



ȘCOALA DE STUDII AVANSAȚE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE CHIMICE
INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ - ILIE MURGULESCU
Domeniul CHIMIE

SISTEME TERMOSENSIBILE STUDIATE PRIN
SPECTROSCOPIA DE REZONANȚĂ ELECTRONICĂ DE
SPIN ȘI METODE CALORIMETRICE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:
DR. CS I. IONIȚĂ ELENA GABRIELA

Student-doctorand:
NECULAE ALEXANDRU-VINCENȚIU-FLORIAN

2024

CUPRINS

| | |
|--|----|
| INTRODUCERE | 4 |
| PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII | 5 |
| Capitolul 1. Sisteme moleculare cu proprietăți care pot fi modulate termic..... | 5 |
| Capitolul 2. Spectroscopia de Rezonanță Electronică de Spin..... | 7 |
| Capitolul 3. Analiza termică. Microcalorimetrie cu Scanare Diferențiată..... | 8 |
| PARTEA A II-A. PARTEA DE CONTRIBUȚII PERSONALE (ORIGINALĂ) | 9 |
| Capitolul 4. Interacția flavonoidului Morină cu Albumina Serică Bovină..... | 9 |
| Capitolul 5. Interacția 4-fenoxianilină marcată cu spin cu BSA în apă și în soluție de trehaloză | 10 |
| Capitolul 6. Studiu fizico-chimic privind organizarea moleculară în sisteme care conțin Pluronici direcți sau inverși. Efectul acidului hialuronic..... | 12 |
| Capitolul 7. Complecși de tip „ <i>gazdă-oaspete</i> ” ai nitroxizilor funcționalizați cu catenă alifatică și nitroxizilor β -fosforilați cu ciclodextrine..... | 15 |
| 7.1. Modificările conformaționale ale nitroxizilor β -fosforilați - un instrument de bază în studiul interacțiunilor de tip „ <i>gazdă-oaspete</i> ” | 15 |
| 7.2. Investigarea soluțiilor de surfactant ionici în prezența ciclodextrinelor folosind ca sonde moleculare nitroxizi β -fosforilați..... | 18 |
| 7.3. Noi sonde moleculare de spin pentru studiul sistemelor autoasamblate..... | 20 |
| CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE | 22 |
| BIBLIOGRAFIE | 23 |
| LISTA CU LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE | 26 |

CUVINTE-CHEIE

- ◇ spectroscopie RES;
- ◇ microcalorimetrie;
- ◇ complecși „*gazdă-oaspete*”;
- ◇ sisteme termosensibile.

INTRODUCERE

Încă de la începutul secolului al XXI-lea, Spectroscopia de Rezonanță Electronică de Spin (spectroscopia RES) a cunoscut o dezvoltare considerabilă, atât din punct de vedere al instrumentației, cât și din punct de vedere al informațiilor valoroase pe care această metodă le poate oferi domeniului de cercetare în chimie-fizică. De-a lungul timpului, industria farmaceutică s-a confruntat cu probleme legate de solubilizarea sau eliberarea controlată a unor substanțe active, fapt pentru care direcții de cercetare au fost axate pe dezvoltarea metodelor care să permită scăderea lipofilității medicamentului și eliberarea controlată pentru optimizarea biodisponibilității. Una dintre metode constă în formarea sistemelor de tip „*gazdă-oaspete*”. Câteva categorii de compuși chimici utilizați ca molecule „*gazdă*” sunt reprezentate de oligozaharide ciclice sau aciclice sau de surfactanți cationici, anionici sau neionici, în timp ce moleculele „*oaspete*” trebuie să prezinte proprietatea de a interacționa fizic, prin legături necovalente cu moleculele „*gazdă*” formând complecși de incluziune moleculară ce pot fi sisteme termosensibile.

În Institutul de Chimie Fizică - Ilie Murgulescu al Academiei Române există două grupuri de cercetare: unul axat pe „*Chimie Cuantică și Structură Moleculară*”, iar celălalt axat pe „*Termodinamică Chimică*”. Primul departament are în vedere studiile moleculare și structurale asupra unor sisteme cu relevanță biologică, în timp ce al doilea departament are ca tematică influența legării unor compuși bioactivi, cum sunt polifenolii, asupra comportamentului chimic al unor proteine cu aplicații în domeniile alimentară și farmaceutică.

Astfel, în cadrul acestei teze ne-am propus să combinăm două tehnici, una spectroscopică și una calorimetrică pentru investigarea unor sisteme termosensibile cu posibile aplicații biomedicale, deoarece spectroscopia RES poate furniza informații legate de dinamica unor specii paramagnetice în diverse sisteme, ținând cont că parametrii spectrali sunt dependenți de temperatură și de interacțiile locale. În același timp, metodele calorimetrice pot furniza date globale privind efectele termice ce însoțesc procesele care au loc într-un sistem ca urmare a modificării temperaturii. Prin urmare, cele două metode se completează, prin informațiile pe care le furnizează privind sistemele moleculare studiate. Astfel, teza de doctorat se axează pe studiul unor „*Sisteme termosensibile studiate prin Spectroscopia de Rezonanță Electronică de Spin și metode calorimetrice*”.

PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. SISTEME MOLECULARE CU PROPRIETĂȚI CARE POT FI MODULATE TERMIC

Sistemele termosensibile pot fi încadrate în clasa materialelor „*inteligente*” [1] care prezintă aplicabilitate în domeniul biomedical prin utilizarea lor ca transportori de medicamente și eliberarea controlată a unor principii active dintr-o formulare farmaceutică, asigurarea biodisponibilității medicamentelor prin creșterea solubilității medicamentelor care prezintă un caracter lipofil accentuat [2]. Sistemele moleculare termosensibile ar putea ajuta și la scăderea biodistribuției nespecifice, adică medicamentul să ajungă direct la țesutul dorit unde să fie eliberat, pentru a evita alte efecte adverse [3].

Expunerea materialelor inteligente la stimuli de natură fizică, cum este temperatura, și stimuli de natură chimică precum *pH*, tărie ionică, implică modificări ale proprietăților lor inițiale, ca răspuns al mediului asupra stimulilor proveniți din exterior [4]. Răspunsurile constau în posibilitatea de modificare a conformației moleculare, și implicit a formei, a solubilității în apă și a tranziției de tip *sol-gel* [5], [6]. În mod particular, proprietățile sistemelor termosensibile vor fi modificate prin variația temperaturii, dar acesta nu este singurul factor.

Tranziția de fază a sistemului de la starea tensionată la cea inițială presupune o relaxare prin îndepărtarea stimulului care a generat modificarea la nivel molecular. Efectul reversibil mai este cunoscut și ca efect de memorie [7]. Printre sistemele termosensibile se pot enumera micellele, gelurile supramoleculare sau materialele bifazice care generează hidrogeluri. Sistemele generate conțin surfactanți amfifilici, polimerici de tip pluronic în cazul cărora se pot observa tranziții *sol-micelă* [8], [9] sau *micelă-gel* [10], [11].

Încapsularea moleculelor cu formarea sistemelor de tip „*gazdă-oaspete*” în chimia supramoleculară reprezintă un alt tip de sistem termosensibil. Acesta are la bază complexarea celor două molecule prin formarea interacțiunilor necovalente dintre acestea, în absența sau în prezența stimulilor externi [12]. Formarea acestor complecși este rezultatul mai multor interacții slabe, de natură fizică printre care pot fi amintite cele de tip ion-ion, ion-dipol, dipol-dipol, *van der Waals*, legături de hidrogen, etc., implicând și efecte sterice în multe cazuri [13].

Studiul acestor sisteme poate fi realizat utilizând metode spectroscopice și calorimetrice, iar teza de doctorat este axată pe „*Sisteme termosensibile studiate prin spectroscopie de*

rezonanță electronică de spin și metode calorimetrice”. Se vor face în continuare referiri la cele două tehnici utilizate în vederea elaborării acestei teze de doctorat.

Spectroscopia de Rezonanță Electronică de Spin (RES) se utilizează pentru a obține informații referitoare la polaritatea micromediului din jurul fragmentului paramagnetic și dinamica acestuia din urmă (**Figura 1.1.A**) pentru un radical de tip nitroxid [14].

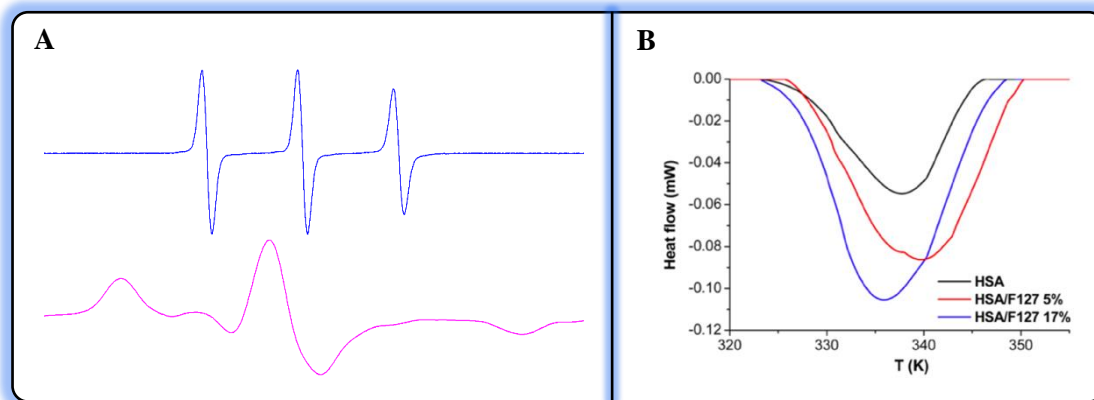


Figura 1.1.A: Spectrele RES al unui radical liber, de tip nitroxid, cu mișcare rapidă (linia albastră) și cu mișcare restricționată (linia roz) [14]. **B:** Termograma μ DSC corespunzătoare denaturării proteice a HSA în absența și în prezența *F127* la diferite concentrații [15].

Microcalorimetria cu Scanare Diferențiată (μ DSC) este o tehnică ce completează metoda RES prin datele pe care le furnizează, deoarece oferă informații, atât individuale, cât și de interacție la scală mezosopică pentru un sistem termosensibil. Un astfel de exemplu este sistemul format din proteină serică și block-copolimerul Pluronic *F127*. Termogramele corespunzătoare Albuminei Serică Umană (HSA) în absența și în prezența la două concentrații diferite ale polimerului indică efecte diferite ale concentrației Pluronicului *F127* asupra denaturării proteinei. Astfel, la concentrație mică, HSA este stabilizată (temperatura de vârf are valoare mai mare) (**Figura 1.1.B**) [15]. În timp ce metoda μ DSC oferă informații globale privind sistemele analizate, spectroscopia RES furnizează informații locale referitoare la micromediul speciilor paramagnetice din sistemele analizate [14].

În cadrul acestei teze au fost analizate o serie de sisteme care sunt termosensibile și care au fost studiate fie prin spectroscopie RES, fie prin μ DSC sau folosind ambele tehnici. Astfel, au fost analizați complecși ai proteinelor, complecși „gazdă-oaspete”, autoasamblarea unor surfactanți ionici sau neionici.

CAPITOLUL 2. SPECTROSCOPIA DE REZONANȚĂ ELECTRONICĂ DE SPIN

Speciile paramagnetice pot fi utilizate în studiile tranzițiilor de fază care au loc în sistemele block-copolimerilor, datorită sensibilității constantei de cuplaj hiperfin a atomului de azot (a_N) precum și a timpului de rotație corelațional (τ_c) la modificările micromediului din jurul radicalului liber induse de procesele de deshidratare și de autoasamblare ale lanțurilor polimerice.

Un exemplu de studiu RES folosind metoda sondelor de spin se referă la utilizarea a două sonde de spin, *CATI6* și *5-DSA*, care se pot lega de situsurile HSA, sistemul format fiind sensibil la tranzițiile de fază ale block-copolimerului Pluronic *F127*. Ambii radicali liberi au afinități diferite pentru HSA, dar și pentru micellele *F127*, și distorsionarea liniilor spectrale care apar indică tipurile de interacție din aceste sisteme. În soluții micelare de Pluronic *F127*, sonda *CATI6* prezintă o mișcare rapidă, în timp ce sonda *5-DSA* prezintă o mișcare mai lentă [15].

„Metoda marcării cu spin” poate fi utilizată pentru a investiga prin spectroscopie RES comportamentul autoasamblării copolimerilor amfifili în soluție apoasă și conformația internă a agregatelor polimerice. Mirjam și colab. au investigat capacitatea de încapsulare a unei substanțe active cu ajutorul copolimerilor funcționalizați cu 4-amino-*TEMPO* în prezența și în absența surfactantului lecitin-colesterolului. Variația raportului molar dintre lecitină și colesterol nu influențează parametrii RES al polimerului marcat cu sonda de spin [16].

Spectroscopia RES este adesea utilizată în studiul complexării ciclodextrinelor (CDs) cu nitroxizii, deoarece se obțin informații termodinamice și structurale ale sistemelor formate. Acest lucru este posibil, datorită modificărilor spectrale care apar în urma interacției „*gazdă-oaspete*” din sistem. Scăderea intensității liniei de câmp înalt și lărgirea acesteia indică formarea complexului „*gazdă-oaspete*”. Prin urmare, valoarea τ_c este mai mare, ceea ce indică o rotație mai lentă. Studiul interacțiilor „*gazdă-oaspete*” la temperaturi variabile oferă informații asupra dinamicii și orientării grupării paramagnetice în complex [17]. Modificarea chimică a CDs prin funcționalizarea acestora cu radicali alchil conduce la creșterea caracterului hidrofob al CDs naturale. Acest aspect poate fi pus în evidență prin RES utilizând sonde de spin (*TEMPO* și *DOXYL*) cu lanț hidrocarbonat variabil. CDs modificate chimic generează un micromediu mai nepolar în jurul fragmentelor paramagnetice care au drept consecință scăderea valorii a_N [18].

CAPITOLUL 3. ANALIZA TERMICĂ. MICROCALORIMETRIE CU SCANARE DIFERENȚIATĂ

Efectul interacției dintre un ligand organic și o proteină sunt exemple de studii termosensibile investigate prin μ DSC, deoarece oferă informații globale despre sistemele studiate. Stabilitatea unei proteine poate fi explicată prin comportamentul său termic. Denaturarea termică a unei proteine cu structură nativă constă în procesul de depliere al acesteia.

Cei doi parametri esențiali ai unei termograme DSC sunt temperatura de denaturare (T_m) și entalpia de denaturare (ΔH) [19].

Prezența liganzilor în soluția de proteină și legarea acestora de BSA aduc modificări în termogramele DSC prin deplasarea T_m către valori mai mari. Cu alte cuvinte, ligandul joacă rol protector asupra denaturării termice a proteinei prin stabilizarea acesteia. Solventul poate contribui sau nu la destabilizarea proteinei prin interacțiile necovalente care se pot realiza. Se pot stabili interacții hidrofobe sau legături de hidrogen care să joace rol de co-factor asupra depliei proteinei [19].

Termograma corespunzătoare denaturării proteice a BSA prezintă două valori corespunzătoare T_{m1} și T_{m2} . Valoarea mai mică a T_{m1} poate fi atribuită depliei proteinei ca urmare a unei interacții slabe cu ligandul. Valoarea mai mare a T_{m2} poate fi atribuită domeniului proteinei care este mai stabil. Quercetina este folosită ca ligand și se poate lega fie la structura nativă a proteinei, fie la structura proteinei deja depliată. Prin creșterea raportului molar ligand:proteină s-a observat o creștere a valorii T_{m1} și o scădere a valorii T_{m2} . Acest lucru poate fi explicat prin interacția hidrofobă a moleculei de quercetină la situsul I de legare al BSA. Molecula neutră de quercetină se transformă într-un anion care poate interacționa electrostatic cu reziduurile de aminoacizi din forma lor cationică și, astfel, repulsiile electrostatice din situsul II sunt minimizează conducând la o stabilizare mai bună a proteinei [19].

Un alt studiu μ DSC se referă la efectul legării acidului galic la BSA. Atât în prezența, cât și în absența acidului galic, denaturarea proteinei este una ireversibilă. Totuși, este esențial raportul ligand:proteină, deoarece creșterea concentrației de acid galic determină o deplasare a T_{m1} și ΔH către valori mai mari. Chiar și la un raport echimolar, proteina este stabilizată, în schimb, la un raport de 25 de ori mai mare de ligand, efectul de stabilizare este semnificativ [20].

PARTEA A II-A. PARTEA DE CONTRIBUȚII PERSONALE
(ORIGINALĂ)
CAPITOLUL 4. INTERACȚIA FLAVONOIDULUI MORINĂ CU
ALBUMINA SERICĂ BOVINĂ

În acest studiu au fost efectuate experimentele de denaturare termică a proteinei BSA utilizând μ DSC7 evo (Setaram), urmat de colectarea și prelucrarea datele cu ajutorul software-ului furnizat de către producătorul instrumentului, Calisto v.1077, utilizând o linie de bază liniară, datele fiind convertite în capacitate calorică de exces utilizând concentrația de BSA și volumul celulei de lucru. Cu ajutorul software-ului PeakFit am realizat descompunerea profilurilor de capacitate calorică în exces. Astfel am determinat parametrii termodinamici ai procesului de denaturare: T_m și ΔH . Pentru evaluarea efectului legării Morinei asupra stabilității termice a BSA am constatat că atât utilizarea unei concentrații scăzute de 1% DMSO, cu rol în solubilizarea Morinei, cât și prezența polifenolului conduc la stabilizarea stării native a proteinei atunci când este modulată termic. Astfel deplicarea BSA are loc la temperaturi mai ridicate în prezența DMSO, deoarece este indus un efect stabilizator al structurii BSA. De asemenea, sistemele care conțin ligand:proteină în raport molar 1:1, respectiv 10:1, conduc la un efect termic stabilizator pentru BSA, cea mai bună influență având-o prezența unei concentrații mai mari de Morină (**Figura 4.1.**).

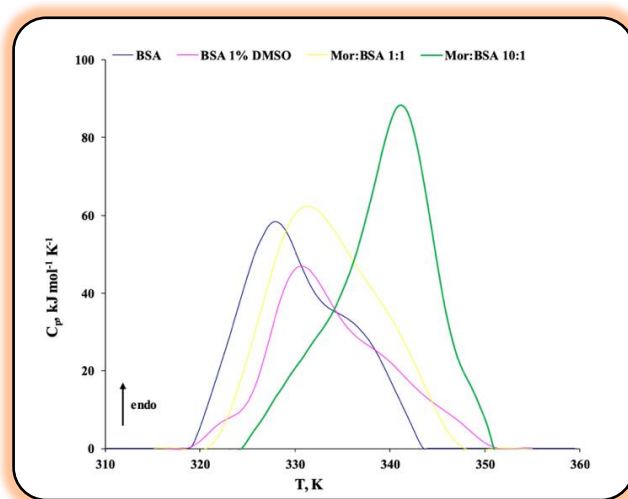


Figura 4.1. Termograma DSC pentru denaturarea termică a BSA în absența (albastru) și în prezența Morinei (galben, raport 1:1) și verde, raport 10:1), 1% DMSO (roz).

CAPITOLUL 5. INTERACȚIA 4-FENOXIANILINĂ MARCATĂ CU SPIN CU BSA ÎN APĂ ȘI ÎN SOLUȚIE DE TREHALOZĂ

În cadrul acestui studiu s-a marcat cu spin molecula 4-fenoxianilină cu 4-carboxi-TEMPO obținându-se *4FA_4CT*, proces ce a implicat sinteza, prelucrarea și purificarea radicalului liber. Au fost efectuate măsurătorile RES utilizând un spectrometru JEOL FA100 în bandă X echipat cu un rezonator de tip cilindric TE011 și o unitate de control al temperaturii. Au fost preparate probele de BSA în apă sau în trehaloză în prezența și în absența *4FA_4CT* și înregistrate utilizând un μ DSC7 evo (Setaram). Prelucrarea datelor s-a făcut utilizând software-ul Calisto v.1077, profilurile experimentale DSC fiind descompuse ca o sumă de două tranziții independente cu două stări utilizând PeakFit. În cazul efectului trehalozei asupra comportamentului la îngheț al soluțiilor de β -CD și albumină s-a constatat că la temperaturi scăzute, în absența trehalozei, sonda de spin prezintă un spectru în care fenomenul de înghețare este asociat cu precipitarea radicalului liber. Prezența trehalozei are rol protector și conduce, în aceleași condiții, la o mișcare puternic restricționată a sondei *4FA_4CT*, dar nu este asociată cu precipitarea speciei radicalice. Cu privire la analiza interacției *4FA_4CT* cu β -CD utilizarea trehalozei s-a făcut cu scopul de a evidenția efectul dizaharidului asupra procesului de complexare dintre *4FA_4CT* cu β -CD. Deoarece nu există modificări ale a_N , acest aspect denotă că fragmentul paramagnetic nu este inclus în cavitatea hidrofobă a β -CD, în schimb creșterea concentrației de β -CD conduce la creșterea valorilor τ_c ai sondei ceea ce presupune formarea complexului „gază-oaspete” a sondei *4FA_4CT* cu β -CD.

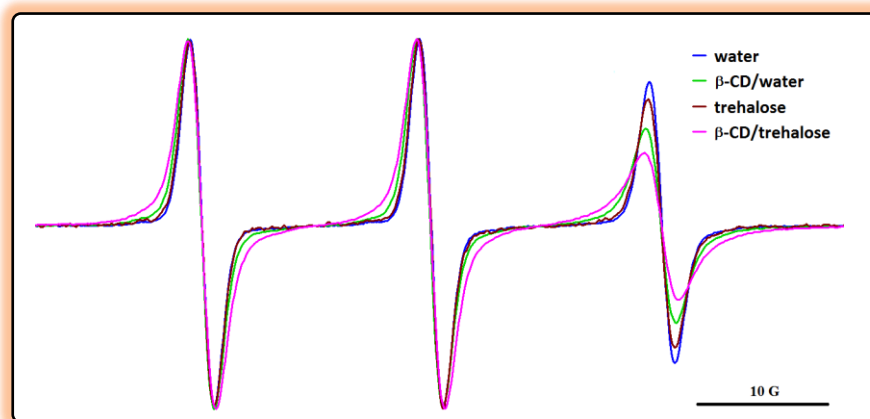


Figura 5.1. Spectrele RES ale sondei de spin *4FA_4CT* în absența și în prezența β -CD, în apă și în soluție de trehaloză 20%; $[\beta\text{-CD}] = 10^{-2}$ M.

Asupra interacției 4-fenoxianilină marcată cu spin cu BSA s-a observat că mișcarea sondei de spin este mai puțin restricționată în BSA decât în β -CD. Componenta spectrală corespunzătoare unei sonde de spin puternic imobilizate în BSA dispare în prezența β -CD, ceea ce evidențiază acțiunea decomplexantă a β -CD. Efectului trehalozei asupra stabilității termice a soluțiilor de albumină în timpul încălzirii constă într-un rol protector al dizaharidului asupra proteinei ceea ce conduce la creșterea temperaturii de denaturare a BSA în prezența trehalozei comparativ cu absența acestuia. Prezența 4FA_4CT determină un efect destabilizant a proteinei datorită legării la situsul de legare a BSA. Această legare determină ca procesul de depliere a proteinei să aibă loc la valori mai mici de temperatură. În schimb, la adăugarea trehalozei, acesta inhibă interacția dintre sondă și BSA conducând la valori mai mari ale temperaturii de denaturare.

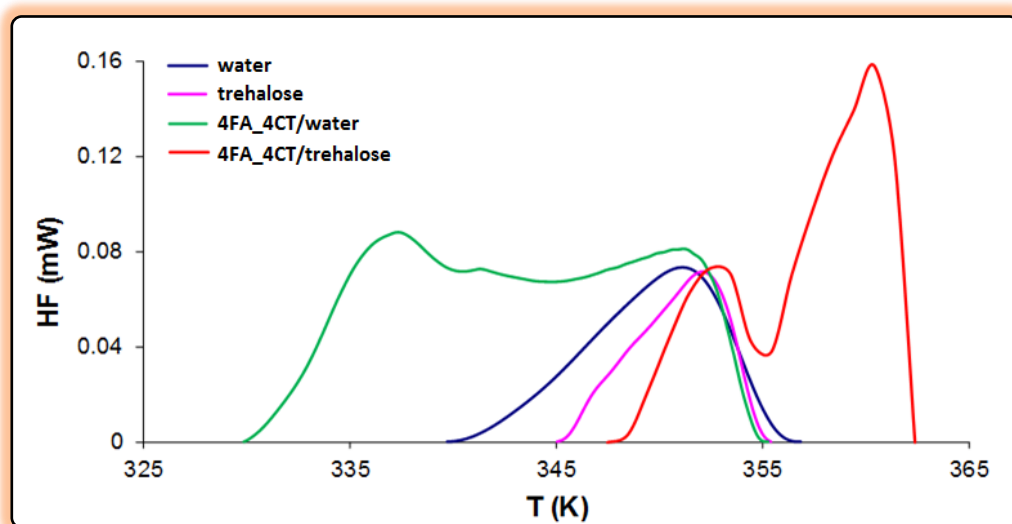


Figura 5.2. Termograma μ DSC a denaturării termice a BSA în apă și în soluție de trehaloză 20%, în absența și în prezența sondei 4FA_4CT.

De asemenea, cu ajutorul dicroismului circular am putut arăta influența temperaturii asupra spectrelor de dicroism circular al BSA în cele patru sisteme investigate. Prezența trehalozei nu modifică structura secundară a BSA. La încălzire, se observă un comportament similar al soluțiilor BSA/apă și BSA/trehaloză 20%, și anume o pierdere de 41-46% a structurii elicoidale. Cu toate acestea, la răcirea probelor la 298 K, recuperarea structurii secundare native a BSA este semnificativ mai mare în trehaloză (84% față de 72% în apă). Legarea ligandului 4FA_4CT la BSA determină o scădere cu 3% a conținutului de α -helix a proteinei, indiferent de prezența trehalozei.

CAPITOLUL 6. STUDIU FIZICO-CHIMIC PRIVIND ORGANIZAREA MOLECULARĂ ÎN SISTEME CARE CONȚIN PLURONICI DIRECTI SAU INVERȘI. EFECTUL ACIDULUI HIALURONIC

În acest studiu s-au efectuat măsurători microcalorimetrice obținând parametrii termodinamici care caracterizează procesul de micelizare (T_{onset} , T_{peak} , ΔH) a Pluronicilor în absența și în prezența acidului hialuronic (*HA*). S-a observat că în cazul Pluronicului direct, *F127*, formarea micelilor e datorată asocierii hidrofobe a blocurilor PPO, temperatura fiind un factor ce influențează micelizarea *F127*, deoarece lanțurile PPO expuse apei tind să se asocieze pentru a forma micela. Se obțin două vârfuri endoterme, unul atribuit micelizării și unul atribuit gelifierii. Tranziția *micelă-gel* poate fi explicată prin deshidratarea lanțurilor PEO la o temperatură peste cea a micelizării. Pluronicii inverși prezintă de asemenea două vârfuri endoterme care indică formarea unor agregate moleculare. În prezența *HA*, temperatura de vârf a *F127* crește ușor, pe când în situația Pluronicilor inverși, *10R5* și *17R4*, prezența *HA* conduce la scăderea temperaturii de vârf indicând favorizarea procesului de micelizare.

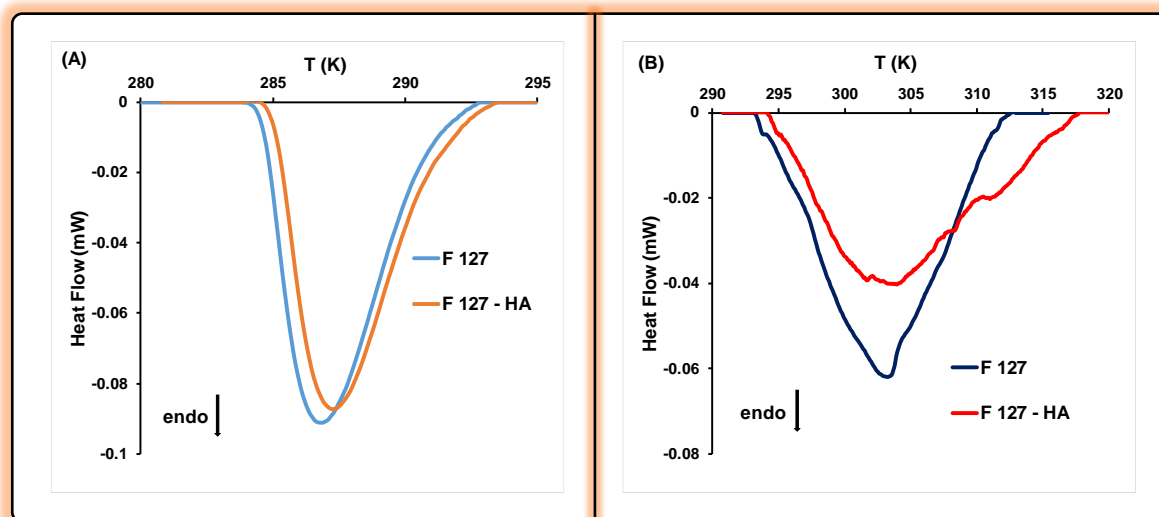


Figura 6.1. Termograma μ DSC pentru micelizare (A) și gelifiere (B) a Pluronicului F127 (20%) în absența și în prezența *HA*.

Pentru investigarea tranzițiilor de fază în Pluronici utilizând spectroscopia RES au fost utilizate patru sonde de spin cu structuri moleculare distincte care să favorizeze localizarea acestora în regiuni diferite ale micelilor/ agregatelor formate.

În cazul sistemelor de Pluronic *F127* și Pluronic *F127+HA*, mobilitatea sondei de spin *5-DSA* are o mișcare puternic restricționată indicând localizarea acesteia în interiorul micelilor, atât în absența, cât și în prezența *HA*. Utilizarea sondei *CAT16* conduce la o localizare diferită a sondei deoarece dinamica sondei este mult mai rapidă comparativ cu *5-DSA*. Utilizarea sondei de spin *L62NO* nu a condus la înregistrarea unei influențe a *HA* în sistemul investigat. De asemenea, prezența *HA* nu conduce la niciun efect vizibil în sistemul care conține sonda de spin moleculară *C12NO*.

În cazul sistemelor de Pluronic *10R5* și Pluronic *10R5+HA* nicio sondă nu a prezentat modificări semnificative ale parametrilor spectrali, deoarece dimensiunea lanțului *10R5* influențează forma micelilor, precum și interacția sondelor cu agregatele moleculare. Sonda *5-DSA* este puțin solubilă în *10R5*, dar prezența *HA* crește ușor solubilitatea sondei în sistemul investigat, neinfluențând parametrii spectrali ai sondei de spin. Spectrele RES ale sondelor de spin *CAT16*, *L62NO* și *C12NO* sunt similare atât în absența, cât și în prezența *HA*.

În cazul sistemelor Pluronic *17R4* și Pluronic *17R4+HA* care conțin *5-DSA*, prezența *HA* prezintă o influență majoră asupra parametrilor spectrali ai sondei de spin (**Figura 6.1.A.**).

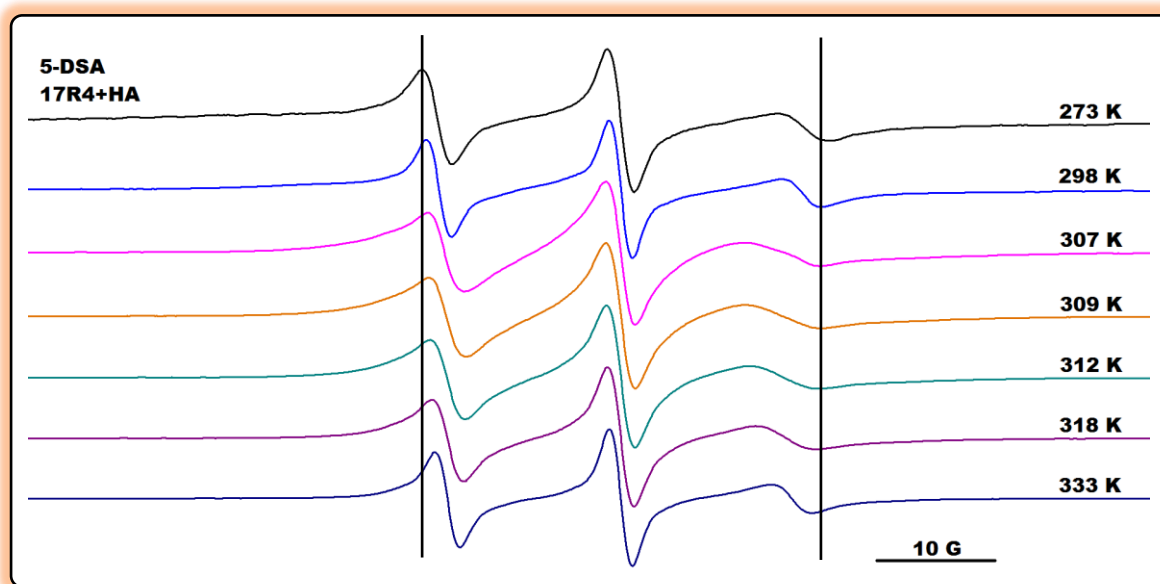


Figura 6.1.A. Spectrele RES a sondei de spin *5-DSA* în Pluronic *17R4* în prezența *HA*.

În absența *HA* spectrul RES a sondei *5-DSA* prezintă o mișcare puternic restricționată la temperaturi joase, pe când în prezența *HA*, mișcarea sondei devine mai rapidă (**Figura 6.1.B.**).

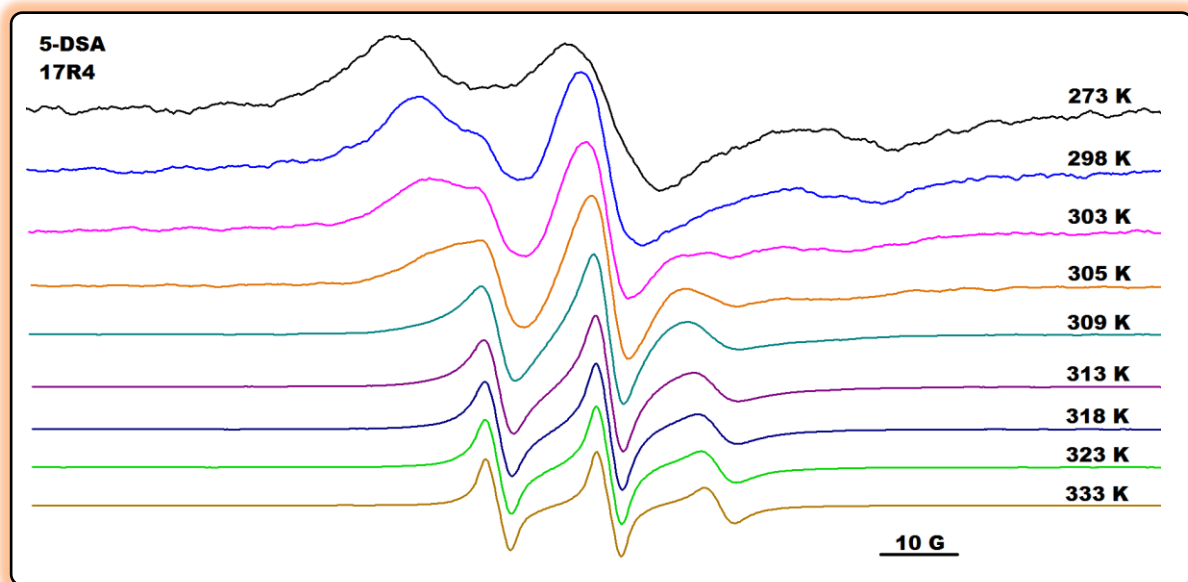


Figura 6.1.B. Spectrele RES a sondei de spin 5-DSA în Pluronic 17R4 în absența HA.

Dinamica sondelor *CAT16*, *L62NO* și *C12NO* este rapidă, iar prezența *HA* în sistemele investigate nu conduce la efecte semnificative de modificare a parametrilor RES, datorită unei localizări diferite a sondelor.

CAPITOLUL 7. COMPLECȘI DE TIP „GAZDĂ-OASPETE” AI NITROXIZILOR FUNCȚIONALIZAȚI CU CATENĂ ALIFATICĂ ȘI NITROXIZILOR β -FOSFORILAȚI CU CICLODEXTRINE

7.1. Modificările conformaționale ale nitroxizilor β -fosforilați - un instrument de bază în studiul interacțiunilor de tip „gazdă-oaspete”

S-au utilizat noi sonde moleculare de tip nitroxizi β -fosforilați, două cu structură ciclică ($S1$, $S2$) și două cu structură aciclică ($S3$, $S4$) capabile să formeze complecși de incluziune moleculară cu CDs. Spectrele RES obținute au fost simulate cu software-ul WinSim disponibil de la NIEHS folosind algoritmul de optimizare LMB1 și cu software-ul EasySpin folosind funcția *garlic* pentru a descrie o mișcare rapidă și izotropă a speciei paramagnetice. Cele patru sonde de spin prezintă semnal RES în apă, iar în prezența CDs își modifică parametrii caracteristici ca urmare a interacțiilor necovalente care se stabilesc între radicalii liberi și interiorul cavității hidrofobe a moleculelor „gazdă”.

$S1$ este inclusă parțial în γ -CD, deoarece spectrul RES arată prezența a două specii, una cu mișcare rapidă, în soluție, și una cu mișcare mai lentă, adică specia complexată cu CD. $S2$ este sensibilă în prezența α -CD și β -CD, modificarea spectrului RES reflectând interacțiunea fragmentului paramagnetic care este inclus în cele două CDs. Flexibilitatea sondelor $S3$ și $S4$ este datorată structurii aciclice și posibilitatea adoptării unei conformații care să le permită stabilirea unor interacții fizice necovalente mai puternice cu interiorul CDs. În cazul $S4$ în apă, sonda prezintă un semnal RES format din șase linii, pe când în sistemul format din $S4/\gamma$ -CD spectrul se modifică semnificativ obținându-se un spectru format din 5 linii ca urmare a unei includeri în totalitate a speciei paramagnetice în interiorul γ -CD (**Figura 7.1.**). Interacțiile care se stabilesc în sistemele studiate scot în evidență modificarea orientării relative a grupărilor nitroxil și fosforil care determină modificări ale valorilor constantelor de cuplaj a_N și a_P . În urma simulării spectrale utilizând software-ul WinSim, a_N și a_P nu sunt sensibili în prezența α -CD, β -CD, și HPB, în timp ce prezența γ -CD determină o scădere a valorii a_N , iar fenomenul de complexare este dependent de mărimea cavității CDs. Valorile corespunzătoare τ_c au fost obținute prin simularea spectrelor experimentale utilizând software-ul EasySpin. În cadrul

acestui studiu s-au realizat experimente de legare competitivă pentru a scoate în evidență afinitatea nitroxizilor β -fosforilați pentru cavitatea mai puțin polară a CDs.

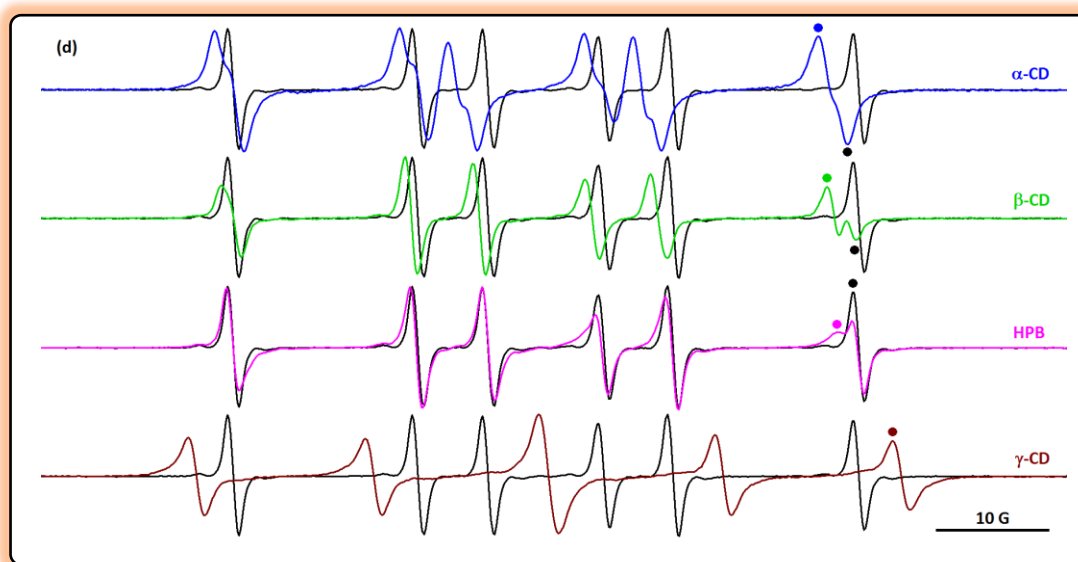


Figura 7.1. Spectrul RES a sondei de spin S_4 în absența (cu negru) și în prezența ciclodextrinei; concentrația sondei de spin 2.5×10^{-4} M, concentrația de ciclodextrină 10^{-2} M (β -CD) sau 10^{-1} M (α -CD, γ -CD, HPB).

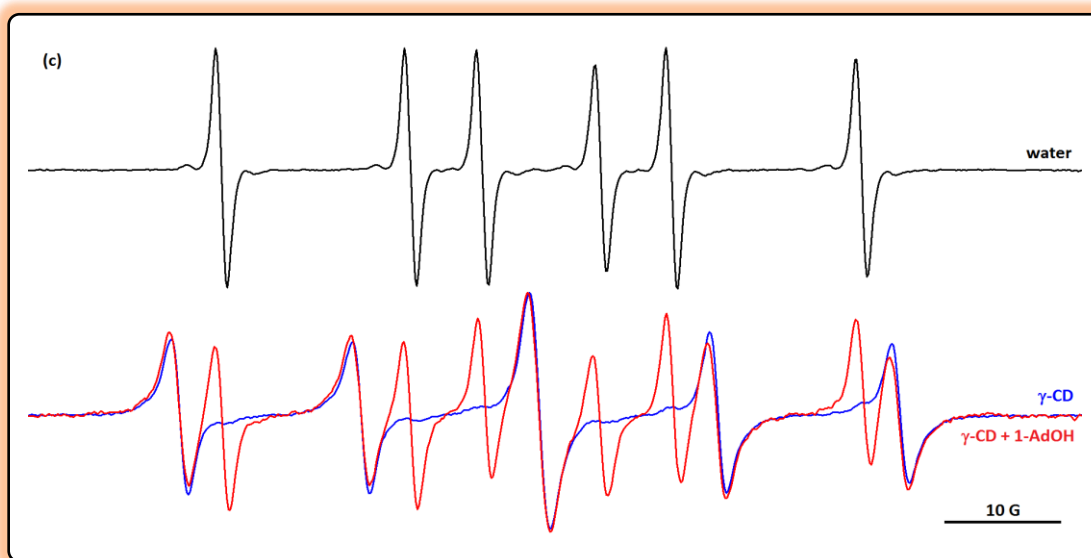


Figura 7.2. Spectrul RES a sondei de spin S_4 în apă și în soluție de γ -CD la concentrație maximă de ciclodextrină (10^{-1} M), în absența și în prezența 1-AdOH.

Datorită afinității mai mari a *S4* pentru cavitățile α -, β - și γ -CD, la adăugarea 1-adamantanol (1-AdOH) sonda de spin este expulzată din interiorul cavităților α - și β -CD. În schimb, datorită γ -CD care prezintă o dimensiune mai mare a cavității, sonda nu este expulzată complet de către moleculele de 1-AdOH care prezintă o afinitate mare pentru CDs. Astfel spectrul RES scoate în evidență prezența a două specii, una liberă în soluție și una complexată cu γ -CD (**Figura 7.2.**).

S3 și *S4* prezintă valori corespunzătoare constantelor de legare (K_a) a sondelor de spin la CDs de ordinul sutelor (M^{-1}). Comparativ cu derivații *TEMPO*, nitroxizii β -fosforilați pot fi utilizați pentru a diferenția CDs dintr-un amestec servind ca aplicație în domeniul analitic.

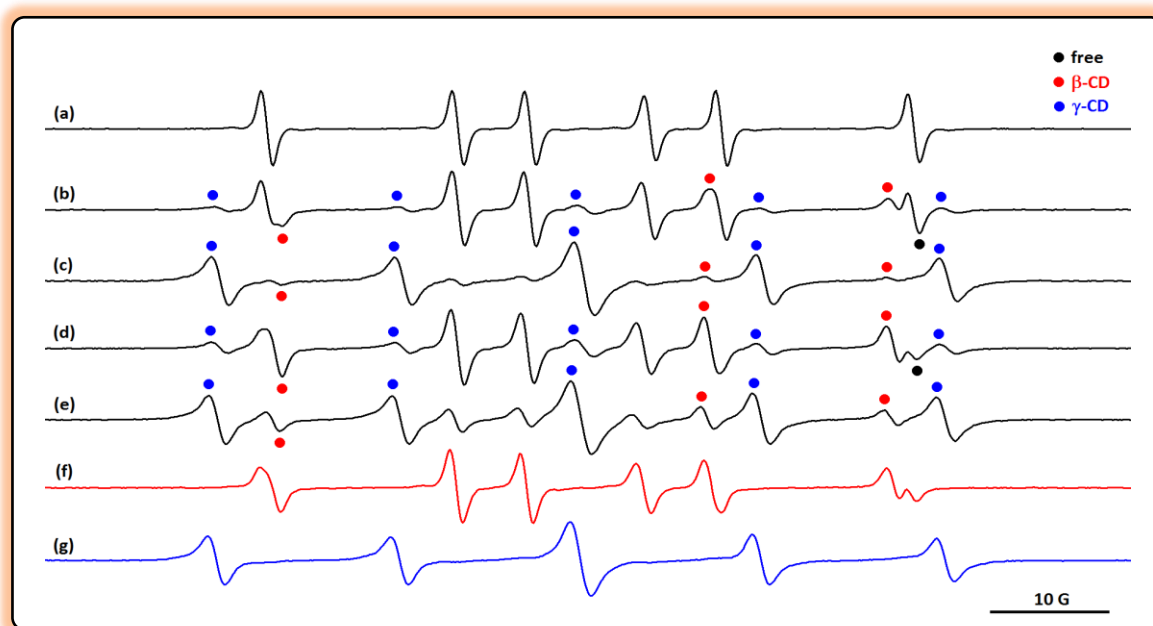


Figura 7.3. Spectrele RES ale sondei de spin *S4* în apă (a) și în amestecuri de β -CD și γ -CD la concentrații diferite: (b) 3×10^{-3} M β -CD, 3×10^{-3} M γ -CD; (c) 3×10^{-3} M β -CD, 10^{-1} M γ -CD; (d) 10^{-2} M β -CD, 10^{-2} M γ -CD; (e) 10^{-2} M β -CD, 10^{-1} M γ -CD; în 10^{-2} M β -CD (f) și în 10^{-1} M γ -CD (g). Componentele libere în soluție, complexate cu β -CD și complexate cu γ -CD sunt marcate cu puncte în culoarea corespunzătoare. Componenta liberă este marcată numai pentru liniile la câmp înalt unde diferențele spectrale sunt cele mai evidente.

7.2. Investigarea soluțiilor de surfactant ionici în prezența ciclodextrinelor folosind ca sonde moleculare nitroxizi β -fosforilați

Au fost urmărite sistemele autoasamblate ale dodecilsulfatului de sodiu (SDS) în absența și în prezența CDs utilizându-se trei sonde de spin *S2-S4*. La concentrația maximă de SDS cei trei radicali prezintă modificări spectrale mai accentuate comparativ cu spectrele acestora la concentrația maximă de CDs. Moleculele de surfactant se asociază formând miclele a căror diametru este mai mare decât al CDs. Drept urmare cele trei sonde de spin pot fi incluse în interiorul cavității miclelele de SDS modificându-și parametrii RES ca urmare a interacțiilor necovalente care se stabilesc. *S4* prezintă o modificare spectrală mai accentuată comparativ cu spectrul aceleași sonde în γ -CD, deoarece de data aceasta spectrul prezintă un semnal format din doar patru linii care poate fi explicat și printr-o modificare a geometriei (**Figura 7.4.**).

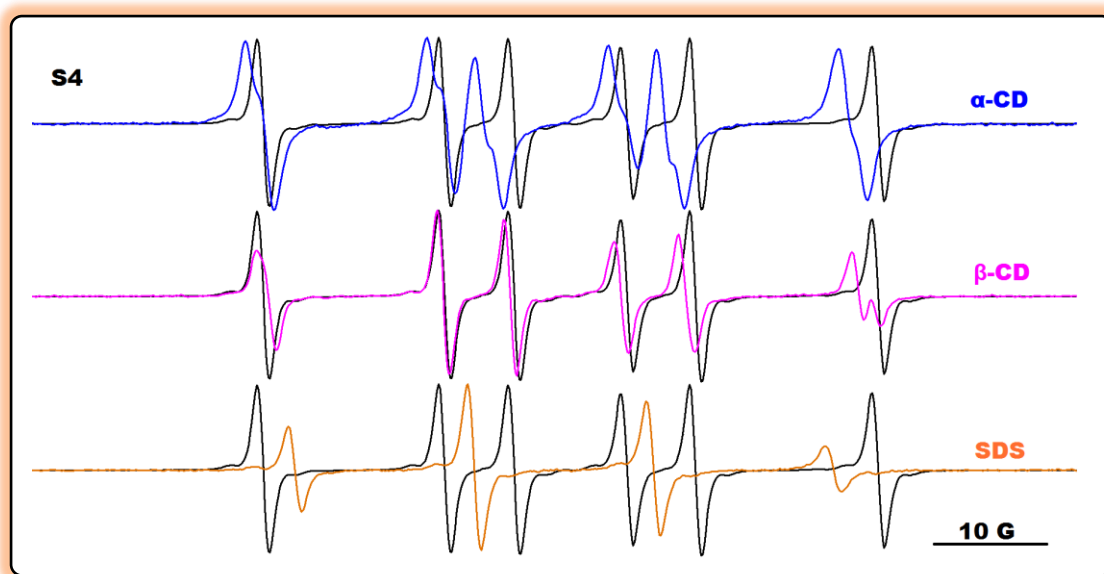


Figura 7.4. Spectrele RES ale sondelor de spin *S4* în absența (linia neagră) și în prezența CDs (linia albastră și linia roz) și SDS (linia portocalie), la concentrația sondei moleculare de spin 2.5×10^{-4} M, concentrația 10^{-2} M pentru β -CD, 10^{-1} M pentru α -CD și SDS.

În cadrul experimentelor competitive pentru studierea afinității sondelor moleculare de spin pentru ciclodextrine în prezența dodecilsulfatului de sodiu s-a observat că la un nivel sub concentrația premicelară, moleculele de surfactant prezintă afinitate pentru interiorul hidrofob al CDs, fapt pentru care sondele sunt dislocuite de către unimerii de SDS pe parcurs ce

concentrația de surfactant crește. De asemenea, valoarea *CMC* a surfactantului crește, deoarece o parte din SDS complexează cu CDs în soluție. În cazul complexului *S2- α -CD/SDS* este pus în evidență prezența a două specii, un liberă în soluție și una complexată cu micela de SDS. De asemenea și în absența α -CD sunt prezente tot două specii. În cazul sistemul *S2- β -CD/SDS* sonda este complet expulzată din interiorul CD, ceea ce scoate în evidență o afinitate mai mare a unimerilor de SDS pentru β -CD, decât pentru α -CD. În cazul complexului *S3- α -CD/SDS*, sonda are o afinitate mare pentru micela de surfactant, deoarece atât în prezența cât și în absența α -CD semnalul RES este identic și corespunzător unei singure specii, imobilizată în micelă. De asemenea, în cazul sistemului *S3- β -CD/SDS* sonda este expulzată pe parcurs ce crește concentrația de surfactant, sonda prezentând un semnal RES asemănător celui în apă, iar după formarea micelilor, sonda formează complex de incluziune cu agregatele micelare. În cazul sistemelor *S4- α -CD/SDS* și *S4- β -CD/SDS* sunt asemănătoare cu complexul *S3- β -CD/SDS*, doar că semnalul RES al sondei *S4* este format din doar patru linii spectrale care conduc la ideea unei legături necovalente puternice cu interiorul micelii de SDS (**Figura 7.5**).

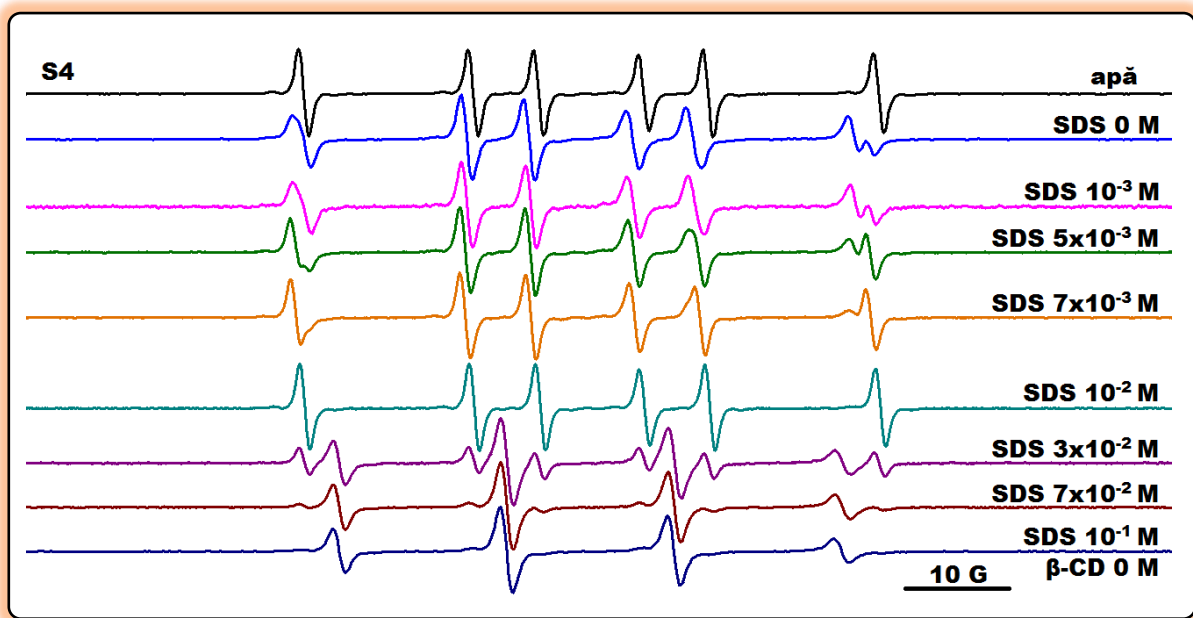


Figura 7.5. Spectrele RES ale sondei moleculare de spin *S4* în CDs (10^{-2} M pentru β -CD; 10^{-1} M pentru α -CD) în absența și în prezența concentrațiilor crescătoare de SDS (10^{-5} - 10^{-1} M).

7.3. Noi sonde moleculare de spin pentru studiul sistemelor autoasamblate

În această parte s-a urmărit formarea sistemelor „gazdă-oaspete” a șase noi sonde de spin cu CDs și SDS. Nitroxizii β -fosforilați S3-1, S3-6 nu prezintă semnal RES în apă din cauza unui caracter hidrofob accentuat. Spectrele RES ale sondelor de spin T-2, T-4, respectiv P-3, P-5 pun în evidență formarea legăturilor necovalente dintre acestea și CDs, respectiv SDS prin scăderea valorilor a_N și/sau lărgirea liniei la câmp înalt. Un alt parametru RES care indică formarea sistemelor de incluziune supramoleculară este τ_c , deoarece este asociat cu mobilitatea moleculară. Cu cât valoarea acestuia este mai mare cu atât mișcarea sondei este mai lentă.

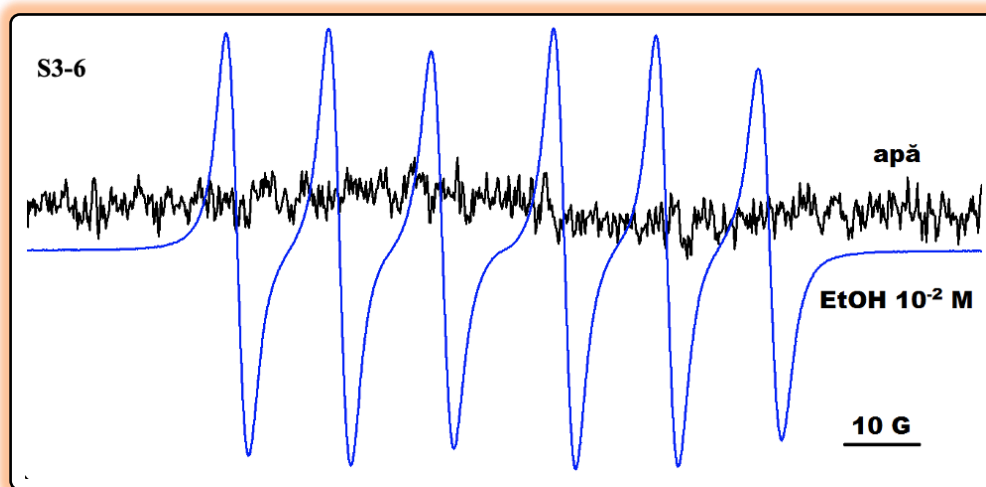


Figura 7.6. Spectrul RES a sondei de spin S3-6 în apă (cu negru) și alcool etilic 10^{-2} M (cu albastru).

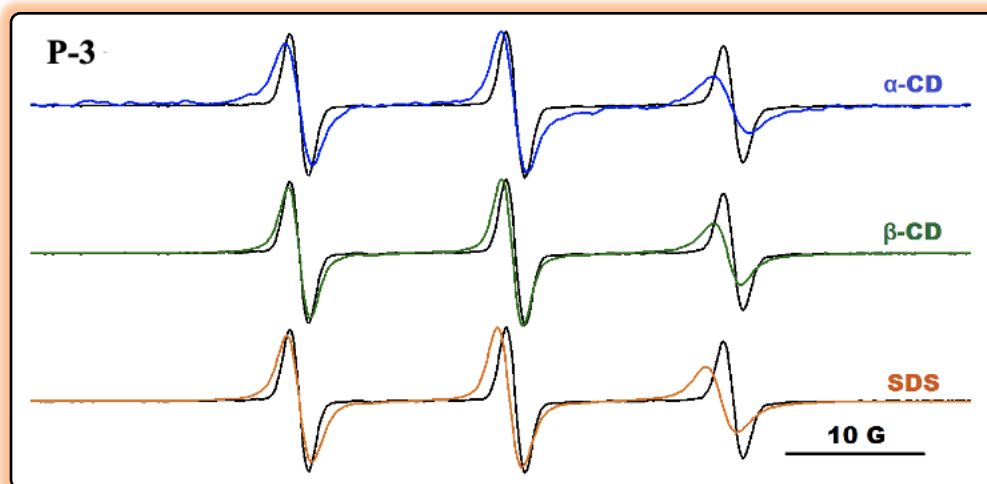


Figura 7.7. Spectrele RES ale sondei moleculare de spin P-3 în absența (cu negru) și în prezența CDs și SDS; concentrația sondei moleculare de spin 2×10^{-4} M, concentrația de CD 10^{-2} M (β -CD), 10^{-1} M (α -CD) și de SDS 10^{-1} M.

În cadrul experimentelor competitive pentru studierea afinității sondelor moleculare de spin pentru ciclodextrine în prezența dodecilsulfatului de sodiu s-a observat că sistemele care conțin cei doi nitroxizi β -fosforilați pot fi utilizați pentru determinarea *CMC* ca metodă alternativă, deoarece în momentul expulzării sondelor de spin din interiorul cavității celor două CDs se constată apariția unei linii asemănătoare spectrului RES al acestora în apă, urmând ca după formarea micelilor de SDS, sonda să formeze complex cu aceasta apărând semnalul RES format din cele șase linii corespunzătoare celor doi nitroxizi β -fosforilați (**Figura 7.8.**).

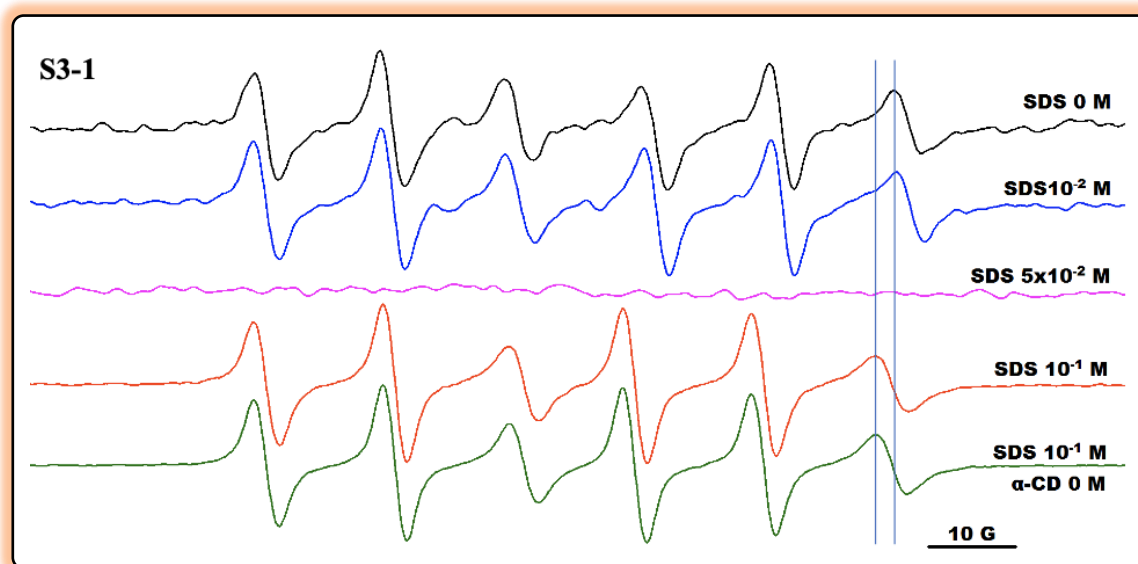


Figura 7.8. Spectrele RES ale sondei de spin *S3-1* în CDs (10^{-2} M pentru β -CD; 10^{-1} M pentru α -CD) în absența și în prezența concentrațiilor crescătoare de SDS (10^{-5} - 10^{-1} M).

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Actualele date experimentale obținute în teza de doctorat intitulată „*Sisteme termosensibile studiate prin Spectroscopia de Rezonanță Electronică de Spin și metode calorimetrice*” oferă posibilitatea de a extinde studiile privind modificările conformaționale ale proteinelor în interacția cu diferite clase de compuși. Aceste studii pot fi conectate cu informații biochimice privind formarea unor agregate moleculare asociate apariției unor boli neurodegenerative. Pe de altă parte diferiți vectori moleculari care poartă grupări paramagnetice își pot găsi aplicații în bioimagică, în special dacă se găsesc sisteme care să protejeze gruparea nitroxid.

Așa cum am arătat, atât formele micelare cât și complexii de tip „*gazdă-oaspete*” reprezintă soluții pentru creșterea stabilității radicalilor. De asemenea ne propunem marcarea cu spin a mai multor molecule cu aplicații biomedicale pentru a le investiga, prin RES, comportamentul în sisteme binare și/sau ternare de oligozaharide aciclice și/sau ciclice.

Tot în direcția studiilor din chimia supramoleculară avem în vedere cercetarea sistemelor autoasamblate formate prin complexarea nitroxizilor β -fosforilați cu catenă ciclică și/sau aciclică cu noi molecule „*gazdă*” (cucurbituril, pilararenă, calixarenă) și noi surfactanți care să permită dezvoltarea unor sisteme care pot fi modulate termic și care să poată deschide noi direcții de cercetare.

BIBLIOGRAFIE

- [1] Hoffman AS. *"Intelligent" Polymers in Medicine and Biotechnology*, Artificial Organs, 1995, 19(5), pp. 458-467. <https://doi:10.1111/j.1525-1594.1995.tb02359.x>.
- [2] Fu Y, Kao WJ. *Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems*, Expert Opinion on Drug Delivery, 2010, 7(4), pp. 429-444. <https://doi:10.1517/17425241003602259>.
- [3] Dastidar DG, Chakrabarti G. *Thermoresponsive Drug Delivery Systems, Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems, Characterization and Application*, Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems, Elsevier, 2019, pp. 133-155. <https://doi:10.1016/B978-0-12-814029-1.00006-5>.
- [4] Ward MA, Georgiou TK. *Thermoresponsive Polymers for Biomedical Application*, Polymers, 2011, 3(3), pp. 1215-1242. <https://doi:10.3390/polym3031215>.
- [5] Caragheorgheopol A, Bandula R, Caldaru H, Joela H. *Polarity profiles in reverse micelles of Triton X-100, as studied by spin probe and absorption probe techniques*, Journal of Molecular Liquids, 1997, 72(1-3), pp. 105-119. [https://doi:10.1016/s0167-7322\(97\)00033-0](https://doi:10.1016/s0167-7322(97)00033-0).
- [6] Caragheorgheopol A, Caldararu H, Dragutan I, Joela H, Brown W. *Micellization and Micellar Structure of a Poly(ethylene oxide)/Poly(propylene oxide)/Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer in Water Solution, As Studied by the Spin Probe Technique*, Langmuir, 1997, 13(26), pp. 6912-6921. <https://doi:10.1021/la970450d>.
- [7] Ahn S-K, Kasi RM, Kim SC, Sharma N, Zhou Y. *Stimuli-responsive polymer gels*, Soft Matter, 2008, 4(6), pp. 1151-1167. <https://doi:10.1039/b714376a>.
- [8] Rehman A, Nisa MU, Usman M, Ahmad Z, Bokhari TH, Rahman GMAU, Rasheed A, Kiran L. *Application of cationic-nonionic surfactant based nanostructured dye carries: Mixed micellar solubilization*, Journal of Molecular Liquids, 2021, 326, pp. 115345-115355.
- [9] Zarrintaj P, Ramsey JD, Samadi A, Atoufi Z, Yazdi MK, Ganjali MR, Amirabad LM, Zangene E, Farokhi M, Formela K, Saeb MR, Mozafari M, Thomas S. *Ploxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications*, Acta Biomaterialia, 2020, pp. 37-67. <https://doi:10.1016/j.actbio.2020.04.028>.

[10] Zarrintaj P, Jouyandeh M, Ganjali MR, Hadavand BS, Mozafari M, Sheiko SS, Russell AJ, Vatankhah-Varnoosfaderani M, Gutierrez TJ, Saeb MR, Matyjaszewski K. *Thermosensitive polymers in medicine: A review*, European Polymer Journal, 2019, 117, pp. 402-423. <https://doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.05.024>.

[11] Okano T. *Molecular design of temperature-responsive polymers as intelligent materials*, In: Dusek K. *Responsive Gels: Volume Transitions II*, Advances in Polymer Science, Springer, Berlin, Heidelberg, 1993, 110, pp. 179-197. <https://doi:10.1007/BFb0021133>.

[12] Soni SS, Alsasa A, Rodell C.B. *Applications of Macrocyclic Host Molecules in Immune Modulation and Therapeutic Delivery*, Frontiers in Chemistry, 2021, 9, pp. 658548-658558. <https://doi:10.3389/fchem.2021.658548>.

[13] Rekharsky MV, Inoue I. *Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins*, *Chemical Reviews*, 1998, 98(5), pp. 1875-1918. <https://doi:10.1021/cr970015o>.

[14] Sahini V, Ionita G. *Evidence of changes in hydrophilic/hydrophobic balance and in chemical activity of HSA induced by thermal treatments*, *Open Chemistry*, 2011, 9(2), pp. 245-252. <https://doi:10.2478/S11532-010-0148-2>.

[15] Neacsu MV, Matei I, Micutz M, Staicu T, Precupas A, Popa VT, Salifoglou A, Ionita G. *Interaction between Albumin and Pluronic F127 Block Copolymer Revealed by Global and Local Physicochemical Profiling*, *The Journal of Physical Chemistry*, 2016, 120(18), pp. 4258-4267. <https://doi:10.1021/acs.jpcc.6b02199>.

[16] Hemmelmann M, Kurzbach D, Koynov K, Hinderberger D, Zentel R. *Aggregation Behavior of Amphiphilic p(HPMA)-co-p(LMA) Copolymers Studied by FCS and EPR Spectroscopy*, *Biomacromolecules*, 2012, 13(12), pp. 4065-4074. <https://doi:10.1021/bm301364g>.

[17] Ionita G, Chechik V. *Mobility of spin probes in viscous cyclodextrin solutions*, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, 12(26), pp.6956-6960. <https://doi:10.1039/b924092f>.

[18] Ionita G, Caragheorgheopol A, Caldaru H, Jones L, Chechik V. *Inclusion complexes of cyclodextrins with nitroxide-based spin probes in aqueous solutions*, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(3), pp. 598-602. <https://doi:10.1039/b817290k>.

[19] Precupas A, Sandu R, Popa VT. *Quercetin Influence on Thermal Denaturation of Bovine Serum Albumin*, The Journal of Physical Chemistry B, 2016, 120(35), pp. 9362-9375. <https://doi:10.1021/acs.jpcc.6b06214>.

[20] Precupas A, Leonties AR, Neacsu A, Sandu R, Popa VT. *Gallic acid influence on bovine serum albumin thermal stability*, New Journal of Chemistry, 2019, 43(9), pp. 3891-3898. <https://doi:10.1039/C9NJ00115H>.

LISTA CU LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole publicate pe tema tezei de doctorat:

1. **Neculae, A.V.F.**; Audran, G.; Bourdillon, S.; Ionita, G.; Joly, J.P.; Marque, S.R.A.; Matei, I.; Mocanu, S., 2022. *Conformational changes in β -phosphorylated nitroxides—A powerful tool to probe host–guest interactions*, Journal of Molecular Liquids, 364, 119983. <https://doi:10.1016/j.molliq.2022.119983>.
2. Precupas, A.; Sandu, R.; **Neculae, A.V.F.**; Neacsu, A.; Popa, V.T., 2021. *Calorimetric, spectroscopic and computational investigation of morin binding effect on bovine serum albumin stability*, Journal of Molecular Liquids, 333, 115953. <https://doi:10.1016/j.molliq.2021.115953>.

Articole publicate în afara temei de doctorat în reviste ISI:

1. Aricov, L.; Raducan, A.; Gifu, I.C.; Alexandrescu, E.; Precupas, A.; **Neculae, A.V.F.**; Visan, R.M.; Morosan, A.; Leonties, A.R., 2022. *The immobilization of Laccase on Mixed Polymeric Microspheres for Methyl Red Decomposition*, Coatings, 12(12), 1-17. <https://doi:10.3390/coatings12121965>.
2. Matei, I.; Ariciu, A.M.; Popescu, E.I.; Mocanu, S.; **Neculae, A.V.F.**; Savonea, F.; Ionita, G., 2022. *Evaluation of the accessibility of molecules in hydrogels using a scale of spin probes*, Gels, 8(7), 428. <https://doi:10.3390/gels8070428>.