

ACADEMIA ROMÂNĂ
„Școala de Studii Avansate a Academiei Române“ (SCOSAAR)

Institutul de Chimie Fizică "Ilie Murgulescu"

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT:
SISTEME CE CONȚIN POLIZAHARIDE STUDIATE PRIN
SPECTROSCOPIA DE REZONANȚĂ ELECTRONICĂ DE SPIN

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT,
Dr. Elena Gabriela Ioniță

DOCTORAND,
Elena Irina Popescu

București
2021

CUVINTE CHEIE

Spectroscopie de rezonanță electronică de spin

Polizaharide

Interacții gazdă-oaspete

Geluri

Nanoparticule

Cuprins

INTRODUCERE	6
PARTEA I. NOȚIUNI DIN LITERATURĂ	9
CAPITOLUL 1. POLIZAHARIDE	10
1.1. Proprietăți generale	10
1.2. Hidrogeluri care au în componență polizaharide	16
1.3. Metode fizico-chimice utilizate în caracterizarea gelurilor polizaharidelor	19
1.3.1. Reologia	19
1.3.2. Microscopia electronică	21
1.3.3. Metode spectroscopice	22
CAPITOLUL 2. SPECTROSCOPIA DE REZONANȚĂ ELECTRONICĂ DE SPIN (RES)	25
2.1. Caracteristici spectrale ale nitroxizilor	29
2.1.1. Dinamica sondelor de spin. Timpul de corelație rotațional	30
2.2. Aplicații ale spectroscopiei RES în studiul gelurilor	34
PARTEA a II-a CONTRIBUȚIA ORIGINALĂ	44
CAPITOLUL 3. INTERACȚII SUPRAMOLECULARE ÎN GELURI DE TIP ALGINAT MODIFICAT CU UNITĂȚI GAZDĂ ȘI UNITĂȚI OASPETE	45
3.1. Funcționalizarea alginatului cu unități gazdă (ciclodextrină) sau oaspete (adamantan)	45
3.2. Evidențierea interacțiilor supramoleculare de tip gazdă-oaspete în gelurile de alginat	49
3.2.1. Morfologia suprafețelor gelurilor de alginat	49
3.2.2. Proprietățile reologice ale gelurilor de alginat	50
3.2.3. Interacții gazdă-oaspete în gelurile de alginat, puse în evidență prin spectroscopie IR	56
3.2.4. Modificări nanoscopice în gelurile de alginat, evidențiate prin spectroscopie RES	59
3.2.5. Difuzia sondei moleculare duale DA1,7T în gelurile de alginat	64
3.2.6. Spectrele RES ale gelurilor de alginat marcate cu spin	66
CAPITOLUL 4. FORMAREA NANOPARTICULELOR DE AUR ÎN SOLUȚII ȘI GELURI ALE POLIZAHARIDELOR	79
CAPITOLUL 5. EVIDENȚIEREA FORMĂRII REȚELELOR INTERPENETRATE ÎN SISTEME DE POLIZAHARIDE PRIN SPECTROSCOPIA RES	89
CAPITOLUL 6. STUDIUL PROPRIETĂȚILOR DE DIFUZIE ALE SONDELOR DE SPIN ÎN GELURI CE CONȚIN POLIZAHARIDE	95
6.1. Difuzia probelor în rețelele de geluri polimerice PEG/CD sau PPG/CD	99
6.2. Analiza capacității de încapsulare a gelurilor ce conțin polizaharide prin metoda spectroscopiei RES	107
CAPITOLUL 7. SISTEME MODEL COLAGEN/ACID HIALURONIC PENTRU EVIDENȚIEREA ROLULUI RIBOFLAVINEI ÎN TRATAMENTUL KERATOCONUSULUI PRIN METODA UVA-CROSSLINKING	110
7.1. Determinări STEM	111
7.2. Determinări reologice	113
7.3. Determinări micro-DSC	126
7.4. Evidențierea speciilor radicalice formate în diferite sisteme care conțin riboflavina	127
CONCLUZII	134
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘTIINȚIFICE	139
LISTA MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE	140
REFERINȚE	141

Notă: Numerotarea paginilor din cuprins este cea din teza de doctorat

Introducere

Lucrarea este structurată în două părți. Prima parte conține date generale din literatură referitoare la proprietățile polizaharidelor și metodele fizico-chimice utilizate, iar a doua parte cuprinde date și rezultate originale. Polizaharidele descrise în prima parte a lucrării sunt cele utilizate pe parcursul stagiului doctoral, și anume acidul alginic, acidul hialuronic, chitosanul și ciclodextrinele (ca oligozaharide). Au fost menționate proprietățile generale și domeniile de utilizare ale acestor polizaharide punând accent pe capacitatea lor de a forma hidrogeluri în anumite condiții. Partea teoretică prezintă în continuare metodele fizico-chimice de caracterizare a proprietăților hidrogelurilor (reologia, microscopia electronică, spectroscopia IR, spectroscopia de fluorescență). Prima parte a lucrării se încheie cu un capitol dedicat spectroscopiei de rezonanță electronică de spin (RES), metoda principală de cercetare folosită în studiul hidrogelurilor polizaharidelor pe parcursul stagiului doctoral. Acest capitol pune accent pe caracteristicile spectrale ale nitroxizilor utilizați ca sonde de spin sau ca markeri de spin, care reflectă proprietățile dinamice și de interacție cu mediul din imediata vecinătate. Sunt prezentate aplicații din literatură referitoare la utilizarea spectroscopiei RES în studiul gelurilor/hidrogelurilor.

În partea a doua a tezei care constituie contribuția originală, ne-am propus utilizarea spectroscopiei RES ca metodă spectroscopică complementară celor clasice (reologie, spectroscopie IR, microscopie SEM) pentru caracterizarea fizico-chimică a gelurilor. În cele mai multe cazuri s-a realizat marcarea cu spin a lanțurilor de polizaharide folosind radicalii amino-TEMPO sau carboxi-TEMPO pentru a evidenția formarea gelurilor.

Direcțiile de cercetare:

- evidențierea neomogenităților gelurilor la nivel nanoscopic folosind sonde moleculare duale de dimensiuni mici;
- determinarea capacității de încapsulare a unor molecule marcate cu spin cu mase moleculare acoperind două ordine de mărime (10^{-2} – 10^{-4});
- rolul pe care îl au interacțiile gazdă–oaspete evidențiat indirect, prin analiza spectrelor RES și corelarea rezultatelor cu cele furnizate de alte metode fizico-chimice, rezultatele fiind utile în proiectarea sistemelor biomoleculare complexe bazate pe alginat;
- au fost analizate procesele de reducere a acidului cloroauric (HAuCl_4) în soluții de polizaharide având ca rezultat formarea nanoparticulelor de aur (AuNP);
- studiul RES privind formarea rețelelor interpenetrante (IPN) și semi-IPN ale alginatului și chitosanului prin introducerea în sisteme a celor două polizaharide marcate cu spin;

- disponibilitatea hidrogelurilor de a încapsula diferite molecule, cu utilizarea metodei RES pentru estimarea calitativă a dimensiunilor ochiurilor de rețea prin folosirea sondelor de spin cu dimensiuni cunoscute;
- analizarea rolului riboflavinei de a genera specii radicalice reactive și a acidului hialuronic de inhibitor de radicali și de antioxidant în procesul de fibrilogenază a colagenului în tratamentul keratoconusului prin metoda CLX (corneal collagen crosslinking).

Contribuții originale

În capitolul trei al tezei s-a studiat modul în care interacțiunile supramoleculare de tip gazdă-oaspete în geluri de alginat funcționalizat cu unități gazdă (ciclodextrină) și unități oaspete (adamantil) schimbă morfologia, comportamentul reologic și capacitatea de încapsulare a hidrogelurilor.

Această abordare pornește de la câteva studii anterioare prezentate în literatură. O parte dintre acestea, referitoare la sinteza gelurilor polimerice rezultate prin cuplarea lanțurilor polietilen glicolice cu unități de ciclodextrină, au fost prezentate pe larg în partea introductivă a tezei [2,3]. Un alt studiu se referă la marcarea cu spin a alginatului de sodiu cu grupări paramagnetice TEMPO cu scopul de a evidenția formarea gelului și interacțiunile de schimb ionic prin modificările dinamice ale grupării paramagnetice [6].

Grupările carboxil prezente în structura alginatului permit introducerea de noi grupări funcționale, oferind posibilitatea de a modula proprietățile gelurilor și, astfel, de a utiliza noii polimeri în aplicații specifice [4,5]. De exemplu, alginatul marcat cu spin a putut fi utilizat pentru a evidenția influența ionilor complexanți asupra dinamicii lanțului și pentru a evidenția procesele de schimb ionic între alginat și EDTA [6].

Interacțiunile gazdă-oaspete determină modificări ale proprietăților gelurilor ce pot fi urmărite prin intermediul grupărilor paramagnetice de tip TEMPO, folosind fie metoda sondelor de spin, fie metoda marcării cu spin. Procedura marcării cu spin a alginatului (Alg), descrisă în literatură [6], a fost adaptată (Figura 1) pentru a introduce, pe lângă gruparea paramagnetică TEMPO (T), și unități structurale de tip gazdă (β -CD funcționalizată cu lanțuri alchil de diferite lungimi) sau oaspete (adamantan, Ad).

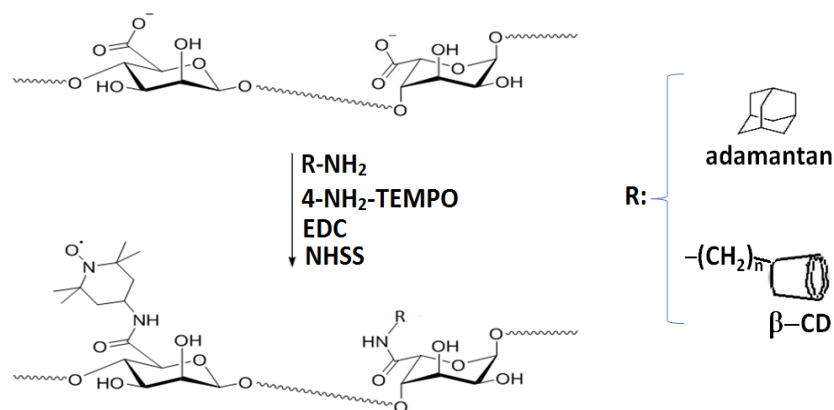


Figura 1. Schema procesului de marcare a alginatului cu spin și cu fragmente de ciclodextrină sau adamantan [6].

Derivații de alginat funcționalizați au fost notați Alg-Ad, Alg-1,2- β -CD, Alg-1,3- β -CD și Alg-1,6- β -CD, iar derivații marcați cu spin au fost notați Alg-T, Alg-Ad-T, Alg-1,2- β -CD-T, Alg-1,3- β -CD-T și Alg-1,6- β -CD-T. Prin analiza spectrelor RES ale acestor sisteme s-a realizat evidențierea indirectă a diferitelor tipuri de interacții necovalente și corelarea rezultatelor RES cu cele furnizate de alte metode fizico-chimice.

Imaginile SEM oferă informații privind modificările morfologice determinate atât de funcționalizarea alginatului cât și de prezența unor interacții adiționale celor care determină forma gelului (complexarea ionilor de calciu de către grupările carboxil), și anume interacțiile de tip gazdă-oaspete.

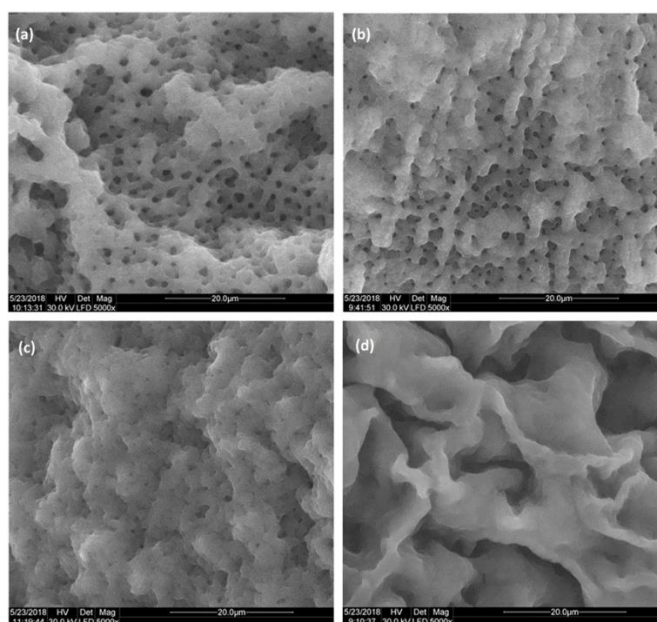


Figura 2. Imagini de morfologie a suprafeței xerogelurilor Alg (a), Alg-Ad (b), Alg-1,3- β -CD (c) și Alg-1,3- β -CD/Alg-Ad (d).

Figura 2 prezintă imaginile SEM ale suprafețelor xerogelurilor de alginat investigate. În cazul alginatului nefuncționalizat (Figura 2a) și a alginatului funcționalizat cu adamantan (Figura 2b), porii rețelei sunt denși și caracterizați printr-o distribuție uniformă. Funcționalizarea cu ciclodextrină determină dimensiuni mai mari atât ale fibrilelor de gel, cât și ale porilor rețelei (Figura 2c). Cu toate acestea, imaginile SEM ale alginatului, alginatului funcționalizat cu adamantan și alginatului funcționalizat cu ciclodextrină se aseamănă într-o mare măsură.

Interesant este faptul că imaginea SEM a gelului de alginat obținut prin adăugarea de ioni Ca^{2+} la un amestec de alginat funcționalizat cu adamantan și alginat funcționalizat cu ciclodextrină prezintă în mod clar o morfologie diferită, caracterizată prin pori considerabil mai mari, canale deformate și o rețea „încrêțită” (Figura 2d). Aceste diferențe de morfologie a suprafeței indică faptul că interacțiunile gazdă–oaspete între lanțurile de alginat afectează proprietățile globale ale gelului. Pentru a confirma acest lucru, au fost efectuate determinări de reologie și spectroscopie IR ce oferă, de asemenea, informații asupra proprietăților globale ale gelurilor.

Proprietățile reologice ale gelurilor de alginat pot fi descrise în termenii a doi parametri, și anume modulul de stocare, G' , și modulul de pierdere, G'' . Factori precum caracteristicile alginatului (sursa, proporția și secvența blocurilor M și G, vâscozitatea), tipul, concentrația cationului de complexare și prezența în sistem a altor specii precum cationii monovalenți sau co-solvenții, modifică proprietățile reologice ale gelurilor de alginat. În studiul nostru, măsurătorile reologice au fost efectuate imediat după prepararea gelurilor.

În Figura 3 se prezintă evoluția parametrilor reologici ai gelurilor de alginat, alginat funcționalizat și gelurilor preparate din amestecarea lor, determinată de creșterea tensiunii de forfecare, la o frecvență constantă de 1 Hz. În cazul tuturor sistemelor, se observă că modulul de stocare G' este mai mare decât modulul de pierdere G'' și că, de la o anumită valoare a stresului de forfecare (σ^*), caracteristică fiecărui sistem, cele două module reologice devin egale. Acest fenomen marchează apariția deformării plastice. După cum se poate observa din Figura 3a, valoarea σ^* crește semnificativ, fie prin funcționalizarea cu fragmente adamantil, fie cu ciclodextrină. De asemenea, trebuie remarcată creșterea rapidă a valorii σ^* cu lungimea lanțului alchil. În cazul gelurilor rezultate din complexarea alginatului Alg-1,6- β -CD cu ionii de calciu, se înregistrează cea mai mare valoare în această serie.

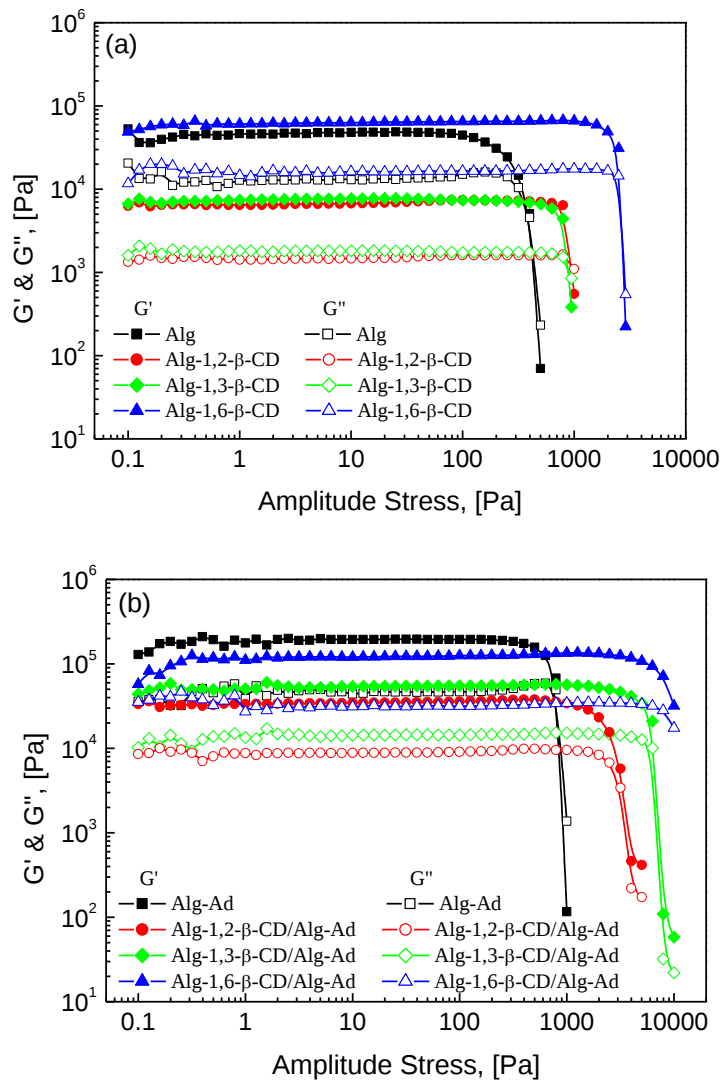


Figura 3. Dependența modulelor G' și G'' de stresul de forfecare (σ^*) pentru (a) gelul de alginat și gelurile de alginat funcționalizat cu ciclodextrină și (b) gelul de alginat funcționalizat cu adamantan și gelurile de alginat ce prezintă interacții gazdă–oaspete.

Aceste date arată că atât funcționalizarea lanțului alginat cu unități β -CD, cât și creșterea lungimii lanțului aminoalchil ce acționează ca linker între cele două, determină o creștere a elasticității rețelei de hidrogel. Astfel, prin funcționalizare se poate modula rezistența gelului la deformare.

Interacțiile gazdă–oaspete determină adesea modificări ale parametrilor spectrali RES ai grupărilor paramagnetice, și anume constanta de scindare hiperfină (a_N) și timpul de corelație rotațional (τ). Astfel, urmărind modificările în spectrele RES ale grupărilor paramagnetice atașate lanțurilor alginat, putem obține informații suplimentare, la nivel nanoscopic, asupra acestor interacții.

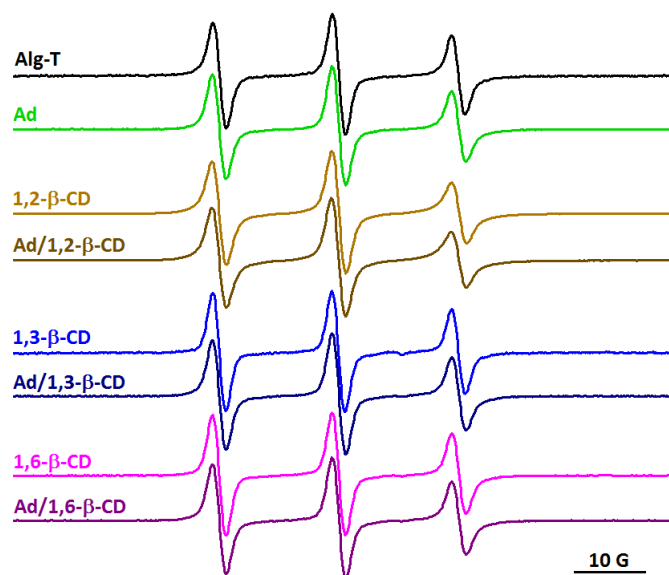


Figura 4. Spectrele RES ale alginatului marcat cu spin (Alg-T) funcționalizat cu unități gazdă (1,n-β-CD) sau oaspete (Ad) și ale amestecurilor acestora (Ad/1,n-β-CD), înregistrate în soluție, la temperatura camerei.

În Figura 4 sunt prezentate spectrele RES ale probelor de alginat marcat cu gruparea paramagnetică TEMPO (T) și funcționalizat cu grupări adamantil (Ad) sau cu unități ciclodextrină (1,n-β-CD) și ale amestecurilor corespunzătoare (Ad/1,n-β-CD), înregistrate în soluție, la temperatura camerei.

Atașarea covalentă a grupării paramagnetice la lanțul de alginat conduce la încetinirea mișcării acesteia, dar spectrul indică totuși menținerea într-un regim dinamic cvasi-izotrop (liniile spectrale sunt mai largi, cea de la câmp înalt având o înălțime mai mică) [1]. Observăm că, în soluție, modificările parametrilor RES sunt minime în cazul amestecurilor de alginați care conțin grupări de adamantil și unități de ciclodextrină. Această observație, corelată cu modificările mici ale parametrilor RES, ne conduc către concluzia că interacțiunile de tip gazdă–oaspete între grupările TEMPO și cavitățile de ciclodextrină atașate lanțurilor alginat sunt mai puțin favorizate decât interacția radicalului TEMPO liber cu ciclodextrina în soluție (Figura 5).

Pentru a confirma această ipoteză am comparat spectrele RES ale sondei de spin 4-amino-TEMPO liberă în Alg-1,2-β-CD (soluție sau gel) cu spectrele alginatului corespunzător marcat cu spin (Alg-1,2-β-CD-T).

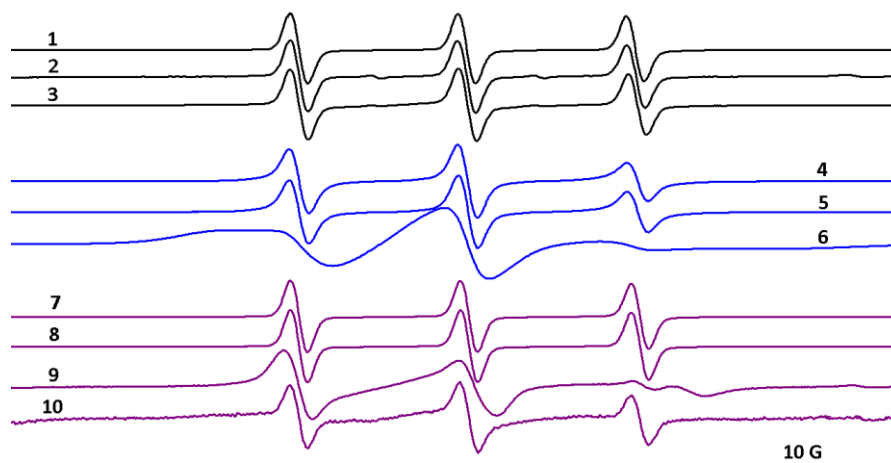


Figura 5. Spectrele RES ale 1) 4-amino-TEMPO în apă, 2) 4-amino-TEMPO în soluție de Alg-1,2- β -CD, 3) 4-amino-TEMPO în gel Alg-1,2- β -CD, 4) soluție de Alg-1,2- β -CD-T, 5) soluție de Alg-1,2- β -CD-T, în prezență de 1-adamantanol, 6) gel Alg-1,2- β -CD-T, 7) 4-carboxi-TEMPO în soluție de Alg-1,2- β -CD, 8) 4-carboxi-TEMPO în soluție de Alg-1,2- β -CD, în prezență de 1-adamantanol, 9) 4-carboxi-TEMPO în gel Alg-1,2- β -CD, 10) 4-carboxi-TEMPO în gel Alg-1,2- β -CD, în prezență de 1-adamantanol.

În cazul Alg-1,2- β -CD-T, interacțiunile gazdă-oaspete între grupările TEMPO și unitățile de ciclodextrină atașate covalent lanțului de polizaharid sunt, în teorie, posibile. Adăugarea de 1-adamantanol la soluția de Alg-1,2- β -CD-T nu a condus la modificări în spectrul RES, ceea ce ne indică faptul că atașarea grupărilor TEMPO și unităților ciclodextrină lanțului de alginat nu favorizează interacția gazdă-oaspete în soluție. În prezența ionilor Ca^{2+} se observă mișcarea restricționată a grupării TEMPO atașată lanțului alginat, fără modificări ale valorii a_N .

O altă serie de experimente a avut ca scop analiza comportării sondei de spin 4-carboxi-TEMPO în soluție și în gelul Alg-1,2- β -CD. Această sondă de spin poate fi implicată atât în interacții cu ciclodextrina, cât și în complexarea ionilor de Ca^{2+} , intrând astfel în competiție cu grupările carboxil ale lanțului alginat. La fel ca în cazul sondei 4-amino-TEMPO, sonda 4-carboxi-TEMPO nu formează complecși cu cavitățile de ciclodextrină atașate lanțului alginat în soluție. Spectrul RES al 4-carboxi-TEMPO în gelul Alg-1,2- β -CD este caracterizat prin prezența a două componente cu dinamică diferită. Componenta mai lentă poate fi atribuită complexării sondei de către unitățile de ciclodextrină atașate lanțului polizaharidic.

În urma analizei datelor prezentate în Figura 6, putem trage concluzia că structura sondei de spin influențează semnificativ interacțiile ce se stabilesc cu matricea gelului. În mod

surprinzător, interacția dintre 4-carboxi-TEMPO și lanțurile de alginat funcționalizate cu unități ciclodextrină are loc în gel, dar nu și în soluție.

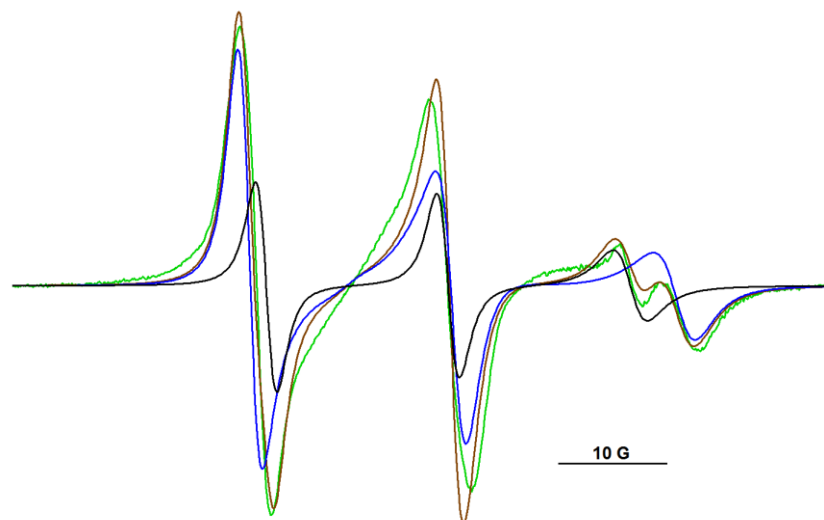


Figura 6. Spectrul RES al 4-carboxi-TEMPO în gelul Alg-1,2- β -CD: verde – spectrul experimental, maro – spectrul simulat, albastru – spectrul componentei cu dinamică lentă, negru – spectrul componentei cu dinamică rapidă.

Spectrele RES prezentate în Figura 7 și datele cuprinse în Tabelul 1, înregistrate pentru gelurile obținute din amestecuri de alginat marcat cu spin și funcționalizat cu ciclodextrină sau cu adamantan (Alg-1,n- β -CD-T/Alg-Ad-T), prezintă două componente. Componenta caracterizată printr-o dinamică lentă este atribuită grupărilor TEMPO localizate în regiunea G a lanțurilor alginat, acolo unde are loc preponderent complexarea ionilor Ca^{2+} , în timp ce componenta cu dinamică rapidă este atribuită grupărilor TEMPO localizate în regiunea M a lanțului alginat, precum și grupărilor TEMPO situate la distanță de nodurile rețelei de gel. Schimbarea majoră de dinamică a grupărilor paramagnetice atașate lanțului de alginat este determinată de procesul de complexare a grupărilor carboxil de către ionii Ca^{2+} și nu de interacțiunile gazdă–oaspete.

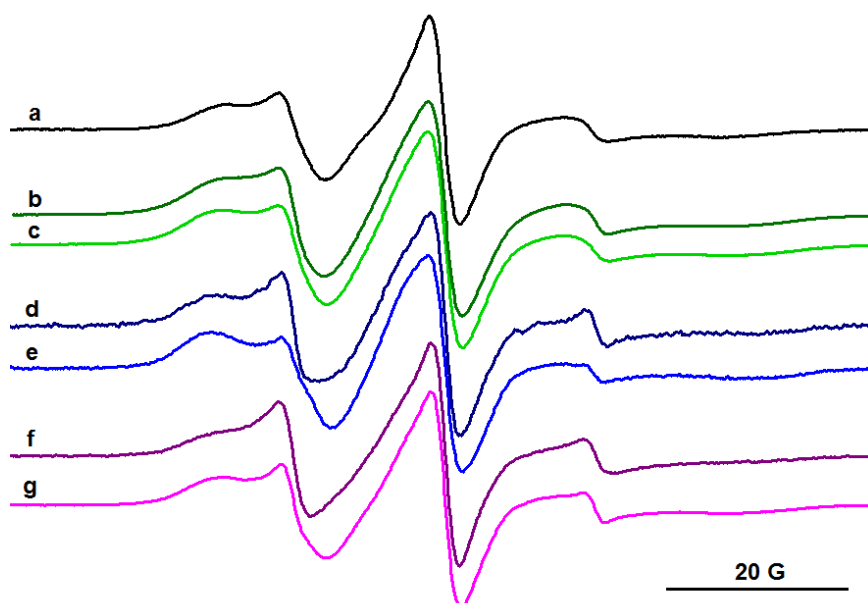


Figura 7. Spectrele RES ale gelurilor alginat marcate cu spin: a) Alg-Ad-T, b) Alg-1,2- β -CD-T, c) Alg-1,2- β -CD-T/Alg-Ad-T, d) Alg-1,3- β -CD-T, e) Alg-1,3- β -CD-T/Alg-Ad-T, f) Alg-1,6- β -CD-T, g) Alg-1,6- β -CD-T/Alg-Ad-T, înregistrate la temperatura camerei.

Tabel 1. Raportul dintre ponderea celor două componente din spectrul RES și distanța dintre liniile extreme ale spectrului ($2A_{zz}$, în G) pentru gelurile de alginat marcate cu spin

Sistem	Alginat individual		Amestec Alg-Ad-T și Alg-1,n- β -D-T	
	Raport componentă lentă/componentă mobilă	$2A_{zz}$	Raport componentă lentă/componentă mobilă	$2A_{zz}$
Alg-Ad-T	-	57.4	-	-
Alg-1,2- β -CD-T	4.74	57.8	4.58	60.2
Alg-1,3- β -CD-T	3.66	62.1	4.64	63.5
Alg-1,6- β -CD-T	2.15	60.4	3.78	61.0

În concluzie, complexarea de către ioni Ca^{2+} a blocurilor guluronice din alginatul funcționalizat este determinantă pentru formarea gelului. Interacțiunile gazdă–oaspete au totuși o contribuție subtilă în ceea ce privește proprietățile gelurilor, determinând modificarea parametrilor reologici și morfologia acestora. Rezultatele RES demonstrează efectul local pe care îl au interacțiunile gazdă–oaspete asupra dinamicii grupărilor TEMPO atașate covalent lanțurilor de alginat.

Studiile efectuate în cadrul tezei în capitolul patru au cuprins și procesele de reducere a acidului cloroauric în soluții de polizaharide (alginat de sodiu, dextran și chitosan), având ca rezultat formarea nanoparticulelor de aur (AuNP) și stabilizarea nanoparticulelor în gel (Figura 8). În aceste procese sunt implicate grupările hidroxil ale polizaharidelor care au capacitatea de a reduce Au^{3+} și de a proteja nanoparticulele în soluție și în gel [7-12, 13].

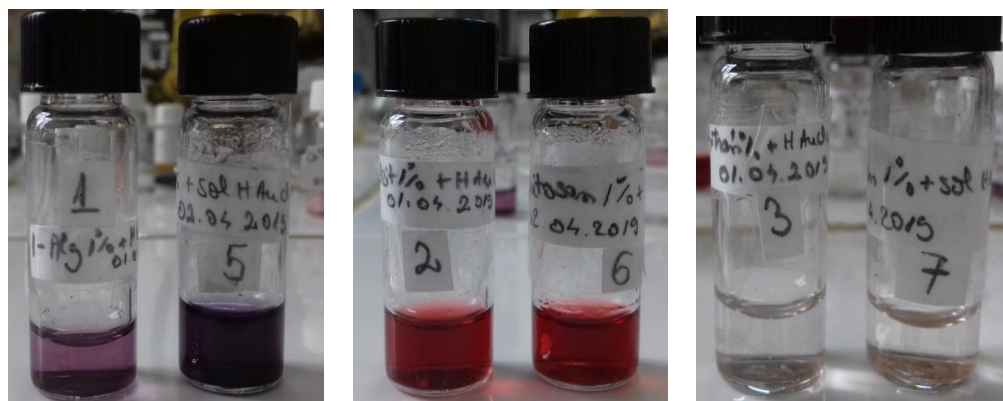


Figura 8. Soluții de 1) AuNP în alginat la temperatura camerei, 2) AuNP în chitosan la temperatura camerei, 3) AuNP în dextran la temperatura camerei 5) AuNP în alginat la 90°C, 6) AuNP în chitosan la 90°C, 7) AuNP în dextran la 90°C.

Obținerea gelurilor de alginat decorate cu nanoparticule de aur s-a realizat fie prin adăugare de ioni Ca^{2+} soluției de alginat conținând nanoparticule de aur, rezultând gelul sub formă de perle, fie prin difuzia ionilor Au^{3+} în gelul de alginat, urmată de reducere *in situ*. Prima modalitate de preparare determină o distribuție mai uniformă a nanoparticulelor de aur în gel. Procesele de reducere și formarea nanoparticulelor de aur au loc mult mai lent în gel decât în soluție (Figura 9). S-a constatat că alginatul și chitosanul favorizează formarea de nanoparticule cu dimensiuni mai mici de 100 nm, în timp ce dextranul determină formarea nanoparticulelor cu dimensiuni mai mari.

Scopul acestui studiu a fost de a obține, din analiza spectrelor RES, informații dinamice ce pot fi asociate cu formarea nanoparticulelor metalice în soluție și în gel de alginat. Pentru aceasta, spectrele RES al alginatului marcat cu spin au fost înregistrate în soluție pe parcursul formării nanoparticulelor de aur. Nu a fost observată o modificare a dinamicii grupării paramagnetice atașate lanțului alginat ca urmare a formării nanoparticulelor de aur (Figura 10). Gruparea paramagnetică are aceeași dinamică în soluție și nu interacționează cu nanoparticulele de aur.

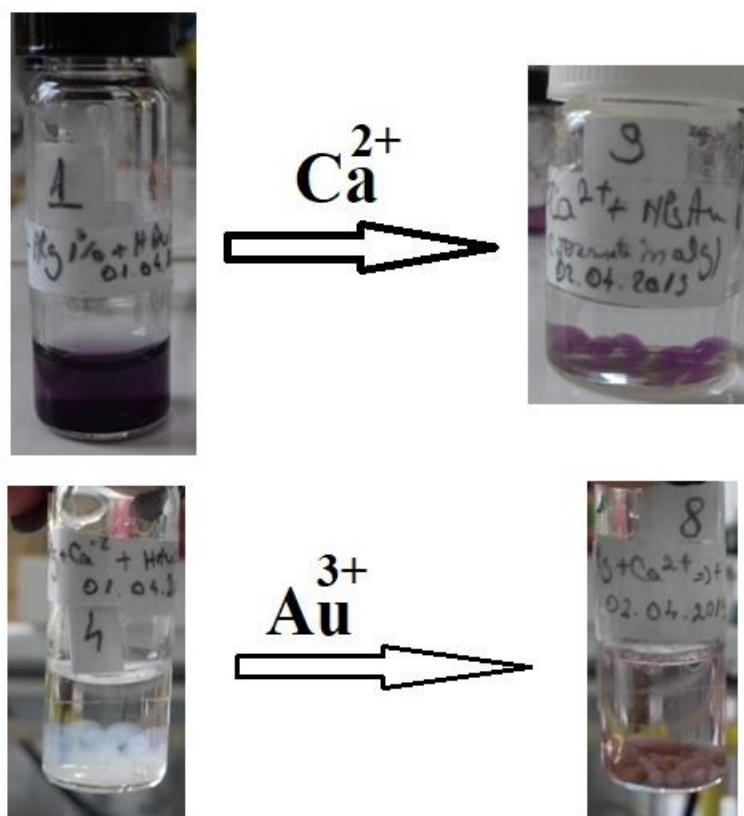


Figura 9. Formarea gelurilor de alginat prin A) adăugarea de ioni Ca^{2+} la soluția de AuNP în alginat și B) difuzia ionilor Au^{3+} în gelul de alginat urmată de reducerea în gel.

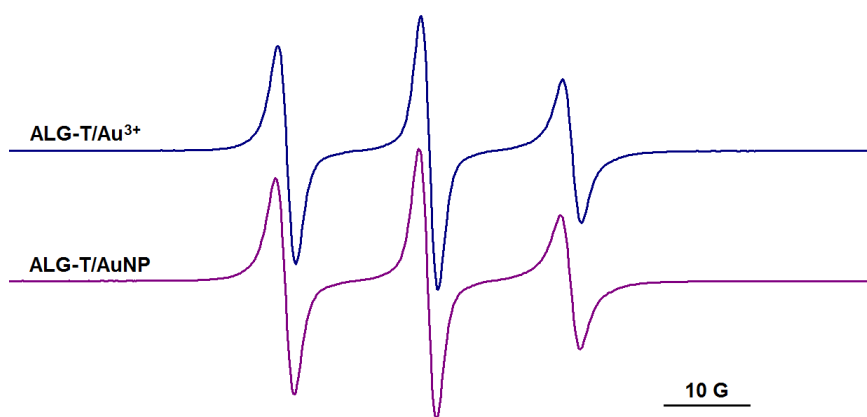


Figura 10. Spectrul RES al alginatului marcat cu spin în soluție, în prezența ionilor Au^{3+} , și spectrul RES în soluția de alginat marcat în care s-au format nanoparticulele de aur.

Spectrele RES ale gelurilor Alg-T și Alg-1,2- β -CD-T în prezența nanoparticulelor de aur prezintă o dinamică puternic restricționată, având două componente spectrale. Dinamica grupărilor paramagnetice atașate lanțurilor nu este influențată semnificativ de formarea nanoparticulelor (Figura 11).

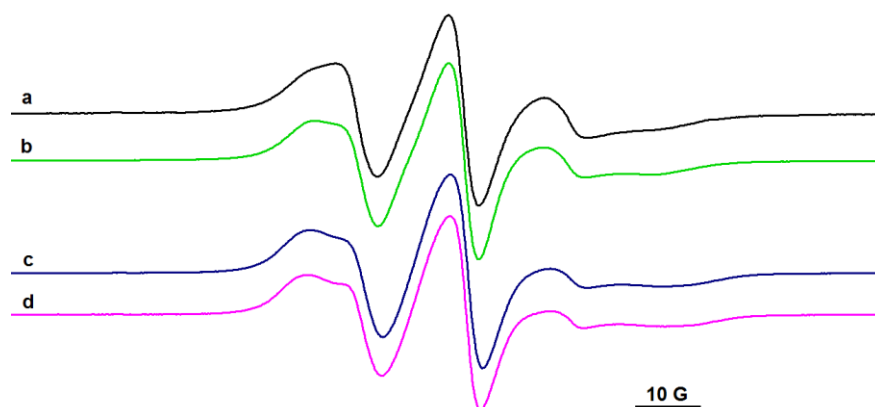


Figura 11. Spectrele RES ale gelurilor de alginat marcate cu spin în absența sau în prezența AuNPs: a) Alg-T, b) Alg-T/AuNP, c) Alg-1,2- β -CD-T, d) Alg-1,2- β -CD-T/AuNP.

Capitolul cinci este dedicat evidențierii formării rețelelor interpenetrante în sisteme de polizaharide. Termenul de rețea polimerică interpenetrată (IPN) se referă la materiale polimerice care rezultă prin întrepătrunderea a două sau mai multe rețele polimerice, fără a fi conectate covalent, dar care nu pot fi separate decât prin ruperea legăturilor chimice [14,15,17]. Atunci când doar rețeaua unuia din polimeri este reticulată, rezultă o rețea semi-IPN [16].

Sistemul de polizaharide considerat în studiul RES pentru evidențierea formării gelurilor de tip semi-IPN și IPN a fost reprezentat de chitosan și alginat folosind ca agenți de reticulare glutaraldehida, respectiv clorura de calciu. În cazul amestecului de chitosan/alginat, adăugarea agenților de reticulare și de gelifiere s-a realizat succesiv și alternant. Utilizarea chitosanului marcat cu spin și a alginatului marcat cu spin a permis evidențierea formării rețelelor de tip semi-IPN și IPN prin analiza modificărilor observate în spectrele RES. În Figura 12 sunt prezentate imaginile sistemelor analizate.

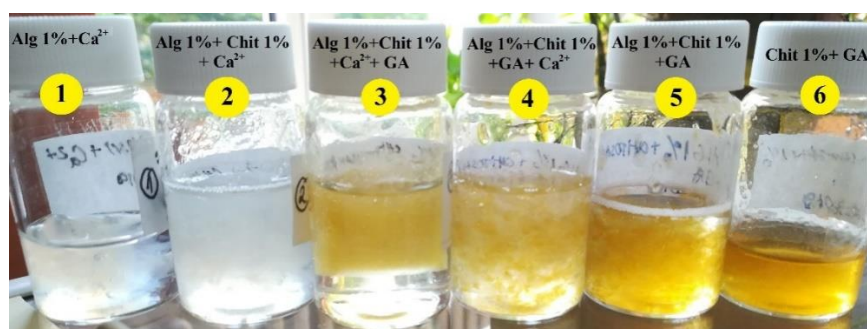


Figura 12. Probele de gel 1) alginat + Ca^{2+} , 2) alginat + chitosan + Ca^{2+} , 3) alginat + chitosan + Ca^{2+} + glutaraldehydă, 4) alginat + chitosan + glutaraldehydă + Ca^{2+} , 5) alginat + chitosan + glutaraldehydă, 6) chitosan + glutaraldehydă.

În Figura 13 sunt prezentate spectrele RES ale chitosanului marcat prezent în sistemele preparate. Pentru aceste sisteme se observă o dinamică rapidă asemănătoare a grupărilor paramagnetice atașate covalent lanțului de chitosan (spectrele a, b, c).

Prin adăugarea de Ca^{2+} s-a realizat complexarea alginatului, sistemul transformându-se în gel (sistemul 2). Față de soluția de alginat/chitosan, în cazul gelului separat se observă o mișcare mai lentă a chitosanului marcat. Aceasta indică faptul că lanțul de chitosan marcat este încorporat în rețeaua gelului de alginat. După cum se observă, gelul are semnal RES (spectrul roz), ceea ce indică faptul că alginatul și chitosanul formează o rețea semi-IPN. Adăugarea de glutaraldehidă la soluția de chitosan și alginat conduce la o mișcare mai restricționată.

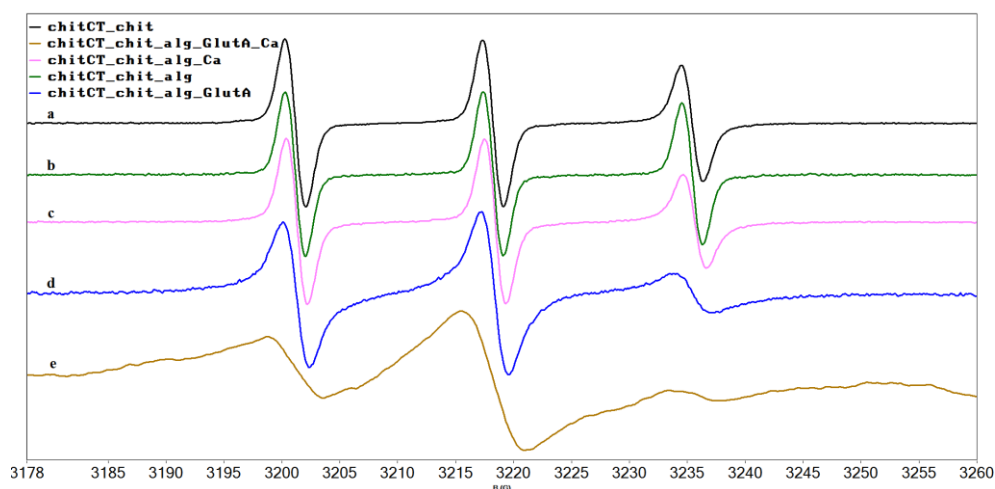


Figura 13. Spectrele RES ale chitosanului marcat în soluție de alginat, în prezența sau absența agenților de reticulare (ioni de Ca^{2+} și glutaraldehidă).

Adăugarea de glutaraldehidă la soluția de chitosan marcat și alginat nemarcat conduce la formarea unui gel. Chitosanul marcat are o mișcare mai încetinită (spectrul albastru) relevată de lărgirea liniilor spectrale corespunzătoare unei rețele semi-IPN. Adăosul de Ca^{2+} la această soluție conduce la o imobilizare și mai mare, aceasta fiind dovada realizării unei rețele IPN (spectrul maro). Spectrele RES ale soluțiilor separate de geluri nu prezintă semnal, ceea ce indică faptul că sonda de spin este încapsulată în rețelele gelurilor.

În cazul sistemelor care conțin alginat marcat cu spin s-au observat comportări similare. Spectrele RES sunt prezentate în Figura 14. În soluții de alginat și chitosan, alginatul marcat cu spin are o mișcare cvasi-izotropă (spectrele a și b din Figura 14). Prin adăugarea Ca^{2+} la soluția de alginat și chitosan se formează un gel semi-IPN, iar semnalul RES corespunde celui pentru un gel de alginat marcat cu spin (Figura 14, spectrul c). În cazul sistemului alginat / chitosan / Ca^{2+} / glutaraldehidă s-a observat o imobilizare mai avansată a grupării paramagnetice (spectrul d) corespunzătoare unei rețele IPN.

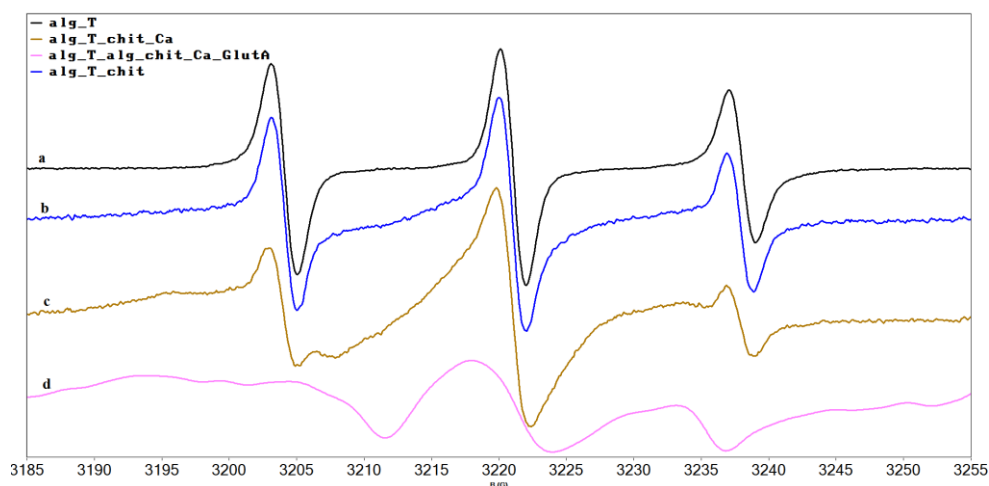


Figura 14. Spectrele RES ale chitosanului marcat în soluție de alginat, în prezența sau absența agenților de reticulare (ioni de Ca^{2+} și glutaraldehidă).

Concluzia acestui studiu este că spectroscopia RES poate pune în evidență diferențele de dinamică ale grupărilor paramagnetice atașate covalent lanțurilor de polizaharide între rețelele IPN sau semi-IPN comparativ cu rețelele simple ale gelurilor formate de polizaharide pure. Studiul urmează să fie completat de investigațiile morfologice ale sistemelor discutate.

În capitolul al șaselea sunt prezentate rezultatele privind utilizarea spectroscopiei RES ca o metodă nouă de estimare a capacității de încapsulare a diferitelor specii moleculare în rețelele geluri, de determinare a dimensiunii ochiurilor rețelelor de gel și ca metodă de a evidenția neomogenitățile din gel [16,20,21]. Astfel, s-a studiat difuzia sondelor indicate în Figura 15 și a albuminei serice bovine (BSA) marcate cu spin în gelurile menționate mai sus. Masele moleculare ale sondelor utilizate în evaluarea capacității de încapsulare a gelurilor sunt prezentate în Tabelul 2. Albumina serică bovină a fost marcată urmând procedura descrisă în studiul privind complexarea/decomplexarea albuminei serice bovine cu dodecilsulfat de sodiu [22] în care s-a arătat că gelul reprezentat în Figura 16, care conține în structură ciclodextrină, poate purifica proteina.

Sondele de spin TEMPO, 4-amino-TEMPO, 4-hidroxi-TEMPO și 4-carboxi-TEMPO au provenit de la firma Aldrich, în timp ce Pluronicii marcați cu spin (P123, L62, F127) au fost obținuți prin marcarea cu fragmente paramagnetice de tip nitroxid după metoda indicată în literatură [19].

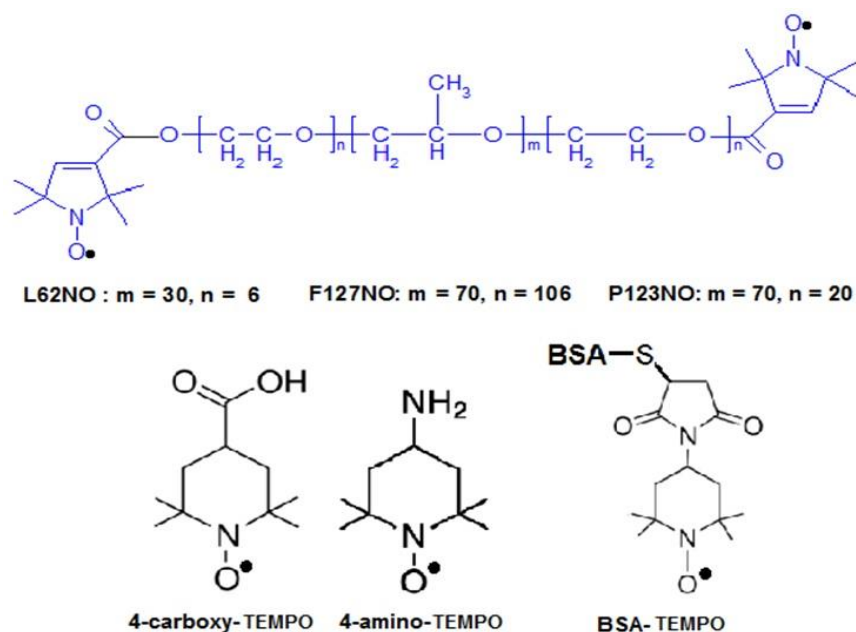


Figura 15. Sondele de spin utilizate pentru difuzia în geluri [19].

Tabel 2. Masele moleculare ale sondelor de spin utilizate pentru difuzia în geluri [19]

Sonda de spin	Masa moleculară (g/mol)
TEMPO (T)	156
4-hidroxi-TEMPO (T-OH)	172
4-carboxi-TEMPO (CT)	200
4-amino-TEMPO(TNH ₂)	171
Pluronic L62NO	2500
Pluronic P123NO	5800
PEG8000-NO	8000
Pluronic F127NO	12600
Albumina serică bovină marcată cu spin	≈ 66000

Au fost analizate o serie de hidrogeluri chimice care rezultă prin reacția dintre polietilen glicol (PEG) sau polipropilen glicol (PPG) funcționalizat cu grupări izocianat care reacționează cu grupările hidroxil ale α - sau β -ciclodextrinei. S-a urmărit evidențierea capacității de încapsulare în funcție de mai mulți parametri: lungimea lanțului PEG, raportul între concentrațiile inițiale PEG/ β -CD, influența polarității lanțului, prin comparația între gelurile ce conțin PPG și PEG (PEG900, PEG2000, PPG2000).

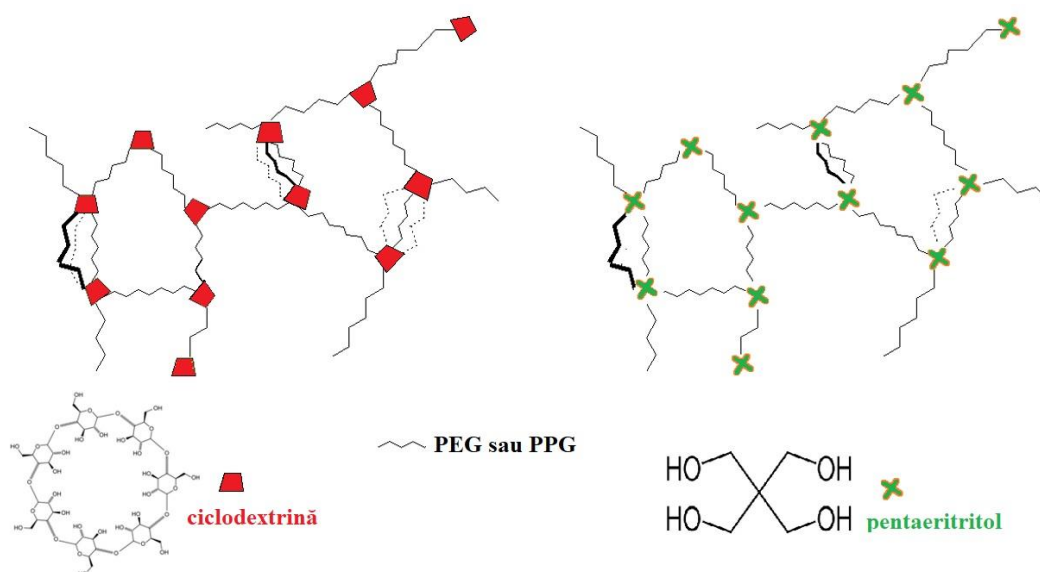


Figura 16. Reprezentarea schematică a rețelelor gelului polimeric format din ciclodextrină sau pentaeritritol cu PEG sau PPG, adaptată după [18].

În funcție de raportul inițial al reactanților folosit în sinteza gelurilor polimerice PEG/CD sau PPG/CD, s-a observat prin analiza spectrelor RES că sondele cu masă moleculară mai mare de 12000 g/mol nu difuzează în toate gelurile polimerice care conțin apă ca solvent. De exemplu, F127NO difuzează în gelul care rezultă din reacția PEG2000 cu β -CD (Figura 17).

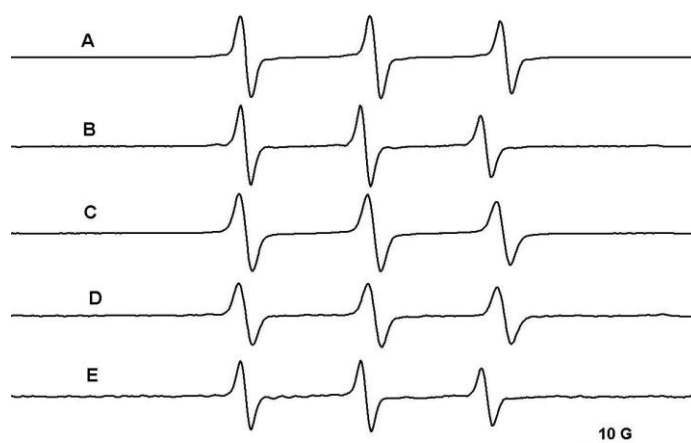


Figura 17. Spectrele RES ale sondelor de spin TEMPO (A), L62NO (B), P123NO (C), PEG8000-NO (D) și F127NO (E) încapsulate în gel PEG2000/ β -CD, în apă.

Înlocuirea lanțului PEG cu PPG (mai hidrofob – conformații mai compacte) modifică dimensiunile ochiurilor rețelei. Înlocuirea β -CD cu α -CD schimbă capacitatea de a încapsula sondele moleculare, astfel încât sonda F127NO nu difuzează în aceste hidrogeluri. Înlocuirea apei cu diclormetan (DCM)/dimetilformamidă (DMF) determină creșterea dimensiunii ochiurilor

rețelei permițând încapsularea sondelor moleculare cu masă moleculară mai mare (PEG8000-NO sau F127NO). Albumina bovină serică marcată cu spin nu difuzează în gelurile polimerice (Figurile 18, 19 și 20).

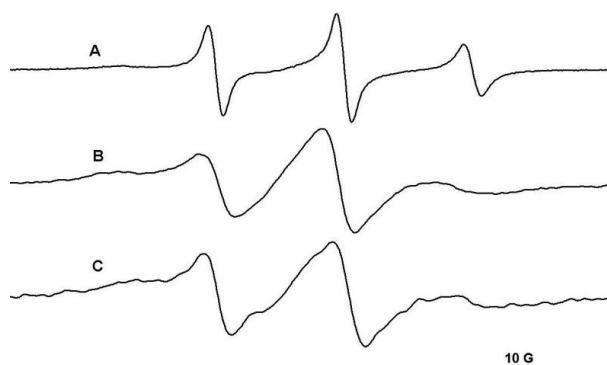


Figura 18. Spectrele RES ale sondelor de spin TEMPO (A), L62NO (B) și P123NO (C) încapsulate în gel PPG2000/ α -CD, în apă.

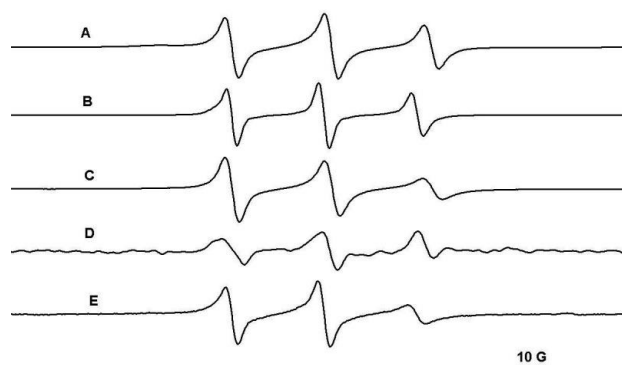


Figura 19. Spectrele RES ale sondelor de spin TEMPO (A), L62NO (B), P123NO (C), PEG8000-NO (D) și F127NO (E) încapsulate în gel PPG2000/ α -CD, în DCM.

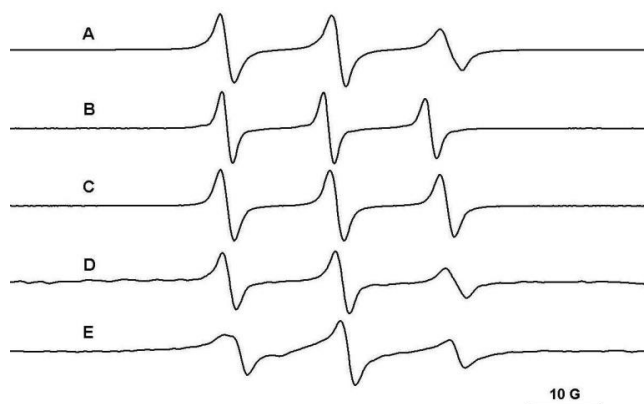


Figura 20. Spectrele RES ale sondelor de spin TEMPO (A), L62NO (B), P123NO (C), PEG8000-NO (D) și F127NO (E) încapsulate în gel PPG2000/ α -CD, în DMF.

Folosind o varietate de specii chimice, a fost posibil să se obțină o imagine generală a permeabilității gelurilor polimerice covalente. Spectrele RES ale sondelor de spin polimerice încapsulate în geluri polimerice indică în unele cazuri o mișcare lentă datorată fie interacției cu rețeaua de gel, fie unei mișcări constrânse în zonele de solvent delimitate de rețea.

Alte două experimente au avut ca scop evidențierea schimbărilor în capacitatea de a încapsula sonde de spin a gelurilor în care ciclodextrina a fost înlocuită de pentaeritritol, atât în cazul utilizării apei cât și a utilizării DCM ca solvent. La fel ca în cazul PEG900/ β -CD, s-a observat că doar sonda P123NO mai poate difuza în hidrogelul PEG900/pentaeritritol. În cazul utilizării DCM, dimensiunile ochiurilor rețelei se largesc și toate cele cinci sonde de spin sunt încapsulate în gel.

În a doua parte a acestui capitol s-a studiat capacitatea de încapsulare a sondelor de spin în funcție de masa moleculară în gel de alginat și în rețele de tip IPN și semi-IPN formate prin reticularea soluțiilor de alginat de sodiu și chitosan.

În continuarea studiului s-a putut observa că sondele de spin obținute prin marcarea bloc-copolimerilor F127, L62 și P123 au difuzat în geluri de alginat și în geluri semi-IPN de alginat și chitosan (Figura 21).

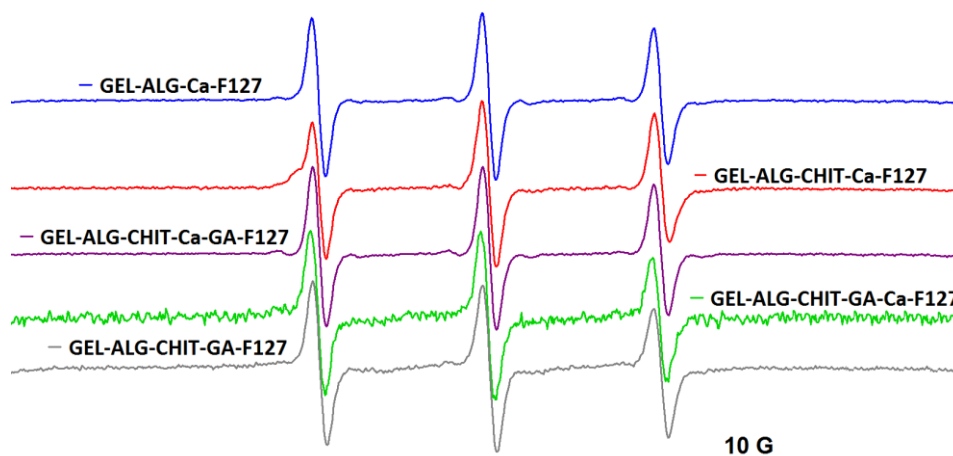


Figura 21. Spectrele RES ale sondei de spin F127NO în hidrogeluri de alginat, semi-IPN și IPN.

De asemenea, și albumina serică bovină marcată cu spin difuzează în gelurile de alginat și gelurile semi-IPN. În cazul rețelei IPN, difuzia albuminei este posibilă, dar este dependentă de ordinea în care se adaugă agenții de reticulare. Dimensiunea ochiurilor rețelelor hidrogelurilor IPN rezultate prin adăugarea succesivă de glutaraldehidă și Ca^{2+} la amestecul de chitosan și alginat este mai mică decât dimensiunea BSA, deoarece albumina marcată cu spin nu difuzează în rețeaua IPN rezultată.

Albumina marcată cu spin are o mișcare restricționată în hidrogelurile semi-IPN și IPN (Figura 22). În prezență de glutaraldehidă se observă o mișcare foarte restricționată, ceea ce demonstrează o interacție puternică cu rețeaua gelului (spectrul gri). În prezență de glutaraldehidă și Ca^{2+} , semnalul RES este foarte slab, indicând o rețea de gel cu ochiuri de dimensiuni mici (spectrul verde).

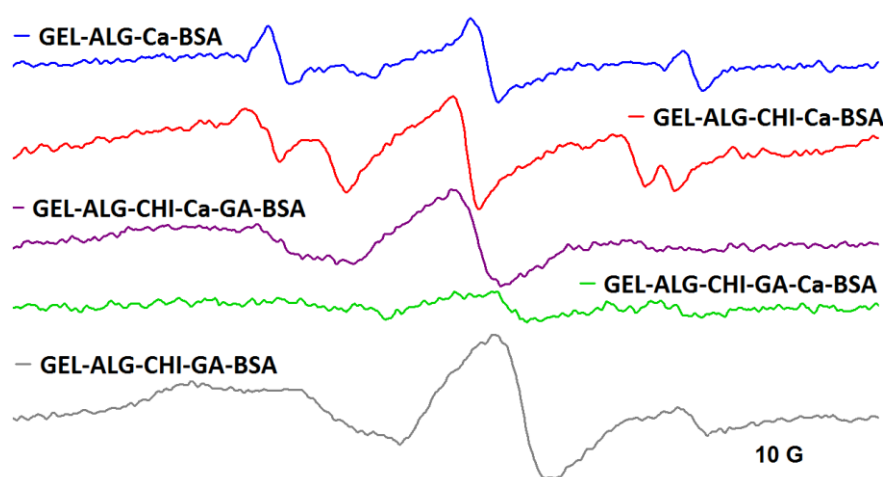


Figura 22. Spectrele RES ale BSA marcată cu spin în alginat, hidrogeluri semi-IPN și IPN.

Așadar, experimentele de difuzie în hidrogeluri efectuate prin spectroscopie RES pot fi folosite pentru estimarea dimensiunii ochiurilor de rețea. În cazul unor dimensiuni mici ale ochiurilor rețelei, sonda nu poate pătrunde în rețeaua gelului și probele de gel nu prezintă semnal RES. La dimensiuni mari ale ochiurilor de rețea se observă un spectru RES ce indică o mișcare restricționată sau puternic restricționată. Experimentele efectuate au demonstrat că gelurile polimerice au o dimensiune a ochiurilor de rețea mai mică de 10 nm (dimensiunea BSA) față de hidrogelurile alginat și IPN cu chitosan. Dimensiunea ochiurilor de rețea a hidrogelurilor IPN este mai mare decât dimensiunea BSA.

Dimensiunea ochiurilor de rețea ale gelurilor polimerice depinde de lungimea linkerului de polimer și de ordinea în care se face reticularea. Utilizarea metodei RES pentru determinarea dimensiunii ochiurilor de rețea prin folosirea sondelor de spin cu dimensiuni cunoscute este un element de noutate.

Ultimul capitol al tezei se referă la modelarea procesului de crosslinking (CLX) al collagenului sub influența riboflavinei și radiației UVA, luând în considerare implicarea componentelor soluțiilor oftalmice (acidul hialuronic) și proteinelor din filmul lacrimal.

Sistemele studiate au fost alese deoarece elementele care intră în componența lor reprezintă actorii principali în procedeul de tratament în vederea stopării evoluției unei afecțiuni

oftalmologice, keratoconus. Acest tratament presupune inițierea formării unor legături intra sau interfibrilare în rețeaua de collagen – element structural al corneei – mediată de radicalii generați de fotodegradarea riboflavinei sub influența radiației UVA, așa cum este prezentat în Figura 23 [23]. Acest procedeu poate avea și efecte adverse deoarece radicalii liberi formați pot induce moartea celulelor endoteliale, deci pot afecta retina sau cristalinul.

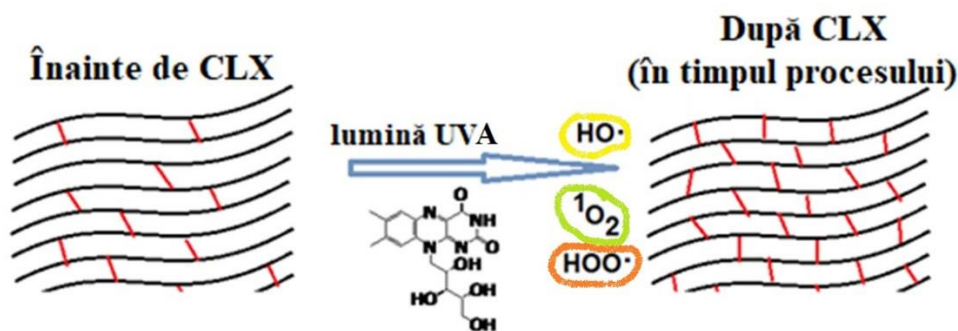


Figura 23. Reprezentarea schematică a procesului de interconectare a lanțurilor de collagen mediată de radicalii generați de riboflavină sub acțiunea UVA [23].

În literatura de specialitate [24-28] privind stoparea evoluției keratoconusului prin inițierea formării unor noi fibrile în structura collagenului în prezența riboflavinei nu sunt raportate date fizico-chimice privind procesele care au loc.

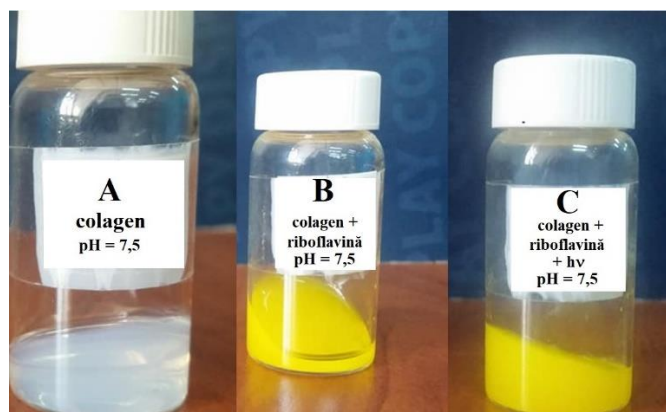


Figura 24. Geluri de collagen formate la pH = 7,5 în absența riboflavinei (A), în prezența riboflavinei înaintea expunerii la radiația UVA (B) și după expunerea la radiația UVA (C).

Cercetările efectuate în cadrul studiului au avut ca scop evidențierea prin metode fizico-chimice a unor transformări în sisteme ce conțin acid hialuronic (HA), riboflavină, collagen. Metodele fizico-chimice utilizate au fost microscopia electronică de transmisie cu scanare (STEM), determinările reologice, determinări de microcalorimetrie și determinări RES de evidențiere a speciilor radicalice formate în prezența riboflavinei în diferite sisteme. În tipul acestui

proces se generează o serie de specii reactive de oxigen (ROS) cum ar fi hidroxil ($\text{HO}\bullet$), superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroperoxid ($\text{HO}_2\bullet$) și oxigen singlet ($^1\text{O}_2$). Probele studiate au fost obținute din collagen extras din dermă bovină. Soluțiile de collagen de 0,25 % în absența și în prezența riboflavinei (0,1%) și/sau a acidului hialuronic (0,1%) la intervale de temperatură de 10–37°C și de pH 3,5–7,5 au fost sau nu expuse radiației UVA (Figura 24)

Formarea fibrilelor s-a evidențiat în sistemele de collagen la temperatura de 37°C și pH = 7,5, cu tranziție de la faza de sol la cea de gel ca rezultat al fibrilogenezei. Probele au fost examinate microscopic. Probele au fost pregătite folosind metodele similare cu cele descrise în literatură [29–31].

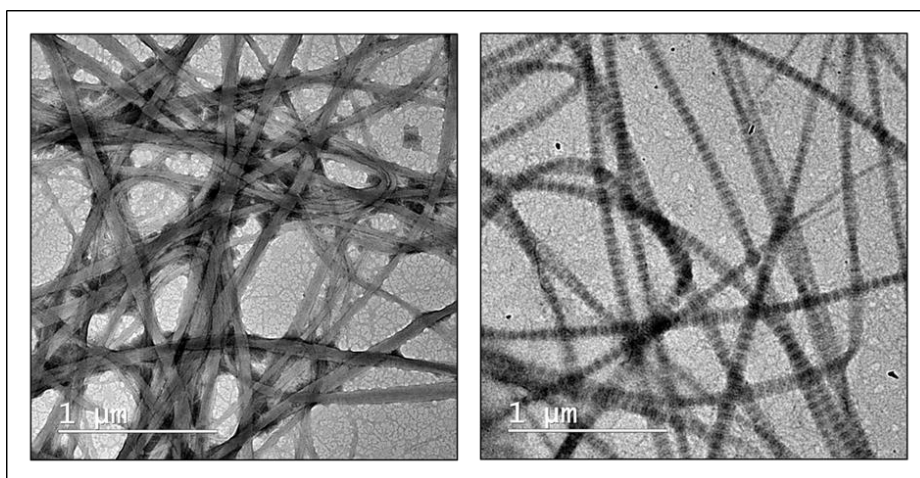


Figura 25. Imaginile STEM ale fibrelor de collagen în absența (A) și în prezența (B) riboflavinei, pH = 7,5.

În cazul probei preparate la pH = 7,5, în urma creșterii temperaturii la 37°C s-a putut observa macroscopic transformarea sol-gel ca dovadă a fibrilogenezei, însă microscopic nu s-a evidențiat un proces uniform (Figura 25 A). În schimb, în prezența riboflavinei, chiar și în absența iradierii cu lumina UV, s-a observat microscopic formarea fibrilelor în mod mult mai ordonat (Figura 25 B). Acestea se formează și în prezența acidului hialuronic. Probele de collagen au fost caracterizate și din punct de vedere reometric.

Scopul determinărilor RES a fost acela de a evidenția radicalii cu viață scurtă (în special cei centrați pe oxigen) în diferite sisteme expuse riboflavinei și radiației UVA. De aceea, experimentele de captare de radicali s-au efectuat pentru soluții de lactoferină (LF), lizozim (LYZ), albumină serică umană (HSA) și amestecuri ale acestora în prezența riboflavinei expuse UVA. Pentru aceasta au fost utilizați cei trei captatori de spin prezentați în Figura 26: DMPO – folosit pentru identificarea radicalilor hidroxil, CPH – folosit pentru evidențierea radicalilor superoxid și

hidroxil, respectiv TEMP – folosit pentru identificarea oxigenului singlet [32]. Pentru majoritatea sistemelor analizate specia radicalică analizată a fost radicalul hidroxil.

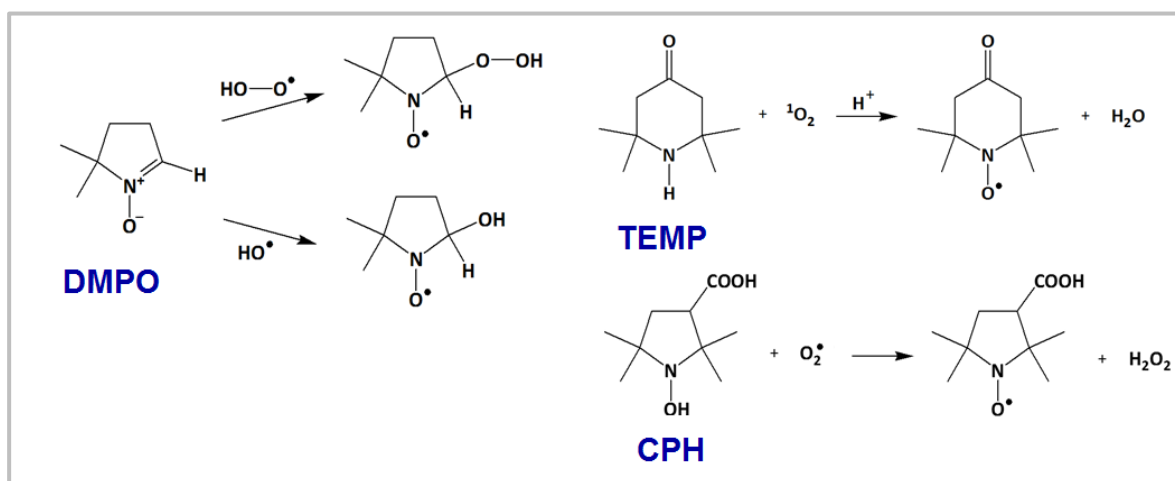


Figura 26. Structurile captatorilor de spin utilizați [32].

Metoda CLX de stopare a evoluției keratoconusului implică iradierea riboflavinei cu lumină UVA, astfel pentru a demonstra rolul luminii a fost înregistrat spectrul RES al soluției la întuneric, observând că nu există semnal (spectrul negru) și spectrul RES în prezența luminii (spectrul cian). În prezența luminii se observă semnalul RES de 4 linii caracteristic aductului DMPO- $\text{HO}^\bullet$ (Figura 27).

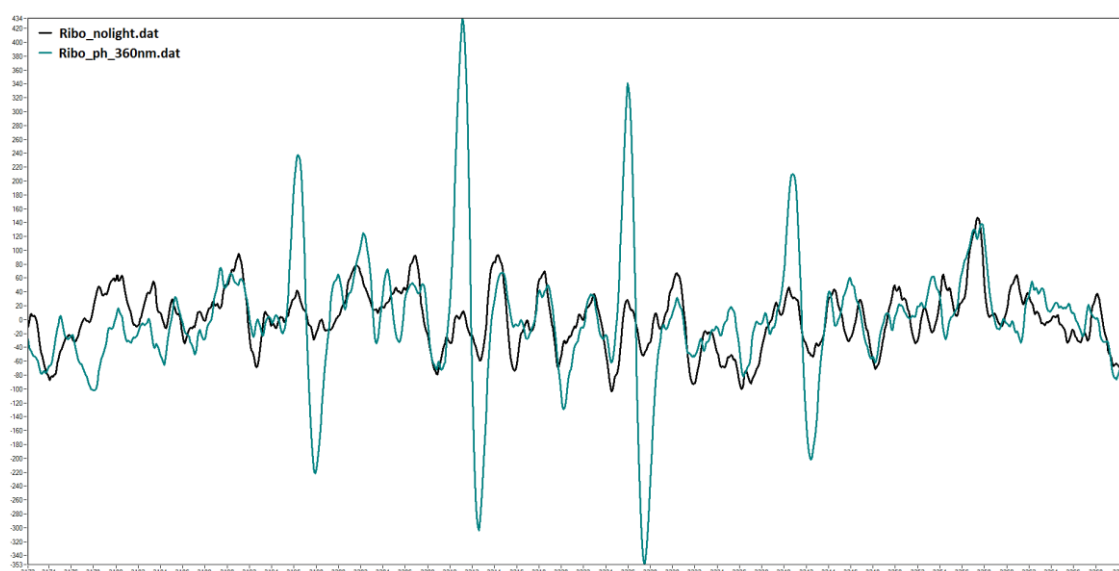


Figura 27. Spectrul soluției de riboflavină/DMPO în absența (negru) și în prezența luminii (cian).

Spectrele RES ale aducților de spin formați în sistemele de proteină menționate mai sus conțin două componente. O componentă corespunde aductului DMPO- $\text{HO}^\bullet$, iar cealaltă

corespunde unui aduct al DMPO cu un radical centrat pe carbon care se formează prin interacția radicalilor ROS generați de riboflavină cu proteinele. Liniile corespunzătoare fiecărui aduct sunt marcate cu bulină **roșie** pentru DMPO-HO• și cu bulină **albastră** pentru aductul radicalului centrat pe carbon (Figura 28). În prezența acidului hialuronic sau a dextranului s-a constatat că formarea radicalilor centrați pe carbon este inhibată. Astfel, putem spune că acidul hialuronic nu are doar un rol în refacerea integrității filmului lacrimal, ci și un rol antioxidant împotriva radicalilor cu reactivitate mare.

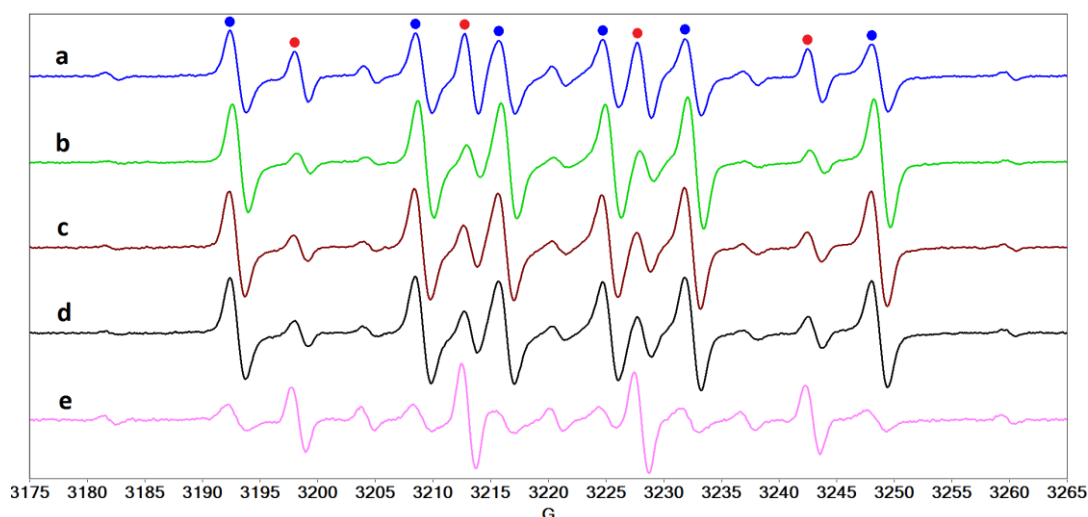


Figura 28. Spectrele RES ale aducților DMPO formați după expunerea la UVA în prezența riboflavinei în soluție de a) HSA, b) LF, c) LYZ și în amestecul celor trei proteine în absența (d) și în prezența HA (e).

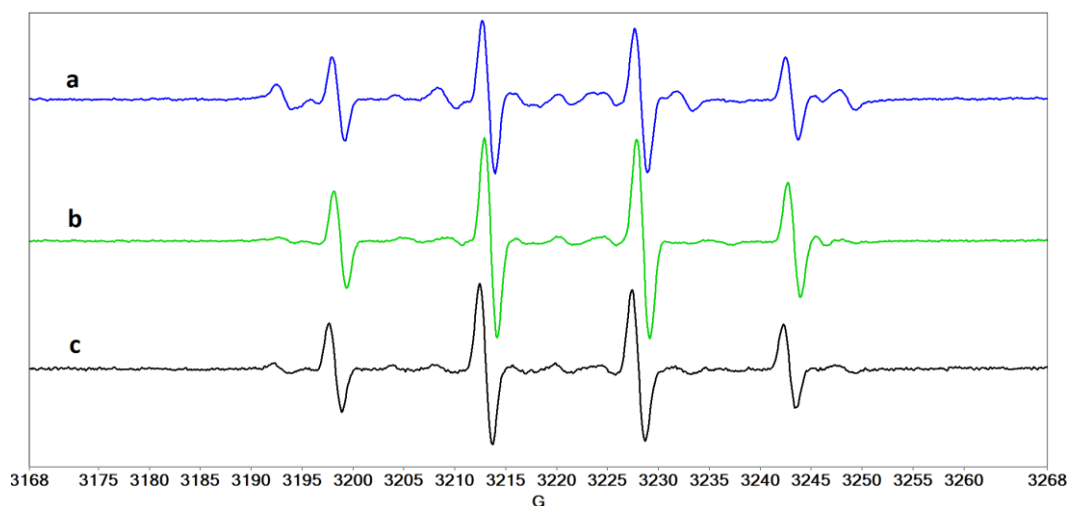


Figura 29. Spectrele RES ale aducților DMPO formați după iradierea UVA în prezența riboflavinei a soluției de collagen în absența HA (a), în prezența HA (b) și în prezența amestecului HA+HSA+LF+LYZ (c).

Radicalii HO• și cei centrați pe atomi de carbon au fost evidențiați și în soluția ce conține collagen și riboflavină după expunerea la radiație UVA (Figura 28 a). Prezența acidului hialuronic, dar și a celor trei proteine (LF, LYZ, HSA) reduce contribuția radicalului centrat pe carbon (Figura 29 b și c).

În urma iradierii soluțiilor care conțin riboflavină se poate forma, pe lângă radicalul hidroxil, și radicalul superoxidul care are o reactivitate mai mare și care, teoretic, ar avea un efect negativ secundar mai mare în tratamentul CLX. Agentul de captare CPH poate evidenția formarea acestui radical prin utilizarea superoxid dismutazei (SOD). În Figura 30 sunt prezentate spectrele aducților CPH formați în soluția de collagen în absența (Figura 30, spectrul albastru) și în prezența SOD (Figura 30, spectrul verde).

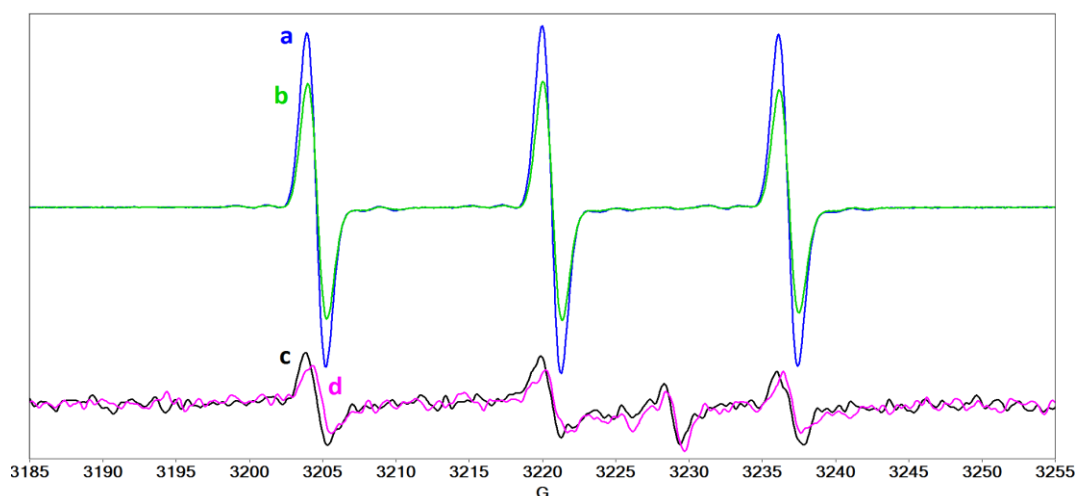


Figura 30. Spectrele RES ale aducților CPH formați prin iradierea cu UVA a unei soluții ce conține riboflavină și a) collagen, b) collagen+SOD, c) collagen+HA și d) collagen+HA+SOD.

Se observă că intensitatea spectrului în prezența SOD este puțin mai mică, ceea ce ar putea conduce la concluzia că radicalul superoxid poate fi generat în soluția de collagen. În cazul soluției care conține collagen și acid hialuronic se observă că intensitățile celor două spectre sunt similare și mai mici (Figura 30, spectrul negru și magenta). Acest rezultat subliniază rolul de protecție pe care îl poate avea acidul hialuronic în timpul tratamentului CLX.

Dintre posibili radicali reactivi centrați pe oxigen generați în prezența UVA și riboflavinei, oxigenul singlet este cel care ar avea un potențial mai mare de distrugere a țesuturilor ochiului în urma tratamentului CLX (Figura 31). Generarea TEMPONE (4-oxo-TEMPO) a făcut posibilă detectarea oxigenului singlet în soluție de riboflavină în apă, în soluție de riboflavină și collagen, în soluție de collagen, dar și în soluția PESCHKE (formula farmaceutică ce conține riboflavină și dextran).

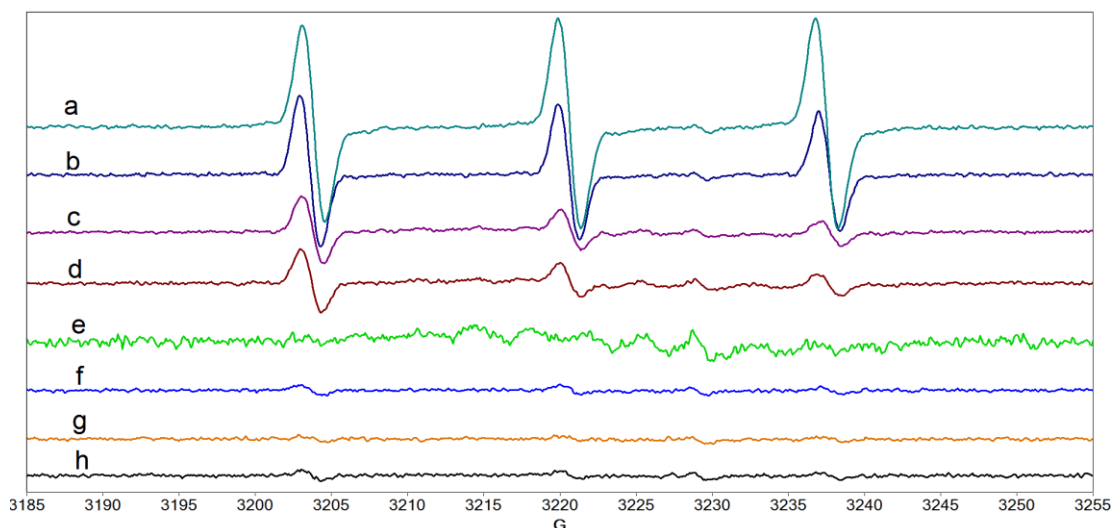


Figura 31. Spectrele RES ale TEMPONE format după iradierea UVA a sistemelor: a) H₂O, b) collagen+riboflavină, c) collagen, d) soluție PESCHKE, e) lacrimi, f) collagen+HA, g) collagen+HA+HSA+LF, h) HSA+LF+LYZ.

În schimb, formarea oxigenului singlet nu a fost evidențiată în lacrimi, în amestec de collagen și acid hialuronic sau în amestec de collagen, acid hialuronic și proteine. Experimentele au arătat că acidul hialuronic are rolul de a neutraliza excesul de specii reactive formate. În prezența acidului hialuronic sau a dextranului s-a constatat că formarea radicalilor centrați pe carbon este inhibată, ceea ce dovedește că acidul hialuronic are rol antioxidant împotriva radicalilor cu reactivitate mare.

Rezultatele determinărilor fizico-chimice privind sistemele ce conțin collagen și acid hialuronic expuse acțiunii riboflavinei și UVA susțin rolurile pe care riboflavina și acidul hialuronic le au în tratamentul CLX. Riboflavina, prin generarea de radicali liberi, asigură formarea unor legături interfibrilare care conduc la creșterea rezistenței mecanice a corneei, în timp ce acidul hialuronic are rolul de a regla sau a neutraliza o parte din radicalii liberi formați. Același rol îl are și dextranul care intră în compoziția soluției PESCHKE.

Lucrarea este centrată pe utilizarea spectroscopiei RES ca metodă de cercetare a sistemelor care conțin polizaharide. Datele RES au fost completate de date obținute prin reologie, calorimetrie, spectroscopie IR și microscopie electronică.

Datele prezentate în această teză oferă perspectiva de continuare a studiilor privind funcționalizarea polizaharidelor în scopul modulării proprietăților acestora în funcție de aplicațiile dorite. În special vor fi detaliate studiile privind formarea nanoparticulelor metalice în geluri ale polizaharidelor.

REFERINȚE SELECTIVE:

Capitolul 3

- [1] G. R. Eaton, S. S. Eaton, K. M. Salikhov, Eds. Foundations of Modern EPR, Singapore, *World Scientific*, **1998**.
- [2] L. C. Cesteros, C. A. Ramirez, A. Pecina, I. Katime, Synthesis and properties of hydrophilic networks based on poly(ethyleneglycol) and β -cyclodextrin, *Macromol Chem Phys.*, **2007**, 208:1764–1772.
- [3] G. Ionita, V. Chechik, Exploring polyethylene glycol/cyclodextrin hydrogels with spin probe sand EPR spectroscopy, *Chem Commun.*, **2010**, 46:8255–8257.
- [4] F. Khan, S. R. Ahmad, Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application, *Macromol. Biosci.*, **2013**, 13, 395–421. doi:10.1002/mabi.201200409.
- [5] S. H. Ching, N. Bansal, B. Bhandari, Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2017**, 57, 1133–1152. doi:10.1080/10408398.2014.965773.
- [6] G. Ionita, A. M. Ariciu, D. K. Smith, V. Chechik, Ion exchange in alginate gels – dynamic behaviour revealed by electron paramagnetic resonance, *Soft Matter*, **2015**, 11, 8968 – 8974.

Capitolul 4

- [7] G. Ionita, G. Marinescu, C. Ilie, D. F. Anghel, D. K. Smith, V. Chechik, Sorption of metal ions by poly(ethyleneglycol)/ β -CD hydrogels leads to gel-embedded metal nanoparticles, *Langmuir*, 29 (29), **2013**, p. 9173-9178. doi:10.1021/la401541p.
- [8] E. Faucher, P. Nativio, K. Black, J. B. Claridge, M. Gass, S. Romani, A. L. Bleloch, M. Brust, In situ Preparation of Network Forming Gold Nanoparticles in Agarose Hydrogels, *Chem. Commun.*, **2009**, 6661-6663.
- [9] J. Colomb, K. Louie, S. P. Massia, K. M. Bennett, Self-Degrading, MRI-Detectable Hydrogel Sensors With Picomolar Target Sensitivity, *Magn. Reson. Med.*, **2010**, 64,1792-1799
- [10] D. C. Hyun, M. Park, C. Park, B. Kim, Y. Xia, J. H. Hur, J. M. Kim, J. J. Park, U. Jeong, Ordered Zig-zag Stripes of Polymer Gel/Metal Nanoparticle Composites for Highly Stretchable Conductive Electrodes, *Adv. Mater.*, **2011**, 23,2946-2950.
- [11] J. O. You, D. T. Auguste, Conductive, Physiologically Responsive Hydrogels, *Langmuir, American Chemical Society*, **2010**, 26 (7), 4607–4612.
- [12] O. Ozay, N. Aktas, N. Sahiner, Hydrogels as a Potential Chromatographic System: Absorption, Speciation, and Separation of Chromium Species from Aqueous Media, *Separation Sci. Technol.*, **2011**, 46, 1450-1461.

[13] I. Matei, M. Bem, C. Raduțiu, E. I. Popescu, S. Mocanu, F. Savonea, R. Barațoiu, G. Ioniță, Processes mediated by gold nanoparticles encapsulated in polymeric gels evidenced by EPR spectroscopy”, *Revue Roumaine de Chimie*, **2021**, 66(3), 295-301.

Capitolul 5

[14] P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W. E. Hennink, F. Alhaique, Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, **2013**, 1172–1187. doi:10.1016/j.addr.2013.04.002.

[15] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, F. Alhaique, Polysaccharide hydrogels for modified release formulations, *Journal of Controlled Release* 119, **2007**, 5–24.

[16] G. Ionita, Characterization and Tailoring the Properties of Hydrogels Using Spectroscopic Methods, in *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, *Intech*, **2016**.

[17] J.R.J. Millar, Interpenetrating polymer networks. Styrene-divinyl benzene copolymers with two and three interpenetrating networks, and their sulphonates, *Chem. Soc.*, **1960**, 1311-1317.

Capitolul 6

[18] G. Ionita, A. M. Ariciu, I. M. Turcu, V. Chechik, Properties of polyethyleneglycol / cyclodextrin hydrogels revealed by spin probes and spin labelling methods, *Soft Matter*, **2014**, 10, 1778–1783.

[19] A. Caragheorgheopol, H. Caldararu, I. Dragutan, H. Joela, W. Brown, Micellization and Micellar Structure of a Poly(ethyleneoxide)/Poly(propyleneoxide)/Poly(ethyleneoxide) Triblock Copolymer in Water Solution, As Studied by the Spin Probe Technique, *J. Langmuir, American Chemical Society Pub.*, **1997**, 13, 6912 – 6921.

[20] S. Kirchhof, M. Abrami, V. Messmann, N. Hammer, A. M. Goepferich, M. Grassi, F.P. Brandl, Diels-Alder hydrogels for controlled antibody release: Correlation between mesh size and release rate, *Mol Pharmaceutics.*, **2015**; 12 (9): 3358–3368.

[21] S. Sutton, N.L. Campbell, A.I. Cooper, M. Kirkland, W.J. Frith, D.J. Adams, Controlled release from modified amino acid hydrogels governed by molecular size or network dynamics, *Langmuir.*, **2009**; 25:10285–10291.

[22] I. Matei, A. M. Ariciu, M.V. Neacsu, A. Collauto, A. Salifoglou, G. Ionita, Cationic spin Probe Reporting on thermal Denaturation and Complexation-Decomplexation of BSA with SDS. Potential Applications in protein purification processe, *J. Phys. Chem.*, **B2014**, 118, 11238-11252.

Capitolul 7

[23] G. Wollensak, E. Sperl, T. Seiler, Riboflavin/Ultraviolet-A – induced Collagen Crosslinking for the Treatment of Keratoconus, *Am. J. Ophtholmol.*, **2003**, 135(5), 620-627.

- [24] B. R. Williams, R. A. Gelman, D. C. Poppke, K. A. Piez, Collagen fibril formation: Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results, *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 6578-6585.
- [25] F. H. Silver, Type I collagen fibrillogenesis in vitro: Additional evidence for the assembly mechanism, *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 4973-4977.
- [26] F. H. Silver, D. E. Birk, Kinetic analysis of collagen fibrillogenesis: I. Use of turbidity-time data, *Collagen Rel. Res.*, **1983**, 3, 393-405.
- [27] D. E. Birk, F. H. Silver, Kinetic analysis of collagen fibrillogenesis: II. Corneal and scleral type I collagen, *Collagen Rel. Res.*, **1984**, 4, 265-277.
- [28] T. Staicu, V. Circu, G. Ionita, C. Ghica, V.T. Popa, M. Micutz, Analysis of bimodal thermally-induced denaturation of type I collagen extracted from calfskin, *RSC Advances.*, **2015**, 5, 38391-38406.
- [29] S. Chandrasekhar, G. W. Laurie, F. B. Cannon, G. R. Martin, H. K. Kleinman, In vitro regulation of cartilage matrix assembly by a Mr 54,000 collagen-binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83, 5126-5130. doi:10.1073/pnas.83.14.5126.
- [30] D. E. Birk, J. M. Fitch, J. P. Babiarz, K. J. Doane, T. F. Linsenmayer, Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter, *J. CellSci.*, **1990**, 95, 649-657.
- [31] Y. Li, A. Asadi, M. R. Monroe, E.P. Douglas, pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding, *Mater. Sci. Eng. C*, **2009**, 29, 1643-1649. doi:10.1016/j.msec.2009.01.001.
- [32] S. Dikalov, I. A. Grigorev, M. Voinov, E. Bassenge, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 248, 211.

Lista articolelor științifice publicate în domeniul tezei de doctorat

1. S. Mocanu, I. Matei, A. Leonties, V. Tecuceanu, A.M. Hanganu, Z. Minea, A. Stancu, E.I. Popescu, G. Ionita, "New flexible molecular probes bearing dansyl and TEMPO moieties for host-guest interactions in solution and gels", *New J. Chem.*, 2019,43, 11233-11240(F.I.=3.288/2019). doi:10.1039/C9NJ01554J
2. E. I. Popescu, L. Aricov, S. Mocanu, I. Matei, E. Hristea, R. Baratoiu, A. Leonties, C. Petcu, E. Alexandrescu, G. Ionita, "Subtle influence on alginate gel properties through host-guest interactions between covalently appended cyclodextrin and adamantane units", *New J. Chem.*, **2021**, 45, 8083-8091 (F.I.=3.591/2020). doi:10.1039/D1NJ01278A
3. I. Matei, E. I. Popescu, S. Mocanu, E. N. Hristea, F. Savonea, R. Baratoiu, G. Ionita, "Non-covalent interactions evidenced by EPR spectroscopy in cyclodextrin complexes", *Rev. Roum. Chim.*, **2021**, 66 (1), 9-23. doi:10.33224/rch.2021.66.1.01
4. I. Matei, M. Bem, A. R. Leonties, C. Radutiu, E. I. Popescu, S. Mocanu, F. Savonea, R. Baratoiu, G. Ionita, "Processes mediated by gold nanoparticles encapsulated in polymeric gels evidenced by EPR spectroscopy", *Rev. Roum. Chim.*, **2021**, 66 (3), 295-301. doi:10.33224/rch.2021.66.3.10

Participări la manifestări științifice:

1. G. Ioniță, I. Matei, E. I. Popescu, Z. Mînea, S. Mocanu, Prezentare poster: Host-guest interactions in polysaccharide hydrogels evidenced by spin probes, 2019, The 52nd International Meeting of the ESR Spectroscopy Group of the Royal Society of Chemistry, Glasgow
2. G. Ioniță, E. I. Popescu, E. Hristea, R. Bărațoiu, S. Mocanu, I. Matei, Prezentare poster: Host-guest interactions in polymeric gels evidenced by EPR spectroscopy, 2019, XIth EFEPR Conference, Bratislava
3. E. I. Popescu, Z. Mînea, S. Mocanu, I. Matei, G. Ioniță, Prezentare poster: Spin probes - Tools to investigate loading capacity and inhomogeneity of hydrogels, 2019, 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE), Constanța

Teza a fost realizată cu sprijinul financiar al UEFISCDI prin grantul PN-III-P4-IDPCE-2016-0734), director de proiect și coordonator al tezei, Dr. Gabriela Ioniță, căreia îi păstrez adâncă prețuire pentru susținere și ajutor. Mulțumesc întregii echipe din Laboratorul de Chimie Cuantică și Structură Moleculară al Institutului de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu” al Academiei Române care a fost alături de mine pentru realizarea acestei lucrări. Măsurătorile de reologie necesare în capitolul trei au fost realizate de CS dr. Ludmila Aricov în cadrul Institutului de Chimie Fizică "Ilie Murgulescu", iar sinteza probelor de collagen cu măsurătorile de reologie respective au fost realizate de conf. dr. Marin Micuț în cadrul Universității din București. Activitatea de cercetare a fost realizată cu sprijinul deosebit al personalului administrativ și al conducerii Institutului de Chimie Fizică "Ilie Murgulescu" al Academiei Române.