



ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A
ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE CHIMICE
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ
“PETRU PONI”
Domeniul CHIMIE



*Geluri multicomponente: modelarea
structurilor cu compuși de masă
moleculară mică*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

CS I DR. LOREDANA E. NIȚĂ

Student-doctorand:

ALEXANDRA CROITORIU

Mulțumiri

Cu deosebită considerație adresez cele mai sincere mulțumiri tuturor celor care mi-au îndrumat pașii în elaborarea și finalizarea tezei de doctorat.

*Cele mai sincere mulțumiri i le adresez conducătorului de doctorat, doamna **Dr. Loredana Elena Niță** care prin profesionalism, dedicare și răbdare a avut bunăvoința de a mă ghida în dezvoltarea mea profesională. Vă sunt profund recunoscătoare pentru înțelegeri, grijă și sprijinul științific acordat pe parcursul stagiului doctoral.*

*Distinse mulțumiri stimabililor referenți **Dr. Mariana Pinteală, Prof. Dr. Liliana Vereștiuc** și **Prof. Dr. Robert Grădinaru** pentru disponibilitatea de a face parte din comisia de evaluare a tezei de doctorat, amabilitatea de a evalua conținutul tezei și totodată pentru aprecierile oferite.*

*Adresez mulțumiri și aleasă recunoștință membrilor comisiei de îndrumare **Dr. Aurica P. Chiriac, Dr. Diana Elena Ciolacu** și **Dr. Niță Tudorachi** pentru răbdare, cunoștințele împărtășite și sfaturile oferite pe perioada stagiului doctoral.*

*Deosebite mulțumiri colegilor de laborator, în special **Dr. Alina Gabriela Rusu** și **Dr. Alina Ghilan** pentru timpul și sprijinul acordat în fiecare etapă a acestui demers științific.*

*Sincere mulțumiri doamnei **Dr. Sanda-Maria Bucătariu** și domnului **Dr. Florin Bucătariu**, oameni dragi mie, pentru susținerea nemărginită, încurajările și sfaturile prețioase mereu-binevenite.*

*Cu recunoștință, adresez distinse mulțumiri tuturor colegilor din **Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni”** pentru sugestii, colaborare și contribuția directă sau indirectă pe care au avut-o la săvârșirea acestei teze.*

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

*În tot acest timp am avut parte și de sprijinul **părinților mei** care mi-au fost alături necondiționat și cărora le voi fi profund recunoscătoare mereu. Mulțumesc **surorii mele** pentru încredere și sprijin moral.*

*Cu dragoste, doresc să îi mulțumesc logodnicului meu, **Andrei**, pentru răbdare, încredere, susținere și dragostea cu care mi-a fost alături indiferent de circumstanțe.*

Cu deosebită considerație,

Alexandra Croitoriu

CUPRINS

INTRODUCERE	1
PARTEA I – STUDIU DE LITERATURĂ	5
CAPITOLUL I – STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ÎN DOMENIUL GELURILOR SUPRAMOLECULARE	6
1.1. Noțiuni generale despre agenți de gelifiere cu masă moleculară mică (LMMGs).....	7
1.2. Aminoacizii și peptidele ca agenți de gelifiere cu masă moleculară mică.....	10
1.2.1. Asamblarea peptidelor în structură de tip α -helix.....	13
1.2.2. Asamblarea peptidelor în structură β -pliată.....	13
1.3. Geluri supramoleculare obținute prin procesul de auto-asamblare.....	13
1.3.1. Factori externi care declanșează procesul de auto-asamblare.....	15
1.3.1.1. Declanșarea gelifierii prin schimbarea pH-ului.....	15
1.3.1.2. Influența temperaturii asupra procesului de gelifiere.....	16
1.3.1.3. Influența solventului asupra procesului de gelifiere.....	16
1.3.1.4. Auto-asamblarea în prezența unei enzime.....	18
1.4. Geluri supramoleculare obținute prin procesul de co-asamblare.....	19
1.4.1. Tipuri de co-asamblare moleculară.....	20
1.4.1.1. Co-asamblarea ortogonală.....	21
1.4.1.2. Co-asamblare cooperantă.....	21
1.4.1.3. Co-asamblare aleatorie.....	21
1.4.1.4. Co-asamblare disruptivă.....	21
1.4.2. Forțe motrice implicate în procesul de auto/co-asamblare.....	22
1.4.2.1. Legături de hidrogen.....	23
1.4.2.2. Interacțiuni electrostatice.....	24
1.4.2.3. Interacțiuni hidrofobe.....	24
1.4.2.4. Interacțiuni π - π	25
1.5. Tixotropia gelurilor supramoleculare.....	25
1.6. Proiectarea gelurilor multicomponente.....	27
1.6.1. Avantajele rețelelor multicomponente.....	30
1.6.2. Strategii actuale privind obținereagelurilor fizice/peptidice.....	31
1.6.2.1. Polimerizarea directă a LMMGs auto-asamblate.....	32
1.6.2.2. Includerea LMMGs într-o matrice polimerică.....	32
1.6.2.3. Adăugarea unei soluții polimerice negelifiante la rețeaua LMMGs.....	33
1.6.2.4. Sisteme cu interacțiuni direcționate/dirijate între polimeri și LMMGs.....	34
1.6.2.5. Introducerea polimerilor naturali/sintetici în rețeaua gelurilor peptidice.....	34
1.6.2.5.1. Includerea polizaharidelor în rețeaua gelului peptidic.....	36
1.6.2.5.2. Includerea proteinelor în rețeaua gelului peptidic.....	40
1.6.2.5.3. Includerea polimerilor sintetici în rețeaua gelurilor peptidice.....	41
1.6.3. Proprietățile gelurilor multicomponente utilizate în aplicații biomedicale.....	42
1.6.3.1. Structura matricei extracelulare.....	42
1.6.3.2. Parametrii de proiectare a suporturilor celulare 3D.....	43
1.6.3.2.1. Porozitate.....	45
1.6.3.2.2. Proprietăți mecanice.....	45
1.6.3.2.3. Cinetica de degradare.....	46
1.6.3.2.4. Bioadeziunea celulară.....	46
1.6.3.3. Sisteme de tip gel utilizate ca suport 3D pentru celule.....	47

PARTEA II – STUDIU EXPERIMENTAL	50
CAPITOLUL II – GELURI SUPRAMOLECULARE PE BAZĂ DE AMINOACIZI ȘI PEPTIDE CA GELATORI DE MASĂ MOLECULARĂ MICĂ.....	51
2.1. Contextul cercetării elaborate	51
2.2. Obiectivele studiului experimental	51
2.3. Studiul capacității aminoacizilor/peptidelor scurte de a forma structuri supramoleculare	52
2.3.1. Studiul capacității de auto-asamblare	52
2.3.2. Studiul capacității de co-asamblare.....	54
2.4. Proiectarea gelurilor supramoleculare	58
2.4.1. Obținerea gelurilor supramoleculare pe bază de triptofan și lizină prin modificare de pH .	58
2.4.2. Detectarea grupărilor amino de la terminalul N.....	60
2.4.3. Caracterizarea gelurilor supramoleculare obținute prin modificarea pH-ului	61
2.4.3.1. Caracterizare structurală în soluție a gelurilor supramoleculare pe bază de triptofan și lizină	61
2.4.3.1.1. Difuzia dinamică a luminii (DLS)	61
2.4.3.1.2. Dicroism circular (CD)	62
2.4.3.1.3. Spectroscopie de fluorescență.....	64
2.4.3.1.4. Spectroscopie UV-VIS	65
2.4.3.2. Caracterizarea structurală a sistemelor pe bază de triptofan și lizină	66
2.4.3.2.1. Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	66
2.4.3.2.2. Studii de difracție de raze X (XRD)	68
2.4.3.3. Evaluarea termică a structurilor obținute prin analiza termogravimetrică.....	69
2.4.3.4. Investigarea morfologiei gelurilor supramoleculare pe bază de triptofan și lizină.....	72
2.4.3.4.1. Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	72
2.4.3.4.2. Microscopie de forță atomică (AFM)	72
2.4.3.4.3. Microscopie optică polarizată (POM).....	74
2.4.3.4.4. Microscopie electronică cu transmisie cu scanare (STEM).....	75
2.4.3.5. Caracterizarea sistemelor în stare de gel.....	76
2.4.3.5.1. Studii de reologie.....	76
2.4.3.6. Studii de citotoxicitate	78
2.4.3.6.1. <i>In vitro</i>	78
2.4.3.6.2. <i>In vivo</i>	78
2.4.4. Obținerea gelurilor supramoleculare pe bază de lizină și un co-partener prin utilizarea unui solvent polar aprotic.....	82
2.4.5. Detectarea grupărilor amino de la terminalul N.....	84
2.4.6. Caracterizarea gelurilor obținute prin utilizarea unui solvent polar aprotic.....	84
2.4.6.1. Caracterizare structurală în soluție a gelurilor supramoleculare pe bază de lizină și un co-partener	84
2.4.6.1.1. Difuzia dinamică a luminii (DLS)	84
2.4.6.1.2. Dicroism circular (CD)	86
2.4.6.1.3. Spectroscopie de fluorescență.....	87
2.4.6.1.4. Spectroscopie UV-VIS	88
2.4.6.2. Caracterizarea structurală a sistemelor obținute	89
2.4.6.2.1. Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	89
2.4.6.2.2. Studii de difracție de raze X (XRD)	91
2.4.6.3. Evaluarea prin analiza termogravimetrică a structurilor obținute.....	94
2.4.6.4. Investigarea morfologiei structurilor obținute pe bază de lizină și un co-partener.....	96
2.4.6.4.1. Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	96
2.4.6.4.2. Microscopie de forță atomică (AFM)	97
2.4.6.4.3. Microscopie optică polarizată (POM).....	99

2.4.6.4.4.	Microscopie electronică cu transmisie prin scanare (STEM).....	101
2.4.6.5.	Caracterizarea sistemelor în stare de gel.....	102
2.4.6.5.1.	Studii reologice.....	102
2.4.6.6.	Studii de citotoxicitate.....	104
2.4.6.6.1.	<i>In vitro</i>	104
2.4.6.6.2.	<i>In vivo</i>	104
2.5.	Concluzii.....	107
CAPITOLUL III – HIDROGELURI MULTICOMPONENTE PE BAZĂ DE STRUCTURI SUPRAMOLECULARE ȘI POLIMERI NATURALI.....		111
3.1.	Obiectivele studiului experimental.....	111
3.2.	Proiectarea gelurilor multicomponente.....	112
3.2.1.	Obținerea gelurilor multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și gumă gellan.....	112
3.2.1.1.	Caracterizarea gelurilor multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și gumă gellan.....	114
3.2.1.1.1.	Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	114
3.2.1.1.2.	Analiza termogravimetrică.....	115
3.2.1.1.3.	Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	117
3.2.1.1.4.	Studii de reologie.....	118
3.2.1.1.5.	Evaluarea bioadezivității.....	119
3.2.1.1.6.	Studii de citotoxicitate.....	120
3.2.2.	Obținerea gelurilor multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și agaroză....	126
3.2.2.1.	Caracterizarea gelurilor multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și agaroză.....	128
3.2.2.1.1.	Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	128
3.2.2.1.2.	Analiza termogravimetrică.....	129
3.2.2.1.3.	Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	131
3.2.2.1.4.	Studii de reologie.....	131
3.2.2.1.5.	Evaluarea bioadezivității.....	133
3.2.2.1.6.	Studii de citotoxicitate.....	134
3.3.	Concluzii.....	139
CAPITOLUL IV – GELURI HIBRIDE PE BAZĂ DE STRUCTURI SUPRAMOLECULARE ȘI POLIMERI NATURALI ȘI SINTETICI.....		141
4.1.	Obiectivele studiului experimental.....	141
4.2.	Proiectarea gelurilor hibride NaAlg/PItAU_sistem supramolecular.....	141
4.2.1.	Sinteza copolimerului poli(anhidridă itaconică-co-3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan).....	141
4.2.2.	Obținerea bioconjugatului NaAlg/PItAU.....	143
4.2.3.	Obținerea gelurilor hibride pe bază de structuri supramoleculare și NaAlg/PItAU.....	143
4.3.	Metode de caracterizare.....	145
4.3.1.	Caracterizarea copolimerului PItAU.....	145
4.3.1.1.	Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	146
4.3.1.2.	Studii de spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (¹ H-RMN).....	147
4.3.1.3.	Determinarea masei moleculare prin difuzia statică a luminii emisă de un laser (SLS).....	148
4.3.2.	Caracterizarea bioconjugatului NaAlg/PItAU.....	148
4.3.2.1.	Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	148
4.3.2.2.	Analiza termogravimetrică.....	149
4.3.2.3.	Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	151
4.3.2.4.	Studiul comportării la umflare.....	151
4.3.3.	Caracterizarea gelurilor hibride.....	153

4.3.3.1.	Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	153
4.3.3.2.	Analiza termogravimetrică	155
4.3.3.3.	Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	157
4.3.3.4.	Studii de reologie.....	158
4.3.3.5.	Studiul comportării la umflare.....	160
4.3.3.6.	Sorbție dinamică de vapori (DVS).....	161
4.3.3.7.	Studii de citotoxicitate	163
4.4.	Concluzii.....	164
CAPITOLUL V – GELURI CU DUBLĂ REȚEA PE BAZĂ DE POLI(2-(DIMETILAMINO)ETIL METACRILAT) ȘI STRUCTURI SUPRAMOLECULARE166		
5.1.	Obiectivele studiului experimental	166
5.2.	Prepararea “ <i>in situ</i> ” a gelurilor cu dublă rețea pe bază de poli(2-(dimetilamino)etil metacrilat) și structuri supramoleculare	166
5.3.	Caracterizarea sistemelor DN	169
5.3.1.	Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	169
5.3.2.	Analiza termogravimetrică.....	171
5.3.3.	Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	174
5.3.4.	Studiul comportării la umflare	175
5.3.5.	Studii de citotoxicitate	175
5.3.5.1.	Hemocompatibilitate <i>in vitro</i>	176
5.3.5.2.	Investigarea biocompatibilității <i>in vivo</i>	177
5.4.	Concluzii.....	181
CAPITOLUL VI – MATERIALE UTILIZATE ȘI METODE DE ANALIZĂ.....182		
6.1.	Materiale utilizate în obținerea sistemelor supramoleculare auto/co-asamblate.....	182
6.1.1.	Aminoacizi și peptide scurte.....	182
6.1.2.	Solvenți și alți compuși chimici.....	183
6.2.	Materiale utilizate în obținerea sistemelor multicomponente	184
6.3.	Materiale utilizate în obținerea gelurilor hibride	185
6.3.1.	Monomeri utilizați în sinteza copolimerului poli (anhidridă itaconică-co- 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan)	185
6.3.2.	Inițiatori și solvenți utilizați în procesul de copolimerizare.....	185
6.3.3.	Polimerii utilizați în obținerea gelurilor hibride	186
6.4.	Materiale utilizate în obținerea gelurilor semi-IPN cu dublă rețea	186
6.4.1.	Monomeri.....	186
6.4.2.	Inițiatori și agenți de reticulare	187
6.5.	Metode de analiză	187
6.5.1.	Caracterizare structurală în soluție.....	187
6.5.1.1.	Difuzia dinamică a luminii (DLS)	187
6.5.1.2.	Dicroism circular (CD)	188
6.5.1.3.	Spectroscopie de fluorescență.....	188
6.5.1.4.	Spectroscopia de absorbție în UV-VIS.....	188
6.5.2.	Caracterizarea structurală a sistemelor sintetizate	188
6.5.2.1.	Studii de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	188
6.5.2.2.	Studii de difracție de raze X (XRD)	189
6.5.2.3.	Studii de spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (¹ H-RMN)	189
6.5.3.	Determinarea masei moleculare prin difuzia statică a luminii emisă de un laser (SLS)....	189
6.5.4.	Evaluarea prin analiza termogravimetrică a structurilor investigate.....	190
6.5.5.	Morfologia sistemelor co-asamblate.....	190
6.5.5.1.	Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	190
6.5.5.2.	Microscopie electronică cu transmisie prin scanare (STEM).....	190

6.5.5.3. Microscopie de forță atomică (AFM)	190
6.5.5.4. Microscopie optică polarizată (POM).....	191
6.5.6. Caracterizarea sistemelor în stare de gel.....	191
6.5.6.1. Studii reologice	191
6.5.6.2. Detectarea grupărilor amino de la terminalul N	191
6.5.7. Studiul comportării la umflare	192
6.5.8. Sorbție dinamică de vapori (DVS).....	192
6.5.9. Evaluarea bioadezivității.....	194
6.5.10. Studii de citotoxicitate	195
6.5.10.1. <i>In vitro</i>	195
6.5.10.2. <i>In vivo</i>	197
CAPITOLUL VII – CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE DE VIITOR.....	202
BIBLIOGRAFIE	213

INTRODUCERE

Chimia supramoleculară este disciplina care se ocupă cu studiul legăturilor intermoleculare [1], fiind cunoscută și sub numele de “chimia de dincolo de molecule”[2]. Acest domeniu are la bază studiul recunoașterii moleculare și al auto-asamblării înalt ordonate generate de interacțiuni moleculare secundare sau covalente reversibile [3]. În anul 1987 chimia supramoleculară a fost recunoscută și acceptată ca ramură importantă a chimiei datorită studiilor întreprinse de grupul format din Charles J. Pedersen, Jean-Marie Lehn, și Donald J. Cram, grup care a primit premiul Nobel în chimie pentru “dezvoltarea și utilizarea moleculelor cu interacțiuni structurale specifice și înalt selective”[4]. Domeniu interdisciplinar, chimia supramoleculară se referă la formarea structurilor supramoleculare prin agregarea lanțurilor moleculare în funcție de grupările funcționale complementare, conformația și configurația lor, dar și prin influența factorilor externi [5] [6].

Natura și sistemele biologice sunt dominate de procese de auto-asamblare moleculară prin care se formează structuri supramoleculare complexe cu funcționalități distincte. Acidul dezoxiribonucleic (ADN), proteinele, matricea extracelulară (ECM) și chiar virusurile sunt create prin recunoașterea moleculară și auto-asamblarea înalt ordonată a aminoacizilor, zaharurilor, ionilor metalici și acizilor nucleici [7]. Larg răspândite în natură, interacțiunile moleculare secundare prezintă importanță deosebită în organizarea ierarhică din sistemele biologice și în susținerea funcționalității acestora oferind flexibilitate și specificitate în procesele biologice [8] [9]. Cu toate că interacțiunile moleculare secundare prezintă o energie de legătură slabă în comparație cu legăturile covalente, acestea pot forma structuri stabile datorită efectului sinergic al interacțiunilor intra- și intermoleculare [9].

Deși agenții de gelifiere cu masă moleculară mică (LMMGs) au fost descoperiți la începutul secolului al XIX-lea, natura supramoleculară a acestor materiale a fost puțin înțeleasă și a rămas nestudiată până la sfârșitul secolului al XX-lea. Molecule cu o mare diversitate structurală, de la cei mai simpli alcani la peptide complexe, au fost dovedite a fi LMMGs. **Motivația** pentru direcția de cercetare abordată în cadrul tezei de doctorat are la bază înțelegerea modului de formare a agregatelor moleculare la diferite niveluri și totodată explorarea potențialului lor pentru aplicații tehnologice inovatoare.

Pornind de la aceste considerente, **obiectivul general** al tezei de doctorat intitulată “**Geluri multicomponente: modelarea structurilor cu compuși de masa moleculară mică**” a constat în proiectarea, obținerea și optimizarea unor noi sisteme polimerice pe bază de LMMGs și polimeri naturali și/sau sintetici, cu structură, proprietăți fizico-chimice stabile și potențial aplicativ ca matrice suport pentru creșterea și dezvoltarea culturilor celulare tridimensionale.

Teza este structurată în două părți și cuprinde șapte capitole cu anexe și referințe.

Partea I a tezei de doctorat, cuprinde un capitol introductiv, *Capitolul I*, dedicat studiului de literatură privind analiza comportamentului aminoacizilor de a se auto-asambla/co-asambla în condiții specifice precum și forțele motrice implicate în generarea structurilor supramoleculare, cât și stadiul actual al cercetărilor în domeniul gelurilor pe bază de LMMGs și polimeri naturali/sintetici cu aplicabilitate în domeniul medical.

Partea a II-a a tezei de doctorat este structurată în șase capitole și prezintă contribuțiile originale privind obținerea, caracterizarea fizico-chimică și testarea *in vitro/in vivo* a sistemelor supramoleculare obținute.

Capitolul II cuprinde studiul capacității aminoacizilor și peptidelor scurte de a forma structuri supramoleculare, fiind divizat în două subcapitole ce descriu: (i) proiectarea și caracterizarea de sisteme supramoleculare prin auto/co-asamblarea unor aminoacizi și peptide scurte sub influența schimbării pH-ului și (ii) proiectarea și caracterizarea de sisteme supramoleculare prin auto/co-asamblarea unor perechi de aminoacizi în urma utilizării unui solvent polar aprotic. De asemenea, în acest capitol este evidențiată importanța grupării fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) ce se regăsește la terminalul N al compușilor utilizați, precum și forțele motrice adiționale ce susțin gelifierea și formarea structurilor tridimensionale. Sistemele supramoleculare obținute au fost caracterizate din punct de vedere structural atât în soluție, cât și în stare solidă fiind puse în evidență dinamica de asociere și mecanismul de asamblare ce stau la baza procesului de structurare. Particularitățile morfologice au fost evidențiate prin tehnici de microscopie, în timp ce caracterizarea sistemelor în stare de gel a permis identificarea comportamentului viscoelastic. În vederea stabilirii potențialului aplicativ ca matrice suport pentru creșterea și dezvoltarea culturilor celulare tridimensionale, sistemele supramoleculare preparate au fost testate *in vitro* și *in vivo* din punct de vedere citotoxic.

Capitolul III include prepararea și caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor multicomponente ce au fost obținute prin integrarea unor polimeri naturali gelifianti (gumă gellan, respectiv agaroză) în matricele supramoleculare co-asamblate sintetizate în Capitolul II. Prin adăugarea componentelor naturale s-a dorit menținerea caracterului biocompatibil, dar și îmbunătățirea rețelei supramoleculare prin creșterea consistenței și rezistenței matricilor obținute. Acest capitol prezintă prepararea și caracterizarea a două tipuri de sisteme multicomponente: (i) geluri multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și gumă gellan și (ii) geluri multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și agaroză. Ambele variante de gel multicomponent au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic, reologic și citotoxic.

Capitolul IV prezintă prepararea și caracterizarea unor noi hidrogeluri hibride de tip semi-interpenetrat (semi-IPN) având în compoziție geluri supramoleculare alături de polimeri naturali și sintetici. În acest sens am realizat copolimerul sintetic poli(anhidridă itaconică-co-3,9-divinil-

2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5]undecan) – (PItAU), etapă urmată de obținerea bioconjugatului pe bază de alginat de sodiu (NaAlg) și PItAU prin implicarea grupelor funcționale hidroxil ale alginatului de sodiu și deschiderea ciclului anhidridei itaconice și în final, prepararea gelurilor hibride prin interacțiunea dintre bioconjugat și sistemul supramolecular. Formarea copolimerului a fost confirmată de analizele spectrale efectuate (¹H-RMN, FT-IR), iar formarea bioconjugatului a fost validată prin spectroscopia FT-IR. Gelurile hibride au fost supuse analizelor spectrale, morfologice și reologice, dar și analizelor biologice efectuate in vitro și in vivo.

Capitolul V descrie prepararea “*in situ*” și caracterizarea gelurilor cu dublă rețea (DN) pe bază de poli(2-(dimetilamino) etil metacrilat) și structuri supramoleculare. Obținerea gelurilor cu dublă rețea s-a realizat în două etape: (i) inițial s-a format matricea polimerică poli(2-dimetilaminoetil metacrilat) prin polimerizare radicalică în apă, în prezența sistemului de inițiere persulfat de amoniu/N-N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamina și reticularea homopolimerului cu N-N'-metilen-bis-acrilamidă, și (ii) întrepătrunderea cu o a doua rețea supramoleculară formată prin co-asamblarea unui aminoacid cu o peptidă scurtă. Rețeaua DN a gelurilor a fost confirmată prin coroborarea rezultatelor obținute din analizele spectrale și morfologice.

Capitolul VI cuprinde informații generale despre materialele utilizate în studiul experimental pentru obținerea fiecărui tip de gel, dar și echipamentele folosite la caracterizarea compușilor obținuți.

Ultimul capitol al tezei, *Capitolul VII*, cuprinde concluziile generale cu privire la rezultatele experimentale obținute, precum și perspective în domeniul gelurilor supramoleculare pe bază de LMMGs și polimeri naturali/sintetici.

Teza de doctorat intitulată “**Geluri multicomponente: modelarea structurilor cu compuși de masa moleculară mică**” se extinde pe 237 de pagini și este structurată în 7 capitole care includ 45 tabele, 117 figuri și 255 referințe bibliografice, iar la final se găsesc următoarele anexe:

Anexa 1. Diseminarea rezultatelor și activitatea științifică desfășurată în cadrul proiectelor de cercetare;

Anexa 2. Bibliografie;

Anexa 3. Articole științifice.

PARTEA II- STUDIU EXPERIMENTAL

CAPITOLUL II

GELURI SUPRAMOLECULARE PE BAZĂ DE AMINOACIZI ȘI PEPTIDE CA GELATORI DE MASĂ MOLECULARĂ MICĂ

2.1. Contextul cercetării elaborate

Gelurile supramoleculare pe bază de aminoacizi/peptide sunt materiale ce prezintă o importanță deosebită în aplicații biomedicale datorită proprietăților intrinseci remarcabile. Proiectarea sistemelor supramoleculare are la bază formarea de structuri înalt ordonate ca urmare a procesului ierarhic de auto-asamblare desfășurat prin intermediul interacțiunilor necovalente. Principalele avantaje pe care le prezintă aceste materiale sunt corelate cu caracterul biocompatibil, bioreactiv și bioadeziv al aminoacizilor, susținând proliferarea celulară. Aceste caracteristici, împreună cu aspectul nanofibros și capacitatea de hidratare ridicată, sunt esențiale pentru dezvoltarea structurilor tridimensionale cu rol în creșterea celulară.

Prin introducerea unui co-partener (aminoacid sau peptidă) se propune îmbunătățirea proprietăților reologice, morfologice și structurale ale hidrogelurilor rezultate din interacțiunea dintre cele două componente diferite. În plus, identificarea forțelor motrice implicate în generarea structurilor supramoleculare tridimensionale ale aminoacizilor, este un alt aspect ce necesită o atenție deosebită.

2.2. Obiectivele studiului experimental

În acest context, studiul privind obținerea de geluri supramoleculare s-a axat pe proiectarea unui sistem supramolecular de tip aminoacid-peptidă sau aminoacid-aminoacid cu structură, proprietăți fizice și chimice stabile și cu aplicabilitate în dezvoltarea de culturi celulare. Prezentul studiu a urmărit: *obținerea gelurilor supramoleculare auto-asamblate/co-asamblate pe bază de aminoacizi și peptide funcționalizate la N-terminal cu gruparea aromatică Fmoc*. Condițiile necesare pentru îndeplinirea obiectivelor vizate sunt:

- Determinarea capacității aminoacizilor și peptidelor scurte de a acționa ca LMMG-uri;
- Studii privind analiza comportamentului aminoacizilor de a se auto-asambla în condiții specifice (pH, solvent);
- Obținerea gelurilor supramoleculare prin co-asamblarea diferitelor perechi de aminoacizi funcționalizați sau prin combinarea aminoacizilor cu peptide cu lanț scurt;
- Determinarea potențialului aplicativ al sistemelor supramoleculare în domeniul biomedical.

2.4. Proiectarea gelurilor supramoleculare

În urma etapelor de determinare a capacității aminoacizilor și peptidelor scurte de a se auto/co-asambla, au fost alese patru sisteme stabile ce vor fi evaluate și caracterizate în continuare. Sistemele selectate sunt prezentate în tabelul 2.3.

Obținerea gelurilor supramoleculare s-a bazat pe declanșarea procesului de gelifiere prin două metode: *modificarea pH-ului (subcapitol 2.4.1)* și *prin utilizarea unui solvent polar aprotic (subcapitol 2.4.4)*.

Tabel 2.3. Geluri co-asamblate selectate pentru evaluare și caracterizare.

SISTEM CO-ASAMBLAT			
Cod sistem	Concentrație minimă de gelifiere		Variantă
	Aminoacid	Co-partener	
S₁ : Fmoc-Trp-OH_ Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	0,5%	0,5%	V ₄ +V ₂ *
S₂ : Fmoc-Lys(Fmoc)-OH_ Fmoc-Ser-OH	0,5%	0,1%	V ₂ + V ₁ *
S₃ : Fmoc-Lys(Fmoc)-OH_ Fmoc-Glu	0,5%	0,1%	V ₂ + V ₁ *
S₄ : Fmoc-Lys(Fmoc)-OH_ Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	0,5%	0,1%	V ₂ + V ₁ *

2.4.1. Obținerea gelurilor supramoleculare pe bază de triptofan și lizină prin modificare de pH

Gelul supramolecular pe bază de **Fmoc-Trp-OH** (M₁) și **Fmoc-Lys(Fmoc)-OH** (M₂) a fost obținut prin modificarea pH-ului și se va regăsi în continuare sub denumirea de **sistem supramolecular S₁** urmat apoi de raportul dintre cei doi co-parteneri (1:3, 1:1 și 3:1). După 24 de ore de la preparare, gelurile au prezentat aspect transparent.

Pentru determinarea aranjamentului molecular, gelurile supramoleculare au fost caracterizate din punct de vedere structural în soluție prin DLS, CD, FL, UV-Vis, dar și în stare de gel prin studii de reologie. Mai mult, sistemele au fost liofilizate, permițând astfel caracterizarea din punct de vedere structural (FTIR, XRD) și morfologic (SEM, POM, AFM, STEM). Potențialul bioaplicativ s-a determinat prin teste *in vitro* și *in vivo*.

Analizele efectuate au demonstrat structurarea și co-asamblarea celor doi co-parteneri într-o morfologie tridimensională, prin alternarea raportului de Fmoc-Trp-OH și Fmoc-Lys(Fmoc)-OH. Aranjamentul molecular a fost facilitat de interacțiunile π - π și stabilizat prin legături de hidrogen între grupări -CO-NH-. Mai mult, difracția de raze X a evidențiat că difractograma XRD a gelului auto-asamblat M₁ prezintă aspect caracteristic structurilor izotrope, iar prin co-asamblare în raport 1:1 cu Fmoc-Lys(Fmoc)-OH are loc o organizare moleculară mai ordonată.

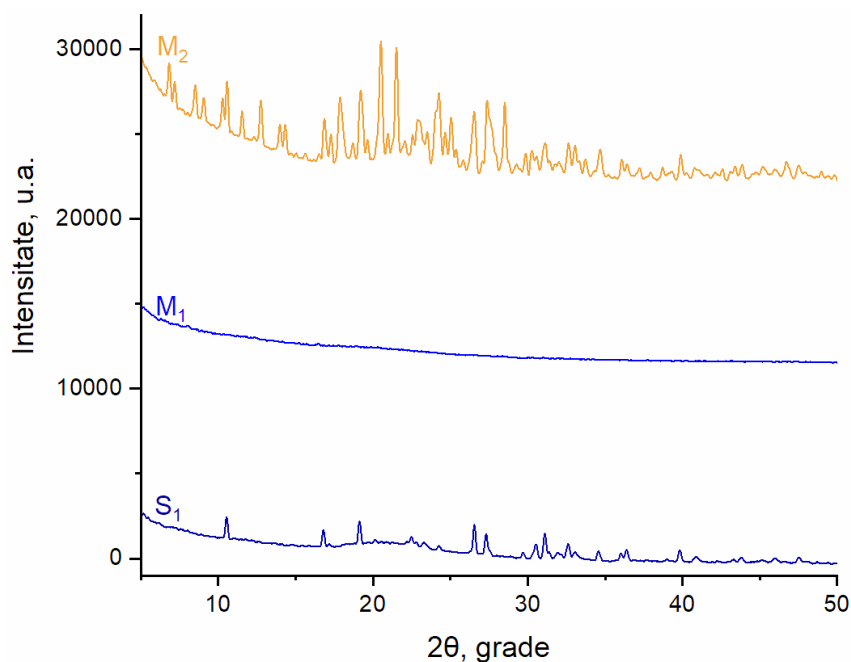


Figura 2.7. Difractogramele XRD ale precursorilor (Fmoc-Trp-OH și Fmoc-Lys(Fmoc)-OH) și sistemului S₁ co-asamblat în raport 1:1.

Studiul morfologic complex arată că sistemul S₁ co-asamblat în raport 1:1 și precursorii acestuia prezintă morfologie fibrilară generată de procesele de ordonare, care continuă în timp și în filmele uscate.

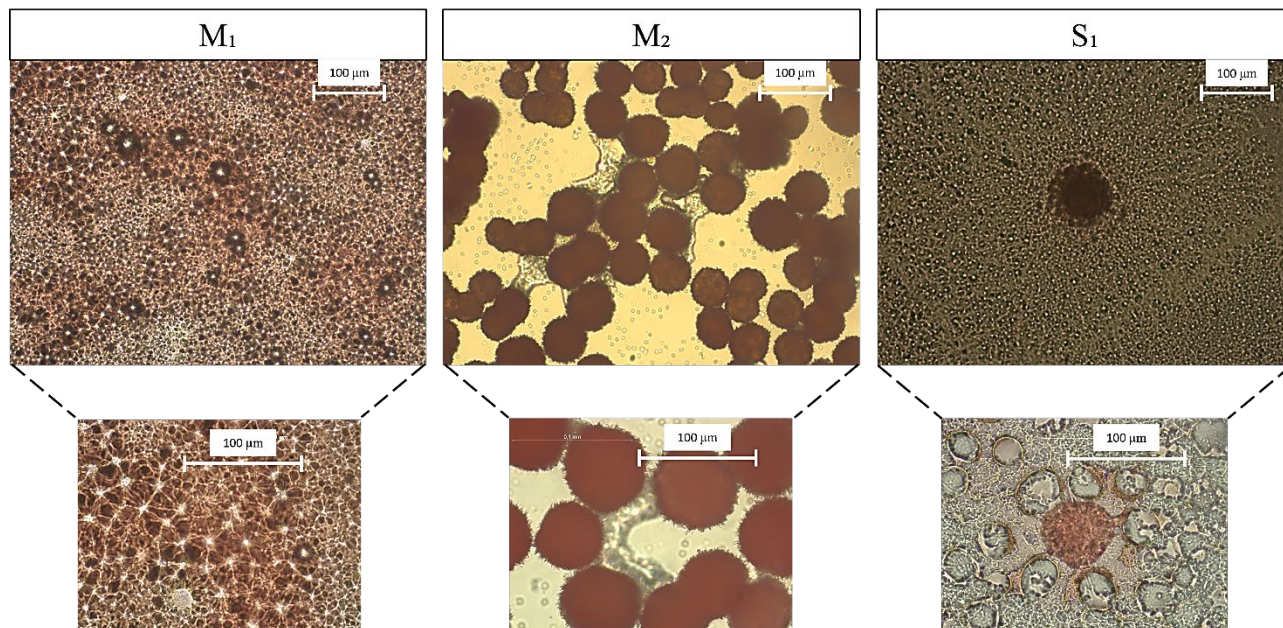


Figura 2.12. Imagini POM ale sistemului S₁ și precursorilor Fmoc-Trp-OH (M₁) și Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (M₂). Bara de scală reprezintă 100 μm.

Din studiile reologice s-a observat că sistemele co-asamblate, excepție făcând raportul 3:1, prezintă comportament caracteristic gelurilor cu $G' > G''$ și $\tan \delta < 1$. Acest comportament se observă în probele cu conținut ridicat de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH: S₁ la un raport de raport 1:3 și 1:1. De asemenea, modulul viscoelastic scade pe măsură ce crește conținutul de Fmoc-Trp-OH. Acest

comportament poate fi corelat cu prezența inelelor indol care creează spațiu între molecule și diminuează potențialul acestora de a interacționa.

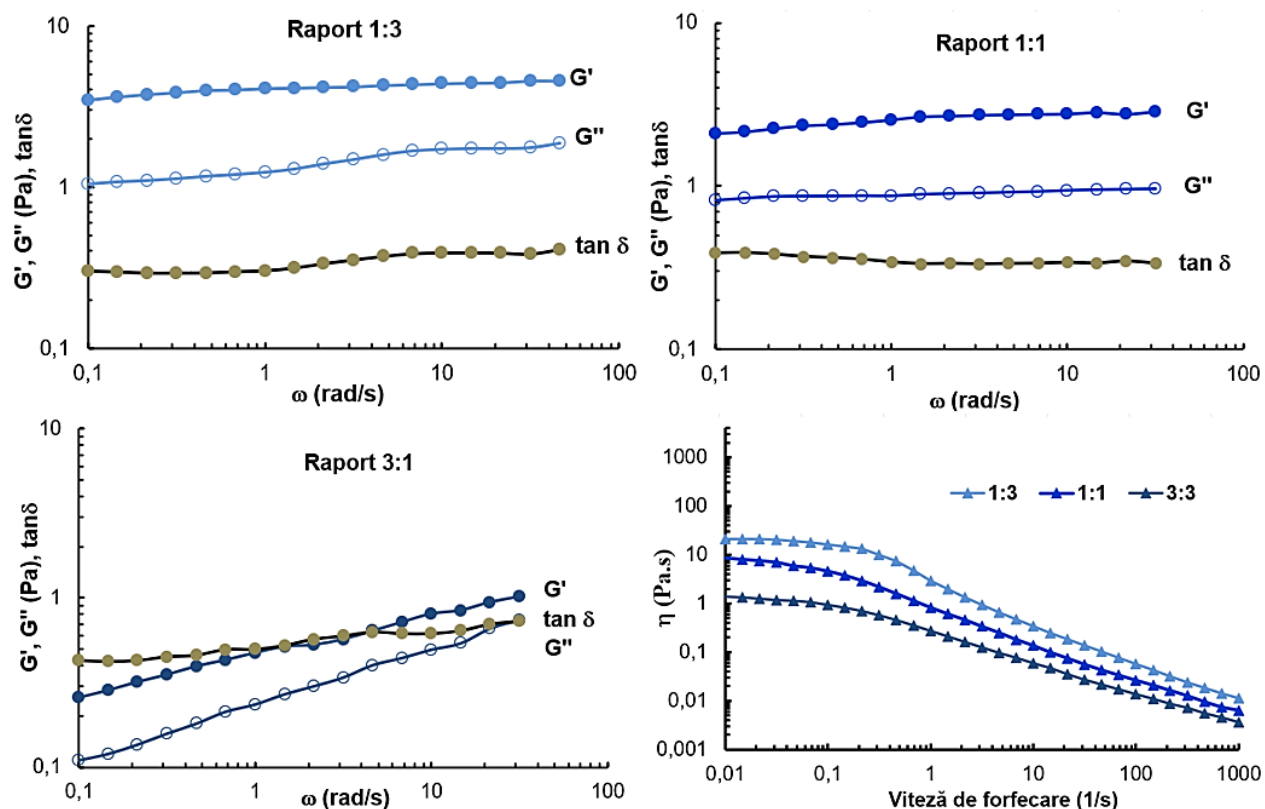


Figura 2.15. Parametri viscoelastici (G' , G'' , $\tan \delta$) în funcție de frecvența de oscilație la 37°C și viscozitatea aparentă în funcție de viteza de forfecare.

2.4.4. Obținerea gelurilor supramoleculare pe bază de lizină și un co-partener prin utilizarea unui solvent polar aprotic

Pentru prepararea sistemelor S_2 , S_3 și S_4 s-a utilizat **Fmoc-Lys(Fmoc)-OH** și un co-partener precum: (i) **Fmoc-Serină-OH** pentru obținerea sistemului S_2 , (ii) **Fmoc-Glu** pentru obținerea sistemului S_3 și (iii) tripeptida **Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH** pentru obținerea sistemului S_4 .

Fiecare sistem a fost co-asamblat în trei rapoarte diferite: 15:1, 5:1 și 2:1, pornind de la concentrația minimă de gelificare. Formarea rețelei și structura macroscopică a fost verificată prin testul de inversie al flaconului. În funcție de compoziție s-au obținut geluri translucide/transparente/opace, cu structură stabilă care rezistă testului de inversie a flaconului.

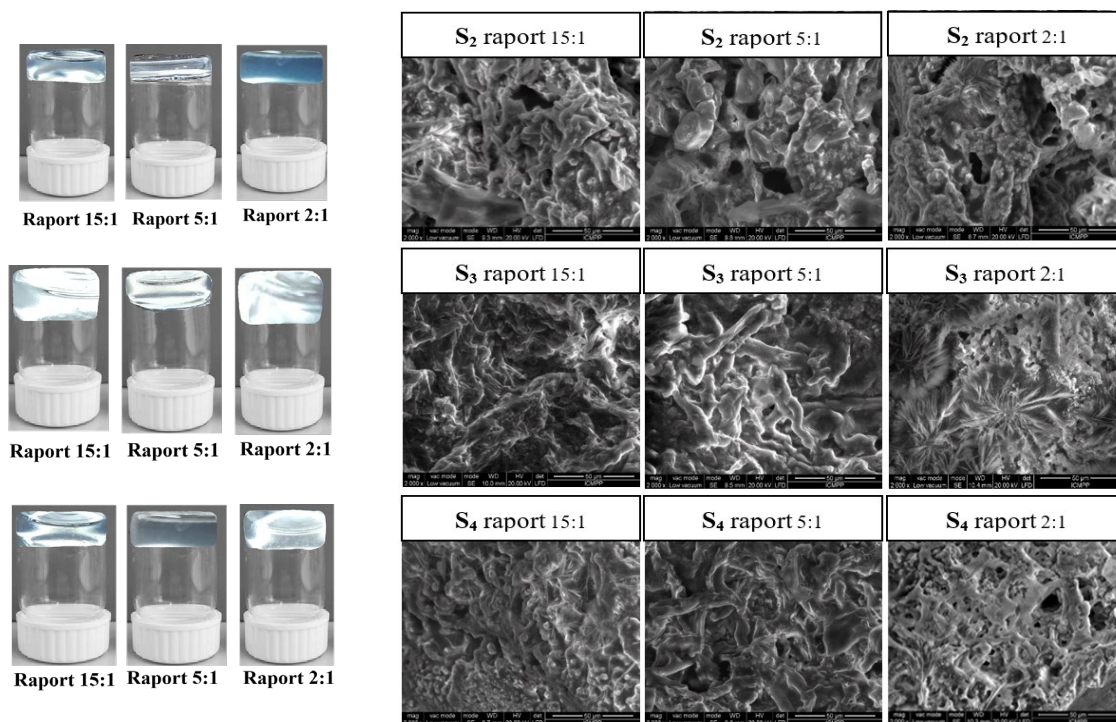


Figura 2.32. Aspectul sistemelor S_2 , S_3 , S_4 co-asamblate în raport 15:1, 5:1 și 2:1 și imaginile SEM ale acestora.

Pentru toate sistemele co-asamblate, s-a demonstrat formarea fibrelor, cu morfologii diferite, în funcție de structura chimică a compuşilor precursori. În cazul sistemului S_2 , fibrele au fost bine definite cu diametrul mediu de 67 ± 13 nm, ușor strangulate în unele zone, formând o rețea destul de densă și compactată, așa cum se vede în Figura 2.34. Pe de altă parte, sistemul S_3 prezintă formațiuni fibrilare dispuse pe un substrat granular, având o lățime medie de 40 ± 6 nm, așa cum se observă în imaginea detaliată AFM. Sistemul S_4 conține fibre groase cu un diametru mediu de 114 ± 15 nm și un aranjament paralel aparent la nivelul de scanare studiat.

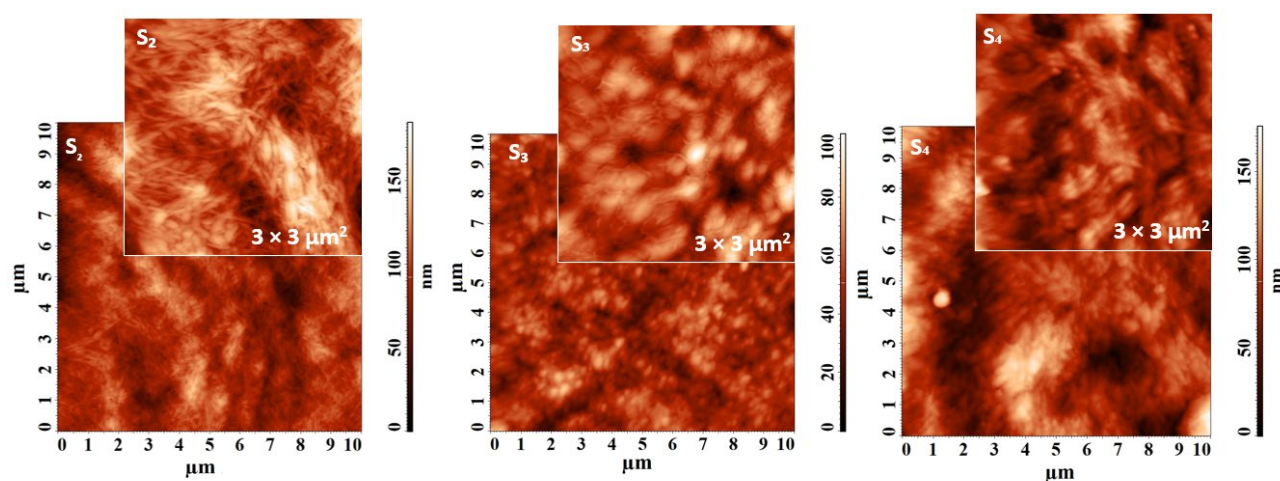


Figura 2.34. Imagini AFM ale sistemelor co-asamblate (S_2 , S_3 și S_4) colectate la $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ și $3 \times 3 \mu\text{m}^2$.

Din studiile reologice se remarcă faptul că sistemele co-asamblate în raport 5:1 prezintă un comportament de gel având $G' > G''$ și $\tan \delta < 1$. Valoarea modulului de elasticitate este influențată

de compoziție, astfel că sistemul S_3 prezintă modulul cel mai mare ceea ce confirmă o structurare și o rezistență mai bună a probei. De asemenea, din curbele de viscozitate se observă că sistemul S_3 este mai structurat, comparativ cu gelurile S_2 și S_4 .

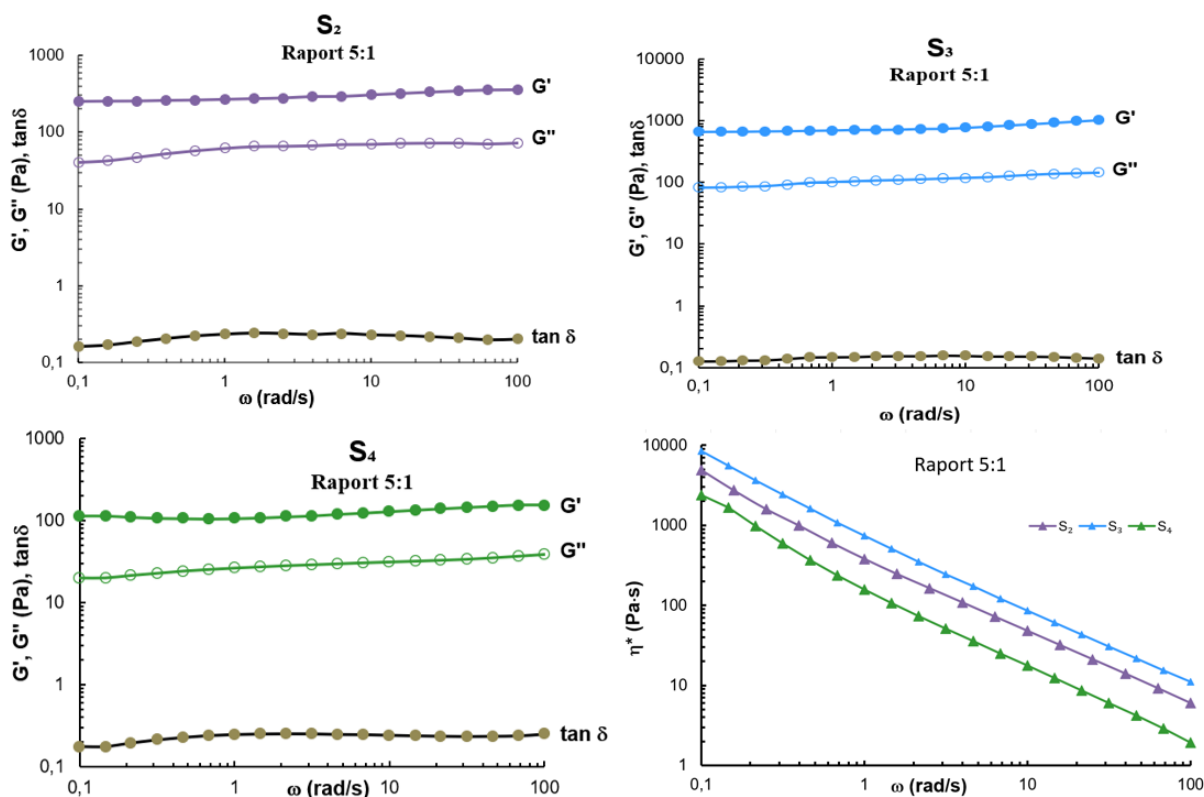


Figura 2.39. Parametri viscoelastici (G' , G'' și $\tan \delta$) în funcție de frecvența de oscilație (ω) pentru gelurile co-asamblate în raport 5:1 și viscozitatea aparentă în funcție de viteza de forfecare.

Acest studiu a demonstrat că aminoacizii și peptidele scurte modificate cu Fmoc pot fi utilizate ca LMMGs pentru formarea de rețele tridimensionale. Mai mult, sistemele supramoleculare S_2 , S_3 și S_4 au prezentat arhitecturi variate, chiar dacă factorul declanșator a fost comun. Acest aspect evidențiază că prezența solventului polar aprotic nu influențează modul de organizare arhitecturală.

CAPITOLUL III

HIDROGELURI MULTICOMPONENTE PE BAZĂ DE STRUCTURI SUPRAMOLECULARE ȘI POLIMERI NATURALI

3.1. Obiectivele studiului experimental

Provocările existente în proiectarea materialelor de tip hidrogel sunt orientate către imitarea cu fidelitate a arhitecturii 3D a ECM, precum și a dinamicii comportamentului mecanic și biochimic al structurilor biologice complexe. Hidrogelurile pe bază de polizaharide și fragmente de tip aminoacizi/peptide sunt materiale cu proprietăți promițătoare datorită biocompatibilității și biofuncționalității lor. În plus, rețelele reticulate fizic sunt considerate suporturi atractive datorită proprietății de auto-reparare, structurii chimice versatile și totodată procesului facil de obținere.

În acest context, scopul studiului din prezentul capitol este *proiectarea unui nou sistem multicomponent pe bază de aminoacizi și polimeri naturali cu structură, proprietăți fizice și chimice stabile și cu aplicabilitate în dezvoltarea de culturi celulare tridimensionale*. Noile hidrogeluri sunt considerate superioare compușilor precursori datorită modului în care proprietățile biologice ale aminoacizilor sau peptidelor se combină sinergic cu proprietățile fizico-chimice ale macromoleculor naturale specifice.

3.2. Proiectarea gelurilor multicomponente

Ca urmare a rezultatelor satisfăcătoare obținute în etapa de co-asamblare, sistemul S_4 pe bază de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH și Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH a fost utilizat pentru obținerea și caracterizarea sistemelor multicomponente de tip S_4 /polimer. Pornind de la aceste considerente, s-a urmărit consolidarea arhitecturii gelului supramolecular și generarea de structuri superioare. Polimerii gelifianti utilizați în cadrul studiului au fost guma gellan și agaroză.

3.2.1. Obținerea gelurilor multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și gumă gellan

Guma gellan este o polizaharidă utilizată în obținerea de biomateriale datorită atât comportamentului său mecanic, cât și reologic. În cadrul studiului experimental s-a utilizat forma nativă a gumei gellan (cu conținut ridicat de grupări acil) comercializată de SigmaAldrich® (Darmstadt, Germania) sub denumirea de Phytigel. Guma gellan se va regăsi în codificarea probelor ca GG.

Obținerea gelului multicomponent pe bază de structuri supramoleculare (S_4) și gumă gellan s-a realizat în două etape. Inițial a fost preparat sistemul supramolecular S_4 în raport 5:1, conform protocolului prezentat în *Capitolul II, Subcapitol 2.4.4*, după care s-a preparat soluția de gumă gellan

(2% w/v) în tampon fosfat 0,01 M (pH = 7,4). După solvirea completă a gumei gellan, a fost adăugat co-ansamblul supramolecular S_4 , obținându-se sistemul multicomponent S_4_GG . Proba GG este considerată probă martor al sistemului multicomponent.

Ca principiu de formare, gelul multicomponent S_4_GG a fost obținut prin co-asamblarea Fmoc-Lys(Fmoc)-OH cu Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH și rearanjarea lanțurilor macromoleculare ale gumei gellan ca urmare a tranziției acestora de la o conformație spiralată la dublu helix (“coil to double helix transition”), după cum este reprezentat în Figura 3.1.

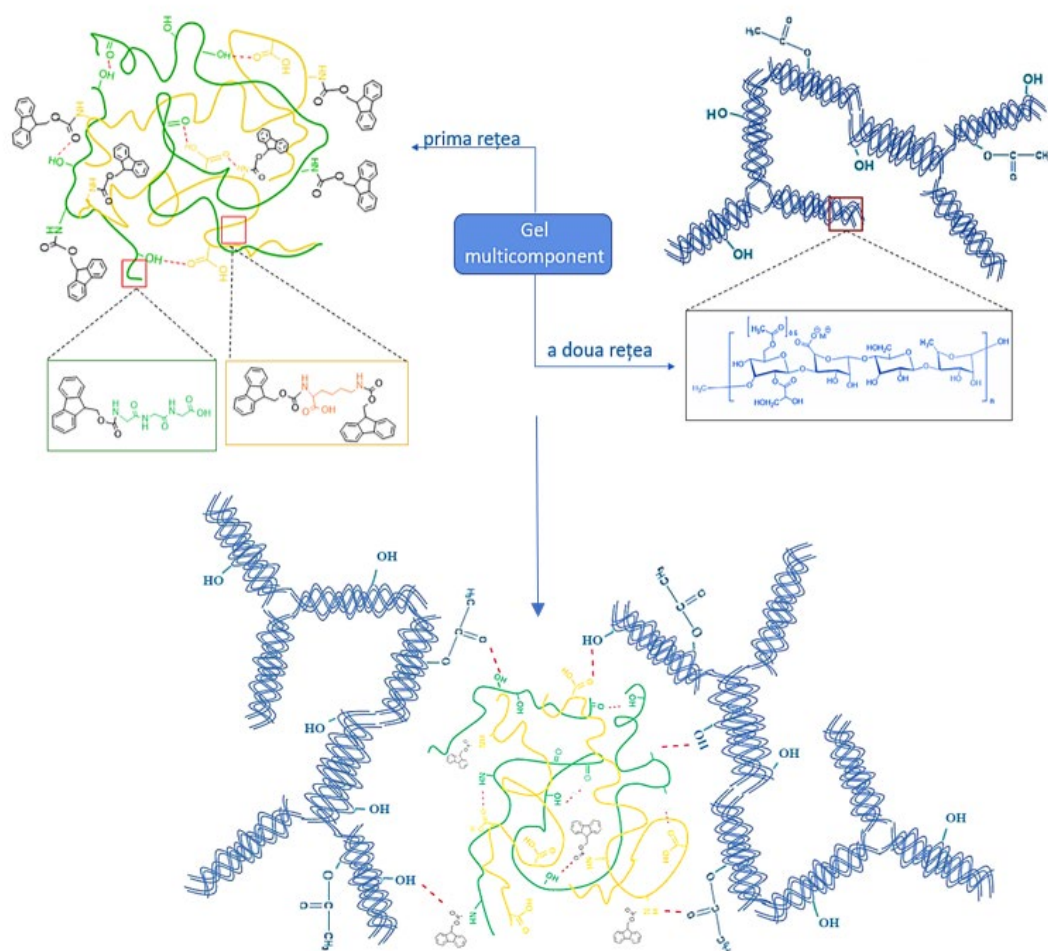


Figura 3.1. Reprezentarea schematizată a structurii hidrogelului multicomponent S_4_GG .

Sistemul multicomponent S_4_GG a fost caracterizat din punct de vedere structural prin spectroscopie cu transformată Fourier (FTIR) prin care s-a confirmat interacțiunea dintre sistemul supramolecular S_4 și guma gellan datorită formării legăturilor intra- și intermoleculare de hidrogen. Descompunerea termică a evidențiat că introducerea gumei gellan în sistemul supramolecular generează o rețea mai stabilă, aspect care poate fi determinat de prezența ciclurilor piranozice din GG și totodată cu numărul mai mare de interacțiuni moleculare secundare. De asemenea, din imaginile SEM s-a observat că prin utilizarea gumei gellan împreună cu S_4 are loc formarea unei rețele mai dense și cu pori mai mici ca urmare a formării unor interacțiuni moleculare secundare suplimentare.

Studiile reologice au relevat că prin introducerea gumei gellan în rețeaua sistemului supramolecular co-asamblat, modulele viscoelastice cresc de la $G' = \sim 100$ Pa și $G'' = \sim 50$ Pa (în cazul sistemului S_4), la G' de cca. 850 Pa și G'' de aproximativ 195 Pa ($\tan \delta \approx 0,229$), aspect ce evidențiază rolul polizaharidei în rețeaua finală. Studiile reologice arată că sistemele obținute pe bază de structuri supramoleculare și gumă gellan prezintă un comportament caracteristic gelurilor: $G' > G''$ și $\tan \delta < 1$.

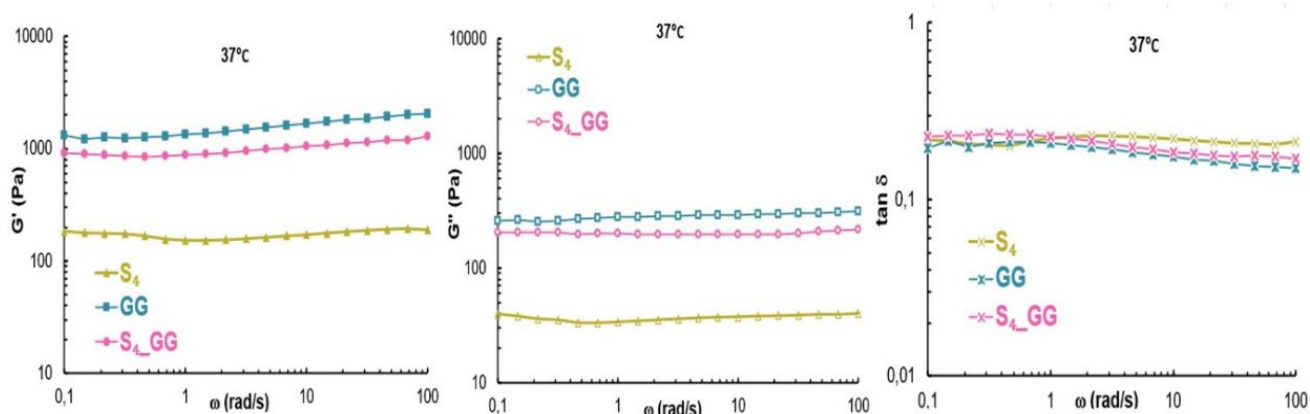


Figura 3.5. Dependența G' , G'' și $\tan \delta$ în funcție de frecvența de oscilație pentru rețelele precursorare S_4 , GG și gelul multicomponent S_4_GG la 37°C .

De asemenea, din studiile *in vitro* de citotoxicitate rezultă că sistemul S_4_GG este biocompatibil și nu generează efecte citotoxice asupra fibroblastelor, evidențiindu-se totodată importanța structurii supramoleculare în sistemul final.

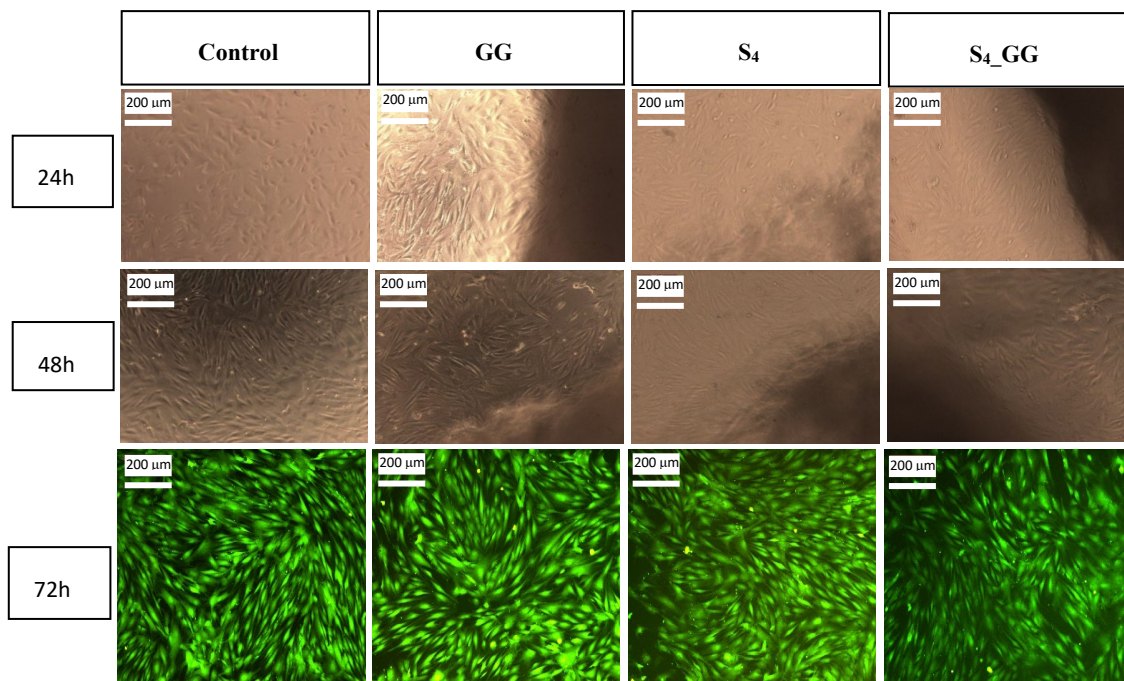


Figura 3.8. Culturile de celule în contrast de fază în contact cu S_4 , GG și S_4_GG la 24 și 48 de ore de la incubare și colorate cu Calceina AM la 72 de ore de la incubare.

3.2.2. Obținerea gelurilor multicomponente pe bază de structuri supramoleculare și agaroză

Agaroză este o polizaharidă liniară care permite obținerea de geluri ca urmare a ciclului încălzire (solvire) – răcire (gelifiere). Agaroză utilizată în cadrul studiului experimental a fost achiziționată de la Sigma-Aldrich® (Darmstadt, Germania) și se va regăsi în codificarea probelor ca A. Ca și în cazul obținerii sistemului multicomponent pe bază de S₄ și guma gellan, hidrogelurile pe bază de S₄ și agaroză au fost preparate în două etape. Inițial, s-a obținut sistemul supramolecular S₄ co-asamblat în raport 5:1 (procedeu descris în *subcapitolul 2.4.4*), după care a fost preparată soluția de agaroză 0.5% w/v în soluție tampon fosfat 0,01 M (pH = 7.4) sub agitare magnetică la temperatura de 90°C. Sistemul S₄ a fost adăugat peste soluția de agaroză, sub agitare ușoară, astfel obținându-se gelul multicomponent S₄_A, iar ca martor, în etapa de caracterizare, s-a utilizat agaroză 0,5% w/v.

Structura chimică a gelului multicomponent S₄_A obținut prin co-asamblarea Fmoc-Lys(Fmoc)-OH cu Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH și rearanjarea lanțurilor macromoleculare ale A este ilustrată în Figura 3.15.

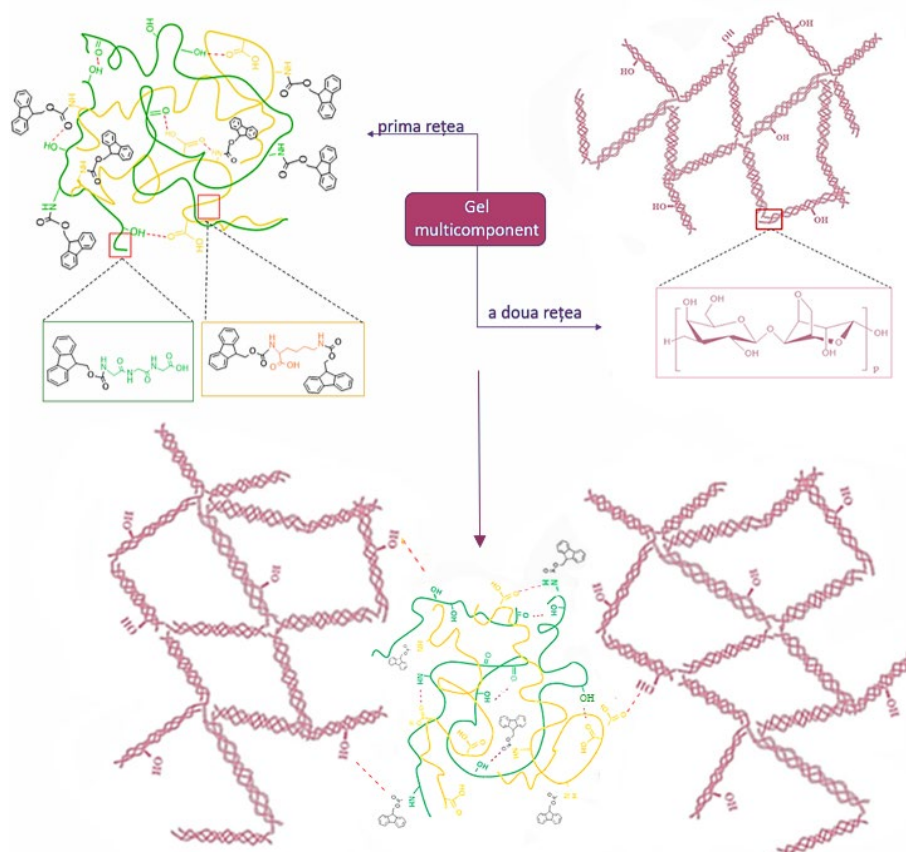


Figura 3.15. Reprezentarea schematică a structurii hidrogelului multicomponent S₄_A.

În cazul sistemului multicomponent S₄_A, caracterizarea structurală prin spectroscopie cu transformată Fourier (FTIR) a confirmat prezența grupărilor funcționale atât din structura moleculelor de aminoacid/tripeptidă, cât și din structura agarozei. Deplasările de bandă înregistrate demonstrează implicarea grupărilor -COOH și -NH₂ în interacțiunea dintre compuși și formarea rețelei tridimensionale. Din analiza termogravimetrică a rezultat că sistemul S₄_A prezintă stabilitate termică

mai ridicată față de sistemele precursoare S_4 și A . Mai mult, studiile reologice au arătat că introducerea agarozei în sistemul co-asamblat S_4 a generat creșterea modulului elastic G' datorită legăturilor suplimentare formate S_4 și A .

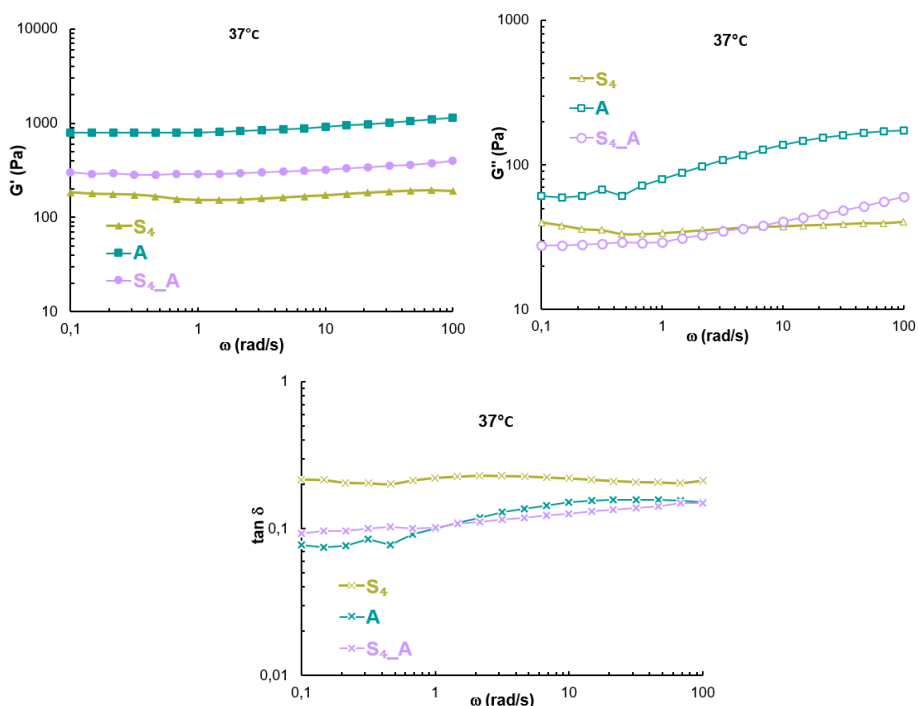


Figura 3.19. Dependența G' , G'' și $\tan \delta$ în funcție de frecvența de oscilație pentru rețelele precursoare S_4 și A și gelul multicomponent S_4_A la 37°C.

Din punct de vedere citotoxic, S_4_A prezintă viabilitate celulară de peste 90% la 72 ore de incubare cu celulele, iar rezultatele obținute din testele *in vivo* susțin rolul bioactiv pe care sistemul supramolecular îl are în interacțiunea dintre material și celulă.

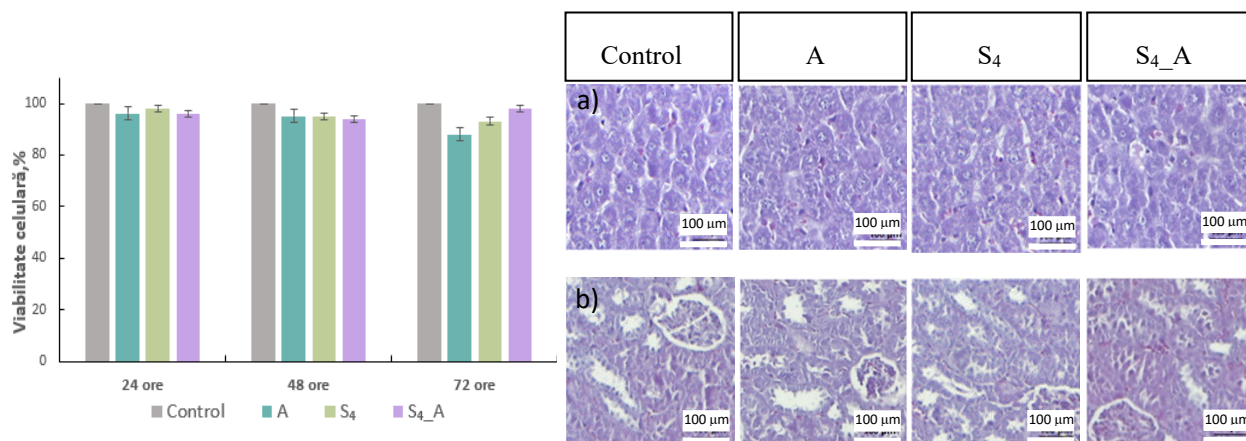


Figura 3.21. Viabilitatea celulară determinată prin testul MTT la 24, 48 și 72 ore în contact cu materialele S_4 , A și S_4_A (stânga) și imagini de microscopie optică ale a) structurii ficatului și b) structurii rinichiului în urma testării gelurilor S_4 , A și S_4_A (dreapta).

Coroborarea rezultatelor obținute din analizele efectuate susțin posibilitatea utilizării materialelor S_4_GG și S_4_A în aplicații de natură biomedicală.

CAPITOLUL IV

GELURI HIBRIDE PE BAZĂ DE STRUCTURI SUPRAMOLECULARE ȘI POLIMERI NATURALI ȘI SINTETICI

4.1. Obiectivele studiului experimental

Obiectivul studiului experimental a fost obținerea de sisteme hibride pe bază de secvențe de tip aminoacid/peptidă (S_4), polimeri naturali (alginat de sodiu - NaAlg) și polimeri sintetici (poli(anhidridă itaconică-co-3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan) – PItAU). Combinarea acestor structuri chimice constituente oferă posibilitatea generării unor **noi materiale hibride cu proprietăți complexe, capabile să favorizeze interacțiunea celulă-matrice**. Componentele naturale au rolul de a menține caracterul biocompatibil, dar totodată sunt și recunoscute pentru capacitatea de a forma hidrogeluri. Componenta sintetică este reprezentativă fiind un compus realizat în cadrul colectivului și care are confirmarea biocompatibilității prin studii *in vivo*.

Studiul experimental are la bază trei etape: (i) *sinteza copolimerului PItAU* urmată de (ii) *modificarea chimică prin greșarea acestuia cu un polimer natural (NaAlg)*, optimizându-se activitatea copolimerului PItAU în mediul biologic, și (iii) *introducerea sistemului supramolecular S_4 în rețeaua hibridă pe bază de alginat de sodiu NaAlg/PITAU* care vizează creșterea potențialului aplicativ în domeniul biomedical.

4.2. Proiectarea gelurilor hibride

Proiectarea sistemelor hibride pe bază de polimeri naturali/sintetici și structuri supramoleculare s-a realizat în trei etape reproductibile, „menționate mai jos”.

4.2.1. Sinteza copolimerului poli(anhidridă itaconică-co-3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan)

Conform protocolului dezvoltat de Diaconu și colab. [143], copolimerul PItAU a fost sintetizat prin procesul de polimerizare radicalică a anhidridei itaconice (ItA) cu 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan (U), în raport 1:1,5 între comonomeri, în prezența AIBN ca inițiator și 1,4-dioxan ca solvent. Polimerizarea s-a desfășurat timp de 17 ore în atmosferă inertă de azot, la temperatură constantă de 75 °C, cu o viteză de agitare de 250 rpm. După răcire, amestecul de reacție a fost precipitat prin picurare în dietileter. Au urmat mai multe etape de spălare cu dietileter, după care copolimerul a fost uscat în etuvă la temperatura camerei și 600 mm HG vacuum pentru 24 de ore. În Figura 4.1 este reprezentat schematizat principiul sintezei copolimerului poli (anhidridă itaconică-co-3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan).

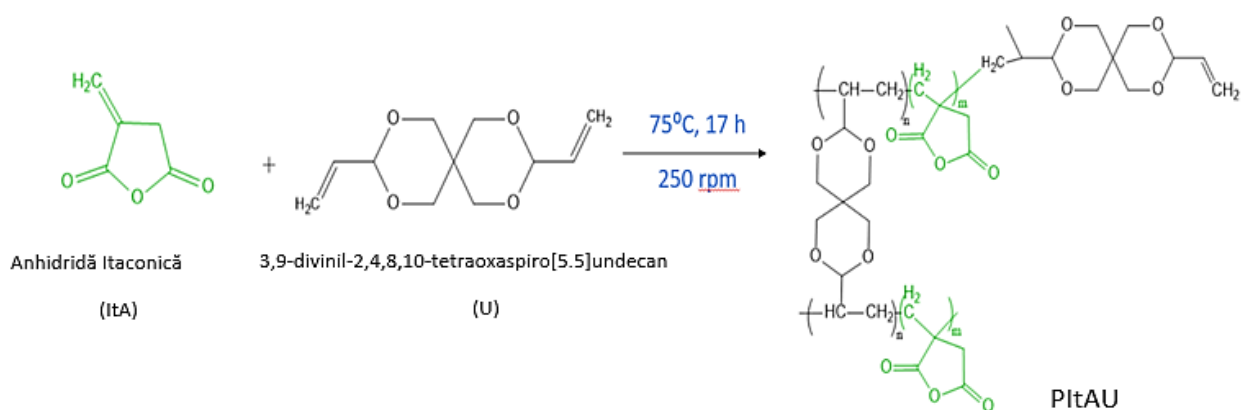


Figura 4.1. Reprezentarea schematizată a sintezei copolimerului PIItAU.

Obținerea copolimerului a fost confirmată de analizele spectrale efectuate (FTIR, ^1H -RMN), în timp ce masa moleculară s-a determinat prin difuzia statică a luminii emisă de un laser (SLS) care relevă că masa moleculară a copolimerului PIItAU este 69.90 kDa.

4.2.2. Obținerea bioconjugatului NaAlg/PIItAU

Cea de a doua etapă a constat în formarea unui sistem hibrid pe baza unui amestec de polimer natural/polimer sintetic. Obținerea bioconjugatului NaAlg/PIItAU s-a realizat prin amestecarea soluției apoase de NaAlg de concentrație 30 mg mL^{-1} cu o cantitate exactă de copolimer (200 mg mL^{-1}) în soluție de dioxan pentru a asigura un raport gravimetric între NaAlg:PIItAU de 1:3,5. Reacția dintre polimerul natural și copolimerul sintetic a avut loc la temperatura camerei, în absența catalizatorilor sau a agenților de reticulare.

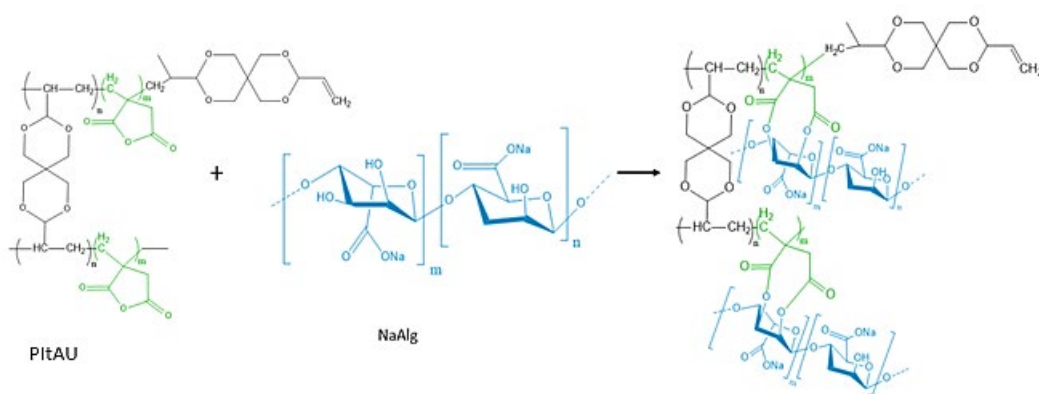


Figura 4.2. Reprezentarea schematizată privind obținerea structurii NaAlg/PIItAU.

Spectrul FTIR al bioconjugatului NaAlg/PIItAU prezintă benzi specifice ce relevă prezența ambilor compuși și totodată interacțiunea dintre aceștia. Prezența benzii din regiunea 3495 cm^{-1} este atribuită vibrațiilor de întindere ale grupării O-H din structura NaAlg, în timp ce dispariția benzilor din regiunea $1862 \text{ cm}^{-1} - 1782 \text{ cm}^{-1}$ confirmă interacțiunea dintre NaAlg și PIItAU, ca urmare a deschiderii inelului anhidridei itaconice și formării de noi legături intermoleculare. De asemenea,

benzile din regiunea 1213 cm^{-1} - 1170 cm^{-1} confirmă prezența fragmentelor spiroacetal caracteristice copolimerului PItAU.

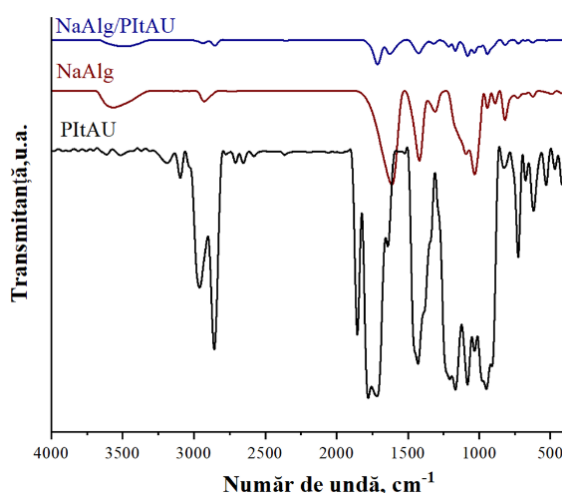
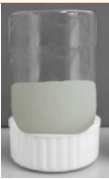
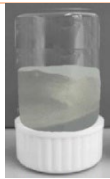


Figura 4.5. Spectrele FTIR ale NaAlg/PItAU, NaAlg și PItAU.

4.2.1. Obținerea gelurilor hibride pe bază de structuri supramoleculare și NaAlg/PItAU

Obținerea hidrogelurilor pe bază de NaAlg/PItAU și structuri supramoleculare co-asamblate s-a realizat în două etape: prima etapă a vizat obținerea bioconjugatului NaAlg/PItAU, iar cea de-a doua etapă s-a axat pe prepararea soluțiilor de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH în concentrație 0,5% w/v și Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH de 0,1% w/v, conform protocolului descris în *subcapitolul 2.4.4*. După realizarea celor două etape, amestecurile pe bază de NaAlg/PItAU și S₄ (raport 15:1, 5:1 și 2:1) au fost lăsate la temperatura camerei pentru 24 de ore pentru maturare. Aspectul acestora în urma testului de inversie a flaconului este prezentat în tabelul 4.3.

Tabel 4.3. Aspectul amestecurilor pe bază de NaAlg/PItAU și S₄ (raport 15:1, 5:1 și 2:1).

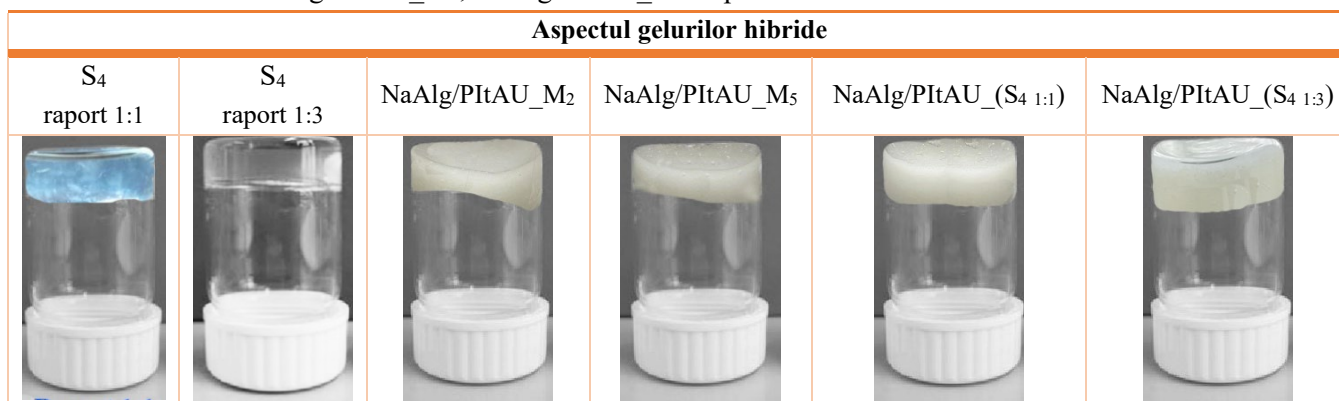
Aspect probe		
NaAlg/PItAU_(S ₄ 15:1)	NaAlg/PItAU_(S ₄ 5:1)	NaAlg/PItAU_(S ₄ 2:1)
		

Ținând cont că după 24 de ore nu s-a format gel stabil, s-a încercat prepararea soluțiilor de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH și Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH în concentrație de 0,5% w/v, ulterior acestea fiind amestecate în raport gravimetric 1:1 și 1:3. De asemenea, raportul dintre structura NaAlg/PItAU și sistemul S₄ este 1:1 v/v.

În Tabelul 4.5. poate fi observat aspectul probelor martor și ale gelurilor hibride în urma testului de inversie a flaconului. Probele prezintă aspect opac, cu ușoare diferențieri la nivel de consistență. După cum se poate remarca, probele NaAlg/PItAU_M₂ și NaAlg/PItAU_M₅ sunt instabile prezentând o ușoară curgere.

Proba cu conținut de NaAlg/PItAU și Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (M_2) va fi regăsită în cadrul studiului sub denumirea NaAlg/PItAU_ M_2 , iar cea cu conținut de NaAlg/PItAU și Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (M_5) va fi NaAlg/PItAU_ M_5 . Acestea sunt considerate probe martor ale sistemelor hibride NaAlg/PItAU_ (S_4 1:1) și NaAlg/PItAU_ (S_4 1:3).

Tabel 4.5. Aspectul gelurilor hibride NaAlg/PItAU_ (S_4 1:1) și NaAlg/PItAU_ (S_4 1:3) și al martorilor NaAlg/PItAU_ M_2 , NaAlg/PItAU_ M_5 după testul de inversie a flaconului.



Din spectrele FTIR ale sistemelor hibride s-a observat că prezența tripeptidei în raport mai mare conduce la formarea unui număr mai mare de legături de hidrogen. Acest aspect este confirmat și de analiza termică din care reiese că gelul NaAlg/PItAU_ (S_4 1:3) este mai stabil în comparație cu NaAlg/PItAU_ (S_4 1:1).

Mai mult, capacitatea de sorbție a vaporilor de apă a fost evaluată în regim dinamic, iar izotermele de sorbție/desorbție obținute pot fi asociate cu izotermele de Tip IV. Acest tip de izotermă cu histerezis este caracteristic suprafețelor poroase, fiind specific pentru un material hidrofil. De asemenea, datele BET obținute din evaluarea comportamentului de sorbție/desorbție a apei demonstrează că rețelele hibride NaAlg/PItAU_ (S_4 1:1) și NaAlg/PItAU_ (S_4 1:3) prezintă pori cu o dimensiune medie de 2 nm și suprafețe specifice cu valori cuprinse în intervalul de 280 până la 340 m^2/g .

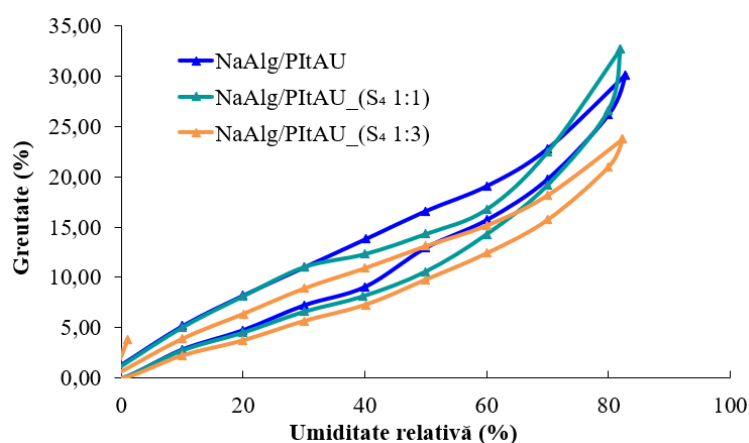


Figura 4.17. Izotermele de sorbție/desorbție ale probelor NaAlg/PItAU, NaAlg/PItAU_ (S_4 1:1) și NaAlg/PItAU_ (S_4 1:3)

Efectele sinergice generate de combinarea fragmentelor naturale aminoacid/tripeptidă și NaAlg cu polimerul sintetic PItAU au condus la obținerea sistemului hibrid NaAlg/PItAU_(S41:3) cu proprietăți superioare compușilor inițiali.

CAPITOLUL V

GELURI CU DUBLĂ REȚEA PE BAZĂ DE POLI(2-(DIMETILAMINO)ETIL METACRILAT) ȘI STRUCTURI SUPRAMOLECULARE

5.1. Obiectivele studiului experimental

Obiectivul acestui studiu a vizat proiectarea de hidrogeluri cu dublă rețea realizată dintr-o primă rețea formată prin reticularea chimică a lanțurilor de PDMAEMA cu N-N'-metilen-bis-acrilamidă și interpenetrată cu cea de a doua rețea supramoleculară formată prin co-asamblarea aminoacidului Fmoc-Lys(Fmoc)-OH cu tripeptida Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH. Interpenetrarea celor două rețele oferă avantajele obținerii unor hidrogeluri moi și dure (“soft and tough”) ce posedă în mod intrinsec rezistență mecanică datorită proprietăților contrastante ale acestora. Unitățile structurale amfotere au fost alese datorită capacității lor de a interacționa și genera sisteme cu dublă rețea cu proprietăți fizico-chimice specifice.

5.2. Prepararea “*in situ*” a gelurilor cu dublă rețea pe bază de poli(2-(dimetilamino)etil metacrilat) și structuri supramoleculare

Formarea “*in situ*” de rețele duble (DN) s-a realizat prin obținerea rețelei sintetice pe bază de PDMAEMA care se interpenetrează cu cea supramoleculară generată de co-asamblarea copartenerilor Fmoc-Lys(Fmoc)-OH și Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH.

Rețeaua pe bază de PDMAEMA a fost preparată prin polimerizarea radicalică a monomerului 2-(dimetilamino)etil metacrilat în prezența sistemului de inițiere redox persulfat de amoniu (APS)/N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamină (TEMED) și reticularea lanțurilor polimerice cu N,N'-metilen-bis-acrilamidă utilizând apa ca mediu de reacție, astfel obținându-se rețeaua sintetică PDMAEMA. Raportul volumetric dintre APS și TEMED a fost de 10:1.

Figura 5.1 prezintă principiul de formare a rețelei PDMAEMA. În urma procesului de polimerizare se formează polimerul poli (2-(dimetilamino)etil metacrilat) care ulterior este reticulat cu N,N'-metilen-bis-acrilamidă. Prezența grupărilor vinil (-CH=CH₂) din structura bisacrilamidei determină formarea de legături covalente cu grupările funcționale ale PDMAEMA, astfel stabilindu-se interacțiuni între lanțurile polimerice.

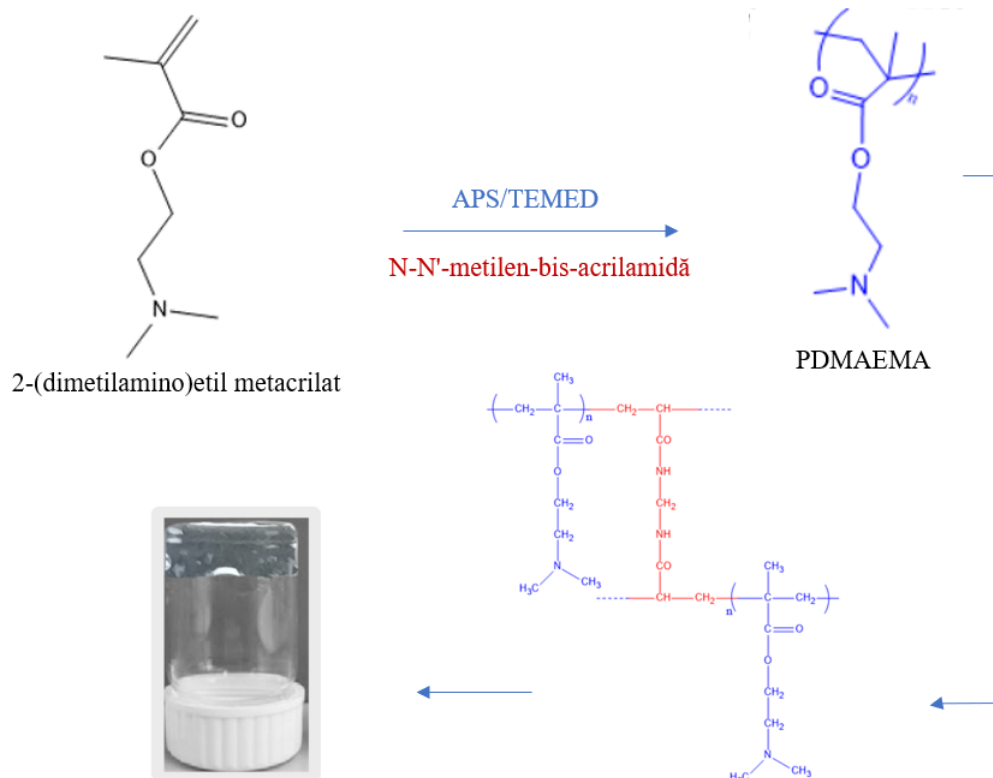


Figura 5.1. Reprezentarea schematizată a rețelei sintetice pe bază de PDMAEMA.

Prepararea rețelei supramoleculare S₄ s-a realizat conform protocolului prezentat în *subcapitolul 2.4.4.*, cu precizarea că, în cadrul prezentului studiu co-partenerii Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (M₂) și Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (M₅) au fost co-asamblați în raport 1:1 și 1:3 ca urmare a creșterii concentrației tripeptidei de la 0,1% w/v (utilizată inițial în formarea sistemului S₄ co-asamblat în raport 15:1, 5:1 și 2:1) la 0,5% w/v. Această creștere a concentrației se datorează faptului că sistemele PDMAEMA_(S₄ 15:1), PDMAEMA_(S₄ 5:1) și PDMAEMA_(S₄ 2:1) nu formează gel stabil. Prin urmare, au fost obținute sistemele PDMAEMA_(S₄ 1:1) și PDMAEMA_(S₄ 1:3).

Tabel 5.1. Aspectul gelurilor cu dublă rețea PDMAEMA_(S₄ 1:1) și PDMAEMA_(S₄ 1:3) și al martorilor PDMAEMA_M₂, PDMAEMA_M₅ după testul de inversie a flaconului.

Aspect probe			
MARTORI		SISTEME DN	
PDMAEMA_M ₂	PDMAEMA_M ₅	PDMAEMA_(S ₄ 1:1)	PDMAEMA_(S ₄ 1:3)

Din studiul comportării la umflare se remarcă o creștere bruscă a gradului de umflare în primele cinci minute, comportament care se datorează caracterului hidrofil al polimerului PDMAEMA [247].

Sistemul DN PDMAEMA_(S₄ 1:3) prezintă un grad de umflare mai mare decât PDMAEMA_(S₄ 1:1) datorită morfologiei cu pori uniform distribuiți, care au un rol activ în difuzia moleculelor de soluție tampon fosfat în matricea de gel. De asemenea, prezența precursorului M₅ în sistemul PDMAEMA_M₅ determină o creștere mai mare a gradului de umflare, față de M₂ ca urmare a formării unui număr mai mare de legături de H între -CO-NH- și mediu.

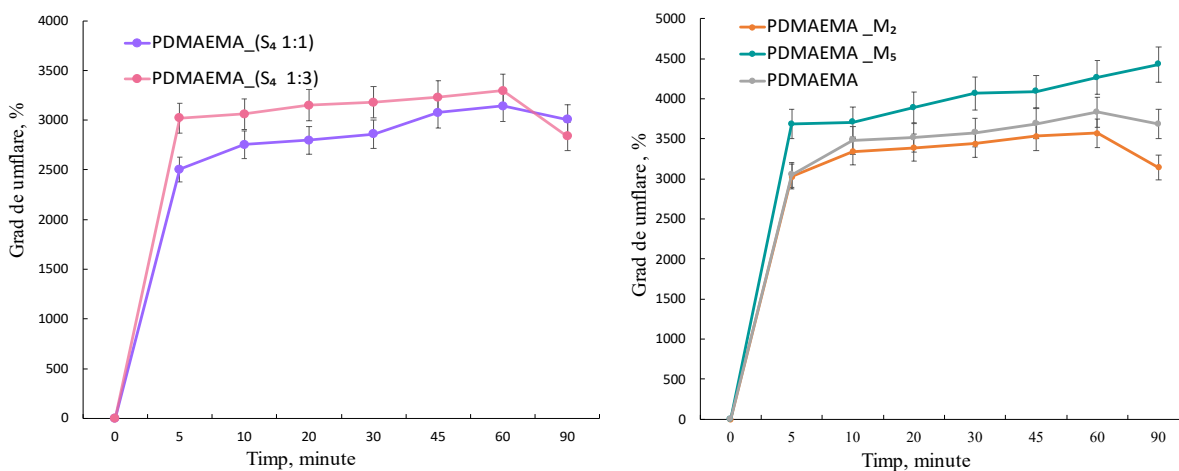


Figura 5.8. Cinetica gradului de umflare a sistemelor DN PDMAEMA_(S₄ 1:1), PDMAEMA_(S₄ 1:3) și a martorilor PDMAEMA, PDMAEMA_M₂ și PDMAEMA_M₅.

Testele biologice au arătat absența unor modificări semnificative ale parametrilor hematologici, biochimici sau imunologici investigați, aspect ce sugerează o bună hemocompatibilitate *in vitro* și biocompatibilitate *in vivo* la șoarece.

Rezultatele obținute în urma studiului experimental **demonstrează că interpenetrarea rețelei PDMAEMA cu rețeaua supramoleculară S₄ (1:1, 1:3) a condus la formarea de geluri cu dublă rețea: PDMAEMA_(S₄ 1:1) și PDMAEMA_(S₄ 1:3).**

CAPITOLUL VII

CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

În ultimii ani a existat un interes imens pentru studierea gelurilor supramoleculare derivate din compuși cu masă moleculară mică (LMMGs). Imitarea fidelă a structurilor supramoleculare auto-asamblate inspirate din natură a devenit o direcție de cercetare din ce în ce mai atractivă datorită moleculelor individuale care prezintă abilitatea de a genera o serie de nano/micro-agregate, precum fibre, foi, tuburi, sfere, α -elice, vezicule. Diversitatea arhitecturilor structurale are la bază agregarea moleculelor prin diferite interacțiuni necovalente (legături de hidrogen, interacțiuni π - π , interacțiuni van der Waals, interacțiuni hidrofobe).

În prezent, cercetările în domeniu deschid noi căi de utilizare a gelurilor supramoleculare ca materiale funcționale moi, vizând potențiale aplicații în medicină și alte științe conexe. Aminoacizii și peptidele au atras atenția cercetătorilor datorită preponderenței acestora în sistemele vii, oferind noi perspective în exploatarea gelurilor supramoleculare ca suporturi 3D pentru creșterea și dezvoltarea culturilor celulare. Cu toate acestea, pe lângă avantajele structurale și versatilitatea chimică ale acestui tip de molecule, apar și dezavantaje generate de natura reversibilă și dinamică a legăturilor necovalente. Prin urmare, utilizarea LMMGs alături de polimeri naturali/sintetici conduce la obținerea de geluri multicomponente cu proprietăți intrinseci superioare compușilor precursori.

Teza de doctorat intitulată „Geluri multicomponente: modelarea structurilor cu compuși de masa moleculară mică” a fost structurată în două părți: Partea I (Capitolul I) prezintă un studiu de literatură privind direcțiile abordate în teză, iar Partea II prezintă contribuțiile originale (Capitolul II-V) și tehnicile utilizate (Capitolul VI). Teza se încheie cu o serie de concluzii generale (Capitolul VII).

Rezultatele originale din Partea a II-a, structurate în patru capitole, au vizat următoarele direcții de cercetare:

- dezvoltarea unor sisteme supramoleculare sub formă de geluri pe bază de aminoacizi și peptide scurte utilizați ca LMMGs;
- obținerea și caracterizarea de geluri multicomponente prin includerea unor polimeri naturali gelifianti în matricea supramoleculară și investigarea potențialului aplicativ ca matrice 3D pentru creșterea și dezvoltarea culturilor celulare;
- prepararea și caracterizarea de geluri hibride pe bază de polimeri sintetici/naturali și structuri supramoleculare în vederea combinării sinergice a proprietăților fizico-chimice și biologice ale compușilor precursori;
- sinteza și caracterizarea de geluri cu dublă rețea (DN) de tip semi-IPN având la bază dezvoltarea matricei polimerice și întrepătrunderea structurilor supramoleculare.

Din studiile efectuate se pot concluziona următoarele aspecte:

GELURI SUPRAMOLECULARE PE BAZĂ DE AMINOACIZI ȘI PEPTIDE CA GELATORI DE MASĂ MOLECULARĂ MICĂ

- În urma studiului de auto/co-asamblare au fost obținute patru sisteme supramoleculare pornind de la utilizarea a doi stimuli externi: schimbarea pH-ului (S_1) și folosirea unui solvent polar aprotic (S_2, S_3, S_4). Sistemul S_1 pe bază de triptofan și lizină a fost co-asamblat în raport 1:3, 1:1 și 3:1 ca urmare a concentrației minime de gelifiere (CMG) 0,5% pentru ambii co-parteneri ai sistemului. În cazul sistemelor S_2, S_3, S_4 , elementul comun a fost lizina care a fost co-asamblată cu serina, acid glutamic și tripeptida glicil-glicil-glicină. Raportul dintre compuși a fost 15:1, 5:1 și 2:1, ca urmare a CMG de 0,5% pentru lizină și 0,1% pentru co-partenerul utilizat, oferind informații cu privire la aportul fiecărui compus asupra proprietăților rețelei finale;
- Capacitatea de organizare/structurare a compușilor a fost confirmată prin analizele efectuate pe sistemele în stare de soluție, arătând că S_1 prezintă un posibil aranjament structural elicoidal generat prin interacțiuni π - π de fragmentele fluorenil din structura Fmoc și inelele indol din structura triptofanului, iar legăturile intra- și intermoleculare de hidrogen au fost forțele motrice dominante ale sistemelor S_2, S_3 și S_4 ;
- În cazul sistemelor S_2, S_3 și S_4 *agregarea moleculară* apare la intervale diferite de timp, în funcție de co-partenerul lizinei. Când se utilizează Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH timpul de co-asamblare este de ~30 minute, în timp ce prezența Fmoc-serinei permite apariția punctului de asociere/asamblare după 90 de minute. Sistemul S_3 care se bazează pe interacțiunea lizinei cu Fmoc-acid glutamic se formează după 24 de ore;
- Studiile de *difracție de raze X* atestă că în urma procesului de co-asamblare se obțin sisteme supramoleculare cu un aranjament molecular mai ordonat, comparativ cu aranjamentul molecular al precursorilor;
- Studiile de *spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)* relevă că o dată cu creșterea cantității de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH un număr mai mare de grupări -CO-NH- este implicat în formarea legăturilor intra- și intermoleculare de hidrogen. Sistemele supramoleculare S_2, S_3, S_4 prezintă deplasări de bandă care atestă formarea legăturilor fizice intra- și intermoleculare și care asigură organizarea lor într-o rețea 3D;
- De asemenea, *stabilitatea termică* ridicată a sistemului S_1 co-asamblat în raport 1:3 (Fmoc-Trp-OH:Fmoc-Lys(Fmoc)-OH) este corelată cu densitatea grupărilor aromatice Fmoc și

descompunerea incompletă a inelelor fluorenil. Analiza *termică* a arătat că sistemul S₄ prezintă o stabilitate termică superioară celorlalte sisteme analizate;

- *Studiul morfologic* complex confirmă că aminoacizii și peptida scurtă utilizați ca LMMGs agregă inițial sub formă de dendrimer, sferulite, fibrile, vezicule care ulterior asigură formarea fibrelor și organizarea lor în rețele tridimensionale. În funcție de co-partenerii utilizați, sistemele co-asamblate prezintă aspect diferit: S₁ prezintă morfologie fibrilară, S₂ prezintă fibre drepte aliniate una lângă alta, în timp ce S₃ are o rețea mai puțin densă cu fibre mai scurte și mai flexibile, iar sistemul S₄ prezintă o rețea mult mai densă cu puncte de ramificare;
- *Studiul reologic* a evidențiat că sistemele supramoleculare obținute prezintă un comportament de tip gel ($G' > G''$ și $\tan \delta < 1$), aspect ce susține capacitatea aminoacizilor și peptidei scurte de a acționa ca LMMG-uri în sistemele studiate. În cazul sistemului S₁ co-asamblat în raport 3:1 se remarcă o scădere a modulului viscoelastic, o dată cu creșterea conținutului de Fmoc-Trp-OH. Astfel, inelele indol creează spațiu între molecule și diminuează potențialul acestora de a forma interacțiuni moleculare;
- *Caracterul citocompatibil* al sistemelor analizate a fost determinat prin teste *in vitro* și *in vivo*, după administrarea intraperitoneală a fragmentelor de materiale la șoareci. Lipsa variației activității enzimelor hepatice a atestat că materialele sunt biocompatibile, fără influență negativă a procesului inflamator asupra funcției hepatice.

Gelurile supramoleculare obținute și caracterizate în cadrul acestui studiu prezintă caracteristici optime pentru utilizarea în aplicații medicale. Datorită proprietăților sale, sistemul S₄ a fost ales pentru utilizarea în studiile următoare.

GELURI MULTICOMPONENTE PE BAZĂ DE STRUCTURI SUPRAMOLECULARE ȘI POLIMERI NATURALI

- Includerea de polimeri naturali în sistemul supramolecular S₄ a fost o altă direcție de cercetare care a vizat consolidarea arhitecturii gelului și generarea de structuri superioare din punct de vedere reologic bazate pe interacțiuni fizice suplimentare;
- Utilizarea gumei gellan și agarozei este justificată de capacitatea acestora de a gelifia ca urmare a rearanjării lanțurilor macromoleculare indusă de variația temperaturii;
- Analiza structurală FTIR confirmă că cele două sisteme multicomponente (S₄_GG și S₄_A) se bazează pe legături fizice intra- și intermoleculare, iar analiza termogravimetrică evidențiază comportamentul termic și schimbările generate de introducerea macromoleculilor, în ambele cazuri având loc o creștere a stabilității termice;

- Studiile morfologice indică formarea unor rețele poroase omogene în directă corelație cu compoziția lor;
- Comportamentul viscoelastic al gelurilor multicomponente a fost studiat prin măsurători reologice care au aratat că prezența macromoleculelor în sistemul S₄ contribuie semnificativ la creșterea modulului de stocare, de la ~300 Pa (S₄) la 500 Pa (S₄_A) sau ~1000 Pa (S₄_GG);
- Materialele au fost testate din punct de vedere al proprietăților de bioadeziune, utilizându-se membrane de dializă hidratate ca model de țesut *in vitro*. Rezultatele obținute sugerează că introducerea gumei gellan în matricea supramoleculară crește forța de adeziune și lucrul mecanic de adeziune a materialului S₄_GG datorită creșterii numărului de legături de hidrogen dintre material și membrană. În cazul sistemului S₄_A se observă o scădere a forței de bioadeziune și a lucrului mecanic de adeziune la valori mai mici decât cele ale rețelei supramoleculare S₄. Caracterul neionic al agarozei este factorul responsabil de proprietățile adezive scăzute ale probei A;
- Testarea biocompatibilității *in vitro* s-a realizat pe fibroblaste primare confirmând că materialele testate nu prezintă citotoxicitate. În cazul ambelor sisteme se remarcă o viabilitate celulară satisfăcătoare, chiar și după 72 de ore de la incubare, însă viabilitatea celulară obținută pentru gelul S₄_A ***demonstrează potențialul acestuia de a fi utilizat ca platformă pentru creșterea și proliferarea celulară ca urmare a creșterii viabilității celulare concomitent cu durata de incubare;***
- Testarea biocompatibilității *in vivo* a gelurilor s-a realizat prin determinarea profilului hematologic, imunologic și histopatologic al șobolanilor Wistar, demonstrând că materialele nu au generat variații semnificative asupra valorilor serice ale parametrilor biologici și a elementelor de formulă leucocitară. În urma examenului histopatologic s-a evidențiat că materialele nu au influențat arhitectura hepatocitelor sau conformația rinichiului medular.

Coroborarea rezultatelor obținute în urma analizele efectuate susțin posibilitatea utilizării sistemelor multicomponente S₄_GG și S₄_A în aplicații de natură biomedicală, ca platformă pentru creșterea și proliferarea celulară ca urmare a creșterii viabilității celulare concomitent cu durata de incubare.

GELURI HIBRIDE PE BAZĂ DE STRUCTURI SUPRAMOLECULARE ȘI POLIMERI NATURALI ȘI SINTETICI

- Copolimerul sintetic poli(anhidridă maleică-co-3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan) utilizat în cadrul studiului a fost obținut prin procesul de polimerizare radicalică, urmat de modificarea chimică prin grefarea acestuia pe alginat de sodiu, cu scopul de a optimiza activitatea copolimerului în mediul biologic;

- Structura copolimerului a fost confirmată prin intermediul analizelor spectrale FTIR, ¹H-RMN, iar reacția de grefare s-a evidențiat prin spectroscopie FTIR ca urmare a deschiderii ciclului anhidridic caracteristic anhidridei itaconică și a formării unei legături ester;
- Analiza structurală FTIR a sistemelor hibride obținute în urma introducerii structurii supramoleculare S₄ în rețeaua NaAlg/PItAU atestă prezența și interacțiunea compușilor prin formarea legăturilor fizice intra- și intermoleculare;
- Analiza TG/DTG a arătat că prezența NaAlg/PItAU în sistemul S₄ contribuie la stabilitatea termică, cu mici variații date de raportul dintre co-partenerii sistemului S₄, aspect observat și din microscopia SEM. Prezența tripeptidei în raport mai mare (S₄ 1:3) conduce la obținerea unei rețele omogene cu aspect poros ca urmare a unui număr mai mare de interacțiuni moleculare generate de gruparea -CO-NH-;
- Din studiile reologice reiese că sistemul hibrid NaAlg/PItAU_(S₄ 1:3) prezintă comportament caracteristic gelurilor ($G' > G''$ și $\tan \delta < 1$), iar valoarea modulului G' mai mare decât al sistemului NaAlg/PItAU confirmă faptul că interacțiunile moleculare secundare formate între S₄ (1:3) și NaAlg/PItAU sunt responsabile de creșterea rigidității dinamice;
- Evaluarea capacității de absorbție a fluidelor s-a realizat în mediu cu soluție tampon fosfat cu pH 7,4, favorabil culturilor celulare. Starea de echilibru a fost atinsă după 96 de ore, gelurile prezentând un grad maxim de umflare cuprins între 3000 și 6700%, aspect ce le conferă caracter superabsorbant;
- Capacitatea de sorbție a vaporilor de apă a fost evaluată în regim dinamic, iar izotermele de sorbție/desorbție obținute sunt asociate cu izotermele de tip IV caracteristice suprafețelor poroase și specifice pentru un material hidrofил. Mai mult, datele BET confirmă că materialele prezintă o dimensiune medie a porilor de 2 nm și suprafețe specifice cu valori cuprinse în intervalul de 280 până la 340 m²/g;
- Testele de biocompatibilitate *in vitro* indică o bună interacțiune între materiale și celule, fiind înregistrate valori ale viabilității celulare de peste 75% după 96 de ore de la incubare.

Efectele sinergice obținute în urma combinării fragmentelor de tip aminoacid/tripeptidă cu NaAlg și polimerul sintetic PItAU au condus la obținerea sistemului hibrid NaAlg/PItAU_(S₄ 1:3) cu proprietăți superioare compușilor inițiali.

GELURI CU DUBLĂ REȚEA PE BAZĂ DE POLI[2-(DIMETILAMINO)ETIL METACRILAT] ȘI STRUCTURI SUPRAMOLECULARE

- Au fost preparate și studiate 5 probe dintre care una a fost rețeaua PDMAEMA pură, două au fost rețelele pe bază de PDMAEMA și Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, respectiv Fmoc-Gly-Gly-Gly-

OH, utilizate ca martori și două au fost gelurile cu dublă rețea, cu conținut de PDMAEMA și structuri supramoleculare de tip S₄ raport 1:1 și S₄ raport 1:3;

- Rețeaua sintetică PDMAEMA, considerată prima rețea din structura gelurilor DN, a fost obținută prin polimerizarea radicalică a 2-(dimetilamino)etil metacrilat în prezența sistemului inițiator APS/TEMED și reticularea lanțurilor polimerice cu N-N'-metilen-bis-acrilamidă;
- Obținerea gelurilor DN s-a bazat pe interpenetrarea celei de a doua rețele, reprezentată de sistemului supramolecular S₄, în matricea polimerică;
- Prima rețea este responsabilă de stabilitatea și rezistența mecanică, în timp ce a doua rețea oferă flexibilitate datorită interacțiunilor moleculare secundare formate între co-parteneri;

În urma analizelor efectuate se poate concluziona că efectele sinergice ale celor două rețele au oferit proprietăți fizico-chimice și biologice superioare compuşilor precursori.

PERSPECTIVE

Ca perspective, direcțiile de cercetare dezvoltate în cadrul tezei de doctorat vor fi extinse și orientate spre:

- studii aprofundate privind asamblarea componentelor peptidice (protonarea-deprotonarea grupelor amino și a grupelor carboxilice prin titrare potențiomtrică);
- studii privind stabilitatea sistemelor tip hidrogel prin expunerea la soluții simulate/fluide corporale;
- evaluarea biodegradabilității enzimatică *in vitro* și *in vivo*;
- evaluarea capacității de încapsulare “*in situ*” a celulelor în structura sistemele supramoleculare;
- optimizarea sistemelor de tip gel pe bază de peptide scurte spre diverse domenii terapeutice;

Ca perspective generale este emergentă dezvoltarea de tehnici de obținere/sinteză dinamice, rapide, fezabile și sustenabile care să confere posibilitatea de a face modificări suplimentare asupra lanțului de aminoacizi, terminalului N- sau C- sau la nivelul lanțurilor laterale. Pentru a imita fidel matricea extracelulară este necesară stabilizarea structurilor secundare obținute prin co-asamblarea aminoacizilor/peptidelor pentru a genera platforme terapeutice promițătoare.

Diseminarea rezultatelor și activitatea științifică

Rezultatele originale obținute și prezentate în cadrul tezei de doctorat fac subiectul a cinci articole științifice, două comunicări și trei postere:

• *Articole științifice publicate*

1. **Alexandra Croitoriu**, Loredana E. Nita, Alina G. Rusu, Florica Doroftei, Liliana Verestiuc, Co-assembled peptides hierarchically oriented for supramolecular gel formation, *Rev. Roum. Chim.*, 2021, 66(5), 449–458. [doi: 10.33224/rrch.2021.66.5.08](https://doi.org/10.33224/rrch.2021.66.5.08) (FI 0,5)
2. **Alexandra Croitoriu**, Loredana Elena Niță, Aurica P. Chiriac, Alina Gabriela Rusu, Maria Bercea, New Physical Hydrogels Based on Co-Assembling of FMOC–Amino Acids. *Gels*. 2021; 7(4):208. [doi:10.3390/gels7040208](https://doi.org/10.3390/gels7040208) (FI 4,6)
3. **Alexandra Croitoriu**, Alina Gabriela Rusu, Alina Ghilan, Maria Bercea, Loredana Elena Nita, Aurica P. Chiriac, New Fmoc-amino acids/peptides-based supramolecular gels obtained through co-assembly process: preparation and characterization, *Polymers*, 2022, 14(16), 3354. [doi:10.3390/polym14163354](https://doi.org/10.3390/polym14163354) (FI 5,0)
4. Loredana Elena Nita, **Alexandra Croitoriu**, Alexandru M. Serban, Maria Bercea, Alina G. Rusu, Alina Ghilan, Maria Butnaru, Liliana Mititelu-Tartau, Aurica P. Chiriac, New Hydrogels Based on Agarose/Phytigel and Peptides, *Macromol Biosci*, 2023, e2200451. [doi: 10.1002/mabi.202200451](https://doi.org/10.1002/mabi.202200451) (FI 5,859)
5. Alina Ghilan, **Alexandra Croitoriu**, Aurica P Chiriac, Lorena Elena Niță, Maria Bercea, Alina Gabriela Rusu, Injectable Networks Based on a Hybrid Synthetic/Natural Polymer Gel and Self-Assembling Peptides Functioning as Reinforcing Fillers, *Polymers*, 2023, 15(3):636. <https://doi.org/10.3390/polym15030636> (FI 5,0)
6. **Alexandra Croitoriu**, Aurica P. Chiriac, Alina Gabriela Rusu, Alina Ghilan, Diana Elena Ciolacu, Iuliana Stoica, Loredana Nita, Morphological Evaluation of Supramolecular Soft Materials Obtained through Co-Assembly Processes, *Gels* 9(11):886. [DOI: 10.3390/gels9110886](https://doi.org/10.3390/gels9110886) (FI 4,6)

• *Comunicări orale la manifestări științifice*

1. **Alexandra Croitoriu**, Loredana E. Nita, Alina G. Rusu, Andrei Cimponeriu, Aurica P. Chiriac, Supramolecular Gels Based on Amino Acids, *The 9th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2021*, 18-19 November, Iasi, Romania.
2. **Alexandra Croitoriu**, Alina G. Rusu, Alexandra Bargan, Maria Bercea, Liliana Mititelu-Tartau, Loredana E. Nita, Aurica P. Chiriac, Hybrid porous materials peptide-alginate/poly (itaconic anhydride-co-3,9-divinyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane) based with controllable properties, *3rd International Conference on Aerogels for Biomedical and Environmental Applications*, 5-7 July 2023, Maribor, Slovenia.

3. **Alexandra Croitoriu**, Loredana E. Niță, Onur Yilmaz, Development of interpenetrating network gels based on low molecular weight gelators and synthetic polymer for treating dye-contaminated water, *7th International Congress on Innovative Aspects for Leather Industry – IAFLI 2023*, 23-24 November, Izmir, Turcia.

- **Prezentare de postere**

1. **Alexandra Croitoriu**, Loredana E. Niță, Alexandru Serban, Alina G. Rusu, New gels preparation based on peptide-peptide co-assembly, *31st Conference of the European Society for Biomaterials, ESB 2021 together with 43RD ANNUAL CONGRESS OF IBERIAN SOCIETY OF BIOMECHANICS AND BIOMATERIALS (SIBB)*, 5-9 September, 2021, PORTO, PORTUGAL.
2. **Alexandra Croitoriu**, Loredana E. Nita, Alina G. Rusu, Alina Ghilan, Florica Doroftei, Maria Bercea, Aurica P. Chiriac, HYBRID HYDROGELS BASED ON PEPTIDE, INTERNATIONAL CONFERENCE ON RHEOLOGY- *Understanding the Viscoelastic Behavior of Materials – Progress and Challenges*, 26 May, 2022, Iasi, Romania.
3. **Alexandra Croitoriu**, Alexandru M. Serban, Aurica P. Chiriac, Alina G. Rusu, Alina Ghilan, Loredana E. Nita, Hydrogels based on amino acids and gelling polymers, *Polymers 2022 Conference: New trends in Polymers Science, Health of the Planet, Health of the People*, 25-27 May, 2022, Turin, Italy.

- **Brevete**

1. Loredana Elena Niță, Aurica Chiriac, Alina Gabriela Rusu, **Alexandra Croitoriu**, Alexandru Șerban, Iordana Neamțu, Constanța Munteanu, Procedeu de preparare a unui gel autoasamblat pe bază de peptide, RO 137294-A8.

Activitatea științifică conexă cu subiectul tezei de doctorat a constat în două articole și patru prezentări de poster:

- **Articole științifice**

1. Alina Gabriela Rusu, Aurica P Chiriac, Loredana Elena Nita, Vera Balan, Alexandru Mihail Serban, **Alexandra Croitoriu**, Synthesis and comparative studies of glucose oxidase immobilized on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles using different coupling agents, *Nanomaterials*, 2022, 12(14):2445. doi: [10.3390/nano12142445](https://doi.org/10.3390/nano12142445) (FI 5,719)
2. Ruxandra Mihailovici, **Alexandra Croitoriu**, Florin Nedeff, V. Nedeff, Lacramioara Ochiuz, Decebal Vasincu, Ovidiu Popa, Maricel Agop, Andreea Moraru, Danut Costin, Marcel Costuleanu, Liliana Verestiuc, Drug-Loaded Polymeric Particulated Systems for Ophthalmic Drugs Release, *Molecules*, 2022, 27(14):4512. doi: [10.3390/molecules27144512](https://doi.org/10.3390/molecules27144512) (FI 4,927)

3. Alina Gabriela Rusu, Loredana Elena Niță, Irina Roșca, **Alexandra Croitoriu**, Alina Ghilan, Liliana Mititelu-Tarțău, Aurica Valentin Grigoraș, Bianca-Elena-Beatrice Crețu, Aurica P. Chiriac, Alginate-Based Hydrogels Enriched with Lavender Essential Oil: Evaluation of Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and In Vivo Biocompatibility, *Pharmaceutics*, 2023, 15(11), 2608. doi: [0.3390/pharmaceutics15112608](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112608) (FI 5,4)

- **Prezentare de postere**

1. **Alexandra Croitoriu**, Loredana E. NITA, Alina G. RUSU, Alina GHILAN, Florica DOROFTEI, Maria BERCEA, Aurica P. CHIRIAC, Investigation of an interpenetrated polymer system containing cellulose nanofibrils and a copolymacrolactone structure, INTERNATIONAL CONFERENCE ON RHEOLOGY- *Understanding the Viscoelastic Behavior of Materials – Progress and Challenges* 26 May, 2022, Iasi, Romania.
2. **Alexandra Croitoriu**, Alexandru Serban, Alexandra Bargan, Maria Bercea, Florica Doroftei, Loredana Elena Nita, Alina Gabriela Rusu, Alina Ghilan, Aurica P. Chiriac, Structured Aerogels as Advanced Materials Based on Cellulose Nanofibrils and a Copolymacrolactone System, *2nd International Conference on Aerogels for Biomedical and Environmental Applications – AEROGELS 2022*, 29 June- 01 July, 2022, Athens, Greece.
3. Loredana E. Nita, Aurica P. Chiriac, **Alexandra Croitoriu**, Alina G. Rusu, Alina Ghilan, Alexandru M. Serban, Irina Rosca, Alexandra Bargan, New antibacterial aerogels based on synthetic polymers and CNF, *2nd International Conference on Aerogels for Biomedical and Environmental Applications – AEROGELS 2022*, 29 June- 01 July, 2022, Athens, Greece.
4. Alina Gabriela Rusu, Aurica P. Chiriac, Loredana Elena Nita, Alina Ghilan, **Alexandra Croitoriu**, Bianca Elena Beatrice Cretu, Alexandru Mihail Serban, Alexandra Bargan, Florica Doroftei, Design of agarose based aerogels with potential application as wound dressings, *3rd International Conference on Aerogels for Biomedical and Environmental Applications*, 5-7 July 2023, Maribor, Slovenia.

- **Premii la manifestări științifice**

1. Young Researcher, 9th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2021.

- **Contracte de cercetare**

Doctorandul mulțumește pentru suținerea oferită prin implicare ca membru în echipă în următoarele proiecte naționale de cercetare:

1. "New hybrid polymer/peptide hydrogels as innovative platforms designed for cell cultures applications" - PN-III-P2-2.1-PED-2019-2743.
2. "3D Advanced smart magnetic scaffolds for bone tissue engineering and regeneration" - PN-III-P2-2.1-PED-2019-4524.
3. "Hybrid bio-systems enriched with biotechnological extracted oils and applicability in skin tissue engineering" - PN-III-P2-2.1-PED-2021-2229.
4. 3D bio-inspired hybrid architectures for deep thickness skin repair and regeneration - PN-III-P2-2.1-PED-2021-3003.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] F. M. Menger, „Supramolecular chemistry and self-assembly”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, nr. 8, pp. 4818–4822, 2002, doi: 10.1073/pnas.062524299.
- [2] Jean-Marie Lehn, „Supramolecular chemistry - Scope and perspectives molecules”, *Supramolecules - Mol. Devices*, 1987.
- [3] E. Frieden, „Non-covalent interactions: Key to biological flexibility and specificity”, *J. Chem. Educ.*, vol. 52, nr. 12, p. 754, 1975, doi: 10.1021/ed052p754.
- [4] A. Lupu, L. M. Gradinaru, V. R. Gradinaru, și M. Bercea, „Diversity of Bioinspired Hydrogels: From Structure to Applications”, *Gels*, vol. 9, nr. 5, p. 376, 2023, doi: 10.3390/gels9050376.
- [5] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, și C. T. Seto, „Molecular Self-Assembly and Nanochemistry: a Chemical Strategy for the Synthesis of Nanostructures”, *Science*, vol. 254, nr. 5036, pp. 1312–1319, 1991, doi: 10.1126/science.1962191.
- [6] C. Colquhoun, „The effect of self-sorting and co-assembly on the mechanical properties of low molecular weight hydrogels”, *Nanoscale*, vol. 6, nr. 22, pp. 13719–13725, 2014, doi: 10.1039/C4NR04039B.
- [7] E. Mayans, „Effect of Solvent Choice on the Self-Assembly Properties of a Diphenylalanine Amphiphile Stabilized by an Ion Pair”, *ChemPhysChem*, vol. 18, nr. 14, pp. 1888–1896, 2017, doi: 10.1002/cphc.201700180.
- [8] S. Awhida, E. R. Draper, T. O. McDonald, D. J. Adams, „Probing gelation ability for a library of dipeptide gelators”, *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 455, pp. 24–31, 2015, doi: 10.1016/j.jcis.2015.05.032.
- [9] S. Panja, B. Dietrich, A. J. Smith, A. Seddon, și D. J. Adams, „Controlling Self-Sorting versus Co-assembly in Supramolecular Gels”, *ChemSystemsChem*, vol. 4, nr. 4, 2022, doi: 10.1002/syst.202200008.
- [10] Chakraborty, M. Aviv, F. Netti, D. Cohen-Gerassi, și L. Adler-Abramovich, „Molecular Co-Assembly of Two Building Blocks Harnesses Both their Attributes into a Functional Supramolecular Hydrogel”, *Macromol. Biosci.*, vol. 22, nr. 5, p. 2100439, 2022, doi: 10.1002/mabi.202100439.
- [11] K. Lei, „Polysaccharide-based recoverable double-network hydrogel with high strength and self-healing properties”, *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, nr. 4, pp. 794–802, 2020, doi: 10.1039/C9TB01679A.
- [12] B. P. Nowak și B. J. Ravoo, „Photoresponsive hybrid hydrogel with a dual network of agarose and a self-assembling peptide”, *Soft Matter*, vol. 16, nr. 31, pp. 7299–7304, 2020, doi: 10.1039/D0SM00835D.
- [13] C. J. Ferris, „Peptide modification of purified gellan gum”, *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, nr. 6, pp. 1106–1115, 2015, doi: 10.1039/C4TB01727G

- [14] X. Gong, „Preparation and characterization of a novel sodium alginate incorporated self-assembled Fmoc-FF composite hydrogel”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 478–486, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.08.059.
- [15] N. F. Albertson, „Synthesis of Peptides with Mixed Anhydrides”, în *Organic Reactions*, S. E. Denmark, Ed., 1 edWiley, 2011, pp. 157–255. doi: 10.1002/0471264180.or012.04.
- [16] Z. Yang, L. Wang, J. Wang, P. Gao, și B. Xu, „Phenyl groups in supramolecular nanofibers confer hydrogels with high elasticity and rapid recovery”, *J. Mater. Chem.*, vol. 20, nr. 11, p. 2128, 2010, doi: 10.1039/b922858f.
- [17] A. Diaconu, Aurica P. Chiriac, Loredana E. Nita, Nita Tudorachi, Iordana Neamtu, Cornelia Vasile, Mariana Pinteala, „Design and synthesis of a new polymer network containing pendant spiroacetal moieties”, *Des. Monomers Polym.*, vol. 18, nr. 8, pp. 780–788, 2015, doi: 10.1080/15685551.2015.1078111.
- [18] S. Höck, R. Marti, R. Riedl, și M. Simeunovic, „Thermal Cleavage of the Fmoc Protection Group: FH – HES”, *CHIMIA*, vol. 64, nr. 3, p. 200, mar. 2010, doi: 10.2533/chimia.2010.200.
- [19] P. Van De Wetering, J.-Y. Cherng, H. Talsma, D. J. A. Crommelin, și W. E. Hennink, „2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents”, *J. Controlled Release*, vol. 53, nr. 1–3, pp. 145–153, apr. 1998, doi: 10.1016/S0168-3659(97)00248-4.
- [20] O. Samsonova, C. Pfeiffer, M. Hellmund, O. M. Merkel, și T. Kissel, „Low Molecular Weight pDMAEMA-block-pHEMA Block-Copolymers Synthesized via RAFT-Polymerization: Potential Non-Viral Gene Delivery Agents?”, *Polymers*, vol. 3, nr. 2, pp. 693–718, mar. 2011, doi: 10.3390/polym3020693.