



**ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI
ROMÂNE**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE CHIMICE
Institutul de Chimie-Fizică „Ilie Murgulescu”**

Domeniul CHIMIE

***“DESIGN-UL ȘI STUDIUL STRUCTURAL AL UNOR
COMPLECȘI BIOPOLIMERICI INTELIGENȚI CU
POTENȚIALE APLICAȚII MEDICALE”***

**REZUMATUL TEZEI DE
DOCTORAT**

Conducător de doctorat,
DR. CS I. ANGELESCU DANIEL-GEORGE

Studentă-doctorandă,
VIȘAN (căs. TOMA) RALUCA-MARIETA

ANUL 2024

CUPRINS

Listă de abrevieri.....	6
PARTEA TEORETICĂ.....	8
Introducere.....	9
CAPITOLUL I. NOȚIUNI INTRODUCTIVE.....	11
1.1. Studiul polimerilor biologici de tip carbohidrat (chitosan, CT).....	12
1.2. Acidul fitic, AF- un reprezentat ciclic al clasei de polifosfați.....	15
1.3. Design-ul unor complecși biomacromoleculari pe bază de chitosan	18
1.4. Aplicații ale complecșilor pe bază de carbohidrați în încapsularea unor substanțe cu relevanță biologică și farmaceutică (acid cafeic, acid ferulic, quercetina).....	21
1.5. Sinteza și obținerea de complecși polielectrolitici pe bază de chitosan	24
CAPITOLUL II. TEHNICI EXPERIMENTALE ÎN CARACTERIZAREA COMPLECȘILOR POLIELECTROLITICI	27
2.1. Împrăștierea dinamică a luminii	28
2.2. Spectroscopie de infraroșu cu transformată Fourier.....	32
2.3. Spectroscopie de absorbție în UV-Vis.....	33
2.4. Spectroscopie de fluorescență	35
2.5. Microscopie de forță atomică	36
CAPITOLUL III. TEHNICI DE SIMULARE MOLECULARĂ.....	38
3.1. Dinamica moleculară pentru medii cu relevanță biologică	39
3.2. Potențiale de interacție în dinamica moleculară	42
3.3. Condiții de frontieră, sumare Ewald și echilibru cu un rezervor.....	44
3.4. Parametrii structurali și energetici de interes, extrași din simulările de dinamică moleculară	47
3.5. Trecerea de la descrierea atomistică la una granulară, compatibilă cu câmpul de forțe Martini.....	51
PARTEA EXPERIMENTALĂ	55
CAPITOLUL IV. REZULTATE REMARCABILE PUBLICATE.....	56

4.1 Aplicarea câmpului clasic de forțe GROMOS pentru modelarea computațională a acidului fitic, quercetinei și a lanțului de chitosan printr-un nivel de detaliere atomică.....	57
4.2. Mecanismul de reticulare al chitosanului în prezența acidului fitic, evidențiat prin dinamică moleculară.....	66
4.3. O abordare complementară a studiului experimental și computațional cu privire la încapsularea quercetinei în complexul chitosan-acid fitic.....	92
4.4. Modelarea granulară a acidului fitic în studiul proceselor de reticulare ionică din constituența hidrogelurilor pe bază de chitosan	119
Concluzii generale și perspective.....	151
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	157
Anexe.....	177

Cuvinte-cheie: chitosan-acid fitic, quercetină, dinamică moleculară

Introducere

Biopolimerii reprezintă o clasă de macromolecule naturale cu aplicabilitate în domeniul medical [1]. Chitosanul (CT) este un exemplu de polimer natural, care se extrage din chitină, principalul constituent al exoscheletului organismelor marine [2]. Versatilitatea CT contribuie la posibilitatea de funcționalizare a unor biomateriale de tipul microsferelor, filmelor subțiri, nanoparticulelor ori a gelurilor macroscopice pentru studierea profilurilor de eliberare a unor molecule mici, cum este și cazul quercetinei (Qu) [3], [4]. Datorită protonării puternice în mediu acid a grupelor amino din unitățile glucozaminice, lanțurile de CT se pot asocia prin intermediul legăturilor electrostatice cu reticulări de natură fizică [5]. Acidul fitic (AF) este un tip de polifosfat cu structură circulară, în care șase grupe fosfat, sunt grefate prin intermediul legăturilor fosfoesterice de un ciclohexan. Proprietățile antioxidante, hepatoprotective ori anticarcinogenice permit utilizarea AF în dezvoltarea unor biomateriale pe bază de CT [7], [8].

Pornind de la aceste considerente, prezenta teză de doctorat intitulată “*Design-ul și studiul structural al unor complecși biopolimerici inteligenți cu potențiale aplicații medicale*” propune atât investigații experimentale, cât și computaționale ale polimorfismului unor rețele pe bază de CT și AF, care pot capta quercetina, un polifenol cu o serie de caracteristici biologice. Scopul principal al directivei de cercetare constă în înțelegerea mecanismului molecular de interacție a CT cu AF, a conformației adoptate de rețea, a morfologiei complecșilor polimerici obținuți și a optimizării proceselor de încapsulare sau de facilitare a transportului quercetinei. Mai mult de atât, mecanismele moleculare responsabile pentru procesul de reticulare au fost investigate printr-un nivel de detaliere atomistic, respectiv granular, compatibil cu cele două câmpuri de forță aferente, GROMOS 56ACARBO și Martini 2.P. Teza doctorală cuprinde o parte teoretică și una experimentală și este divizată în patru capitole, având la bază atât o introducere amplă în studiul complecșilor biopolimerici, cât și contribuții originale aferente. Capitolele I-III includ date din literatură, concepte de bază și expuneri ale tehnicilor experimentale (DLS, FT-IR, UV-Vis, fluorescență și AFM) și computaționale (modelare atomistică / la scară redusă) abordate pentru susținerea rezultatelor originale. Capitolul IV este dedicat rezultatelor remarcabile, publicate în articole de specialitate.

CAPITOLUL IV. REZULTATE REMARCABILE PUBLICATE

4.1. Aplicarea câmpului clasic de forțe GROMOS pentru modelarea computațională a acidului fitic, quercetinei și a lanțului de chitosan printr-un nivel de detaliere atomică

Geometria inițială a CT a fost generată cu pachetul Avogadro [9], iar topologia a fost preluată din implementarea propusă de Naumov & Ignatov [10] pentru structuri de tip carbohidrat. Modelul polimeric dezvoltat are la bază o succesiune de patru unități monomerice de CT. În mod particular, doi monomeri ai lanțului de CT au fost definiți, ca fiind unități monomerice terminale și au fost abreviați CHT0 & CHTN. Unitățile monomerice intermediare abreviate CHTP & CHT conțin fie grupe amino protonate, fie grupe neprotonate. Cu alte cuvinte, o unitate principală N-protonată β -D-glucopiranoză fost modificată prin adăugarea de i) o grupă OH pentru a reprezenta unitățile terminale; ii) a unui atom de hidrogen pentru a defini unitatea terminală CHTN sau iii) acetilată, la nivelul grupei $-NH_2$ pentru monomerul ACE. Structurile atomice, precum și denumirile atribuite formelor deacetilate sunt redată în Figura 4.1.

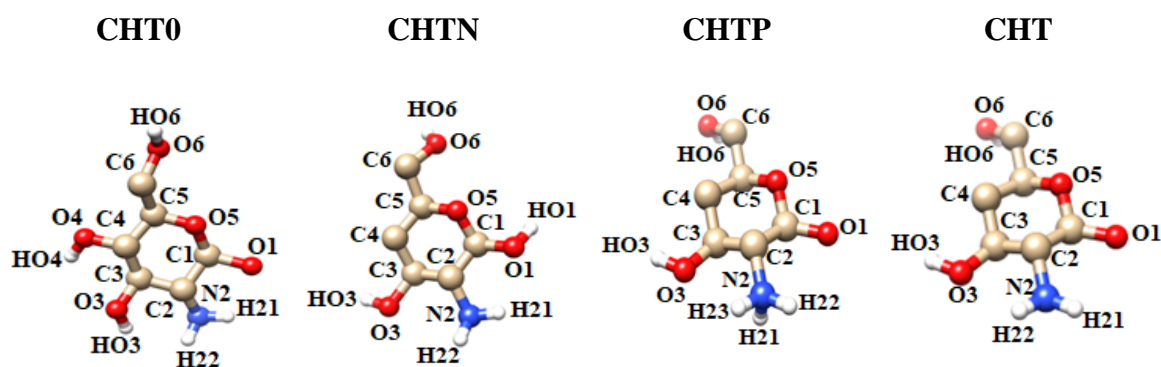
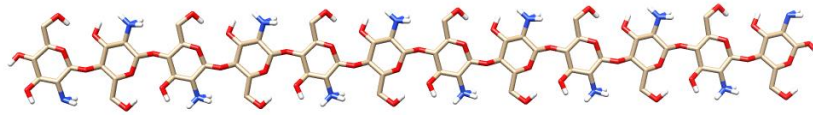


Figura 4.1. Numerotarea atomilor pentru monomerii de chitosan (CT): terminali CHT0 și CHTN și intermediari CHTP și CHT.

Unitățile terminale au fost considerate întotdeauna electroneutre, în timp ce prin alternarea celorlalte trei tipuri de monomeri, și anume CHT, CHTP sau ACE, se poate obține orice secvență dorită în structura lanțului de CT. În Figura 4.2. sunt ilustrate exemple de lanțuri cu diferite grade de protonare (ne)acetilate, care au fost investigate în cuplarea mediată de prezența anionului fitat.

CHT0-CHTP₁₀-CHTN



CHT0-(CHTP₂-CHT-CHTP-CHT)₂-CHTN



CHT0-(CHTP-CHT₂-CHTP-CHT)₂-CHTN



CHT0-CHT₁₀-CHTN



CHT0-(ACE)₁₀-CHTN



Figura 4.2. Secvențele lanțurilor de CT. Codul de culoare este atribuit astfel: C – alb/gri, O – roșu și N – albastru.

Planul inozitolului este redat prin pozițiile atomilor de carbon: C, C1, C2, C3, C4, C5, care reproduce forma scaun a inelului. Atomii de oxigen fosfoesterici O18, O19, O21, O23 și O22 sunt situați în planul de inozitol, în timp ce atomul O20 este poziționat perpendicular pe plan. Această structură a fost optimizată cu ajutorul server-ului de calcul *Automated Topology Builder* (ATB) [11].

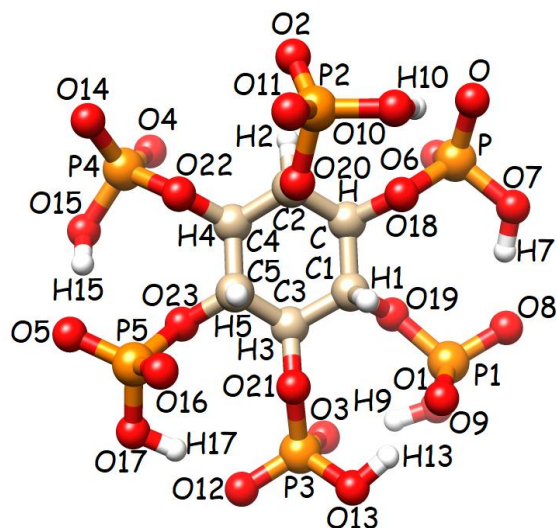


Figura 4.3. Structura anionului fitat hexavalent și numerotarea atomilor în vederea constituirii topologiei moleculei în reprezentarea de tip sferă-legătură.

Studiul computațional al quercetinei (Qu) a avut la bază reprezentare acesteia în forma sa neutră, iar stereochimia moleculei a fost construită în mod similar cu abordarea implementată la construcția atomistică a AF. Astfel, structura inițială a fost construită cu ajutorul programului Avogadro 1.2.0, utilizată ulterior pe server-ul *Automated Topology Builder* (ATB) pentru obținerea structurii de echilibru și a topologiei compatibile cu câmpul de forțe menționat. Geometria rezultată este prezentată în Figura 4.4.

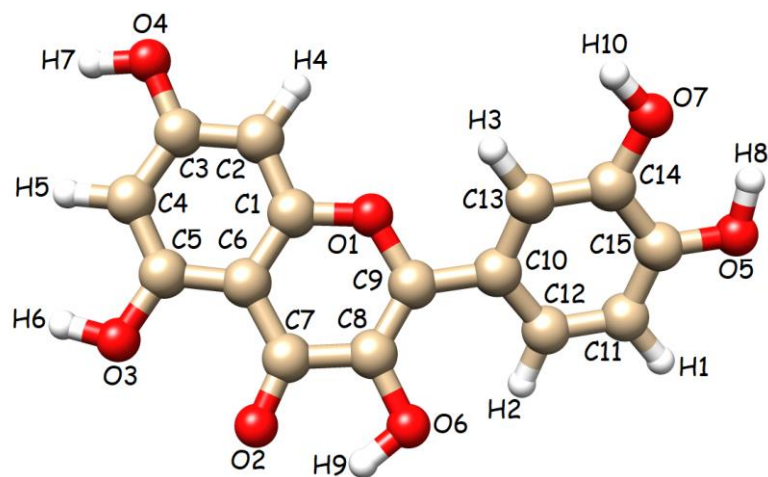


Figura 4.4. Geometria și indexarea atomilor reprezentării atomistice pentru Qu

4.2. Mecanismul de reticulare al chitosanului în prezența acidului fitic, evidențiat prin dinamică moleculară

Din punct de vedere experimental, sinteza nanoparticulelor de CT și AF a pornit de la prepararea unor soluții stoc de chitosan în soluție de acid acetic (1%), respectiv, acid fitic (1%). pH-ul (2,6) soluției de CT a fost ajustat cu o soluție 1M de HCl. Soluția de AF a fost filtrată, cu ajutorul unui microfiltru, având diametrul de 0,45 μm , iar cea de CT a fost trecută printr-o hârtie de filtru calitativă. Soluția finală de fitat a fost adăugată în picătură în cea de CT, cu ajutorul unei seringi de 10 mL, sub agitare magnetică (750 rpm) timp de 30 de minute. S-au întocmit următoarele sisteme pe baza rapoartelor masice CT:AF (1:1; 3:1; 5:1). În timpul agitării, s-au format agregate, care au fost separate ulterior prin centrifugare la 5000 de rpm-uri, timp de 120 de minute, la temperatura camerei. După îndepărtarea supernatanților, peleții obținuți au fost colectați și purificați prin spălare repetată cu apă ultrapură. Înainte de realizarea experimentelor, probele au fost redispersate și omogenizate, cu ajutorul unei băi de ultrasonare (10 minute, la temperatura camerei) și de asemenea, cu ajutorul unui ultrasonator vertical cu omogenizare, timp de 5-15 minute la temperatura camerei.

Simulările de dinamică moleculară au avut la bază implementarea unui model atomistic pentru descrierea lanțurilor de chitosan, respectiv a acidului fitic. În construcția lanțurilor polimerice, s-au considerat patru unități monomerice, două capete, abreviate cu CHT0 & CHTN și două unități intermediare CHTP & CHT. Prin alternanța unităților intermediare din constituența unei secvențe polimerice formate din 12 monomeri, s-au obținut sisteme cu grade de protonare diferite: 0,83 (toate unitățile intermediare au fost protonate); 0,5 și 0,33 (două secvențe simetrice intermediare au fost protonate aleatoriu); 0,0 (sistem neutru din punct de vedere electric) și ACE (în care grupe amino din unitățile intermediare prezintă acetilări). În cazul sistemului cu cel mai ridicat grad de protonare (0,83) nu a fost posibilă și protonarea unitățile terminale, datorită restricțiilor aplicate câmpului de forță GROMOS 56A_{CARBO}. Structurile și abrevierile celor cinci sisteme model sunt prezentate în Tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Secvența unităților glucozaminice pentru un lanț de CT alcătuit din 12 monomeri; a)–d) grade de protonare diferite 0,83, 0,50, 0,33, 0,00 și CT acetilat; Structurile au fost obținute prin adăugarea de grupe de tipul $-\text{NH}_3^+$, $-\text{NH}_2$ și $-\text{NHCOCH}_3$ la atomul C2 al unității glucozaminice, iar unitățile terminale prezintă doar grupa NH_2 .

Grad de protonare	Secvență
0,83	CHT0-CHTP ₁₀ -CHTN
0,50	CHT0-(CHTP ₂ -CHT-CHTP-CHT) ₂ -CHTN
0,33	CHT0-(CHTP-CHT ₂ -CHTP-CHT) ₂ -CHTN
0,0	CHT0-CHT ₁₀ -CHTN
ACE	CHT0-(CHT-ACE) ₁₀ -CHTN

Metoda computațională presupune plasarea aleatorie a unui număr de zece lanțuri de CT și a unui număr variabil de molecule de acid fitic (5, 10, 40) într-o construcție cubică cu dimensiuni prestabilite (10 nm x 10 nm x 10 nm). Ulterior, cutia a fost solvatată cu aproximativ 32,000 de molecule fiind compatibilă cu câmpul de forțe GROMOS 56A_{CARBO}. Electroneutralitatea mediului a fost asigurată prin adăugarea de ioni Na^+ și contraioni de Cl^- . Simulările au fost efectuate în condiții de periodicitate 3D, la presiune și temperatură constantă, folosind pachetul de dinamică moleculară GROMACS 4.5.4 [12]. Ulterior, a avut loc o minimizare a energiilor în 50,000 de pași, urmată de o pre-echilibrare de 1 ns în ansamblul canonic NVT. Rulările efective din cadrul cărora au fost extrase datele structurale, s-au realizat într-un interval de timp de 150 ns, la $T = 300 \text{ K}$ și $p = 1 \text{ atm}$.

Tabel 4.2. Descrierea sistemelor CT-AF investigate

Sistem	Număr de molecule		Număr și tip
	Chitosan	Acid fitic	Contraioni
CHT-PA			
CHT-083-05	10	5	70 Cl^-
CHT-083-10	10	10	40 Cl^-
CHT-083-40	10	40	140 Na^+
CHT-050-10	10	10	/
CHT-033-10	10	10	20 Na^+
CHT-0-40	10	40	240 Na^+
CHT-ACE-40	10	40	240 Na^+

Rezultatele teoretice obținute au permis analiza conformațională aprofundată a complecșilor, modul de formare și natura legăturilor de hidrogen, realizarea hărților de contur specifice distanțelor minime între centrii de interacție (CT-AF), stabilirea unghiurilor diedre și de torsiune, respectiv, calcularea energiei libere de legare, cu ajutorul parametrilor de pliere Cremer-Pople. În procesul de reticulare al rețelei se evidențiază faptul că un singur anion fitat poate lega de la două până la șase lanțuri de chitosan. De asemenea, două grupe fosfat pot reticula un singur lanț de CT, mai precis, două unități glucozaminice consecutive. Interacția dintre polimer și reticulant este una de natură electrostatică, extrem de puternică. Analiza conformațională este completată și de modul de formare al legăturilor de hidrogen între grupele fosfat, respectiv, cele amino și hidroxil ale CT. Distribuția circulară a grupelor fosfat din structura inozitolului determină polimorfismul rețelei de CT și AF. Atracția electrostatică dintre aceste unități și grupele amino, respectiv hidroxil, influențează orientările conformaționale aproximativ izotrope la nivelul joncțiunilor. CT permite asocierea cu anionii fitat, prin legături electrostatice foarte puternice, formând complecși insolubili. În cazul unui sistem neutru din punct de vedere electric și în cazul în care există acetilări la nivelul unităților intermediare, doar o parte din moleculele de AF se regăsesc în imediata apropiere a lanțurilor. O scădere a numărului de legături de hidrogen este evidențiată în cazul unui sistem complet neprotonat. În cazul sistemelor cu grade de protonare variate, capacitatea de formare a legăturilor de hidrogen crește, fiind posibile interacții ale grupelor fosfat, cu cele amino și hidroxil, aparținând a două unități glucozaminice adiacente. Rezultatele computaționale au fost completate de o serie de investigații experimentale pe baza spectroscopiei FT-IR și a măsurătorilor de împrăștiere dinamică a luminii pentru sisteme de tipul CT-AF, obținute la diferite rapoarte masice pentru o înțelegere exhaustivă a aranjamentului molecular al rețelei reticulate.

4.3. O abordare complementară a studiului experimental și computațional cu privire la încapsularea quercetinei în complexul chitosan-acid fitic

Polimorfismul rețelei investigate în subsecțiunea precedentă a condus atât din punct de vedere experimental, cât și computațional la posibilitatea de înglobare în matricea polimerică reticulată, a unei molecule mici, hidrofobe, din clasa polifenolilor, anume quercetina (Qu). Studiul computațional a implicat o analiză structurală, pe baza datelor energetice extrase din dinamica moleculară, care au arătat faptul că încapsularea și retenția eficientă a quercetinei este datorată capacității mari de asociere a acesteia prin legături de hidrogen, atât de lanțurile de chitosan, cât și în prezența sistemelor formate de CT și AF.

Rezultatele teoretice au fost completate de o serie de studii experimentale, care au pornit de la procedura de sinteză a nanoparticulelor după cum urmează: CT a fost solubilizat în soluție de acid acetic pentru a obține o concentrație de 1% și lăsat peste noapte pentru echilibrare, sub agitare magnetică, la temperatura camerei. De asemenea, o soluție stoc de AF (1%) a fost preparată în apă ultrapură și lăsată peste noapte, în condițiile menționate anterior. Concentrația finală a soluției de quercetină (1,5 mg/mL în etanol pur 99%) a fost de 5×10^{-3} M. Un volum de 150 μ L din soluția stoc de Qu a fost adăugat în trei flacoane diferite, procedură urmată de evaporarea solventului. În probele existente au fost adăugate volume corespunzătoare ale unor soluții de CT având concentrații variate (0,05%, 0,1% și 0,2 %). Probele au fost sonicate aproximativ 5 minute în baia de ultrasonare, la temperatura camerei. Un volum de 60 μ L din soluția de AF a fost adăugat în fiecare probă, sub agitare magnetică la 750 rpm-uri. După apariția fenomenului de opalescență, probele au fost centrifugate timp de 30 de minute la 5000 de rpm-uri, spălate cu apă ultrapură și redispersate în 4 mL volum de analiză. Supernatanții au fost măsurați spectrofotometric pentru calcularea eficienței de încapsulare a Qu, iar probele au fost investigate prin diferite metode experimentale de lucru.

Proprietățile fizico-chimice ale nanoparticulelor de tipul Qu-CT-AF au fost investigate prin spectroscopie de fluorescență, FT-IR, UV-Vis și prin măsurători de împrăștiere dinamică a luminii. Studiile experimentale au fost completate de analiza morfologiei nanoparticulelor prin intermediul microscopiei de forță atomică (Figura 4.5). Pentru aprofundarea înțelegerii mecanismului molecular, au fost realizate simulări de dinamică moleculară, atât pe sisteme de tipul CT-Qu, cât și pe sisteme reticulate, Qu-CT-AF.

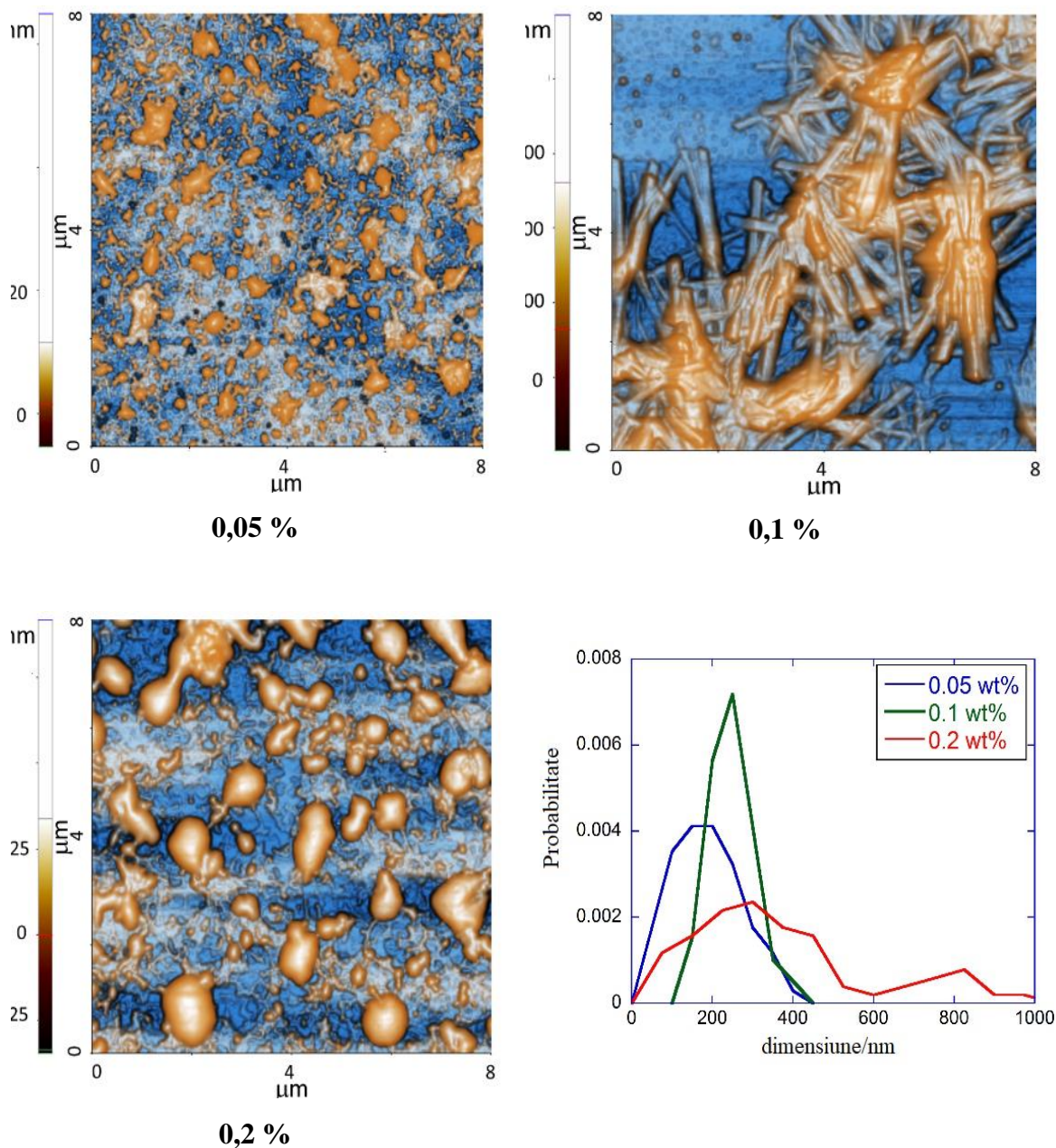


Figura 4.5. Imagini reprezentative în modul tapping cu contrast îmbunătățit de fază și distribuția dimensiunii particulelor Qu-CT-AF la concentrațiile indicate de CT.

În vederea realizării simulărilor computaționale, s-a creat o cutie cubică, având următoarele dimensiuni: 10 x 10 x 10 nm. În interiorul acesteia, au fost plasate zece lanțuri de CT (fiecare conținând 12 unități monomerice, iar cele intermediare, în număr de 10, au fost protonate). Cele zece lanțuri au fost plasate în cutie, fie libere, fie reticulate cu 10 molecule de acid fitic. În ambele tipuri de sisteme au fost adăugate câte cinci molecule de Qu, a căror capacitate de legare de lanțurile polimerice a fost investigată pentru evaluarea eficienței de încapsulare a complexului format. Introducerea în cutie a Qu a fost urmată de

o echilibrare extensivă a rețelei polimerice. În oricare dintre cele două sisteme, moleculele de Qu au fost plasate aleatoriu. Cutia a fost solvatată cu molecule de apă, descrise cu ajutorul câmpului de forță SPC (model extins de încărcare punctuală simplă). În cele din urmă s-au adăugat contraioni de Cl^- pentru asigurarea electroneutralității celulei de simulare. Simulările de dinamică moleculară au fost performate cu ajutorul software-ului Gromacs, versiunea 2019.1.

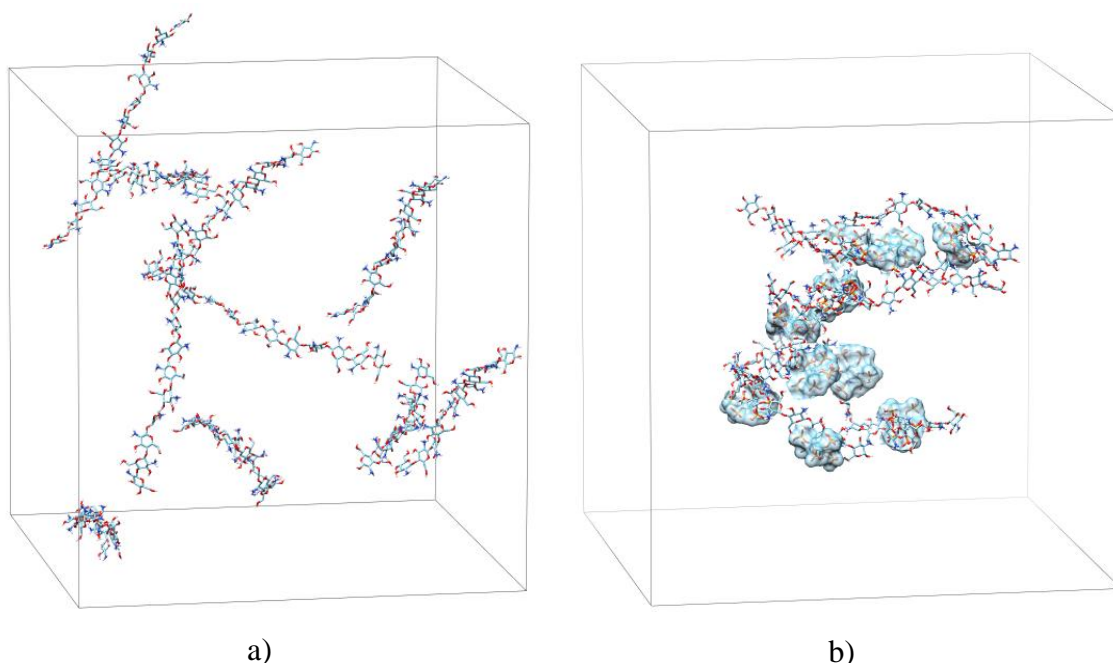


Figura 4.6. Configurația inițială a) a lanțurilor libere de CT (reprezentate cu bețe) și b) a lanțurilor reticulate cu ajutorul AF (reprezentate de anvelopa semitransparentă prezentă în cutia de simulare)

În cazul interacției Qu-CT în soluții apoase, legăturile de hidrogen se stabilesc, în principal, cu grupele hidroxil, care aparțin fragmentului cinamoil și a celor amino din unitățile glucozaminice ale CT. Aceste interacții specifice conduc la imobilizarea semnificativă a Qu la nivelul lanțului polimeric. Acest fapt explică anizotropia mărită și aspectul vibrațional prezent în comportamentul fluorescent și în randamentul de înglobare al Qu în rețeaua formată. Microscopia atomică de forță evidențiază morfologii variate ale sistemelor de tipul Qu-CT-AF, aspect fibrilar sau de tip sferă, obținute la diferite concentrații de polimer. În ceea ce privește capacitatea de încapsulare, aceste nanosisteme prezintă caracteristici similare, indiferent de morfologia adoptată. Complexul CT-AF poate fi utilizat în studii cu privire la încapsularea, eliberarea sigură și controlată a unor substanțe active. Atât

conținutul variat de polimer din soluțiile precursor, cât și polaritatea solventului ales pentru realizarea dializei nu influențează semnificativ cantitatea eliberată de antioxidant. Cu toate că AF posedă un rol suplimentar de stabilizare și captare a polifenolului, acesta nu influențează modul de legare al Qu de lanțurile de CT.

Tabel 4.3. Raportul intensității fluorescente I_T/I_N și anizotropia r pentru 6×10^{-5} M Qu în diferite medii

Probă	I_T/I_N^b	r	
		$\lambda_{em}(450\text{ nm})^a$	$\lambda_{em}(575\text{ nm})^b$
Tampon PBS:DMSO 1:0,0	1,59±0,03	0,095±0,009	0,084±0,004
Tampon PBS:DMSO 1:0,25	3,55±0,03	0,098±0,003	0,082±0,004
0,05 % CT	1,57±0,02	0,303±0,003	0,257±0,003
0,1 % CT	1,01±0,03	0,208±0,002	0,252±0,003
0,2 % CT	0,50±0,02	0,142±0,001	0,242±0,003
0,05 % CT -1,2 mM AF	1,93±0,2	0,390±0,004	0,259±0,004
0,1 % CT – 1,2 mM AF	1,98±0,03	0,376±0,004	0,256±0,003
0,2 % CT – 1,2 mM AF	1,46±0,03	0,317±0,004	0,257±0,003

^a $\lambda_{ex} = 340\text{ nm}$; ^b $\lambda_{ex} = 370\text{ nm}$

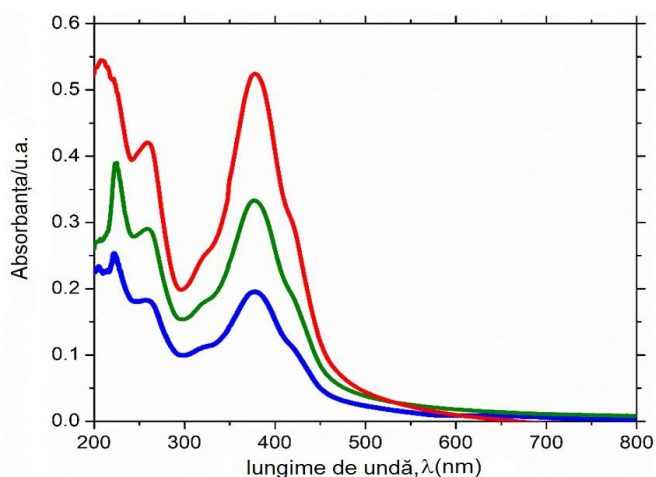


Figura 4.7. Spectre UV-Vis ale supernatanților rezultați în urma sintezelor, pornind de la soluțiile precursor de CT cu albastru- 0,5 % , verde- 0,1 % și roșu- 0,2 %.

4.4. Modelarea granulară a acidului fitic în studiul proceselor de reticulare ionică din constituența hidrogelurilor pe bază de chitosan

Pentru o mai bună interpretare a mecanismelor moleculare și a proprietăților fizico-chimice specifice gelurilor de natură ionică, s-au construit și parametrizat modele la scară redusă pentru chitosan și anionul fitat, compatibile cu câmpul de forță Martini 2.3P. Investigarea computațională a constat în studierea procesului de gelificare ionică pentru o soluție de polimer, având un grad de protonare ridicat. În modelul granular, interacțiile nespecifice dintre AF și CT au fost derivate, având ca scop reproducerea corectă a proprietăților structurale, furnizate pe baza rezultatelor modelării atomistice. Modelarea la scară redusă a analizat proprietățile dinamice și configuraționale ale lanțurilor polimerice reticulate la nivelul grupelor fosfat. De asemenea, s-a implementat și studiat topologia rețelei preexistente și impactul excesului de reticulant asupra organizării lanțului, pe o durată mai mare de timp.

Lanțul de CT este reprezentat cu ajutorul unor secvențe de monomeri de glucozamină neacetilată, iar explicitarea tuturor atomilor a fost posibilă, cu ajutorul construcției de poliglucoze dezvoltate de Naumov și Ignatov [10], model bazat pe câmpul de forță GROMOS 56A_{CARBO}. Structura inițială a lanțului de CT a fost construită cu ajutorul pachetului Avogadro [9] și a cuprins un grup de șase reziduuri protonate (o unitate de referință protonată de tip CHTP). Grupelor protonate le-au fost adăugate două unități terminale (CHT0 și CHTN). Au fost realizate simulări individuale pentru CT și AF și pentru sisteme având raportul 1:3. În ambele cazuri, moleculele de interes au fost introduse într-o cutie cubică, cu lungimea de 5,5 nm, în care au fost solvate molecule de apă (cu descriere SPC). S-a considerat o distribuție inițială aleatorie a constituenților, iar câteva molecule de solvent au fost înlocuite cu ioni mici de Na⁺ sau Cl⁻, pentru obținerea condițiilor de electroneutralitate. Simulările de dinamică moleculară au fost realizate prin aplicarea condițiilor periodice de frontieră implementate de software-ului Gromacs.

Fragmentul polimeric linear a fost construit pe baza grupării atomilor C și O din inelul de glucozamină și a atomilor de O din legătură glicozidică, sub forma unor reprezentări granulare de tipul B2 (de tip polar, *P1*, în descrierea câmpului Martini). Granula denumită B1 (de tip polar, *P2*, în descrierea câmpului Martini) include OH-ul lateral, iar granula denumită B3 (în Martini sunt specificate cu *Q0* și *P4*) asociază hidroxilul și partea amino aflate în opoziție cu grupa hidroxil din granula B2. Pentru unitatea B3, granulele Martini

implementate au fost cele de tip *P4*, specifice monomerilor terminali, neutri din punct de vedere electric, respectiv, *Q0*, pentru granulele cu sarcină +1e.

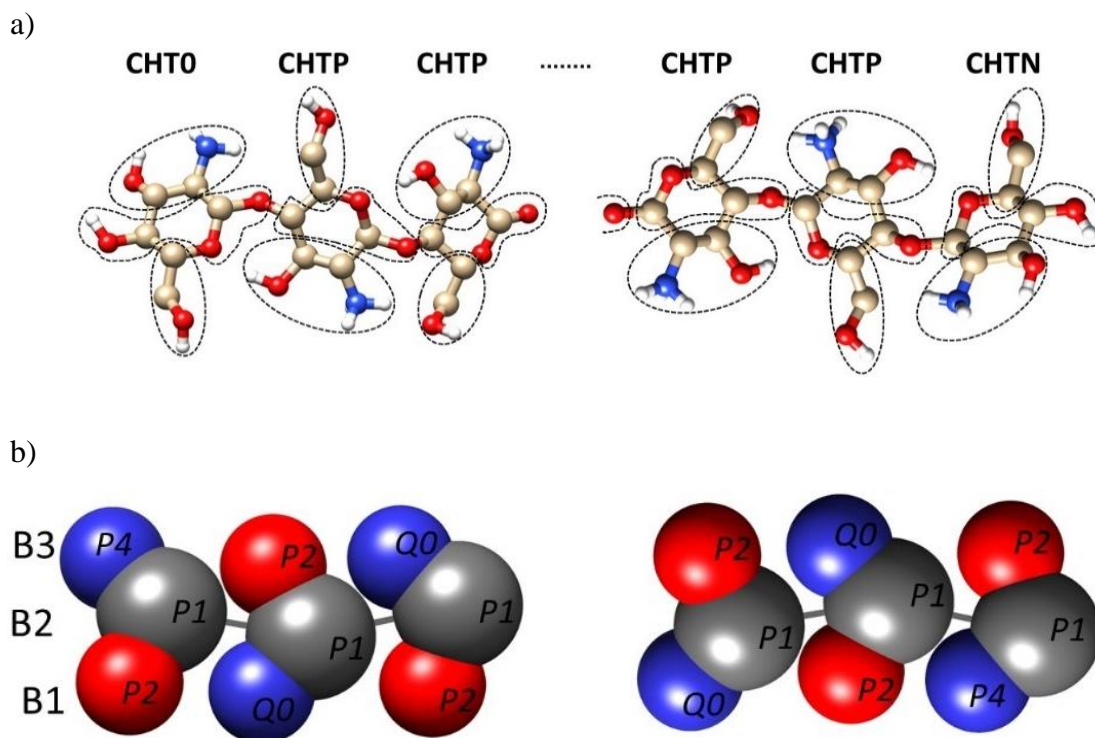


Figura 4.8. Reprezentarea geometrică a tuturor atomilor și atribuirea granulelor în modelarea la scară redusă pentru CT; zonele punctate în a) înconjoară atomii atribuiți unei granule, numele fiecărei granule este specificat lângă aceasta, iar în b) *fontul italic* desemnează tipul de granulă specific modelului Martini 2.2P.

Construcția primului tip de particulă corespunde centrului geometric a doi atomi de C și de O din inel, plus atomii de tip P de la nivelul legăturilor fosfoesterice corespunzătoare. Miezul este reprezentat prin trei sfere denumite C1-C3. Fiecare dintre aceste trei granule sunt de tipul *SNa* în descrierea câmpului de forță Martini 2.2P. *SNa* este atribuit datorită pierderii polarității miezului de mio-inozitol, atunci când grupa hidroxil este înlocuită de legătura fosfoestică. Pentru grupele fosfat s-a ales o reprezentare polară de tip *Sqa*, fiecare granulă purtând o sarcină negativă și fiind poziționată în afara planului (PO2) sau în planul inozitolului, granulele PO1, PO3-PO6.

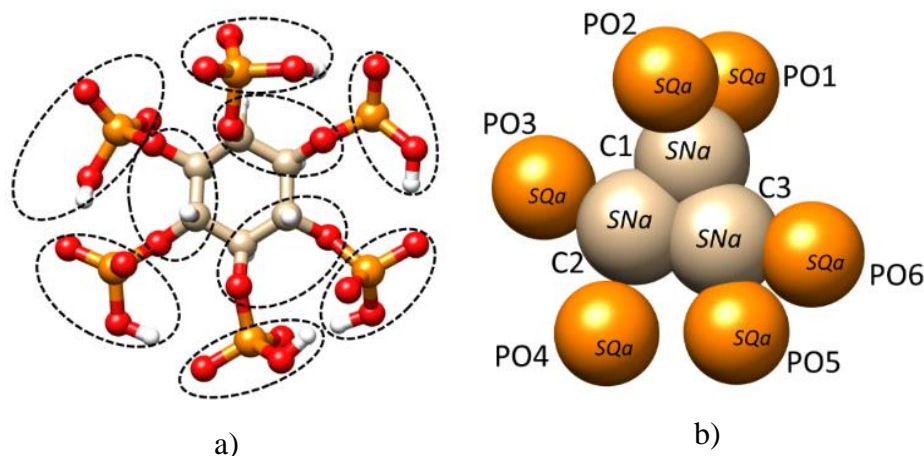


Figura 4.9. a) Reprezentarea geometrică a tuturor atomilor și b) atribuirea granulelor în modelul la scară redusă pentru AF; zonele punctate în a) înconjoară atomii atribuiți unei granule, numele fiecărei granule este specificat lângă aceasta în b) cu *font italic* este reprezentat tipul de granulă specific câmpului de forță Martini 2.2P.

CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Prezenta teză de doctorat propune o cercetare științifică exhaustivă, cu privire la investigarea design-ului unor complecși biopolimerici pe bază de chitosan și acid fitic, cu ajutorul metodelor experimentale și computaționale conexe. Simulările realizate prin intermediul dinamicii moleculare permit înțelegerea mecanismului molecular de reticulare al chitosanului și impactul grupelor funcționale asupra morfologiei legăturilor mediate de reticulant. Capacitatea grupărilor fosfat de a stabili legături de hidrogen, cu grupele amino protonate/neutre din structura unităților monomerice intermediare, respectiv cu grupele hidroxil poziționate pe unități monomerice adiacente permit înțelegerea mecanismul molecular de reticulare. De asemenea, posibilitatea de înglobare a quercetinei în matricea polimerică reticulată a fost studiată din punct de vedere computațional și experimental. S-a examinat și determinat modalitatea de formare a legăturilor de hidrogen în sistemele precursor, respectiv în nanoparticulele care conțin polifenol. Morfologia lor a fost analizată prin microscopie atomică de forță și prin măsurători de împrăștiere dinamică a luminii. Comportamentul fluorescent al quercetinei în diferiți solvenți, anizotropia caracteristică, profilul de eliberare, eficiența de încapsulare a polifenolului în nanoparticule și legăturile formate în structura complecșilor au fost profund investigate. În funcție de concentrația de polimer, complecșii sintetizați pot prezenta formă sferică sau fibrilară. Sistemele pe bază de

chitosan și acid fitic formează o rețea bine definită și foarte stabilă, permițând captarea eficientă a quercetinei. Cu ajutorul câmpului de forță Martini 2.3P, au fost parametrizate modele la scară redusă pentru chitosan și acid fitic, cu scopul studierii mecanismelor moleculare pentru sisteme supramoleculare. Modelarea la scară redusă examinează proprietățile dinamice și configuraționale ale lanțurilor reticulate de CT la nivelul grupelor fosfat, ținând cont de implementările aduse modelării atomistice. De asemenea, a fost studiată topologia rețelei preexistente și impactul excesului de reticulant asupra organizării lanțului pe o durată mai mare de timp.

Modelul de reticulare abordat propune o interpretare solidă a mecanismelor de interacție și a proprietăților fizico-chimice pentru posibilitatea dezvoltării unor geluri ionice. Modelarea la scară redusă este considerată a fi un instrument extrem de valoros pentru explorarea fenomenelor moleculare, care pot avea loc și în alte tipuri de sisteme polimerice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] N. A. Pattanashetti, G. B. Heggannavar, and M. Y. Kariduraganavar, “Smart Biopolymers and their Biomedical Applications,” *Procedia Manuf*, 2017, doi: 10.1016/j.promfg.2017.08.030.
- [2] G. Crini, “Historical review on chitin and chitosan biopolymers,” *Environmental Chemistry Letters*. 2019. doi: 10.1007/s10311-019-00901-0.
- [3] A. Das, T. Ringu, S. Ghosh, and N. Pramanik, “A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers,” *Polymer Bulletin*, 2022, doi: 10.1007/s00289-022-04443-4.
- [4] S. Nathiya, M. Durga, and T. Devasena, “Quercetin, encapsulated quercetin and its application- A review,” *Int J Pharm Pharm Sci*, vol. 6, pp. 20–26, 2014.
- [5] R. M. Visan, A. R. Leonties, L. Aricov, V. Chihaia, and D. G. Angelescu, “Polymorphism of chitosan-based networks stabilized by phytate investigated by molecular dynamics simulations,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 23, no. 39, 2021, doi: 10.1039/D1CP02961D.

- [6] A. S. Sandberg and N. Scheers, "Phytic Acid: Properties, Uses, and Determination," in *Encyclopedia of Food and Health*, 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00544-4.
- [7] J. Nissar, T. Ahad, H. R. Naik, and S. Z. Hussain, "A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical," ~ 1554 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2017.
- [8] Z. Sang *et al.*, "Comparison of three water-soluble polyphosphate tripolyphosphate, phytic acid, and sodium hexametaphosphate as crosslinking agents in chitosan nanoparticle formulation," *Carbohydr Polym*, vol. 230, p. 115577, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115577.
- [9] M. Hanwell, D. Curtis, D. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, and G. Hutchison, "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. J Chem Inf 4," *J Cheminform*, vol. 4, p. 17, 2012, doi: 10.1186/1758-2946-4-17.
- [10] V. S. Naumov and S. K. Ignatov, "Modification of 56ACARBO force field for molecular dynamic calculations of chitosan and its derivatives," *J Mol Model*, vol. 23, no. 8, p. 244, 2017, doi: 10.1007/s00894-017-3421-x.
- [11] A. K. Malde *et al.*, "An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0.," *J Chem Theory Comput*, vol. 7, no. 12, pp. 4026–4037, Dec. 2011, doi: 10.1021/ct200196m.
- [12] M. J. Abraham *et al.*, "GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers," *SoftwareX*, vol. 1–2, pp. 19–25, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Lucrări publicate în jurnale științifice cotate ISI ale căror rezultate au făcut subiectul tezei de doctorat:

1. **Raluca M. Visan**, Anca R. Leonties, Ludmila Aricov, Viorel Chihaiia and Daniel G. Angelescu* “Polymorphism of chitosan-based networks stabilized by phytate investigated by molecular dynamics simulations”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2021, 23, 22601-22612, **(IF 3.676)**
2. **Raluca M. Visan***, Anca R. Leonties, Mihai Anastasescu and Daniel G. Angelescu, “Towards understanding the interaction of quercetin with chitosan-phytate complex: An experimental and computational investigation”, *Journal of Molecular Liquids*, 2023, 380, 121673, **(IF 6.0)**
3. **Raluca M. Visan &** Daniel G. Angelescu*, “Coarse-grained model of phytic acid for predicting the supramolecular architecture of ionically crosslinked chitosan hydrogels”, *Journal of Physical Chemistry B*, 2023, 127, 25, 5718-5729, **(IF 3.3)**

Lucrări publicate în jurnale științifice cotate ISI care sunt conexe cu subiectul tezei de doctorat (rezultate neincluse în teza de doctorat):

1. Ludmila Aricov, Adina Raducan, Ioana Catalina Gifu, Elvira Alexandrescu, Aurica Precupas, Alexandru Vincentiu Florian Neculae, **Raluca Marieta Visan**, Alina Morosan, Anca Ruxandra Leonties, “The Immobilization of Laccase on Mixed Polymeric Microspheres for Methyl Red Decomposition”, *Coatings*, 2022, 12, 1965, **(IF 3.4)**

Conferințe:

1. **Raluca Marieta Vișan**, Daniel Angelescu, "An experimental study model and computational design for the chitosan-phytic acid complex" (prezentare orală); CCSAR, București, noiembrie 2021;

2. **Raluca-Marieta Vișan**, Anca-Ruxandra Leonties, Ludmila Aricov, Daniel-George Angelescu, “*Novel perspective into chitosan-based materials for its broad applications*” (prezentare orală), NeXT Chem, Ediția a-IV-a, București, mai 2022;
3. **Raluca M. Vișan**, Anca R. Leonties, Ludmila Aricov, Mihai Anastasescu and Daniel G. Angelescu, “*The study of a natural antioxidant interaction with a biomaterial substrate*” (poster); 9th IUPAC International Conference on Green Chemistry (9th ICGC), Atena, septembrie 2022;
4. **Raluca M. Vișan***, Anca R. Leonties, Mihai Anastasescu și Daniel G. Angelescu, “*Molecular architecture of biopolymeric complexes*” (prezentare orală), MacroYouth 2022, Iași, noiembrie 2022.
5. **Raluca-Marieta Vișan**, Daniel Angelescu, „ *A coarse-grained model of chitosan for a physical cross-linking pattern*” (poster); ROMPHYSICHEM, București, septembrie 2023;