



Școala de Studii Avansate a Academiei Române – SCOSAAR  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE CHIMICE – SDSC  
Aleea Grigore Ghica Voda 41A, 700487-Iași, România  
Telefon +4 0332 880 220, Email: secretariatsdsc@icmpp.ro

---

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

***SISTEME INTELIGENTE PENTRU TRANSPORTUL DE***  
***SPECII CHIMICE ACTIVE. OBTINERE.***  
***CARACTERIZARE***  
**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Conducător de doctorat:  
DR. PINTEALĂ MARIANA

Student-doctorand:  
COȘEREANU (căs. ZONDA) RADU

2024

## CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI.....	3
INTRODUCERE.....	5
PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	9
CAPITOLUL 1. CANALE IONICE ARTIFICIALE CA SISTEME BIOMIMETICE PENTRU TRANSPORTUL IONIC PRIN MEMBRANE LIPIDICE.....	10
1.1. Chimia supramoleculară – auto-asamblarea în formarea sistemelor biomimetice pentru transportul ionic.....	10
1.2. Structura și caracteristicile canalelor ionice.....	13
1.3. Transportul prin membrane.....	15
1.4. Transportul prin membrane biologice.....	17
1.5. Evaluarea capacității de transport prin membrane lipidice dublu-strat.....	22
1.5.1. Evaluarea transportului ionic prin spectroscopie de fluorescență.....	22
1.5.2. Evaluarea selectivității canalelor ionice prin testul de etanșitate (Leakage-test)..	24
1.5.3. Determinarea permeabilității membranelor lipidice prin metoda „stopped-flow” ..	25
CAPITOLUL 2. SISTEME DE TRANSPORT ȚINTIT AL MOLECULELOR BIOACTIVE ÎN ORGANISM.....	27
2.1. Biomarkeri sangvini – importanța lor în designul sistemelor de transport țintit.....	27
2.2. Lipozomii utilizați în transportul țintit al medicamentelor.....	29
2.2.1. Definiție, structură și clasificare.....	29
2.2.2. Metode de obținere a lipozomilor.....	30
2.2.3. Caracterizarea lipozomilor.....	32
2.2.4. Aplicații ale lipozomilor în terapia țintită.....	34
PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	38
CAPITOLUL 3. ANSAMBLURI SUPRAMOLECULARE BIOMIMETICE PENTRU TRANSPORTUL IONILOR PRIN MEMBRANE LIPIDICE.....	39
3.1. Introducere - Eterii coroană și transportul ionic.....	39
3.2. Auto-asamblarea prin punți de hidrogen în membrana lipidică a benzo-eterilor coroană monofuncționalizați cu grupări alchil ureice.....	41
3.2.1. Designul și sinteza compușilor sintetizați.....	41
3.2.2. Materiale și metode.....	42
3.2.3. Rezultate și discuții.....	46
3.2.4. Concluzii.....	85

3.3. Eteri coroană funcționalizați cu proprietăți de auto-asamblare prin interacțiuni $\pi - \pi$ în medii cu polarități diferite pentru transportul cationilor alcalini.....	86
3.3.1. Introducere.....	86
3.3.2. Studiul aranjamentelor supramoleculare a derivaților de tip di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6.....	89
3.3.3. Studiul aranjamentelor supramoleculare ale derivaților de tip di-azopirenil-dibenzo-eter-18-coroană-6 în medii cu polarități diferite pentru transportul cationilor alcalini.....	119
CAPITOLUL 4. EVALUAREA POTENȚIALULUI ENDOCANULUI CA BIOMARKER - UN PRIM PAS ÎN DESIGNUL SISTEMELOR INTELIGENTE PENTRU DETECȚIA RAPIDĂ A ENDOCANULUI DIN PROBELE BIOLOGICE.....	150
4.1. Introducere.....	150
4.2. Materiale și metode.....	151
4.2.1. Design-ul experimental pentru includerea în studiu a nou-născuților cu sepsis neonatal.....	151
4.2.2. Evaluarea nivelurilor de endocan.....	154
4.2.3. Analiza statistică.....	154
4.3. Rezultate și discuții.....	154
4.3.1. Determinarea nivelurilor serice bazale de endocan la nou-născuții din lotul de control.....	154
4.3.2. Determinarea nivelurilor serice de endocan în sepsisul neonatal precoce.....	156
4.4. Concluzii.....	165
CONCLUZII GENERALE.....	166
PERSPECTIVE.....	169
DISEMINAREA REZULTATELOR.....	170
BIBLIOGRAFIE.....	174

## INTRODUCERE

În ultimele decenii, nanotehnologia a revoluționat modul în care este abordat transportul chimic. Nanoparticulele și nanosistemele pot fi proiectate și programate pentru a livra molecule specifice în locuri precise din corp. În domeniul terapiei genetice și al ingineriei genetice, sistemele de transport au avansat considerabil pentru a permite livrarea precisă a genelor și proteinelor în celulele țintă. Cu avansul tehnologiilor informatice și a inteligenței artificiale s-au dezvoltat sisteme inteligente de transport care pot monitoriza și controla livrarea substanțelor chimice în timp real.

Sistemele de transport inteligent pentru speciile chimice active într-un mediu biologic sunt esențiale în domeniul medical, permițând livrarea precisă a medicamentelor și aplicarea terapiilor, reducând efectele secundare și îmbunătățind tratamentele. În biotehnologie și inginerie genetică, aceste sisteme facilitează livrarea și integrarea precisă a genelor și proteinelor, având potențialul de a revoluționa terapiile genetice. În plus, pot fi folosite în diagnosticare, crescând rapiditatea și acuratețea diagnosticelor, și în protejarea mediului înconjurător, detectând și eliminând poluarea chimică. În concluzie, sistemele de transport inteligent pentru speciile chimice active aduc numeroase beneficii, incluzând îmbunătățirea tratamentelor medicale, progresul în ingineria genetică, diagnosticarea medicală precisă, protejarea mediului și economii semnificative și reprezintă un instrument vital în domeniile științifice și medicale cu un potențial semnificativ în avansarea cunoștințelor și îmbunătățirea vieții. Acest deziderat permite implementarea de noi structuri funcționale inovative necesare în perfecționarea metodelor de administrare țintită a principiilor active prin intermediul markerilor biologici specifici.

În acest context, tema de cercetare abordată în cadrul prezentei teze de doctorat, **„Sisteme inteligente pentru transportul de specii chimice active. Obținere. Caracterizare”**, se încadrează în tendințele actuale ale cercetărilor prin dezvoltarea de sisteme supramoleculare de tip canal ionic pentru transportul cationilor prin membrane naturale sau artificiale. Teza și-a propus, de asemenea, să abordeze și identificarea unui marker specific sepsisului neonatal precoce în vederea ulterioară a proiectării unui sistem pentru eliberarea principiilor active la situsurile afectate, identificate cu ajutorul markerului.

Teza de doctorat a beneficiat de finanțare prin proiectul internațional **ORIZONT 2020**, „**SupraChem Lab - Laboratory of Supramolecular Chemistry for Adaptive Delivery Systems - ERA Chair initiative**”, derulat în cadrul Centrului de Cercetări Avansate pentru Bionanoconjugate și Biopolimeri, Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași.

Proiectul menționat a avut ca scop să promoveze excelența în cercetare, prin înființarea unui grup specializat în proiectarea, sinteza și caracterizarea de structuri supramoleculare adaptive auto-organizate. În acest context, în cadrul unui subgrup de cercetare s-a abordat dezvoltarea de sisteme interactive dinamice utilizate în constituirea canalelor de apă și ionice cu ajutorul unor compuși mic moleculari capabili să se autoasambleze în structuri supramoleculare funcționale în interiorul membranelor lipidice dublustrat.

Subiectul tezei corespunde tematicii de cercetare a acestui proiect, urmărind integrarea studiului canalelor ionice artificiale obținute prin organizare supramoleculară dinamică, în sisteme de transport inteligente. Aceste sisteme sunt capabile să îndeplinească funcții complexe într-un ansamblu biologic, ducând la dezvoltarea de noi proceduri de eliberare controlată de principii active.

Cercetarea integrată în teza de doctorat urmărește ideea transportului de principii active înglobate în lipozomi și eliberarea acestora într-un punct țintă. Avantajul utilizării sistemelor lipozomale în studierea transportului speciilor active în mediu biologic constă în similaritatea membranei acestora cu membrana celulară. În acest sens, în cadrul tezei de doctorat au fost dezvoltate strategii de creare a canalelor ionice, prin autoasamblarea compușilor mic moleculari, în membrana lipozomală și identificarea endocanului ca biomarker în sepsis la nou-născuți.

Pentru formarea de structuri supramoleculare autoasamblate în membrana lipozomală s-au studiat derivați de eteri coroaă capabili să formeze structuri supramoleculare tip canal ionic prin intermediul punților de hidrogen sau interacțiunilor de tip  $\pi$ - $\pi$  asigurate de funcțiunile atașate eterului coroaă. Pentru evaluarea capacității de transport s-au folosit metode experimentale, bazate pe transportul ionic prin membrane lipozomale și metode teoretice de calcul computerizat.

Teza de doctorat se împarte în **două secțiuni**. **Prima secțiune** este o prezentare generală a sistemelor de transport pe bază de lipozomi și oportunitatea aplicării lor în transportul țintit al speciilor active, iar **a doua secțiune** a tezei expune rezultatele proprii asupra experimentelor efectuate atât pentru evaluarea capacității de transport a derivaților de eteri coroaă studiați, cât și investigarea posibilității folosirii endocanului ca biomarker în sepsisul la nou-născuți.

Pentru evaluarea transportului ionic prin membrane lipidice s-a folosit metoda HPTS, care implică utilizarea spectroscopiei de fluorescență, utilizând vezicule unilamelare de dimensiuni mari (100  $\mu\text{m}$ ) cu membrane lipidice dublu-strat (lipozomi) și a unui fluorofor sensibil la pH, 8-hidroxi-piren-1, 3, 6 – trisulfonat de sodiu (HPTS). Metoda constă în introducerea fluoroforului în interiorul veziculei pentru a detecta modificările de pH datorate transportului ionic prin membrană. Prin acest procedeu s-a investigat auto-asamblarea compușilor de tip alchil-benzoureido-eteri-coroană prin intermediul punților de hidrogen, cu formare de canale ionice în interiorul membranei lipozomale. Prin testele HPTS s-a observat existența transportului ionic, iar calculele de dinamică moleculară au sugerat un proces de transport de tip „carrier” datorat translației moleculelor de alchil-benzoureido-eteri coroană de la o față la alta a membranei lipidice.

S-a explorat, de asemenea, și posibilitatea autoasamblării în medii cu polarități diferite a doi derivați de eter-18-coroană-6 funcționalizați cu grupări de piren legate simetric prin intermediul grupărilor iminice, respectiv azo. Rezultatele experimentale obținute prin absorbția UV-vis, fluorescență și WAXD au fost corelate cu calcule computerizate de mecanică cuantică în starea fundamentală și dinamică moleculară. În urma coroborării rezultatelor experimentale și teoretice s-a observat că cei doi compuși sunt capabili să formeze ”stive” pirenice, mai ordonate sau mai puțin ordonate în funcție de polaritatea mediului sau a secvenței organice prin care a fost realizată atașarea unităților de piren. Astfel, dacă grupările pirenice au fost atașate eterului coroană prin legături iminice se formează ”stive” compuse din doar 2-3 molecule, în timp ce atunci când grupările pirenice s-au atașat prin intermediul legăturilor -N=N- (azo) rezultă o geometrie planară a moleculei, fapt ce favorizează formarea de ”stive” pirenice ordonate compuse dintr-un număr semnificativ de molecule.

Investigarea endocanului, ca potențial biomarker în sepsisul neonatal precoce, este un studiu prospectiv privind utilizarea ulterioară a acestuia ca țintă în proiectarea sistemelor inteligente de transport a principiilor active în combaterea sepsisului. Din studiile efectuate în cadrul acestui capitol se poate extrage concluzia că endocanul poate fi considerat un marker util în diagnosticul sepsisului neonatal precoce, cât și în urmărirea evoluției sub tratament.

Informațiile extrase prin prezenta teză de doctorat au implicat studii interdisciplinare complexe în domenii precum chimia supramoleculară, fizică, chimie fizică, calcule computerizate, biologie, biochimie și medicină. Acestea reprezintă modele pentru dezvoltări ulterioare ale sistemelor de transport prin canale ionice sintetice create în membranele lipozomale.

**PARTEA a II-a**  
**CONTRIBUȚII ORIGINALE**

**CAPITOLUL 3. ANSAMBLURI SUPRAMOLECULARE BIOMIMETICE PENTRU  
TRANSPORTUL IONILOR PRIN MEMBRANE LIPIDICE**

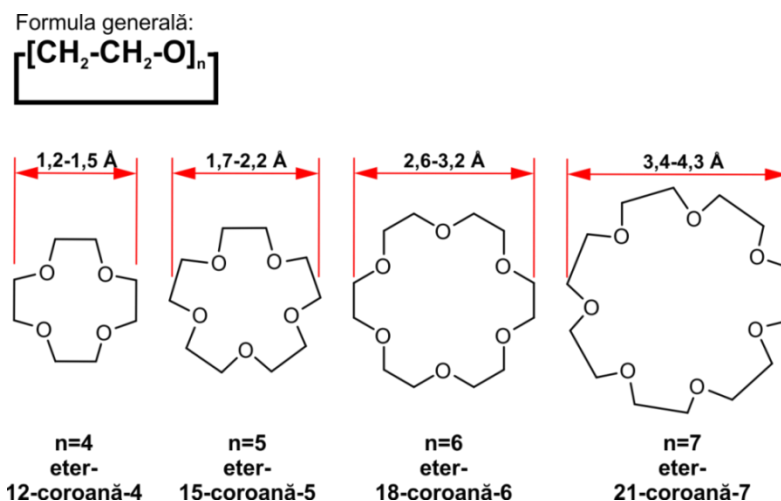
**Obiectiv general:** Prepararea și caracterizarea canalelor ionice prin auto-asamblarea în membrane lipidice pe bază de fosfatidilcolină;

**Obiective specifice:**

- Preparare de canale ionice pe bază de benzo-eteri-coroană monofuncționalizați cu grupări alchil-ureice;
- Preparare de canale ionice pe bază de dibenzo-eteri coroană difuncționalizați simetric cu grupări azo-pirenice sau imino-pirenice.

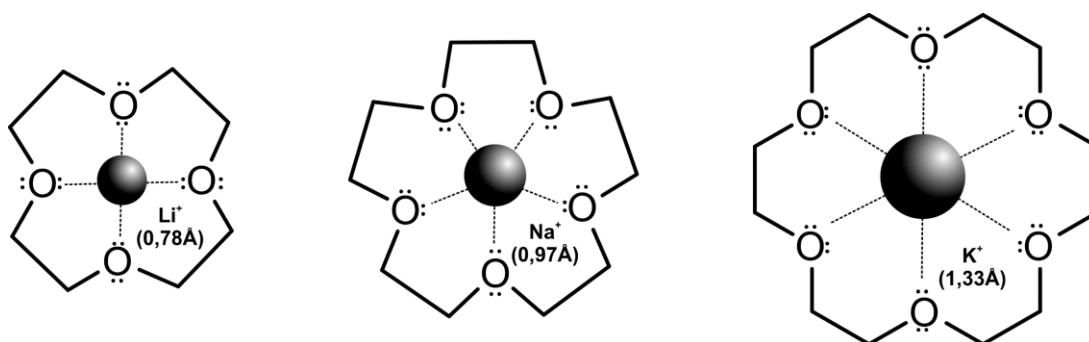
**3.1. Introducere - Eterii coroană și transportul ionic**

Eterii coroană sunt compuși organici polieterici macrociclici, ceea ce înseamnă că sunt alcătuiți din mai multe grupe eterice [1]. Cei mai comuni eteri coroană sunt oligomerii ciclici ai etilenoxidului, unitatea repetitivă din moleculă fiind restul etilenoxi [2],  $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{O]}_n-$ . Cei mai importanți reprezentanți ai acestei clase de compuși sunt tetramerul ( $n = 4$ ), pentamerul ( $n = 5$ ), hexamerul ( $n = 6$ ) și heptamerul ( $n=7$ ), formule evidențiate și în Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Dimensiunile și structurile chimice ale celor mai utilizați eteri coroană (adaptat după referința [3])

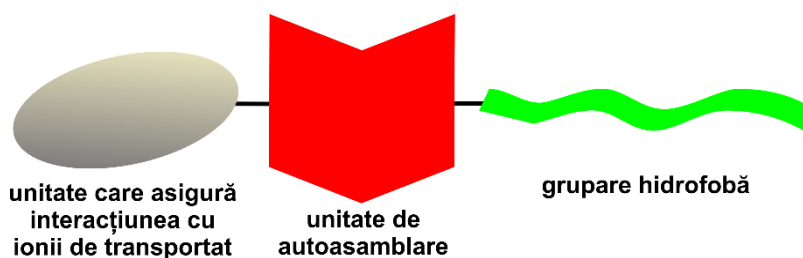
Este bine cunoscut în literatură faptul că eterii coroană formează complecși cu ionii metalelor alcaline, afinitatea dintre aceștia fiind determinată în principal de raza ionică coroborată cu dimensiunea ciclului eterului coroană (Figura 3.2) [3–5].



**Figura 3.2.** Complecși ai metalelor alcaline cu eteri coroană (adaptat după referința [5])

Capacitatea eterilor coroană de a interacționa selectiv cu ionii alcalini poate fi folosită în construcția de canale ionice, componente în structura membranelor lipidice dublu-strat. Pentru ca un compus să formeze canale ionice prin auto-asamblare în membranele lipidice dublu-strat, acesta trebuie să respecte cumulativ mai multe criterii (Figura 3.3):

1. Să poată forma legături intermoleculare – pentru auto-asamblare
2. Să interacționeze cu ionii transportați – pentru selectivitate
3. Să prezinte o parte hidrofobă – pentru integrarea în stratul lipidic



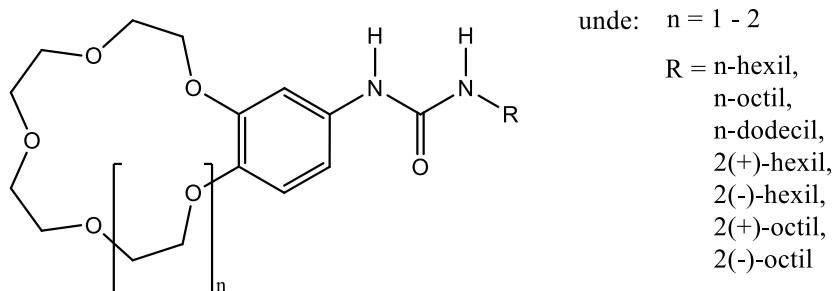
**Figura 3.3.** Componentele necesare unei molecule pentru a forma structuri supramoleculare capabile să îndeplinească funcția de canale ionice

## 3.2. Auto-asamblarea prin punți de hidrogen în membrana lipidică a benzo-eterilor coroană monofuncționalizați cu grupări alchil ureice

### 3.2.1. Designul și sinteza compușilor sintetizați

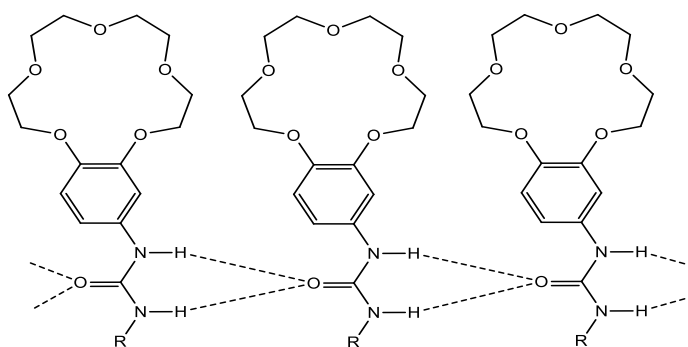
În acest studiu am investigat capacitatea de auto-asamblare prin punți de hidrogen și a transportului ionic ai compușilor de tip alchil-benzoureido-eteri-coroană prin membrana lipozomală de fosfatidilcolină. Structura compușilor sintetizați în acest scop este prezentată în Schema 3.1.



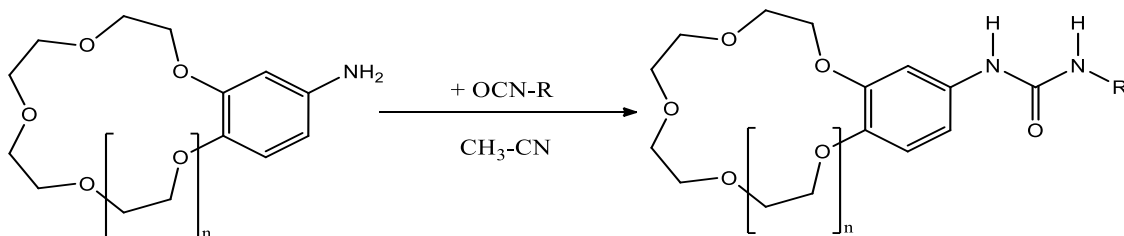


**Schema 3.1.** Structura generală a compușilor sintetizați de tip alchil-benzourea-eter-coroană.

Compușii sintetizați prezintă trei situsuri caracteristice: (a) eterul coroană, care asigură transportul ionic; (b) gruparea hidrofobă, reprezentată de radicalul alchilic liniar sau ramificat; (c) gruparea capabilă să formeze punți intermoleculare de hidrogen, reprezentată de gruparea ureică [6]. Schema 3.2 prezintă principiul de agregare al unităților de benzourea-eteri coroană în structuri supramoleculare, iar Schema 3.3 prezintă reacția de obținere a alchil-benzourea-eterilor coroană studiați.



**Schema 3.2.** Principiul agregării unităților de benzourea-eteri-coroană în structuri supramoleculare (adaptat după referințele [6,7])



**Schema 3.3.** Obținerea alchil-benzourea-eterilor coroană studiați, unde  $n$  și  $R$  se regăsesc în Tabelul 3.1.

### 3.2.2.2. Sinteza benzoeterilor coroană funcționalizați cu grupări alchil-ureice

Pentru prepararea compușilor de tip alchil-benzoureido-eteri coroană au fost dizolvați 50 mg amino-benzo-eter-15-coroană-5 în 2 mL acetonitril, peste care s-au adăgat 1,1 volume alchil-izocianat corespunzător obținerii compusului necesar, conform Tabelului 3.1. Amestecul de reacție a fost refluxat timp de 24 de ore. Toate operațiunile s-au desfășurat sub atmosferă de azot uscat. După reflux, amestecul de reacție a fost menținut la -20 °C timp de 24 de ore, apoi filtrat rapid. Precipitatul a fost uscat sub vid timp de 3 zile.

**Tabelul 3.1.** Resturile alchil (R) și dimensiunea eterului coroană (n) corespunzătoare compușilor sintetizați (Schema 3.3.).

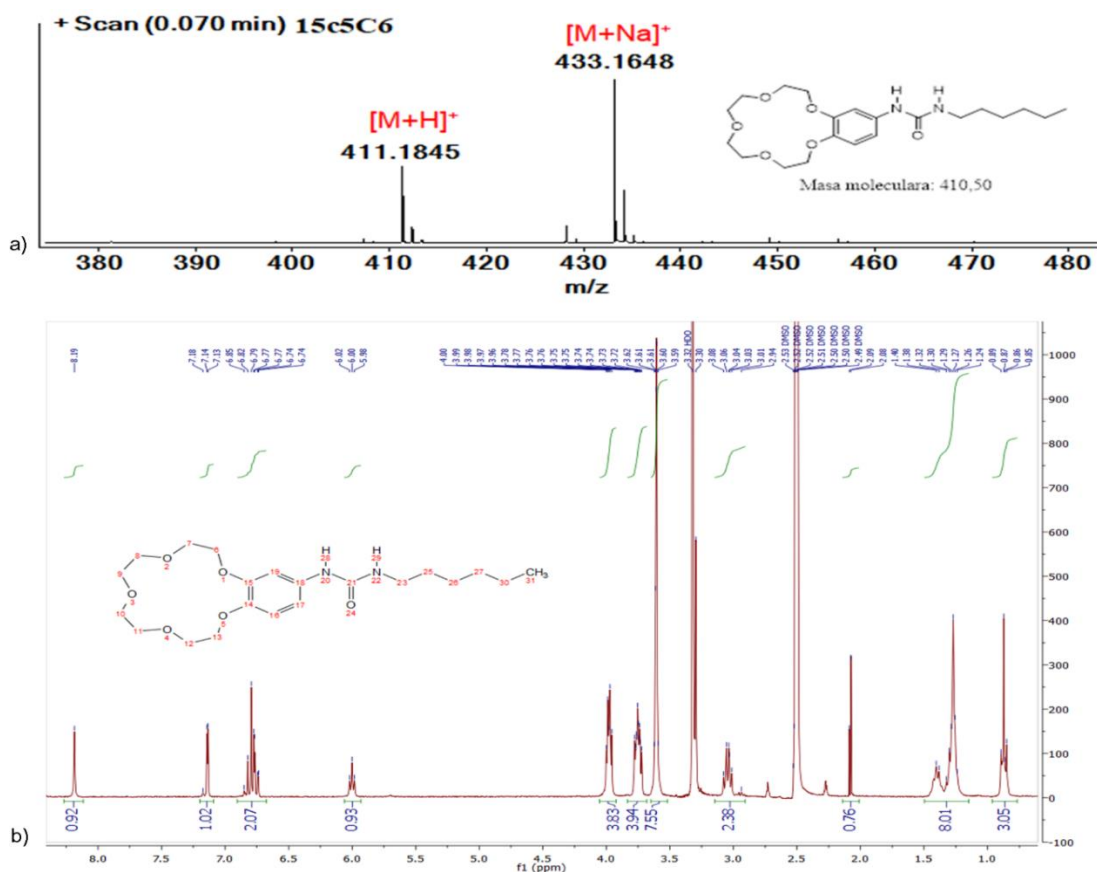
	<b>R</b>	<b>n</b>	<b>Denumire compus</b>	<b>Cod compus</b>	<b>Masă moleculară teoretică</b>
1	butil	1	Butil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C4	382,45
2	hexil	1	Hexil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C6	410,50
3	hexil	2	Hexil-benzoureido-eter-18-coroană-6	18c6C6	454,56
4	octil	1	Octil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C8	438,56
5	dodecil	1	Dodecil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C12	494,66
6	(s)-(+)-2-hexil	1	(s)-(+)-2-hexil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C6+	410,50
7	(r)-(-)-2-hexil	1	(r)-(-)-2-hexil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C6-	410,50
8	(s)-(+)-2-octil	1	(s)-(+)-2-octil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C8+	438,56
9	(r)-(-)-2-octil	1	(r)-(-)-2-octil-benzoureido-eter-15-coroană-5	15c5C8-	438,56

### 3.2.2.3. Caracterizarea structurală a compușilor benzoeterilor coroană funcționalizați cu grupări alchil-ureice

Spectrele <sup>1</sup>H-RMN au fost înregistrate în dimetil sulfoxid-d<sub>6</sub> (DMSO-d<sub>6</sub>), utilizând un spectrometru DRX 300 MHz (Bruker Scientific Instruments, Billerica, MA USA), iar analiza prin spectrometrie de masă cu ionizare electrospray (ESI-MS) a fost efectuată pentru a confirma structura compușilor sintetizați folosind sistemul LC/MS Agilent 6500 Series Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA USA).

### 3.2.2.4. Prepararea lipozomilor pe bază de fosfatidilcolină încărcăți cu 8-hidroxi-piren-1, 3, 6 – trisulfonat de sodiu (HPTS)

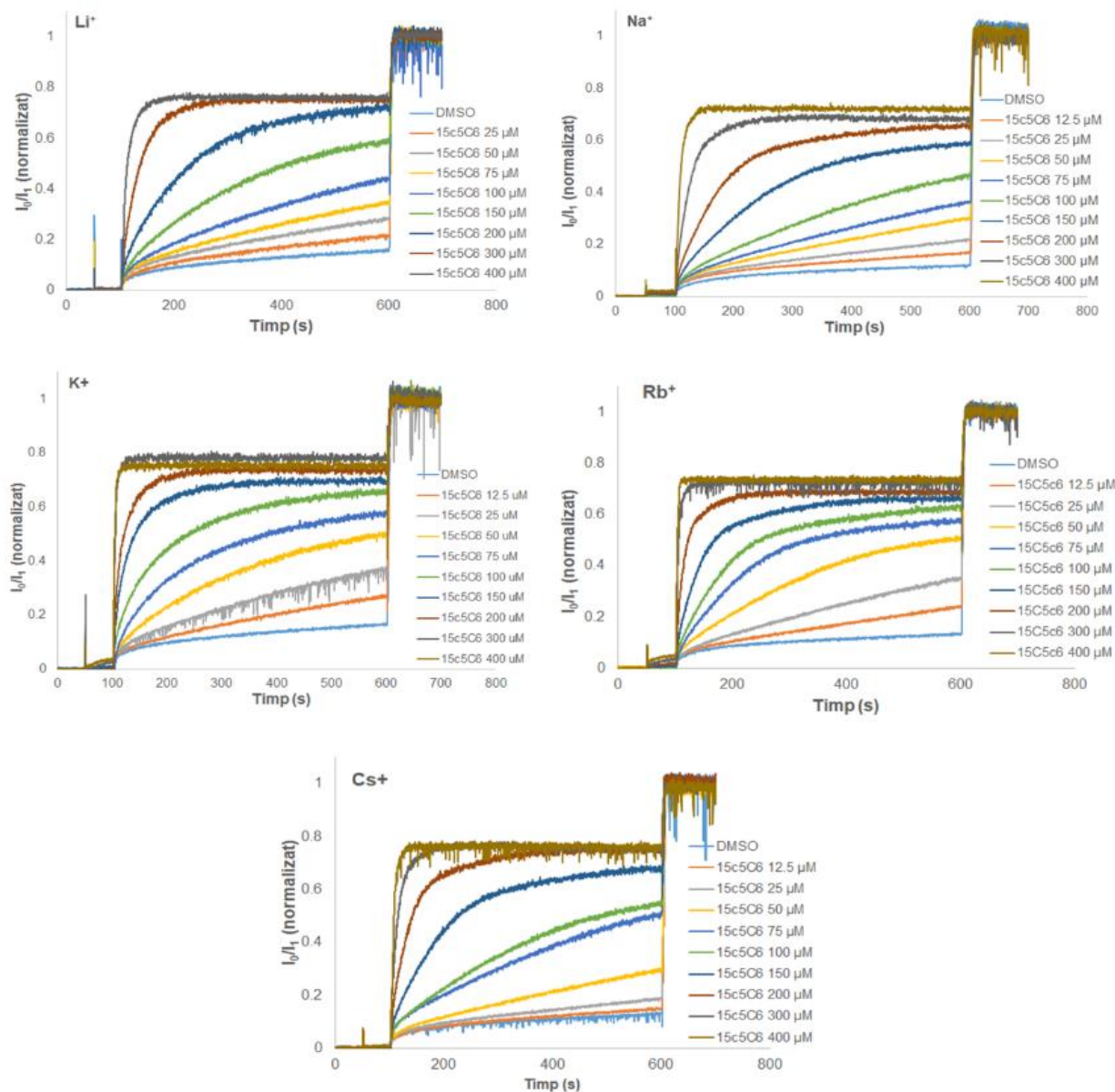
Lipozomii au fost obținuți prin solubilizarea L- $\alpha$ -fosfatidilcolină (EYPC), în solvent organic, urmată de evaporarea solventului organic și obținerea unui film de L- $\alpha$ -fosfatidilcolină. Acesta a fost apoi hidratat prin agitare manuală cu o soluție tampon fosfat salin (PBS, pH=6,5) care conține 8-hidroxi-piren-1, 3, 6 – trisulfonat de sodiu (HPTS). După ce filmul s-a dispersat complet în soluția apoasă, soluția rezultată a fost supusă unor cicluri de îngheț/dezghet succesive și rapide, urmate de extrudare, utilizând un extruder prevăzut cu un filtru cu diametrul porilor de 100 nm. Veziculele obținute au fost purificate prin trecerea pe o coloană de Dextran G-50 și spălarea lipozomilor cu PBS pentru îndepărtarea HPTS din mediul exterior [8].



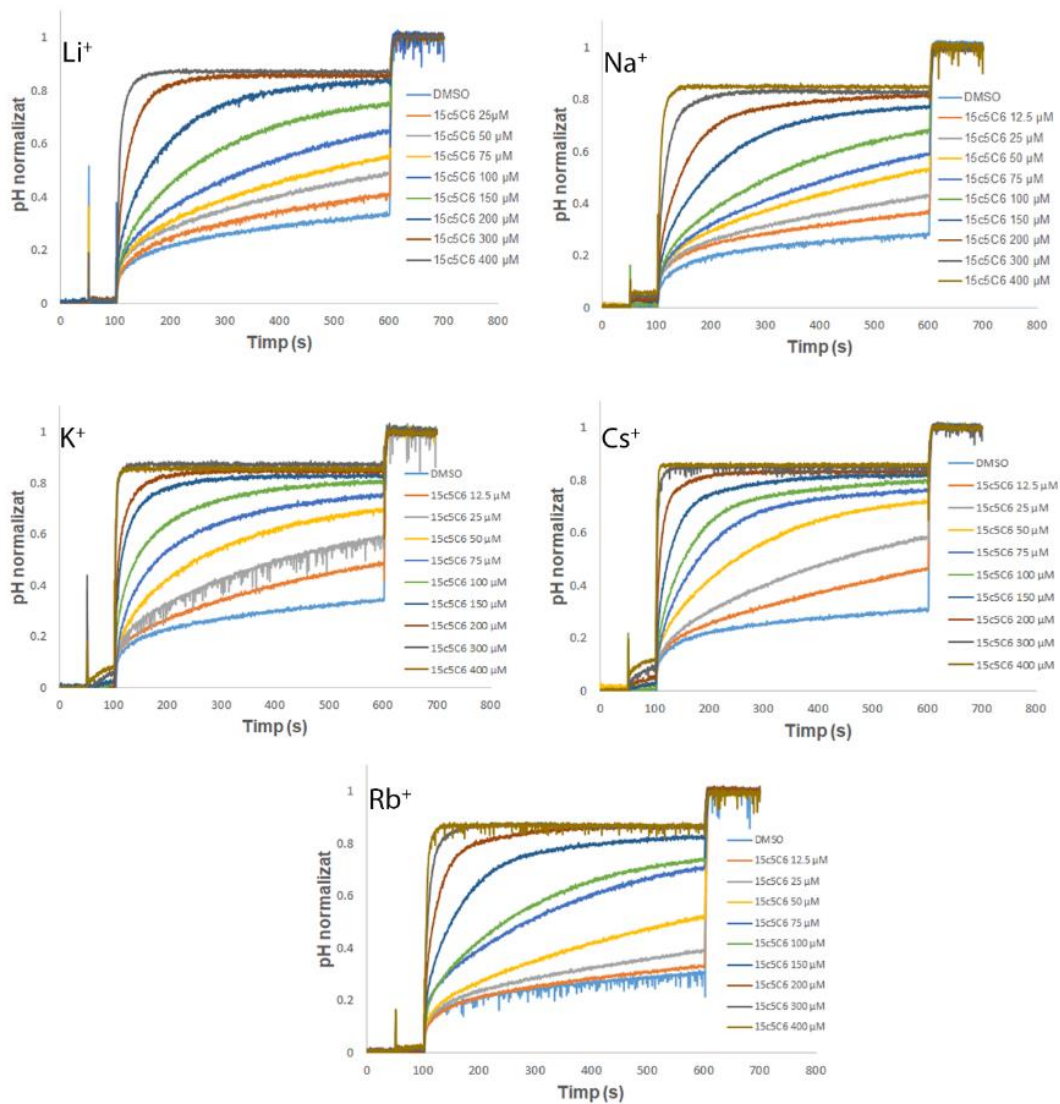
**Figura 3.5.** Spectrul de masă (a) și spectrul <sup>1</sup>H-RMN (b) pentru compusul 15c5C6. ESI-MS: m/z [M+H]<sup>+</sup> = 411,18 [M+Na]<sup>+</sup> = 433,16. <sup>1</sup>H-NMR: ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S=O, ppm) δ = 0.86 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 3.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.59 (m, 8H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O eter-coroană), 3.74 (m, 4H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- eter-coroană), 3.97 (m, 4H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- eter-coroană), 6.00 (t, 1H, NH-Alchil), 6.79 (m, 2H, H-Ar), 7.13 (d, 1H, H-Ar), 8.19 (s, 1H, NH -Ar).

### 3.2.3.1. Analiza capacității de transport selectiv de cationi alcalini a alchil-benzoureido-eterilor coroană prin membrana lipozomală utilizând metoda HPTS

Capacitatea de transport a cationilor alcalini:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  și  $\text{Cs}^+$  prin membrane lipozomale a tuturor compușilor sintetizati s-a realizat prin metoda HPTS după cum putem observa în Figurile 3.13 și 3.19.



**Figura 3.13.** Variația valorilor  $I_0/I_1$  normalizate vs timp datorată transportului ionilor de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  și  $\text{Cs}^+$  în funcție de concentrația compusului 15c5C6 în membrana lipozomală.



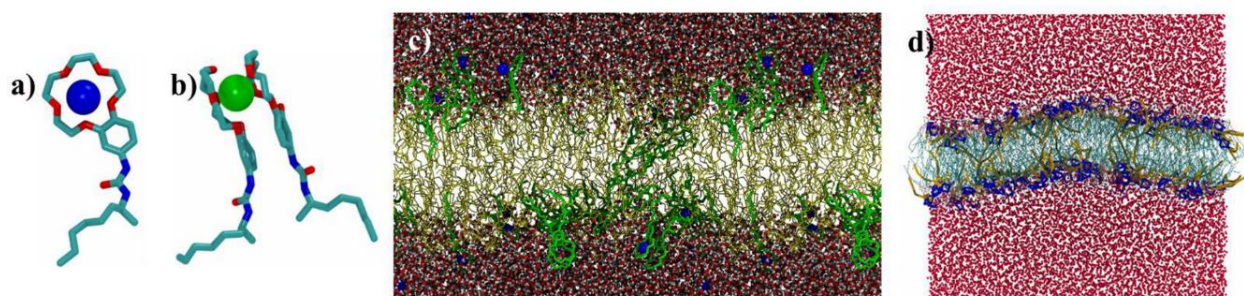
**Figura 3.19.** Variația valorilor pH-ului normalizate vs timp datorată transportului ionilor de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  și  $\text{Cs}^+$  în funcție de concentrația compusului 15c5C6 în membrana lipozomală.

**Tabelul 3.3.** Valorile vitezei de transport ionic ( $k$ ), activității fracționare ( $Y$ ), a concentrației efective ( $EC_{50}$ ) și a coeficientului Hill ( $n$ ) calculate pentru compusul 15c5C6

	Concentrația finală ( $\mu\text{M}$ ) în compus studiat	$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Rb}^+$	$\text{Cs}^+$
	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	0	0,025	0,0115	0,0272	0,0325
12,5		-	0,0144	0,0279	0,0221	0,0219
25		0,0339	0,0183	0,0382	0,0266	0,015
50		0,025	0,0167	0,0315	0,0472	0,0144
100		0,0349	0,0269	0,1088	0,0557	0,0193
200		0,0375	0,0289	0,0626	0,0724	0,0377
300		0,0448	0,0342	0,1066	0,1033	0,0428
400		0,0464	0,052	0,1285	0,1656	0,076
$Y$ (u.a.)		0	0,0935	0,1608	0,3526	0,3543
	25	0,2081	0,3007	0,5682	0,6010	0,2560
	50	0,3075	0,4045	0,7106	0,7204	0,5806
	75	0,4604	0,5653	0,8544	0,7842	0,6404
	100	0,7047	0,7844	0,9210	0,8588	0,8469
	200	0,9953	0,9308	1,0949	0,9563	0,9987
	300	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	400	0,0935	0,1608	0,3526	0,3543	0,0917
$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		78,66	71,15	36,14	37,95	0,01
$n$ (u.a.)		2,89	1,66	1,59	1,42	2,13

### Simulări de dinamică moleculară (DM)

Pentru o mai bună înțelegere a mecanismului de transport ionic prin membranele lipidice s-a recurs la o simulare dinamică atomistică pentru un interval de timp de 500 ns. Moleculele studiate au eterul coroană figurat în culoarea albastră, iar capătul alchil în culoarea galbenă, lipidele sunt reprezentate prin linii fine turcoaz, iar moleculele de apă prin sfere roșii. Toți eterii coroană studiați formează complecși cu  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$ , după cum se poate observa și în Figura 3.38.



**Figura 3.38.** Simularea computerizată pe model atomistic a transportului de cationi de **a)**  $\text{Na}^+$  și **b)**  $\text{K}^+$  mediat de compusul  $15c5C8^+$ . **c)** Secțiune transversală prin membrana lipozomală în simularea atomistică de transport a  $\text{Na}^+$  în prezența compusului  $15c5C8^+$ . **d)** Secțiune transversală prin membrana lipozomală în simularea Course-Grain de transport a  $\text{Na}^+$  în prezența compusului  $15c5C8^+$  (adaptat după referința [9])

Principala diferență dintre complexii celor două metale alcaline este numărul de eteri coroană coordinați de cationi,  $\text{Na}^+$  formând astfel complexi mult mai stabili cu un singur eter coroană în timp ce  $\text{K}^+$  determină formarea de complexi cu două molecule de eter coroană. În orice caz, ambele structuri s-au regăsit pentru un timp foarte scurt atât la complexii pe bază de  $\text{Na}^+$ , cât și la cei pe bază de  $\text{K}^+$ . Mai mult, în cazul compusului  $15c5C8^+$  s-a observat pentru o scurtă perioadă o formațiune de eteri coroană care traversează membrana lipidică (Figura 3.38.c).

De asemenea, modelul Course-Grain (CG) ne-a permis să extindem timpul de simulare la  $10 \mu\text{s}$ . Nici acest model nu a evidențiat o formațiune stabilă în timp (Figura 3.38.d) în perioada simulării, posibil din cauza instabilității canalului format. În timpul simulării CG câteva molecule de derivați de eteri coroană au fost observați ca acționând după modelul „flip-flop”, sugerând un mecanism de transport de tip „carrier” (Figura 3.38.d). Toate aceste observații sugerează un mod complex de transport, o combinație dintre constituirea dinamică a unor canale ionice, pe de o parte, și de tip „carrier”, pe de altă parte, aceste concluzii fiind în concordanță și cu rezultatele experimentale.

### 3.2.4. Concluzii

- ❖ Pentru toți compușii studiați și prezentați în acest capitol, creșterea concentrației acestora determină creșterea vitezei de transport a cationilor prin membrană de către aceștia.
- ❖ În urma analizei  $EC_{50}$  și  $k$  s-a observat că transportul ionilor prin membrană este mai eficient în cazul compușilor cu lanțul alchil mai lung (15c5C8 și 15c5C12) comparativ cu compusul cu lanțul alchil mai scurt, 15c5C6.
- ❖ Se observă diferențe între transportul mediat de 15c5C8 și 15c5C12 funcție de ionul transportat de către aceștia. Astfel, transportul de  $K^+$  este mai rapid și mai eficient în cazul folosirii 15c5C12.
- ❖ Prin înlocuirea radicalului alchil liniar cu unul ramificat optic activ nu s-au înregistrat diferențe notabile de selectivitate, activitatea de transport a compușilor cu octil optic activ fiind intermediară celor cu n-hexil și respectiv n-octil.
- ❖ Pentru toți compușii studiați, activitatea cea mai mare se regăsește la transportul ionilor de  $K^+$  și  $Rb^+$ , iar cea mai mică activitate de transport este corespunzătoare ionilor cu razele cele mai mici,  $Li^+$  și  $K^+$ , situație evidențiată de valorile activității fracționare  $Y$  și susținute de valorile  $k$  și  $EC_{50}$ .
- ❖ Pe parcursul simulărilor de DM nu s-a observat auto-asamblarea compușilor în canale ionice stabile, dar s-a observat în simularea de tip Course-Grain translația moleculelor de alchil-benzoureido-eteri coroană de la o față la alta a membranei lipidice, ceea ce poate sugera existența unui proces de transport de tip „carrier”.
- ❖ Rezultatele obținute până acum sugerează un mecanism complex de transport, pentru care este necesar continuarea studiului în amănunt.

### 3.3. Eteri coroană funcționalizați cu proprietăți de auto-asamblare prin interacțiuni $\pi - \pi$ în medii cu polarități diferite pentru transportul cationilor alcalini

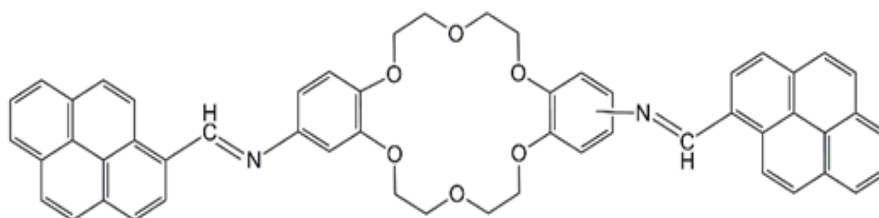
O modalitate particulară de a crea structuri supramoleculare este utilizarea moleculelor  $\pi$ -conjugate. În acest scop, pirenul este o alegere bună datorită înclinației sale de a se auto-agrega prin stivuire de tip  $\pi - \pi$ , fenomen ce poate fi detectat cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență [10,11]. Deoarece unitățile de piren pot fi auto-asamblate prin interacțiunea de stivuire  $\pi - \pi$  în starea fundamentală și în starea excitată, proprietățile fotofizice se schimbă în permanență astfel încât emisia de fluorescență poate spori sau se poate stinge [12,13].



### 3.3.2. Studiul aranjamentelor supramoleculare a derivaților de tip di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6

**Obiectiv:** Sinteza, caracterizarea structurală și investigarea proprietăților de auto-asamblare în medii cu polarități diferite a compusului di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6.

Acest capitol prezintă sinteza di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6 (denumit DPyDB-C=N-18C6), fiind un compus nou care include eterul coroană și fragmentele de piren legate prin legături -HC=N- în mod simetric față de ciclul eteric (Figura 3.39.).



**Figura 3.39.** Formula structurală a di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6 (adaptat după referința [13])

Scopul prezentului studiu a fost de a demonstra formarea unui potențial aranjament supramolecular mediat de interacțiuni inter- și intramoleculare între moleculele DPyDB-C=N-18C6.

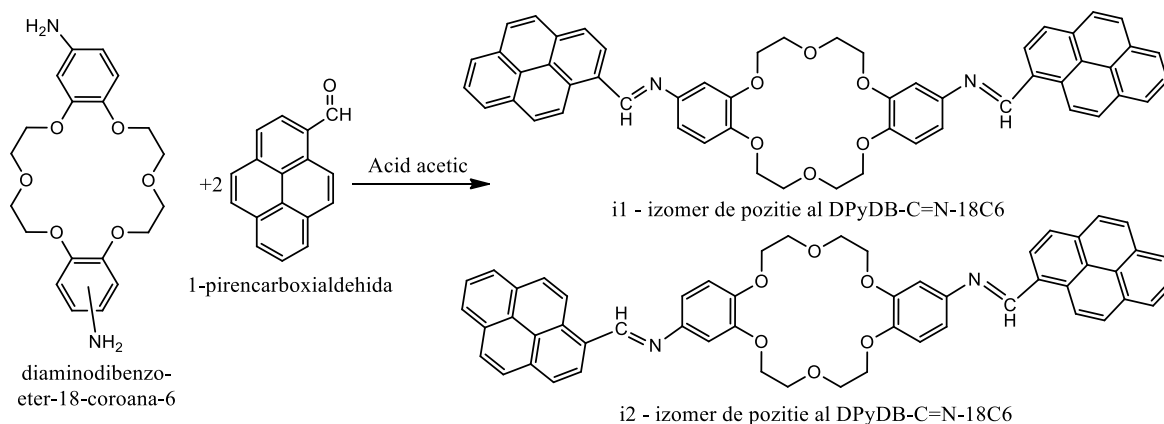
#### **Sinteza di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6 (DPyDB-C=N-18C6)**

Peste o soluție de diaminodibenzo-eter-18-coroană-6 (200 mg, 0,51 mmol) în etanol (20 mL), s-au adăugat acid acetic (200 μL, 2,80 mmol, 4 echiv.) și 1-pirencarboxaldehydă (260 mg, 1,15 mmol, 2,1 echiv.). Amestecul rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 24 de ore, filtrat și purificat prin centrifugare din diclormetan și eter etilic. S-a obținut un produs solid de culoare galbenă, cu randament de 80%.

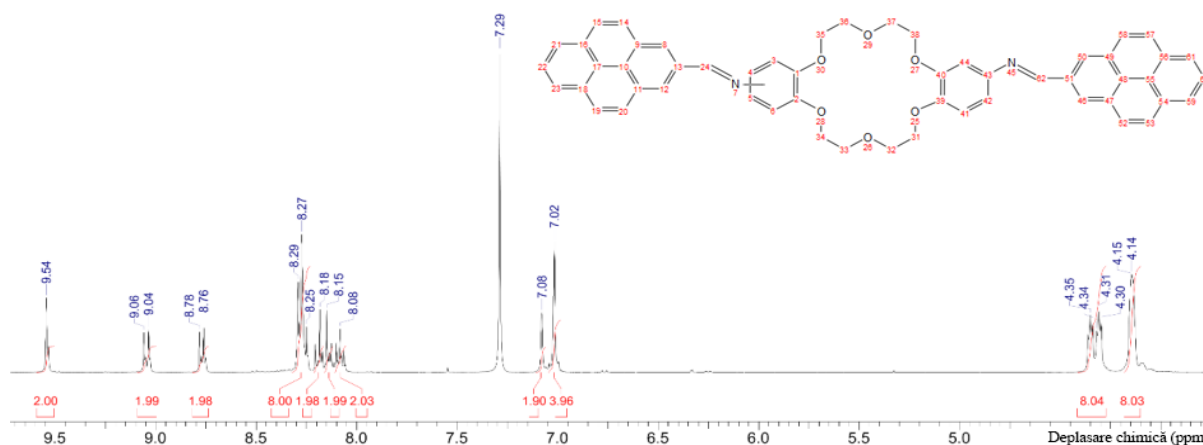
#### **3.3.2.3. Rezultate și discuții**

##### **Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6 (DPyDB-C=N-18C6)**

DPyDB-C=N-18C6 a fost preparat prin reacția directă dintre grupările aminice ale diaminodibenzo-eter-18-coroană-6 și gruparea aldehydă a 1-pirencarboxaldehydei, în mediu acid, cu formarea de legături iminice între cei doi precursori, așa cum sunt prezentate în Schema 3.4. Diaminodibenzo-eter-18-coroană-6 a fost sintetizat așa cum este descris de Ardeleanu și colab. [14], ca un amestec de doi izomeri de poziție (notați ca **i1** și **i2**) în ceea ce privește poziția grupării aminice atașată inelului fenil.



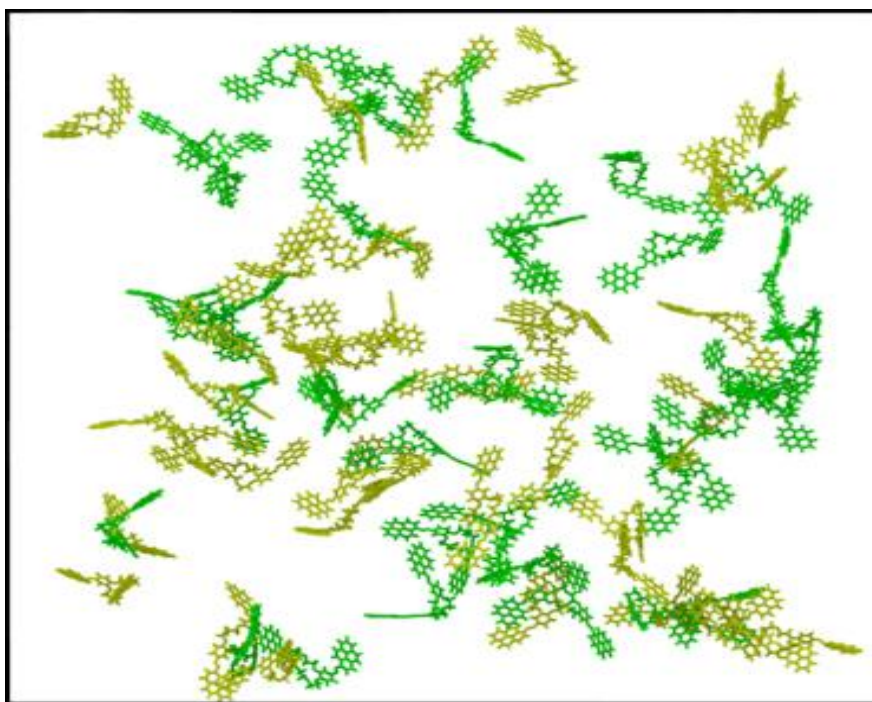
**Schema 3.4.** Metoda de sinteză a compusului DPyDB-C=N-18C6 (adaptat după referința [13])



**Figura 3.41.** Spectrul  $^1\text{H-RMN}$  al compusului DPyDB-C=N-18C6.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4,14$  (as, 8H), 4,35 (dd, 8H), 7,02 (d, 4H), 7,08 (s, 2H), 8,08 (d, 2H), 8,15 (d, 2H), 8,18 (d, 2H), 8,28 (m, 8H), 8,77 (d, 2H), 9,05 (d, 2H), 9,54 (s, 2H) (adaptat după referința [13])

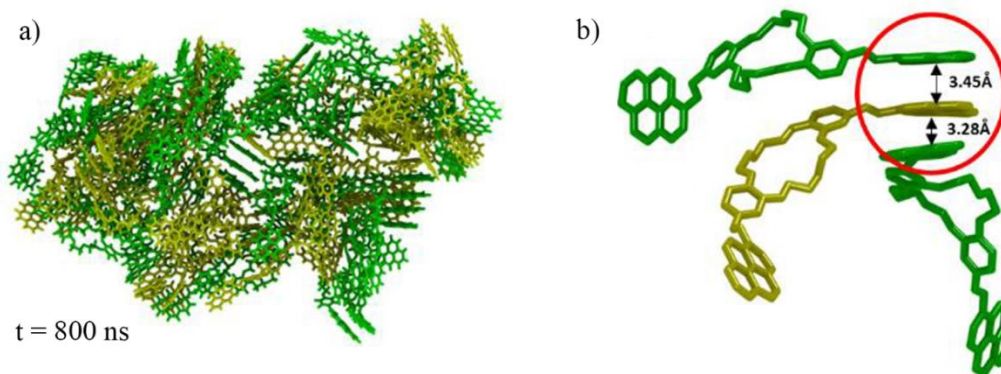
### Simulări de dinamică moleculară (DM)

Pentru a investiga capacitatea de agregare a compusului di-iminopiren-dibenzo-eter-18-coroană-6, au fost efectuate simulări de DM ale procesului de agregare în etanol. Ambii izomeri de poziție au fost incluși în simulările de DM, astfel încât în Figura 3.47 este prezentată conformația inițială a compușilor sistemului. În verde gălbui este reprezentat izomerul de poziție **i1** și în verde este reprezentat izomerul de poziție **i2**.



**Figura 3.47.** Structurile inițiale ale compusului DPyDB-C=N-18C6 după minimizarea energiei (adaptat după referința [13])

Pentru simularea moleculară în condiții de concentrații mari, în celula de simulare s-au introdus 23 278 molecule de solvent și 40 de molecule din fiecare izomer de poziție, rezultând un singur agregat capabil să pună în evidență interacțiunile intermoleculare ce guvernează procesul de agregare și poate atinge echilibrul într-un timp de simulare rezonabil (800 ns). Figura 3.48.a ilustrează structura finală a agregatului DPyDB-C=N-18C6.



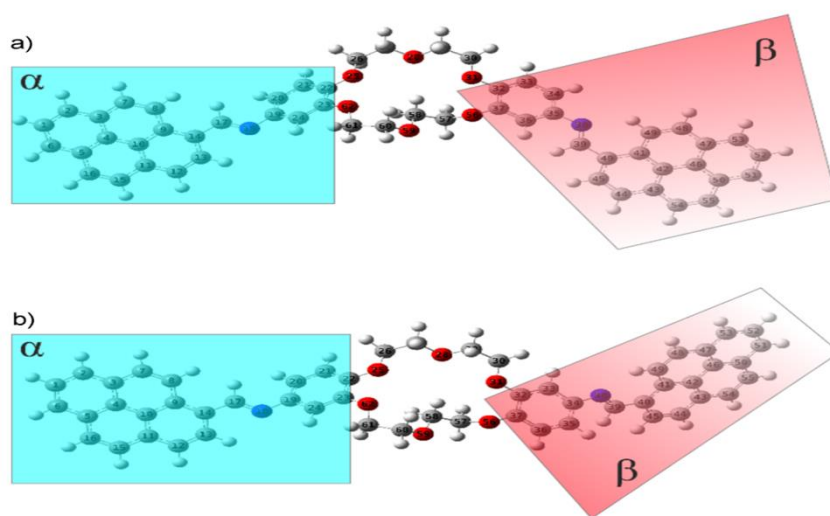
**Figura 3.48. a)** Structura finală a agregatului DPyDB-C=N-18C6, rezultată după 800 ns de simulare; **b)** Detaliu reprezentând interacțiunea intermoleculară piren-piren pe o singură grupare laterală (încercuit cu roșu) (adaptat după referința [13])

Analiza vizuală a agregatului simulat prezintă o structură amorfă (Figura 3.48.a), în acord cu rezultatele obținute din tehnica de analiza WAXD. În ciuda gradului ridicat de dezordine al agregatului, se poate observa că unitățile de piren sunt capabile să formeze stive  $\pi - \pi$  intermoleculare între trei până la patru unități pirenice paralele provenite din molecule diferite, cu distanțe de interacțiune de aproximativ 3,45 și 3,28 Å. Unitățile de piren ordonate se dezvoltă doar pe o parte a moleculei, fragmentele de piren de pe cealaltă parte fiind fie neagregate, fie implicate în stive cu grupări pirenice aparținând unor molecule total diferite (Figura 3.48.b).

### Studii teoretice – calcule de mecanică cuantică în starea fundamentală

Pentru a explica incapacitatea DPyDB-C=N-18C6 de a forma stive intermoleculare  $\pi - \pi$  cu implicarea ambelor unități pirenice, s-a recurs la efectuarea de calcule de mecanică cuantică în starea fundamentală.

Toate geometriile de echilibru ale ambilor izomeri de poziție (i1 și i2) atinse, după finalizarea calculelor de mecanică cuantică folosind metoda PBE0/6-311+G(d,p), sunt prezentate în Figura 3.51.



**Figura 3.51.** Geometriile de echilibru în starea fundamentală calculate folosind metoda PBE0/6-311+G(d,p) pentru: **a)** izomerul i1; **b)** izomerul i2 (adaptat după referința [13])

Calcululele DFT au fost efectuate în starea fundamentală, considerând starea singlet  $S_0$  ca nivel fundamental. Efectul conformațional a fost studiat prin rotirea planului fragmentului pirenic în sensul acelor de ceasornic, în timp ce planul fragmentului fenil a fost orientat în sens invers acelor de ceasornic, cu pași mici de  $10^\circ$ . Efectul conformațional al compușilor studiați a fost estimat utilizând suprafața de energie potențială (PES).

#### 3.3.2.4. Concluzii

- ❖ În acest capitol a fost sintetizat un compus nou prin legarea a două fragmente pirenice la diaminodibenzo-eter-18-coroană-6 prin legături iminice ( $-\text{HC}=\text{N}-$ ), rezultând produsul DPyDB-C=N-18C6.
- ❖ Sinteza a fost confirmată prin tehnici FTIR,  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, TGA și DSC, iar analiza cantitativă  $^{13}\text{C}$ -RMN a evidențiat prezența a doi izomeri de poziție.
- ❖ S-a demonstrat prin metode experimentale (tehnica de analiză WAXD) și teoretice (simulări de DM) că DPyDB-C=N-18C6 formează un agregat supramolecular cu interacțiuni  $\pi - \pi$  slabe.
- ❖ Rezultatele simulării de DM au arătat existența unor structuri aproape izoenergetice ca un agregat ușor-parallel cu o distanță de interacțiune în jurul valorilor de 3,45 și 3,28 Å.
- ❖ Studiile experimentale și teoretice efectuate au arătat formarea de agregate mici cu interacțiuni  $\pi - \pi$  slabe și au evidențiat mai multe aspecte care limitează capacitatea de auto-asamblare a moleculei sintetizate, cum ar fi unghiul diedru al  $-\text{C}-\text{HC}=\text{N}-\text{C}-$  răsucit cu circa  $40^\circ$ , conducând la repulsia sterică care apare între moleculele individuale.
- ❖ Au fost investigate proprietățile fotofizice ale compusului DPyDB-C=N-18C6 în solvenți cu polarități diferite (n-hexan, toluen, 1,2-diclorețan și etanol) prin experimente UV-vis și de fluorescență, precum și prin calcule de mecanică cuantică. S-a observat prezența tranzițiilor  $\pi \rightarrow \pi^*$  și  $n \rightarrow \pi^*$ , dintre care predominantă a fost tranziția  $\pi \rightarrow \pi^*$  datorată conjugării extinse  $\pi$ .
- ❖ Analiza fluorescenței a arătat o emisie slabă ce ar putea fi explicată prin transferul de electroni fotoindus și efectele de stingere cauzate de agregare.
- ❖ Orbitalii moleculari de frontieră în starea fundamentală au demonstrat că densitatea electronică a DPyDB-C=N-18C6 a fost localizată doar pe o secvență piren-CH=N-fenil a eterului coroaă, ceea ce duce la perturbarea stivei columnare  $\pi - \pi$  intermoleculare.

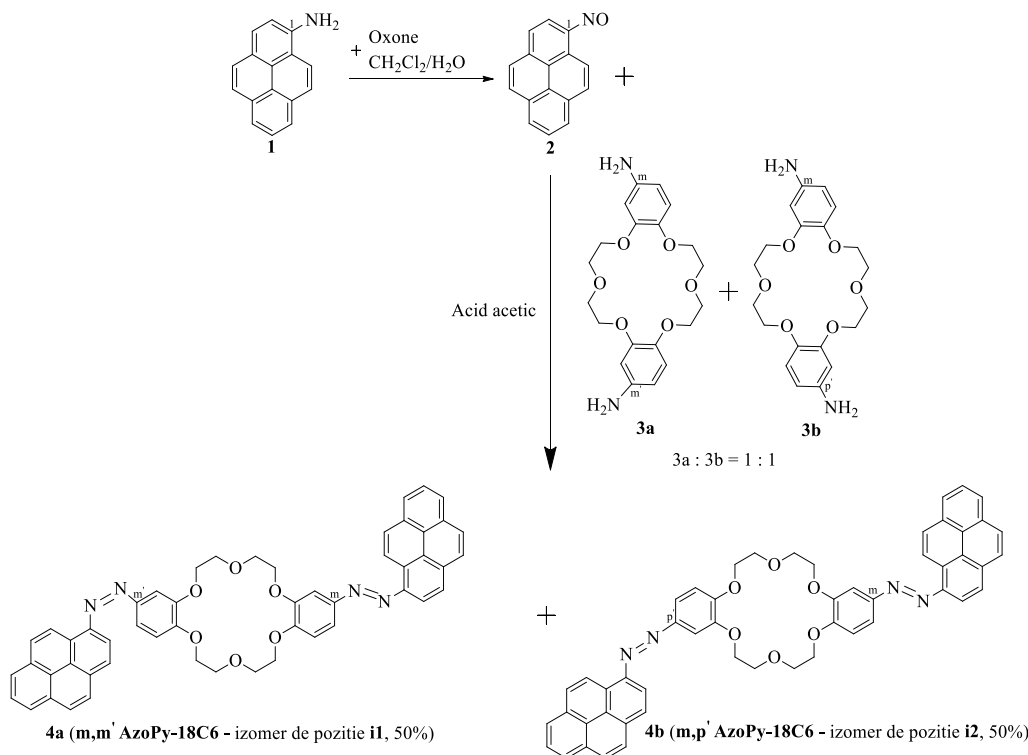
#### 3.3.3. Studiul aranjamentelor supramoleculare ale derivaților de tip di-azopirenil-dibenzo-eter-18-coroană-6 în medii cu polarități diferite pentru transportul cationilor alcalini

În acest capitol am realizat proiectarea unui nou sistem pe bază de dibenzo-eter-coroană, obținut prin modificări ale catenei laterale ale ambelor grupări amino din dibenzo-coroană-eter cu fragmente de piren, rezultând formarea a două grupări azopiren pe fiecare

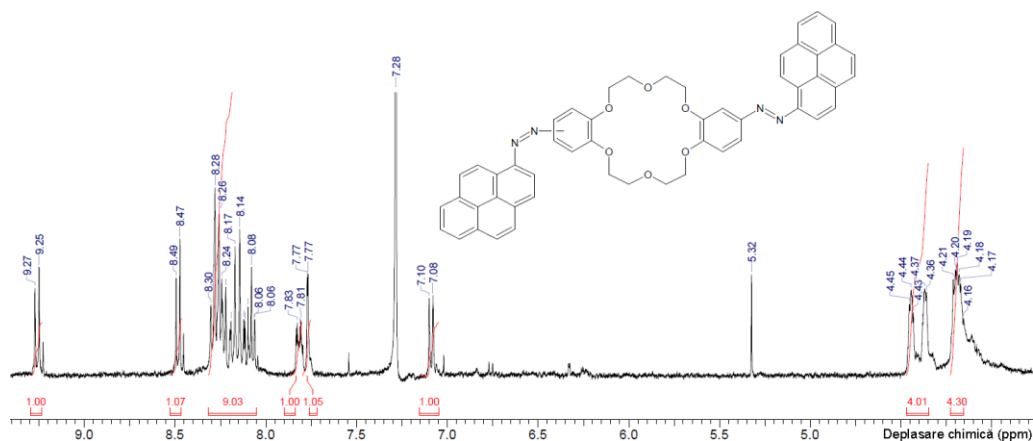
parte. Scopul acestui studiu a fost de a îmbunătăți capacitatea de stivuire  $\pi - \pi$  a moleculelor, plecând de la ipoteza că schimbarea legăturii  $-HC=N-$ , raportată anterior [13], la legătura azo ( $-N=N-$ ) ar crește planeitatea moleculelor.

### Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a di-azopirenil-dibenzo-eter-18-coroană-6 (AzoPy-18C6)

Pentru a obține structuri supramoleculare auto-asamblate cu capacitate îmbunătățită de stivuire, a fost sintetizat compusul di-azopirenil-dibenzo-eter-18-coroană-6 (AzoPy-18C6, Schema 3.5.). AzoPy-18C6 a fost proiectat prin modificări ale catenei laterale ale ambelor grupări aminice din pozițiile 3, 3' cu fragmente de piren, rezultând astfel formarea a două grupări azopirenice pe fiecare parte a dibenzo-coroană-eterului. A fost aplicată o procedură în doi pași pentru sinteza chimică prin reacția grupării nitrozo a pirenului cu grupările aminice ale dibenzo-eter-18-coroană-6 [15–18]. Prima etapă a presupus reacția dintre 1-aminopiren (1) și peroximonosulfatul de potasiu (Oxone) la temperatura camerei pentru a obține 1-nitrozopiren (2) cu randament ridicat (90%). A doua etapă a constat în cuplarea 1-nitrozopirenului (2) cu diamino-dibenzo-eter-18-coroană-6 (3) într-un amestec de acid acetic-toluen la reflux timp de 48 de ore pentru a produce un amestec de izomeri de poziție i1 și i2 (4a, 4b) ai AzoPy-18C6, într-un raport 50:50, cu randament ridicat (82 %).



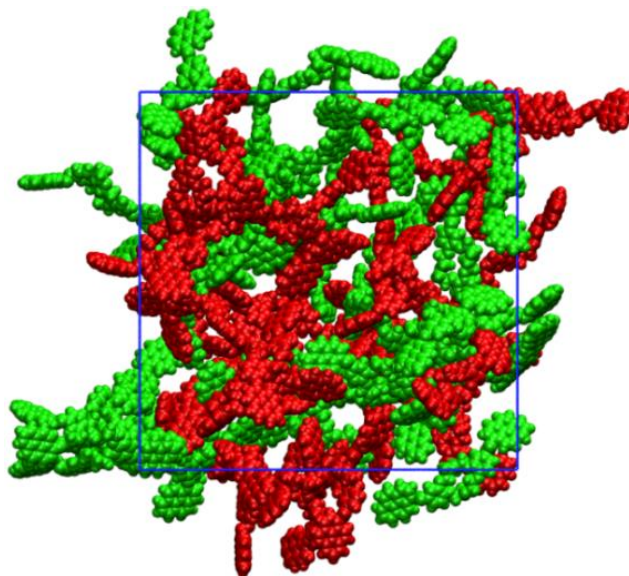
**Schema 3.5.** Schema de sinteză pentru izomerii de poziție 4a (m,m' AzoPy-18C6 - i1) și 4b (m,p' AzoPy-18C6 - i2) în raport 50:50 (adaptat după referința [19])



**Figura 3.60.** Spectrul  $^1\text{H-NMR}$  al compusului AzoPy-18C6.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4,20$  (as, 8H), 4,40 (d, 8H), 7,09 (d, 2H), 7,77 (as, 2H), 7,82 (d, 2H), 8,06-8,30 (m, 18H2), 8,48 (d, 2H), 9,26 (d, 2H) (adaptat după referința [19])

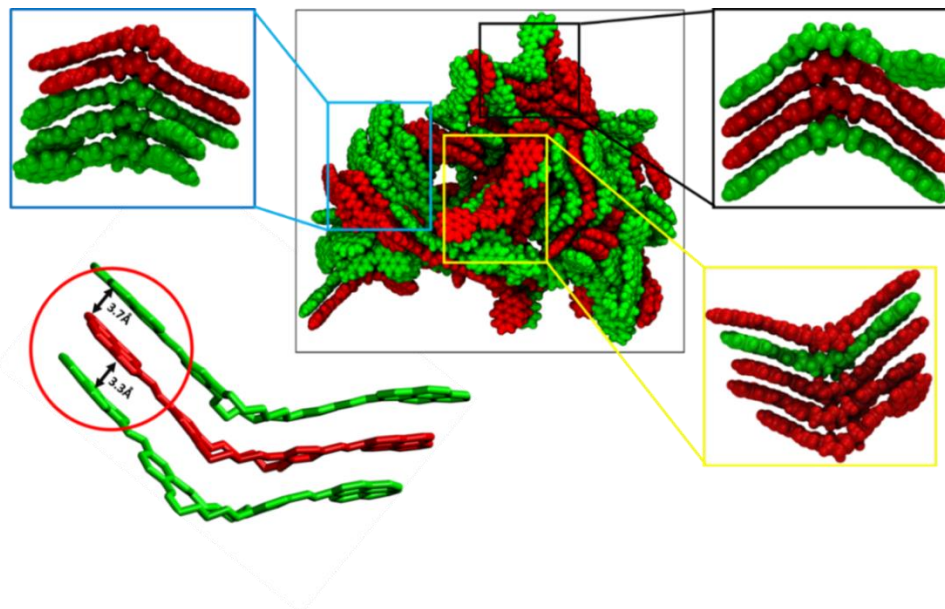
### Simulări de DM

Deoarece spectrele  $^{13}\text{C-RMN}$  au arătat prezența a doi izomeri, am efectuat simulări de DM ale procesului de agregare a compusului AzoPy-18C6 în etanol pentru a determina mecanismul interacțiunilor intermoleculare și rolul izomerilor în aceste interacțiuni. Pentru simulările de DM s-au utilizat câte 40 de molecule din fiecare izomer de poziție **i1** și **i2**, răspândiți aleatoriu în cutia de simulare umplută cu etanol. Figura 3.65. ilustrează locațiile de pornire utilizate: izomerul de poziție **i1** - verde, izomerul de poziție **i2** –roșu.



**Figura 3.65.** Locațiile de pornire ale celor 40 molecule **i1** și 40 molecule **i2**, distribuite aleatoriu (adaptat după referința [19])

După minimizarea energiei, simularea a fost inițiată și moleculelor li s-a oferit o fereastră de timp de 800 ns pentru auto-asamblare. La finalizarea simulărilor, toate cele 80 de molecule s-au grupat pentru a crea un agregat mare, așa cum se poate observa în Figura 3.66.: izomerul de poziție i1 - verde, izomerul de poziție i2 –roșu.



**Figura 3.66.** Structura finală a agregatului AzoPy-18C6 după 800 ns. Detaliile (rotite pentru claritate) reprezintă stive formate ordonat. Cercul roșu evidențiază interacțiunile  $\pi - \pi$ , precum și distanța intermoleculară dintre unitățile de piren (adaptat după referința [19])

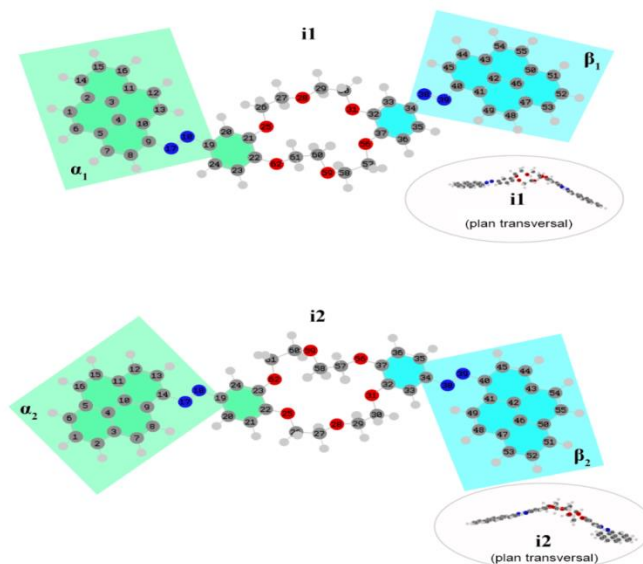
Din Figura 3.66. se poate observa că AzoPy-18C6 formează stive ordonate de 3 până la 5 molecule și că aceste stive se agregă între ele în mod aleatoriu. În plus, se poate observa că poziția unităților de piren nu influențează structura stivei. Detaliile din Figura 3.66. prezintă exemple reprezentative de stive care au o compoziție mixtă. În urma simulării nu s-au identificat stive compuse exclusiv din unul dintre cei doi izomeri de poziție (i1-i1 sau i2-i2). Comparând aceste rezultate cu cele obținute în subcapitolul anterior privind studiul compusului DPyDB-C=N-18C6 [13], se poate observa că agregatul pare să aibă o structură de bază similară în ansamblu. Cu toate acestea, la o analiză mai atentă, se poate observa că există o diferență semnificativă între stivele care compun agregatul (Figura 3.66).

### Calcul de mecanică cuantică în starea fundamentală

Pe lângă simulările de DM prezentate mai sus, proprietățile chimice și fizice intrinseci determinate anterior prin tehnica de analiza WAXD și analiza spectrelor UV-VIS și de fluorescență au fost evaluate *in silico* prin calcule de mecanică cuantică. Pentru a demonstra structura de echilibru și caracteristicile intramoleculare ca lungimile legăturilor, cât și a



unghiurilor diedre și de valență, parametri care au fost prezii folosind metoda PBE0/6-311+G(d,p). Compusul AzoPy-18C6 și cei doi izomeri ai săi au fost evaluați în starea fundamentală. În plus, a fost investigat efectul conformațional a sistemului molecular AzoPy-18C6, cum ar fi coplanaritatea sau dimpotrivă, existența unei structuri răsucite.

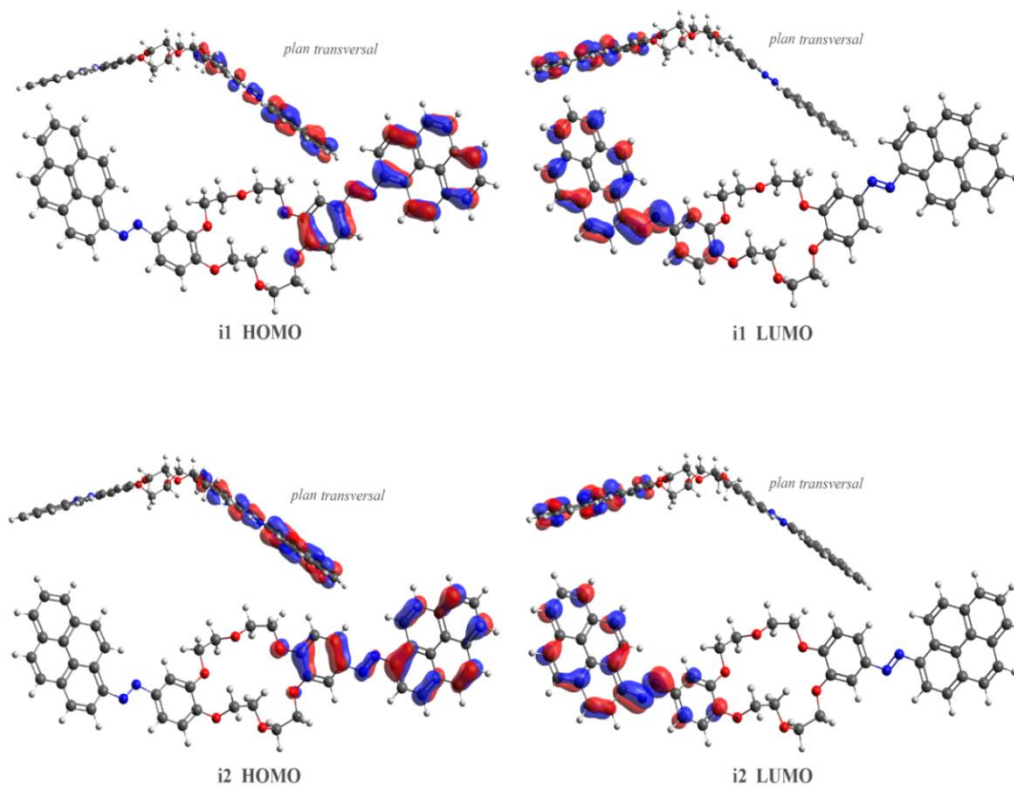


**Figura 3.69.** Structurile izomerilor de poziție: i1 (sus) și i2 (jos), după optimizarea în starea fundamentală utilizând metoda PBE0/6-311+G(d,p) (adaptat după referința [19])

Figura 3.69. oferă o reprezentare grafică a optimizării geometriei folosind nivelul teoriei alese PBE0/6-311+G(d,p). În această figură, modul și planul de legare a celor două unități de piren la inelele fenil vecine secvenței eterului coroană au fost marcate cu culorile verde și, respectiv, albastru. În acest mod, sunt indicate modurile de izomerizare ale ambilor conformeri i1 și i2.

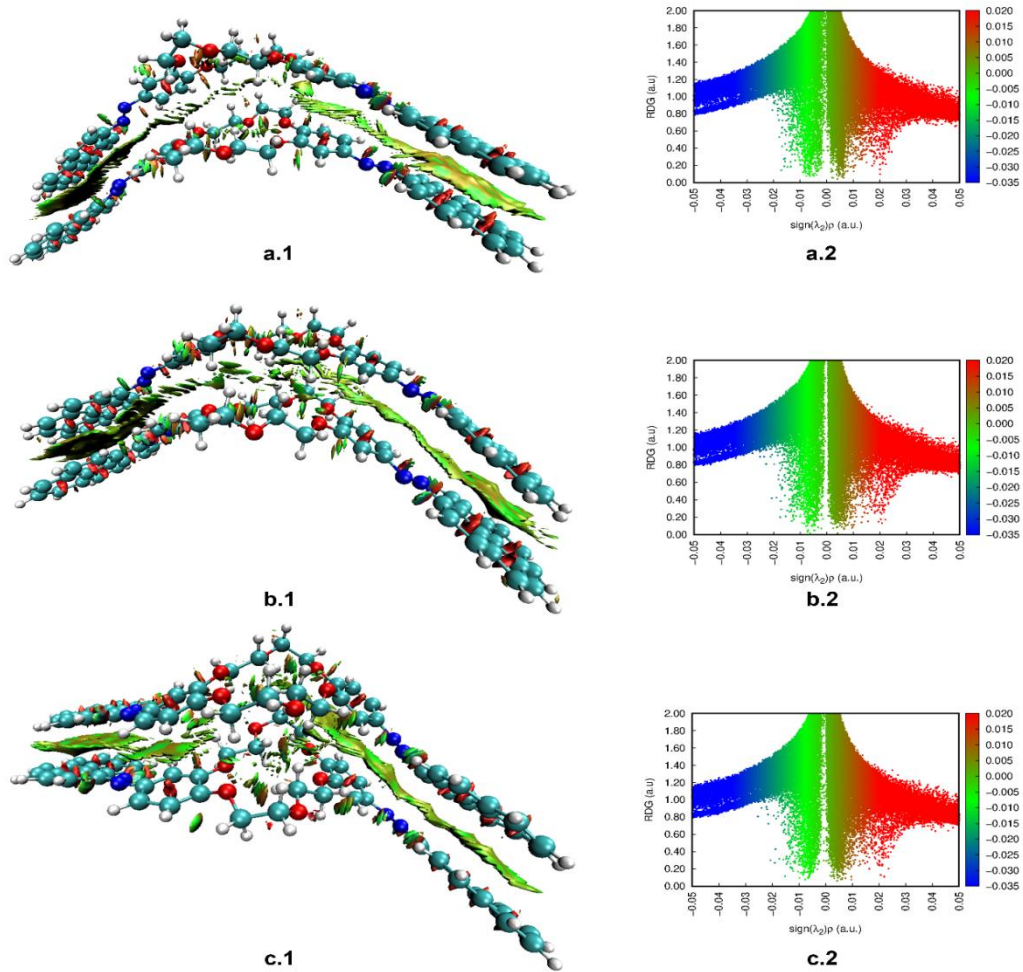
### Calcul de mecanică cuantică ale stărilor excitate

Pentru a înțelege mai bine procesul interacțiunii de stivuire prezent a fost efectuată o investigație aprofundată a densității electronice. Astfel, s-au realizat diagrame ale decalajului dintre orbitalilor moleculari de frontieră HOMO (orbitale moleculare ocupate de energie înaltă) și LUMO (orbitale moleculare neocupate de energie joasă) (Figura 3.70.).



**Figura 3.70.** Vedere transversală a densităților electronice HOMO-LUMO localizate pe izomerii i1 și i2 al sistemului azopiren (adaptat după referința [19])

Figura 3.70. demonstrează că densitatea norului de electroni este localizată pe unitățile aromatice (piren,  $-N=N-$ , fenil) și are o distribuție de tip  $\pi$  (fiind de legătură, HOMO) și  $\pi^*$  (anti-legătură care se formează în LUMO). Ca urmare a faptului că unitățile pirenice sunt mai mari ca număr de atomi decât fenilii și legăturile  $-N=N-$  și includ un grup mare de legături  $\pi$ , densitatea electronică a fost localizată predominant pe aceste secvențe. Analiza diferenței de energie dintre nivelurile HOMO și LUMO a arătat o modificare a densității electronice a inelelor pirenice pe măsură ce acestea se deplasează din pozițiile planare  $\beta 1$  și  $\beta 2$  din dreapta către pozițiile planare  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$  din stânga. Chiar dacă secvențele aromatice din pozițiile planare  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  și  $\beta 2$  ar fi unite prin sisteme chimice neconjugate, această deplasare a densității electronilor ar fi totuși vizibilă (în cazul de față, grupul central eter coroață). Atât metodele experimentale, cât și teoretice au validat formarea de dimeri ai derivaților de diazopiren în starea fundamentală. S-a demonstrat că acest proces este guvernat de o interacțiune slabă non-covalentă. Figura 3.76. ilustrează interacțiunile necovalente care apar în fiecare dintre cele trei configurații posibile ale asociațiilor de dimeri (i1-i1, i1-i2 și i2-i2).



**Figura 3.76.** Reprezentarea suprafeței NCI în stânga și a diagramei NCI în dreapta pentru interacțiunile necovalente în stivele i1-i1 (a.1, a.2); i1-i2 (b.1, b.2); i2-i2 (c.1, c.2) (adaptat după referința [19])

### 3.3.3.4. Concluzii

- ❖ În acest capitol, un nou sistem a fost proiectat și obținut prin legarea a două fragmente de piren prin punți  $-N=N-$  de fiecare parte a dibenzo- eterului coroană. Caracterizarea prin tehnici fizico-chimice (FTIR,  $^1H$ -RMN,  $^{13}C$ -RMN, TGA și DSC) a compusului obținut a confirmat structura propusă.
- ❖ Din punct de vedere experimental și *in silico*, s-a demonstrat aranjamentul supramolecular al sistemului AzoPy-18C6. Au fost efectuate simulări de DM pentru a dezvălui interacțiunile de stivuire  $\pi - \pi$ , care au fost confirmate mai departe prin tehnica de analiza WAXD în spectrul căreia s-a observat apariția unui vârf ascuțit la  $2\theta$  de  $1,914^\circ$ .
- ❖ Prin investigarea caracteristicilor fotofizice ale stării excitate utilizând spectroscopiile UV-Vis și de fluorescență s-a demonstrat că fragmentele de piren aromatic din interiorul stivelor ordonate ale AzoPy-18C6 prezintă interacțiuni  $\pi - \pi$ . Acest lucru a fost confirmat în continuare de calculele DFT și TD-DFT care au arătat interacțiunea dintre densitățile electronice ale orbitalilor moleculari. Mai mult, s-a observat prezența tranzițiilor mixte  $\pi \rightarrow \pi^*$  și  $n \rightarrow \pi^*$ , predominând tranziția  $\pi \rightarrow \pi^*$  datorită conjugării  $\pi$ -extinse. De asemenea, a fost dezvăluit prin abordările de DM, DFT și TD-DFT că legătura  $-N=N-$  a contribuit la o așezare a moleculei mai plană și o îmbunătățire a capacității de stivuire  $\pi - \pi$  a moleculelor. În același timp, unghiul diedru din secvența  $C-N=N-C$ , specifică unităților de azopiren și interacțiunile Van der Waals, joacă un rol cheie în stivuirea  $\pi - \pi$  a sistemului AzoPy-18C6.
- ❖ Rezultatele *in silico* au arătat faptul că unghiul diedric  $C-N=N-C$ , specific unităților de azopiren și interacțiunilor Van der Waals, joacă rolul dominant în formarea agregatelor de tip  $\pi - \pi$  și, implicit, a agregatelor pe bază de eter coroană.
- ❖ Calculele DFT și TD-DFT au arătat că asocierea  $\pi - \pi$  este favorizată în stare fundamentală și nu în cea excitată.

## **CAPITOLUL 4. EVALUAREA POTENȚIALULUI ENDOCANULUI CA BIOMARKER - UN PRIM PAS ÎN DESIGNUL SISTEMELOR INTELIGENTE PENTRU DETECȚIA RAPIDĂ A ENDOCANULUI DIN PROBELE BIOLOGICE**

**Obiectiv:** Studiu prospectiv asupra endocanului ca biomarker în sepsisul neonatal

### **4.1. Introducere**

Sepsisul neonatal precoce reprezintă o infecție invazivă apărută în primele 72 de ore de viață, însă în aproximativ 90 % din cazuri simptomatologia debutează în primele 24 de ore de la naștere [20]. În cazul nou-născuților, semnele clinice sugestive pentru sepsis apărute în primele 72 de ore de viață sunt nespecifice, putând fi atribuite și altor patologii cu debut în perioada imediat post-natală. Pe de altă parte, biomarkerii utilizați de rutină în diagnosticul sepsisului, precum proteina C reactivă (CRP) și procalcitonina (PCT), au sensibilitate, specificitate și valoare predictivă pozitivă reduse în primele 3 zile de viață, fiind afectați de factori multipli de natură non-infecțioasă [21].

Endocanul (*endothelial cell-specific molecule-1*) este un proteoglican solubil cu masă de 50 kDa secretat de celulele endoteliale pulmonare și renale, și este exprimat în diferite patologii [22,23]. Experimentele *in vitro* au demonstrat că citokinele pro-inflamatorii, precum interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) și factorul de necroză tumorală  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), determină creșterea expresiei genice a endocanului și induc secreția acestuia de către celulele endoteliale [24], în timp ce interferonul gamma (IFN $\gamma$ ) o inhibă [23–27]. De asemenea, s-a demonstrat degradarea endocanului *in vitro* sub acțiunea serin-proteazelor eliberate de polimorfonuclearele neutrofile [28].

Datele raportate în literatură au arătat creșterea nivelurilor serice ale endocanului la pacienții cu sepsis, atât adulți, cât și nou-născuți, precum și corelarea lor cu severitatea sepsisului [24,25], reflectând activarea endotelială asociată inflamației sistemice. Endocanul se leagă de antigenul asociat funcției leucocitare (LFA-1), o integrină exprimată pe suprafața limfocitelor, monocitelor și celulelor Jurkat, inhibând interacțiunea acesteia cu molecula de adeziune intercelulară 1 (ICAM-1) și intervenind astfel în reglarea migrării leucocitelor la locul inflamației, precum și a adeziunii și activării leucocitare. Cu toate acestea, endocanul acționează ca și moleculă protectoare, reducând leziunile tisulare datorate diapedezei leucocitare excesive [28–31] și ar putea totodată reprezenta un biomarker adecvat pentru diagnosticul sepsisului.

Astfel, *un prim obiectiv* propus a fost stabilirea valorilor normale ale endocanului seric în primele 3 zile de viață la nou-născuții la termen și prematuri fără infecție. De asemenea, ne-am propus caracterizarea modului de variație al acestuia în diferite momente după naștere și sub acțiunea diferiților factori asociați cu creșteri ale markerilor inflamatori folosiți în mod uzual în practică. *Al doilea obiectiv* a constat în investigarea rolului potențial al endocanului în diagnosticul sepsisului neonatal precoce pentru facilitarea inițierii timpurii a tratamentului țintit și îmbunătățirea prognosticului vital și pe termen lung al nou-născuților cu sepsis.

#### **4.2.1. Design-ul experimental pentru includerea în studiu a nou-născuților cu sepsis neonatal**

În colaborare cu o echipă de medici neonatologi, am realizat un studiu prospectiv pe nou-născuți internați în secțiile de neonatologie ale Spitalului Clinic de Obstetrică și Ginecologie Cuza-Vodă din Iași. În studiu am inclus în lot 65 de pacienți internați într-o perioadă de 10 luni. Au fost recrutați atât nou-născuți la termen, cât și prematuri, cu vârste de gestație (VG) cuprinse între 33 și 41 de săptămâni, pe baza următoarelor criterii de includere: nou-născut la termen sau prematur (cu VG  $\geq$  33 de săptămâni), în prima zi de viață, fără factori de risc pentru infecție/suspiciune clinică de sepsis, cu adaptare bună la viața extrauterină.

Datele înregistrate din foile de observație clinică au constat în: vârsta de gestație (VG), greutatea la naștere (GN), sexul nou-născuților, modul nașterii, elemente de suferință fetală (lichid amniotic meconial sau anomalii ale bățăilor cordului fetal), necesitatea manevrelor de resuscitare la naștere, scorul APGAR, prezența traumatismelor obstetricale minore (oricare dintre: bosă sero-sangvinolentă, cefalhematom, echimoze, fractură de claviculă, elongație de plex brahial), factori de risc pentru infecție și semne clinice de sepsis.

Lotul a inclus nou-născuți la termen și prematuri cu VG între 26 și 41 de săptămâni și vârstă post-natală  $<$  24 h la internarea în terapie intensivă. Includerea în studiu a fost condiționată de prezența factorilor de risc și a semnelor clinice prezentate în Tabelul 4.1. Pentru includerea în studiu a fost necesară prezența a cel puțin a unui factor de risc și trei sau mai multe semne clinice. Nou-născuții cu anomalii congenitale au fost excluși din studiu.

**Tabelul 4.1.** Criteriile clinice de includere în studiu (adaptat după referința [32])

<b>Factori de risc</b>	<b>Semne clinice</b>	<b>Deteriorare clinică și/sau biologică în cursul primelor 72 h de viață (considerate a fi datorate sepsisului)</b>
Ruperea membranelor > 18 h	Instabilitate termică	Hipotensiune ce impune volum <i>expander</i> sau suport inotrop
Corioamniotită	Apnee	Anemie ce impune transfuzie de masă eritocitară
Febră maternă	Necesar de oxigen suplimentar	Acidoză
Culturi pozitive din lichidul amniotic	Necesitatea suportului respirator non-invaziv/invaziv	Enterocolită ulcero-necrotică
Infecții vaginale sau de tract urinar în timpul sarcinii	Tahicardie/bradicardie	Hemoragie intraventriculară
Lichid amniotic fetid	Intoleranță digestivă	

În cadrul lotului de studiat, nou-născuții au fost împărțiți în două grupuri: septic și non-septic. Grupul septic a inclus nou-născuți cu infecție confirmată (hemocultură pozitivă) și infecție probabilă (date clinice și de laborator sugestive pentru sepsis, dar hemocultură negativă). Suspiciunea de infecție a fost evaluată la internare la toți nou-născuții cu semne clinice sugestive. Parametri serici principali luați în considerare au fost: proteina C reactivă (CRP) și procalcitonină (PCT), iar ca parametri serici suplimentari au fost considerați: numărul de globule albe; valoarea absolută a polimorfonuclearelor neutrofile; numărul de trombocite (Tabel 4.2).

**Tabelul 4.2.** Criteriile utilizate pentru definirea sepsisului neonatal (adaptat după referința [32])\*

<b>Sepsis confirmat</b>	<b>≥ 3 semne clinice sugestive pentru sepsis</b>
	CRP ≥ 6 PCT > 0.5 ng/mL ≥ 2 parametri serici modificați* Hemocultură: <b>pozitivă</b>
<b>Sepsis probabil</b>	<b>≥ 3 semne clinice sugestive pentru sepsis</b>
	CRP ≥ 6 PCT > 0.5 ng/mL ≥ 2 parametri serici modificați* Hemocultură: <b>negativă</b>
<b>Sepsis posibil</b>	<b>&lt; 3 semne clinice sugestive pentru sepsis</b>
	CRP < 6 PCT ≤ 0.5 ng/mL < 2 parametri serici modificați* Hemocultură: <b>negativă</b>
<b>Fără sepsis</b>	<b>Fără semne clinice sugestive pentru sepsis</b>
	CRP < 6 PCT < 0.5 ng/mL Fără modificări ale parametrilor serici* Hemocultură: <b>negativă</b>

\* CRP – proteina C reactivă; PCT – procalcitonină. Alți parametri serici: numărul de globule albe; valoarea absolută a polimorfonuclearelor neutrofile; numărul de trombocite.

#### 4.2.2. Evaluarea nivelurilor de endocan

De la fiecare pacient inclus în studiu s-a recoltat câte 1 mL de sânge prin puncție venoasă periferică în decursul primelor 6 ore de viață și apoi în ziua 3 de viață. Concentrația serică a endocanului a fost determinată prin tehnica ELISA, utilizând anticorpi monoclonali anti-endocan (ELISA Kit H1, Lunginnov, Lille, France). Valorile au fost reprezentate în ng/mL [24].

#### 4.2.3. Analiza statistică

Analiza statistică a fost realizată cu programul IBM SPSS Statistics for Windows v20.0 (IBM SPSS, IBM Ireland Product Distribution Limited, Dublin, Ireland). Diferențele semnificative între grupurile de variabile normal distribuite au fost evaluate prin analiza *Student t test* (pentru probe independente sau pereche, în funcție de caz). Pragul pentru semnificație statistică a fost stabilit la 5 % (valorile p mai mici decât 0,05). Pentru analiza statistică a variabilelor distribuite non-normal a fost utilizată analiza Mann Whitney U test.



În urma prelucrării probelor provenite de la 38 de nou-născuți la termen și 27 prematuri pentru care s-au colectat probe de sânge în ziua 1 și 3, numai 39 de perechi de probe au fost validate. Restul probelor au fost invalidate din cauza insuficienței cantității de ser necesar analizei cu testul ELISA.

**Tabelul 4.4.** Concentrația de endocan seric la lotul de control în zilele 1 și 3 de viață (*adaptat după referința [33]*)

<b>Endocan seric (ng/mL) media ± DS (interval; IC 95%)</b>	<b>n = 22</b>	<b>Termen</b>	<b>Eroare standard (±)</b>	<b>n = 17</b>	<b>Prematuri (VG ≥ 33)</b>	<b>Eroare standard (±)</b>	<b>p</b>
<b>Ziua 1</b>		1,74 ± 0,65 (0,48-3,22; IC: 1,49-2,03)	0,13		2,02 ± 0,49 (1,14-3,20; IC: 1,77-2,27)	0,11	†p = 0,11
<b>Ziua 3</b>		2,02 ± 0,48 (1,16-2,95; IC: 1,81-2,24)	0,10		1,97 ± 0,74 (0,77-3,40; IC: 1,59-2,35)	0,18	‡p = 0,79
		*p = 0,09			§p = 0,81		

DS = deviația standard; IC = interval de confidență; VG = vârstă gestațională;

\*coeficient de semnificație pentru endocanul seric între ziua 1 și ziua 3 la nou-născuții la termen; §coeficient de semnificație pentru endocanul seric între ziua 1 și ziua 3 la nou-născuții prematuri;

†coeficient de semnificație pentru endocanul seric în ziua 1 între nou-născuții la termen și prematuri;

‡coeficient de semnificație pentru endocanul seric în ziua 3 între nou-născuții la termen și prematuri.

În urma analizării rezultatelor celor 39 perechi de probe, între prima și a treia zi de viață nu au existat diferențe semnificativ statistic ale nivelului seric de endocan (nou-născuților la termen: p = 0,09, prematuri: p = 0,81) (Tabel 4.4). De asemenea, nu au existat diferențe semnificativ statistic ale nivelului de endocan seric între nou-născuții la termen și cei prematuri, atât în ziua 1 de viață (p = 0,11), cât și în ziua 3 (p = 0,79).

**Tabelul 4.5.** Variația concentrației endocanului seric (ng/mL) în funcție de modul nașterii, prezența suferinței fetale și a traumatismelor obstetricale minore (adaptat după referința [33])

	<b>n</b>	<b>Ziua 1</b>	<b>p</b>	<b>n</b>	<b>Ziua 3</b>	<b>p</b>
<b>Cezariană *</b>	31	1,76 ± 0,56	0,53	24	2,01 ± 0,79	0,42
<b>Naștere vaginală</b>	26	1,86 ± 0,61		23	2,19 ± 0,79	
<b>Suferință fetală</b>	8	1,76 ± 0,73	0,78	5	2,24 ± 0,19	0,67
<b>Fără suferință fetală</b>	49	1,82 ± 0,56		42	2,08 ± 0,12	
<b>Traumatisme minore</b>	8	1,87 ± 0,56	0,75	6	2,17 ± 0,62	0,81
<b>Fără traumatisme</b>	49	1,80 ± 0,59		41	2,09 ± 0,81	

\*rahianestezie; n – număr cazuri; p – valoarea p.

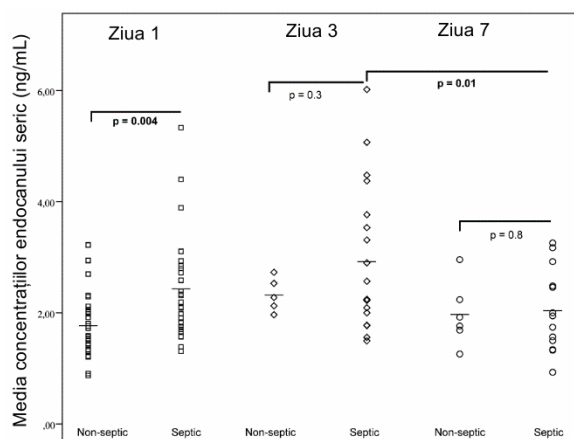
#### 4.3.2. Determinarea nivelurilor serice de endocan în sepsisul neonatal precoce

În studiu au fost incluși 59 de nou-născuți, 24 la termen și 35 prematuri, evaluați în cursul primelor 24 de ore de viață pentru suspiciune de sepsis, dintre care 32 nou-născuți au fost încadrați în lotul septic, iar 27 în lotul non-septic (Tabelul 4.6.).

**Tabelul 4.6.** Caracteristicile nou-născuților incluși în studiu cu sepsis neonatal, în funcție de severitatea sepsisului (adaptat după referința [32])

<b>Lot</b>	<b>Sex</b>	<b>Vârsta gestațională</b>		<b>Total</b>
		<b>Prematuri</b>	<b>Termen</b>	
<b>Non-septic</b>	Feminin	3	4	7
	Masculin	5	15	20
	<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>27</b>
<b>Sepsis</b>	Feminin	5	1	6
	Masculin	2	2	4
	<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
<b>Sepsis sever</b>	Feminin	5	0	5
	Masculin	15	2	17
	<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>22</b>
<b>Total</b>		<b>35</b>	<b>24</b>	<b>59</b>

Concentrația serică medie a endocanului a continuat să crească atât la nou-născuții din lotul septic, cât și din lotul non-septic, însă deși nivelul seric mediu a fost mai mare la nou-născuții septici, diferența dintre cele două loturi nu a mai avut semnificație statistică. Concentrația serică medie a endocanului măsurată în ziua a 7-a a fost mai mică la pacienții din ambele loturi comparativ cu cea din ziua a 3-a, dar scăderea a fost semnificativă din punct de vedere statistic doar în cazul nou-născuților septici (2,04 vs. 2,92, p = 0,01) (Figura 4.1.).



**Figura 4.1.** Comparație între concentrațiile endocanului seric (ng/mL) din ziua 1, ziua 3 și ziua 7, la nou-născuții septici și non-septici (adaptat după referința [32]).

#### 4.4. Concluzii

Din studiile efectuate în cadrul acestui capitol se pot extrage trei concluzii importante:

- ❖ endocanul poate fi considerat un marker util în diagnosticul sepsisului neonatal precoce, cât și în urmărirea evoluției sub tratament;
- ❖ trebuie întreprinse studii suplimentare pentru stabilirea nivelului optim al endocanului la copii nou-născuți sănătoși;
- ❖ trebuie dezvoltat un bionanoconjugat ca platformă pentru testul ELISA cu sensibilitate și specificitate mărite pentru detecția endocanului. Kit-ul disponibil pe piață pentru testul ELISA prezintă o sensibilitate și specificitate destul de mici, de aceea se impune dezvoltarea unor bionanoconjugate ca platforme pentru testul ELISA cu înaltă specificitate în detecția endocanului din probe biologice ce conțin cantități foarte mici ale analitului studiat.

## CONCLUZII GENERALE

Din rezultatele obținute în urma cercetărilor întreprinse în teza de doctorat „Sisteme inteligente pentru transportul de specii chimice active. Obținere. Caracterizare”, se desprind următoarele concluzii generale:

- ✓ S-a sintetizat o serie de derivați de eteri coroană pentru studierea agregării acestora prin intermediul punților de hidrogen. Structurile chimice ale derivaților de eteri coroană au fost confirmate prin  $^1\text{H-RMN}$  și HPLC-MS.
- ✓ Capacitatea de transport a cationilor prin membrana lipozomală este determinată de creșterea concentrației de derivat de eter coroană studiat.
- ✓ În urma analizei  $\text{EC}_{50}$  și  $k$ , s-a observat că transportul ionilor prin membrană este mai eficient în cazul compușilor cu lanțul alchil mai lung, având în componență radicalul octil și dodecil față de compusul cu lanțul alchil mai scurt (hexil).
- ✓ S-au observat diferențe între transportul mediat de derivații de eter-15-coroană-5 având în componență radicalii octil sau dodecil în funcție de ionul transportat. Transportul ionilor de  $\text{K}^+$  este mai rapid și mai eficient în cazul compusului cu radicalul alchil mai lung, și anume dodecil-benzoureido-eter-15-coroană-5.
- ✓ Prin înlocuirea radicalului alchil liniar cu unul ramificat optic activ nu s-au observat diferențe semnificative în ceea ce privește selectivitatea în transportul ionilor. Activitatea de transport a compușilor cu un radical octil optic activ se situează între cea a compușilor cu radical n-hexil și cea a compușilor cu radical n-octil.
- ✓ Pentru toți compușii examinați, cea mai mare activitate de transport a fost înregistrată în cazul ionilor de  $\text{K}^+$  și  $\text{Rb}^+$ , în timp ce cea mai mică activitate de transport a fost observată în cazul ionilor cu cele mai mici raze ionice,  $\text{Li}^+$  și  $\text{K}^+$ . Această situație este evidentă din valorile activității fracționare  $Y$  și este susținută de valorile  $k$  și  $\text{EC}_{50}$ .
- ✓ În timpul simulărilor DM, nu au fost detectate fenomene de auto-asamblare a compușilor în canale ionice stabile. Cu toate acestea, în cadrul simulărilor de tip Course-Grain, s-a observat translația moleculelor de alchil-benzoureido-eteri coroană de la o parte la alta a membranei lipidice. Acest aspect ar putea sugera existența unui proces de transport de tip *carrier*. Rezultatele obținute până în prezent indică prezența unui mecanism de transport complex.
- ✓ S-au sintetizat doi compuși, prin legarea a două fragmente pirenice la diaminodibenzo-eter-18-coroană-6 prin legături  $-\text{HC}=\text{N}-$ , respectiv  $-\text{N}=\text{N}-$  pentru studiul asupra auto-asamblării derivaților de eter coroană prin interacțiuni de tip  $\pi-\pi$ . Obținerea compușilor a

fost confirmată prin FTIR,  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, TGA și DSC. Analiza cantitativă determinată prin  $^{13}\text{C}$ -RMN a evidențiat prezența a doi izomeri de poziție pentru fiecare din cei doi compuși sintetizați.

- ✓ S-a demonstrat că ambii compuși formează agregate supramoleculare prin intermediul interacțiunilor  $\pi - \pi$ .
- ✓ Compusul DPyDB-C=N-18C6 prezintă interacțiuni de tip  $\pi$ - $\pi$  slabe, rezultatele simulării DM arătând existența unor structuri aproape izoenergetice ca un agregat ușor-paralel cu o distanță de interacțiune în jurul valorilor de 3,45 și 3,28 Å.
- ✓ Compusul AzoPy-18C6 prezintă "stive" pe straturi multiple, evidențiate prin simulări DM și confirmate prin WAXD.
- ✓ În urma investigării compusului DPyDB-C=N-18C6 în solvenți cu polarități diferite (n-hexan, toluen, 1,2-diclorețan și etanol), prin experimente UV-vis și de fluorescență, precum și prin calcule de mecanică cuantică, s-a observat prezența tranzițiilor  $\pi \rightarrow \pi^*$  și  $n \rightarrow \pi^*$ , dintre care predominantă a fost tranziția  $\pi \rightarrow \pi^*$  datorată conjugării extinse  $\pi$ . Experimentele au confirmat modelele cuantice efectuate pentru aceste sisteme.
- ✓ Aranjamentul supramolecular al sistemului AzoPy-18C6 a fost demonstrat din punct de vedere experimental și prin studii *in silico*.
- ✓ S-a demonstrat că fragmentele de piren aromatic din interiorul stivelor ordonate ale AzoPy-18C6 prezintă interacțiuni  $\pi$ - $\pi$  în urma studierii caracteristicilor fotofizice ale stării excitate (analiza UV-Vis și spectroscopia de fluorescență). Calculele DFT și TD-DFT care au arătat interacțiunea dintre densitățile electronice ale orbitalilor moleculari au confirmat prezența tranzițiilor mixte  $\pi \rightarrow \pi^*$  și  $n \rightarrow \pi^*$ , predominând tranziția  $\pi \rightarrow \pi^*$  datorită conjugării  $\pi$ -extinse.
- ✓ S-a observat că legătura -N=N- joacă un rol cheie în stivuirea  $\pi$ - $\pi$  a sistemului AzoPy-18C6, prin determinarea unei geometrii moleculare planarizate
- ✓ Unghiul diedru din secvența C=N=N-C, specifică unităților de azopiren și interacțiunilor Van der Waals, este, de asemenea, important în stivuirea  $\pi$ - $\pi$  a sistemului AzoPy-18C6.
- ✓ În urma studiilor efectuate pe nou-născuți la termen și cei născuți prematuri, pe baza concentrației endocanului seric s-a constatat că endocanul este un marker biologic cu o sensibilitate mare, dar cu o selectivitate mai mică. Totuși endocanul poate avea rol de marker în procesul de diagnosticare precoce în sepsisul neonatal și în monitorizarea răspunsului la tratament. Prin proiectarea unor sisteme inteligente pentru detecția endocanului se pot dezvolta sisteme complexe de tratare a efectelor sepsisului neonatal.

## DISEMINAREA REZULTATELOR

Rezultatele științifice prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au făcut până în prezent subiectul a cinci articole științifice publicate în reviste cotate ISI, a trei participări la conferințe științifice naționale (două comunicări orale și un poster) și a trei participări la conferințe internaționale (trei postere).

### I) Lucrări publicate în reviste cotate ISI raportate la teza de doctorat:

1. A. Coroaba, C. Al-Matarneh, T. Vasiliu, S.-A. Ibanescu, **R. Zonda**, I. Esanu, D.-L. Isac, M. Pinteala. Revealing the supramolecular interactions of the bis(azopyrenyl) dibenzo-18-crown-6-ether system, *Journal of Molecular Liquids*, 374, 121298, **2023**, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121298>. (IF 2022 = 6)
2. A. Coroaba, D.-L. Isac, C. Al-Matarneh, T. Vasiliu, S.-A. Ibanescu, **R. Zonda**, R. Ardeleanu, A. Neamtu, D. Timpu, A. Nicolescu, F. Mocci, S. S. Maier, A. Laaksonen, M. Abadie, M. Pinteala. Probing the supramolecular features via  $\pi$ - $\pi$  interaction of a di-iminopyrene-dibenzo-18-crown-6-ether compound: experimental and theoretical study. *RSC advances*, 10 (63), 38304-38315, **2020**, DOI: 10.1039/D0RA06929A (IF 2022 = 3.9)
3. G. I. Zonda, **R. Zonda**, A. T. Cernomaz, L. Paduraru, B. D. Grigoriu. Endocan serum concentration in uninfected newborn infants. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 13 (9), 817-822, **2019**, <https://doi.org/10.3855/jidc.11660> (IF 2022 = 2.512)
4. G. I. Zonda, **R. Zonda**, A. Cernomaz, L. Paduraru, A. Avasiloiu, B. Grigoriu. Endocan - a potential diagnostic marker for early onset sepsis in neonates. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 13 (4), 311-317, **2019**, <https://doi.org/10.3855/jidc.11202> (IF 2022 = 2.512)
5. **R. Zonda**, A. Coroaba, S. Ibanescu, T. Vasiliu, A. Neamtu, M. Sillion, T. Rusu, M. Pinteala. Cation transport activity of the alkyl-ureido-benzo-15-crown-5-ethers through double layer lipid membranes, *Rev. Roum. Chim.*, 63 (7-8), 665-672, **2018**, (IF 2022 = 0.5)

### II) Lucrări publicate in reviste cotate ISI conexe cu subiectul tezei de doctorat:

1. N. Simionescu, **R. Zonda**, A. R. Petrovici, A. Georgescu. The Multifaceted Role of Extracellular Vesicles in Glioblastoma: microRNA Nanocarriers for Disease Progression and Gene Therapy, *Pharmaceutics*, 13 (7), 988, **2021**, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070988> (IF 2022 = 5,4)

### III) Capitole de carte

1. **R. Zonda**, S.-A. Ibanescu, M. Sillion, A. Coroaba, D.-L. Isac, M. J. M. Abadie. Measuring Ionic Transport Through Lipid Bilayers. In: *New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications* (eds. M. J. M. Abadie, M. Pinteala, A. Rotaru), 25-50 (Springer International Publishing), **2021**
2. M. Sillion, A. Fifere, L. A. Lungoci, N. Marangoci, S.-A. Ibanescu, **R. Zonda**, A. Rotaru, M. Pinteala. Mass spectrometry as a complementary approach for noncovalently bound complexes based on cyclodextrins. In: *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research* (eds. A. G. Woods, C. C. Darie), 685–701 (Springer International Publishing), **2019**

### IV) Participări la manifestări științifice naționale și internaționale

#### a) Comunicări orale:

1. **R. Zonda**, S. Ibanescu, A. Coroaba, T. Vasiliu, C. Al-Matarneh, M. Sillion, A. Neamtu, M. Pinteala. Autoasamblarea supramoleculară a derivaților de piren prin variația mediului și a geometriei moleculare. *Zilele Academice Iașene, a XXVII-a Sesiune de Comunicări Științifice a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Progrese în știința compușilor organici și macromoleculari*, Iași, 2 – 4 octombrie **2019**.
2. **R. Zonda**, A. Coroaba, M. Sillion, S. Ibanescu, M. Pinteala, M. Barboiu. Selectivity of transport capacity of the compounds based on 15-crown-5 and 18-crown-6 ethers, *Conferința Facultății de Chimie, Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” Iași*, Iași, 27 – 28 octombrie **2016**.

#### b) Participări cu poster:

1. N. Simionescu, S. Nechifor, R. Buga, M. Dabija, L. Eva, **R. Zonda**, A. R. Petrovici, A. Georgescu. Microvesicle-associated microRNA signature in glioblastoma: preliminary results from OpenArray profiling. *Conferința Internațională sub egida Academiei Române: cel de-al 42-lea Simpozion Aniversar al Institutului de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu” și cea de-a 38-a Sesiune Anuală a Societății Române de Biologie Celulară*, eveniment hibrid, București, 4 – 6 noiembrie **2021**.
2. M. Sillion, C. M. Alexandrica, **R. Zonda**, A. Coroaba, S. Ibanescu, M. I. Popa. Modulation de la morphologie des Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL) pour la fabrication des biohybrides utilises comme vecteurs non viraux. *Dixième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée*, Bacău, 27 – 29 iunie **2018**.
3. **R. Zonda**, A. Coroaba, M. Sillion, S. Ibanescu, M. Pinteala, M. Barboiu. Study of the transport capacity of the compounds based on modified 15-crown-5 and 18-crown-6 ethers through bilayer lipidic membranes. *18th Tetrahedron Symposium, New Developments in Organic Chemistry*, Budapest, Hungary, 27 - 30 iunie **2017**.

**4. R. Zonda**, A. Coroaba, S. Ibanescu, T. Vasiliu, A. Neamtu, M. Sillion, M. Pinteala. Influența lungimii radicalului alchil din alchil-ureidobenzo-eteri-15-coroană-5 asupra capacității de transport cationic prin membrane lipidice dublu-strat, *Zilele Academice Iașene, a XXVI-a Sesiune de Comunicări Științifice a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, Progrese în știința compușilor organici și macromoleculari*, Iași, 5 - 6 octombrie **2017**.

#### **V) Specializări și cursuri efectuate:**

**1.** Seminar *Electrolytes polymères pour les piles à combustible, accumulateurs lithium, cellules solaires à colorant*, dr. Cristina Iojoiu, Directeur de Recherche, CNRS, LEPMI (Laborator d'electrochimie si fisico chimie des materiales si interfate) – Grenoble - INP, Franța, organizat la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, 16 – 17 noiembrie **2017**.

**2.** *Fourth SupraChem Lab training event* organized by the ERA Chair management team, 17 – 19 septembrie **2017**.

**3.** *Third Suprachem Lab indoor training* organized by the ERA Chair management team, 31 mai – 01 iunie **2017**.

**4.** Seminar *UV/EB Curing-Principle, 3D Structures, Coatings and Thin Film Technologies*, Prof. Marc J.M. Abadie, University of Montpellier, Franța, organizat la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, 28 februarie – 01 martie **2017**.

**5.** Seminar *Auto-organized supramolecular systems by anisotropic self-assembly. Biobased polymers and matrix to develop green composites. Design of sustainable thermosets: from synthesis to properties control*, dr. Alice Cristina Mija, Associate Professor HDR at University of Nice Sophia Antipolis, Franța, organizat la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, 07 – 10 noiembrie **2016**.

#### **VI) Finanțarea cercetărilor – membru în echipele de cercetare ale proiectelor naționale și internaționale:**

**1. Horizon 2020 WIDESPREAD 2-2014: ERA Chairs**, nr. 667387 (2016 – 2020) - Suprachem Lab - Laboratory of Supramolecular Chemistry for Adaptive Delivery Systems Era Chair Initiative. Subproject 1: Dynamic Interactive Systems for Constitutional Water and Ion Channels

**2. PN-III-P4-ID-PCE-2016-0519** (2018 – 2019) – „Noi oligomeri cationici amfifili ca alternative sintetice pentru peptide antimicrobiene si/sau ca biocizi de uz extern”



## BIBLIOGRAFIE

1. Daintith, J. Dictionary of Chemistry (6th Edition). *Oxford Univ. Press* **2008**, doi:10.1016/B978-0-08-011600-6.50016-4.
2. Gokel, G.W.; Leevy, W.M.; Weber, M.E. Crown Ethers: Sensors for Ions and Molecular Scaffolds for Materials and Biological Models. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2723–2750, doi:10.1021/cr020080k.
3. Steed, J.W. First- and Second-Sphere Coordination Chemistry of Alkali Metal Crown Ether Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *215*, 171–221, doi:10.1016/S0010-8545(01)00317-4.
4. Sakai, N.; Matile, S. Synthetic Ion Channels. *Langmuir* **2013**, *29*, 9031–9040, doi:10.1021/la400716c.
5. Sanders, J.K. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives. VonJ.-M. Lehn. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1995. 271 S., Geb. 128.00 DM/Broschur 58.00 DM. - ISBN 3-527-29312-4/3-527-29311-6; 1995; Vol. 107; ISBN 3527293116.*
6. Cazacu, A.; Tong, C.; Van Der Lee, A.; Fyles, T.M.; Barboiu, M. Columnar Self-Assembled Ureido Crown Ethers: An Example of Ion-Channel Organization in Lipid Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9541–9548, doi:10.1021/ja061861w.
7. Barboiu, M.; Vaughan, G.; Van Der Lee, A. Self-Organized Heteroditopic Macrocyclic Superstructures. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3073–3076, doi:10.1021/ol035096r.
8. Gilles, A.; Barboiu, M. Highly Selective Artificial K<sup>+</sup> Channels: An Example of Selectivity-Induced Transmembrane Potential. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 426–432.
9. Zonda, R.; Coroaba, A.; Ibanescu, S.; Vasiliu, T.; Neamtu, A.; Silion, M.; Rusu, T.; Pinteala, M. Cation Transport Activity of the Alkyl-Ureido-Benzo-15-Crown-5-Ethers through Double Layer Lipid Membranes. *Rev. Roum. Chim.* **2018**, *63*, 665–672.
10. Pinteala, M.; Epure, V.; Harabagiu, V.; Simionescu, B.C.; Schlick, S. Concentration- and PH-Dependent Conformational Changes and Aggregation of Block Copolymers of Poly(Methacrylic Acid) and Poly(Dimethylsiloxane) in Aqueous Media, Based on Fluorescence Spectra of Pyrene and Potentiometry. *Macromolecules* **2004**, *37*, 4623–4634, doi:10.1021/MA0496697/ASSET/IMAGES/LARGE/MA0496697F00010.JPEG.
11. Szajdzinska-Pietek, E.; Pinteala, M.; Schlick, S. Monitoring PH-Dependent Conformational Changes in Aqueous Solutions of Poly(Methacrylic Acid)-b-Polydimethylsiloxane Copolymer Based on Fluorescence Spectra of Pyrene and 1,3-Bis(1-Pyrenyl)Propane. *Polymer (Guildf).* **2004**, *45*, 4113–4120.
12. Hoche, J.; Schmitt, H.-C.C.; Humeniuk, A.; Fischer, I.; Mitrić, R.; Röhr, M.I.S.S. The Mechanism of Excimer Formation: An Experimental and Theoretical Study on the Pyrene Dimer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 25002–25015, doi:10.1039/C7CP03990E.
13. Coroaba, A.; Isac, D.L.; Al-Matarneh, C.; Vasiliu, T.; Ibanescu, S.A.; Zonda, R.; Ardeleanu, R.; Neamtu, A.; Timpu, D.; Nicolescu, A.; et al. Probing the Supramolecular Features: Via  $\pi$ - $\pi$  Interaction of a Di-Iminopyrene-Di-Benzo-18-Crown-6-Ether Compound: Experimental and Theoretical Study. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 38304–38315, doi:10.1039/d0ra06929a.
14. Ardeleanu, R.; Voiculescu, N.; Marcu, M.; Roman, G.; Buchidau, C.; Sacarescu, L.; Sacarescu, G.; Ghica, G.; Alley, V. Synthesis of a New Siloxane-Crown Ether Polyamide P-. **1997**, *746*, 739–746.
15. Deo, C.; Bogliotti, N.; Métivier, R.; Retaillieu, P.; Xie, J. Photoswitchable Arene Ruthenium Complexes Containing O-Sulfonamide Azobenzene Ligands. *Organometallics* **2015**, *34*, 5775–5784, doi:10.1021/ACS.ORGANOMET.5B00871/SUPPL\_FILE/OM5B00871\_SI\_003.CIF.
16. Al Matarneh, C.; Ciobanu, C.I.; Mangalagiu, V.; Zbancioc, G.; Danac, R. Microwave Assisted Synthesis of Six Member Ring Azaheterocycles and Their Antimycobacterial and Anticancer Evaluation. *Rev. Chim.* **2020**, *71*, 287–293, doi:10.37358/RC.20.3.7999.
17. Al Matarneh, C.M.; Ciobanu, C.I.; Apostu, M.O.; Mangalagiu, I.I.; Danac, R. Cycloaddition versus Amidation in Reactions of 2-Amino-2-Oxoethyl-Phenanthroline Ylides to Activated Alkynes and Alkenes. *Comptes Rendus Chim.* **2018**, *21*, 1–8, doi:10.1016/J.CRCL.2017.11.003.
18. Al Matarneh, C.M.; Apostu, M.O.; Mangalagiu, I.I.; Danac, R. Reactions of Ethyl Cyanofornate with Cycloimmonium Salts: A Direct Pathway to Fused or Substituted Azaheterocycles.

- Tetrahedron* **2016**, 72, 4230–4238, doi:10.1016/J.TET.2016.05.061.
19. Coroaba, A.; Al-Matarneh, C.; Vasiliu, T.; Ibanescu, S.-A.; Zonda, R.; Esanu, I.; Isac, D.-L.; Pinteala, M. Revealing the Supramolecular Interactions of the Bis(Azopyrenyl) Dibenzo-18-Crown-6-Ether System. *J. Mol. Liq.* **2023**, 374, 121298, doi:10.1016/J.MOLLIQ.2023.121298.
  20. Plano, L.R.W. The Changing Spectrum of Neonatal Infectious Disease. *J. Perinatol.* **2010**, 30, S16-20, doi:10.1038/jp.2010.92.
  21. Sucilathangam, G.; Amuthavalli, K.; Velvizhi, G.; Ashihabegum, M.; Jeyamurugan, T.; Palaniappan, N. Early Diagnostic Markers for Neonatal Sepsis: Comparing Procalcitonin (PCT) and C-Reactive Protein (CRP). *J. Clin. diagnostic Res.* **2012**, 627–631.
  22. Lassalle, P.; Molet, S.; Janin, A.; Van der Heyden, J.; Tavernier, J.; Fiers, W.; Devos, R.; Tonnel, A.B. ESM-1 Is a Novel Human Endothelial Cell-Specific Molecule Expressed in Lung and Regulated by Cytokines. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 20458–20464, doi:10.1074/jbc.271.34.20458.
  23. Bechard, D.; Meignin, V.; Scherpereel, A.; Oudin, S.; Kervoaze, G.; Bertheau, P.; Janin, A.; Tonnel, A.B.; Lassalle, P. Characterization of the Secreted Form of Endothelial-Cell-Specific Molecule 1 by Specific Monoclonal Antibodies. *J. Vasc. Res.* **2000**, 37, 417–425, doi:10.1159/000025758.
  24. Scherpereel, A.; Depontieu, F.; Grigoriu, B.; Cavestri, B.; Tscopoulos, A.; Gentina, T.; Jourdain, M.; Pugin, J.; Tonnel, A.B.; Lassalle, P. Endocan, a New Endothelial Marker in Human Sepsis. *Crit. Care Med.* **2006**, 34, 532–537, doi:10.1097/01.CCM.0000198525.82124.74.
  25. Saldır, M.; Tunc, T.; Cekmez, F.; Cetinkaya, M.; Kalayci, T.; Fidancı, K.; Babacan, O.; Erdem, G.; Kocak, N.; Sari, E.; et al. Endocan and Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 as Novel Markers for Neonatal Sepsis. *Pediatr. Neonatol.* **2015**, 56, 415–421, doi:10.1016/j.pedneo.2015.03.006.
  26. Buhimschi, I.A.; Buhimschi, C.S. The Role of Proteomics in the Diagnosis of Chorioamnionitis and Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clin. Perinatol.* 2010, 37, 355–374.
  27. Simonsen, K.A.; Anderson-Berry, A.L.; Delair, S.F.; Dele Davies, H. Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, 27, 21–47, doi:10.1128/CMR.00031-13.
  28. Palud, A.; Parmentier-Decrucq, E.; Pastre, J.; De Freitas Caires, N.; Lassalle, P.; Mathieu, D. Evaluation of Endothelial Biomarkers as Predictors of Organ Failures in Septic Shock Patients. *Cytokine* **2015**, 73, 213–218, doi:10.1016/j.cyto.2015.02.013.
  29. Pauly, D.; Hamed, S.; Behnes, M.; Lepiorz, D.; Lang, S.; Akin, I.; Borggreffe, M.; Bertsch, T.; Hoffmann, U. Endothelial Cell-Specific Molecule-1/Endocan: Diagnostic and Prognostic Value in Patients Suffering from Severe Sepsis and Septic Shock. *J. Crit. Care* **2016**, 31, 68–75, doi:10.1016/j.jcrc.2015.09.019.
  30. Béchard, D.; Scherpereel, A.; Hammad, H.; Gentina, T.; Tscopoulos, A.; Aumercier, M.; Pestel, J.; Dessaint, J.-P.; Tonnel, A.-B.; Lassalle, P. Human Endothelial-Cell Specific Molecule-1 Binds Directly to the Integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and Blocks Binding to Intercellular Adhesion Molecule-1. *J. Immunol.* **2001**, 167, 3099–3106, doi:10.4049/jimmunol.167.6.3099.
  31. Buyuktiryaki, M.; Tayman, C.; Okur, N.; Serkant, U.; Cakir, U.; Halil, H.; Oncel, M.Y.; Oguz, S.S. Can Endocan Predict Late-Onset Neonatal Sepsis? *J. Pediatr. Infect. Dis.* **2019**, 14, 96–102, doi:10.1055/s-0038-1675239.
  32. Zonda, G.I.; Zonda, R.; Cernomaz, A.T.; Păduraru, L.; Avasiloaiei, A.L.; Grigoriu, B.D. Endocan - A Potential Diagnostic Marker for Early Onset Sepsis in Neonates. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2019**, 13, 311–317, doi:10.3855/jidc.11202.
  33. Zonda, G.I.; Zonda, R.; Cernomaz, A.T.; Paduraru, L.; Grigoriu, B.D. Endocan Serum Concentration in Uninfected Newborn Infants. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2019**, 13, 817–822, doi:10.3855/jidc.11660.