

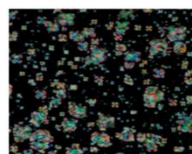
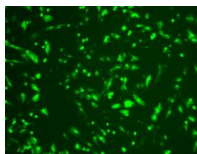
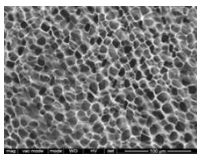
ACADEMIA ROMÂNĂ

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași



STRUCTURI SUPRAMOLECULARE COMPLEXE CU APLICAȚII BIOMEDICALE

Rezumatul tezei de doctorat



Conducător științific

Acad. Bogdan C. Simionescu

Doctorand

Ing. Daniela Ailincăi

Academia Română

Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

Nr. 4929/14.X.2016

Doamnei/Domnului _____

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **31 octombrie 2016**, ora **12:00**, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată "**Structuri supramoleculare complexe cu aplicații biomedicale**", teză elaborată de domnișoara inginer chimist **Daniela Ailincăi**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

PREȘEDINTE:

Dr. Valeria Harabagiu, Cercetător științific I
Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Acad. Bogdan C. Simionescu
Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași

REFERENȚI:

Dr. Silvia Destri, Cercetător Principal
Institutul pentru Studii Macromoleculare din Milano, Italia

Prof. Dr. Geta David
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași

Dr. Mariana Pinteală, Cercetător științific I
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.

Vă invităm să participați la ședința de susținere a tezei.

DIRECTOR

Dr. Anton Airinei



Mulțumiri

În elaborarea și finalizarea acestei teze de doctorat am beneficiat de susținere intelectuală, morală și afectivă din partea unor oameni, cărora le dedic o pagină de cuvenite mulțumiri.

*Cu deosebit respect adresez mulțumiri conducătorului științific, domnul **Acad. Bogdan C. Simionescu** pentru sprijinul moral și științific, pentru încrederea și înțelegerea acordate pe parcursul întregului stagiul doctoral.*

*Mulțumiri speciale doamnei **Dr. Luminița Marin** pentru îndrumarea științifică pe parcursul întregului stagiul de pregătire și elaborare a tezei de doctorat, pentru profesionalismul, înțelegerea și bunăvoința de care a dat dovadă. Îi voi fi mereu recunoscătoare pentru susținerea profesională și personală și pentru întreaga contribuție adusă la formarea mea ca tânăr cercetător, dar și ca om. A fost și este o reală binecuvântare să lucrez și să învăț alături de dumneaei.*

*Adresez mulțumiri și recunoștință doamnei **Dr. Mariana Pinteală** pentru încrederea acordată și pentru că mi-a oferit posibilitatea de a lucra și învăța multe tehnici care mi-au permis să înțeleg mai bine aspecte importante ale studiilor întreprinse.*

*Mulțumesc **Academiei Române** pentru suportul financiar acordat pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.*

*Mulțumesc conducerii **Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** din Iași pentru sprijinul acordat în elaborarea tezei de doctorat.*

*Tuturor colegilor din colectivele **Policondensare** și **IntelCentru**, precum și celorlalți **colegi din Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** doresc să le adresez mulțumiri pentru contribuția directă sau indirectă la săvârșirea acestei teze.*

*Mulțumiri speciale colegilor mei de laborator: **Andrei, Manuela, Anda și Elena** pentru că au făcut ca acest drum să fie presărat cu amintiri frumoase și multe zâmbete.*

*Prietenelor mele, **Corina și Roxana**, le mulțumesc pentru încrederea insufletă, pentru susținere și mai ales pentru frumoasa prietenie pe care mi-au oferit-o.*

*Neprețuite mulțumiri domnișoarei **Profesor Dr. Ing. Lucia Tătaru** pentru înțelegerea, căldura și atenția oferite, bucurându-mă și onorându-mă totodată cu prietenia dumneaei.*

*Sprijinul **mamei mele**, precum și exemplul personal de dăruire și putere de muncă m-au determinat să-mi doresc să fac totul mai bine și mai frumos. Pentru dragostea, atenția și educația oferite, doresc să îi mulțumesc din suflet!*

Vă mulțumesc!

Teza de doctorat intitulată „Structuri supramoleculare complexe cu aplicații biomedicale” are 205 pagini împărțite în cinci capitole care includ 23 tabele, 94 figuri, 11 scheme și 260 indicații bibliografice. În cele ce urmează se prezintă aspecte semnificative abordate în cadrul tezei de doctorat, urmărind îndeaproape cuprinsul lucrării.

CUPRINS

Listă de abrevieri	5
Introducere	7
Partea I. Date de literatură	
Capitolul I. Structuri supramoleculare cu potențiale bioaplicații	11
I.1 Structuri supramoleculare dinamice pe bază de chitosan	11
I.1.1 Introducere	11
I.1.2 Chitosanul - biopolimer ce poate fi utilizat cu succes în obținerea de material dinamic	12
I.1.2.1 Filme pe bază de chitosan	13
I.1.2.2 Hidrogeluri pe bază de chitosan	14
I.2 Vectori pentru transportul materialului genetic	25
I.2.1 Introducere	25
I.2.2 Vectori virali. Vectori nonvirali	26
I.2.3 Strategii de împachetare a materialului genetic	27
I.2.3.1 Interacțiuni electrostatice	28
I.2.3.2 Încapsularea ADN-ului	28
I.2.3.3 Adsorbția ADN-ului	30
I.2.4 Sisteme utilizate ca vectori nonvirali	31
I.2.4.1 Lipidele și lipozomii	31
I.2.4.2 Polimerii cationici. Nanoparticule	32
I.2.4.3 Dendrimerozomii	34
I.3 Sisteme compozite de tip PDLC	36
I.3.1 Introducere	37
I.3.2 Sisteme de tip PDLC: materiale, parametri importanți, avantaje și dezavantaje	37
I.3.3 Metode de obținere a sistemelor de tip PDLC	39
I.3.4 Aplicații ale sistemelor de tip PDLC	41
Partea a-II-a. Contribuția autorului	
Capitolul II. Structuri supramoleculare dinamice pe bază de chitosan	45
II.1 Filme biodinamice pe bază de imino-chitosan	45
II.1.1 Introducere	45
II.1.2 Obținere	46
II.1.3 Studii de spectroscopie în infraroșu (FTIR)	47
II.1.4 Studii de difracție de raze X la unghi larg (XRD)	49
II.1.5 Măsurători de microscopie de forță atomică (AFM)	52
II.1.6 Măsurători de analiză mecanică dinamică (DMA)	54
II.1.7 Determinarea unghiului de contact și a energiei libere de suprafață	56
II.1.8 Testarea activității antimicrobiene a filmelor de imino-chitosan	59

II.1.9 Concluzii	61
II.2 Hidrogeluri pe bază de imino-chitosan	62
II.2.1 Introducere	62
II.2.2 Hidrogeluri pe bază de chitosan și acid 2-fenil-formil-boronic (2-FPBA)	63
II.2.2.1 Studii de spectroscopie în infraroșu (FTIR)	64
II.2.2.2 Studii de spectroscopie magnetică nucleară (RMN)	68
II.2.2.3 Studii de difracție de raze X la unghi larg (XRD)	69
II.2.2.4 Studii de microscopie electronică de baleiaj (SEM)	71
II.2.2.5 Studii reologice	73
II.2.2.6 Determinarea gradului de umflare	79
II.2.2.7 Testarea activității antifungice	80
II.2.2.8 Concluzii	83
II.2.3 Hidrogeluri pe bază de chitosan și citral	84
II.2.3.1 Studii de spectroscopie magnetică nucleară (RMN)	85
II.2.3.2 Studii de spectroscopie în infraroșu (FTIR)	87
II.2.3.3 Studii de difracție de raze X la unghi larg (XRD)	88
II.2.3.4 Studii de microscopie electronică de baleiaj (SEM)	90
II.2.3.5 Studii reologice	91
II.2.3.6 Determinarea gradului de umflare	96
II.2.3.7 Testarea biocompatibilității <i>in vivo</i>	97
II.2.3.8 Testarea preliminară a capacității hidrogelurilor pe bază de citral-chitosan de a încapsula medicamente hidrofobe	97
II.2.3.9 Concluzii	100
Capitolul III. Vectori nonvirali pe bază de imine hidrofob-hidrofile	101
III.1 Introducere	101
III.2 Structuri dinamice cu miez hidrofob pe bază de trialdehidă și Jeffamină D	101
III.2.1 Design, sinteză și caracterizare structurală	101
III.2.2 Confirmare structurală	104
III.2.3 Studii de electroforeză pe gel de agaroză	109
III.2.4 Studii de microscopie electronică de transmisie (TEM)	113
III.2.5 Studii de electroforeză de difuziune a luminii	113
III.2.6 Studii de microscopie de forță atomică (AFM)	114
III.2.7 Determinarea eficienței de transfecție	116
III.2.8 Concluzii	118
III.3 Structuri dinamice cu miez hidrofob pe bază de trialdehidă și siloxan	122
III.3.1 Design, sinteză și caracterizare structurală	122
III.3.2 Studii de microscopie electronică de transmisie ale compușilor	124
III.3.3 Formarea poliplecșilor. Electroforeză pe gel de agaroză	124
III.3.4 Formarea poliplecșilor. Caracterizare dimensională	126

III.3.5 Determinarea citotoxicității poliplecșilor	128
III.3.6 Determinarea eficienței de transfecție	128
III.3.7 Concluzii	130
Capitolul IV. Polivinil borat – matrice polimerică pentru obținerea de sisteme PDLC cu potențiale bioaplicații	131
IV.1 Introducere	131
IV.2 Sisteme de tip PDLC pe bază de PVAB și nemotogen 5CB	132
IV.2.1 Studii de microscopie optică în lumină polarizată	132
IV.2.2 Studii de microscopie electronică de baleiaj	134
IV.2.3 Studii de calorimetrie cu scanare diferențială	136
IV.2.4 Proprietăți de suprafață ale PDLC-urilor	138
IV.2.5 Proprietăți optice	141
IV.2.6 Concluzii	142
IV.3 Sisteme de tip PDLC pe bază de PVAB și un cristal lichid smectic	143
IV.3.1 Introducere	143
IV.3.2 Sinteza și caracterizarea cristalului lichid smectic	143
IV.3.2.1 Confirmare structurală	144
IV.3.2.2 Studii de calorimetrie cu scanare diferențială	149
IV.3.2.3 Studii de microscopie optică în lumină polarizată	150
IV.3.2.4 Proprietăți optice	152
IV.3.2.5 Proprietăți de suprafață	153
IV.3.2.6 Proprietăți antimicrobiene	153
IV.3.2.7 Concluzii	155
IV.3.3 Obținerea de sisteme de tip PDLC pe bază de PVAB și BBO	156
IV.3.3.1 Studii de microscopie optică în lumină polarizată	156
IV.3.3.2 Studii de microscopie RAMAN	159
IV.3.3.3 Studii de calorimetrie cu scanare diferențială	163
IV.3.3.4 Studii de microscopie electronică de baleiaj	164
IV.3.3.5 Proprietăți de suprafață	166
IV.3.3.6 Concluzii	170
Capitolul V. Parte experimentală	171
V.1 Materiale și solvenți	171
V.2 Obținerea derivaților de imino-chitosan și a filmelor corespunzătoare	172
V.3 Obținerea hidrogelurilor și a xerogelurilor pe bază de chitosan	172
V.3.1 Utilizând acidul 2-fenil-formil-boronic ca agent de reticulare	172
V.3.2 Utilizând citral ca agent de reticulare	173
V.4 Obținerea de vectori nonvirali pe bază de imine hidrofob-hidrofile	174
V.4.1 Cu miez hidrofob pe bază de Jeffamină D și trialdehidă	174
V.4.2 Cu miez hidrofob pe bază de siloxan și trialdehidă	175
V.5 Prepararea și caracterizarea poliplecșilor	175

V.6 Amplificarea plasmidului pEYFP	176
V.7 Obținerea sistemelor de tip PDLC	176
V.7.1 Obținerea sistemelor de tip PDLC pe bază de PVAB și nematogen	
5CB	176
V.7.2 Obținerea sistemelor de tip PDLC pe bază de PVAB și smectic	176
BBO	
V.7.2.1 Sinteza smecticului BBO	176
V.7.2.2 Obținerea compozitelor de tip PDLC	178
V.8 Echipamente și metode utilizate pentru caracterizarea compușilor și materialelor obținute	178
Concluzii generale	188
Bibliografie	196

Chimia supramoleculară, cunoscută și sub numele de „*chimia de dincolo de moleculă*” se bazează pe studiul recunoașterii moleculare și al asamblării înalt-ordonate, generate de interacțiuni noncovalente sau covalente reversibile.¹ În anul 1987, premiul Nobel în Chimie a fost acordat unui grup format din Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn, și Charles J. Pedersen pentru „*dezvoltarea și utilizarea moleculelor cu interacțiuni structurale specifice și înalt selective*”.² Acest eveniment a marcat apariția și recunoașterea chimiei supramoleculare ca o disciplină importantă, de sine stătătoare. Deoarece sistemele supramoleculare sunt construite din blocuri structurale legate între ele prin interacțiuni noncovalente, ele pot prezenta sensibilitate la stimuli externi.³ Acești stimuli pot fi lumina (materiale fotosensibile), anumiți agenți chimici (de exemplu metalele pentru sisteme cu metalo-selecție)⁴, temperatura, pH-ul sau tăria ionică.⁵ Astfel, prin această caracteristică de sensibilitate la stimuli externi, materialele a căror obținere are la bază principiile chimiei supramoleculare, prezintă caracter adaptativ⁶, caracteristică ce lărgeste și mai mult domeniul lor de aplicare.

Și mai fascinant este faptul că prin chimia supramoleculară se pot obține arhitecturi greu de obținut pe calea convențională a chimiei covalente clasice, care implică etape de sinteză numeroase și purificări dificile.

După doar 50 de ani de existență, chimia supramoleculară a fost îndelung utilizată și exploatată în domenii diferite, incluzând: dezvoltarea de mașini moleculare⁷, senzori moleculari⁸, obținerea de sisteme pentru absorbția gazelor, catalizatori chimici, nanoreactoare⁹ sau în eliberarea de medicamente.¹⁰ Chimia supramoleculară este așadar o disciplină care transcende un număr mare de domenii: chimie organică, chimie fizică, chimie coordinativă, chimie macromoleculară, știința materialelor, științe biologice și multe altele.

Obiectivele cercetărilor în domeniul chimiei supramoleculare implică numeroase și diverse clase de molecule. Cele mai importante dintre acestea sunt: metalocicluri și metalo-cuști obținute prin chimia coordinativă metal-ligand¹¹, nanoentități pe bază de carbon: nanotuburi, grafenă și fulerene și autoasamblarea suprastructurată a acestora¹², gazde moleculare care conțin legături cu halogen¹³, cristale lichide¹⁴, hidrogeluri supramoleculare sau vectori nonvirali pentru terapia genică.¹⁵

Din cele enunțate până acum se poate concluziona că datorită caracterului reversibil al interacțiunilor ce stau la baza principiilor chimiei supramoleculare, acestea are un caracter dinamic.

Reacțiile care pot fi utilizate în chimia dinamică pot fi împărțite în două categorii: reacții de schimb – care implică substituția unui partener de reacție cu un altul, generând același tip de legătură, cum ar fi reacțiile de transesterificare și reacțiile de schimb disulfidic și al doilea tip, așa numitele reacții de formare, care se bazează pe generarea de noi legături covalente, cum ar fi reacțiile Diels-Alder sau reacțiile aldol. În anumite situații, aceeași reacție poate fi încadrată în ambele categorii. De exemplu, formarea bazelor Schiff poate fi considerată o reacție de formare a legăturilor de tip

imină și totodată, o reacție de schimb dacă în sistem există două sau mai multe amine sau aldehide diferite (reacția de trans-iminare).

Mai mult, în acest domeniu al materialelor generate prin chimie supramoleculară dinamică, chimia formării bazelor Schiff reprezintă cea mai utilizată cale pentru obținerea de ansambluri supramoleculare dinamice, cum ar fi: cristale epitaxiale, microtuburi, molecule amorfe poroase, filme cu proprietăți de autovindecare și multe altele.

Teza de doctorat intitulată "**Structuri supramoleculare complexe cu aplicații biomedicale**" este dezvoltată pe trei direcții ale chimiei supramoleculare, după cum urmează: structuri supramoleculare dinamice pe bază de chitosan, vectori non-virali hidrofob-hidrofili și sisteme compozite de tip PDLC (cristale lichide dispersate în matrici polimerice), toate constituind subiecte de actualitate în cercetările din domeniul științei biomaterialelor.

Teza a fost organizată în două părți, prima cuprinzând date de literatură, iar în partea a doua sunt expuse rezultate proprii, fiind structurată în cinci capitole.

Capitolul I prezintă date de literatură privind stadiul actual al cercetărilor în cele trei domenii abordate în teză, iar capitolele II, III și IV constituie partea de contribuții originale.

În **capitolul II** este prezentată obținerea și caracterizarea unor structuri supramoleculare dinamice pe bază de iminohitosan, fiind structurat în două subcapitole aferente celor două tipuri de sisteme descrise: (i) filme de iminohitosan și respectiv (ii) hidrogeluri de iminohitosan. Ambele subcapitole debutează cu o scurtă introducere în care este subliniată importanța sistemelor obținute și care conține o argumentare privind modul de abordare al subiectelor, noutatea adusă și respectiv alegerea componentelor în obținerea sistemelor pe bază de chitosan. Atât filmele pe bază de iminohitosan, cât și hidrogelurile obținute utilizând chitosan și acid 2-fenil-formil-boronic și respectiv citral, au fost caracterizate din punct de vedere structural, fiind pusă în evidență formarea legăturii imină, responsabilă de anumite particularități morfologice evidențiate prin tehnicile de microscopie de forță atomică, microscopie electronică de baleiaj și difracție de raze X la unghi larg. Toate sistemele obținute și caracterizate în detaliu din punct de vedere fizico-chimic au fost testate, în vederea stabilirii potențialului lor aplicativ în domeniul biomedical ca acoperiri pentru instrumentar medical cu proprietăți antimicrobiene, în cazul filmelor de imino-chitosan sau ca hidrogeluri cu proprietăți antifungice pentru tratarea vulvovaginitelor recurente, în cazul hidrogelului pe bază de chitosan și acid 2-fenil-formil boronic. Hidrogelurile pe bază de chitosan și citral urmează a fi studiate pe larg în sensul utilizării lor ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, în acest sens fiind testată biocompatibilitatea lor prin teste *in vivo*, precum și capacitatea de a reține compuși hidrofobi.

Capitolul III cuprinde sinteza și caracterizarea unor vectori non-virali hidrofob-hidrofili pe bază de imine pentru transfer genic, fiind divizat la rândul lui în două subcapitole principale, aferente celor două sisteme diferite obținute: (i) *sisteme policationice cu miez hidrofob pe bază de 1,3,5 benzotrientaldehidă și Jeffamină D (JD-PEI)*; (ii) *sisteme policationice cu miez hidrofob pe bază de 1,3,5 benzotrientaldehidă și*

siloxan (TAS-PEI). S-a dorit obținerea de structuri amfifile pe bază de legături imină reversibile, care, datorită proceselor de iminare și transiminare să fie capabile să se autoorganizeze în structuri sferice asemănătoare micelilor: cu un miez hidrofob și un înveliș hidrofil. Compușii obținuți au fost caracterizați din punct de vedere structural prin ¹H-RMN. Design-ul teoretic a fost confirmat prin microscopie electronică de transmisie când a fost evidențiată morfologia sferică a compușilor obținuți. Capacitatea compușilor sintetizați de a complexa acizii nucleici formând poliplecși a fost verificată prin electroforeză pe gel de agaroză, la diferite valori ale raportului N/P (raportul molar dintre atomii de N din structura vectorului nonviral și atomii de fosfor din structura acizilor nucleici). Poliplecșii au fost caracterizați din punct de vedere morfologic prin microscopie de forță atomică sau microscopie electronică de transmisie, precum și din punct de vedere al stabilității coloidale, prin determinare potențialului Zeta. Ulterior, au fost efectuate teste biologice pe culturi celulare, când s-a determinat citotoxicitatea poliplecșilor și eficiența lor de transfecție, teste care au validat metoda exploatarea principiilor chimiei supramoleculare dinamice și a teoriei compușilor amfifili în design-ul unor vectori nonvirali pentru terapia genică.

Capitolul IV cuprinde obținerea și caracterizarea unor sisteme de tip PDLC, pe bază de polivinil borat (PVAB) – ca matrice polimerică și două cristale lichide: un nematogen comercial (5CB) și un cristal lichid smectic (BBO), cu activitate antimicrobiană, proiectat și sintetizat în laboratorul nostru. Sistemele PDLC obținute au fost caracterizate prin microscopie optică în lumină polarizată, microscopie electronică de baleiaj și calorimetrie cu scanare diferențială, tehnici care au permis evidențierea capacității PVAB-ului de a constrânge cristalul lichid să formeze picături sferice, cu polidispersitate dimensională redusă. Caracteristicile de suprafață ale filmelor PDLC obținute au fost determinate prin măsurători de unghi de contact și calcule de energie liberă de suprafață, arătând că sistemele obținute prezintă potențial pentru bioaplicații, valorile unghiului de contact obținute fiind apropiate de unghiul de contact al corneei (în cazul utilizării BBO).

Teza se încheie cu un capitol care conține partea experimentală (**Capitolul V**), care cuprinde solvenții și reactivii utilizați pentru sinteza compușilor prezentați în teză, procedurile de sinteză precum și metodele și aparatele folosite la caracterizarea acestora.

Teza mai cuprinde și activitățile de diseminare a rezultatelor din perioada tezei de doctorat: lista lucrărilor publicate, precum și participările la manifestări științifice, dar și bibliografia consultată în elaborarea tezei.

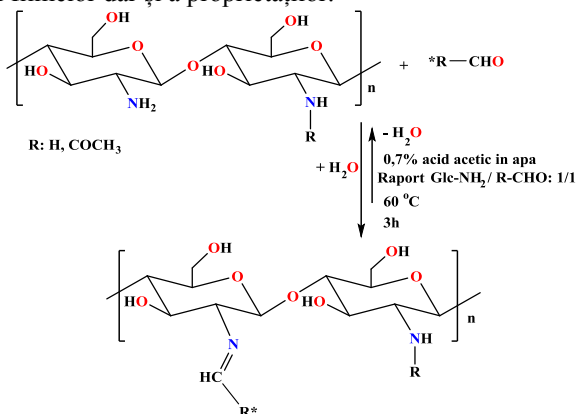
CAPITOLUL II

Structuri supramoleculare dinamice pe bază de chitosan

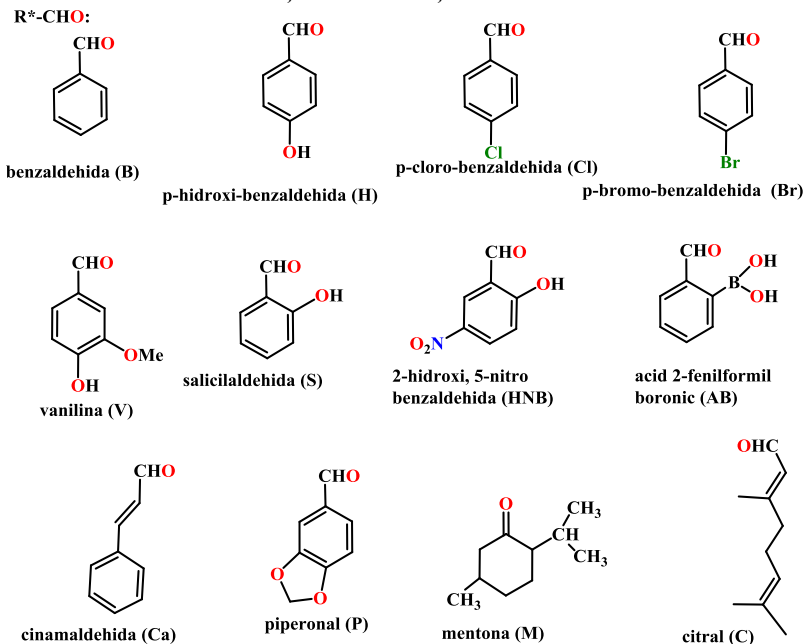
Capitolul II a avut drept obiectiv obținerea și caracterizarea unor biomateriale dinamice pe bază de chitosan, sub formă de filme și hidrogeluri.

II.1 Filme biodinamice pe bază de iminochitosan

Au fost preparate 12 derivați de imino-chitosan (CX), prin reacția de condensare acidă între grupările amină de pe lanțul de chitosan (C) și diferite monoaldehide (X) (Schema 3), investigând efectul reversibilității legăturii imină asupra preparării filmelor dar și a proprietăților.



Schema 2. Obținerea derivaților de iminochitosan



Schema 3. Structurile aldehidelor utilizate pentru obținerea biopolimerilor și codurile corespunzătoare

Spectroscopia FTIR și difracția de raze X au demonstrat structurarea biopolimerilor într-o morfologie tridimensională, obținută prin alternarea chitosanului

hidrofil și a unităților imină hidrofobe. Arhitectura tridimensională este facilitată de solubilitatea bună a aldehidei în apă, fapt ce oferă timp suficient legăturilor imină să participe la procese de transiminare. Mai mult, s-a demonstrat că în structura biopolimerilor rămân cantități mici de apă chiar și după uscare, facilitând procesele de transiminare și de asemenea procesele de ordonare, care continuă chiar și în filme uscate. Alternarea straturilor hidrofil/hidrofob asigură o balanță foarte bună a entităților hidrofile/hidrofobe la suprafață și duce la obținerea unor filme cu umectabilitate moderată- un prim deziderat al materialelor biocompatibile (Figura 18).

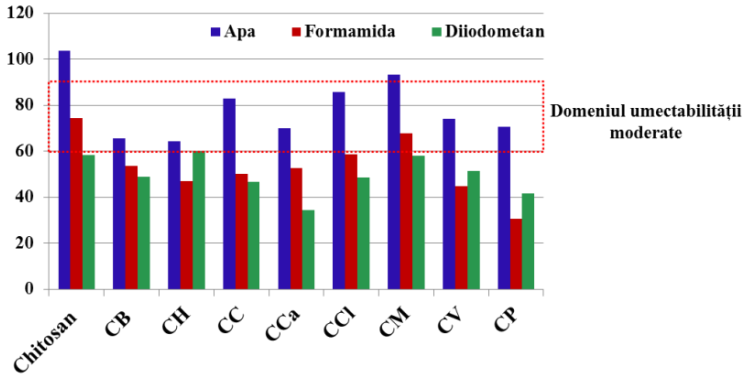
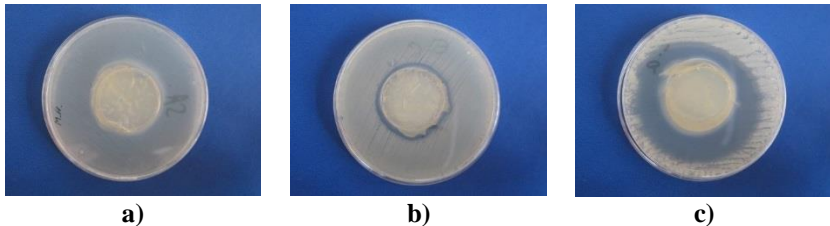
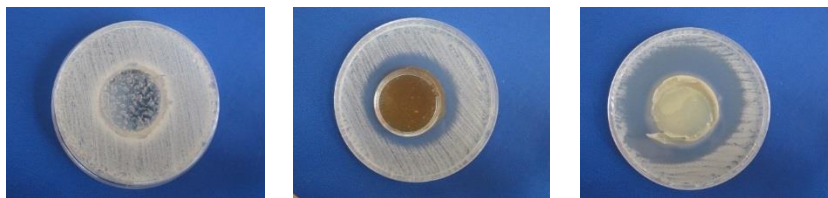


Figura 18. Valorile medii ale unghiurilor de contact obținute pentru filmele de imino-chitosan și apă, formamidă și diiodometan

Toate filmele de imino-chitosan obținute au prezentat o suprafață nanostructurată, așa cum a fost evidențiat prin microscopie de forță atomică (AFM), care facilitează adeziunea și proliferarea celulelor. Mai mult decât atât, filmele de imino-chitosan au prezentat proprietăți de auto-apărare, inhibând creșterea bacteriilor pe suprafețe mari în jurul filmelor (Figura 19) și având potențial real în a preveni formarea biofilmelor. Prezența legăturilor imină reversibile conferă proprietăți dinamice filmelor, asigurând o eliberare lentă a aldehidei cu activitate antimicrobiană în mediul microbiologic, echilibrul de reacție fiind deplasat odată cu consumarea aldehidei.





d)

e)

f)

Figura 19. Activitatea antimicrobiană a biopolimerului CCl împotriva a) *S. aureus*, b) *E. coli*, c) *C. albicans* și activitatea antifungică a d) chitosan, e) CP, f) CAB împotriva *C. albicans*

Acest studiu a demonstrat faptul că grefarea unităților imină pe lanțurile de chitosan, asistată de chimia covalent dinamică oferă oportunități interesante în obținerea de biomateriale valoroase cu morfologii și structuri controlate ale suprafeței.

II.2 Hidrogeluri pe bază de chitosan

Hidrogeluri pe bază de chitosan și acid 2-fenil-formil-boronic

Au fost preparate hidrogeluri pe bază de chitosan utilizând compusul carbonilic acid 2-fenil-formil-boronic (2-FPBA) ca agent de reticulare, compus care datorită structurii chimice ar trebui să faciliteze o dublă reticulare a lanțurilor de chitosan, chimică prin legături de tip imină și fizică prin legături de hidrogen. Au fost preparate hidrogeluri cu diferite grade de reticulare variind raportul molar între gruparea amină din chitosan și cea aldehidă din 2-FPBA (Tabel 6). Mai mult, deoarece analiza RMN a arătat o creștere a densității legăturilor imină în timp, atingând un maxim în 7 zile, au fost preparate și caracterizate și hidrogeluri care au fost păstrate 7 zile înainte de liofilizare (marcate cu simbolul *). Hidrogelurile cu un conținut scăzut de aldehidă (H3; H3,5; H3*; H3,5*) au colapsat când au fost încălzite la 75 °C, în timp ce hidrogelurile cu un conținut ridicat de aldehidă (H1; H2; H2,5; H1*; H2*; H2,5*) și-au păstrat integritatea. Acest lucru a indicat predominanța interacțiunilor fizice ca forță motrice în obținerea hidrogelurilor cu un conținut scăzut de aldehidă și predominanța reticulării chimice în cazul celor obținute utilizând cantități mai ridicate de aldehidă.

Tabel 6. Codurile probelor și rapoartele molare între grupările funcționale NH₂/CHO pentru hidrogelurile studiate

Cod	H1/ H1*	H2/ H2*	H2,5/ H2,5*	H3/ H3*	H3,5/ H3,5	H3,75/ H3,75*	H4/ H4*
Raport NH₂:CHO	1:1	2:1	2,5:1	3:1	3,5:1	3,75:1	4:1

Hidrogelurile reticulate preponderent chimic au format o arhitectură supramoleculară tridimensională bazată pe segregarea chitosanului hidrofil și a iminoboronatului aromatic hidrofob.

Studiul proprietăților reologice ale sistemelor obținute a revelat faptul că se pot obține hidrogeluri până la o valoare a raportului molar NH_2/CHO mai mică de 3,75/1, date care sunt în acord cu inspectarea vizuală a probelor (Figura 28).

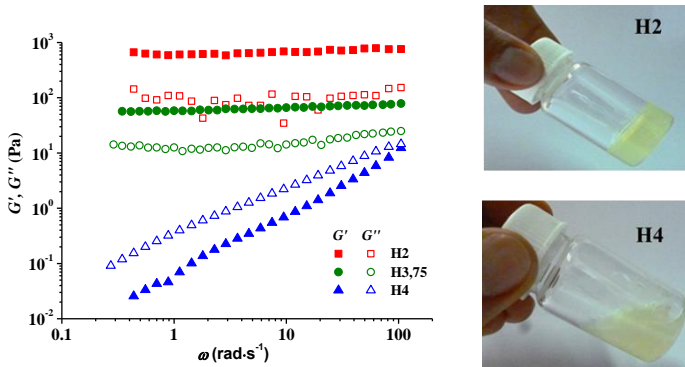


Figura 28. Dependența parametrilor G' și G'' de frecvența pentru $H2^*$, $H3,75^*$ și $H4^*$ la 37°C și 1 Pa

Hidrogelurile prezintă grade mari de umflare, variind între 10 și 110, în funcție de gradul de reticulare și de pH-ul soluției în care s-a efectuat umflarea. Activitatea antifungică a hidrogelurilor și a componentelor hidrogelurilor a fost testată preliminar pe două tulpini de *Candida*: *Candida glabrata* și *Candida albicans*, atât pe plancton, cât și pe biofilm. Chitosanul utilizat ca martor a încetinit creșterea tulpinilor, având un efect fungistatic și nu fungicid, în timp ce aldehida pură a distrus tulpinile de *Candida* foarte repede. Hidrogelurile pe bază de chitosan și acid 2-FPBA au distrus tulpinile de *Candida* lent, demonstrând că, datorită prezenței în structura lor a legăturilor imină reversibile și mai mult decât atât, datorită stabilizării legăturii imină formate printr-o legătură intramoleculară de hidrogen, hidrogelurile sunt capabile să asigure o eliberare lentă și susținută a aldehidei antifungice în mediul biomimetic (Figura 33).

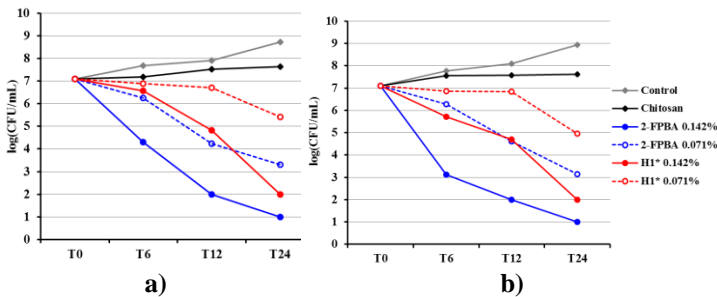


Figura 33. Evaluarea activității antifungice pe plancton de a) *Candida albicans* și b) *Candida glabrata*

Mai mult, hidrogelurile s-au dovedit a fi capabile să inhibe activitatea metabolică a biofilmelor corespunzătoare, mai mult de 99,5%, fiind promițătoare pentru tratamentul vulvovaginitelor recurente.

Hidrogeluri pe bază de chitosan și citral

În continuare ne-am propus obținerea de hidrogeluri pe bază de chitosan, utilizând citralul, o monoaldehidă extrasă din uleiul esențial de lămâi, puternic hidrofobă. Această monoaldehidă ar trebui să fie capabilă ca în prezența chitosanului să genereze hidrogeluri supramoleculare autoasamblate datorită caracterului antagonic al celor două componente: chitosanul-hidrofil și citralul-hidrofob.

Au fost obținute hidrogeluri cu grade diferite de reticulare chimică și fizică, variind raportul molar între gruparea amină din chitosan și gruparea aldehidă din citral (Tabel 11).

Tabel 11. Codurile și rapoartele molare corespunzătoare între grupările funcționale NH₂/CHO pentru hidrogelurile studiate

Cod	C1/ C1*	C2/ C2*	C2,5/ C2,5*	C3/ C3*	C3,5/ C3,5	C4/ C4*	C4,5/ C4,5*
Raport NH₂:CHO	1:1	2:1	2,5:1	3:1	3,5:1	4:1	4,5:1

Toate hidrogelurile au prezentat o arhitectură supramoleculară stratificată și o morfologie poroasă, așa cum a fost evidențiat prin difracție de raze X la unghi larg și microscopie electronică de baleiaj (Figura 38).

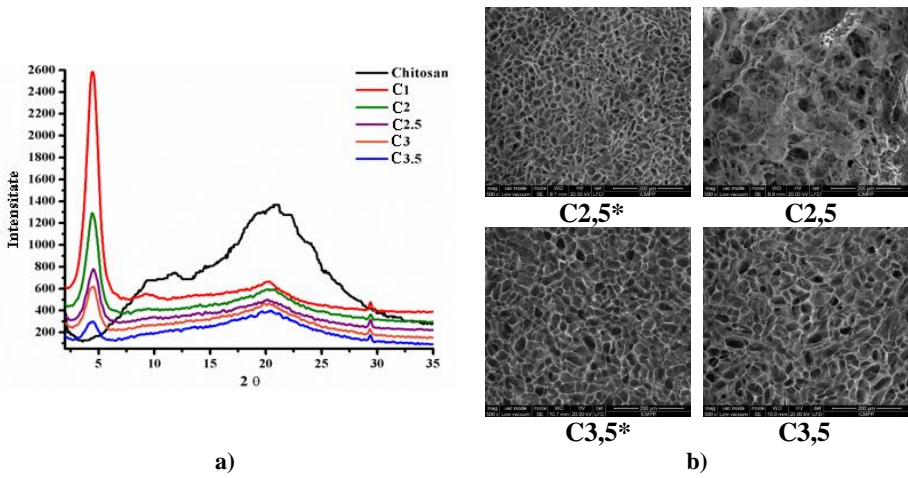


Figura 38. Microfotografii SEM ale probelor obținute

Comportamentul vâscoelastic al hidrogelurilor a fost investigat prin măsurători reologice toate probele având un comportament tixotrop, prezentând transformări reversibile sol-gel și invers.

Testarea *in vivo* a biocompatibilității hidrogelurilor s-a bazat pe determinarea profilului hematologic, biochimic și imunitar al animalelor (șoareci) care au primit hidrogelurile, nefiind puse în evidență modificări semnificative, comparativ cu animalele care au primit ser fiziologic (Figura 44).

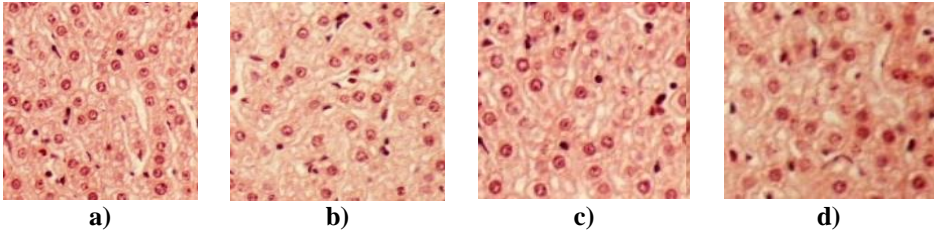


Figura 44. Lot martor - secțiune la nivel hepatic. Col HE x10 (a) și lot tratat cu b) C1, c) C2, d) C3. Col HE x 10

CAPITOLUL III

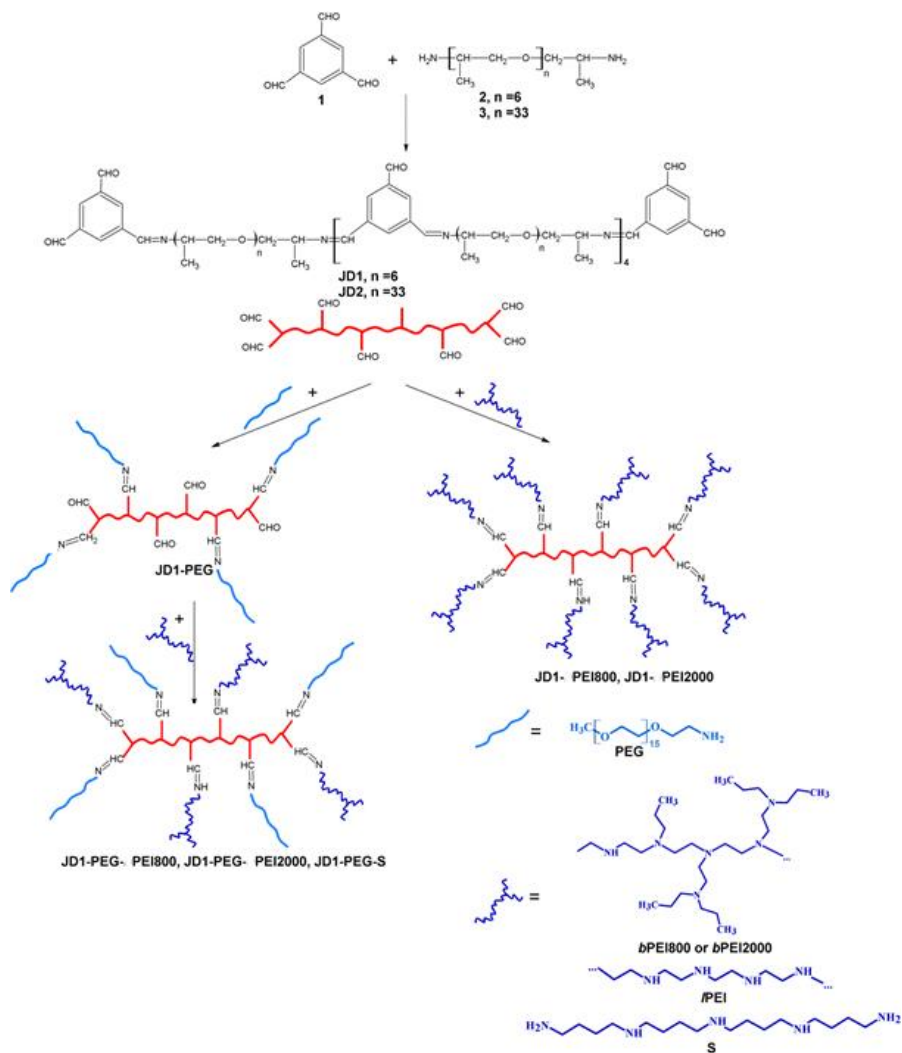
Vectori nonvirali pe bază de imine hidrofob-hidrofile

Obiectivul acestui studiu a fost obținerea unor sisteme bazate pe unități structurale hidrofob-hidrofile, care datorită caracterului amfifil, ar trebui să fie capabile să se autoorganizeze în arhitecturi sferice, capabile să interacționeze cu materialul genetic și să-l transporte în celulă.

Pentru a evita etapele dificile de sinteză și purificare, care apar la obținerea dendrimerilor, am ales ca strategie de sinteză pentru legarea celor două părți antagonice, condensarea acidă a grupărilor aldehidă cu grupări amină, cu obținerea de legături imină reversibile. Autoasamblarea în structuri sferice ar trebui să fie favorizată de procesele de iminare și transiminare caracteristice legăturilor imină reversibile și de asemenea de tendința naturală de minimizare a energiei. În acest context, există premisele ca, într-un mediu adecvat, compușii obținuți să genereze arhitecturi sferice cu o distribuție largă a funcționalităților pe suprafață, care să permită interacțiuni puternice cu ADN-ul.

III.1 Sisteme dinamice cu miez hidrofob pe bază de trialdehidă și Jeffamină D

Prima serie de compușii hidrofili/hidrofobi care mimează arhitectura dendrimerilor au fost sintetizați prin formarea legăturilor covalente dinamice de tip imină care ajută la autoasamblare prin procese de iminare și trans-iminare pornind de la următorii compuși: trialdehidă, Jeffamină D – ca entități structurale hidrofobe și polietilenimină hiperramificată (bPEI), polietilenimină liniară (lPEI) spermină și polietilenglicol (PEG) – ca structuri hidrofile (Schema 7).



Schema 7. 1,3,5 benzentialdehida 1 reacționează cu Jeffamina 400 și Jeffamina 2000, pentru a forma miezurile hidrofobe **JD1** și **JD2**; structurile amfibile au fost obținute prin formarea de legături imină între **JD1** și segmente hidrofile de PEG și/sau molecule capabile să complexeze ADN-ul: spermină (S), polietilenă liniară (lPEI), polietilenimină hiperramificată (bPEI) cu $M_w=800$, bPEI800 or $M_w=2000$, bPEI2000. Compușii solubili în apă: JD1-bPEI800, JD1-bPEI2000, JD1-PEG-bPEI800, și JD1-PEG-spermină au fost testate în continuare pentru a le testa capacitatea de a interacționa cu ADN-ul.

Determinarea capacității compușilor sintetizați de a forma poliplecși a fost realizată prin electroforeză pe gel de agaroză. Testele au fost efectuate la diferite rapoarte N/P (raportul molar între atomii de azot din structura vectorului sintetizat și atomii de fosfor din ADN). Având în vedere că atât complexarea materialului genetic, cât și eliberarea lui au loc în mediul apos, au fost luați în considerare numai compușii care au fost solubili în apă și anume: *JD1-PEG-PEI800*, *JD1-PEG-Spermină*, *JD1-PEI800* și *JD1-PEI2000*.

Dintre aceștia, au format poliplecși cu ADN-ul numai *JD1-PEG-PEI800*, *JD1-PEI800* și *JD1-PEI2000* (Figura 51), care au fost ulterior caracterizați din punct de vedere morfologic prin microscopie de forță atomică, când au fost puse în evidență forma sferică și dimensiunea nanometrică a poliplecșilor formați.

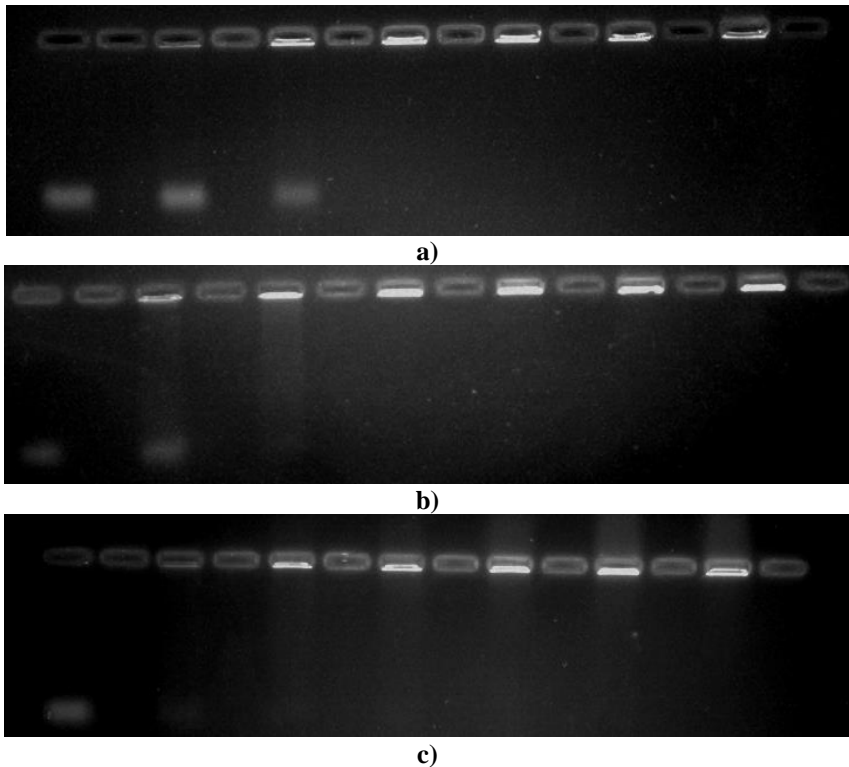


Figura 51. Electroforeză pe gel de agaroză a) *JD1-PEI800*, b) *JD1-PEI2000* pentru rapoarte N/P= 0,5; 1; 3; 5; 10; 20 și c) *JD1-PEG-PEI800*, pentru rapoarte N/P= 1; 3; 5; 10; 15; 20, la pH=7,4; ADN-ul de somon necomplexat a fost utilizat ca și control

Potențialul Zeta al compușilor solubili în apă dar și a poliplecșilor lor a fost determinat prin electroforeză de difuziune a luminii. A fost evidențiat faptul că *JD1-bPEI800*, *JD1-bPEI2000* și *JD1-PEG-bPEI800* prezintă valori pozitive ale potențialului Zeta, în acord cu efectul lor de "burete de protoni" în soluție tampon, în

timp ce poliplecşii prezintă valori negative ale potenţialului Zeta la valori mici ale raportului N/P, atingând valori pozitive odată cu creşterea raportului N/P (+8, +13 şi respectiv +7 mV) pentru o valoare a raportului N/P egală cu 200.

Caracterizarea dimensională şi morfologică a poliplecşilor formaţi a fost realizată prin microscopie de forţă atomică. Figura 55 prezintă imagini reprezentative de microscopie de forţă atomică pentru poliplecşii pe bază de **JDI-PEI800** şi **JDI-PEI2000**, la diferite valori ale raportului N/P. În cazul compusului pe bază de **JDI-PEG-PEI**, nu s-a putut observa nici o structură cu formă regulată.

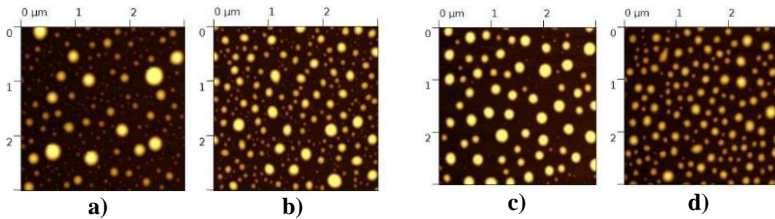


Figura 55. Imagini de microscopie de forţă atomică pentru **JDI-PEI800** la raportul a) N/P=50 şi b) N/P=100 şi pentru **JDI-PEI2000** la raportul c) N/P=50 şi d) N/P=100

Efectul poliplecşilor formaţi utilizând compuşi sintetizaţi cu plasmid pEYFP asupra viabilităţii celulelor HEK 293T a fost determinat prin *metoda MTT*.

Viabilitatea celulelor HEK 293T nu a fost afectată semnificativ atunci când s-au utilizat valori ale raportului N/P mai mici de 50 (peste 90% viabilitate celulară). Peste această valoare a raportului N/P, s-a observat o descreştere a viabilităţii celulare cu 20% şi 60% pentru poliplecşii pe bază de **JDI-PEI2000** şi **JDI-PEI800** la o valoare N/P=100 şi respectiv N/P=200. În cazul compusului PEG-ilat, viabilitatea celulară este menţinută la valori mai mari de 90% chiar şi la raporte N/P mari de 100 şi 200.

Pentru a studia abilitatea compuşilor sintetizaţi de a transporta eficient ADN în celule, s-a urmărit expresia proteinei fluorescente YFP în celule de tip HEK 293T la 48 de ore după transfecţie. Eficienţa de transfecţie s-a determinat calitativ prin vizualizarea celulelor pozitive YFP prin microscopie de fluorescenţă şi cantitativ, utilizând tehnica de citometrie în flux (Figura 58). Rezultatele au fost comparate cu agentul comercial de transfecţie SuperFect® de la Qiagen, în condiţiile în care acesta dă transfecţia maximă. Dintre cele trei materiale studiate, **JDI-PEI2000/pEYFP** prezintă cea mai mare eficienţă de transfecţie.

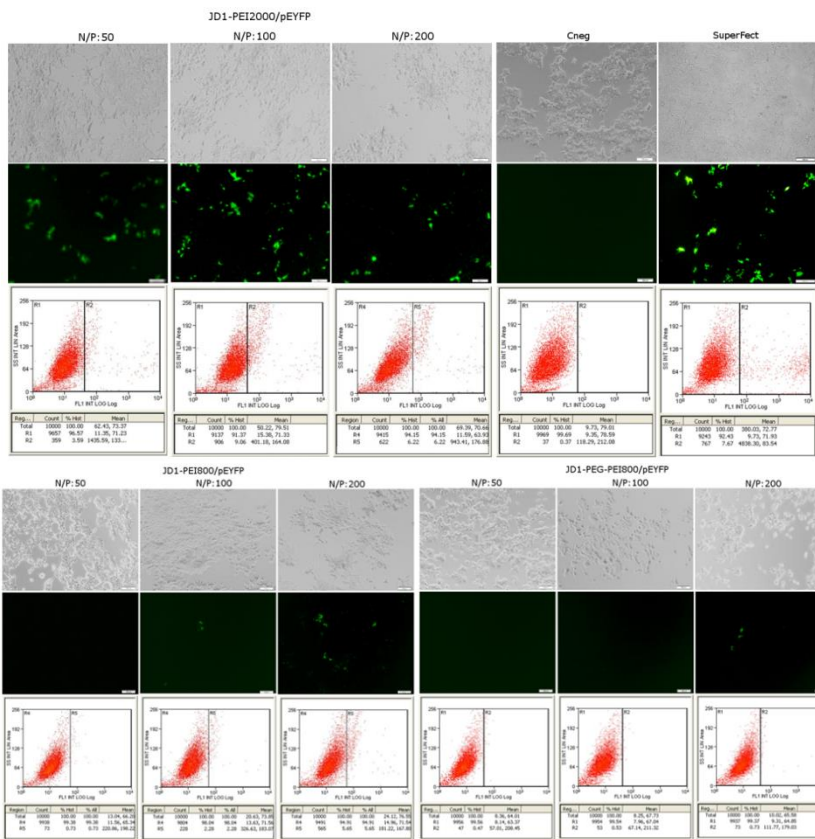


Figura 58. Vizualizarea expresiei proteinei YFP în celulele HEK 293T transfectate cu poliplecșii **JDI-PEI2000/pEYFP**, **JDI-PEI800/pEYFP** și **JDI-PEG-PEI800/pEYFP** la diferite rapoarte N/P. Sunt incluse drept control negativ – celule netratate (Cneg) și drept control pozitiv – celule transfectate cu Superfect. Scala e de 100 μ m. Sunt prezentate și grafice reprezentative de citometrie în flux.

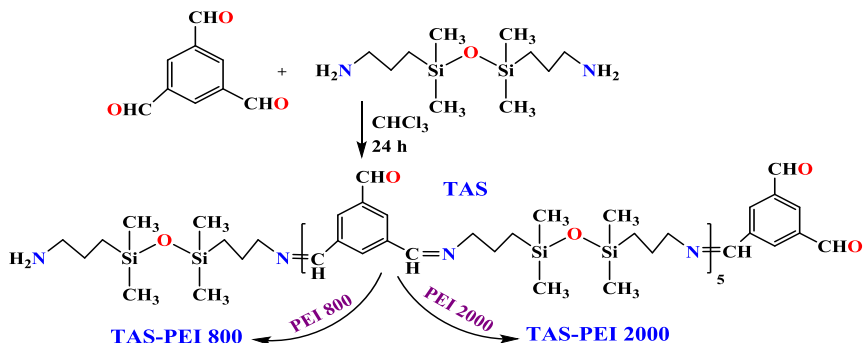
Studiul descris aduce o contribuție importantă la dezvoltarea domeniului terapiei genice, în primul rând prin prezentarea unei noi metode de a obține vectori nonvirali cu efort sintetic minim, utilizând principiile chimiei dinamice.

Principiul a fost verificat pe o serie de trei compuși, obținuți sub formă de nanostructuri sferice prin autoasamblare hidrofob-hidrofil și reacții de iminare și transiminare. S-a demonstrat că PEI hiperramificată cu masă de 2000 de Da în combinație cu blocuri structurale hidrofobe conduce la vectori nonvirali cu eficiență de transfecție mai importantă decât a unui martor comercial.

III.2 Sisteme dinamice cu miez hidrofob pe bază de trialdehidă și siloxan

Având în vedere că designul hidrofob-hidrofil descris anterior a dovedit eficiență de transfecție, am decis să continuăm studiile pe această direcție, utilizând un alt miez structural hidrofob. Date de literatură sugerează introducerea siloxanului hidrofob în crearea de vectori nonvirali drept un bloc structural care influențează pozitiv îmbunătățirea eficienței de transfecție.

Ținând cont de toate acestea am proiectat un nou design miez/manta utilizând chimia dinamică a legăturii imină, pe bază de 1,3,5 benztrialdehidă, 1,3-bis-(3-aminopropil)-1,1,3,3-tetrametilsiloxan și PEI 800 sau PEI 2000 (Schema 8). Conform premiselor teoretice referitoare la compuşii cu caracter amfifil, compuşii sintetizați ar trebui să fie capabili să se autoorganizeze în apă sub formă de structuri sferice, de tipul micelilor, cu un miez hidrofob format din unitățile de 1,3,5 benztrialdehidă și 1,3-bis-(3-aminopropil)-1,1,3,3-tetrametilsiloxan și un înveliș hidrofil pe bază de PEI. Astfel, datorită formei sferice a entităților formate, se obține o suprafață mare care conține centre capabile să complexe ADN-ul, ducând la o eficiență mare de împachetare și la obținerea unor entități stabile.



Schema 8. Obținerea vectorilor nonvirali **TAS-PEI800** și **TAS-PEI2000**

Structurile compuşilor sintetizați au fost confirmate prin rezonanță magnetică nucleară.

Pentru a verifica design-ul teoretic, compuşii sintetizați au fost analizați prin microscopie electronică de transmisie. În ambele cazuri s-a observat formarea unor structuri sferice de dimensiuni nanometrice diferite, în funcție de masa moleculară a PEI –ului utilizat în sinteza.

Determinarea capacității compuşilor sintetizați de a interacționa cu ADN-ul a fost realizată prin electroforeză pe gel de agaroză, utilizând în primă fază un ADN comercial din spermă de somon, pentru diferite valori ale raportului N/P și ulterior utilizând un plasmid cu 4830 de perechi de baze. Ambii compuşii s-au dovedit a fi capabili să reducă mobilitatea electroforetică a materialului genetic.

Caracterizarea dimensională și morfologică a poliplecşilor formați a fost realizată prin *microscopie electronică de transmisie*. Figura 66 prezintă imagini

reprezentative pentru poliplecşii pe bază de *TAS-PEI2000* și *TAS-PEI800*, la diferite valori ale raportului N/P.

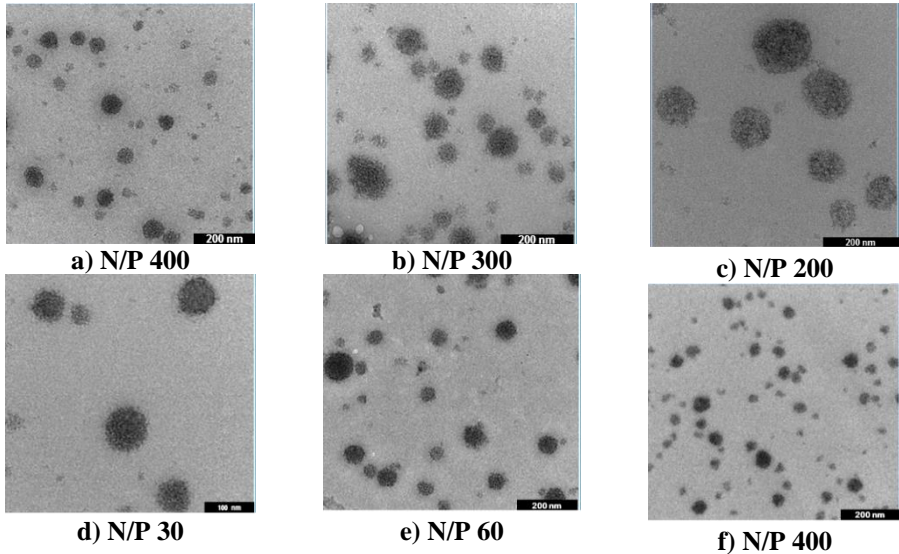
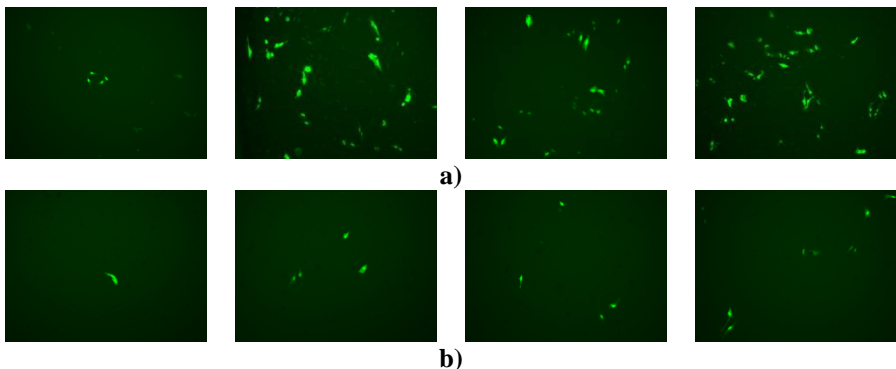


Figura 66. Imagini TEM pentru poliplecşii obținute pe bază de *TAS-PEI800* (a, b, c) și *TAS-PEI2000* (d, e, f) la diferite rapoarte N/P

Testarea citotoxicității poliplecşilor pe bază de *TAS-PEI 800* și *TAS-PEI 2000* a fost realizată pe celule de tip Hela la diferite rapoarte N/P, ambii compuși prezentând o citotoxicitate care permite utilizarea lor ca vectori nonvirali.

Determinarea capacității de transfecție a fost realizată într-o primă etapă calitativ prin *microscopie de fluorescență* folosind gena reporter GFP și s-a observat că eficiența transfecției crește cu creșterea raportului N/P, ambii compuși prezentând o capacitate mai bună de a transfecta celulele de tip Hela comparativ cu PEI-ul simplu, utilizat ca martor (Figura 68).



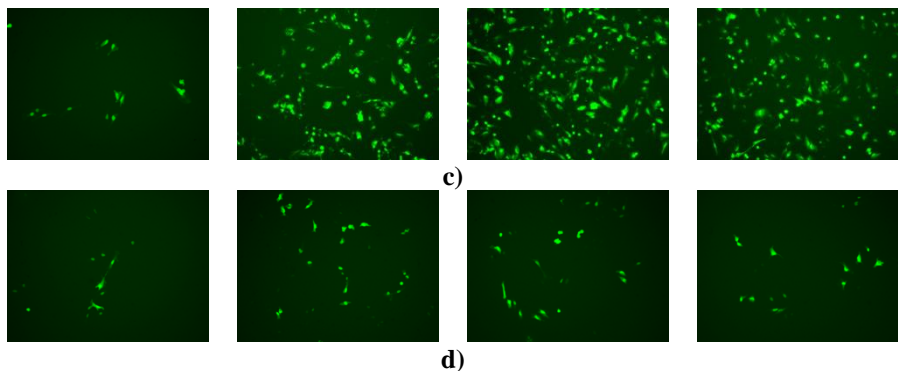


Figura 68. Vizualizarea expresiei proteinei GFP în celulele HeLa transfectate cu poliplecșii pe bază de a) **TAS-PEI800** și b) **PEI800** la diferite rapoarte N/P în ordinea: 100, 200, 400, 600 și respectiv c) **TAS-PEI2000** și d) **PEI2000** la diferite rapoarte N/P în ordinea: 30, 60, 100, 200

Ulterior, eficiența transfecției a fost determinată și cantitativ, prin testul cu Luciferază, când s-a confirmat capacitatea superioară de transfecție a vectorului pe bază de PEI 2000, comparativ cu cel pe bază de PEI 800.

Metoda utilizării chimiei supramoleculare dinamice în sinteza unor compuși care să fie utilizați ca vectori nonvirali în terapia genică a fost validată și de această dată. Astfel, au fost obținute nanoentități sferice prin autoasamblare hidrofob-hidrofil și reacții de iminare și transiminare a doi compuși pe bază de 1,3,5 benzotrientaldehidă, 1,3-bis-(3-aminopropil)-1,1,3,3-tetrametilsiloxan și PEI 800 sau PEI 2000. Compușii s-au dovedit a fi capabili să reducă mobilitatea electroforetică a ADN-ului și mai mult decât atât să formeze cu acesta poliplecși de dimensiuni nanometrice, capabili să penetreze membrana celulelor de tip HeLa, atingând eficiențe de transfecție remarcabile.

CAPITOLUL IV.

Polivinil borat – matrice polimerică pentru obținerea de sisteme PDLC cu potențiale bioaplicații

Aplicarea compozitelor **PDLC** în domeniul biomedical ca irisuri artificiale sau biosenzori pentru fluide biologice și nu numai, implică utilizarea unor matrici polimere biocompatibile. Polimerul utilizat în mod special în asemenea cazuri este polialcoolul vinilic (PVA), datorită proprietăților intrinseci pe care le prezintă: lipsa de toxicitate, biodegradabilitatea totală, stabilitatea chimică foarte bună și capacitatea de a forma filme.¹⁶ Studii dedicate obținerii de sisteme **PDLC** cu ancorare homeotropă a cristalului lichid în matricea polimeră de PVA au concluzionat că pentru atingerea acestui deziderat, este necesară utilizarea unui al treilea component în materialul compozit: un surfactant.¹⁷ Rolul acestuia este de a interacționa cu moleculele de cristal lichid, determinând aliniamentul perpendicular al acestora pe suprafața polimerului și

prin urmare schimbarea configurației directorului, ancorarea planară generată de obicei de PVA, fiind transformată în una homeotropă. Însă prin utilizarea unui component suplimentar în compozit apar noi dificultăți legate de formularea acestuia și de costul compozitului datorită complexității proceselor implicate.

Pentru a evita această problemă introdusă de utilizarea unui surfactant, a fost propusă înlocuirea sistemului PVA/surfactant cu polivinil borat (**PVAB**- un polimer cu capacitate de a promova o atracție electrostatică cu momentul de dipol al moleculelor de cristal lichid, creând astfel premisele ancorării homeotrope.

Pornind de la aceste premise, au fost proiectate și obținute două sisteme de materiale compozite **PVAB**-cristal lichid, primul în care cristalul lichid este un nematogen: 4-ciano-4'-pentilbifenil-ul (**5CB**), și un al doilea în care cristalul lichid este un smectogen: butil-*p*-[*p*'-*n*-octiloxi benzoiloxi]benzoat-ul (**BBO**)

Compozitele de tip **PDLC** au fost obținute prin metoda încapsulării, utilizând diferite rapoarte gravimetrice între cristalele lichide și **PVAB**.

Materialele compozite obținute au format filme flexibile, de sine stătătoare. Proprietățile structurale ale compozitelor, formarea picăturilor, dimensiunea, polidispersitatea acestora, distribuția și configurația, efectul de ancorare și stabilitatea morfologică au fost studiate prin microscopie în lumină polarizată, calorimetrie cu scanare diferențială și microscopie electronică de baleiaj. Au fost determinate și proprietățile de suprafață ale sistemelor **PDLC** rezultate prin măsurarea unghiului de contact și determinarea energiei totale de suprafață și a componentelor acesteia.

Sisteme PDLC pe bază de PVAB și 5CB

Studiile **PDLC**-urilor pe bază de **PVAB** și cristal lichid nematic au demonstrat că matricea polimerică favorizează aliniamentul homeotrop al cristalului lichid nematic în interiorul picăturilor, datorită forțelor de atracție de interfață care se dezvoltă între atomul de bor deficitar în electroni al **PVAB**-ului și gruparea cian bogată în electroni a cristalului lichid **5CB**. Prezența atomului de bor în structura **PVAB**-ului asigură un raport bun între tensiunea superficială și forțele de atracție de interfață, ducând la o distribuție uniformă și o polidispersitate dimensională redusă a picăturilor pentru compozitele cu conținut mai ridicat de cristal lichid, 40% (Figura 71). Diametrul picăturilor este de aproximativ 4μm, dimensiune ideală pentru aplicații optoelectronice.

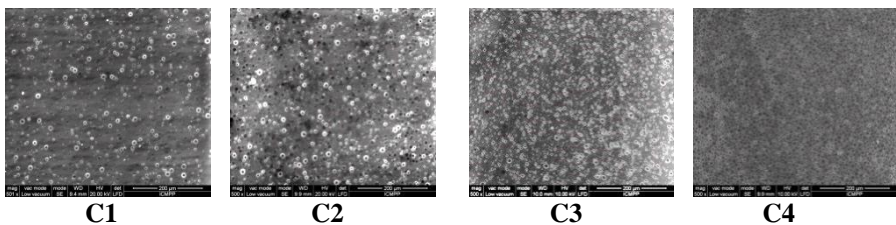


Figura 71. Microfotografii SEM ale filmelor de PDLC

Nemiscibilitatea matricii polimere **PVAB** cu cristalul lichid împiedică pierderea de cristal lichid „consumat” ca plastifiant al matricii polimere, fapt ce prezintă două avantaje: (i) utilizarea unei cantități mai mici de cristal lichid pentru a

obține un conținut ridicat de picături micrometrice și prin urmare un cost mai scăzut și (ii) proprietățile optice ale matricii polimerice sunt conservate în compozitele de tip **PDLC**. Mai mult, măsurătorile de unghi de contact și calculele de energie liberă de suprafață dintre sânge și suprafața filmelor indică o biocompatibilitate potențială a compozitelor preparate.

Acest studiu a demonstrat că polimerul **PVAB** poate să înlocuiască cu succes PVA-ul atunci când se dorește obținerea unui aliniament homeotrop al picăturilor de cristal lichid.

Sisteme PDLC pe bază de PVAB și BBO

Pe de altă parte, obținerea de sisteme de tip **PDLC** bazate pe un smectogen nou și polivinil borat ca matrice polimerică a arătat abilitatea **PVAB**-ului de a constrânge creșterea cristalului lichid în picături smectice cu un diametru mediu de 7 μm , dimensiune ideală pentru aplicații optoelectronice.

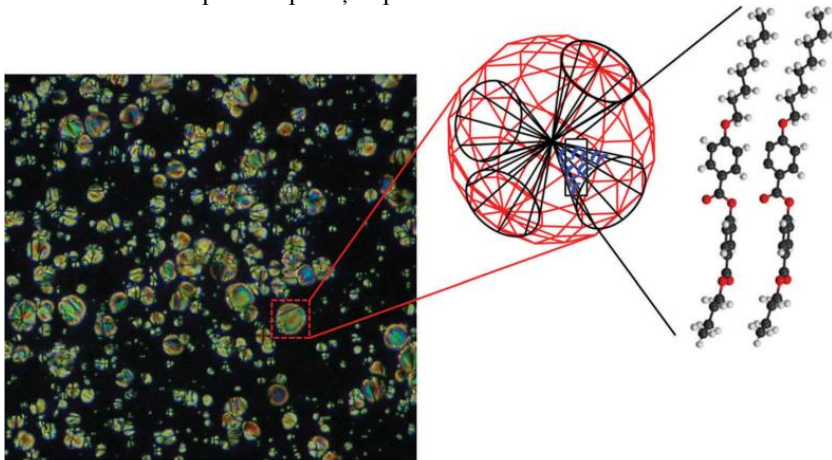


Figura 95. Imagine *MOP* a unui film *PDLC* și topologia texturii poligonale a smecticului *A* în interiorul picăturilor

Și în acest caz a fost observat că cele două componente: **PVAB**-ul și cristalul lichid **BBO** sunt complet nemiscibile, fapt care constituie un avantaj important. Valorile energiei libere de suprafață ale filmelor de **PDLC** sunt destul de ridicate încât să asigure capacitatea sistemului de a răspunde la stimuli electrici, facilitând totodată adeziunea celulelor. Mai mult, hidrofilia filmelor de **PDLC** poate fi reglată prin controlul morfologiei matricii de **PVAB**, astfel încât aceasta să îndeplinească condițiile necesare aplicațiilor biomedicale.

Trebuie menționat faptul că smectogenul utilizat prezintă o tranziție directă smectic-izotrop și o mezofază stabilă pe un interval larg de temperatură (69-28 $^{\circ}\text{C}$), incluzând temperatura corpului uman. Mai mult, el prezintă activitate antimicrobiană împotriva unor agenți patogeni virulenți (Figura 84).

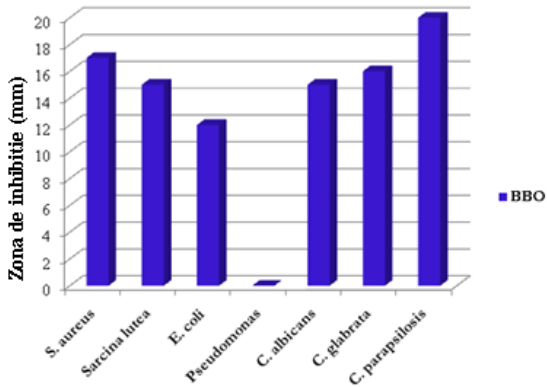


Figura 84. Zona de inhibiție (mm) pentru tulpinile testate

Utilizarea **PVAB**-ului ca matrice polimerică a dus la ancorarea planară a picăturilor de cristal lichid datorită forțelor de atracție dintre atomul de bor deficitar în electroni și unitățile esterice bogate în electroni.

Filmel de sisteme **PDLC** prezintă o distribuție uniformă a picăturilor smectice cu o polidispersitate dimensională redusă, cu picături în jur de 7 μm , dimensiune ideală pentru aplicații în optoelectronică. Cele două componente sunt complet nemiscibile, lucru care elimină situația nedorită în care cristalul lichid acționează ca plastifiant al matricii polimerice. Valorile energiei libere de suprafață a filmelor **PDLC** sunt suficient de ridicate pentru a asigura capacitatea sistemelor de a răspunde la stimuli electrici și adeziunea celulară. Mai mult, hidrofilia filmelor **PDLC** poate fi reglată prin controlul simplu al morfologiei matricii de **PVAB**, astfel încât să îndeplinească cerințele multiplelor aplicații biologice. Toate aceste aspecte recomandă sistemele **PDLC** ca materiale pentru ingineria biomedicală.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată „**Structuri supramoleculare complexe cu aplicații biomedicale**” este structurată în două părți: un studiu de literatură (Capitolul I) și contribuții originale (Capitolele II-IV) și se încheie cu concluziile generale.

Primul capitol rezumă date de literatură privind cele trei direcții diferite ale chimiei supramoleculare abordate în teză: structuri supramoleculare dinamice pe bază de chitosan, vectori non-virali pe bază de imine hidrofob-hidrofile și sisteme compozite de tip **PDLC**.

Rezultatele originale, structurate în trei capitole, s-au concentrat pe următoarele direcții:

- ✓ Obținerea și caracterizarea unor derivați de iminochitosan sub formă de filme și hidrogeluri
- ✓ Sinteza și caracterizarea unor vectori nonvirali pe bază de imine hidrofob-hidrofile

- ✓ Obținerea și caracterizarea unor sisteme de tip PDLC utilizând PVAB-ul ca matrice polimerică

Din studiile întreprinse s-au deprins următoarele concluzii:

1. Au fost sintetizați doisprezece biopolimeri de tip imino-chitosan prin reacția de condensare acidă în soluție apoasă între grupările aminice de pe lanțurile de chitosan și diferite aldehide cu proprietăți biologice

- Spectroscopia FTIR a evidențiat formarea legăturii imină, dar și anumite reorganizări ale legăturilor de hidrogen intra- și inter-moleculare
- Profilul difracției de raze X al biopolimerilor obținuți a prezentat trei picuri de difracție, indicând o arhitectură supramoleculară stratificată apărută ca urmare a exercitării simultane a trei forțe de ordonare: segregare hidrofob/hidrofil; legături intermoleculare de hidrogen între lanțurile de chitosan și interacțiuni aromatic-aromatic
- Suprafața filmelor studiate a prezentat valori mici ale rugozității, caracteristice suprafețelor filmelor netede și totodată valori mici ale deplasării contrastului de fază, indicând diferențe de relief și nu variații ale compoziției chimice
- Studiile DMA au arătat că mici cantități de apă rămân în structura biopolimerilor chiar și după uscarea sub vacuum, facilitând procese de trans-iminare și totodată procese de ordonare chiar și în starea de film
- Toate filmele analizate au prezentat umectabilitate moderată, făcându-le candidați promițători pentru a fi utilizați ca suporturi în ingineria țesuturilor
- Activitatea antimicrobiană a filmelor de iminochitosan, evaluată pe *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, a evidențiat că reversibilitatea legăturii imină conferă filmelor proprietăți dinamice, asigurând o eliberare lentă a aldehidei în mediul microbiologic

2. Au fost obținute hidrogeluri dublu-reticulare pe bază de chitosan, utilizând pentru prima dată acidul 2-fenil-formil-boronic, ca agent de reticulare, în diferite rapoarte de combinare a funcționalităților amină și aldehydă

- A fost sintetizat un compus model prin reacția dintre 2-FPBA și D-glucozamină, unitatea structurală din chitosan
- Datele RMN și FTIR, precum și luminescența albastră a hidrogelurilor obținute și a compusului model au indicat o stabilizarea a legăturii imină formate, printr-o legătură intramoleculară de hidrogen, formând o unitate de tip iminoboronat
- Analiza RMN a indicat o creștere a densității de legături imină, atingându-se un maxim în 7 zile
- Derivații iminoboronat de chitosan au prezentat o morfologie tridimensională stratificată, evidențiată prin studiile de difracție de raze X
- Comportamentul vâscoelastic al hidrogelurilor a fost analizat prin măsurători reologice, constatându-se că se obțin hidrogeluri la valori ale raportului molar amină/aldehydă mai mici de 3,75/1
- Toate hidrogelurile studiate au prezentat un comportament pseudoplastic

- Gradul de umflare al xerogelurilor a fost determinat în trei medii diferite: soluție tampon fosfat cu pH 7,4 apropiat de cel al țesuturilor; soluție tampon acetat cu pH 4,2, valoare apropiată de cea a mediului vaginal; și apă bidistilată. Starea de echilibru a fost atinsă în timp de 48 de ore în apă și soluție tampon fosfat și în 2 ore în soluție tampon acetat, xerogelurile prezentând un grad maxim de umflare cuprins între 15 și 115%, în funcție de pH-ul mediului în care s-a urmărit umflarea
- Activitatea antifungică a hidrogelurilor iminoboronat-chitosan a fost evaluată împotriva a două tulpini de *Candida*: *Candida albicans* și *Candida glabrata*, atât pe plancton, cât și pe biofilm, rezultatele obținute indicând sistemele analizate ca materiale cu potențial real în tratarea Candidozelor recurente

3. Au fost obținute hidrogeluri pe bază de chitosan, utilizând pentru prima dată citralul ca agent de reticulare, în diferite rapoarte de combinare a funcționalităților amină și aldehydă

- A fost sintetizat un compus model prin reacția dintre citral și D-glucozamină
- Hidrogelurile și compusul model au fost caracterizate din punct de vedere structural prin spectroscopie FTIR și RMN
- Analiza RMN a indicat o creștere a densității de legături imină, atingându-se un maxim în 10 zile
- Derivații de citral-iminochitosan au prezentat o morfologie tridimensională stratificată, evidențiată prin studiile de difracție de raze X
- Comportamentul viscoelastic al hidrogelurilor a fost analizat prin măsurători reologice, constatându-se că se obțin hidrogeluri la o valoare a raportului molar amină/aldehydă mai mică de 4,2/1
- Probele de hidrogel au prezentat un comportament tixotrop, prezentând transformări reversibile sol-gel și invers
- Gradul de umflare al xerogelurilor a fost determinat în trei medii de pH diferit: soluție tampon fosfat cu pH 7,4; soluție tampon acetat cu pH 4,2; și apă bidistilată. Echilibrul maxim de umflare a fost atins relativ repede, în trei ore, în soluție tampon acetat și mai lent, în 24 de ore în apă și tampon fosfat. Pentru toate cele trei medii de pH diferit, valorile MES cresc pe măsură ce conținutul de citral și astfel, asociațiile hidrofobe descresc, aproape de până la trei ori în cazul soluției tampon acetat.
- Testarea *in vivo* a biocompatibilității hidrogelurilor a fost realizată, determinând profilului hematologic, biochimic și imunitar al animalelor care au primit substanțele de testat
- Nu au fost înregistrate modificări statistice semnificative ale parametrilor urmăriți, indicând faptul că hidrogelurile analizate sunt biocompatibile
- Analiza histologică efectuată cu microscopul optic asupra preparatelor de țesut hepatic recoltate de la animalele care au fost tratate cu hidrogelurile analizate nu a pus în evidență modificări semnificative ale arhitecturii normale, comparativ cu animalele care au primit ser fiziologic (lotul martor)
- A fost testată preliminar capacitatea hidrogelurilor obținute de a încapsula molecule hidrofobe, prin testarea capacității de absorbție a unui compus hidrofob fluorescent,

rezultatele obținute indicând premise de încapsulare a unor medicamente hidrofobe în acest tip de hidrogeluri

4. Au fost sintetizați compuși hidrofil/hidrofobi care mimează arhitectura micelilor prin formarea legăturilor covalente dinamice de tip imină între un miez hidrofob pe baza unei trialdehide aromatice și Jeffamină D (JD1) și diverse blocuri hidrofile: polietilenimină hiperramificată, polietilenimină liniară, spermină și polietilenglicol

- Compușii au fost caracterizați din punct de vedere structural prin spectroscopie RMN și GPC, tehnici care au confirmat obținerea structurilor dorite
- Capacitatea compușilor de a complexa materialul genetic a fost evidențiată prin electroforeză pe gel de agaroză, rezultate bune fiind obținute pentru compușii cu înveliș hidrofil pe bază de PEI 800, PEI 2000 și PEG-PEI800
- Compușii pe bază de PEI800, PEI2000 și PEG-PEI800 au fost capabili să se autoasambleze în structuri sferice asemănătoare micelilor cu un miez hidrofob înconjurat de un înveliș hidrofil, așa cum a fost evidențiat prin microscopie electronică de transmisie
- Compușii care conțin PEI necomplexați cu ADN prezintă un potențial Zeta ζ pozitiv, în acord cu efectul de burete de proton în soluție tampon, care duce la prezența sarcinilor pozitive pe suprafața vectorului
- S-a constatat că morfologia poliplecșilor depinde de mărimea PEI-ului și de raportul N/P, poliplecșii obținuți pentru rapoarte N/P mai mici de 200 prezentând formă sferică, în timp ce cei obținuți la rapoarte N/P mai mari neavând o formă regulată
- Viabilitatea celulară determinată în cazul amestecurilor pEYFP/PEI la rapoarte similare N/P nu a arătat nici o influență asupra celulelor HEK 293T pentru rapoarte mai mici de 100, în timp ce o descreștere a viabilității celulare cu 30% a fost indusă când este utilizat un raport egal cu 200
- Dintre cei trei compuși studiați, **JDI-PEI2000** a prezentat cea mai mare eficiență de transfecție, mai mare chiar decât a unui agent comercial de transfecție (Superfect)

5. Au fost sintetizați compuși hidrofil/hidrofobi prin formarea de legături covalente dinamice de tip imină între un miez hidrofob pe bază de trialdehidă și 1,3-bis-(3-aminopropil)-1,1,3,3-tetrametilsiloxan (TAS) și două blocuri hidrofile: polietilenimină hiperramificată cu masa moleculară 2000 Da și polietilenimină hiperramificată cu masa moleculară 800 Da.

- Compușii au fost caracterizați din punct de vedere structural prin spectroscopie RMN și GPC, tehnici care au confirmat obținerea structurilor dorite
- Capacitatea compușilor de a complexa materialul genetic a fost evidențiată prin electroforeză pe gel de agaroză, ambii compuși fiind capabili să rețină ADN-ul de somon și plasmidul de la valori relativ mici ale raportului N/P
- Ambii compuși au format structuri sferice, de tipul micelilor, cu polidispersitate dimensională redusă
- Dimensiunea poliplecșilor depinde de mărimea PEI și de raportul N/P, toți poliplecșii obținuți având o morfologie sferică, dar cu dimensiuni diferite, în domeniul zecilor de nanometri, așa cum a fost demonstrat prin TEM

- Testarea citotoxicității poliplecșilor pe bază de **TAS-PEI 800** și **TAS-PEI 2000** a fost realizată pe celule de tip Hela la diferite rapoarte N/P, o viabilitate celulară satisfăcătoare fiind obținută până la N/P=100, în cazul compusului pe bază de PEI 2000 și respectiv N/P=400, în cazul compusului pe bază de PEI 800
 - Eficiența transfecției a fost determinată calitativ și cantitativ, ambele metode dovedind capacitatea superioară de transfecție a vectorului pe bază de PEI 2000 comparativ cu cel pe bază de PEI 800
6. Au fost obținute sisteme de tip PDLC, utilizând pentru prima dată PVAB-ul ca matrice polimerică, folosind un nematogen comercial: 5CB și un smectogen proiectat și sintetizat în laboratorul nostru: BBO
- PDLC-urile obținute au fost caracterizate prin microscopie optică în lumină polarizată, microscopie electronică de baleiaj și calorimetrie cu scanare diferențială, tehnici care au evidențiat capacitatea polimerului ales de a genera picături sferice, de dimensiuni micrometrice în ambele cazuri
 - Au fost evaluate unghiul de contact și energia liberă de suprafață a filmelor de PDLC, valorile obținute indicând o potențială biocompatibilitate a acestor sisteme, făcându-le materiale cu potențiale aplicații în domeniul biomedical
 - În cazul smectogenului BBO, a fost efectuată o testare preliminară a activității antimicrobiene împotriva unor agenți patogeni precum: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Sarcina lutea* ATCC 9341 ca bacterii gram pozitive, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ca bacterii gram negative și *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC MYA 2950 și *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ca fungi

Rezultatele originale prezentate în teză au fost publicate sub formă de articole științifice în reviste internaționale și naționale cotate ISI.

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. Luminita Marin, **Daniela Ailincăi**, Elena Paslaru, Monodisperse PDLC composites generated by use of polyvinylalcohol boric acid as matrix, *RSC Advances*, **2014**, 4, 38397 -38404. (**ISI: 3,289**)
2. **Daniela Ailincăi**, Andrei Bejan, Irina Titorencu, Mioara Dobrota, Bogdan C. Simionescu, Imino-chitosan derivatives. Synthetic pathway and properties, *Revue Roumaine de Chimie*, **2014**, 59, 385-392. (**ISI: 0,21**)
3. Luminita Marin, **Daniela Ailincăi**, Mihai Mares, Elena Paslaru, Mariana Cristea, Valentin Nica, Bogdan C. Simionescu, Imino-chitosan biopolymeric films. Obtaining, self-assembling, surface and antimicrobial properties, *Carbohydrate Polymers*, **2015**, 117, 762-770. (**ISI: 4,2**)
4. **Daniela Ailincăi**, Luminita Marin, Sergiu Shova, Cristina Tuchilus, Benzoate liquid crystal with direct isotropic-smectic transition and antipathogenic activity, *Comptes Rendus Chimie*, **2015**, doi. org/10.1016/j.crci.2016.01.008. (**ISI: 1,798**)

5. **Daniela Ailincăi**, Cosmin Farcau, Elena Paslaru & Luminita Marin, PDLc composites based on polyvinyl boric acid matrix – a promising pathway towards biomedical engineering, *Liquid Crystals*, doi:10.1080/02678292.2016.1172353 (**ISI: 2,244**)
6. **Daniela Ailincăi**, Luminita Marin, Simona Morariu, Mihai Mares, Andra-Cristina Bostanaru, Mariana Pinteala, Bogdan C. Simionescu, Mihai Barboiu, Dual crosslinked iminoboronate-chitosan hydrogels with strong antifungal activity against *Candida* planktonic yeasts and biofilms, *Carbohydrate Polymers*, **2016**, 152, 306–316. (**ISI: 4,2**)
7. Luminita Marin, **Daniela Ailincăi**, Manuela Calin, Daniela Stan, Cristina Constantinescu, Laura Ursu, Florica Doroftei, Mariana Pinteala, Bogdan C. Simionescu, Mihai Barboiu, Dynamic Frameworks for DNA Transfection, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2016**, **2**, 104-111.

Lucrări publicate în reviste cotate ISI (rezultate care nu sunt incluse în teză)

1. **Daniela Ailincăi**, Helmut Ritter, Cyclodextrin-poly(ϵ -caprolactone) based nanoparticles able to complex phenolphthalein and adamantyl carboxylate, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2014**, 5, 651–657. (**ISI:2,778**)
2. Andrei Bejan, Luminita Marin, Bogdan Chiricuta, **Daniela Ailincăi**, Bogdan C. Simionescu, A new phenothiazine blue light emitter. Synthesis, structure and photophysical properties, *Revue Roumaine de Chimie*, **2016**, 61(4-5), 291-297. (**ISI: 0,21**)

Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:

1. "*Biologically inspired systems for engineered structural and functional entities*", PNII-ID-PCCE-2011-2-0028.
2. "*Diode electroluminiscente organice flexibile cu emisie în alb pentru iluminare*", PNII-PT-PCCA-2013-4-1861.
3. "*Multifunctional dynamic hydrogels with tuned morphology for biomedical applications*", PN-II-RU-TE-2014-4-2314.
4. "*SupraChem Lab*", Horizon 2020 WIDESPREAD 2-2014: ERA Chairs.
5. *PN III-P3-3.6-H2020-2016-0011*
6. "*New approaches in designing polymer surfaces with controllable pattern for applications in biomedicine and high technologies*", PN-II-RU-TE-2014-4-2976.

Mobilități în timpul tezei de doctorat

1. La Institutul de Chimie Nucleară și Tehnologie, Varșovia, Polonia în cadrul programului **Erasmus +** "*Joint innovative training and teaching/learning program in enhancing development and transfer knowledge of application of ionizing radiation in materials processing*".
2. La Universitatea din Palermo, Italia în cadrul programului **Erasmus +** "*Joint innovative training and teaching/learning program in enhancing development and transfer knowledge of application of ionizing radiation in materials processing*".

Participări la sesiuni științifice naționale și internaționale

a) Comunicări orale

1. **Daniela Ailincăi**, Luminita Marin, Dragos Peptanariu, Daniela Stan, Cristina Ana Constantinescu, Manuela Calin, Mariana Pinteala, Mihail Dumitru Barboiu, Synthese et caracterisation d'un nouveau transporteur non-viral d'ADN, a base de benztrialdehyde, Jeffamine D et polyethyleneimine (pei) ramifie, *8ème Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée (COFrRoCA)*, **2014**, Montpellier, Franta.
2. **Daniela Ailincăi**, Luminita Marin, Mihai Mares, Bogdan C. Simionescu, The synthesis and characterization of new imino-chitosan biopolymeric films with antimicrobial properties, *3^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Medicinale*, **2014**, Iasi, Romania.
3. **Daniela Ailincăi**, Non-Viral Gene Delivery Vectors based on Dynamic Hydrophobic – Hydrophilic Imines, *Seventh Cristofor I. Simionescu Symposium Frontiers in Macromolecular and Supramolecular Science*, **2015**, Iasi, Romania.
4. **Daniela Ailincăi**, Bogdan C. Simionescu, Luminita Marin, Polymer dispersed liquid crystals based on polyvinylalcohol boric acid matrix, *International Conference on Materials Science, Applied Physics and Chemistry*, **2015**, Londra, Marea Britanie.
5. **Daniela Ailincăi**, Mariana Pinteala, Mihai Barboiu, Luminita Marin, Chitosan iminoboronate hydrogels with antifungal activity, *ACS on Campus*, **2016**, Bucuresti, România.
6. **Daniela Ailincăi**, Mariana Pinteala, Bogdan C. Simionescu, Mihai Barboiu, Luminita Marin, Hydrogels based on chitosan and 2-formylphenyl boronic acid – promising materials for the treatment of Candida infections, *XIIth French-Romanian Polymer Meeting*, **2016**, Sophia Antipolis, Franța.
7. **Daniela Ailincăi**, Luminița Marin, Chitosan based hydrogels via iminoboronate motif as promising materials for the treatment of candidiasis, **2016**, *A-XXXIV-a Conferința Nationala de Chimie, Căciulata, România*

b) Prezentare de postere

1. **Daniela Ailincăi**, Mariana Pinteala, Bogdan C. Simionescu, Luminita Marin, Chitosan Iminoboronate Hydrogels – New Promising Materials for the Treatment of Candidiasis, *Eighth Cristofor I. Simionescu Symposium – Frontiers in Macromolecular and Supramolecular Science*, Iasi, Iunie, 2016
2. Geta David, Adina Coroaba, Laura Elena Ursu, Dragos Peptanariu, **Daniela Ailincăi**, Mariana Pinteala, Hybrid biopolymer/synthetic multilayer micro-/nanocapsules for drug/gene delivery, *Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials*, Martie, Sitges, Spania.
3. **Daniela Ailincăi**, Luminita Marin, Carmen-Mihaela Popescu, Supramolecular chitosan hydrogels via reversible imine linkage, *2nd EPNOE Junior Meeting*, October, **2016**, Sophia Antipolis, France

Bibliografie selectivă

- (1) Lehn, J.-M. *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 151.
- (2) Huang, F.; Anslyn, E. V. *Chemical reviews* **2015**, *115*, 6999.
- (3) Lehn, J.-M. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 3276.
- (4) Zhang, Y.; Legrand, Y.-M.; van der Lee, A.; Barboiu, M. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, 1825.
- (5) Cram, D. J. *Nature* **1992**, *356*, 29.
- (6) Lehn, J. M. *Topics in current chemistry* **2012**, *322*, 1.
- (7) Stadler, A.-M.; Ramírez, J. In *Constitutional Dynamic Chemistry*; Barboiu, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2012**, p 261.
- (8) Sun, X.; James, T. D. *Chemical reviews* **2015**, *115*, 8001.
- (9) Vriezema, D. M.; Comellas Aragones, M.; Elemans, J. A.; Cornelissen, J. J.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. *Chemical reviews* **2005**, *105*, 1445.
- (10) Haag, R. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 278.
- (11) Cook, T. R.; Vajpayee, V.; Lee, M. H.; Stang, P. J.; Chi, K.-W. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 2464.
- (12) Li, J.; Hu, W.; Zhang, Y.; Tan, H.; Yan, X.; Zhao, L.; Liang, H. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2015**, *53*, 1235.
- (13) Langton, M. J.; Beer, P. D. *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 1935.
- (14) Cheng, X.-H.; Gao, H.-F. In *Hydrogen Bonded Supramolecular Materials*; Li, Z.-T., Wu, L.-Z., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2015**, p 133.
- (15) Gabrielson, N. P.; Cheng, J. *Biomaterials* **2010**, *31*, 9117.
- (16) Teperek, A.; Czajkowski, W.; Fabianowski, W. **1995**; Vol. 2372, p 408.
- (17) Amimori, I.; Eakin, J. N.; Qi, J.; Skacej, G.; Zumer, S.; Crawford, G. P. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **2005**, *71*, 031702.