

RAPORT STIINTIFIC FINAL
în cadrul proiectului PN-II-ID-PCCE-2011-2-0028
(1 iunie 2012 - 30 septembrie 2016)

Denumirea proiectului: **SISTEME DE INSPIRAȚIE BIOLOGICĂ PENTRU ENTITĂȚI PROIECTATE STRUCTURAL ȘI FUNCȚIONAL**

Coordonator: **INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ „PETRU PONI” DIN IAȘI**

Director de proiect: **DR. MARIANA PINTEALĂ**

ADRESA WEB: http://www.intelcentru.ro/Biomimetics_PCCE/ro/
http://www.intelcentru.ro/Biomimetics_PCCE/ro/index.html

Raportul contine ca trimiteri bibliografice numai lucrarile publicate de grupul de lucru cu multumiri la proiectul PNII-ID-PCCE-2011-2-0028

Proiectul a fost axat pe două direcții majore de cercetare: (i) imitarea morfologiei și funcționalității unor structuri aparținând sistemelor vii, pentru a elucida și a exploata relația dintre structurile biologice și funcțiile lor și pentru a stabili interacțiunile specifice dintre acestea; (ii) angrenarea în studii de inginerie biomoleculară și de auto-organizare la scară nanometrică, în vederea reproducerii mecanismelor „viului” printr-o abordare chimică. S-a vizat proiectarea și „construirea” unor entități structurale și funcționale, capabile să imite componentele extra- și intra-celulare implicate în mecanismele traficului de gene și în cel al modelării matricelor extracelulare. Studiile se adresează medicinei individualizate / personalizate, dar și ingineriei și reprogramării genetice. "Filosofia" proiectului constă în aplicarea metodelor avansate de conjugare chimică pentru obținerea de noi (macro)sisteme biomimetice capabile să înlocuiască sau să completeze arhitecturi funcționale specifice materiei vii.

Au fost avute în vedere patru obiective majore:

1. Proiectarea și realizarea unor sisteme care să mimeze histona ca unitate a "nucleozomului artificial", trasabile fluorimetric, capabile să acționeze ca un sistem non-viral de livrare a genelor, cu o capacitate de impachetare de aproximativ $2 \div 5$ kb.
2. Proiectarea și realizarea unor purtători non-virali biomimetici pe bază de polimeri și aducți polimerici, destinați eliberării controlate, inclusiv intracelular, a unor specii cu acțiune farmacologică.
3. Proiectarea și realizarea unui sistem de mineralizare biomimetic tip calus osos, cu capacitate de transfecție, imuno-evaziv și capabil să stocheze și să transfere specii biochimice sau farmaceutice, bazat de biomacromolecule și polimeri de sinteză, cu capacitate de recunoaștere celulară, activ ca un substrat pentru

cultura de celule *ex-vivo* și potențial injectabile în site-uri osoase, cu scopul de a ghida restaurarea țesutului în prezența celulelor adecvate. Acest obiectiv reprezintă o aplicare imediată a primelor două, mai sus enunțate.

4. Dezvoltarea unor metode de investigare aplicabile în terapia genică și pentru caracterizarea sistemelor de eliberare controlată.

Primul și cel de-a treilea obiectiv implică abordări noi și inovatoare în împachetarea și vehicularea unuia sau a mai multor segmente de acizi nucleici, suficient de mari pentru a transfera informația necesară inducerii, înlocuirii, extinderii sau secundării unei funcții celulare aflată sub control genetic, ori implicată în mecanismele funcționale ce implică acizi nucleici. Cel de-al doilea obiectiv a vizat abordări noi și inovatoare în încărcarea, vehicularea și eliberarea de specii farmacologic active, iar cel de-al patrulea s-a axat pe extinderea cadrului experimental al caracterizării analitice a entităților dezvoltate în cadrul proiectului.

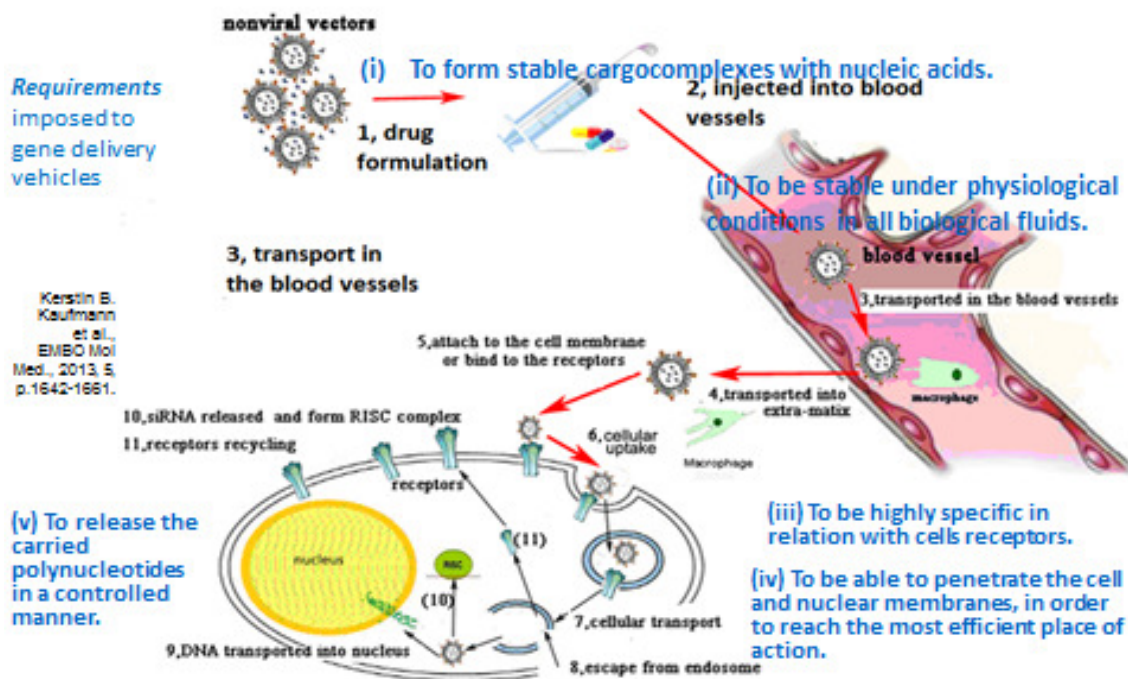
Proiectul a avut un ridicat grad de multidisciplinaritate, implicând expertiză în sinteza chimică și modelarea moleculară, biochimie, fizică și biologie celulară, expertiză asigurată de partenerii implicați în implementarea proiectului.

Obiectivul 1. MIMAREA FUNCȚIONALITĂȚII HISTONELOR, CU SCOPUL DEZVOLTĂRII UNUI “NUCLEOZOM ARTIFICIAL”

În contextul acestui obiectiv, proiectul s-a axat pe bio-mimarea la nivel molecular a funcțiilor de împachetare și de vehiculare a acizilor nucleici, funcții specifice histonelor, prin intermediul unor entități (macro)moleculare din clasa bio-nano-conjugatelor, generate pe calea sintezei chimice atent proiectate și sever controlate, pentru a li se asigura o funcționalitate strictă și reproductibilă în mediul biologic. Reacțiile de conjugare sunt instrumente moderne, esențiale pentru modificarea, îmbunătățirea și controlul proprietăților fizico-chimice ale speciilor (macro)moleculare de interes biochimic.

Esențialmente, entitățile dezvoltate în cadrul proiectului sunt structuri (macro)moleculare cu încărcare cationică în condițiile mediului fiziologic ori patologic, cu structură, compoziție și spațialitate bine definite, capabile să funcționeze drept parteneri de complexare reversibilă și de transportori ai acizilor nucleici. În urma interacțiunii ionice între respectivele entități și acizii nucleici rezultă așa-numiții poliplecși, iar prin „colaborarea” mai multor „transportori”, complexarea generează „cargocomplecși” cu funcționalitate similară nucleozomului. Aceștia împachetează, protejează, transportă și eliberează acizii nucleici, acționând ca veritabile „unelte” destinate protocoalelor specifice ingineriei genice și genetice.

Pentru a livra segmente de ADN intacte, poliplecșii trebuie să fie în măsură să străbată nealterați cinci bariere, din afara și din interiorul celulelor țintă, și anume: (i) „capcanele” biochimice ale mediului tisular / unoral / extracelular, (ii) membrana celulară, (iii) periferia și interiorul sistemului endocitotic și lizozomal, (iv) membrana nucleului și (v) mediul aglomerat al cromatinei (Schema 1). Mai mult, ei trebuie să elibereze ADN-ul transportat în interiorul nucleului celulei, ori cel puțin în compartimente non-agresive enzimatic din volumul citosolului.



Schema 1. Cerințe impuse vectorilor ce transportă și eliberează gene.

O1.1. Vectori genetici non-virali obținuți prin „chimie dinamică constituțională”

Conform ideilor lui J.M. Lehn, laureat al premiului Nobel în 1987, idei rezumate în cartea “Constitutional Dynamic Chemistry” (Topics Curr. Chem, 322, Ed. M. Barboiu, 2012, p1-32), *chimia dinamică constituțională* reprezintă puntea între *chimia supramoleculară* și *chimia adaptivă*, abordând nivelurile moleculare și supramoleculare ale sintezei dinamice a unor entități cu structuri complexe și funcționalitate posibil de proiectat. În această paradigmă chimică, entitățile (macro)moleculare se formează, se destructurează și se (re)organizează continuu, dinamic și reversibil, pornind de la unimeri („blocuri” sau ”piese” de construcție) capabili să formeze legături controlat labile, dar suficient de ferme pentru a le oferi o existență spațio-temporală sesizabilă.

Studii complexe, conduse la granița dintre sinteza chimică, știința biomaterialelor, eliberarea controlată și terapia genică, au identificat o serie de parametri definitorii pentru proiectarea vectorilor non-virali, capabili să livreze „material” biologic în celule vii.

Data fiind larga varietate a componentelor genic- și genetic-active, proiectarea rațională a structurilor chimice dinamice este supusă unor limitări în ceea ce privește numărul (finit) de componente, poziționarea relativă a acestora, amplasarea grupărilor funcționale în poziții bine precizate pe scheletul molecular al unimerilor. Abordarea dinamică a generării de entități funcționale este susținută de bibliotecile de compuși cu rol de unimer (biblioteci moleculare), ori de subansamble structurale generice (biblioteci supramoleculare). Utilizând astfel de biblioteci se poate genera o largă varietate de entități dinamice, cu funcții stabile ori variabile în timp, inclusiv din clasa transportorilor de acizi nucleici și specii farmacologic active.

Având în vedere aspectele mai sus menționate, dr. M. Barboiu a propus utilizarea strategiei dinamice constitutionale (Dynamic Constitutional Strategy; DCS) pentru obținerea unei biblioteci de compusi (Dynamic Combinatorial Framework; DCF) destinați recunoașterii ADN-ului. Elementele de asamblare utilizează chimia reversibilă amino-carbonil / imina și au la bază 1,3,5-benzentrialdehida, poli-(etilenglicol)-bis(3-amino-propil) (PEG, Mn 1,5 kDa), și reactivul Girard T, N,N-dimetil-etilenamina, sau clorhidratul de aminoguanidina (Figura 1).^{1,2}

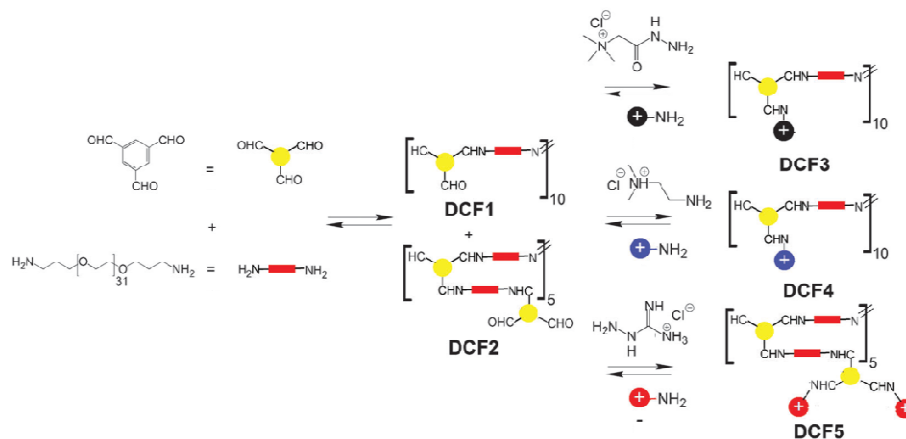


Figura 1. Calea generică de sinteză a compuşilor bibliotecii DCF, cu formarea compuşului DCF1:DCF2, 1:1, mol : mol. Reacţia ulterioară cu compuşii cu terminaţie cationică generează reţelele DCF3 - DCF5.

Studiul nostru a arătat că asocierea prin complexare cu ADN-ul este favorizată de compactitatea reticulării a reţelei DCF5, în timp ce reţelele liniare DCF3 și DCF4 nu sunt apte a complexa. Această constatare elucidează preferinţa ADN-ului de a complexa cu sisteme tridimensional-încolăcite, în defavoare celor liniare, similar mecanismului de împachetare a ADN-ului de către agregatul molecular al histonelor. Una dintre cerinţele esenţiale pentru o transfecţie de succes este capacitatea vectorilor / poliplexşilor de a evita sistemul imunitar și a fi internalizaţi în endozom. Poliplexul trebuie să fie apoi eliberat din endozom înainte de degradarea sa ca urmare a transformării endozomului în lizozom. Prin urmare, vectorii trebuie proiectaţi astfel încât să conţină grupări chimice care să faciliteze evadarea din endozom, sau componente moleculare degradabile în acesta, pentru a facilita largarea acidului nucleic din cargo-complexul administrat. În acest context, polietilenimina (PEI) și derivaţii săi sunt printre cele mai studiate macromolecule în vederea transportului și eliberării de gene. Este cunoscută capacitatea acestor macromolecule de a crește eficacitatea transfectării, TÂT *in vitro*, cât și *in vivo*. Raportul teoretic al grupărilor amino primare, secundare și terţiare în PEI ramificată (branched PEI; bPEI) a fost calculat ca fiind de 1: 2: 1, existând o relație directă între pH-ul mediului și densitatea încărcării pozitive a PEI. În acest context, am efectuat studii pentru a modela și optimiza procesul de complexare, în funcție de pH-ul soluției și de raportul bPEI/oligonucleotida.³ Pentru a stabili mecanismul de formare a poliplexşilor, a fost efectuată o simulare de dinamică moleculară la scară atomică. Pornind de la o separare inițială între macromolecule de circa 40 Å, dsADN și bPEI se apropie rapid și formează un complex stabil după 12 ns (Figura 2). Lucrând în condițiile optime stabilite *in silico*, s-a obținut experimental o valoare maximă a eficienței de împachetare de 99,96%.

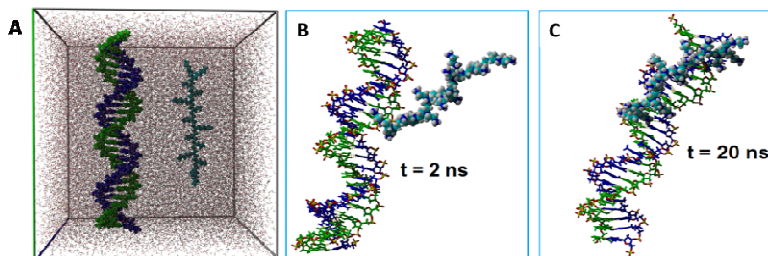


Figura 2. Simularea interacțiunii dintre macromoleculele de dsADN și bPEI într-o celulă de simulare (având molecule de apă drept solvent): (A) structura de echilibru inițială; (B) și (C) imagini ce prezintă evoluția complexării dsADN cu bPEI și formarea poliplexului, la pH 5,8 și timpii de simulare de 2 ns (B) și respectiv 20 ns (C) (moleculele de apă au fost omise).

Utilizarea PEI pentru livrarea de gene *in vivo* și *in vitro* este limitată însă din cauza stabilității sale coloidale scăzute și a citotoxicității mari. Pentru a crește stabilitatea și a îmbunătăți biocompatibilitatea poliplecșilor ce conțin PEI, aceștia pot include polietilenglicol (PEG), dar acesta ecranează sarcinile pozitive ale PEI, fapt ce diminuează eficiența transfecției.

Într-un al doilea studiu s-au utilizat drept unimeri 1,3,5-benzotrientaldehida, poli-(etilen glicol)-bis(3-aminopropilul) (PEG; Mn 1,4kDa) și bPEI (800 Da) (Figura 3A).⁴ Poliplecșii formați cu structuri din biblioteca DCF s-au dovedit stabili și capabili de a funcționa ca nanovectori pentru transportul de gene. Funcție de tipul și cantitatea de ADN complexat, dar și de raportul molar dintre bPEI și PEG, poliplecșii dobândesc dimensiuni cuprinse între 40 și 125 nm (Figura 3A). Toți vectorii testați au prezentat capacitate de transfecție a ADN-ului în celule HeLa, precum și citotoxicitate redusă. Chiar și la un raport N/P = 200 viabilitatea celulară post-transfecție este de peste 90% față de celulele de control, netratate (Figura 3B, C). Așadar, prezența componentei PEG și a unei cantități moderate de bPEI în DCF sunt determinante pentru generarea de poliplecși biocompatibili, eficienți în transfecție.

Simplitatea strategiei de sinteză o recomandă și pentru auto-generarea de structuri DCF sinergetice cu doi parteneri, respectiv ADN și membrana celulară. Această strategie permite sistemelor de transport să auto-selecteze și să auto-genereze vehiculul cel mai adecvat în condițiile concrete ale transfecției. În baza acestei idei a fost propusă o a doua generație de structuri DCF, care conțin, pe lângă miez și ramificații purtătoare de sarcini pozitive, unități hidrofobe suplimentare, pentru a facilita auto-asamblarea și adaptabilitatea DCF-urilor. Strategia propusă are la bază un screening al DCF-urilor construite din PEG, squalenă și bPEI pe centrele de bază trialdehidice (Figura 4A).⁵ Aceste componente generează DCF-uri polivalente cu dimensiuni variabile, ce sunt capabile să interacționeze cu ADN-ul la diferite rapoarte N/P, formând poliplecși (Figura 4B). Prezența squalenei în DCF-ul nou preparat a sporit atât eficacitatea transfecției, cât și biocompatibilitatea cargo-complexșilor.

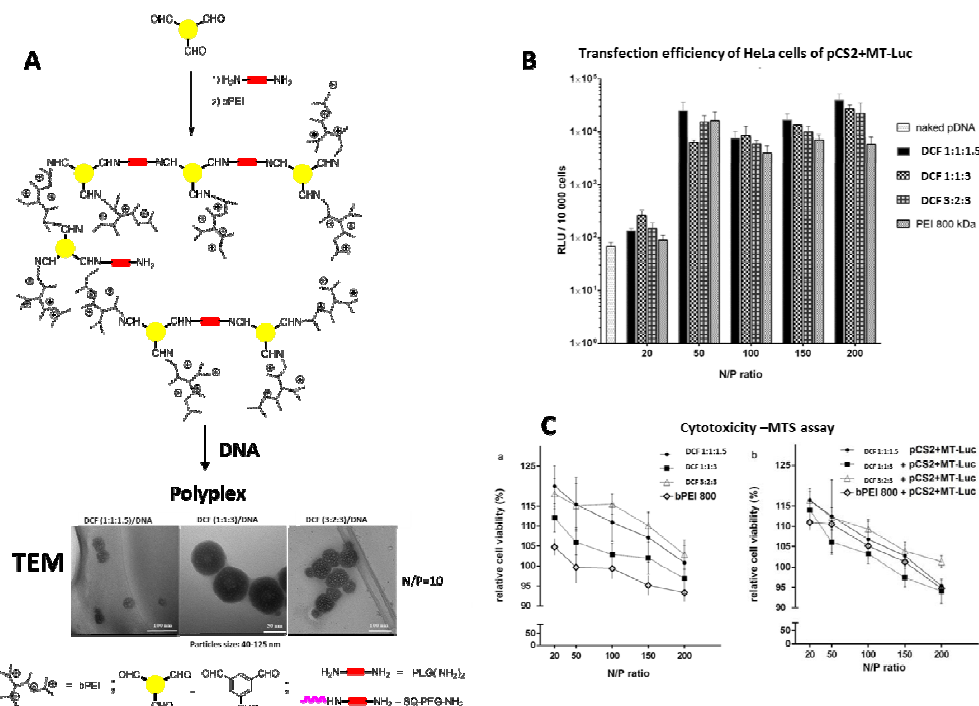


Figura 3. (A) Reprezentarea schematică a sintezei DCF-urilor. (B) Eficiența transfecției la diferite rapoarte N/P, măsurată după 48 ore. (C) Profilul citotoxicității DCFurilor (a) și respectiv a poliplecșilor DCF/PEI/pCS2+MT-Luc (b), evidențiat prin teste MTS.

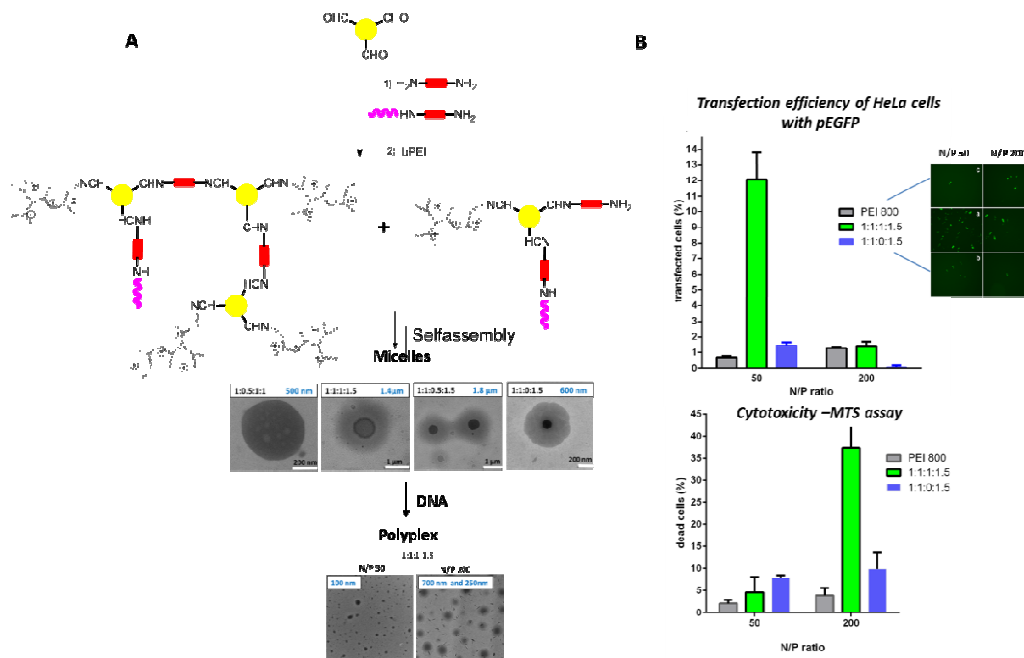


Figura 4. (A) Reprezentarea schematică a sintezei DCF-urilor. (B) Eficiența transfecției asupra celulelor HeLa, determinată prin citometrie în flux. (C) Profilul citotoxicității poliplecșilor, evidențiat prin teste MTS.

Vectorii dinamici testați prezintă o bună transfecție asupra celulelor HeLa (la rapoarte N/P de 50 și 200) și au o citotoxicitate redusă. Dimensiunea poliplecșilor generați se modifică funcție de raportul de complexare între ADN-ul transfectat și vector. Aceste constatări oferă

perspective în dezvoltarea de biblioteci de unimeri auto-asamblabili adaptivi multivalenți, că grupări funcționale specifice atât complexării cu ADN, cât și penetrării membranei celulare, cu un ecou pozitiv în îmbunătățirea randamentelor transfecției.

Sintetizând rezultatele noastre legate de proiectarea și prepararea vectorilor non-virali destinați terapiei genice, avem convingerea că strategiile care implică generarea de vectori cu miez flexibil, alături de abordarea dinamică constituțională, prezintă un important potențial în creșterea eficienței și selectivității vectorilor genici non-virali. Aceste direcții de studiu vor fi continuate, pentru a oferi alternative cu costuri rentabile și cu o mai bună reproductibilitate comparativ cu variantele existente deja. Sistemele generate conferă certe avantaje, prin capacitatea lor de adaptare și de evoluție sub influențe externe de factură biochimică (modificări ale parametrilor compoziționali ai soluțiilor) sau fizică (variații ale mărimilor termodinamice) și contribuie la facilitarea controlului spațio-temporal al transfecției celulelor.

O altă direcție investigată în cadrul proiectului a fost aceea a obținerii de vectori non-virali cu formă geometrică asemănătoare dendrimerilor, dar a căror sinteză să se efectueze într-o manieră mai simplă și cu randamente de reacție mari. Pentru aceasta au fost proiectate sisteme hidrofob-hidrofile ale căror blocuri structurale au fost conectate prin intermediul legăturilor imină (Figura 5). Drept blocuri structurale hidrofobe au fost utilizați oligomeri pe bază de poli-izopropilenoxid și siloxan, iar drept blocuri structurale hidrofile polietilenimina, spermina și polietilenoxidul. Analizele morfologice au confirmat spațialitatea, iar compuşii au dovedit eficiență de transfecție asemănătoare cu a martorilor comerciali (Figura 5).⁶

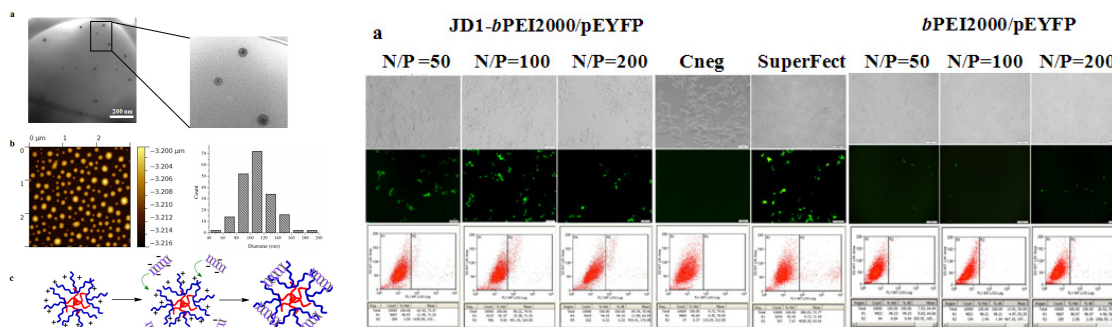


Figura 5. Imagini TEM și AFM ale vectorilor non-virali cu spațialitate de dendrimer și eficiența lor de transfecție, la diverse rapoarte N/P de complexare cu ADN.

O1.2. Vectori non-virali cu structuri polirotaxanice și cu mare capacitate de transfecție

Din momentul în care J.M. Lehn a definit principiile chimiei supramoleculare, aceasta a devenit o temă centrală în aplicații ale chimiei și biologiei. Chimia supramoleculară este o "chimie dinamică", datorită labilității interacțiunilor responsabile de conectarea moleculelor prin forțe intermoleculare necovalente, care permite generarea de ansambluri moleculare cu proprietăți mult diferite de cele ale compuşilor de start.

Terapia prin transfecție constă în inserarea unei secvențe de ADN în genomul celulei gazdă, în vederea exprimării produsului codat de gena nou introdusă, sau pentru inhibarea

exprimării unei gene responsabile de afecțiunea ce se dorește a fi tratată. Mimând rolul histonelor în împachetarea ADN-ului, au fost dezvoltati vectori non-virali cationici.

Candidati notabili pentru terapia genică sunt și structurile supramoleculare de tip polirotaxanic, alcătuite din molecule de ciclodextrină înșirate de-a lungul unui polimer liniar, cu rol de ax. Polirotaxanii au drept forțe constitutive legăturile fizice (de hidrogen, interacțiile hidrofил/hidrofob, forțele van der Waals etc.) și prezintă proprietăți fascinante, date mai ales de compoziția și structura reproductibilă, dar și mobilitatea moleculelor de ciclodextrină în lungul lanțului polimeric central. De asemenea, prezența moleculelor de ciclodextrină permite obținerea de structuri funcționale în condițiile unei citotoxicități neglijabile.

În acest context, în cadrul proiectului a fost dezvoltat un vector non-viral de tip polirotaxanic, bazat pe β -ciclodextrină modificată cu dendroni de polietilenimină (PEI 2 kDa) și un „ax” polimeric de poli(etilen glicol) (PEG 1 kDa) (Figura 6).⁷

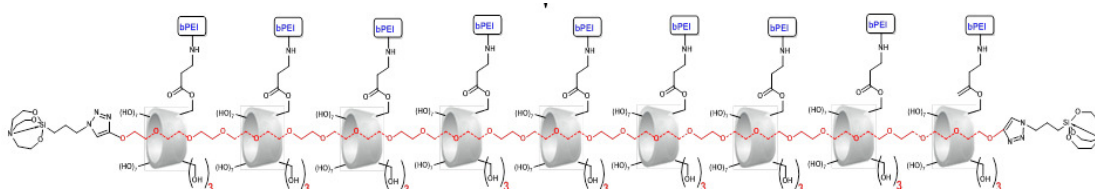


Figura 6. Structura polirotaxanilor dezvoltati ca vectori genici non-virali.

Structura polirotaxanului a fost construită inițial pornind de la datele experimentale, iar apoi a fost modelată prin metoda dinamicii moleculare, utilizând un mediu de simulare Maestro ce constă dintr-un spațiu paralelipipedic cu 49582 molecule de apă, 786 ioni de clor și 138 ioni de sodiu care asigură neutralitatea sistemului la o concentrație de 150 mM NaCl. Structura echilibrată obținută prin această metodă are o formă alungită, cu lungimea de circa 13,5 nm (Figura 28) și un diametru transversal de aproximativ 6,7 nm (Figura 7).

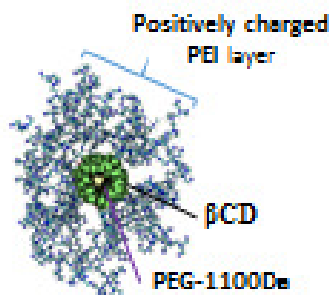


Figura 7. Structura polirotaxanului sintetizat, modelată IN SILICO.

Analiza hărților bidimensionale ale densității diferitelor componente ale sistemului reflectă structura internă a agregatului: ionii de Cl^- sunt internalizați ca urmare a prezenței dendronilor de PEI, în timp ce ionii de Na^+ sunt expulzați către exterior.

Diametrul transversal al polirotaxanului, de 6,7 nm, este foarte apropiat de dimensiunea agregatelor histonice (Figura 8) ale nucleozomilor (6.5 nm).

Rezultatele simulării prin dinamică moleculară a interacției dintre ADN-ul dublu catenar și PEI relevă menținerea nemodificată a celor două concavități ale acidului nucleic (Figura 9). Acest fapt a fost confirmat de analiza prin dicroism circular (Figura 9).

Citotoxicitatea conjugatelor sintetizate și a poliplecșilor transportori de ADN plasmidic a fost investigată pe culturi celulare HEK 293T, utilizând testul MTT. Viabilitatea celulară, atât în cazul ROT-PEI, cât și în cel al poliplecșilor cu pCS2+MT-Luc, a fost de peste 95% (Figura 10).

Eficiența în transfecție a poliplecșilor cu polirotaxani a fost determinată prin două tehnici complementare: microscopia de fluorescență (pentru evaluarea calitativă a abundenței celulelor transfectate, Figura 11) și respectiv cuantificarea abilității de transfecție a poliplecșilor (Figura 12). Pentru aceste evaluări vectorii testați au fost încărcati cu gena ce determină exprimarea luciferazei (pCS2+MT-Luc), care codifică o proteină fluorescentă verde (9eGFP). Celulele HeLa au fost transfectate cu poliplecși formați prin complexarea plasmidului pCS2+MT-Luc cu vectorul polirotaxanic.

Dupa cum se observă în Figurile 11 și 12, pentru toate rapoartele N/P testate poliplecșii ROT-PEI prezintă cea mai mare eficiență de transfecție.

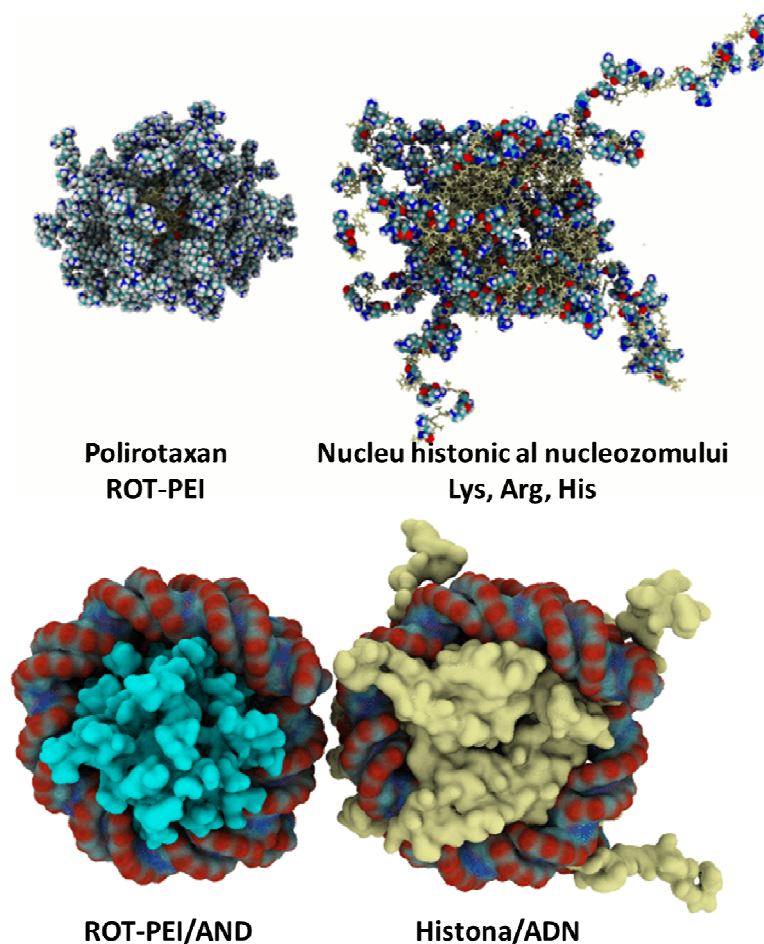


Figura 8. Reprezentarea comparativă a cu polirotaxanului și a cu agregatului histonic, și respectiv a poliprecșilor polirotaxan/ADN și histonă/ADN.

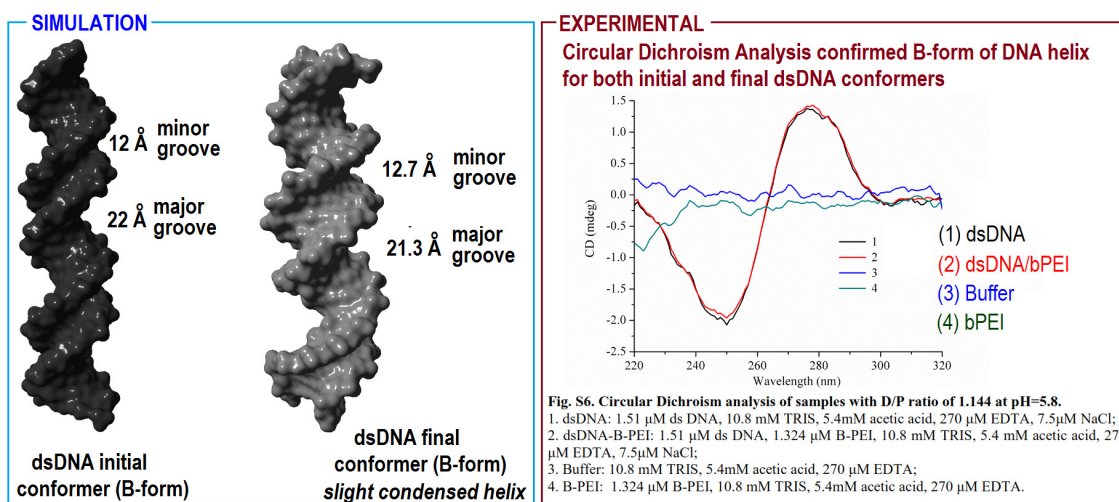


Figura 9. Rezultatele simulării prin dinamică moleculară a ADN_{dc} (stanga) și rezultate experimentale obținute prin dicroism circular înainte și după interacția ADN_{dc} cu PEI (dreapta).

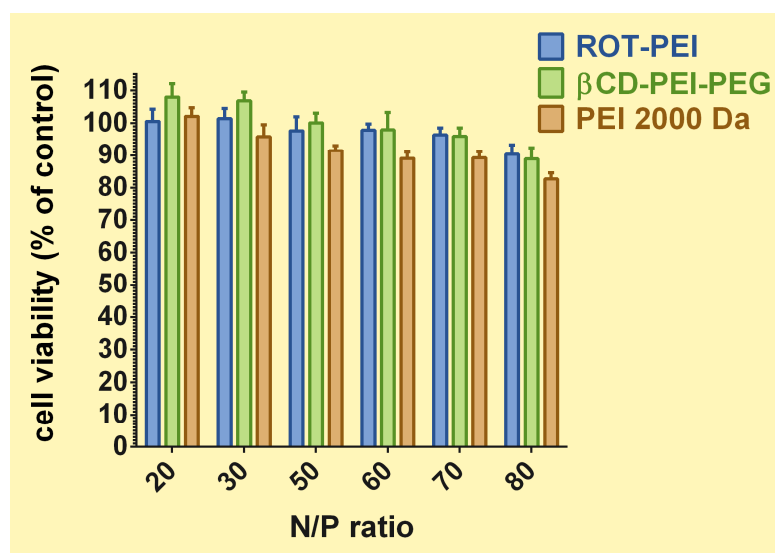


Figura 10. Testarea citocompatibilității vectorilor polirotaxanici.

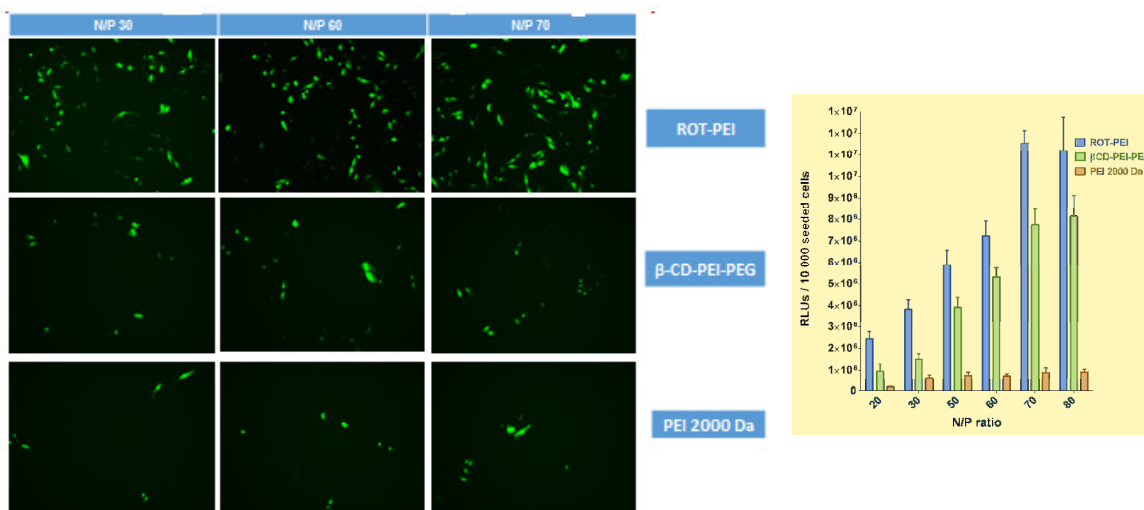


Figura 11. Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor HeLa transfectate cu gena reporter eGFP utilizând poliplexul vector non-viral ROT-PEI/pCS2+MT-Luc și conjugatul β-CD-PEI-PEG).

Figura 12. Cuantificarea abilității de transfecție a poliplexșilor transportori de genă Luciferaza (rezultate raportate ca unități de lumina relativă RLU per 10⁴ celule transfectate).

O1.3. Vectori non-virali cu legături covalente, cu bune eficiențe în transfecție

Vectori non-virali cu structura policationică, pe bază de PEI ramificată

Au fost sintetizati o serie de vectori pentru transfecție prin cuplarea covalentă a unui număr de catene de PEI ramificată (Mw 2 kDa) cu molecule centrale având grade diferite de hidrofobicitate (Figura 13). În compușii conjugați obținuți lanțurile policationice de PEI se dispun la exterior, în jurul moleculei cu rol de miez hidrofob, adoptând o structură de tip dendrimer. Ca și molecule centrale au fost utilizate: fulerena C60, 2,4,6,8-tetrametil-2,4,6,8-tetrakis ciclotetrasiloxan (cD4H) și β-ciclodextrina (β-CD). De asemenea, s-a studiat și influența PEG-ilării asupra eficacității transfecției.

Compușii sintetizați sunt următorii:

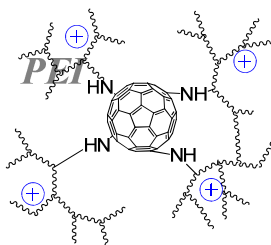
- 1) **C60-PEI.** Sinteza s-a realizat prin aminarea directă a moleculei de C60, printr-un mecanism de adiție nucleofilă. Reacția a avut loc în cloroform, în atmosferă de azot, la temperatura ambiantă și în prezența luminii, timp de 5 zile. Raportul molar C60 : PEI a fost de 1 : 10, iar după îndepărtarea solventului și purificare prin dializă raportul dintre cele două componente în produsul final s-a determinat a fi 1 : 3,5 (din date TGA și XPS). Progresul reacției s-a urmărit prin spectroscopie UV-Vis, supraveghind dispariția picului de la 330 nm. Legarea covalentă a PEI de C60 a fost dovedită prin spectroscopie ¹³C-RMN și FTIR, ambele evidențiind modificări ale spectrelor aferente catenelor de PEI, atribuite în special conversiei aminelor primare în amine secundare.⁸
- 2) **C60-PEG-PEI.** Sinteza a decurs în două etape. Mai întâi s-a realizat conjugarea mPEG-NH₂·HCl cu fulerena, apoi grefarea PEI, ambele prin reacții de hidroaminare. Reacția s-a desfășurat într-un amestec 3 : 1 toluen : cloroform, în aceleași condiții ca și

în cazul sintezei conjugatului C60-PEI. Raportul molar dintre reactanții C60 : PEG : PEI a fost de 1 : 2 : 10. Fiecare etapa a durat câte 5 zile, după care s-a îndepărtat solventul și s-a efectuat o purificare prin dializă, urmată de liofilizare.

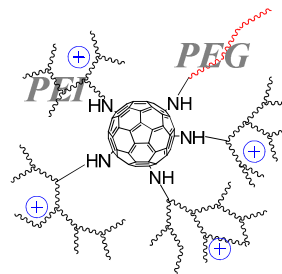
- 3) **cD₄^H-AGE-PEI.** În prima etapă s-a sintetizat intermediarul cD₄^H-AGE cu 4 grupări oxirane reactive, prin reacția de hidrosilare dintre cD₄^H și alilglicidil eter (AGE), în toluen, în atmosferă de azot, în prezența catalizatorului Karstedt's, la 40 °C, timp de 72 de ore. Produsul final s-a obținut prin reacția dintre cD₄^H-AGE și PEI, desfașurată la 80 °C, în DMSO, în prezența alcoolului isopropilic, timp de 40 de ore. Produsul de reacție s-a purificat prin dializă, urmată de liofilizare.⁹
- 4) **β-CD-PEG-PEI.** β-CD a fost supusă inițial reacției cu clorura de acrilil, în DMF anhidru și atmosferă inertă, pe baie de gheață, timp de 2 h, după care s-a continuat la temperatura ambiantă încă 5 zile. Pentru a asigura un grad de substituție maximal, raportul molar β-CD : clorură de acrilil s-a stabilit la 1 : 7 (cu un exces de 1,5%). Produsul acrilat, recuperat prin precipitare în soluție tampon (pH 7) și uscare sub vid, a fost supus în continuare funcționalizării cu mPEG-NH₂·HCl și PEI prin intermediul unor reacții de adiție Michael a aminelor la dubbele legături din gruparea acrilil. Reacția a decurs în metanol, la 65 °C, timp de 72h. Purificarea s-a efectuat prin dializă în apă ultrapură, urmată de liofilizare. Structura a fost dovedită prin spectroscopie ¹H-RMN, ¹³C-RMN și FTIR.⁷

Modelarea moleculară a fost realizată prin calcule de orbitali moleculari, prin metoda semi-empirică de calcul cuantic, PM3 în scopul optimizării geometriei conjugatelor. În Figura 14a este ilustrată conformația vectorului cD₄H-AGE-PEI, care evidențiază o structură asimetrică, cu tendința de a expune separat domeniul cu sarcini pozitive (policationul) față de regiunea neutră electric (siloxanul împreună cu secvența de legătură AGE), aparținând grupului de simetrie C₁. Conform calculelor la nivel PM3 s-a obținut un moment de dipol apreciabil, de 8,3 Debyes. Figura 14b reprezintă modelarea moleculară a vectorului β-CD-PEG-PEI ce include catene oligomere de PEI și PEG, cu o masă moleculară de 4,68 kDa. Structura a fost optimizată prin minimizarea energiei potențiale utilizând mediul YASARA.

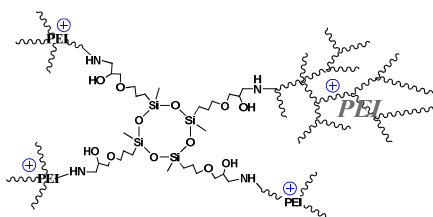
C60-PEI



C60-PEG-PEI



cD₄^H-AGE-PEI



β-CD-PEI-PEG

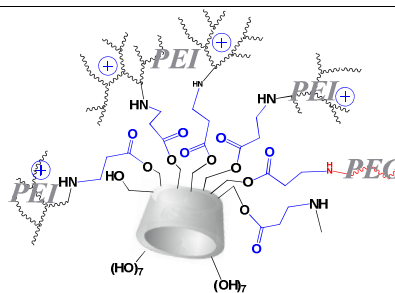


Figura. 13. Reprezentarea comparativă a structurilor chimice ale vectorilor C60-PEI, C60-PEG-PEI, cD_4^H -AGE-PEI și β -CD-PEI-PEG.

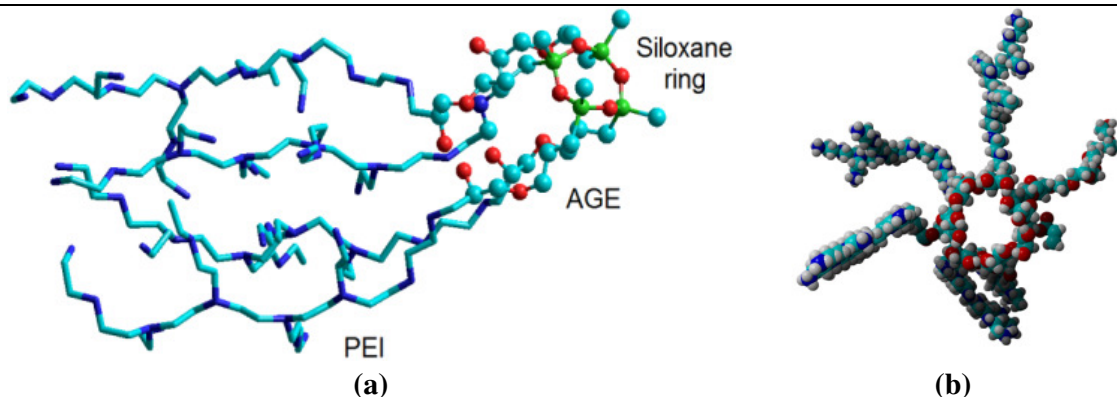


Figura 14. Structura moleculară a conjugatelor cD_4^H -AGE-PEI (a) și β -CD-PEG-PEI (b).

Vectorii obținuți au fost supuși, *in vitro*, testelor de **eficiență a transfecției** pe culturi de celule HEK 293T. Celulele au fost puse în contact cu soluții de poliplecși obținute prin complexarea moleculelor policationice cu ADN plasmidic (pEYFP). Celulele transfectate exprimă proteina fluorescentă codificată de plasmid. Rezultatele transfecției au fost evaluate atât cantitativ, prin microscopie de fluorescență (Figura 15), cât și cantitativ, prin citometrie în flux. Pentru fiecare dintre cei patru vectori s-a determinat un raport N/P la care transfecția este maximă, exprimată în procente de celule transfectate, raport care variază între 6% pentru C60-PEG-PEI și 38% pentru cD_4^H -AGE-PEI.

Agentul de transfecție	Imagini de microscopie de fluorescență	Randamentul transfecției
------------------------	--	--------------------------

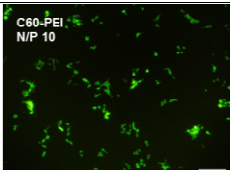
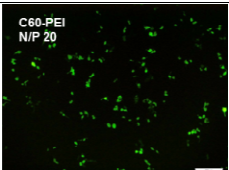
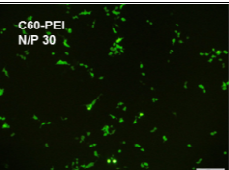
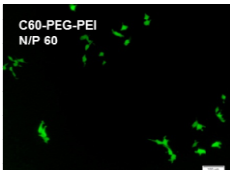
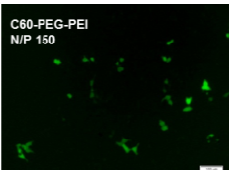
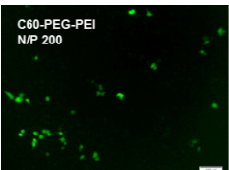
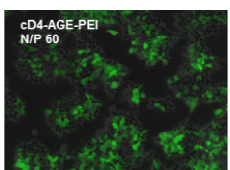
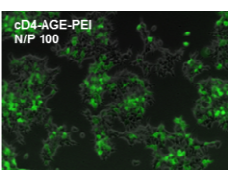
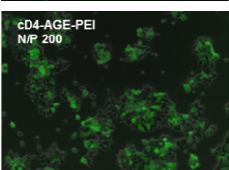
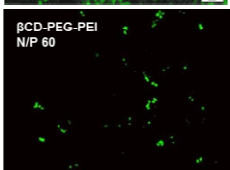
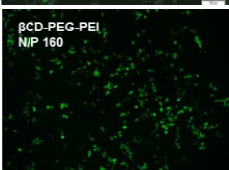
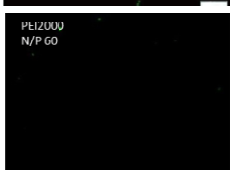
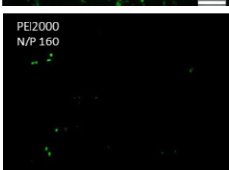
C60-PEI				25% (N/P 30)
C60-PEG-PEI				6% (N/P 200)
cD₄^H-AGE-PEI				38% (N/P 200)
β-CD-PEI-PEG				14% (N/P 160)
PEI (2 kDa)				~4% (N/P 160)

Figura 15. Rezultatele transfectării celulelor HEK 293T cu complecși C60-PEI/pEYFP, C60-PEI-PEG/pEYFP, cD₄^H-AGE-PEI/pEYFP și β-CD-PEI-PEG/pEYFP, comparativ cu PEI (2 kDa). Coloana din dreapta indică procentul maxim de celule transfectate, obținut prin citometrie în flux și respectiv raportul N/P aferent.

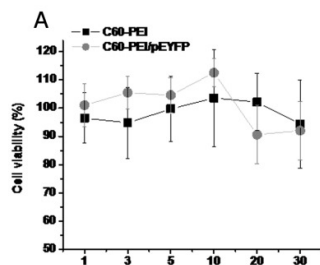
Testele de **citotoxicitate**, efectuate prin metoda MTT, indica viabilitatea celulelor HEK 293T dupa incubarea cu mediu de cultura continand solutiile de poliplexi, preparate la aceleasi rapoarte N/P ca si in cazul experimentelor de eficacitate in transfectie. Conform rezultatelor de viabilitate celulara (Figura 16), se poate observa ca toti vectorii ADN au manifestat o inalta citocompatibilitate. Procentul de celule viabile obtinut pentru raportul N/P maxim al fiecarui vector a fost de aproximativ 90% la C60-PEI si cD₄^H-AGE-PEI, iar pentru β-CD-PEI-PEG de 160-180%.

Concluzii

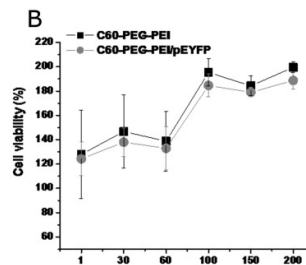
Dintre vectorii sintetizați, cel mai eficient în transfecție s-a dovedit a fi cD₄^H-AGE-PEI, care, la un raport N/P de 200, a asigurat randamente de 38%, estimate prin exprimarea genei transfectate. Așa cum rezultă și din modelarea moleculara, vectorul adoptă o conformație asimetrică, în care domeniul hidrofoab se dispune separat de secvența policationică, facilitand astfel penetrarea membranelor celulare. Compușii PEG-ilați C60-PEG-PEI și β-CD-PEI-PEG asigură eficacități de transfecție mai reduse, de numai 6% respectiv 14% celule transfectate, în special deoarece lanțurile de PEG acoperă suprafața particulelor, împiedicând împachetarea plasmidului. Acești vectori au însă avantajul unei citotoxicități mai reduse. Creșterea raportului N/P determină o

proliferare celulară semnificativă, astfel încât la valori peste 100 numărul de celule transfectate practic se dublează. Utilizând vectorul C60-PEI s-a obținut o eficacitate de transfecție de 25% la rapoarte N/P mici, de 20 – 30, pentru care viabilitatea celulară se menține ridicată (la circa 90%).

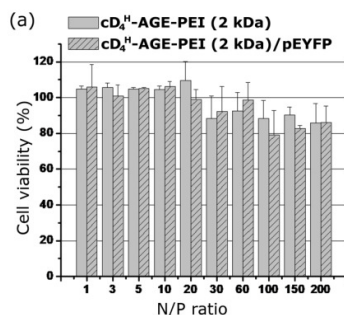
C60-PEI



C60-PEG-PEI



cD₄^H-AGE-PEI



β-CD-PEI-PEG

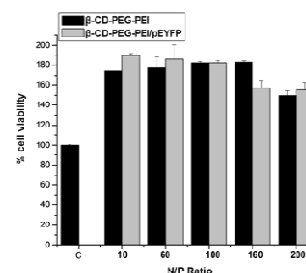


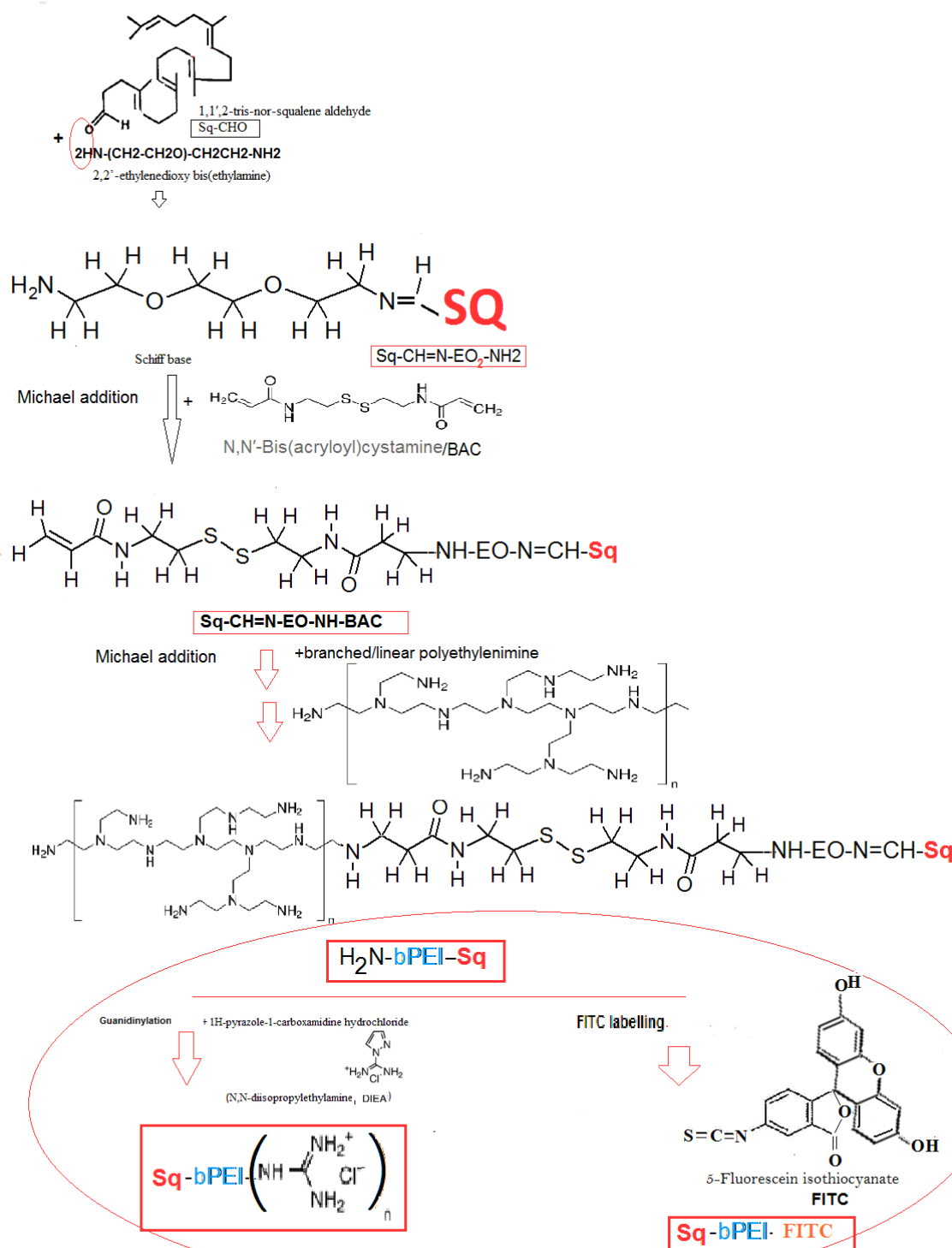
Figura 16. Rezultatele testelor de viabilitate a celulelor HEK 293 T în prezența C60-PEI, C60-PEI-PEG, cD₄^H-AGE-PEI, β-CD-PEI-PEG și a poliplexilor acestora cu pEYFP, pentru diferite rapoarte N/P.

O1.4. Proiectarea, sinteza, caracterizarea și testarea *in vitro* a unui vector genic cu squalenă și bPEI (Sq-bPEI), obținut prin tehnici combinate de sinteză

Strategiile de îmbunătățire a transfecției utilizând vectori non-virali vizează complexarea acizilor nucleici cu policationi ori cu lipide cationice. Lipozomii cationici, lipidele cationice și emulsiile cationice sunt printre cele mai utilizate. Caracteristicile care recomandă includerea lipidelor în acești purtători sunt:

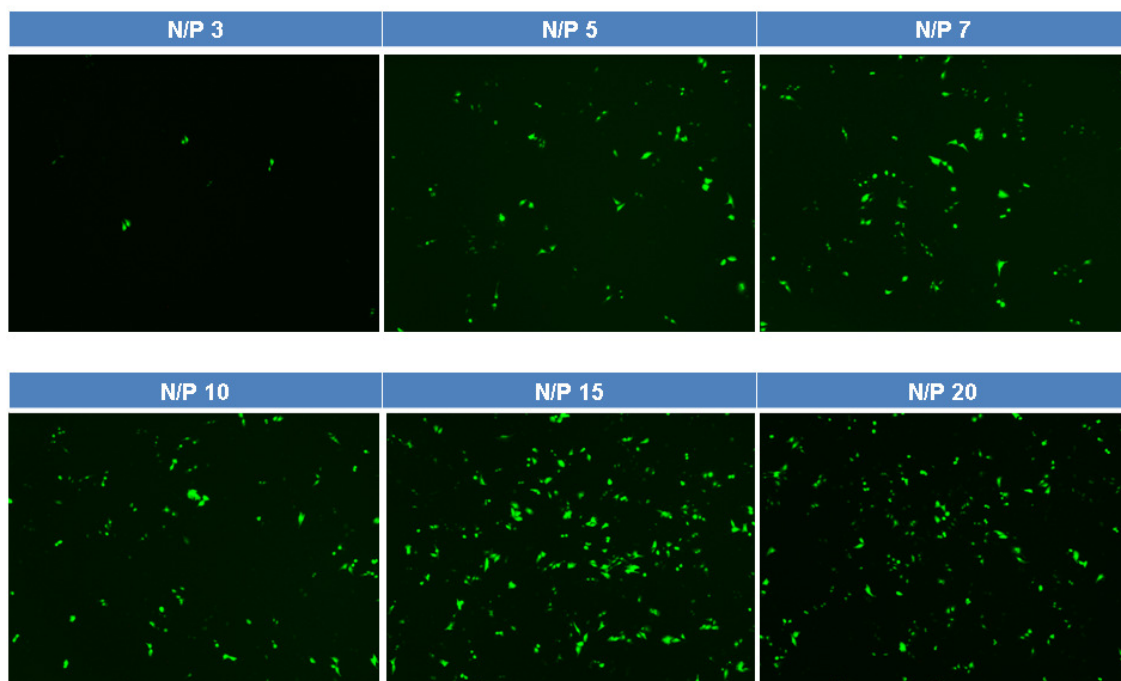
- abilitatea de auto-asamblare în mediu apos, prin organizarea supramoleculară și/sau autoansamblarea agregatelor lipidice;
- protejarea ADN-ului față de atacul enzimatic, în torentul sanguin;
- capacitatea de a interacționa cu membrana celulară încărcată negativ, pentru a facilita internalizarea celulară;
- citotoxicitate redusă în aplicațiile ce utilizează doze medii;
- abilitatea de a condensa ADN-ul sub formă de particule coloidale nanometrice, capabile să penetreze celulele mamiferelor, *in vitro*;
- imunogenicitate redusă.

Lipidele aduc și o serie de dezavantaje, cum ar fi: toxicitatea la concentrații mari, prepararea dificilă și eficiența scăzută de transfectare.



Schema 2. Strategia de sinteză a unui purtător bazat pe Sq-bPEI.

Transfection of Hela cells with reporter gene eGFP
Sq-bPEI-G



Transfection of Hela cells with reporter gene eGFP
Sq-bPEI-NH₂

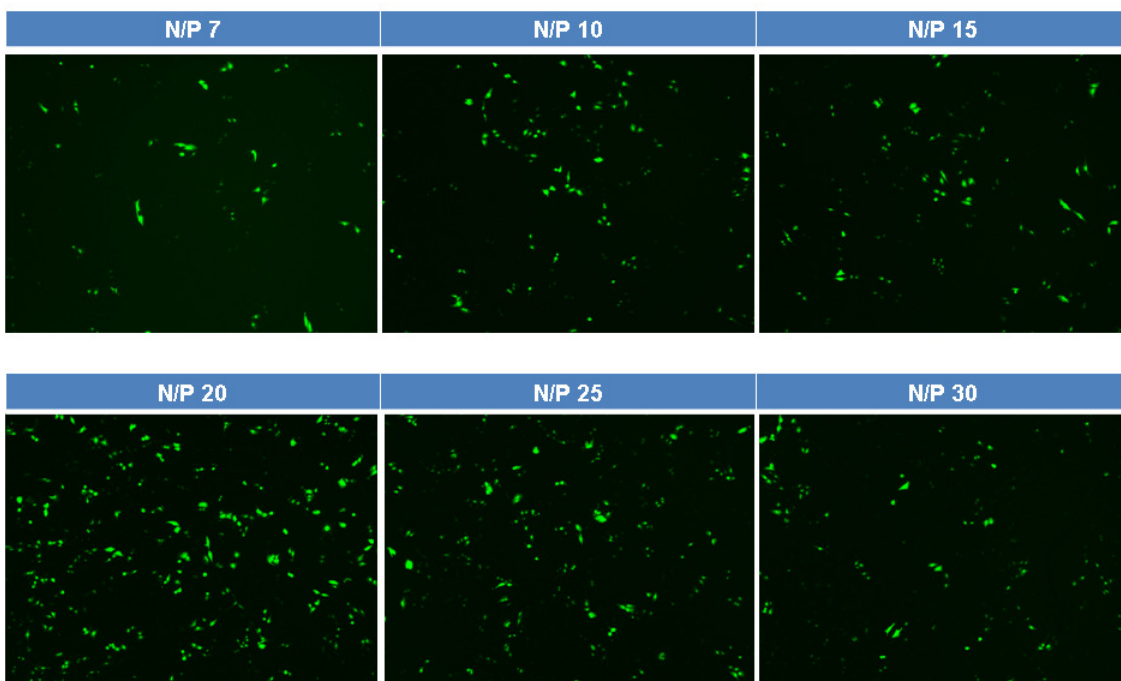


Figura 17. Investigarea eficacității de transfectare a celulelor HeLa cu complexe bazate pe Sq-bPEI-G și Sq-bPEI. Micrografii de microscopie de fluorescență la valori diferite ale raportului N/P. Transfectarea s-a realizat pentru gena eGFP ($t=48h$).

În studiul nostru a fost dezvoltat și caracterizat un compus amfifil bazat pe squalenă și bPEI (Sq-bPEI), cu potențiale aplicații în transfecție. Pentru a asigura învingerea barierelor ce apar în procesul de transfecție, prin proiectare, în structura conjugatului au fost introduse

grupări funcționale recomandate de literatura de specialitate. Sinteza s-a realizat în condiții blânde (temperatura camerei, solvenți uzuali, mediu de reacție apos), conform schemei 2.¹⁰ Obținerea compușilor intermediari și finali a fost confirmată prin spectroscopie ¹H-RMN, ¹³C-RMN, FT-IR.

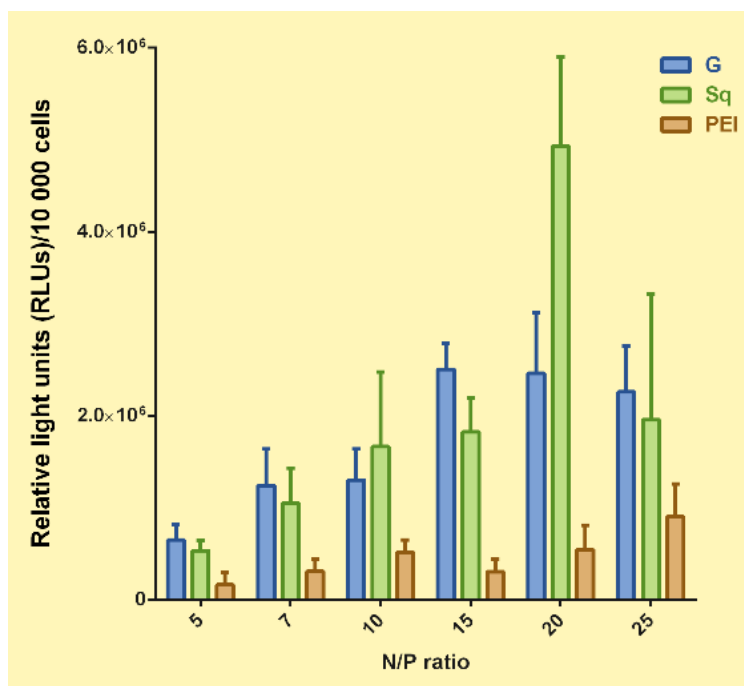


Figura 18. Reprezentare comparativă a exprimării genei Luciferaza pentru bPEI și complexii cu Sq-bPEI și Sq-bPEI-G.

Transfectarea celulelor HeLa cu gena eGFP în prezența bPEI (1.8kDa) și a purtătorilor sintetizați (Sq-bPEI/5a și Sq-bPEI-G/5b) a decurs optim la un raport N/P de 15 pentru 5b și de 20 pentru 5a (Figurile 17 și 18). La un raport N/P de 15, Sq-bPEI-G asigură o eficiență de 6.2 ori mai mare, iar la raportul 20 de 8.33 ori mai mare comparativ cu bPEI administrată individual.

S-a constatat așadar că agregatele lipidice asigură o creștere a acumulării locale a bPEI, efect ce duce la creșterea eficienței transfecției. Așa cum era de așteptat încă din etapa de proiectare, guanidilarea vectorului favorizează complexarea cu ADN-ul și mărește abilitatea complexului de a penetra membranele celulare.

O1.5. Nanoparticule magnetice dispersate prin acțiunea unor surfactanți siloxanici, cu potențiale aplicații în terapia genică

În cadrul proiectului s-au realizat și o serie de studii preliminare privind includerea polipeptidelor magnetice în vezicule formate de către agenți activi de suprafață (de tip polisiloxan), pentru a spori stabilitatea acestora și pentru a îmbunătăți capacitatea de control și livrare.^{11-13,23,24} Au fost utilizate nanoparticule de magnetită dispersate în soluții de surfactant polisiloxanic. În general, sinteza propriu-zisă duce la particule de tip SPION, cu înveliș organic, hidrofob, care pot fi dispersate doar în solvenți nepolari ori cu polaritate

moderată. Pentru aplicații medicale este necesar un înveliș hidrofili, pentru asigurarea dispersiei în apă. De asemenea, este necesară asigurarea biocompatibilității nanoparticulelor, ceea ce presupune folosirea unor polimeri biocompatibili sau naturali, ori apelul la materiale anorganice, precum silica sau aurul. Pentru dispersarea în apă a unor nanoparticule superparamagnetice de Fe_3O_4 (magnetita) și de FeCr_2O_4 (cromita) au fost utilizați surfactanți ce au în structură unități siloxanice. Biocompatibilitatea nanoparticulelor fost validată prin teste MTT. În Figura 19 se observă că viabilitatea celulară s-a menținut la peste 90% la concentrații mai mici decât 1 g/L (concentrația limită folosită în mod curent pentru încapsulare), dar rezultate satisfacatoare au fost obținute și la concentrații mai mari.

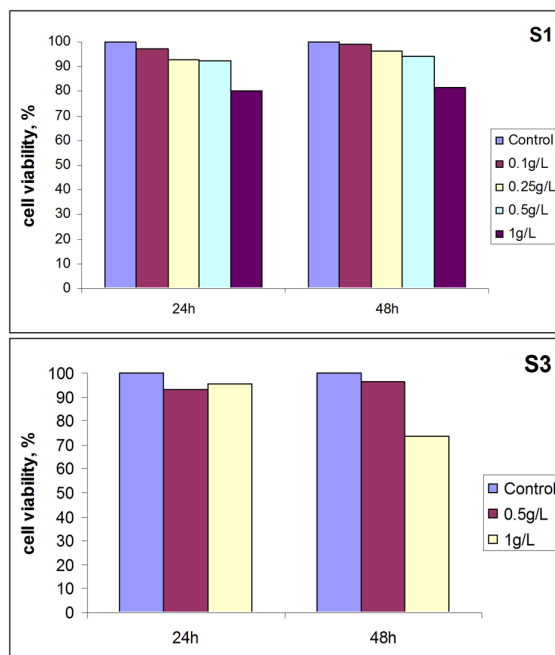


Figura 19. Viabilitatea celulară în prezența surfactanților siloxanici (test MTT).

Rezultatele studiului indică faptul că nistatina a fost încapsulată fizic în agregatele surfactantului, nefiind legată chimic. Mecanismul solubilizării a fost sugerat de observațiile TEM și implică inserarea moleculelor de nistatină în regiunea hidrofobă a veziculelor de surfactant. Studiul a demonstrat: (a) posibilitatea obținerii eficiente a nanoparticulelor pe bază de PDMS și a agregatelor de tip vezicular pe bază de surfactanți polisiloxanici, printr-un procedeu simplu, reproductibil; (b) abilitatea entităților anterior citate de a încărca sau de a include principii active, fără dezvoltarea de interacțiuni puternice, care să afecteze structura sau funcția terapeutică a acestora.

Datele preliminare dovedesc abilitatea compușilor siloxanici de a funcționa drept polipecși cu potențial rol în transfecția non-virală. Respectivii compuși au fost testați, drept componente ale unor sisteme de includere în matrice polimerice sau în scaffold-uri ternare ((atelo)colagen / dimetilsilandioli/hialuronat / poli(ϵ - caprolactonă)), ca atare, sau după asocierea cu nanoparticule de hidroxiapatită. S-au obținut micro-structuri sferice, cu interior poros cu AteCol situat în interiorul porilor sau în perete, prin combinarea metodelor de emulsionare clasică și a tehnicii LBL.

O1.6. Biosinteza exopolizaharidelor utile drept precursori pentru prepararea sistemelor utilizate în terapia genică

Bacteriile lactice sunt capabile să biosintetizeze extracelular biopolimeri cu diferite structuri chimice, în funcție de compoziția mediului de cultură utilizat. Astfel, s-a realizat un mediu nou de cultură, a cărui compoziție este capabilă să inducă biosinteza unor cantități ridicate de exopolizaharide (EPZ) (26,6 g exopolizaharide liofilizate/ L mediu de cultură). S-a utilizat o tulpină de bacterii lactice izolată din făina de porumb originară în Polonia, tulpină care a fost identificată prin secvențiere 16S ADN drept *Weissella confusa*. Biopolimerul extras și purificat a fost caracterizat prin FTIR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, 2D-RMN (HSQC), HPLC, GPC și TGA. Analizele HPLC demonstrează că în structura exopolizaharidului sunt prezente doar molecule de glucoză. De asemenea, prin analizele RMN și FTIR se confirmă structura de dextran cu 96,8 % legături α -(1→6) și 3,2 % legături α -(1→3). Prin analiza GPC a exopolizaharidului purificat se identifică două fracții cu masă moleculară mare ($3,3 \times 10^5$ și $1,6 \times 10^7$ g mol/L) și două fracții cu masă moleculară mică ($4,4 \times 10^2$ și $1,6 \times 10^2$ g mol/L). Analiza termogravimetrică evidențiază două trepte de degradare termică, cea mai importantă fiind la 288°C, cu o pierdere de masă de 65.9%. Luându-se în considerare cantitatea mare de EPZ obținută prin fermentare și compoziția naturală a mediului de cultură, considerăm că acest biopolimer se obține cu costuri mici, într-un timp scurt și poate avea aplicații medicale, farmaceutice și alimentare. EPZ obținut poate fi funcționalizat în scopul realizării unor noi clase de compuși utili în transfecție.¹⁴

De asemenea, au fost izolate și identificate 52 de tulpini de drojdii cultivate pe două medii de cultură numite mediu de drojdie peptonă-glucoză și mediu de cultură diacetil-acetaldehida, în scopul obținerii unor cantități ridicate de diacetil și acetaldehida. Aceste arome se pot folosi în industria alimentară drept substitut pentru compușii de sinteză chimică. Selecția inițială a tulpinilor de drojdii s-a realizat folosind reacții calitative pentru detectarea acetaldehidei cu reactiv Schiff (culoare violet), respectiv a diacetilului cu reactiv Brady (precipitat galben). Mediul de cultură rezultat în urma fermentării a 10 tulpini de drojdie a fost analizat prin gaz cromatografie, cuantificându-se acetaldehida și diacetilul. Valoarea acidității total titrabilă indică faptul că un coeficient de 5,5 °SH a fost favorabil pentru biosinteza de acetaldehidă de către tulpina D15 (*Candida lipolytica*; 96,05 mg L⁻¹acetaldehidă), în timp ce un coeficient de 7 °SH facilitează biosinteza de diacetil de către tulpina D38 (*Candida globosa*; 3,58 mg L⁻¹diacetil).¹⁵ 58,61

Obiectivul 2. PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNOR VEHICULE NON-VIRALE BIOMIMETICE PENTRU ELIBERAREA ȘI DOZAREA CONTROLATĂ A MEDICAMENTELOR SPECIALE ÎN CELULE, PE BAZĂ DE POLIMERI ȘI ADUCTI POLIMERICI

O2.1. Polimeri inteligenți utilizați pentru eliberarea controlată a moleculelor biologic-active

Polimerii sensibili la stimuli externi sau polimerii “inteligenți” sunt materiale deosebit de atractive, capabile să răspundă la modificări ale parametrilor externi prin modificări ale proprietăților lor. Abilitatea de a răspunde la stimuli externi este de fapt una dintre caracteristicile cele mai importante ale organismelor vii. Ca urmare și deloc surprinzător, cele mai frecvente aplicații ale acestor materiale sunt în medicină și farmacie, ca sisteme pentru eliberarea controlată a medicamentelor, ADN-ului și radionuclizilor. Aceste sisteme au o arhitectură specială, adaptată pentru trimiterea la țintă și eliberarea compușilor biologic-activi, sub acțiunea unor factori de declanșare specifici.

Dintre polimerii sensibili la stimuli externi, în acest proiect au fost utilizați cei sensibili la pH și temperatură, deoarece în corpul uman acești parametri fizico-chimici diferă între diversele compartimente ale organelor, iar condițiile patologice pot acționa ca agenți de declanșare.^{12,27,28,41,3}

Poli(N-isopropilacrilamida) (poli(NIPAAm)) este un polimer termosensibil care, în soluție apoasă, prezintă o temperatură critică de solubilizare (lower critical solution temperature, LCST) în jurul valorii de 32 °C. Cu scopul de a crește LCST-ul către valoarea temperaturii corpului uman, poli(NIPAAm) a fost copolimerizată cu monomeri hidrofilii cu diferite grupări funcționale, cum ar fi hidroxietil acrilamida (HEAAm), acidul metacrilic (MA), acidul maleic (MAc), β -ciclodextrina funcționalizată (β -CD).¹⁶⁻²⁰ Apoi, polimerii “inteligenți” au fost transformați prin asociere sau auto-asociere în hidrogeluri macroscopice sau asocieri micrometrice ori nanometrice, cu proprietăți controlabile cum ar fi: temperatura de tranziție de fază, distribuția mărimii, viteza de umflare / colapsare, balanța hidrofil / hidrofob a suprafețelor, densitatea de sarcină, cu scopul final de a realiza un sistem de eliberare eficient.

Au fost sintetizate și hidrogeluri poroase cu o dublă sensibilitate la stimuli, respectiv la pH și temperatură, prin copolimerizarea NIPAAm-ului cu acidul metacrilic sau cu acidul maleic, în prezența unui agent de reticulare (N,N'-metilenbisacrilamida), sau prin crearea de rețele semi-interpenetrare.²¹ În fluidele fiziologice (PBS, pH = 7.4), grupările carboxilice ale MA sunt ionizate și hidrogelul își pierde termosensibilitatea. În mod remarcabil, când grupările carboxilice ionizate interacționează electrostatic cu compuși biologic-activi, hidrogelul își recapătă termosensibilitatea, colapsează și eliberează anumite cantități de medicament (Figura 22). În acest caz, co-monomerul sensibil la pH (MA) acționează ca biosensor, iar co-monomerul sensibil la temperatură (NIPAAm) acționează drept componentă de livrare a medicamentului. **Acest sistem dual ar putea reprezenta baza de pornire în obținerea unei noi generații de dispozitive pentru eliberarea controlată a medicamentelor.**

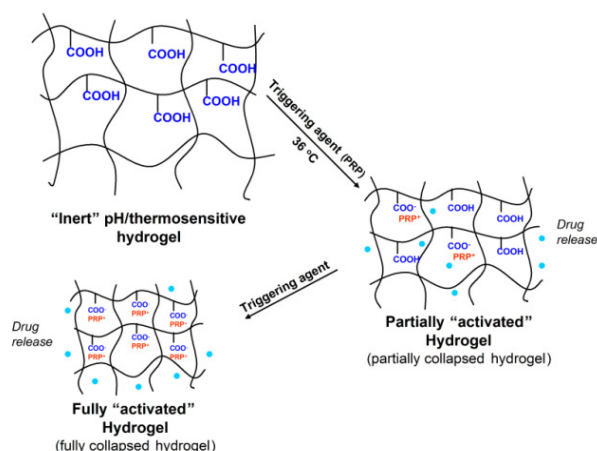


Figura 22. Reprezentarea schematică a modului de operare a microgelurilor de poli(NIPAAm-co-MA) în prezența unui agent de declanșare, în condiții fiziologice simulate.

Într-o altă abordare a acestui subiect, NIPAAm a fost copolimerizată cu β -CD funcționalizată cu grupări vinilice, cu scopul de a obține materiale sensibile la temperatură (microgeluri) capabile să rețină în mod selectiv compuși biologic-activi. Aceste microgeluri sunt biodegradabile deoarece CD a fost funcționalizată astfel încât să posede mai mult de o grupare polimerizabilă per moleculă. Datorită dimensiunii micrometrice și porozității ridicate, aceste microgeluri prezintă o tranziție de fază abruptă la temperatura și pH-ul fiziologic. Ca urmare, viteza de răspuns la schimbări mici ale parametrilor fiziologici este foarte mare. Aceste hidrogeluri sunt capabile să elibereze medicamentele incluse în cavitatea hidrofobă a CD în regim pulsatoriu, printr-un mecanism de tip “ON-OFF” (Figura 23).

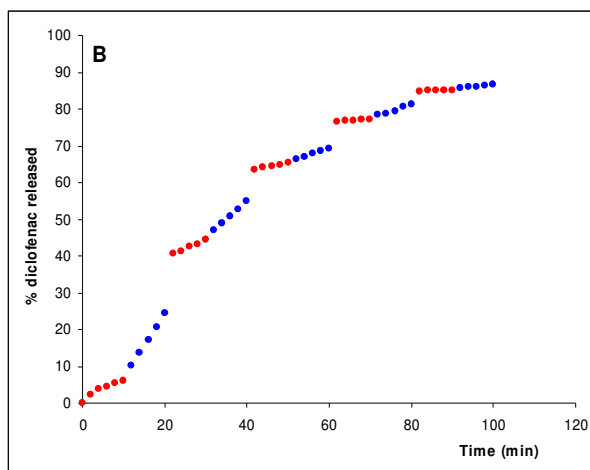


Figura 23. Efectul modificării ciclice a temperaturii între 32 (●) și 40 °C (●) asupra cineticii de eliberare a diclofenacului din microgelurile de poli(NIPAAm-co- β -CD), în condiții fiziologice simulate.

Pentru aplicații biomedicale care necesită particule cu dimensiuni submicronice au fost sintetizate, prin metoda polimerizării precipitative, nanoparticule sensibile la temperatură, pe bază de NIPAAm și HEAAm,²² sau pe bază de poli(NIPAAm) grefat pe pululan.²³ Tranziția de fază a fost determinată prin DLS, spectroscopie UV-VIS și ¹H-RMN. S-a demonstrat că nanoparticulele prezintă tranziție de volum (VPTT) la o temperatură apropiată de cea a corpului uman, ele putând fi deci folosite în scopuri biomedicale. Nanoparticulele sunt sferice și monodisperse. Viteza de eliberare a propranololului a fost semnificativ influențată de temperatură. Sub VPTT microgelurile se află în stare umflată și medicamentul

este rapid eliberat, în timp ce la valori peste VPTT, microgelurile sunt colapsate și medicamentul este eliberat lent.

Ciclodextrinele sunt frecvent utilizate pentru eliberarea controlată a medicamentelor. În cadrul acestui proiect, CD a fost utilizată drept agent de protejare,²⁴ sau a fost imobilizată în microsfele din dextran, care au fost introduse într-o coloană cromatografică din sticlă. Timpii de retenție au fost determinați pentru diferite medicamente și compuși model.²⁴ S-au determinat profilurile curbelor de eliberare a respectivelor specii moleculare (indol, 3-nitrofenol, acid p-hidroxibenzoic, diclofenac). S-au obținut viteze de eliberare neașteptat de mari chiar pentru compuși cu valori ridicate ale timpilor de retenție (constante de asociere mari). Mai mult, volumul fluidului în care se realizează eliberarea influențează semnificativ viteza de eliberare. De aceea, volumul fluidului receptor (“sink conditions”) trebuie menținut pe toată durata experimentului, deoarece la fiecare concentrație a medicamentului în mediul de eliberare se stabilește un echilibru între medicamentul liber și cel inclus în CD.

O2.2. Complecși de incluziune ai nitratului de propiconazol cu β -ciclodextrine diferit substituie. Sinteză și caracterizare.

Ca parte a primului studiu românesc cu privire la distribuția speciilor și profilul sensibilității la agenți antifungici al izolatelor clinice de fungi,^{25,26} proprietățile antifungice ale complexului de incluziune dintre propiconazolul nitrat și β -ciclodextrină (β -CD/PCZH-NO₃) a fost testat pe o colecție de 551 izolate clinice de levuri, primite de la spitale din diverse regiuni ale țării, alături de doi triazoli, fluconazol (FLC) și voriconazol (VOR), și trei echinocandine, caspofungină (CAS), micafungină (MCA) și anidulafungină (ANI), agenți antifungici cu largă utilizare clinică. În cazul VOR a fost folosită formularea comercială în care acesta este complexat cu o ciclodextrină îmbunătățită, sulfobutileter- β -CD (SBE7- β -CD/VOR).

Testarea antifungică și interpretarea concentrațiilor minime inhibitorii (CMI) au fost realizate urmând recomandările Comitetului European pentru Testarea Susceptibilității Antimicrobiene (EUCAST). Activitatea antifungică a complexului experimental a fost în general comparabilă cu cea a voriconazolului complexat (Figura 24A) și cu a echinocandinelor (Figura 24B).

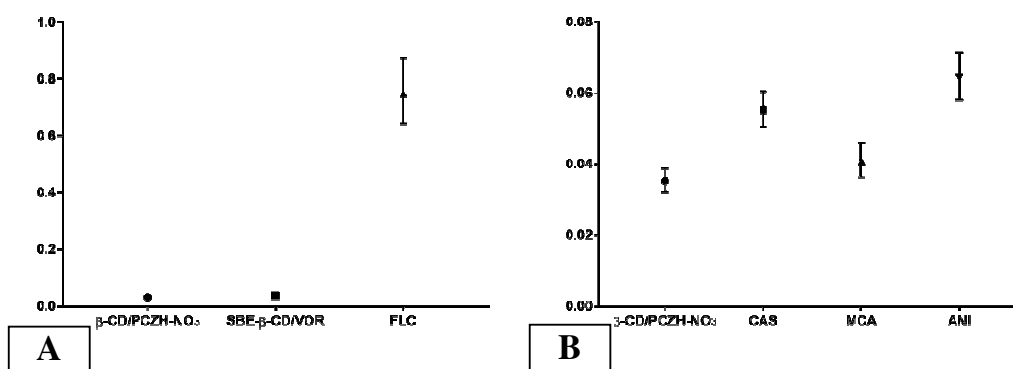


Figura 24. β -CD/PCZH-NO₃ comparativ cu agenți antifungici utilizați clinic – mediile geometrice ale valorilor CMI, cu intervale de confidență 95%: [A] β -CD/PCZH-NO₃ comparativ cu triazoli clinici; [B] β -CD/PCZH-NO₃ comparativ cu echinocandine clinice.

Compusul experimental a fost activ și superior complexului cu VOR, împotriva izolatelor de *C. glabrata* (Figura 25A), care sunt cunoscute ca având adesea sensibilitate redusă la azoli, și împotriva multor izolate cu rezistență la fluconazol (Figura 25B).

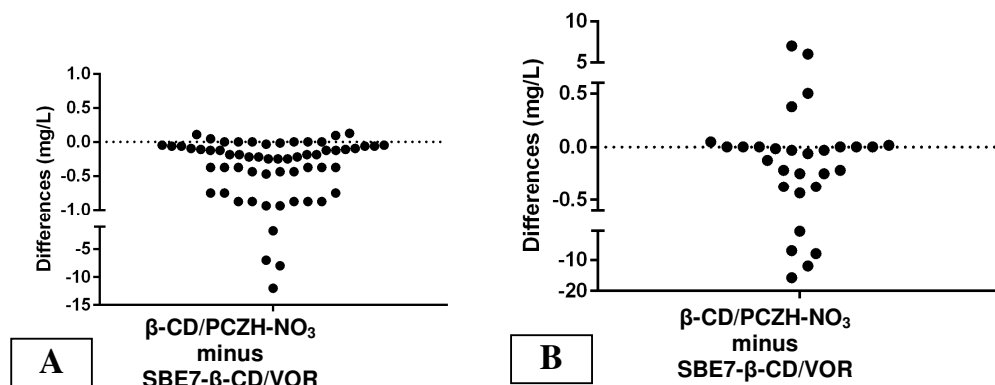


Figura 25. β -CD/PCZH-NO₃ comparativ cu SBE7- β -CD/VOR – valorile absolute ale diferențelor β -CD/PCZH-NO₃ minus SBE7- β -CD/VOR (mg/L): [A] activitatea antifungică împotriva *C. glabrata*; [B] activitatea antifungică împotriva izolatelor non-krusei din genul *Candida*, rezistente la FLC.

Următoarea etapă în studiul vectorilor pentru îmbunătățirea eficienței PCZH-NO₃ a fost prepararea a trei noi complecși de incluziune în care β -CD parentală a fost înlocuită cu trei derivați ai săi, și anume sulfobutyleter- β -CD (SBE7- β -CD), sarea de sodiu a sulfatului de β -CD (β -CD-SNa) și sarea de sodiu a monoclorotriazinil- β -CD (MCT- β -CD).^{27,22,25,48,53,67,68}

Au fost efectuate simulări de andocare și dinamică moleculară (cu apa ca solvent explicit) ale complecșilor de incluziune ale PCZH-NO₃ cu β -CD și SBE- β -CD. Studiile computaționale au sugerat coexistența a mai multor tipuri diferite de complecși de incluziune, în funcție de gruparea funcțională a PCZH-NO₃ care intră în cavitatea ciclodextrinei. Cea mai favorabilă conformație din punct de vedere energetic este cu inelul aromatic al grupării diclorfenil inclus în cavitate la nivelul inelului glucidic.

Complecșii de incluziune au fost apoi preparați prin liofilizare. Complexarea și informațiile oferite de studiile computaționale au fost confirmate prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (¹H-RMN), spectroscopie de rezonanță magnetică 2D (ROESY) și calorimetrie dinamică diferențială (DSC). Titrarea RMN a permis măsurarea constantei de asociere, evidențiind faptul că PCZH-NO₃ formează cel mai stabil complex de incluziune cu SBE7- β -CD, probabil datorită interacțiunilor ciclurilor organice de dioxanil și triazolic cu atomii de oxigen glicozidici sau cu grupele -SO₃⁻. Experimentele de titrare au furnizat de asemenea valorile raportului de complexare între cei doi componenți ai complecșilor de incluziune ca fiind de 1:1.

Testarea proprietăților antifungice ale noilor complecși,²⁸ urmând aceleași recomandări EUCAST, a arătat că, în majoritatea cazurilor, valorile CMI au fost in

concordanță, diferențele fiind în limitele intervalului acceptat, de $\pm$ o diluție log2 (Figura 26A). Această similaritate sugerează că natura ciclodextrinei nu influențează în mod semnificativ comportamentul *in vitro* al PCZH-NO₃ față de celulele fungice.

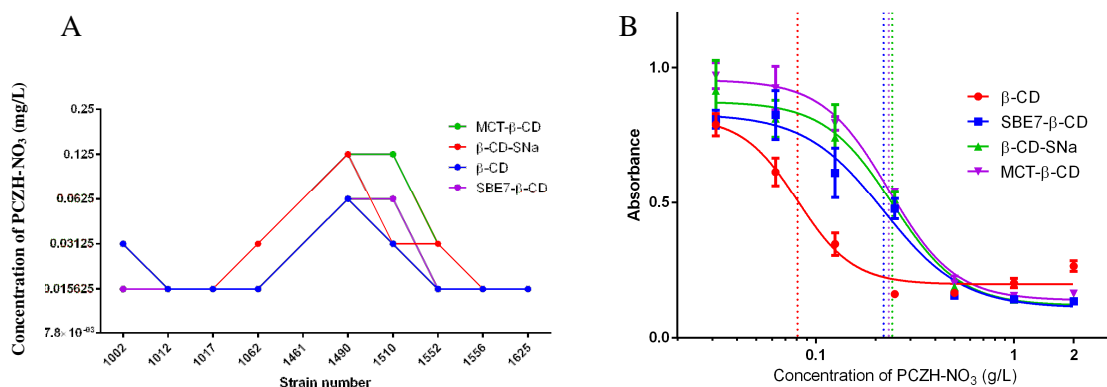


Figura 26. Activitatea biologică a complexelor de incluziune.

[A]: Concordanța valorilor CMI ale celor patru complexi de incluziune ai PCZH-NO₃ cu β-CD și derivații ei testați pe izolate de *C. albicans*; **[B]:** Citotoxicitatea celor patru complexi de incluziune ai PCZH-NO₃ cu β-CD și derivații ei – fitare neliniară a curbelor doză-răspuns. Liniile punctate indică valorile IC₅₀.

A fost de asemenea evaluată citotoxicitatea pe fibroblaști umani dermici normali – NDHF (PromoCell) utilizându-se testul comercial CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Curbele de regresie neliniară au arătat complexul PCZH-NO₃ cu β-CD parentală a fi mai toxic decât complexii cu cei trei derivați de β-CD (Figura 26B). Concentrațiile inhibitorii mediane (IC₅₀) au fost cu 2-3 ordine de mărime mai ridicate față de concentrațiile necesare pentru activitate antifungică.

Lipsa diferențelor semnificative în testele de sensibilitate antifungică și diferențele de citotoxicitate între complexul cu β-CD parentală și complexii cu derivați ai acesteia sugerează că tipul de ciclodextrină ar fi mai important pentru interacțiunea azolului cu gazda infectată decât pentru activitatea antifungică propriu-zisă.

O2.3. Noi materiale hibride pe bază de hidroxizi dublu lamelari (LDHs) folosite ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor.

Hidroxizii dublu lamelari (LDHs) reprezintă o clasă de materiale cu structură stratificată, în care straturile sunt încărcate pozitiv, iar stabilitatea structurii este asigurată de către anioni, care leagă electrostatic straturile adiacente. LDHs sunt materiale biocompatibile utilizabile ca matrice pentru stocarea de biomolecule ori medicamente, dar și ca sisteme pentru eliberarea controlată a acestora. Având în vedere acest fapt, au fost obținute noi materiale hibride pe bază LDHs, capabile să intercaleze medicamente și să acționeze ca sisteme eficiente de eliberare a acestora.²⁹ Clorhidratul de tramadol (TrH) a fost ales ca medicament model și a fost intercalat într-o matrice de ZnAl LDH sub formă nitrat folosind metoda schimbului ionic. TrH a fost utilizat în cantități de câte 0.1, 0.4 și 0.8 g pentru fiecare

2 g de ZnAILDH. Precursorii și materialele hibride au fost caracterizate prin XRD, FT-IR, RAMAN, EDX și SEM.

Rezultatele obținute indică faptul că TrH este prezent în spațiul interlamelar în cazul ZnAILDH_TrH 0.4 și ZnAILDH_TrH 0.8, atunci când se utilizează cantități mari de TrH pentru schimbul ionic. În spectrele FT-IR și RAMAN se observă absența benzilor de vibrație caracteristice ionilor nitrat, ceea ce confirmă înlocuirea acestora cu anioni de medicament. În celelalte cazuri a fost observată o intercalare parțială a TrH între straturi și o absorbție semnificativă pe suprafața ZnAILDH. Acest studiu sugerează că TrH poate fi intercalat în straturile de ZnAILDH, iar noile materiale hibride ar putea deschide perspective interesante pentru obținerea de rezervoare pentru medicamente și de sisteme pentru eliberare controlată.

O2.4. Efectul citotoxic al particulelor magnetice

Scopul acestor studii a fost de a proiecta, sintetiza și caracteriza un purtător complex nanoparticulat, constând dintr-un miez de magnetită acoperit cu polisiloxan sau heparină, capabil să fie încărcat cu lipază (pentru aplicații catalitice)³⁰ sau cu Rhein³¹ 66 (un medicament antitumoral) (Figura 27). Rezultate notabile s-au obținut pentru nanoparticulele magnetice încărcate cu Rhein. Testele folosind 10, 20 și 30 pM echivalent Rhein liber, precum și a celor care folosesc nanoparticule Rhein-încărcate, a arătat că viabilitatea hepatocitelor tumorale este semnificativ redusă (până la circa 10%) pentru 30 μM Rhein încărcat pe nanoparticulele magnetice, ceea ce reprezintă o activitate antitumorală mai bună în comparație cu aceeași concentrație de Rhein liber.

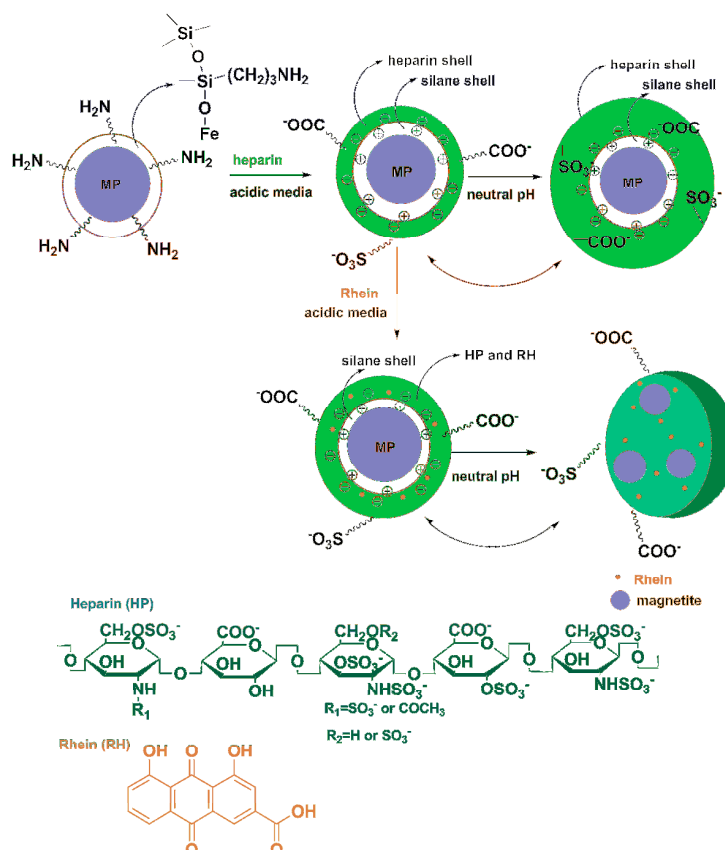
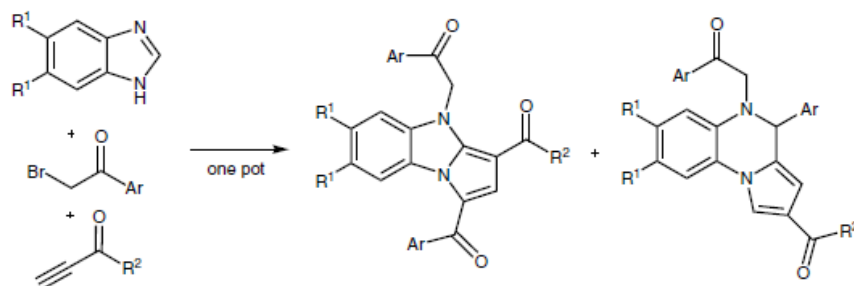


Figura 27. Prepararea nanoparticulelor magnetice incarcate cu Rhein.

O2.5. Sinteza și caracterizarea derivaților de pirolo[1,2-*a*]benzimidazol cu acțiune anti-tumorală

Studiile efectuate reprezintă o contribuție originală privind sinteza multicomponent „one pot” a pirolochinoxalinelor și pirolobenzimidazolilor. Cele două clase de compuși sunt studiate datorită interesului pentru proprietățile lor biologice. Derivații de pirolo[1,2-*a*]benzimidazol sunt agenți anti-tumorali și sunt de asemenea folosiți în tratamentul afecțiunilor sistemului nervos central. Scheletul pirolo[1,2-*a*]chinoxalinei se regăsește în numeroși compuși cu activități biologice diverse. Structurile compușilor sintetizați au fost amănunțit studiate prin tehnici instrumentale, în special spectroscopie RMN ^1H , ^{13}C , și ^{15}N , folosind tehnici bidimensionale puțin uzuale, dar și prin cristalografie de raze X.



Reacțiile multicomponent reprezintă o abordare modernă și rapidă pentru sinteza mai multor clase de compuși organici. Au fost investigate mecanismele de reacție și au fost propuse condiții de sinteză care să favorizeze formarea preponderentă a unuia sau altuia dintre reprezentanții celor două clase de heterociclii menționate mai sus. Pentru caracterizarea cât mai bună a acestor reacții au fost sintetizați pe alte căi și intermediarii sintezelor multicomponent (sărurile de benzimidazoliu), pentru unele dintre acestea în afara caracterizărilor structurare fiind studiate și proprietățile de incluziune în ciclodextrine. Rezultatele au fost publicate parțial într-o serie de articole,³²⁻³⁷ iar alte manuscrise fiind în pregătire.

Obiectivul 3. PROIECTAREA ȘI REALIZAREA UNUI SISTEM DE MINERALIZARE BIOMIMETIC DE TIP CALUS OSOS CU CAPACITATE DE TRANSPECȚIE ȘI IMUNO-EVAZIVĂ, PE BAZĂ DE COMPUȘI MACROMOLECULARI NATURALI ȘI SINTETICI, CU CAPACITATE DE RECUNOAȘTERE CELULARĂ, ACTIV CA SUBSTRAT PENTRU CULTURA DE CELULE *EX-VIVO* ȘI POTENȚIAL INJECTABIL ÎN SITE-URI OSOASE, CU SCOPUL DE A GHIDA RESTAURAREA ȚESUTULUI ÎN PREZENȚA CELULELOR ADECVATE.

O3.1. Obținerea și caracterizarea unor compozite biomimetice injectabile

În cadrul proiectului am stabilit un procedeu simplu de preparare al hidrogelurilor bazate pe formarea arhitecturii G4, utilizând guanozina (G) grefată pe complexul preformat alcool polivinilic-acid boricin prezenta de Li^+OH^- (PVAB) (Figura 26). Prin adăugarea β -ciclodextrinei (βCD) în diverse rapoarte molare G/ βCD , conduce la schimbarea proprietăților hidrogelului format, acționând ca un adjuvant datorită formării complexelor de incluziune βCD -guanozina (Figura 28).³⁸

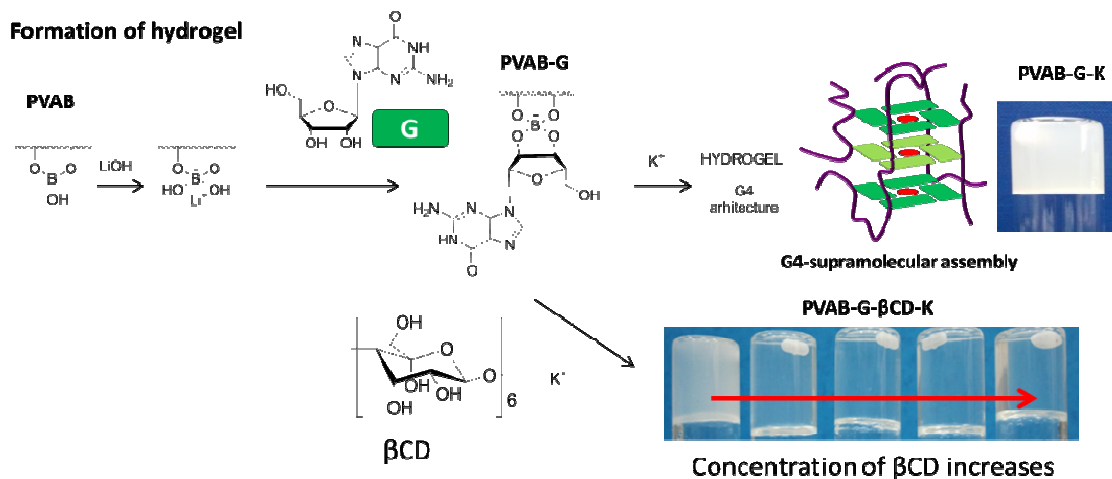
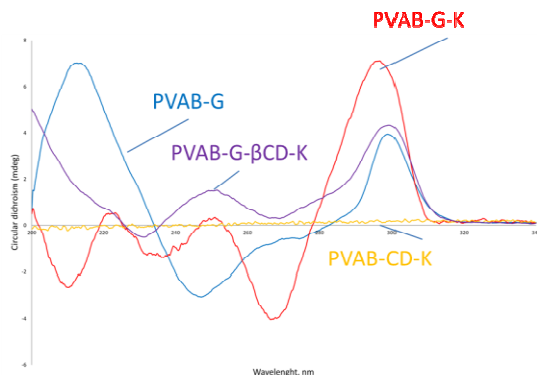


Figura 28. Reprezentarea schematică a formării hidrogelurilor.

Spectroscopia ^{11}B -RMN a fost utilizată pentru a caracteriza formarea borat-esterilor între PVAB și guanozina (PVAB-G), iar prin ^1H -RMN s-a demonstrat formarea complexelor de incluziune guanozina- βCD .

Trebuie menționat faptul că PVAB-G formează arhitecturi supramoleculare ierarhice ordonate dirijate de prezența cationilor K^+ , Na^+ sau Ba^{2+} . Pentru a identifica structurile G4 și, în special, pentru a distinge toate structurile paralele din cadrul structurilor antiparalele este adesea utilizat dicromismul circular. Cu ajutorul curbelor obținute, prin dicromism circular, se pot pune în evidență structurile G-quadruplex paralele. Astfel, acizii nucleici în prezența de guanosina, prezintă o bandă pozitivă la ~ 260 nm și o bandă negativă la ~ 240 nm, indicând prezența unei structuri G-quadruplex paralele. În cazul nostru, prin înregistrarea spectrelor prin dicromism circular (Figura 29), s-a observat formarea structurilor G-quadruplex (cvartetului G) (G4) pentru PVAB-G-K și PVAB-G- βCD -K și nu s-a observat pentru PVAB-G. Prezența benzilor pozitive în regiunea 290 nm, ar putea indica prezența formării G-quadruplex (G-cvartetelor) în structura hidrogelului.

a) Circular dichroism



b) XRD

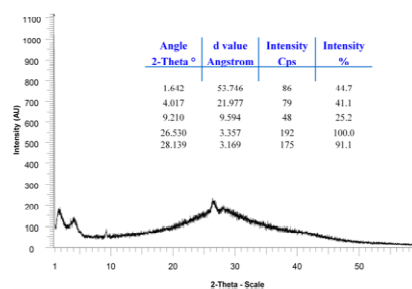


Figura 29. a) Circular dichroism data. b) X-Ray Diffraction spectrum of PVAB-G-K.

Tehnica de difracție cu raze X (XRD) a fost folosită pentru obținerea dovezilor suplimentare de formare a G-cvartetului/cvadruplexului. Din datele XRD (Figura 27b) ale PVAB-G-K a fost identificat un pic la $2\theta \approx 26.5^\circ$ ($d = 3.3 \text{ \AA}$), care corespunde cu distanța de conjugare π - π între două plane G4-cvartete. Un semnal la $2\theta \approx 4.01^\circ$ corespunde cu o distanță de 21,97 Å, caracteristică lungimii unui singur G4-cvartet (Figura 27b).

Din analizele SEM (Figura 28) se poate observa că materialele obținute prezintă o morfologie caracteristică unui hidrogel. Prezența ionului de K^+ în structurile PVAB-G-K și PVAB-G- β CD-K conduce la obținerea de geluri cu o structură mai densă și compactă în comparație cu structurile PVAB- Li^+ .

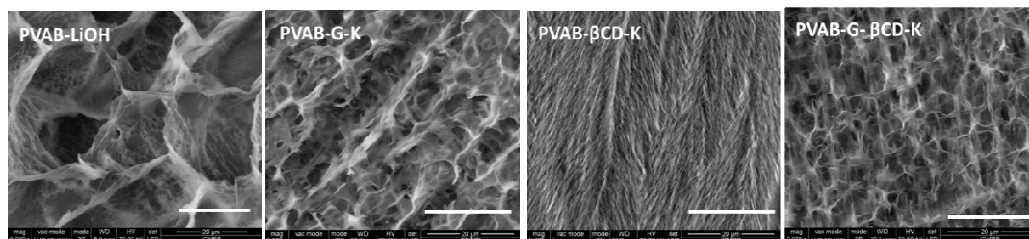


Figura 30. Imaginile SEM pentru PVAB- Li^+ , PVAB-G- K^+ , PVAB-G- β CD- K^+ (scala 20 μ m).

Testarea oscilatorie dinamică este o modalitate recunoscută de a obține informații esențiale despre microstructura materialelor care pot genera informații despre comportamentul macroscopic. Astfel, determinarea parametrilor G^* , G' și G'' , factorului de pierdere ($\delta = G \tan \delta / G'$), viscozității complexe (η^*) sau unghiului (δ), duce la obținerea unei imagini complete despre structura internă a esanționului în limitele domeniului viscoelastic liniar (Figura 29).

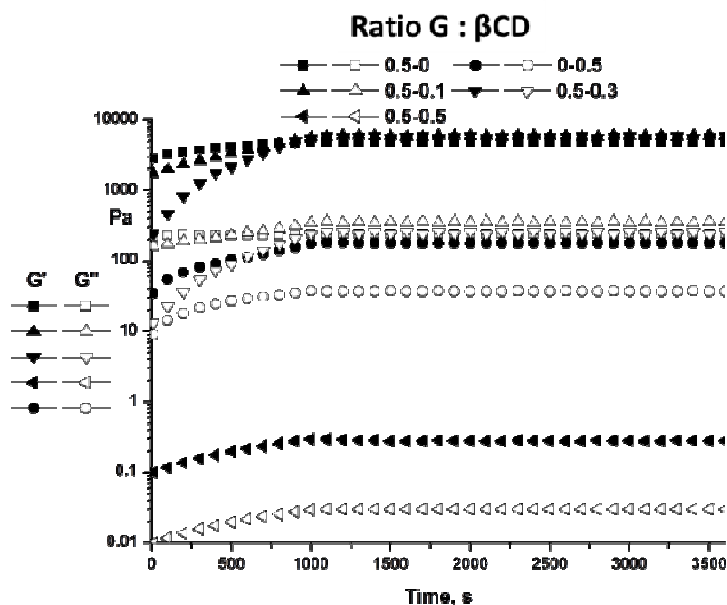


Figura 31. Variatia parametrilor G' si G'' in functie de timp pentru probele PVAB-G- β CD- K^+ la diverse rapoarte molare G/β CD.

In cazul nostru, pentru toate probele supuse analizei (Figura 29) s-a observat o crestere rapida a modului G' si atingerea rapida a platoului (in mai putin de 700 s), ceea ce indica finalizarea gelifierii. Din analiza graficelor se mai poate observa faptul ca raportul molar $G : \beta$ CD are o influenta considerabila asupra rigiditatii si stabilitatei hidrogelurilor: gelul mai „moale” este obtinut pentru PVAB-G- β CD-K la un raport molar $G : \beta$ CD = 0.5 : 0.5, iar cel mai rigid si mai stabil structural este PVAB-G-K (concentratia β CD = 0).

Concluzii:

- a fost stabilit un procedeu simplu pentru prepararea hidrogelurilor pe baza de asamblare G-quadruplex (G-cvartet), prin formarea esterilor borici prin ^{11}B -RMN;
- s-a demonstrat structurilor G-quadruplex (G-cvartet) (asamblare cvadruplex) prin inregistrarea spectrelor prin dicroism circular si raze-X;
- a fost stabilit modului de interactiune β CD-componente hidrogel, prin formarea complexilor de incluziune β CD:guanozina prin ^1H -RMN;
- **au fost studiate proprietatile hidrogelurilor obtinute prin reologie si SEM si se poate concluziona ca gelurile sintetizate sunt suficient de flexibile astfel incat sa poata fi considerate geluri injectabile pentru rapoarte molare β CD:guanozina mari.**

O3.2. Hidrogeluri pe baza de chitozan și cinamaldehyda

O alta realizare importanta a acestei directii de cercetare o constituie obtinerea de hidrogeluri pe baza de chitosan si cinamaldehyda, pe calea unei reticulari duale atribuita concurentei dintre grefarea aldehidei pe lantul de chitosan si auto-organizarea unitatilor imina nou formate, soldată cu formarea de clusteri hidrofobi cu rol de noduri de reticulare (Figura

32a). Hidrogelurile prezinta o morfologie poroasa, iar diametrul porilor poate fi controlat prin varierea raportului gruparilor functionale (Figura 32b,c). Investigari reologice au relevat proprietati inalt elastice si un grad de umflare ridicat.³⁹ Determinari preliminare au demonstrat ca hidrogelurile favorizeaza proliferarea celulelor osoase, avand potential de aplicare ca scaffolduri pentru regenerarea osoasa.

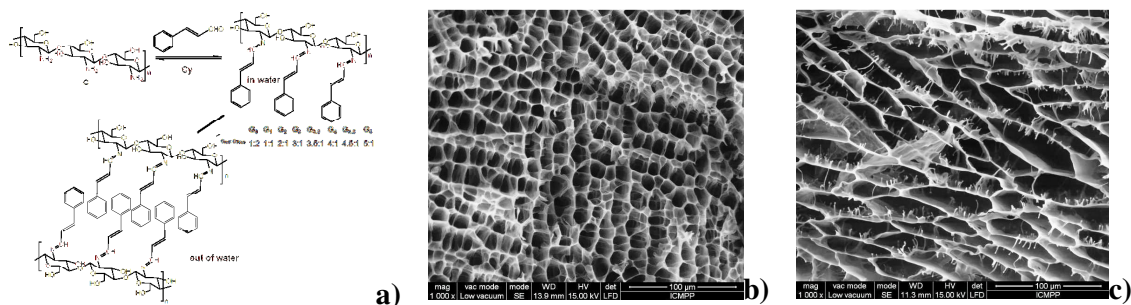


Figura 32. Obținerea hidrogelurilor demonstrată prin analiză RMN și imagini SEM a două xerogeluri cu grad de rețulare diferit.

Capacitatea de auto-ordonare a unităților imina a fost demonstrată pe o serie de compusi model mic moleculari prin difracție de raze X pe monocristal (Figura 33a,b).⁴⁰ Studiile au fost extinse și spre sinteza de noi agenți antimicrobieni de tip benzoat cu capacitate de organizare în mezofaze lichid cristaline, proprietăți ce pot fi exploatate în obținerea de materiale compozite de tip PDLC pentru aplicații biomedicale ca fabricarea irisilor artificiali (Figura 33 c,d).⁴⁰

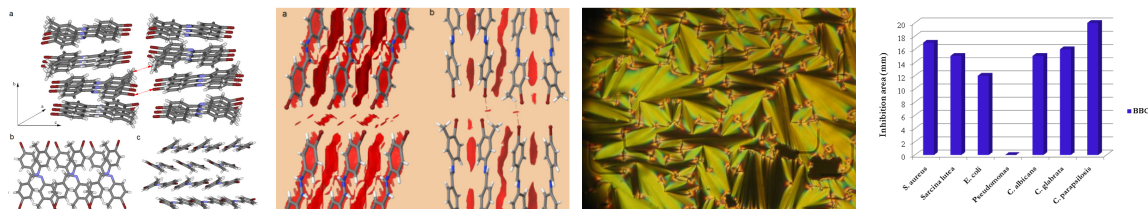


Figura 33. a,b) Impachetarea supramoleculară compactă a compusilor model imina demonstrată prin difracție de raze X pe monocristal; și c) textură evantai și d) proprietățile antimicrobiene ale unui compus benzoat reprezentativ

O3.3. Dezvoltarea unui substitut al matricei calusului osos, util drept substrat în susținerea transfecției *ex vivo*

Caracteristicile calusului osos pot fi mimate de către matrice colagenice dopate cu cristale de hidroxiapatită biomimetică. Obținerea unor astfel de matrice s-a realizat prin sinteza hidroxiapatitei în prezența atelocolagenului, prin controlul nucleerii și creșterii cristalelor utilizând câmpuri electrice aplicate în regim capacitiv.

În cadrul proiectului s-au brevetat tehnica de sinteză (cererea de brevet OSIM A00710 din 27.09.2013) și instalația pentru controlul sintezei hidroxiapatitei biomimetice calciu-deficiente (cererea de brevet OSIM A00615 din 07.09. 2016).

În principiu, procedeul pentru controlul caracteristicilor hidroxiapatitei sintetizate în prezența biomacromoleculelor implică parcurgerea următoarelor etape și subetape:

- i.** – obținerea sării de calciu a biomacromoleculei / biomacromoleculelor în prezența căreia / căroră se va sintetiza hidroxiapatita;
- ii.** – reglarea parametrilor mediului de reacție și controlul compoziției chimice a acestuia (condiționarea chimică a mediului de reacție), prin eliminarea până la o valoare controlată a excesului de ioni de calciu nelegați și prin adaosul de specii chimice cu rol de modulator al proceselor de creștere a cristalelor de hidroxiapatită;
- iii.** – inducerea unei difuzii activate masive a celorlalți ioni implicați în sinteza hidroxiapatitei (fosfat și cei de substituie: CO_3^{2-} , F^- , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} etc.), iar ulterior a unui surplus de ioni de Ca^{2+} , difuzie accelerată prin intermediul unui câmp electric generat din exteriorul mediului de reacție;
- iv.** – separarea produselor de reacție, realizată diferențiat funcție de forma utilă, respectiv a fracției anorganice, sau a amestecurilor intime ale acesteia cu biomacromoleculele în prezența căroră hidroxiapatita a fost sintetizată;

Instalația pentru sinteza particulelor de hidroxiapatită permite controlul gradului de cristalinitate, dimensiunilor, morfologiei și distribuției fazelor cristaline și amorse în cazul particulelor de hidroxiapatită sintetizate în mediu lichid și în câmp electric de înaltă intensitate, inclusiv în prezența compușilor (bio)macromoleculari susceptibili denaturării (în particular a proteinelor și în speță a atelocolagenului), compuși utilizați ca matriță pentru nucleerea și creșterea cristalelor ori particulelor cristalin-amorse. Soluția inventivă constă în:

- separarea printr-o barieră impermeabilă și dielectrică a electrozilor de volumul soluției apoase ori a emulsiei în care are loc sinteza;
- numărul, forma și geometria amplasării electrozilor care alcătuiesc sistemul capacitiv de aplicare a potențialelor de control al proceselor;
- modalitatea de conectare a electrozilor la sursele de înaltă tensiune, în vederea eliminării efectelor ripplului respectivelor surse, ripplu care conduce la disiparea suplimentară de energie între electrozii cuplați capacitiv, disipare soldată cu încălzirea inutilă a mediului lichid;
- modul de control al evoluției în timp a potențialului aplicat electrozilor, prin polaritatea, forma și frecvența curenților electrici debitați de către surse;
- modul de distribuire a valorilor potențialelor de lucru în raport cu masa generală și respectiv cu masa blocurilor electronice, în vederea protejării sistemelor de control împotriva scurgerilor accidentale dinspre sursele de înaltă tensiune, dar și pentru garantarea siguranței în funcționare.

În principiu, instalația pentru controlul sintezei particulelor de hidroxiapatită prin intermediul câmpului electric aplicat în regim capacitiv, instalație care face obiectul cererii de invenție, se compune din:

- reactorul chimic propriu-zis;
- partea electrică a sistemului de control al sintezei, inclusiv electrozii;
- sursele de înaltă și joasă tensiune;
- circuitul pentru ridicarea potențialului masei circuitelor de joasă tensiune în raport cu masa surselor de înaltă tensiune și cu electrozii de lucru;
- sistemul digital pentru controlul evoluției în timp a potențialelor de lucru;
- sistemele de deservire a reactorului.

Figura 20 prezintă schema bloc a instalației pentru controlul sintezei particulelor de hidroxiapatită prin intermediul câmpului electric aplicat în regim capacitiv, conform invenției, iar Figura 21 schema funcțională a instalației.

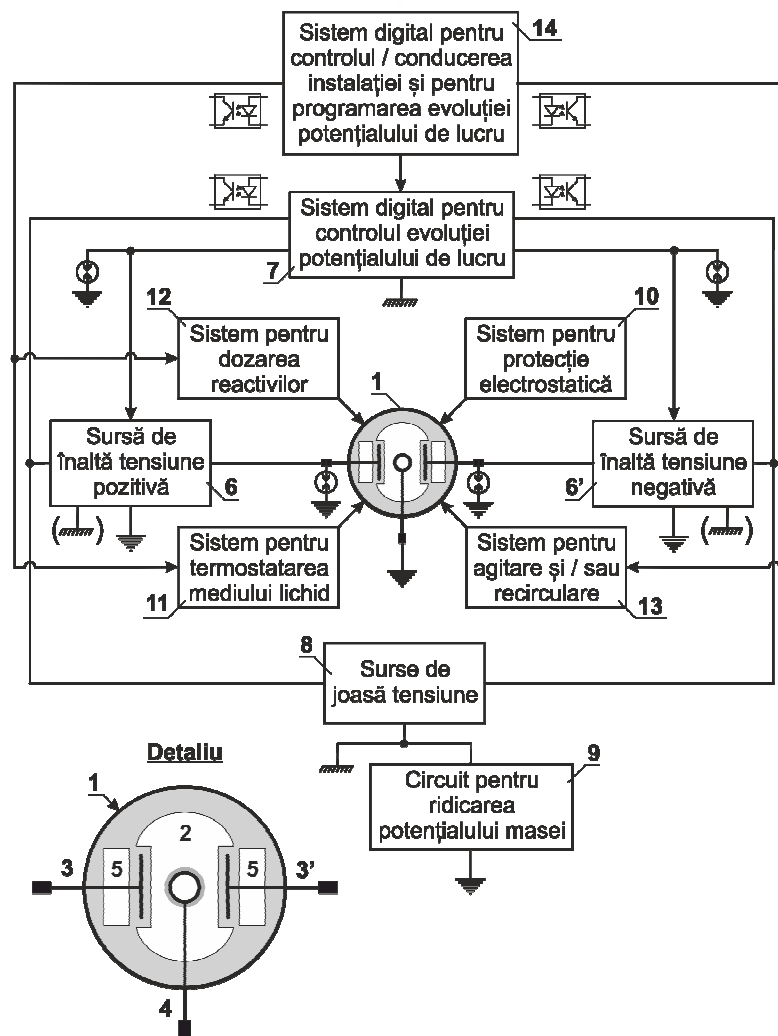


Figura 20. Schema bloc a instalației brevetate.

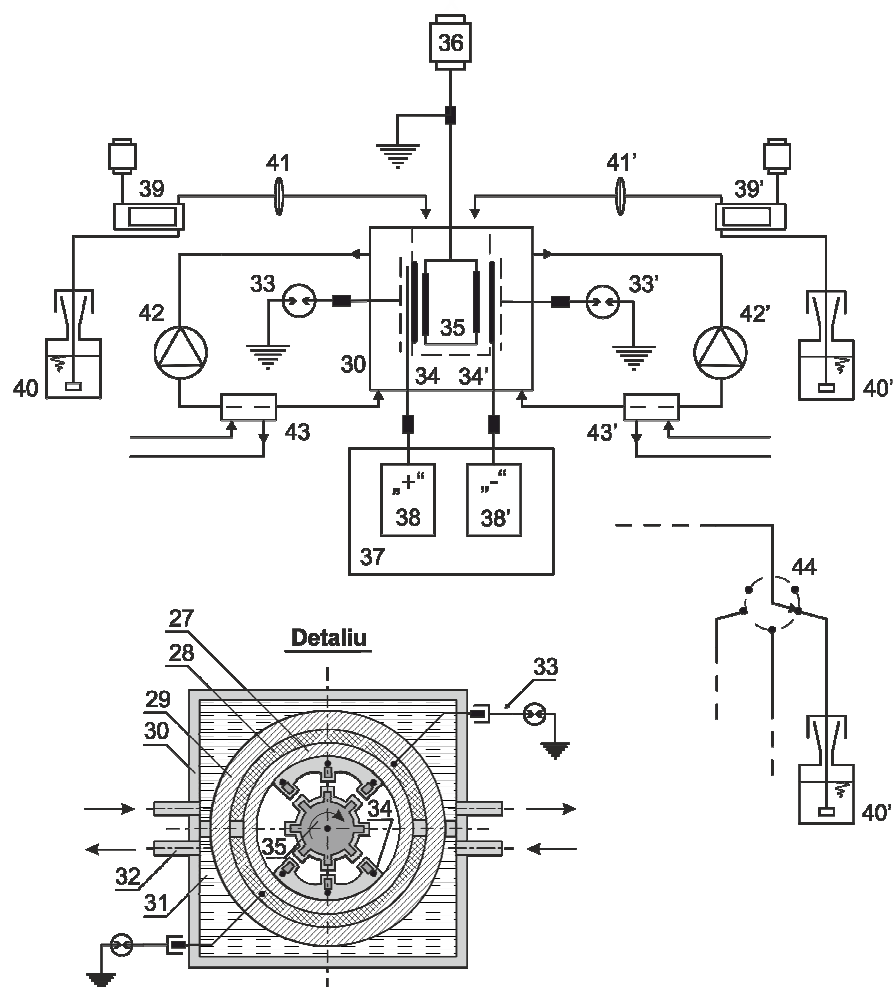


Figura 21. Schema funcțională a instalației brevetate.

Utilizând această instalație se obțin composite anorganic – organice, în care cristalele de hidroxiapatită calciu-deficientă sunt nucleate și crescute în matricea unui compus biomacromolecular (atelocolagen sau polizaharid). Compozitul poate avea caracteristicile unui hidrogel și proprietăți tipice scaffold-urilor destinate cultivării ex vivo a celulelor. În plus, scaffold-urile astfel generate pot susține procesele de transfectare a celulelor fie utilizându-se acizi nucleici „nuzi”, fie cargocomplecși ai acizilor nucleici cu carrier-ii dezvoltăți în cadrul proiectului. Astfel de scaffold-uri sunt aplicabile în transfectarea celulelor specifice osului.

O3.4. Stabilirea modalităților de realizare a unui substrat cu abilități de transfecție, din clasa substitutelor matricei extracelulare a țesutului osos

Studiile s-au derulat pe următoarele direcții:

A. Realizarea unui substitut al matricei extracelulare pe baza de atelocolagen, respectiv:

- selecția componentelor pentru un scaffold organic;
- sinteza și caracterizarea unor precursori pentru scaffold organic;
- selecția alternativei de preparare;

- studiul interacțiunilor specifice între componente și efectul acestora asupra proprietăților sistemului multicomponent;
- selecția compoziției matricei organice luând în considerare relația structură- mod de preparare- proprietăți în concordanță cu domeniul de aplicare propus și cerințele acestuia (caracteristici fizico-mecanice, chimice, biologice).

B. *Selecția componentei anorganice și a modului de preparare/includere în formularea matricei hibride, cuprinzând:*

- realizarea de precursori/sinteza prin co-precipitare asistată de câmp electric;
- realizarea de nano-hidroxiapatită funcționalizată;
- selecția variantei optime prin studiu comparativ.

C. *Realizarea unui sistem complex de transfecție prin înglobarea unui vector genic non-viral în matricea biomimetică realizată, incluzând:*

- studii privind selecția vectorilor genici non-virali cu biocompatibilitate și eficiență adecvată de transfecție, sintetizați de grupul de lucru (Figura 34);
- includerea vectorului/poliplexului în scaffold;
- caracterizarea sistemului combinat realizat.

Astfel pentru matricea organică a compozitului destinat realizării substitutelor matricei extracelulare s-au selectat, sintetizat și purificat următoarele componente:

- a) componenta proteică: atelocolagen (obținut și purificat conform unui procedeu brevetat anterior atelocolagen sau colagen tiolat (pentru formulări injectabile);⁴¹
- b) polizaharide: hialuronan sau derivatul său dimetilsilandioli hialuronat, gelatină nativă;
- c) polimer sintetic biocompatibil: derivat bifuncțional reactiv de poli(ε-caprolacton) (PCL) (diizocianat sau dimetacrilat).

S-a recurs la combinarea de polimeri naturali și sintetici pentru a asigura rezistența mecanică și prelucrabilitate ameliorată, dar și control al cineticii procesului de biodegradare prin utilizarea PCL, cu menținerea performanțelor biologice caracteristice componentelor naturale (proteina, polizaharida). Pentru asigurarea stabilității și reproductibilității formulărilor s-au efectuat studii privind interacțiunile specifice între componente⁴² și comportarea la formarea gelului (reticulare),^{43,44} care au permis selectarea condițiilor optime de pH, temperatură, concentrație totală, raport al componentelor etc.

Aplicând criogelarea unui amestec de atelocolagen/dimetilsilandioli hialuronat/poli(ε-caprolacton) diizocianat (AteCol/DMSHA/PCL-DI) s-au realizat matrici 3D macroporoase, p5 cu pori interconectați, bio-/hemocompatibile, cu o comportare la umflare și viteză de degradare controlate de compoziție, gradul de reticulare și condiții de preparare.⁴⁵ Compararea caracteristicilor obținute în cazul criogelurilor ternare cu cele realizate în cazul structurilor poroase sau dense a evidențiat superioritatea acestei alternative în obținerea de materiale cu arhitectură, porozitate, rezistență mecanică, puritate adecvată utilizării ca scaffold.^{46,47}

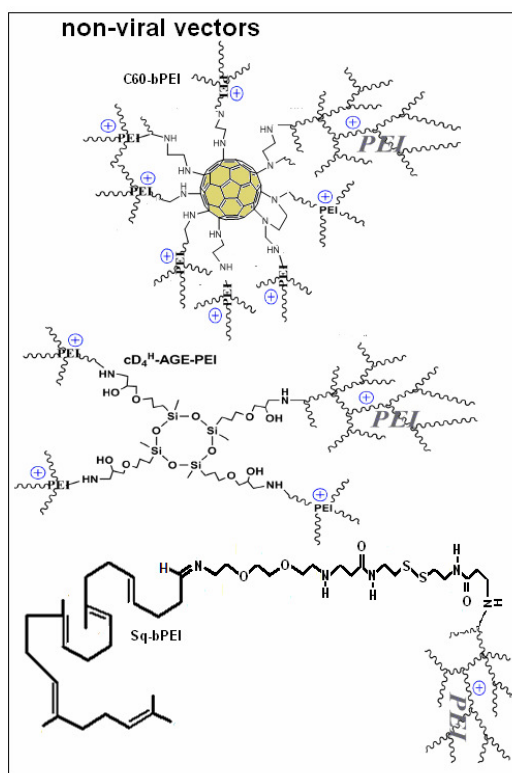


Figura 34. Vectorii non-virali selectati pentru a fi inglobati in matricea extracelulara in forma de poliplex.

Din studiile efectuate rezulta ca o formulare optima, de echilibru, pentru o eventuala utilizare pentru realizarea unui substitut de tesut dur presupune un raport gravimetric procentual AteCol:DMSHA:PCL-DI de minim 100:10:10. Luand in considerare date de literatura privind avantajele criogelurilor tip biocompozit collagen-hidroxiapatita in raport cu cele doua componente in aplicarea in ingineria tesuturilor dure, cat si posibilitatea de control a caracteristicilor biocompozitelor AteCol-DMSHA/PCL din conditii de preparare, s-a optat pentru realizarea unei matrici hibride organic/anorganic de tip criogel, prin includerea in formularea selectata a hidroxiapatitei (25% fata de componenta proteica) – cod CH10P10/HAp25-15. Pentru comparare s-au realizat compozitii similare fara HAp (CH10P10-15) si compozitii la care s-a adaugat si 15% β -TCP (fosfat de calciu comercial - Aldrich Sigma), respectiv CH10P10/HAp25; TCP15-15 (Figura 35). Pentru a asigura o buna dispersare a componentei ceramice in matrice in vederea asigurarii proprietatilor mecanice adecvate, s-a optat pentru nano-hidroxiapatita. S-au elaborat doua modalitati de obtinere in vederea asigurarii morfologiei, compozitiei si cristalinitatii adecvate: a) sinteza prin coprecipitare asistata de camp,^{48,49} si b) prepararea de nHAp functionalizata superficial.^{50,51} Avand in vedere utilizarea intr-un sistem complex de transfectie scaffold/vector genic, pentru a asigura si functionalitatea necesara atasarii vectorului si controlului vitezei de eliberare a ADN/pADN din sistem, s-a apelat la sintetiza nHAp prin metoda precipitarii umede in prezenta unor aditivi cationici, capabili de complexare cu ADN. In urma analizei comparative a rezultatelor s-a ales nHAp functionalizata cu polietilenimina limiara (LPEI), polimer capabil sa actioneze ca agent de compatibilizare in sisteme multicomponente, dar si recunoscut pentru eficienta in compactarea ADN si transfectie.

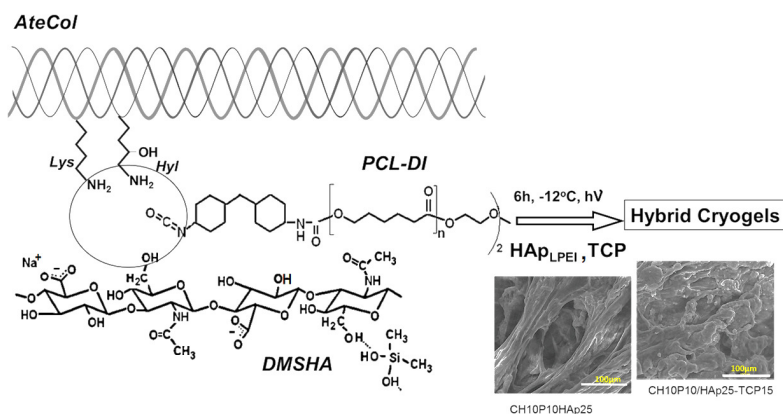


Figura 35. Structura si caracterizarea SEM a matricei 3D.

In paralel, ca o alternativa, s-au realizat si caracterizat si biocompozite polimer artificial biodegradabil/material ceramic, respectiv acetat de celuloza/montmorilonit-silice.

Pentru realizarea sistemului combinat s-au utilizat poliplexi formati de ADN de somon sau plasmide cu vectori non-virali pe baza de polietilenimina ramificata si scuallena, fulerena C60 sau ciclu siloxanic sintetizati in cursul derularii proiectului (Figura 32).

Evaluarea citotoxicitatii matricei libere sau incarcate cu plasmid / poliplex in prezenta celulelor HEK 293T si a potentialului de transfectie al matricelor macromoleculare si al vectorilor asociati a condus la urmatoarele concluzii:⁵² **63**

- 1) Datorita functionalitatii ridicate matricele hibride sintetizate pot fi incarcate eficient prin incubare cu dispersiile apoase ale poliplexilor formati intre conjugatii polimerice cu PEI si ADN plasmidic. Aceste sisteme complexe pot furniza pe o durata mare de timp material genetic ce poate determina expresia sustinuta a unei anumite proteine in celulele din vecinatate pana la o luna. Inglobarea sistemului control/martor PEI (25 kDa)/pDNA in matrice determina reducerea toxicitatii acestuia, eficienta transfectiei mentinandu-se la un nivel ridicat.
- 2) Nici in cazul inglobarii unor vectori marcati cu fluoresceina (scuallena-PEI-FITC, C60-PEI -FITC) prin incubare sau includere in peretii/formularea matricei nu s-a constatat un efect citotoxic drastic fata de celulele HEK 293T. Studiile cinetice au evidentiat o eliberare prelungita a materialului genic, cu mentinerea neschimbata a structurii ADN/pADN. Eficienta transfectiei scade in timp, dar pentru o perioada indelungata este la un nivel acceptabil, evidentiindu-se exprimarea proteinei codificate de plasmid in aproximativ 40% din celulele peste care au fost adaugate matricele, la 3 zile de incubare pentru sistemul matrice/poliplex(C60-PEI-FITC inglobat in matrice/pEYFP)-celule .

O3.5. Arhitecturi supramoleculare complexe pe baza de chitosan cu activitate antimicotica

Derivati de chitosan prin grefarea de aldehide terapeutice au fost obtinuti prin exploatarea principiilor chimiei covalente dinamice pentru a obtine arhitecturi supramoleculare complexe. O prima realizare a acestui demers stiintific a fost obtinerea de filme nanostructurate cu proprietati de autoaparare impotriva microorganismelor si fungilor si

hidrofilicitate moderata, fapt ce le recomanda pentru aplicatii biomedicale incluzand implanturile. Dintre aceste filme, cele care incorporeaza vanilina au dovedit activitate fungicida impotriva tulpinilor de *Candida Albicans* si o eliberare lenta a vanilinei antifungice datorita unei impachetari compacte la nivel nanometric, motiv pentru care au fost propuse ca acoperiri ale instrumentarului medical, in special a celui utilizat in tratarea pacientilor cu imunitate scazuta pentru care infectiile cu tulpini *Candida* au un procent de mortalitate ridicat (Figura 36).⁵³⁻⁵⁵ 11,34

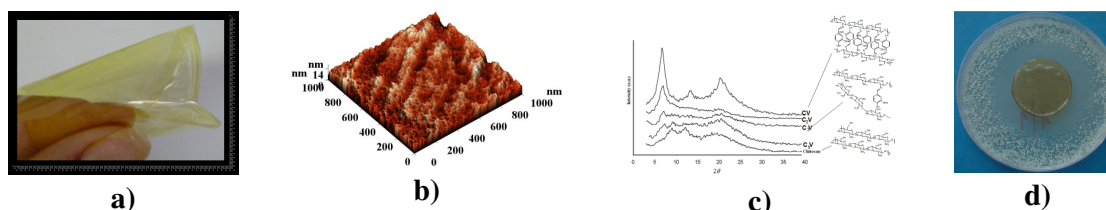


Figura 36. Imagini reprezentative ale unui film de vanilina: a) film de sine stator; b) suprafata nanostructurata a filmului vazuta la AFM; c) impachetarea compacta evidentiata prin difractie de raze X; d) activitatea antifungica a filmului impotriva *C. albicans*.

O3.5. Structuri poroase pentru aplicatii biomedicale

Aerogelurile pe bază de argilă prezintă interes datorită structurii interne foarte poroase și multiplelor aplicații. Pentru a studia posibilitățile de preparare și aplicațiile biomedicale a materialelor naturale foarte poroase am analizat design-ul experimentelor utilizate pentru obținerea de compozite polimer-aerogel pe bază de argilă.⁵⁶ Astfel, pentru sistemele experimentale propuse au fost selectate trei variabile: cantitățile de montmorilonit (MMT), alcool polivinilic (PVA) și dodecilsulfatul de sodiu (SDS). Obiectivul principal al optimizării a fost de a crește la maxim porozitatea, precum și capacitatea de sorbție a materialelor. Conform rapoartelor de reactivi calculate, aerogelul final preparat în condițiile optim de 2.109% w/v PVA, 2.678% w/v MMT și 0.210% w/v SDS a prezentat cea mai bună capacitate de sorbție. Suplimentar au fost studiate metode de sinteză variate cu scopul de a ajusta hidrofobitatea materialelor foarte poroase obținute pentru a largi domeniul de aplicații. Toate compozitele polimer-aerogel pe bază de argilă au fost caracterizate prin microscopie electronica de baleiaj (SEM), spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) și difracție de radiație X (XRD).

Obiectivul 4. DEZVOLTAREA UNOR METODE DE INVESTIGARE PENTRU TERAPIA GENICĂ ȘI ASISTEMLOR CU ELIBERARE CONTROLATĂ A MEDICAMENTELOR

O4.1. Studiul fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$ prin spectrometrie de masă cu electro-ionizare

S-a demonstrat ca spectrometria de masa cu ionizare prin electrospray (ESI-MS) este o metoda potrivita pentru studiul fulerenolului $C_{60}(OH)_{24}$ in apa si in prezenta de solutii apoase

de amoniac, atat in modul de ionizare negativ cat si pozitiv.⁵⁷ Voltajele capilarei si al fragmentorului au fost optimizate astfel incat sa se obtina un semnal stabil si cea mai buna intensitate pentru picurile atribuite fulleranolului $C_{60}(OH)_{24}$. In timp ce in modul de ionizare negativ picul de baza pentru $C_{60}(OH)_{24}$ notat $[M-H]^-$ a fost observat la m/z 1127, in modul pozitiv au putut fi observate specii incarcate multiplu cum ar fi: $[M-H_2O+4H]^{4+}$ la m/z 279 si $[M-12H_2O+2NH_3+6H]^{6+}$ la m/z 158. In modul de ionizare negativ, fulleranolul pierde cu usurinta atat molecule de H_2O cat si radicali $OH\bullet$ și $H\bullet$ care dau nastere la numeroase specii de ioni care contin radicali fulleranolul foarte stabili si/sau radicali fulleranolul mai putin stabili.

O4.2. Arhitecturi multistrat lectina-gliconanoparticule utile pentru o detectie imbunatatita prin QCM a interactiunii zahar-proteina

Membranele biologice contin zone dense de carbohidrati care joaca un rol fundamental in procesele de recunoastere celulara prin legarea multivalenta a lectinelor. Plecand de la premisa ca o crestere a densitatii locale de carbohidrati conduce la o imbunatatire a activitatii, au fost raportate numeroase sisteme artificiale multivalente continand diferite nanosisteme (fullerena, nanotuburi de carbon, nanoparticule si nanovesicule) generatoare de nanoplatforme multivalente de carbohidrati.

In acest scop, au fost preparate compozite multistrat pe baza de gliconanoparticule si lectina organizate printr-o recunoastere specifica multivalenta carbohidrat-lectina.⁵⁸ **13,37** Strategia noastra se bazeaza pe interactiunile specifice foarte slabe dintre glucid si lectina. Interactiunile multivalente dintre gliconanoparticulele de aur si Con A pot fi utilizate eficient atat pentru construirea de compozite cu arhitecturi multistrat cat si pentru imbunatatirea detectiei QCM in cuantificarea interactiunilor dintre carbohidrati si lectina.

De asemenea, tot in acest scop au mai fost create si alte arhitecturi multistrat prin depunerea succesiva strat cu strat a gliconanohibridelor pe baza de oxid de molibden $\{Mo132\}$ /manozida $((NH_4)_{42-n}2_n1a)$ sau glicozida $(NH_4)_{42-m}3_m1a$ si ConA.⁵⁹ Aceste arhitecturi pot fi preparate cu usurinta si cuantificate folosind microgravimetria cu cristale de cuarț (QCM), care detecteaza adsorbtia de masa la suprafata senzorilor pe baza efectului piezoelectric reciproc. Gliconanocapsulele obtinute interactioneaza specific cu lectinele si se auto-asambleaza intr-o arhitectura hibrida multistrat doar in cazul in care carbohidratul multivalent prezent la exterior si situsurile de recunoastere a lectinei sunt compatibile. "Multistraturile hibride biomimetice" sunt stabile sub un debit de apa continuu si pot servi drept retele artificiale pentru o mai buna intelegere a diferitelor mecanisme biologice, de care pot beneficia in mod direct domeniul separarilor chimice, senzorilor sau dispozitivelor de stocare-livrare.

O4.3. Sensori pentru imbunatatirea spectroscopiei Raman de suprafata

Materialele hibride din nanotuburi de carbon cu un singur perete (SWNTs) și nanoparticule, în care SWNTs sunt utilizate ca platforme de asamblare pentru nanoparticule, prezintă importanță datorită multiplelor aplicații (senzori, suporturi catalitice, în spectroscopia Raman amplificată de suprafață, imagistica celulelor canceroase și terapia termică). Pentru a dezvolta o metodă nouă și simplă pentru poziționarea nanoparticulelor pe SWNTs am utilizat

ADN-ul sintetic cu un anumit design cu rol de dispersare pentru nanotuburi cât și de suport pentru sinteza particulelor metalice (Figura 37).⁶⁰

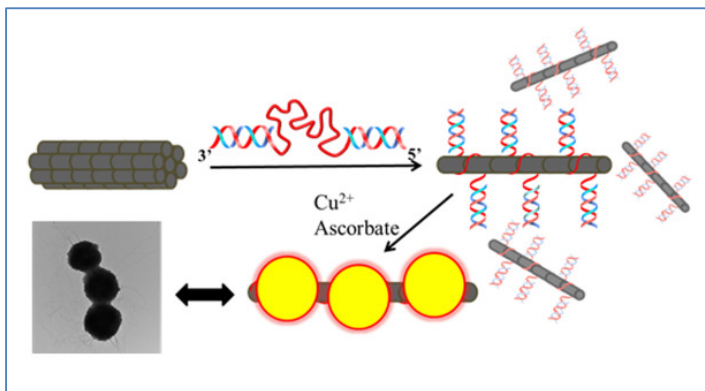


Figure 37. Dispersia nanotuburilor de carbon de către ADN-ul monocatenar cu regiuni mici de ADN dublu-catenar pentru formarea de hibrizi SWNT/CuNPs în soluție de Cu^{2+} și ascorbat de sodiu.

Secvența de ADN utilizată conține un domeniu monocatenar care va determina dispersia nanotuburilor de carbon și domenii dublu-catenare pentru creșterea selectivă a nanoparticulelor de Cu. Sistemele hibride SWCNT/CuNP rezultate au fost caracterizate prin spectroscopie de fluorescență și microscopie electronică de transmisie. Astfel de materiale se pretează la aplicații biomedicale care includ transfecția și imagistica celulelor.

O4.4. Obținerea de filme de înaltă calitate prin tehnica laser secvențială în impulsuri

Filme de ZnO și ZnO dopat cu impurități au fost studiate intens datorită potențialelor aplicații pentru diode organice emițătoare de lumină, celule solare, dispozitive cu suprafața cu unde acustice, traductoare piezoelectrice și dispozitive de detectare a gazelor. Pentru unele aplicații, filmele subțiri de oxid de zinc nepolar sunt mai potrivite.

În acest context, propunem utilizarea tehnicii de depunere secvențială cu laser pulsant pentru obținerea filmelor cu calitate superioară de ZnO Al-dopat (AZO) cu orientarea (110) pe substrat amorf. Această tehnică constă în ablația laser alternativă a două ținte metalice (de exemplu, zinc și aluminiu), la temperatura camerei, în diferite condiții experimentale (pentru diferite concentrații de dopant și presiuni de oxigen la depunere). Dependența proprietăților structurale, optice și electrice de concentrația de dopant și presiunea de oxigen la depunere a fost investigată sistematic. S-a observat o tranziție de la orientarea (002) preferențială a cristalitelor la orientare (110) mai puțin frecventă datorată efectului combinat al concentrației dopantului și scăderea presiunii de depunere. Pentru o presiune de depunere constantă de 5 Pa cristalinitatea filmului se modifică de la orientarea preferențială (002) până la policristalin cu creșterea concentrației de dopant.

Pentru concentrația maximă de dopant (4,4% at.) proprietățile structurale ale filmelor AZO se modifică de la o fază policristalin la orientarea preferențială (110) cu scăderea presiunii de depunere. Acest mod de creștere mai puțin frecventă este însoțită de o schimbare a morfologiei dintr-o structură granulară densă la una mai rară (Figura 38). În plus, diferența de bandă se lărgeste până la 3,88 eV și rezistivitatea electrică scade la $5,4 \times 10^{-2} \Omega\text{cm}$. Modificările structurale au fost atribuite următoarelor două mecanisme: primul, responsabil

pentru suprimarea fazei (002) ca urmare a bombardamentului cu ioni de aluminiu în timpul procesului de dopare și, cel de-al doilea, creșterea fazei (110) pe măsură ce vitezele de difuziune a atomilor de zinc și oxigen sunt afectate de încorporarea dopantului și scăderea presiunii de depunere.⁶¹

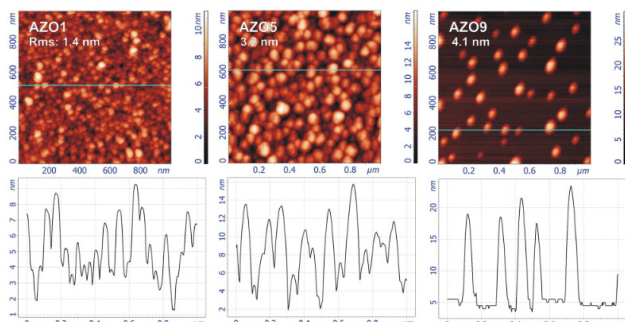


Figura 38. Imaginile AFM pentru probele cu creșterea concentrației de dopant, la o presiune de depunere de oxigen constant de 5 Pa și cu creșterea presiunii de depunere la o concentrație de dopaj constantă de 4,4% at.

O4.5. Utilizarea metodelor neinvazive (FTIR, XPS, ADX, SEM) pentru investigarea mecanismelor de degradare în țesuturile vii

Prin utilizarea metodelor FTIR, XPS, ADX, SEM ce furnizeaza informatii suplimentare s-a stabilit mecanismul de degradare al biopolimerilor keratina si cistina din unghiile psoriaticе.⁶²

O4.5. Elaborarea unor protocoale de testare electrochimică a sistemelor la nanoscară utile în transfecție

În contextul elaborat al proiectării și obținerii de vectori non-virali, tehnicile electrochimice au fost folosite în caracterizarea secvențială a compusilor sintetizați și/sau pentru a evalua formarea unor anumite structuri, punând în evidență dispariția picurilor redox atribuite anumitor grupe funcționale din precursori sau apariția unor picuri redox noi specifice complexului nou format.

O direcție de cercetare în cadrul acestui obiectiv a fost de a evalua formarea legăturii iminice, în scopul de a obține arhitecturi supramoleculare cu aplicații biomedicale. Capacitatea de auto-ordonare a unităților iminice a fost investigată electrochimic pentru o serie de compusi cu masă moleculară mică (baze Schiff având grupe brom terminale) (O3.2.).

O altă abordare importantă a fost de a evalua formarea efectivă a complexelor de incluziune între ciclodextrine și diferiți compusi, cu scopuri biomedicale sau farmacologice. Interesul principal în studiul ciclodextrinelor rezida din capacitatea acestora de a forma complexi de incluziune cu o largă varietate de molecule cu caracter hidrofob. Aplicarea tehnicilor electrochimice în caracterizarea/detecția complexelor de incluziune este posibilă numai atunci când molecula de incluziune este electroactivă, și evidențiază fie o deplasare a potențialului redox caracteristic moleculei de incluziune, fie o diminuare a curenților de pic datorită modificării esențiale a coeficientului de difuzie. Utilizând arhitecturi chimice adecvate, s-a demonstrat că toxicitatea viologenilor (1,1-di (hidroxicarbil) -4,4'-bipiridiniu)

poate fi redusă semnificativ prin interacții gazda-oaspete implicate în formarea complexelor de incluziune, transformându-le astfel în candidați de interes farmaceutic.⁶³ Alături de alte tehnici, validarea complexului de incluziune a fost făcută și prin voltametrie ciclică, arătând că interacțiunea fragmentului dipiridil din molecula oaspete de viologen cu β -ciclodextrina gazda determină modificări pronunțate în comportamentul redox (Figura 39).

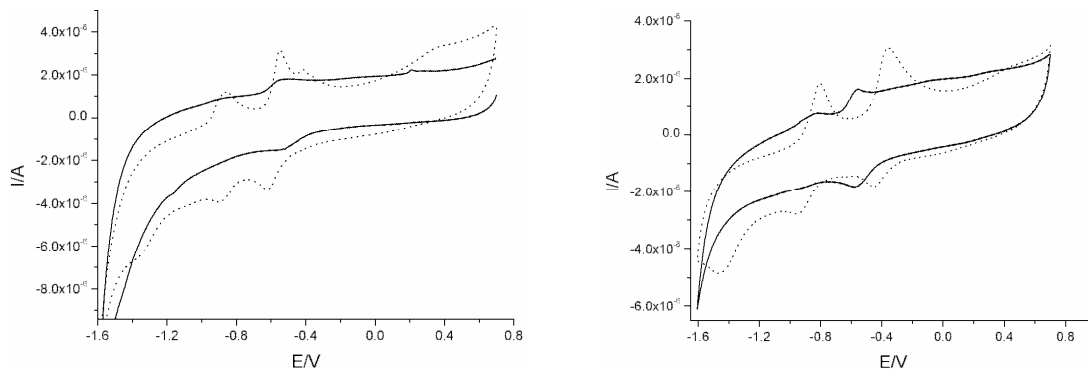


Figura 39. Comportamentul electrochimic al $bPy2+PDMS$ (linii punctate) și β - $CD/bPy2+PMDS$ (linii continue), pentru primul ciclu voltametric (a), și după 10 cicluri succesive (b).

În formarea complexelor de incluziune, un rol determinant îl au diametrul interior al cavității ciclodextrinei și dimensiunea moleculei oaspete. Influența acestor factori a fost studiată prin tehnici de voltametrie ciclică în contextul complexelor de incluziune ai thiotriazinonei (TTZ) cu α -ciclodextrina și β -ciclodextrina.⁶⁴ Derivații cu inel 1,2,4-triazinona au atras atenția în mod deosebit datorită structurii lor și diverselor aplicații în obținerea de medicamente antibacteriene, antidepresive, antivirale, pesticide și erbicide. În Fig. 2 se observă doar o ușoară alterare a picurilor redox caracteristice TTZ după reacționarea acestora cu α -CD (Figura 40a), indicând o includere parțială a moleculei TTZ în cavitatea α -CD. În schimb, asocierea β -CD cu TTZ a produs modificări remarcabile ale semnalelor electrochimice caracteristice TTZ (Figura 40b), indicând faptul că interacțiunea β -CD și TTZ a fost bine stabilită, centrul redox al TTZ este situat în interiorul cavității moleculei gazda, împiedicând transferul electronic cu electrodul.

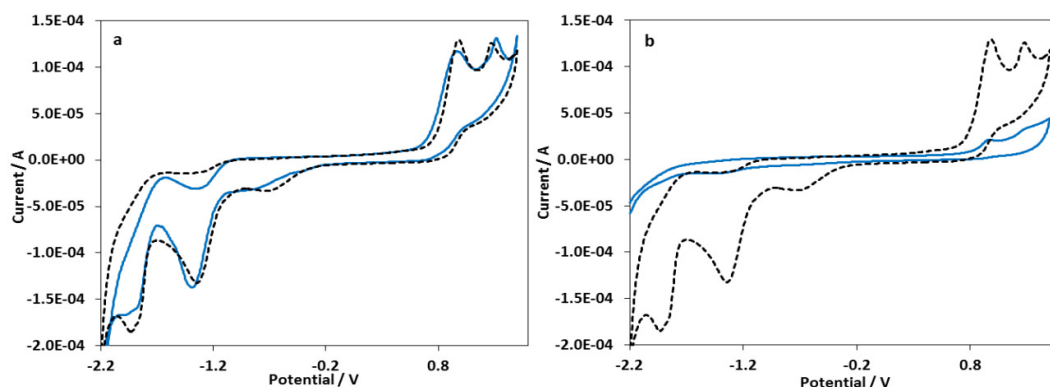


Figura 40. Activitatea electrochimică 20 mM TTZ dizolvat liber în soluție (linii punctate) și în complexul de incluziune (linii continue) cu α -CD (a) și β -CD (b) în 0.1 M NaClO₄ supporting electrolyte.

Selectivitatea procesului de complexare a mai fost studiată în cadrul acestui proiect, atunci când s-a evaluat capacitatea structurilor pe baza de eter coroață de a lega cationi metalici și organici din soluție apoasă.⁶⁵ Studiile electrochimice au demonstrat că un copolimer grefat de tipul p(HPMA-NAS-18C6) obținut prin reacția dintre N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida-co-N-acryloxysuccinimida copolimerului p(HPMA-NAS) cu 2-aminometil-18-coroană-6 (18C6), este capabil de a lega cationi de plumb (Pb²⁺) din soluție apoasă și poate fi aplicat în mod eficient ca material de electrod în dezvoltarea unui senzor electrochimic sensibil pentru Pb²⁺ (Figura 41).

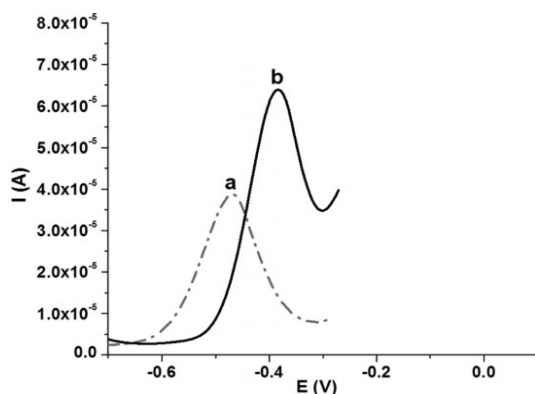


Figura 41. Raspunsul voltametric DPASV pentru 3 ppm Pb²⁺ în Tris 0.1 M. obținut la (a) electrod gol de Au și (b) electrod modificat cu p(HPMA-NAS-18C6).

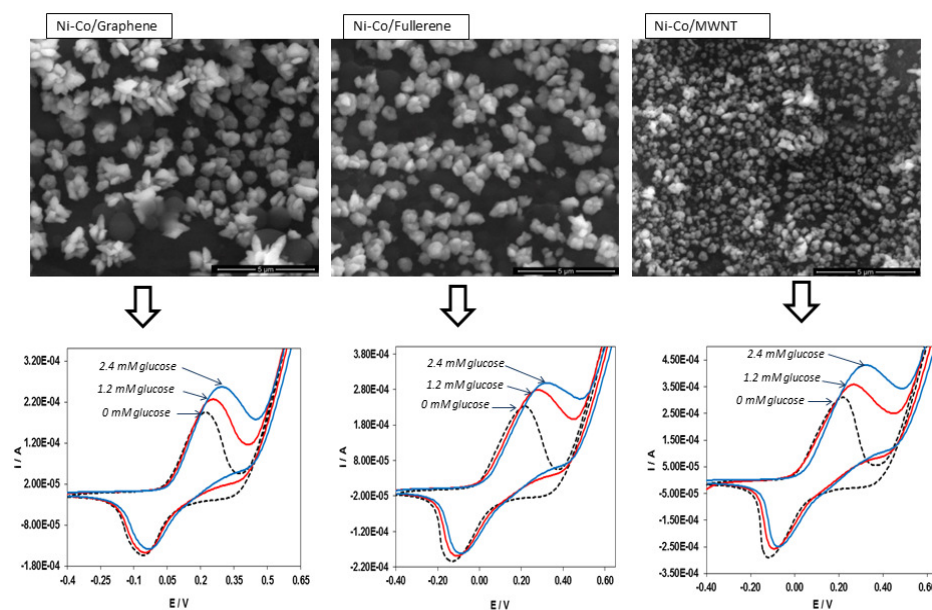


Figura 42. Nanoparticule Ni–Co depuse pe electrozi modificați cu grafen, fullerene și CNT: morfologie și răspunsul electrocatalitic față de glucoză.

În contextul sintezei controlate a diferitelor nanoparticule metalice pentru aplicații medicale, depunerea electrochimică s-a dovedit a fi o metodă eficientă pentru fabricarea de nanoparticule aliaj de tip nichel-cobalt pe materiale carbonice.⁶⁶ S-a studiat depunerea electrochimică a nanoparticulelor de Ni-Co cu diferite mărimi și morfologii pe trei tipuri de materiale carbonice folosite ca suport (grafen, fullerene și nanotuburi de carbon). S-a arătat cum modificarea condițiilor și parametrilor de operare influențează morfologia și compoziția nanoparticulelor Ni-Co, care mai departe se reflectă și în activitatea electrochimică și electrocatalitică față de oxidarea glucozei (Figura 42)

O altă direcție de cercetare importantă în contextul obiectivului stabilit al proiectului este evaluarea atașării acizilor nucleici pe sistemele utilizate în transfecție. Cea mai utilizată tehnică electrochimică, voltametria ciclică, permite investigarea prezentei ADN-ului la suprafața structurilor micelare evidențiind fie dispariția picurilor caracteristice structurilor micelare, fie apariția altora noi specifice complexului nou format. Capacitatea structurilor micelare auto-asamblate de a atașa ADN a fost evaluată studiind comparativ comportamentul electrochimic înainte și după interacțiunea cu ADN, luând în considerare faptul că guanina și adenina sunt singurele baze nucleice care pot fi oxidate, iar detectia electrochimică a ADN-ului din probe biologice se bazează pe oxidarea guaninei și/sau adeninei. În acest stadiu al studiului experimental, sensibilitatea determinărilor este foarte scăzută, întrucât și concentrația de ADN, respectiv guanina, este scăzută. Studiile sunt în curs de desfășurare, în scopul de a îmbunătăți sensibilitatea și reproductibilitatea procesului de oxidare a guaninei, implicând introducerea de compusi electroactivi care amplifică transferul electronic (datele nu sunt încă publicate).⁶⁷

Breviarul proiectului

➤ - Interdisciplinaritatea

Proiectul a prezentat un caracter interdisciplinar, derulându-se cu contribuția a șapte grupuri de lucru cu expertiză complementară. Tabelul 1 enumeră respectivele grupuri de lucru și prezintă domeniile lor de activitate.

Tabelul 1. Echipele științifice care au concurat la derularea proiectului.

Echipa	Afilierea	Coordonatorul	Domeniul de expertiză
CO	Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” – Grupul de studii în bio-nano-conjugate	Dr. Mariana Pinteală, Director de proiect	- sinteză organică; - sinteza, funcționalizarea și conjugarea polimerilor, - funcționalizarea fullerenei; - investigații fizico-chimice;
P1	Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” – Grupul de proiectare moleculară	Acad. Bogdan C. Simionescu <i>Scientific Manager</i>	- proiectare moleculară <i>in silico</i> ; - proiectarea arhitecturilor supra-moleculare; - modelarea sistemelor chimice; - validarea structurilor chimice;
P2	Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” – Grupul de studii în asamblarea supra-moleculară	Dr. Mihail Bărboiu	- sinteza avansată a structurilor (macro)moleculare și a agregatelor supramoleculare cu structuri proiectate; - funcționalizarea arhitecturilor (supra)moleculare;
P3	Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” – Grupul de studii în fizico-chimia biosistemelor	Dr. Adrian Salic	- fizico-chimia biomoleculelor; - interacțiile biomoleculelor cu sisteme macromoleculare naturale ori de sinteză; - funcționalizarea biomoleculelor;
P4	Institutul de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu”, București	Acad. Maya Simionescu	- testarea <i>in vitro</i> , <i>ex-vivo</i> și <i>in-vivo</i> a complexelor intermoleculare ale acizilor nucleici; - studii de cito- și bio-toxicitate;
P5	Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași	Prof. dr. Geta David	- funcționalizarea polimerilor; - realizarea substraturilor destinate culturii celulare și testelor de transfecție; - inginerie tisulară;
P6	Centrul de Chimie Organică al Academiei Române “Costin D. Nenițescu”, București	Dr. Florina Dumitru	- investigații biochimice avansate; - sinteză organică; - studiul arhitecturilor (supra)moleculare.

➤ 2. - Resursele materiale și bugetul

Proiectul a beneficiat de infrastructura de cercetare experimentală și teoretică a celor patru instituții partenere, pentru realizarea studiilor de: (i) chimie computațională, modelare și proiectare a structurilor chimice, (ii) sinteza chimică, funcționalizare și conjugare între compuși biologic-activi, (iii) investigare instrumentală și imagistică științifică în domeniul chimiei, biochimiei și biomaterialelor, (iv) cultura celulară și biologie moleculară.

Bugetul total al proiectului: 6 999 150 lei

Distribuirea bugetului pe categorii de cheltuieli:

- *Cheltuieli de personal: 59.02%*
- *Cheltuieli de logistică: 21.46%*
- *Mobilități: 9.15%*
- *Regie: 10.37%*

În principal, cheltuielile de logistică au vizat: reactivii, consumabilele asociate echipamentelor de investigare instrumentală, o serie de kit-uri pentru tehnicile de cultivare a celulelor, sticlărie sofisticată și adaptată experimentelor chimice, componente destinate tehnicii de calcul.

Calitatea resursei umane: 52 de persoane:

- *Cercetători (inclusiv cercetători experimentați): 17 persoane*
- *Studenti masteranți și doctoranți: 15 persoane*
- *Post-doctoranți: 17 persoane*
- *Personal administrativ: 3 persoane*

Indicatori realizați:

	Indicatori proiect	Indicatori realizați
Resursa umană tânără	60.84 %	61.54%
Număr de lucrări publicate în reviste cotate ISI	25	90 lucrări dintre care: - 69 publicate; - 4 acceptate; - 6 proceedings; - 11 în evaluare.
Brevete	2	2
Număr de participări la conferințe		119 participări dintre care: - 67 conferințe - 52 postere
Stagii de cercetare/traininguri/workshop		
Teze de doctorat parțial finanțate din proiect		6

Bibliografie

- (1) Clima, L.; Rotaru, A.; Cojocaru, C.; Pinteala, M.; Simionescu, B. Polymer Engineering Focusing on DRUG/GENE Delivery and Tissue Engineering. In: IEEE, 2015; pp. 1–6.
- (2) Catana, R.; Barboiu, M.; Moleavin, I.; Clima, L.; Rotaru, A.; Ursu, E.-L.; Pinteala, M. Dynamic Constitutional Frameworks for DNA Biomimetic Recognition. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 2021–2024.
- (3) Clima, L.; Ursu, E. L.; Cojocaru, C.; Rotaru, A.; Barboiu, M.; Pinteala, M. Experimental Design, Modeling and Optimization of Polyplex Formation between DNA Oligonucleotides and Branched Polyethylenimine. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 9445–9456.
- (4) Turin-Moleavin, I.-A.; Doroftei, F.; Coroaba, A.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. Dynamic Constitutional Frameworks (DCFs) as Nanovectors for Cellular Delivery of DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 9005–9011.
- (5) Clima, L.; Peptanariu, D.; Pinteala, M.; Salic, A.; Barboiu, M. DyNAVectors: Dynamic Constitutional Vectors for Adaptive DNA Transfection. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 17529–17531.
- (6) Marin, L.; Ailincăi, D.; Calin, M.; Stan, D.; Constantinescu, C. A.; Ursu, L.; Doroftei, F.; Pinteala, M.; Simionescu, B. C.; Barboiu, M. Dynameric Frameworks for DNA Transfection. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, 2, 104–111.
- (7) Ardeleanu, R.; Calin, M.; Maier, S. S.; Dascalu, A. I.; Cojocaru, C.; Uritu, C. M.; Nicolescu, A.; Sillion, M.; Peptanariu, D.; Pinteala, M. Transfection-Capable PEGylated-Cyclodextrin-Containing Polycationic Nanovectors. A New Synthesis Pathway. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, sent for publication.
- (8) Uritu, C. M.; Varganici, C. D.; Ursu, L.; Coroaba, A.; Nicolescu, A.; Dascalu, A. I.; Peptanariu, D.; Stan, D.; Constantinescu, C. A.; Simion, V. Hybrid Fullerene Conjugates as Vectors for DNA Cell-Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 2433–2446.
- (9) Uritu, C. M.; Calin, M.; Maier, S. S.; Cojocaru, C.; Nicolescu, A.; Peptanariu, D.; Constantinescu, C. A.; Stan, D.; Barboiu, M.; Pinteala, M. Flexible Cyclic Siloxane Core Enhances the Transfection Efficiency of Polyethylenimine-Based Non-Viral Gene Vectors. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 8250–8267.
- (10) David, G.; Vasiliu, T.; Clima, L.; Peptanariu, D.; Balan, M.; Simionescu, B. C. Squalene/Polyethyleneimine – Based Non-Viral Gene Delivery Systems. *Lucru* **2016**.
- (11) Racles, C. Polydimethylsiloxane–indomethacin Blends and Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* **2013**, 14, 968–976.
- (12) Racles, C.; Mares, M.; Sacarescu, L. A Polysiloxane Surfactant Dissolves a Poorly Soluble Drug (Nystatin) in Water. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 443, 233–239.
- (13) Racles, C.; Iacob, M.; Butnaru, M.; Sacarescu, L.; Cazacu, M. Aqueous Dispersion of Metal Oxide Nanoparticles, Using Siloxane Surfactants. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 448, 160–168.
- (14) Petrovici, A. R.; Rosca, I.; Stoica, I.; Sillion, M.; Nicolescu, A.; Dodi, G.; Simionescu, N.; Varganici, C. D.; Ivanov, I.-C.; Pinteala, M. Biosynthesis of Exopolysaccharides by *Weissella Confusa* in a New Culture Medium. *Rom Biotech Lett* **2016**, in press.
- (15) Rosca, I.; Petrovici, A. R.; Brebu, M.; Stoica, I.; Minea, B.; Marangoci, N. An Original Method for Producing Acetaldehyde and Diacetyl by Yeast Fermentation. *Braz. J. Microbiol.* **2016**.

- (16) Fundueanu, G.; Constantin, M.; Asmarandei, I.; Bucatariu, S.; Harabagiu, V.; Ascenzi, P.; Simionescu, B. C. Poly (N-Isopropylacrylamide-Co-Hydroxyethylacrylamide) Thermosensitive Microspheres: The Size of Microgels Dictates the Pulsatile Release Mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 614–623.
- (17) Constantin, M.; Bucatariu, S.; Harabagiu, V.; Popescu, I.; Ascenzi, P.; Fundueanu, G. Poly (N-Isopropylacrylamide-Co-Methacrylic Acid) pH/Thermo-Responsive Porous Hydrogels as Self-Regulated Drug Delivery System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *62*, 86–95.
- (18) Fundueanu, G.; Constantin, M.; Bucatariu, S.; Ascenzi, P. pH/Thermo-Responsive poly(N-Isopropylacrylamide-Co-Maleic Acid) Drug Delivery System with a Sensor and an Actuator. *Polymer* **2016**, *submitted*.
- (19) Tarabukina, E. B.; Simonova, M. A.; Bucatariu, S.; Harabagiu, V.; Fundueanu, G.; Filippov, A. P. Behavior of Thermo-and pH-Responsive Copolymer of N-Isopropylacrylamide and Maleic Acid in Aqueous Solutions. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2016**, *21*, 11–17.
- (20) Constantin, M.; Bucatariu, S.; Ascenzi, P.; Simionescu, B. C.; Fundueanu, G. Poly (NIPAAm-Co- β -Cyclodextrin) Microgels with Drug Hosting and Temperature-Dependent Delivery Properties. *React. Funct. Polym.* **2014**, *84*, 1–9.
- (21) Asmarandei, I.; Fundueanu, G.; Cristea, M.; Harabagiu, V.; Constantin, M. Thermo- and pH-Sensitive Interpenetrating Poly (N-Isopropylacrylamide)/Carboxymethyl Pullulan Network for Drug Delivery. *J. Polym. Res.* **2013**, *20*, 1–13.
- (22) Bucatariu, S.; Fundueanu, G.; Prisacaru, I.; Balan, M.; Stoica, I.; Harabagiu, V.; Constantin, M. Synthesis and Characterization of Thermosensitive Poly (N-Isopropylacrylamide-Co-Hydroxyethylacrylamide) Microgels as Potential Carriers for Drug Delivery. *J. Polym. Res.* **2014**, *21*, 1–12.
- (23) Constantin, M.; Bucatariu, S.; Stoica, I.; Fundueanu, G. Smart Nanoparticles Based on Pullulan-G-poly(N-Isopropylacrylamide) for Controlled Delivery of Indomethacin. *Int J Biol Macromol* **2016**, *accepted*.
- (24) Bucatariu, S.; Constantin, M.; Ascenzi, P.; Fundueanu, G. Poly (Lactide-Co-Glycolide)/Cyclodextrin (Polyethyleneimine) Microspheres for Controlled Delivery of Dexamethasone. *React. Funct. Polym.* **2016**, *107*, 46–53.
- (25) Minea, B.; Nastasa, V.; Moraru, R.; Kolečka, A.; Flonta, M.; Marincu, I.; Man, A.; Toma, F.; Lupse, M.; Doroftei, B. Species Distribution and Susceptibility Profile to Fluconazole, Voriconazole and MXP-4509 of 551 Clinical Yeast Isolates from a Romanian Multi-Centre Study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *34*, 367–383.
- (26) Mares, M.; Minea, B.; Nastasa, V.; Bostanru, A.; Toma, V.; Cristea, V. C.; Murariu, C.; Pinteala, M.; Marincu, I.; Doroftei, B. In Vitro Inhibitory and Fungicidal Activity of Echinocandins against a Collection of Clinical Yeast Isolates from Romania. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *submitted*.
- (27) Marangoci, N. L.; Minea, B.; Nicolescu, A.; Neamtu, A.; Varganici, C. D.; Rosca, I. Inclusion Complexes of Propiconazole Nitrate with Substituted β -Cyclodextrins: Synthesis, Characterization and in Silico Assessment. *J Mater. Sci Eng* **2016**, *5*, 72.
- (28) Rosca, I.; Minea, B.; Peptanariu, D.; Marangoci, N.; Fifere, A.; Mares, M. Inclusion Complex of Propiconazole Nitrate with Substituted β -Cyclodextrin S II: In Vitro Assessment of Antifungal Properties. *J Mater. Sci Eng* **2016**, *5*, 71.

- (29) Alexandrica, M. C.; Silion, M.; Timpu, D.; Popa, M. I. A Study on the Intercalation Process of Tramadol Hydrochloride in ZnAl - Nitrate Layered Double Hydroxides. *Rev. Roum. Chim.* **2016**, *61*, accepted.
- (30) Durdureanu-Angheluta, A.; Ignat, M.-E.; Maier, S. S.; Pricop, L.; Coroaba, A.; Fifere, A.; Pinteala, M.; Chiriac, A. Lipolytic Biocatalyst Based on Recyclable Magnetite-Polysiloxane Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *292*, 898–905.
- (31) Durdureanu-Angheluta, A.; Uritu, C. M.; Coroaba, A.; Minea, B.; Doroftei, F.; Calin, M.; Maier, S. S.; Pinteala, M.; Simionescu, M.; Simionescu, B. C. Heparin-Anthranoid Conjugates Associated with Nanomagnetite Particles and Their Cytotoxic Effect on Cancer Cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 131–142.
- (32) Nicolescu, A.; Deleanu, C.; Georgescu, E.; Georgescu, F.; Iurascu, A.-M.; Shova, S.; Filip, P. Unexpected Formation of Pyrrolo [1, 2-a] Quinoxaline Derivatives during the Multicomponent Synthesis of Pyrrolo [1, 2-a] Benzimidazoles. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1486–1488.
- (33) Nicolescu, A.; Balan, M.; Georgescu, E.; Georgescu, F.; Ursu, L.; Simionescu, B. C.; Filip, P.; Deleanu, C. Benzimidazolium-Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Rev. Chim.* **2013**, *64*, 451–455.
- (34) Georgescu, E.; Nicolescu, A.; Georgescu, F.; Teodorescu, F.; Marinescu, D.; Macsim, A.-M.; Deleanu, C. New Highlights of the Syntheses of Pyrrolo [1, 2-a] Quinoxalin-4-Ones. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2377–2387.
- (35) Georgescu, E.; Nicolescu, A.; Georgescu, F.; Shova, S.; Teodorescu, F.; Macsim, A.-M.; Deleanu, C. Novel One-Pot Multicomponent Strategy for the Synthesis of Pyrrolo [1, 2-a] Benzimidazole and Pyrrolo [1, 2-a] Quinoxaline Derivatives. *Synthesis* **2015**, *47*, 1643–1655.
- (36) Georgescu, E.; Nicolescu, A.; Georgescu, F.; Teodorescu, F.; Shova, S.; Marinoiu, A. T.; Dumitrascu, F.; Deleanu, C. Fine Tuning the Outcome of 1, 3-Dipolar Cycloaddition Reactions of Benzimidazolium Ylides to Activated Alkynes. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 2507–2520.
- (37) Georgescu, E.; Nicolescu, A.; Georgescu, F.; Shova, S.; Simionescu, B. C.; Deleanu, C. Contributions to Syntheses of pyrrolo[1,2-A]benzimidazole Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. *Rev. Roum. Chim.* **2016**, *61*, 283–290.
- (38) Clima, L.; Marangoci, N.; Doroftei, F.; Ibanescu, C.; Danu, M.; Timpu, D.; Pinteala, M.; Barboiu, M. Hydrogels Based on G4 Selfassembly. *Chem. Commun.* **2016**, *in lucru*.
- (39) Marin, L.; Moraru, S.; Popescu, M.; Nicolescu, A.; Zgardan, C.; Simionescu, B. C.; Barboiu, M. Out-of-Water Constitutional Self-Organization of Chitosan–Cinnamaldehyde Dynagels. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4814–4821.
- (40) Marin, L.; Harabagiu, V.; van der Lee, A.; Arvinte, A.; Barboiu, M. Structure-Directed Functional Properties of Symmetrical and Unsymmetrical Br-Substituted Schiff-Bases. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1049*, 377–385.
- (41) David, G.; Turin-Moleavin, I.-A.; Ursu, E.-L.; Peptanariu, D.; Ailincai, D. Multilayer Biopolymer - Based Nanoparticles. *J Microencapsul* **2016**, *in evaluare*.
- (42) Lefter, C.-M.; Maier, S. S.; Maier, V.; Popa, M.; Desbrieres, J. Engineering Preliminaries to Obtain Reproducible Mixtures of Atelocollagen and Polysaccharides. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 2323–2331.

- (43) Maier, V.; Lefter, C. M.; Maier, S. S.; Butnaru, M.; Danu, M.; Ibanescu, C.; Popa, M.; Desbrieres, J. Property Peculiarities of the Atelocollagen–hyaluronan Conjugates Crosslinked with a Short Chain Di-Oxirane Compound. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *42*, 243–253.
- (44) Simionescu, B. C.; Neamtu, A.; Balhui, C.; Danciu, M.; Ivanov, D.; David, G. Macroporous Structures Based on Biodegradable Polymers—candidates for Biomedical Application. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 2689–2698.
- (45) Diaconescu, R.; Simionescu, B. C.; David, G. Control and Prediction of Degradation of Biopolymer Based Hydrogels with Poly (ϵ -Caprolactone) Subunits. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *71*, 147–154.
- (46) Balhui, C.; David, G.; Drobota, M.; Musteata, V. E. Dielectric Characterization of Biopolymer/Poly (ϵ -Caprolactone) Hydrogels. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2014**, *19*, 234–244.
- (47) David, G.; Fundueanu, G.; Pinteala, M.; Minea, B.; Dascalu, A.; Simionescu, B. C. Polymer Engineering for Drug/Gene Delivery: From Simple towards Complex Architectures and Hybrid Materials. *Pure Appl. Chem.* **2014**, *86*, 1621–1635.
- (48) Maier, S. S.; Pinteala, M.; Simionescu, B. Procedeu Pentru Controlul Caracteristicilor Particulelor de Hidroxiapatită Sintetizată În Prezența Biomacromoleculelor. *OSIM Bucur.* **2013**, *cerere de brevet A / 00710/ 27.09.2013*.
- (49) Maier, S. S.; Pinteala, M.; Maier, V.; Simionescu, A.-B. Instalație Pentru Controlul Sintezei Particulelor de Hidroxiapatită Prin Intermediul Câmpului Electric Aplicat În Regim Capacitiv. *OSIM Bucur.* **2016**, *cerere de brevet 2016*.
- (50) David, G.; Sacarescu, L.; Timpu, D.; Vasiliu, T. A Comparative Study of Functionalized Nano-Hydroxyapatite. In: IEEE, 2015; pp. 1–4.
- (51) Timpu, D.; Simionescu, B. C.; Sacarescu, L.; Vasiliu, T.; David, G. Functional Hydroxyapatite Synthesis and Possible Applications- a Comparative Study. *Int J Biol Macromol* **2016**, *in lucru*.
- (52) Constantinescu, C. A.; Stan, D.; Uritu, C. M.; Pinteala, M.; Simionescu, M.; Calin, M. Dynamin-Dependent Endocytosis Is the Main Pathway Involved in DNA Transfection of HEK 293T Cells by Siloxane/PEI-DNA Polyplexes. In: Bulletin of RSCB: Oradea, Romania, 2016; p. 59.
- (53) Marin, L.; Ailincăi, D.; Mares, M.; Paslaru, E.; Cristea, M.; Nica, V.; Simionescu, B. C. Imino-Chitosan Biopolymeric Films. Obtaining, Self-Assembling, Surface and Antimicrobial Properties. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *117*, 762–770.
- (54) Ailincăi, D.; Bejan, A.; Titorencu, I.; Drobota, M.; Simionescu, B. C. IMINO-CHITOSAN DERIVATIVES. SYNTHETIC PATHWAY AND PROPERTIES. *Rev Roum Chim* **2014**, *59*, 385–392.
- (55) Marin, L.; Stoica, I.; Mares, M.; Dinu, V.; Simionescu, B. C.; Barboiu, M. Antifungal Vanillin–imino-Chitosan Biodynameric Films. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3353–3358.
- (56) Rotaru, A.; Cojocaru, C.; Cretescu, I.; Pinteala, M.; Timpu, D.; Sacarescu, L.; Harabagiu, V. Performances of Clay Aerogel Polymer Composites for Oil Spill Sorption: Experimental Design and Modeling. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *133*, 260–275.

- (57) Silion, M.; Dascalu, A.; Pinteala, M.; Simionescu, B. C.; Ungurenasu, C. A Study on Electrospray Mass Spectrometry of Fullerenol C₆₀ (OH) 24. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1285–1295.
- (58) Mahon, E.; Mouline, Z.; Silion, M.; Gilles, A.; Pinteala, M.; Barboiu, M. Multilayer Lectin–glyconanoparticles Architectures for QCM Enhanced Detection of Sugar–protein Interaction. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3004–3006.
- (59) Barboiu, M.; Mouline, Z.; Silion, M.; Licsandru, E.; Simionescu, B. C.; Mahon, E.; Pinteala, M. Multivalent Recognition of Concanavalin A by {Mo132} Glyconanocapsules—Toward Biomimetic Hybrid Multilayers. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6678–6683.
- (60) Ursu, E.; Clima, L.; Hejesen, C.; Rotaru, A.; Pinteala, M. DNA-Mediated Copper Nanoparticle Formation on Dispersed Single-Walled Carbon Nanotubes. *Helv. Chim. Acta* **2015**, *98*, 1141–1146.
- (61) Coman, T.; Ursu, E. L.; Nica, V.; Tiron, V.; Olaru, M.; Cotofana, C.; Dobromir, M.; Coroaba, A.; Dragos, O.-G.; Lupu, N. Improving the Uncommon (110) Growing Orientation of Al-Doped ZnO Thin Films through Sequential Pulsed Laser Deposition. *Thin Solid Films* **2014**, *571*, 198–205.
- (62) Coroaba, A.; Pinteala, T.; Chiriac, A.; Chiriac, A. E.; Simionescu, B. C.; Pinteala, M. Degradation Mechanism Induced by Psoriasis in Human Fingernails: A Different Approach. *J. Invest. Dermatol.* **2016**, *136*, 311–313.
- (63) Marangoci, N.; Maier, S. S.; Ardeleanu, R.; Arvinte, A.; Fifere, A.; Petrovici, A. R.; Nicolescu, A.; Nastasa, V.; Mares, M.; Pasca, S. A. Low Toxicity β -Cyclodextrin-Caged 4, 4'-Bipyridinium-Bis (Siloxane): Synthesis and Evaluation. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 546–557.
- (64) Arvinte, A.; Marangoci, N.; Nicolescu, A.; Pinteala, M. Electrochemical Evidence for Inclusion Complexes of Thiotriazinone with Cyclodextrins. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 82817–82823.
- (65) Simionca, I.-M.; Arvinte, A.; Pinteala, M. Crown Ether-Based Structures for Sensitive Electrochemical Detection. *High Perform. Polym.* **2015**, *27*, 669–675.
- (66) Arvinte, A.; Doroftei, F.; Pinteala, M. Comparative Electrodeposition of Ni–Co Nanoparticles on Carbon Materials and Their Efficiency in Electrochemical Oxidation of Glucose. *J. Appl. Electrochem.* **2016**, *46*, 425–439.
- (67) Arvinte, A.; Ignat, M.-E.; Pinteala, M.; Ignat, L. Electrochemical Survey of Silver Nanoparticles-Lignosulfonate Formation and Their Assessment in the Electrocatalytic Oxidation of P-Nitrophenol. *Curr. Anal. Chem.* **2016**, *in evaluate*.