.

Un alt obiectiv al studiului raportat aici a constat în investigarea proprietăților fotofizice ale moleculei. În acest scop am folosit tehnici experimentale (UV-Vis, emisie de fluorescență, fluorescență rezolvată temporal) și computaționale cu ajutorul cărora am reușit să interpretăm absorbția electronică, emisia de fluorescență și timpul radiativ de fluorescență pentru molecula TPZ. Chiar dacă rămân unele întrebări legate de anumite detalii ale acestor proprietăți, considerăm că am reușit să explicăm, cel puțin din punct de vedere cantitativ contribuțiile diferitelor specii (de tip monomer, dimer) la răspunsul spectroscopic al probelor investigate.

Bibliografie

[B3LYP] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648-5652; C. Lee, W. Yang and R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785-789; P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski and M.J. Frisch, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 11623-11627; S.H. Vosko, L. Wilk and M. Nusair, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200-1211.

[Barone2014] V. Barone, M. Biczysko, and J. Bloino, "Fully anharmonic IR and Raman spectra of medium-size molecular systems: accuracy and interpretation," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 5, pp. 1759–1787, Jan. 2014, doi: 10.1039/C3CP53413H.

[Beck2007] R. Beck et al., "Pretreatment 18F-FAZA PET Predicts Success of Hypoxia-Directed Radiochemotherapy Using Tirapazamine," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 48, no. 6, pp. 973–980, Jun. 2007, doi: 10.2967/jnumed.106.038570.

[Brown1993] Brown, J. SR 4233 (Tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br J Cancer* 67, 1163–1170 (1993). <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.220>

[Burke2007] Burke, K. (2007). The ABC of DFT. [g1.pdf \(uci.edu\)](#), accesat 12.06.2023.

[Chong2014] D. P. Chong, "Theoretical Study of Structures and Spectra of Small Anticancer Drugs: Fluorouracil, Hydroxyurea, and Tirapazamine," *J. Chin. Chem. Soc.*, 63, pp. 109–120, 2016, doi: 10.1002/jccs.201400443.

[Chris2020] Guise CP, Abbattista MR, Anderson RF, Li D, Taghipouran R, Tsai A, Lee SJ, Smaill JB, Denny WA, Hay MP, Wilson WR, Hicks KO, Patterson AV. Subcellular Location of Tirapazamine Reduction Dramatically Affects Aerobic but Not Anoxic Cytotoxicity. *Molecules*. 2020 Oct 22;25(21):4888. doi: 10.3390/molecules25214888.

[Denny2001] Denny, William & Wilson, Bill. (2001). Tirapazamine: A bioreductive anticancer drug that exploits tumour hypoxia. *Expert opinion on investigational drugs*. 9. 2889-901. 10.1517/13543784.9.12.2889.

[Dyson1949] F.J Dyson, "The S Matrix in Quantum Electrodynamics. Phys. Rev., 75 (1949) 1736–1755: DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.75.1736>

[Hedin1965] L.Hedin, "New Method for Calculating the One-Particle Green's Function with Application to the Electron-Gas Problem", Phys.Rev., 139 (1965) A796; doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.139.A796>.

[Heyd2004] J. Heyd, G. E. Scuseria, and M. Ernzerhof, J. Chem. Phys. 118, 8207 (2003).

[Heyd2006] J. Heyd, G. E. Scuseria, and M. Ernzerhof, J. Chem. Phys. 124, 219906 (2006).

[HK1964] P. Hohenberg and W. Kohn, "Inhomogeneous Electron Gas" Phys. Rev. 136, B864 (1964). DOI: [10.1103/PhysRev.136.B864](https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864)

[IUPAC] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

[Kadanoff1962] L.P.Kadanoff and G.Baym Quantum Statistical Mechanics W.A. Benjamin Inc., New York, 1962.

[Koopmans1934] T. Koopmans, Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, Physica, 1934, 1 (1-6), 104-113. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-8914\(34\)90011-2](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(34)90011-2).

[Leeuwen2023] R. van Leeuwen, N.E. Dahlen, "An Introduction to Nonequilibrium Green Functions", https://www.tddft.org/TDDFT2008/lectures/RL_LN.pdf, accesat în 30.05.2023.

[Liu2016] Y. Liu et al., "The synergistic radiosensitizing effect of tirapazamine-conjugated gold nanoparticles on human hepatoma HepG2 cells under X-ray irradiation", Int. J. Nanomed., vol. Volume 11, pp. 3517–3531, Jul. 2016, doi: [10.2147/IJN.S105348](https://doi.org/10.2147/IJN.S105348).

[Liuyun2021] Gong L, Zhang Y, Liu C, Zhang M, Han S., Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2021 Feb 12;16:1083-1102. doi: 10.2147/IJN.S290438. Erratum in: *Int J Nanomedicine*. 2021 Dec 16;16:8139-8140.

[Mandal2020] N. Mandal, A. K. Pal, P. Gain, A. Zohaib, and A. Datta, "Transition-State-like Planar Structures for Amine Inversion with Ultralong C–C Bonds in Diamino-o-carborane and Diamino-o-dodecahedron", *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, 142, 11, 5331–5337, <https://doi.org/10.1021/jacs.0c00181>

[Marcu2006] Marcu L, Olver I. Tirapazamine: from bench to clinical trials. *Curr Clin Pharmacol*. 2006 Jan;1(1):71-9. doi: 10.2174/157488406775268192.

[Martins2019] G. F. Martins and B. J. C. Cabral, "Electron Propagator Theory Approach to the Electron Binding Energies of a Prototypical Photo-Switch Molecular System: Azobenzene," *J. Phys. Chem. A*, vol. 123, no. 10, pp. 2091–2099, Mar. 2019, doi: 10.1021/acs.jpca.9b00532.

[NCI2023] National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/lysis>, accesat 26.06.2023

[Niessen1984] Wolfgang von Niessen, Jochen Schirmer, Lorenz S Cederbaum, "Computational methods for the one-particle Green's function", *Computer Physics Reports*, 1 (1984) 57-125; DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7977\(84\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0167-7977(84)90002-9).

[Ortiz1999] J. V. Ortiz, "Toward an Exact One-Electron Picture of Chemical Bonding", *Advances in Quantum Chemistry* 35 (1999) 33-52; doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-3276\(08\)60454-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3276(08)60454-2).

[Ortiz2013] J.V. Ortiz, "Electron propagator theory: an approach to prediction and interpretation in quantum chemistry, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 3 (2013) 123-142.

[Ortiz2020] J. V. Ortiz, "Dyson-orbital concepts for description of electrons in molecules", *Journal of Chemical Physics*, 153 (2020) 070902; doi: 10.1063/5.0016472.

[Pomogaev2021] V. Pomogaev, S. Lee, S. Shaik, M. Filatov, and C. H. Choi, "Exploring Dyson's Orbitals and Their Electron Binding Energies for Conceptualizing Excited States from Response Methodology", *J. Phys. Chem. Lett.*, 12 (2021) 9963–9972; doi: 10.1021/acs.jpcclett.1c02494].

[Poole2007] J. S. Poole et al., "Photochemical Electron Transfer Reactions of Tirapazamine", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 75, no. 4, pp. 339–345, 2007, doi: 10.1562/0031-8655(2002)0750339PETROT2.0.CO2.

[Pople1980] K. Raghavachari, J. S. Binkley, R. Seeger, and J. A. Pople, Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions, *J. Chem. Phys.*, 72 (1980) 650-54. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.438955>

[Qiao2023] Y. Qiao et al., "A Li₂CO₃-Free Li-O₂/CO₂ Battery with Peroxide Discharge Product", <https://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/C7EE03341A>, accesat 10.06.2023.

[Santoro2007] F. Santoro, R. Improta, A. Lami, J. Bloino, and V. Barone, "Effective method to compute Franck-Condon integrals for optical spectra of large molecules in solution", *J. Chem. Phys.*, 126 (2007) 084509 1-13. DOI: 10.1063/1.2437197.

[Sarlauskas2022] J. Sarlauskas, K. Tulaite, and J. Tamuliene, "Investigation of oxygen influence to the optical properties of tirapazamine," *J. Mol. Model.*, vol. 28, no. 4, p. 96, Mar. 2022, doi: 10.1007/s00894-022-05085-z.

[Shi2005] X. Shi, J.S. Poole, I. Emenike, G Burdzinski, M.S. Platz, "Time-Resolved Spectroscopy of the Excited Singlet States of Tirapazamine and Desoxytirapazamine". *J. Phys. Chem. A*, 2005, 109 (8), 1491–1496. <https://doi.org/10.1021/jp0457040>.

[who.int] World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, accesat 12.06.2023

[Zakrzewski2014] V. G. Zakrzewski, O. Dolgounitcheva, and J. V. Ortiz, "Electron Propagator Calculations on the Ground and Excited States of C-60," *J. Phys. Chem. A*, 118 (2014) 7424–7429; doi: 10.1021/jp412813m.

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Răzvan-Ștefan Angheluță, declar că lucrarea de licență pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea iulie 2023, sub îndrumarea Prof.dr. Vasile Chiș, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării. Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

28.06.2023

Răzvan-Ștefan Angheluță,