

Universitatea POLITEHNICA din București

Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor

Departamentul de Chimie Organică "Costin D. NENIȚESCU"



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător științific:
Prof. dr. ing. Raluca Stan**

**Doctorand:
Alina Moroșan**

**BUCUREȘTI
2020**

Universitatea POLITEHNICA din București

Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor

Departamentul de Chimie Organică "C. D. NENIȚESCU"



Sisteme nanostructurate magnetice cu aplicații în sinteza de peptide și în electronică

**Conducător științific:
Prof. dr. ing. Raluca Stan**

**Doctorand:
Alina Moroșan**

**BUCUREȘTI
2020**

CUPRINS

LISTA DE ABREVIERI	9
INTRODUCERE	13
I. STUDIUL CRITIC AL DATELOR DIN LITERATURĂ	15
CAPITOLUL 1. SINTEZA DE PEPTIDE	16
1.1. Sinteza de peptide. Noțiuni generale..	16
1.2. Sinteza chimică de peptide: Scurt istoric.	22
1.3. Sinteza de peptide în fază solidă (SPPS)	24
1.3.1. Grupări folosite pentru protejarea amino acidului N-terminal în sinteza de peptide pe suport solid	25
1.3.2. Monitorizarea etapelor de cuplare și deprotejare	29
1.3.3. Selectarea rășinii utilizată ca suport solid și proprietățile de gonflare	31
1.3.4. Linkeri folosiți în SPPS	33
1.3.5. Activarea grupării carboxil a amino acizilor	35
1.3.6. Particularități specifice în SPPS	36
1.3.6.1. Racemizarea.....	36
1.3.6.2. Formarea aspartimidelor	38
1.3.6.3. Agregarea peptidelor.....	39
1.4. Strategii moderne de abordare ale sintezei de peptide în fază solidă	40
1.4.1. SPPS asistată la microunde (MW-SPPS) și SPPS utilizând amestecarea cu ultrasunete	40
1.4.2. Abordarea chimiei verzi în SPPS	40
1.4.3. Materiale nanocompozite în SPPS	41
1.5. Purificarea și caracterizarea peptidelor sintetizate.....	44
CAPITOLUL 2. NANOPARTICULE MAGNETICE PE BAZĂ DE FIER	45
2.1. Nanoparticule magnetice pe bază de oxid de fier. Noțiuni generale..	45
2.1.1. Proprietățile magnetice ale nanoparticulelor	46
2.2. Nanoparticule magnetice te tip core-shell cu shell organic	48
2.2.1. Metode de sinteză a nanoparticulelor magnetice	49
2.2.1.1. Metoda co-precipitării	49
2.2.1.2. Metoda microemulsie	50
2.2.1.3. Metoda sol-gel	51
2.2.1.4. Metoda prin descompunere termică a precursorilor.....	51
2.2.1.5. Metoda hidrotermală	52
2.2.1.6. Metoda electrochimică	53
2.2.1.7. Metoda polioliol	54
2.2.1.8. Biomineralizare	55
2.2.2. Modificarea suprafeței nanoparticulelor magnetice Fe ₃ O ₄	56
2.2.2.1. Acoperirea cu silice prin metoda sol-gel.....	57
2.3. Aplicații ale nanoparticulelor magnetice	59

2.3.1. Imagistica prin rezonanță magnetică nucleară	62
2.3.2. Hipertermie magnetică	63
2.3.3. Livrarea țintită de medicamente	63
2.3.4. Bioseparare	64
2.3.5. Detecția bacteriilor, virusurilor și proteinelor	64
2.3.6. Suport solid în sinteza de peptide în fază solidă	64
2.3.7. Aplicații în electronică	65
2.3.8. Aplicații de mediu	65
2.3.9. Nano-organocatalizatori	65
2.3.10. Aplicații industriale	66
II. CONTRIBUȚII ORIGINALE	67
CAPITOLUL 3. MATERIALE ȘI METODE.....	68
3.1. Materiale utilizate pentru obținerea sistemelor nanostructurate magnetice și în sinteza peptidică în fază solidă	68
3.1.1. Materiale folosite pentru sinteza nanoparticulelor magnetice de tip core-shell/nanoparticulelor cu shell de silice funcționalizat și sinteza sistemelor linker	68
3.1.2. Materiale folosite pentru sinteza de peptide în fază solidă	68
3.1.3. Solvenți.....	69
3.2. Metode de sinteză și tehnici de caracterizare a nanoparticulelor magnetice de tip core-shell, a nanoparticulelor cu shell de silice funcționalizat, a sistemelor linker și a secvențelor peptidice sintetizate.	70
3.2.1. Metode de sinteză a sistemelor nanostructurate	70
<i>Sinteza nanoparticulelor magnetice de tip core-shell: Fe₃O₄-PABA</i>	70
<i>Sinteza nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂</i> .	70
a) Sinteza nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1	70
b) Sinteza nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2	71
c) Sinteza nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3 și Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4	71
<i>Sinteza sistemelor nanostructurate folosite ca suport solid în sinteza de peptide</i>	72
a) Sinteza sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-GA-PPD	72
b) Sinteza sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA	72
c) Sinteza sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH	73
d) Sinteza sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH_{mw}	74
<i>Fabricarea tranzistorului pe bază de nanoparticule magnetice Fe₃O₄-PABA</i>	74
<i>Sinteza nanofilmului Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu radical DPPH</i>	75
3.2.2. Sinteza de peptide pe suport nanostructurat magnetic	75
a) Sinteza Lys-Ala-Gly	75
b) Sinteza Val-Ile- Lys	76

c) Sinteza Gly-Ala-Phe	78
d) Sinteza Leu-Ile-Val	78
3.2.3. Tehnici de caracterizare ale produşilor finali şi intermediari sintetizaţi	78
Spectrometria de Infraroşu cu Transformantă Fourier (FT-IR)	78
Analiză Termogravimetrică (TGA).....	78
Difracţia de raze X (XRD)	78
Microscopia electronică de transmisie de înaltă rezoluţie (HR-TEM).....	78
Microscopia electronică de baleaj (SEM)	79
Difuzia dinamică a luminii (DLS).....	79
Analiza Brunauer–Emmett–Teller (BET)	80
Spectroscopia de rezonanţă magnetică nucleară (RMN)	81
Spectrometria de masă (MS)	81
Spectrometria de masă de înaltă rezoluţie HR-MS şi MALDI-FT-ICR	82
Microscopia de Infraroşu cu Transformantă Fourier (Microscopia FT-IR).....	82
Măsurători magnetice	83
Iradieră cu microunde	83
Măsurători electrice ale tranzistorilor pe bază de nanoparticule magnetice	83
3.2.4. Determinarea biodisponibilităţii nanoparticulelor Fe₃O₄-PABA folosind modelul membranei corioalantoidiene (CAM) de embrion de pui şi modelul murin	83
CAPITOLUL 4. OBIECTIVE ŞI ORIGINALITATE	86
CAPITOLUL 5. CONTRIBUŢII ORIGINALE PRIVIND SINTEZA SISTEMELOR NANOSTRUCTURATE MAGNETICE CA SUPORTURI SOLIDE PENTRU SINTEZA DE PEPTIDE.....	89
5.1. Obiectivele cercetării experimentale.....	89
5.2. Obţinerea şi caracterizarea sistemelor nanostructurate folosite ca suport solid în sinteza de peptide în fază solidă	90
5.2.1. Obţinerea şi caracterizarea nanoparticulelor Fe₃O₄-PABA	90
Determinarea biodisponibilităţii nanoparticulelor Fe₃O₄-PABA folosind modelul membranei corioalantoidiene (CAM) de embrion de pui şi modelul murin	95
5.2.2. Obţinerea şi caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂	103
5.2.2.1. Obţinerea şi caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1	104
5.2.2.2. Obţinerea şi caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2	111
5.2.2.3. Obţinerea şi caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3 şi Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4	113
5.2.3. Obţinerea şi caracterizarea sistemelor nanostructurate utilizabile în sinteza în fază solidă.....	124
5.2.3.1. Obţinerea şi caracterizarea sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-GA-PPD	125

5.2.3.2. Obținerea și caracterizarea sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA	126
5.2.3.3. Obținerea și caracterizarea sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-SiO₂- SiLOH	130
5.2.3.4. Obținerea și caracterizarea sistemului nanostructurat Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiLOHmw	134
5.3. Concluzii	136
CAPITOLUL 6. CONTRIBUȚII ORIGINALE PRIVIND APLICAȚIILE ÎN ELECTRONICĂ ALE NANOPARTICULELOR Fe₃O₄-PABA ȘI INVESTIGAREA PROPRIETĂȚILOR ELECTRICE ALE NANOFILMULUI Fe₃O₄-PABA-SiO₂ DOPAT CU DPPH	137
6.1. Aplicații speciale ale nanoparticulelor Fe₃O₄-PABA : Obținerea tranzistorului pe bază de nanoparticule Fe₃O₄-PABA	138
6.2. Investigarea proprietăților electrice ale nanofilmului Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu radical DPPH	143
6.2.1. Caracterizarea nanofilmului Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu radical DPPH	147
6.3. Concluzii	151
CAPITOLUL 7. CONTRIBUȚII ORIGINALE ASUPRA SINTEZEI DE PEPTIDE PE SUPORT NANOSTRUCTURAT MAGNETIC (NSS).....	152
7.1. Obiectivele cercetării experimentale.....	153
7.2. Sinteza de peptide pe suport nanostructurat magnetic	153
7.2.1. Obținerea și caracterizarea peptidei Lys-Ala-Gly	158
7.2.2. Obținerea și caracterizarea peptidei Val-Ile-Lys	160
7.2.3. Obținerea și caracterizarea peptidei Gly-Ala-Phe	163
7.2.4. Obținerea și caracterizarea peptidei Leu-Ile-Val	164
7.3. Identificarea peptidelor și a fragmentelor posibile obținute prin analiza FT-MS....	166
7.3.1. Identificarea Lys-Ala-Gly și a fragmentelor posibile.....	168
7.3.2. Identificarea Val-Ile-Lys și a fragmentelor posibile.....	173
7.3.3. Identificarea Gly-Ala-Phe și a fragmentelor posibile.....	178
7.3.4. Identificarea Leu-Ile-Val și a fragmentelor posibile	179
7.4. Concluzii	184
CAPITOLUL 8. CONCLUZII GENERALE	185
ANEXE	188
BIBLIOGRAFIE	197
DISEMINARE REZULTATE	213

Cuvinte cheie: nanoparticule magnetice core-shell, linker, suport solid, Fmoc, sinteza în fază solidă, sinteza de peptide, tranzistor cu film subțire

II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 4. OBIECTIVE ȘI ORIGINALITATE

Sinteza de peptide pe suport solid reprezintă una dintre puținele metodologii sintetice care a revoluționat sinteza organică clasică. Procedurile de lucru simple, ce necesită cantități mici de reactivi, dar și valoarea economică a produșilor rezultați, oferă sintezei de peptide pe suport solid o serie de avantaje față de sinteza organică clasică.

***Obiectivul principal** al acestei teze de doctorat constă într-o nouă abordare a sintezei de peptide în fază solidă (SPPS), și anume: sinteza de peptide pe suport nanostructurat magnetic utilizând strategia Fmoc. În acest scop, în locul suportului solid standard, format dintr-o rășină funcționalizată, am dezvoltat noi tipuri de suport solid constituite din nanoparticule de ferită de tip core-shell cu PABA, shell secundar de silice și diferite sisteme linker cu grupare terminală polară, labile în condițiile finale de clivare, capabile să lege eficient aminoacizi blocați N-terminal și compatibile cu toate etapele sintezei peptidice menționate. Abilitatea de atașare a noilor sisteme nanostructurate utilizând principiul SPPS a fost testată prin cuplarea succesivă a trei aminoacizi diferiți protejați Fmoc.*

Pentru realizarea obiectivului principal s-au urmărit mai multe obiective secundare:

- (1) Sinteza și caracterizarea unor materiale magnetice cu shell organic care să constituie suportul solid în sinteza de peptide
- (2) Sinteza și caracterizarea unor sisteme core-shell cu shell secundar de silice
- (3) Design-ul, sinteza și caracterizarea unor sisteme linker cu grupare terminală polară
- (4) Testarea sistemelor nanostructurate nou sintetizate ca suport solid în sinteza de peptide în fază solidă
- (5) Investigarea proprietăților electrice ale nanofilmelor pe bază de nanoparticule magnetice cu shell organic și a nanofilmelor cu shell organic și shell secundar de silice dopate cu radical DPPH
- (6) Determinarea biodisponibilității nanoparticulelor magnetice **Fe₃O₄-PABA**

Originalitatea acestei lucrări constă în dezvoltarea unei metode noi a sintezei de peptide care folosește ca suport solid un sistem nanostructurat format din nanoparticule magnetice cu shell de PABA (**Fe₃O₄-PABA**) și nanoparticule magnetice cu shell de PABA și shell secundar de silice (**Fe₃O₄-PABA-SiO₂**) funcționalizate cu diferite sisteme linker. Astfel, au fost dezvoltate noi sisteme linker și noi suporturi solide.

În **Capitolul 5** este prezentată contribuția originală despre metodele de sinteză a sistemelor nanostructurate pe bază de nanoparticule magnetice cu shell organic (PABA) și shell

secundar de silice folosite ca suport solid în sinteza de peptide pe suport solid: **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH_{mw}**. De asemenea, în acest capitol sunt prezentate designul și metodele de sinteză ale noilor linkeri testați în sinteza de peptide.

Rezultatele obținute, au fost publicate în articolele:

Alina Moroșan, Dan Eduard Mihaiescu, Daniela Istrati, Georgeta Voicu, Adrian Fudulu, Raluca Stan, „Polar shell magnetic nanostructured systems for heterogeneous nanophase reactions”, *U.P.B. Sci. Bull*, **2018**, 80 (3), 53-64, ISSN 1454-2331

Alina Moroșan, Dan Eduard Mihaiescu, Daniela Istrati, Georgeta Voicu, Mihai Radu, Anamaria Hanganu, Raluca Stan, „Functionalized silica shell magnetic nanoparticles for nanophase peptide synthesis applications”, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2019**, 286, 45-56. (IF = 4.551)

De asemenea, în cadrul acestui capitol, a fost determinată biodisponibilitatea nanoparticulelor magnetice **Fe₃O₄-PABA** folosind modelul membranei corioalantoidiene (CAM) de embrion de pui și modelul murin.

Capitolul 6 conține rezultatele obținute în urma investigării proprietăților electrice ale nanofilmelor pe bază de nanoparticule magnetice cu shell organic, precum și, a nanofilmelor cu shell organic și shell secundar de silice dopate cu radical DPPH.

Rezultatele obținute au fost publicate în articolul:

Cristian Ravariu, Dan Eduard Mihaiescu, **Alina Morosan**, Daniela Istrati, Bogdan Purcăreanu, Rodica Cristescu, Roxana Trușcă, Bogdan Ștefan Vasile, „Solution for green organic thin film transistors: Fe₃O₄ nano-core with PABA external shell as p-type film”, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, **2020**, 31, 1-11. (IF = 2.220)

În **Capitolul 7** este prezentată o nouă abordare a sintezei de peptide utilizând principiul sintezei de peptide pe suport solid, și anume: *sinteza de peptide pe suport nanostructurat magnetic*. Astfel, în locul suportului solid polimeric standard, am dezvoltat noi tipuri de suport solid constituite din nanoparticule de ferită de tip core-shell cu PABA, shell secundar de silice și diferite sisteme linker cu grupare terminală polară, labile în condițiile finale de clivare, capabile să lege eficient aminoacizi blocați N-terminal și compatibile cu toate etapele sintezei de peptide. Noile sisteme nanostructurate sintetizate au fost testate cu succes prin cuplarea succesivă a trei aminoacizi diferiți protejați Fmoc. Peptidele sintetizate (**Lys-Ala-Gly**, **Val-Ile-Lys**, **Gly-Ala-Phe**, **Leu-Ile-Val**) au fost identificate utilizând tehnici avansate de analiză, spectrometrie de masă LC-MS și HR-MS. Structura peptidelor sintetizate a fost confirmată prin identificarea ionilor de fragmentare în spectrele MS.

CAPITOLUL 5. CONTRIBUȚII ORIGINALE PRIVIND SINTEZA SISTEMELOR NANOSTRUCTURATE MAGNETICE CA SUPORTURI SOLIDE PENTRU SINTEZA DE PEPTIDE

Obiectivele cercetării experimentale:

- (1) Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell de PABA. Determinarea biodisponibilității nanoparticulelor magnetice **Fe₃O₄-PABA** folosind modelul membranei corioalantoidiene (CAM) de embrion de pui și modelul murin.
- (2) Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice și a sistemelor nanostructurate folosite ca suport solid în sinteza de peptide.

5.2. Obținerea și caracterizarea sistemelor nanostructurate folosite ca suport solid în sinteza de peptide în fază solidă

5.2.1. Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor *Fe₃O₄-PABA*

Nanoparticulele magnetice core-shell (**Fe₃O₄-PABA**) au fost sintetizate prin metoda coprecipitării [59, 78, 136, 138]. Această metodă este foarte simplă și economică, dimensiunea și forma nanoparticulelor obținute depind de: tipul sărurilor utilizate, diluție, raportul dintre Fe³⁺ și Fe²⁺, valoarea pH-ului, temperatura de reacție, viteza de agitare. Fiind cunoscută afinitatea nanoparticulelor magnetice pentru grupări acide [150] a fost selectat acidul *para*-aminobenzoic (PABA) ce prezintă grupări –NH₂ disponibile după legarea de nanoparticule, pentru a facilita acoperirea cu silice. Alegerea acidului *para*-aminobenzoic este fundamentată și de proprietățile sale biologice care conferă acestui tip de nanoparticule magnetice o bună biocompatibilitate lărgindu-le aria de aplicabilitate.

Reacția chimică de formare a nanoparticulelor Fe₃O₄:

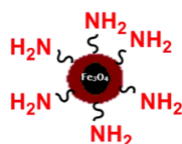
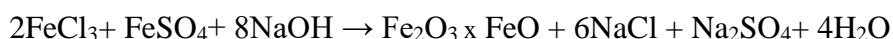


Figura 5.1. Reprezentarea schematică a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA**

Structura cristalină a core-ului magnetic al nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** a fost demonstrată prin analiza XRD și SAED; iar dimensiunea hidrodinamică și morfologia acestora prin DLS, TEM și SEM.

Diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** conform DLS este de 71 nm. Valoarea indicelui de polidispersitate obținut, 0.191 dovedește o bună uniformitate iar stabilitatea bună a dispersiei este dovedită de valoarea potențialului zeta, + 51.6 mV, datorată shell-ului de PABA prin prezența grupărilor -NH₃⁺.

Morfologia nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** a fost determinată prin microscopie electronică. În imaginile SEM putem observa o morfologie granulară cu o bună omogenitate.

Imaginile TEM (Fig. 5.5) confirmă prezența nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** cu dimensiunea core-ului de aproximativ 12 nm. Imaginea SAED (Selected Area Electron Diffraction) confirmă prezența structurii cristaline a Fe₃O₄. Utilizarea metodelor complementare DLS și TEM permite diferențierea între diametrul hidrodinamic al sistemului core-shell/shell de solvatare, respectiv al core-ului magnetic de Fe₃O₄.

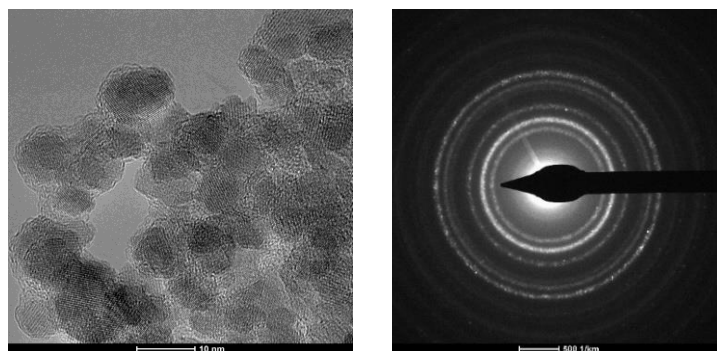


Figura 5.5. Imaginile TEM și SAED pentru **Fe₃O₄-PABA**

Compoziția elementală a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** realizată prin spectroscopie de raze X prin dispersie de energie (EDX) arată că elementele Fe, O, C și N sunt majoritare în probă, confirmându-se prezența elementelor din sistemul core-shell Fe₃O₄-PABA. Prezența Cu se datorează grilei-suport care s-a utilizat pentru realizarea analizei [151].

Suprafața specifică a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** a fost estimată prin analiza BET. Conform analizei BET, materialul obținut are o suprafață specifică de 653 m²/g, cu dimensiune porilor dBH=2.38 nm și volumul porilor V_p=0.74 cm³/g.

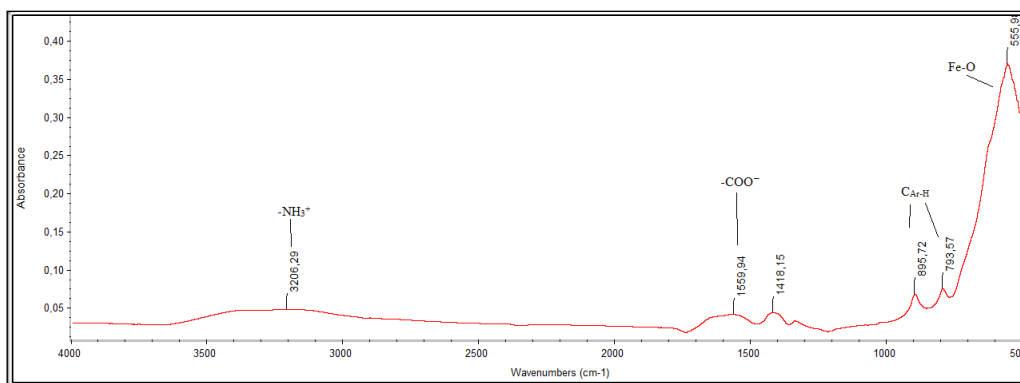


Figura 5.7. Spectrul FT-IR pentru **Fe₃O₄-PABA**

Existența shell-ului de PABA a fost confirmată de spectrul FT-IR (Fig. 5.7). prin prezența benzilor caracteristice pentru gruparea -NH_3^+ la 3206 cm^{-1} și vibrația de întindere caracteristică carboxilatului la 1559 cm^{-1} . Structura aromatică a acidului *p*-aminobenzoic este evidențiată prin prezența benzilor caracteristice în intervalul $793\text{-}895\text{ cm}^{-1}$. Vibrațiile legăturii Fe-O care poate fi observată la 555 cm^{-1} confirmă prezența magnetitei.

Proprietățile magnetice ale nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** au fost măsurate cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrantă (VSM). Curba de magnetizare poate fi observată în Fig. 5.10, precum și valoarea magnetizației de saturație $M_s = 63.174\text{ emu/g}$. Nanoparticulele obținute au fost separate eficient cu ajutorul unui câmp magnetic extern ceea ce arată că shell-ul de PABA nu afectează proprietățile magnetice și utilizarea acestora în aplicații ulterioare.

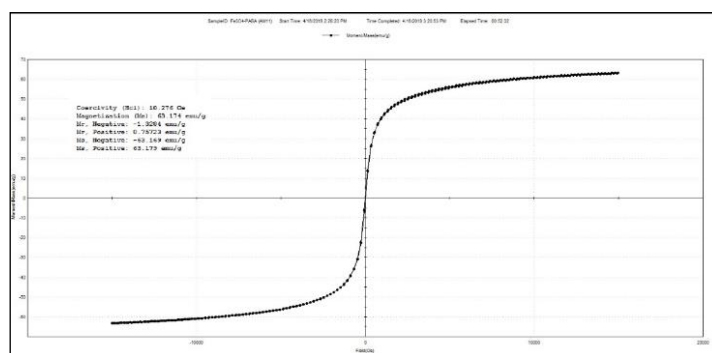


Figura 5.10. Curba de magnetizare a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA**

Determinarea biodisponibilității nanoparticulelor Fe₃O₄-PABA folosind modelul membranei corioalantoidiene (CAM) de embrion de pui și modelul murin

Studiile preliminare pe modele *in vivo* au fost efectuate pe modelul membranei corioalantoidiene a embrionilor de pui și pe modelul murin, folosind nanoparticulele magnetice **Fe₃O₄-PABA** în cadrul Laboratorului pentru studii experimentale pe animale, Biobaza Universității de Medicină și Farmacie din Craiova. În vederea testării proprietăților biologice și a potențialelor perspective biomedicale ale **Fe₃O₄-PABA** s-au testat persistența în circulație, potențialul emboligen după administrarea intravenoasă și posibilitatea conducerii țintite a nanoparticulelor cu ajutorul unui câmp magnetic static extern.

Testarea pe modelul membranei corioalantoidiene

Pentru a testa persistența nanoparticulelor în circulație s-a încercat agregarea intravasculară a acestora în câmp magnetic static, prin aplicarea pe suprafața membranei corioalantoidiene a unui magnet puternic. Persistența nanoparticulelor în circulație se corelează cu cantitatea de nanoparticule agregate în zona de acțiune a câmpului magnetic. Datele obținute au arătat că mărimea depozitelor intravasculare realizate prin agregarea intravasculară a

nanoparticulelor feromagnetice funcționalizate cu PABA nu depinde de timpul cât ouăle au fost ținute în incubator după injectare, ci de timpul de expunere la acțiunea câmpului magnetic static.

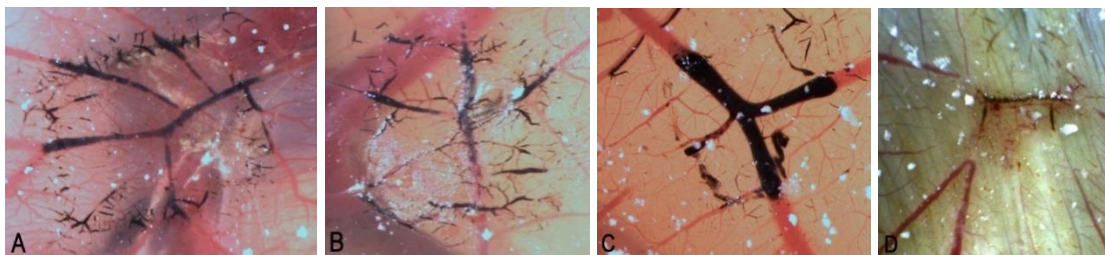


Figura 5.13. Agregarea intravasculară a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** după expunerea timp de 30 minute la acțiunea unui câmp magnetic static. D – aspectul membranei corioalantoidiene la 24 ore de la blocajul magnetic al unui vas de calibru mare.

Dezvoltarea normală a embrionilor după realizarea acestor experimente poate fi considerată un argument puternic în favoarea unui potențial emboligen redus al agregatelor de nanoparticule formate intravascular sub acțiunea câmpului magnetic, cât și pentru potențialul teratogen redus al nanoparticulelor feromagnetice funcționalizate cu PABA.

Testarea pe modelul murin

Pentru acest test s-au utilizat doi șobolani albi din rasa Wistar, la care doza de 1 mL din dispersia de nanoparticule feromagnetice funcționalizate cu PABA a fost injectată pe calea venei cozii, respectiv la nivelul venei mezenterice superioare (după laparotomie).

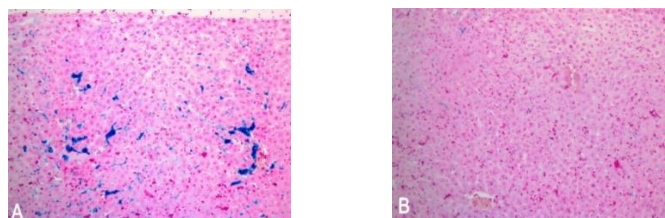


Figura 5.18. Aspectul depozitelor de nanoparticule feromagnetice (colorate albastru) de la nivelul venelor din spațiile porte din zona expusă acțiunii câmpului magnetic (A) și dintr-o zonă neexpusă (B). *Injectare la nivelul venei mezenterice superioare. Colorație cu albastru de Prusia. Ob x10.*

Analiza histologică a secțiunilor colorate cu albastru de Prusia, tehnică care este foarte sensibilă pentru depozitele de Fe³⁺, au evidențiat depozite bogate de nanoparticule în venele spațiului port din zona parenchimului hepatic expusă acțiunii câmpului magnetic static extern (Fig. 5.18 A). La nivelul venelor din spațiile porte ale zonelor neexpuse câmpului magnetic s-au observat depozite discrete de nanoparticule feromagnetice (Fig. 5.18 B).

Concluziile acestui experiment:

- shell-ul de PABA permite persistența în circulație și o manevrare facilă sub acțiunea unui câmp magnetic static a nanoparticulelor feromagnetice pe care le funcționează.
- nanoparticulele de tipul **Fe₃O₄-PABA** sunt biocompatibile și prezintă un risc emboligen scăzut la administrarea intravenoasă

5.2.2. Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice Fe_3O_4 -PABA- SiO_2

Acoperirea suprafeței nanoparticulelor Fe_3O_4 -PABA cu silice, prin prezența grupărilor silanol abundente pe suprafața nanoparticulelor permite o ușoară și eficientă funcționalizare ulterioară [167].

Nanoparticulele Fe_3O_4 -PABA- SiO_2 au fost obținute printr-o metodă sol-gel modificată ce a utilizat două surse de silice, și anume: o soluție de silicat de sodiu, $\rho=1.39 \text{ g mL}^{-1}$ și TEOS. Ca agent alcalin s-a utilizat NH_4OH și ca agent tensioactiv: CTAB (Tabel 5.1.).

Tabel 5.1. Sinteza nanoparticulelor magnetice cu shell de silice: Fe_3O_4 -PABA- SiO_2

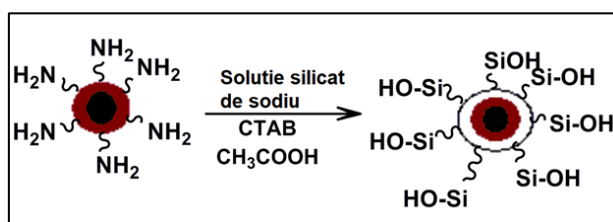
Nanoparticulele magnetice cu shell de silice	Condiții de sinteză	Precursor de silice	Agent alcalin	Template	Îndepărtare template
Fe_3O_4 -PABA- SiO_2 -1	T.c. (picurare)	Sol. silicat de sodiu ($\rho=1.39 \text{ g mL}^{-1}$)	-	CTAB	Calcinare $540^\circ\text{C}/24 \text{ ore}$
Fe_3O_4 -PABA- SiO_2 -2	T.c. (picurare)	TEOS	NH_4OH	CTAB	Spălare EtOH; ACN
Fe_3O_4 -PABA- SiO_2 -3	Microunde (reflux)	TEOS	NH_4OH	CTAB	Calcinare $450^\circ\text{C}/24 \text{ ore}$
Fe_3O_4 -PABA- SiO_2 -4	Microunde (reflux)	TEOS	NH_4OH	CTAB	Spălare EtOH:Ac. Ac 5%;EtOH

Studiul procesului de îndepărtare al template-ului s-a realizat prin două metode:

- calcinare la temperaturi de 450°C și $540^\circ\text{C}/24 \text{ ore}$;
- spălări repetate cu apă ultrapură și solvenți organici de polarități diferite: MeOH, acetona, DCM, EtOH/Acid acetic 5% și EtOH.

5.2.2.1. Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice ce a utilizat ca sursă de silice o soluție de silicat de sodiu Fe_3O_4 -PABA- SiO_2 -1

Pentru sinteza nanoparticulelor magnetice cu shell de PABA și shell secundar de silice pentru care s-a folosit ca sursă de silice o soluție de silicat de sodiu s-au utilizat mai multe concentrații de precursor de silice (Tabel 5.2) cu scopul de a obține o suprafață specifică cât mai ridicată [138].



Schema 5.1. Sinteza nanoparticulelor Fe_3O_4 -PABA- SiO_2 -1 folosind soluție de silicat de sodiu ca sursă de silice

Tabel 5.2. Sinteza nanoparticulelor magnetice cu shell de PABA și shell secundar de silice pentru care s-a folosit ca sursă de silice o soluție de silicat de sodiu

Proba	Sol. silicat de sodiu ($\rho=1.39 \text{ g mL}^{-1}$)	Acid Acetic	Caracterizare
1	3.6 mL	20 mL	FT-IR, BET
2	7.2 mL	20 mL	FT-IR
3	14.4 mL	20 mL	FT-IR, BET, XRD, TEM, SEM, EDX
4	21.6 mL	20 mL	FT-IR
5	36 mL	50 mL	FT-IR
6	50.5 mL	70 mL	FT-IR
7	72 mL	100 mL	FT-IR

Varianta optimă a fost aleasă ținând cont de următoarele criterii, și anume: folosirea unei cantități reduse de silicat pentru a preveni tendința de aglomerare și pentru a evita problemele de dispersabilitate ulterioară. De asemenea, s-a urmarit obținerea unei suprafețe specifice cât mai ridicate.

Structura și morfologia nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** (proba 3) obținute a fost determinată prin următoarele tehnici: FT-IR, XRD, SEM, TEM, EDX. Pentru a stabili regimul de tratament termic a fost efectuată o analiză TGA. Suprafața specifică a materialului obținut a fost estimată prin analiza BET.

Analiza semi-cantitativă de difracție de raze X a fost efectuată atât pentru proba **3-Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** înainte de tratamentul termic cât și după tratamentul termic. Interferențele de difracție obținute dovedesc că nanoparticulele **Fe₃O₄-PABA** (Fig. 5.20) își păstrează caracteristicile cristaline și după acoperirea cu silice [62]. De asemenea, poate fi observat la 2θ =de la 15 la 28 un mic pic larg ce poate fi atribuit SiO₂ amorf, conform datelor din literatură [65].

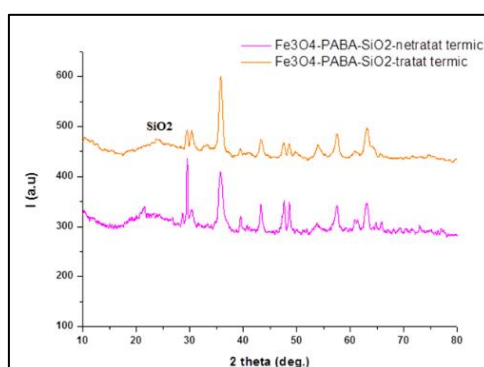


Figura 5.20. Difractograma pentru proba **3-Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** înainte și după tratamentul termic

Prezența shell-ului de silica pe suprafața nanoparticulelor proba **3-Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** înainte cât și după tratamentul termic a fost confirmată în spectrul FT-IR prin prezența

vibrațiilor de întindere asimetrică a legăturilor Si-O-Si la 1057 cm^{-1} , respectiv 1051 cm^{-1} [107, 141] și banda corespunzătoare legăturii Si-OH la 794 cm^{-1} , respectiv 802 cm^{-1} . Banda caracteristică magnetitei, corespunzătoare legăturii Fe-O a fost identificată la 557 cm^{-1} , respectiv 556 cm^{-1} .

Morfologia nanoparticulelor determinată prin SEM și TEM confirmă acoperirea cu silica a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA**. Imaginile SEM arată o morfologie globulară cu o bună omogenitate. În imaginile TEM (Fig. 5.23) se poate observa că acoperirea suprafeței nanoparticulelor cu shell-ul secundar de silica este inegală prin prezența conglomeratelor în care nanoparticulele magnetice sunt incluse în structura de silica.

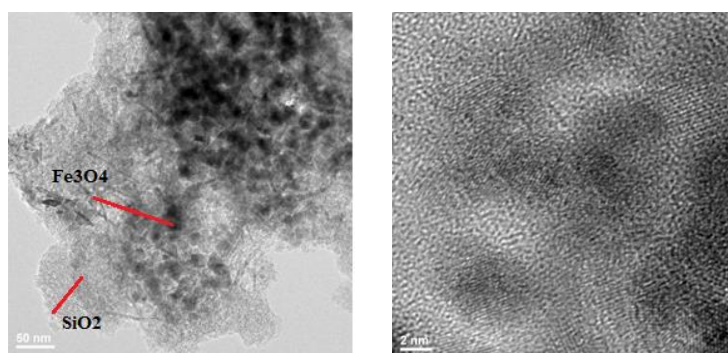


Figura 5.23. Imagini TEM pentru proba **3-Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1**

Compoziția elementală a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** (proba 3) realizată prin spectroscopie de raze X prin dispersie de energie (EDX) arată că elementele Fe, Si, O și C sunt majoritare în probă, confirmându-se prezența elementelor din sistemul core-shell **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1**. Prezența Cu se datorează grilei-suport care s-a utilizat pentru realizarea analizei [151].

Suprafața specifică a probei **3-Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** a fost estimată prin analiza BET obținându-se o suprafață specifică de $601\text{ m}^2/\text{g}$ cu dimensiune a porilor $\text{dBJH}=2.25\text{ nm}$, 3.7 nm , 6.3 nm și volumul porilor $V_p=1.12\text{ cm}^3/\text{g}$, fapt ce demonstrează existența unei structuri mezoporoase a shell-ului de secundar de silica. Analiza BET arată că prin acoperirea cu silica a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** suprafața specifică a acestora scade. Acest lucru este explicat de tendința de aglomerare a nanoparticulelor ce are loc în timpul tratamentului termic (conform imaginilor TEM-Fig. 5.23). Se observă că variația cantității de silicat de sodiu utilizat în sinteză nu conduce la o modificare semnificativă a suprafeței specifice.

Proprietățile magnetice ale nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** au fost măsurate cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrantă (VSM). Curbele de magnetizare pot fi observate în Fig. 5.27, precum și valoarea magnetizației de saturație $M_s=42.111\text{ emu/g}$. Nanoparticulele obținute au fost separate eficient cu ajutorul unui câmp magnetic extern ceea ce demonstrează

ca acoperirea cu silice nu afectează proprietățile magnetice ale nanoparticulelor cu aplicații în sinteza în fază solidă.

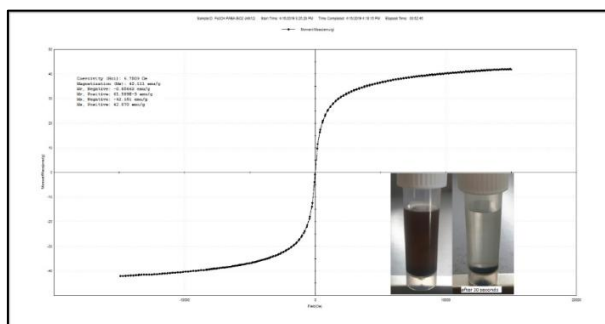
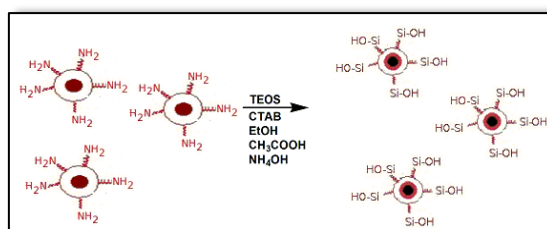


Figura 5.27. Curba de magnetizare și procesul de separare al nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** cu ajutorul unui câmp magnetic extern

5.2.2.2. Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2**

Pentru a realiza o îmbunătățire a proprietăților nanoparticulelor core-shell pentru sinteza probei **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2** a fost adoptată o metodă sol-gel modificată la temperatura camerei, prin picurare și agitare magnetică, utilizând TEOS ca agent de formare a shell-ului de silice, NH₄OH ca agent alcalin și CTAB ca agent tensioactiv.



Schema 5.3. Sinteza nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2** folosind TEOS ca sursă de silice

Prezența shell-ului de silice pe suprafața nanoparticulelor Fe₃O₄-PABA înainte cât și după îndepărtarea template-ului prin spălare cu EtOH, a fost confirmată prin înregistrarea spectrului FT-IR care a pus în evidență benzi caracteristice după cum urmează:

- vibrațiile de întindere asimetrică ale legăturii Si–O–Si la 1006 cm⁻¹, respectiv 1012 cm⁻¹;
- vibrațiile de întindere asimetrică ale legăturii Si-OH la 864 cm⁻¹, respectiv 865 cm⁻¹;
- banda caracteristică magnetitei atribuită legăturii Fe–O a fost identificată la 534 cm⁻¹, respectiv 558 cm⁻¹.

Morfologia nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2** a fost determinată prin examinarea microgرافیilor TEM (Fig. 5.29). Imaginile obținute confirmă prezența shell-ului secundar de silice și se poate observa o mică tendință de aglomerare ceea ce explică dispersibilitatea crescută în solvenții obișnuiți utilizați în sinteza de peptide.

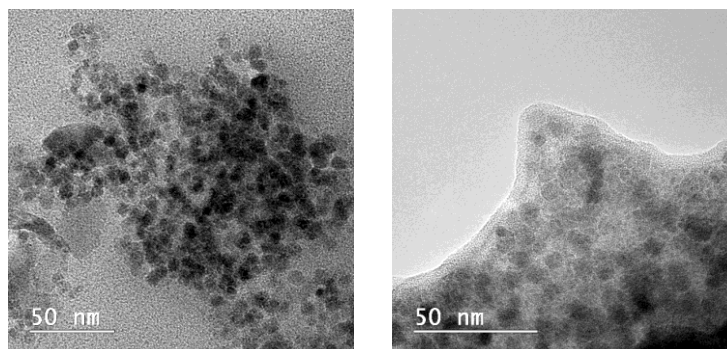
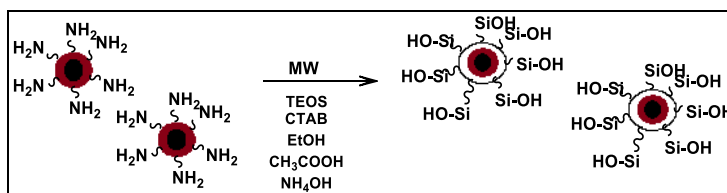


Figura 5.29. Imaginile TEM pentru $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-2}$

Proprietățile magnetice ale nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-2}$ au fost măsurate cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrantă (VSM) obținându-se o valoare a magnetizației de saturație $M_s = 6.791 \text{ emu/g}$. Nanoparticulele obținute prin această metodă au fost de asemenea separate eficient cu ajutorul unui câmp magnetic extern.

5.2.2.3. Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice ce a utilizat TEOS ca sursă de silice $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$

Sinteza probelor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$ a fost realizată printr-o metodă sol-gel modificată în câmp de microunde.



Schema 5.5. Sinteza nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$

Pentru proba $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ template-ul a fost îndepărtat prin calcinare la 450°C timp de 24 ore, iar pentru proba $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$ template-ul a fost îndepărtat prin spălare cu EtOH: Acid Acetic 5%, urmată de spălare cu EtOH.

Structura și morfologia nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$ a fost investigată prin următoarele tehnici: FT-IR, TEM, SAED, EDX.

Pentru a stabili regimul de tratament termic pentru proba $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2$ a fost efectuată o analiză TGA constatându-se faptul că spălarea cu solvent organic îndepărtează template-ul CTAB în mai mare măsură decât spălarea cu apă, fapt vizibil prin pierderea de masă superioară (în cazul spălării cu apă) din intervalul $190\text{-}500^\circ\text{C}$ când este oxidată o cantitate mai mare de substanță.

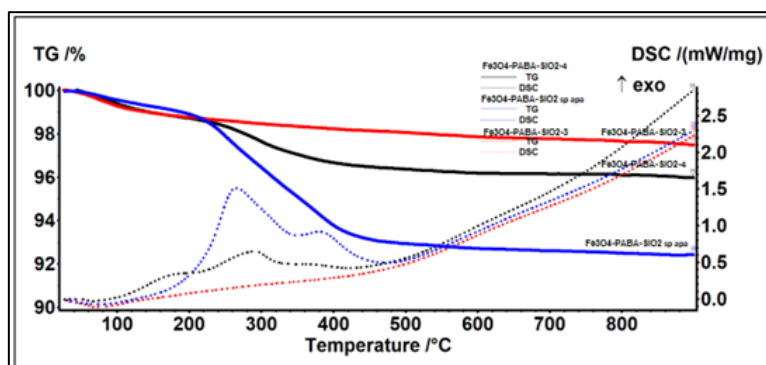


Figura 5.34. Analiza TGA comparativă efectuată după etapa de spălare cu apă a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2$, respectiv a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$

Reziduuul tuturor probelor analizate prin TGA nu și-a modificat culoarea față de proba inițială și au prezentat proprietăți magnetice. S-a observat că nu există transformarea fizică specifică maghemită-hematit din intervalul 300-500°C [173], fapt ce confirmă prezența shell-ului secundar de silice.

Suprafața specifică a probelor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$ a fost estimată prin analiza BET. Pentru proba $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ s-a obținut o suprafață specifică de 127 m²/g cu dimensiune a porilor dB_{JH}=33.223 nm și volumul porilor V_p=0.690 cm³/g, iar pentru $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-4}$ o suprafață specifică de 122 m²/g cu dimensiune a porilor dB_{JH}=19.497 nm și volumul porilor V_p=0.595 cm³/g. Procedura de îndepărtare a template-ului pentru probele sintetizate în câmp de microunde nu afectează semnificativ suprafața specifică și respectiv volumul porilor.

a) Caracterizarea nanoparticulelor cu shell secundar de silice $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$

Prezența shell-ului de silica pentru nanoparticulele $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ pentru care s-a folosit TEOS ca sursă de silice a fost confirmată prin înregistrarea spectrului FT-IR în care a fost identificată prezența benzii caracteristice pentru vibrațiile de întindere asimetrică a Si-O-Si la 1049 cm⁻¹. Banda caracteristică magnetitei poate fi observată la 551 cm⁻¹ corespunzătoare legăturii Fe-O.

Morfologia nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PABA-SiO}_2\text{-3}$ a fost determinată prin TEM (Fig. 5.40). Analizând micrografiile obținute se confirmă prezența shell-ului de silica cu o grosime de aprox. 2 nm. De asemenea, în imaginile TEM se poate observa faptul că prin calcinare, nanoparticulele au tendința de a se aglomera. Imaginea SAED confirmă structura cristalină a Fe₃O₄.

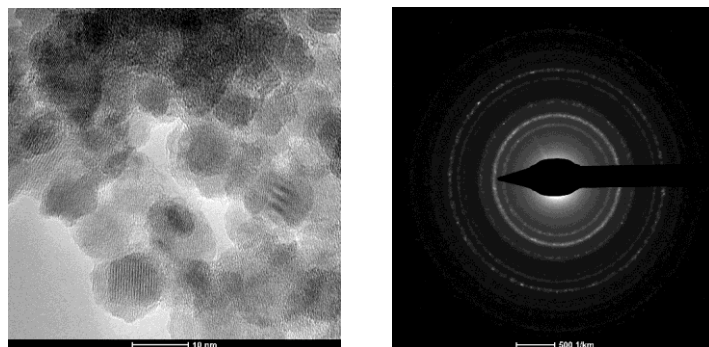


Figura 5.40. Imagini TEM și SAED pentru nanoparticulele **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3**

Compoziția elementală a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3** realizată prin spectroscopie de raze X prin dispersie de energie (EDX) arată că elementele Fe, Si, O, C și N sunt majoritare în probă, confirmându-se prezența elementelor din sistemul core-shell **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3**. Prezența Cu se datorează grilei-suport care s-a utilizat pentru realizarea analizei [151].

b) Caracterizarea nanoparticulelor cu shell secundar de silica **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4**

Prezența shell-ului de silica pentru nanoparticulele **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4** a fost confirmată prin înregistrarea spectrului FT-IR prin prezența benzii caracteristice pentru vibrațiile de întindere asimetrică ale Si-O-Si la 1064 cm⁻¹. Prezența magnetitei este evidențiată de banda caracteristică la 553 cm⁻¹ corespunzătoare legăturii Fe-O.

Analiza TEM a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4** (Fig. 5.43) confirmă prezența shell-ului de silica cu o grosime de aprox. 2 nm și o tendință mai mică de aglomerare. Structura cristalină a Fe₃O₄ este confirmată de imaginea SAED.

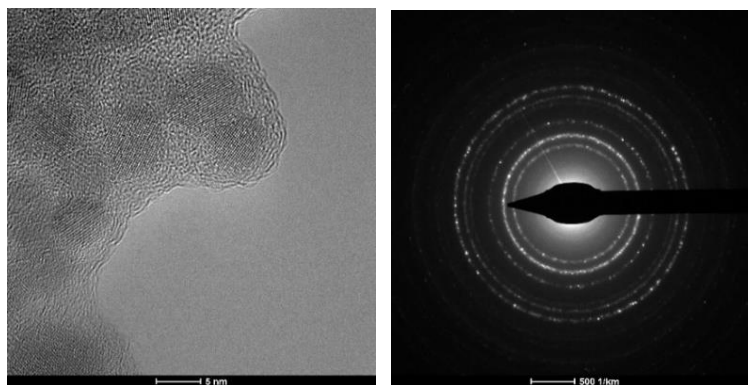


Figura 5.43. Imagini TEM și SAED pentru **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4**

Compoziția elementală a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4** realizată prin spectroscopie de raze X prin dispersie de energie (EDX) arată că elementele Fe, Si, O, C și N sunt majoritare în probă, confirmându-se prezența elementelor din sistemul core-shell **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4**. Prezența Cu se datorează grilei-suport care s-a utilizat pentru realizarea analizei [151].

Proprietățile magnetice ale nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4** au fost măsurate cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrantă (VSM), obținându-se o valoare a magnetizației de saturație $M_s = 57.121$ emu/g. Nanoparticulele obținute prin această metodă au fost de asemenea separate eficient cu ajutorul unui câmp magnetic extern.

5.2.3. Obținerea și caracterizarea sistemelor nanostructurate utilizabile în sinteza în fază solidă

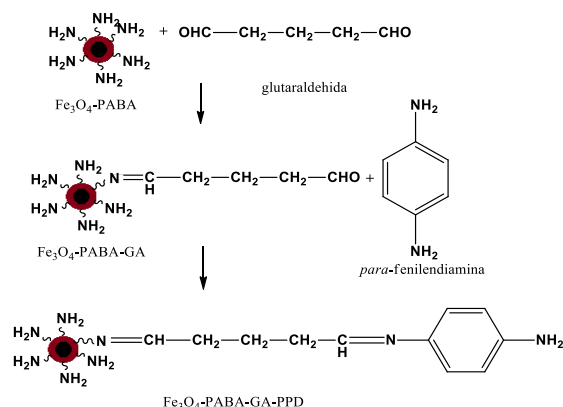
Rășinile folosite ca suport solid în sinteza de peptide trebuie să prezinte o capacitate ridicată și să permită purificarea cu ușurință prin filtrare. Pentru rășinile folosite în mod obișnuit, accesibilitatea funcționalităților grefate necesită gonflarea particulelor, iar difuzarea reactivilor în microgel este limitată. Nanoparticulele depășesc această problemă, de ex. nanoparticulele de ~70 nm prezintă o suprafață de $\sim 1.1 \times 10^5$ ori mai mare și prezintă o accesibilitate îmbunătățită la funcționalitățile suprafeței prin accesul direct la centrul de reacție. De asemenea, sedimentarea magnetică asigură o purificare ușoară după fiecare etapă de reacție [26].

În această lucrare au fost proiectate și testate ca suport solid pentru sinteza de peptide prin strategia Fmoc **sisteme nanostructurate pe bază de nanoparticule de ferită de tip core-shell cu shell de PABA, shell secundar de silice și diferite sisteme linker cu grupări terminale-NH₂ sau -CH₂-OH libere** potrivite pentru atașarea aminoacizilor protejați Fmoc. Metodele de obținere și caracterizarea acestor sisteme sunt prezentate în cele ce urmează.

5.2.3.1. Obținerea și caracterizarea sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD**

Primul sistem nanostructurat proiectat se bazează pe un concept nou folosind nanoparticule magnetice de tip core-shell, **Fe₃O₄-PABA** și un sistem linker ambident cu grupare -NH₂ liberă, compatibil cu toate etapele de sinteză. În acest scop, s-a ales ca linker glutaraldehida (GA) datorită cuplării ușoare cu grupări amino. De asemenea, pentru a obține o grupare -NH₂ reactivă la capătul sistemului linker (Schema 5.7.), capabilă să lege eficient aminoacizii blocați N-terminal, s-a grefat *p*-fenilendiamina (PPD) [136].

Prezența glutaralhidei grefate pe suprafața nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** și atașarea ulterioară a *p*-fenilendiaminei a fost confirmată prin spectrometrie FT-IR. Astfel, în spectrul FT-IR comparativ **Fe₃O₄-PABA-GA** și **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD** (Figura 5.46) se poate observa atașarea GA printr-o legătura azometinică demonstrată prin prezența benzilor de absorbție caracteristice grupării -CH=N la 1630 cm^{-1} și gruparea formil nereacționată la 1718 cm^{-1} .



Schema 5.7. Sistemul nanostructurat core-shell linker: **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD**

Reacția cu PPD a dus la creșterea intensității benzii pentru $-\text{CH}=\text{N}$, confirmată de dispariția benzii caracteristice pentru aldehydă. Atașarea PPD este, de asemenea, confirmată de prezența benzilor de absorbție caracteristice grupării terminale $-\text{NH}_2$ la 3372 cm^{-1} și 3298 cm^{-1} .

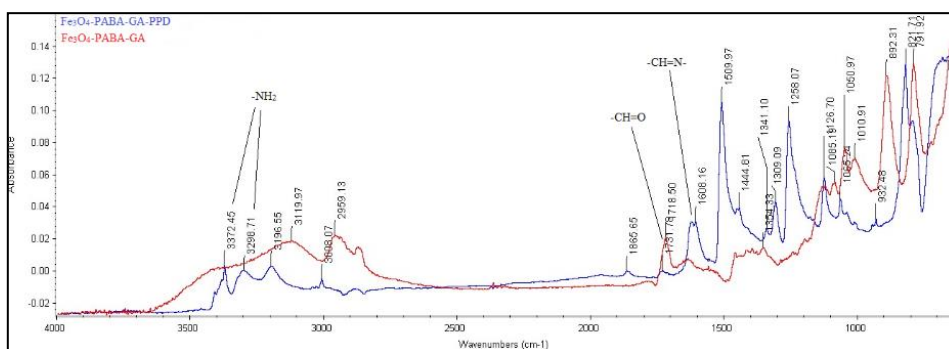
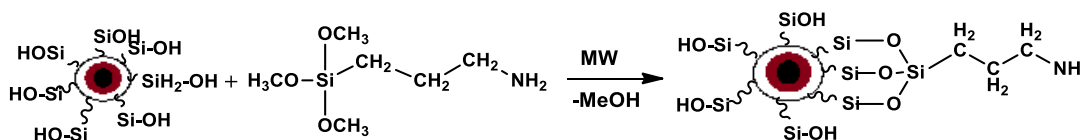


Figura 5.46. Spectrul FT-IR comparativ: **Fe₃O₄-PABA-GA** și **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD**

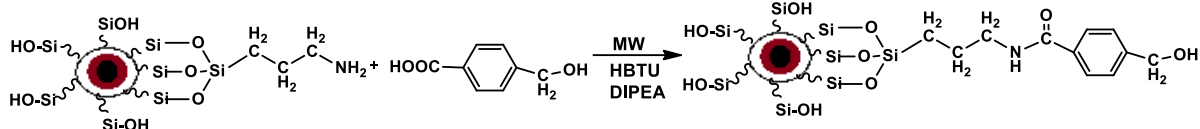
5.2.3.2. Obținerea și caracterizarea sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA**

Pentru funcționarea suprafeței nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4** a fost utilizat 3-aminopropiltrimetoxisilan (APTMS) cu scopul de a obține grupări $-\text{NH}_2$ reactive libere [170] care permit atașarea ulterioară de linkeri caracteristici sintezei în fază solidă a peptidelor.



Schema 5.8. Sinteza **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS**

Un linker labil, cel mai folosit în sinteza peptidică pe suport solid este acidul 4-hidroxiacetilbenzoic (HMBA).



Schema 5.9. Sinteza sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA**

Avantajul utilizării HMBA ca linker, este remanența acestuia pe suportul solid după clivarea peptidelor cu TFA ceea ce permite caracterizarea și utilizarea ulterioară a peptidei sintetizate.

Funcționalizarea cu APTMS a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3** a fost confirmată de spectrul FT-IR prin prezența benzilor de absorbție caracteristice grupării -NH₂ libere la 3361 și 3202 cm⁻¹ și a benzii corespunzătoare vibrației de întindere C-H la 2931 cm⁻¹. De asemenea, pot fi observate benzile caracteristice vibrațiilor de întindere asimetrică a Si-O-Si la 1032 cm⁻¹ iar banda caracteristică magnetitei poate fi observată la 549 cm⁻¹ corespunzătoare legăturii Fe-O. În același mod a fost pusă în evidență și funcționalizarea cu APTMS a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4**.

Proprietățile magnetice ale nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4-APS** au fost măsurate cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrantă (VSM) obținându-se o valoare a magnetizației de saturație Ms= 50.883 emu/g. Nanoparticulele obținute prin această metodă au fost de asemenea separate eficient cu ajutorul unui câmp magnetic extern.

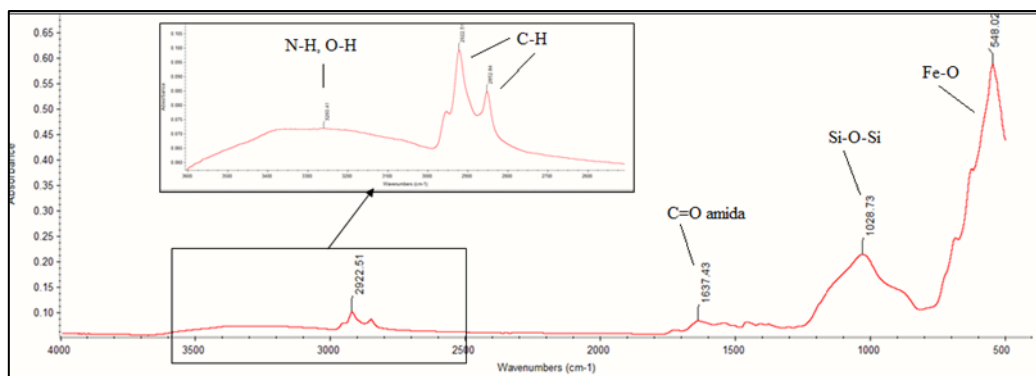


Figura 5.50. Spectrul FT-IR **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3-APS-HMBA**

Obținerea sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3-APS-HMBA** prin atașarea linker-ului HMBA de shell-ul de silice funcționalizat cu APTMS a fost confirmată de spectrul FT-IR prin prezența benzii corespunzătoare vibrației de întindere C=O pentru amida secundară nou formată prin atașarea linker-ului de la 1637 cm⁻¹. De asemenea pot fi observate benzile caracteristice vibrațiilor de întindere N-H și O-H la 3260 cm⁻¹, banda corespunzătoare vibrației de întindere C-H la 2922 și 2852 cm⁻¹. Sunt evidențiate de asemenea și benzile caracteristice suportului anorganic, vibrația de întindere asimetrică a Si-O-Si la 1028 cm⁻¹ și la 548 cm⁻¹ și respectiv banda caracteristică magnetitei corespunzătoare legăturii Fe-O. În același mod a fost

pus în evidență și succesul obținerii sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4-APS-HMBA**.

5.2.3.3. Obținerea și caracterizarea sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiLOH**

Sistemul nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** (Fig. 5.52) a fost sintetizat având la bază nanoparticulele de tip core-shell **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1**.

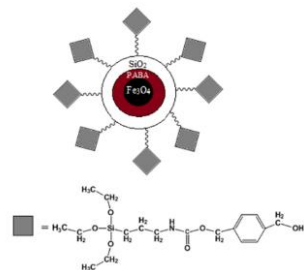
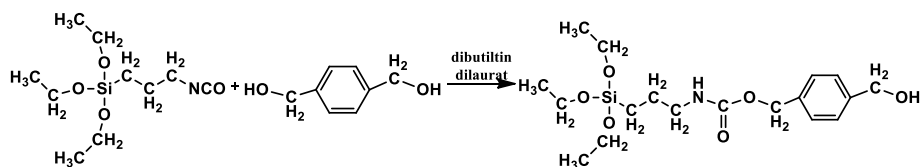


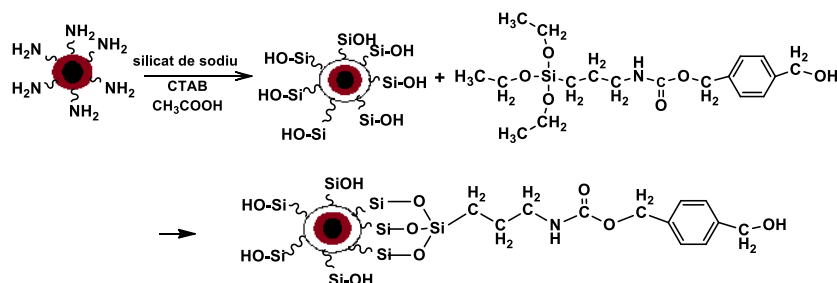
Figura 5.52. Reprezentarea grafică a sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH**

Un sistem linker organic, **SiL-OH**, similar cu linker-ul utilizat frecvent în SPPS, și anume HMBA, a fost obținut din 1,4-dimetilolbenzen și *gamma*-izicianatopropil trietoxi silan (Schema 5.10) și a fost grefat ulterior pe suprafața nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** conform șirului de reacții prezentat în Schema 5.11.



Schema 5.10. Sinteza sistemului linker **SiL-OH**

Sistemul linker selectat conține o grupare terminală $-CH_2-OH$ în poziția benzilică, furnizând o legătură reversibilă între lanțul peptidic și suportul solid, asigurând astfel protecția și blocarea capătului C-terminal în timpul procesului de sinteză a peptidelor în fază solidă [138].



Schema 5.11. Sinteza sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH**

Structura sistemului linker **SiL-OH** a fost confirmată prin ¹H RMN, ¹³C RMN și FT-IR prin identificarea deplasărilor chimice specifice și prin prezența benzilor de absorbție

caracteristice. Atribuțiile semnalelor din spectrele RMN de proton și carbon ale sistemului **SiL-OH** sunt prezentate în Figura 5.53.

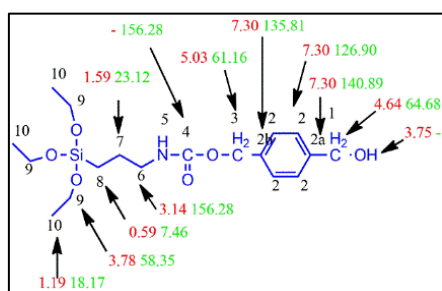


Figura 5.53. Deplasările chimice, $\delta^1\text{H}$ și $\delta^{13}\text{C}$ ale **SiL-OH**

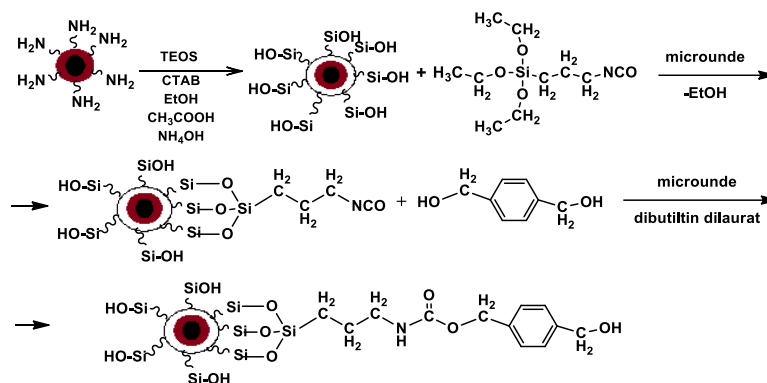
Structura sistemului linker **SiL-OH** obținut a fost confirmată și de spectrul FT-IR prin prezența benzilor de absorbție caracteristice vibrației de întindere N-H_{uretan} la 3331 cm^{-1} și C=O_{uretan} la 1695 cm^{-1} . Banda corespunzătoare vibrației de deformare N-H poate fi observată la 1528 cm^{-1} iar banda corespunzătoare vibrației de întindere N-CO-O la 1244 cm^{-1} . Structura aromatică este evidențiată prin prezența benzilor caracteristice C_{Ar-H} la 769 cm^{-1} . Banda corespunzătoare vibrațiilor de întindere asimetrică Si-O-Si poate fi observată la 1072 cm^{-1} iar banda corespunzătoare vibrației de întindere C-H la 2926 cm^{-1} .

Obținerea sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** a fost demonstrată de spectrul FT-IR prin prezența benzilor de deformare pentru amina secundară la 1519 cm^{-1} , benziilor de întindere C=O la 1692 cm^{-1} și N-H la 3331 cm^{-1} și a benzilor caracteristice vibrațiilor de întindere C-H la 2927 cm^{-1} precum și vibrațiile de deformare corespunzătoare structurii aromatice C_{Ar-H} la 772 cm^{-1} care confirmă prezența unităților alifatică și aromatică legate de nanoparticulele core-shell-silice. Prezența învelișului de silice este confirmat de banda corespunzătoare vibrației asimetrice Si-O-Si la 1000 cm^{-1} , iar la 550 cm^{-1} banda caracteristică magnetitei corespunzătoare legăturii Fe-O.

5.2.3.4. Obținerea și caracterizarea sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH_{mw}**

Având în vedere tendința de aglomerare observată în micrografiile TEM pentru sistemele **Fe₃O₄-PABA-SiO₂** pentru care template-ul CTAB a fost îndepărtat prin calcinare care afectează suprafața specifică a nanoparticulelor, și deci și performanțele așteptate în SPPS o nouă strategie a fost abordată pentru sintetizarea unui sistem nanostructurat cu linker **SiL-OH** prin utilizarea unei materii prime care nu este calcinată și anume **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2**. Procedura de lucru adoptată pentru sistemul nanostructurat final **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH_{mw}** a fost funcționalizarea secvențială a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2**, cu *gamma*-

izocianatopropil trietoxi silan și 1,4-dimetilolbenzen la microunde în prezență de dibutiltin dilaurat



Schema 5.12. Sinteza sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OHmw**

Obținerea sistemului nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OHmw** a fost demonstrată de spectrul FT-IR prin prezența benzilor de deformare pentru amina secundară la 1538 cm⁻¹, benziilor de întindere C=O la 1694 cm⁻¹ pentru legatura amidică și N-H la 3325 cm⁻¹ și a benzilor caracteristice vibrațiilor de întindere C-H la 2926 cm⁻¹ și vibrațiilor de deformare corespunzătoare structurii aromatice C_{Ar-H} la 775 cm⁻¹ care confirmă prezența unităților alifatică și aromatice legate de nanoparticulele core-shell-silice. Prezența învelișului de silice este confirmat de banda corespunzătoare vibrației asimetrice Si-O-Si la 1015 cm⁻¹.

5.3. Concluzii

Nanoparticulele magnetice core-shell **Fe₃O₄-PABA** au fost sintetizate prin metoda coprecipitării iar shell-ul secundar de silice a fost obținut printr-o metodă sol-gel modificată folosindu-se o soluție de silicat de sodiu ($\rho=1.39 \text{ g mL}^{-1}$) și TEOS ca surse de silice.

Biodisponibilitatea nanoparticulelor magnetice **Fe₃O₄-PABA** a fost determinată folosind modelul membranei corioalantoidiene (CAM) de embrion de pui și modelul murin.

Au fost proiectate patru noi tipuri de sisteme nanostructurate pe bază de nanoparticule magnetice cu shell organic (PABA) și shell secundar de silice care să constituie suportul solid pentru sinteza de peptide în fază solidă: **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OHw**. Aceste sisteme sunt decorate cu linkeri similari celor utilizați frecvent în sinteza de peptide în fază solidă.

A fost proiectat un nou sistem linker **SiL-OH** cu grupare -OH liberă, obținut din 1,4-dimetilolbenzen și *gamma*-izocianatopropil trietoxi silan.

Toate tipurile de nanoparticule sintetizate și respectiv sistemele nanostructurate cu aplicații în sinteza în fază solidă au fost caracterizate utilizând metode moderne de investigare: XRD, FT-IR, TEM, SEM, EDX, DLS, BET, VSM.

CAPITOLUL 6. CONTRIBUȚII ORIGINALE PRIVIND APLICAȚIILE ÎN ELECTRONICĂ ALE NANOPARTICULELOR Fe_3O_4 -PABA ȘI INVESTIGAREA PROPRIETĂȚILOR ELECTRICE ALE NANOFILMULUI Fe_3O_4 -PABA-SiO₂ DOPAT CU DPPH

În acest capitol s-au avut în vedere următoarele obiective:

- (a) Aplicații speciale ale nanoparticulelor Fe_3O_4 -PABA: Obținerea tranzistorului pe bază de nanoparticule Fe_3O_4 -PABA
- (b) Investigarea proprietăților electrice ale nanofilmului Fe_3O_4 -PABA-SiO₂ dopat cu DPPH

6.1. Aplicații speciale ale nanoparticulelor Fe_3O_4 -PABA: Obținerea tranzistorului pe bază de nanoparticule Fe_3O_4 -PABA

Tranzistorul pe bază de nanoparticule **Fe_3O_4 -PABA** a funcționat ca dispozitiv electronic, prin plasarea a două sonde subțiri pe partea superioară a filmului **Fe_3O_4 -PABA**, ca contacte Sursă și Drenă. Electroful ITO a fost utilizat ca electrod de Poartă. Trei filme de **Fe_3O_4 -PABA** cu grosimi diferite ale fiecărui strat, și anume: de 200, 400 și 600 nm au fost depuse pe același substrat acoperit anterior cu un strat de polistiren de 100 nm, prin metoda Dip Coating [137].

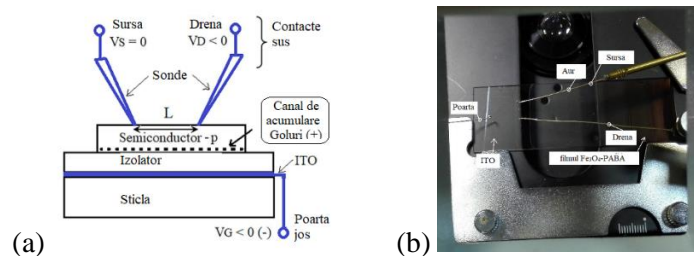


Figura 6.1. (a) Structura de testare a tranzistorului organic cu film subțire (TFT), similară tranzistorului cu contacte sus și poartă jos (BGTC) de tip p [181] (b) testarea proprietăților electrice ale tranzistorului pe bază de nanoparticule **Fe_3O_4 -PABA**

Curbele caracteristice de ieșire subliniază o regiune cvasi-liniară, urmată de o regiune de saturație specifică filmelor OTFT de tip p (Fig. 6.2.a).

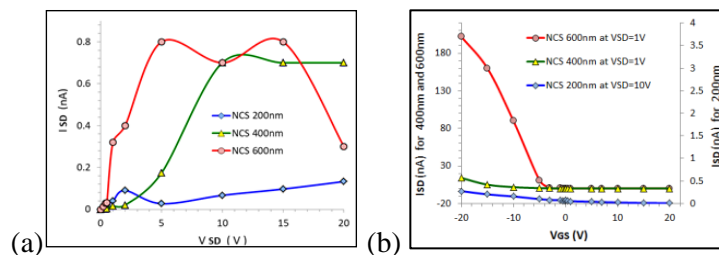
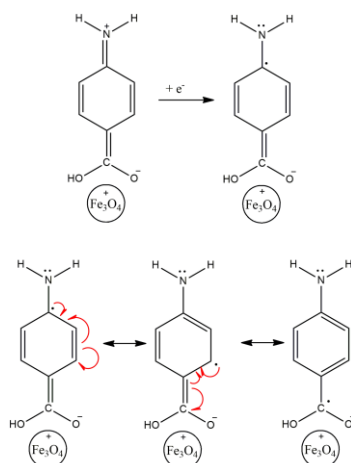


Figura 6.2. Curbele caracteristice măsurate ale tranzistorului organic **Fe_3O_4 -PABA** fabricat: (a) curbele caracteristice de ieșire la $V_{GS} = 0$ V; (b) curbele caracteristice de transfer la diferite $V_{SD} = 1$ V pentru grosimi de 200, 400 și respectiv 600 nm și 10 V numai pentru grosime de 200 nm

Comportarea ca semiconductor de tip p a filmului de **Fe₃O₄-PABA** a fost pusă pe seama capacității compusului organic, PABA, de a funcționa ca acceptor de electroni, prin obținerea unui sistem de tip radical cationic ca urmare a transferului unui electron, sistem stabilizat prin conjugare capabil de a ceda la rândul său electronul prin revenirea la structura inițială, conform Schemei 6.1.



Schema 6.1. Stabilizarea ca radical-cation prin acceptare de 1 electron pentru sistemul nanostructurat **Fe₃O₄-PABA**

Acumularea la tensiuni de poartă negative (Fig. 6.2.b) constituie cel mai eficient regim. Aceasta este principala dovadă că filmul **Fe₃O₄-PABA** prezintă un comportament de tip „p” pentru modelul OTFT fabricat [137].

6.2. Investigarea proprietăților electrice ale nanofilmului *Fe₃O₄-PABA-SiO₂* dopat cu radical DPPH

Compușii organici puternic polarizabili, ca specii bogate sau cu deficiență de electroni (ex: radicalul difenil-picril-hidrazil, fenilsidnona sau polianilina) sunt buni candidați pentru aplicațiile de transfer de electroni în electronică, precum: tranzistorul tip TFT (tranzistor cu film subțire).

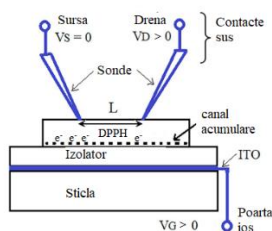
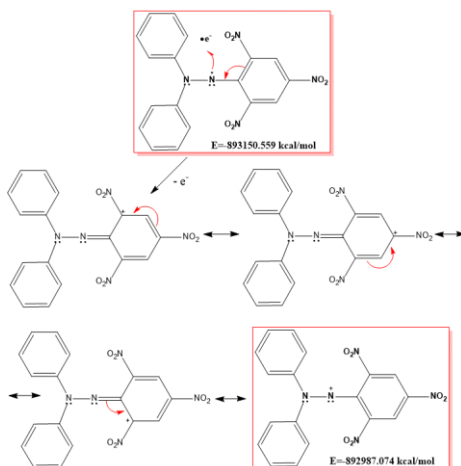


Figura 6.5. Structura de testare a tranzistorului organic cu film subțire de tip n (TFT), cu comportament de tranzistor cu efect de câmp

Caracterul de tip „n” al nanofilmului **Fe₃O₄-PABA-SiO₂** dopat cu radical DPPH a fost dovedit prin măsurători statice. Comportarea ca semiconductor de tip „n” a nanofilmului

Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu radical DPPH a fost pusă pe seama capacității radicalului DPPH de a funcționa ca donator de electroni, prin obținerea unui sistem de tip cationic ca urmare a transferului unui electron, sistem stabilizat prin conjugare, capabil de a accepta la rândul său electronul prin revenirea la structura inițială, conform Schemei 6.2.



Schema 6.2. Structurile limită ale carbocationului DPPH⁺ format prin transfer de 1 electron

Pentru optimizarea structurii teoretice a radicalului DPPH și a structurii rezultate în urma transferului de 1 electron, precum și pentru evidențierea distribuției parțiale de sarcină a acestor două structuri s-a utilizat programul de modelare moleculară Gamess. Se constată, așa cum demonstrează și structurile limită, o stabilizare a acestora prin conjugare pe sistemul aromatic. Diferența de energie ($\Delta E = -163.485$ Kcal/mol) justifică teoretic comportarea ca semiconductor a radicalului DPPH prin transfer de 1 electron.

6.2.1. Caracterizarea nanofilmului Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu radical DPPH

În spectrul de masă (Fig. 6.9) obținut utilizând tehnica de ionizare ESI și introducerea probei prin infuzie directă, poate fi observat ionul molecular corespunzător radicalului DPPH [m/z 394] precum și distribuția izotopică specifică [$M+1$] și [$M+2$].

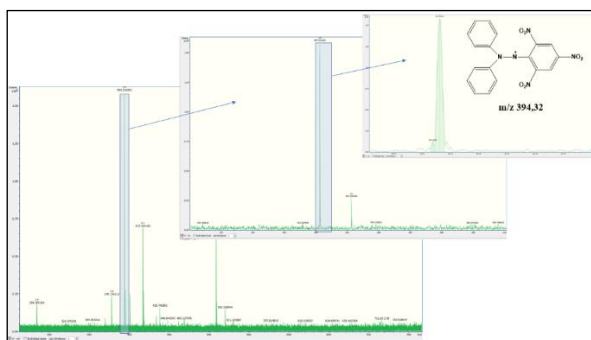


Figura 6.9. Analiza HR-MS a soluției radical DPPH

Confirmarea picului molecular în analizele MALDI (Fig. 6.10) arată transferul cu succes și fără degradare a sistemului radicalic în matricea nanostructurată și apoi în filmul subțire.

Metoda de ionizare MALDI a fost utilizată pe baza caracteristicii de protejare a compusului analizat prin transferul de energie de la matrice către probă în cursul procesului de ablație laser. Fiind cunoscută utilizarea nanoparticulelor magnetice ca matrice pentru analize MALDI pentru analiza moleculelor cu mase mici [186] nu a fost necesară utilizarea altei matrici suplimentare deoarece ionizarea intrinsecă produsă de nanoparticulele **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4** a fost suficientă.

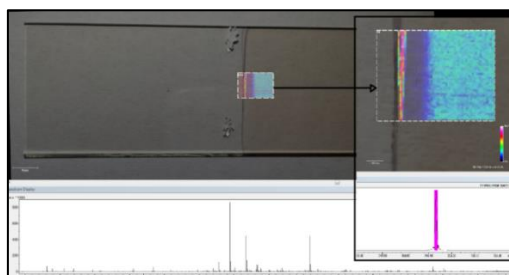


Figura 6.10. Analiza MALDI a nanofilmului **Fe₃O₄-PABA-SiO₂** dopat cu radical DPPH

Estimarea omogenității nanofilmului Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu radical DPPH

Omogenitatea depunerii filmului a fost evidențiată prin omogenitatea răspunsului spectral (Fig. 6.10. și 6.11.) utilizând următoarele tehnici de caracterizare: MALDI și microscopie FT-IR. Pentru nanofilmul obținut se observă, de asemenea și o zonă de discontinuitate în zona de start.

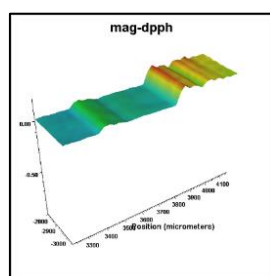


Figura 6.11. Analiza microscopie FT-IR a nanofilmului **Fe₃O₄-PABA-SiO₂** dopat cu radical DPPH

Caracterul de tip „n” al nanofilmului **Fe₃O₄-PABA-SiO₂** dopat cu radical DPPH a fost dovedit prin măsurători statice.

6.3. Concluzii

Au fost investigate proprietățile electrice ale nanofilmelor **Fe₃O₄-PABA** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu DPPH** obținute prin metoda Dip-Coating.

Nanofilmul **Fe₃O₄-PABA** obținut a funcționat ca dispozitiv electronic cu un comportament de tip „p” pentru modelul OTFT (tranzistor organic cu film subțire) fabricat.

Nanofilmul **Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu radical DPPH** obținut a funcționat ca dispozitiv electronic cu un comportament de tranzistor tip TFT (tranzistor cu film subțire) cu film de tip „n”. Caracterul de tip „n” al nanofilmului **Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu DPPH** a fost dovedit prin măsurători ale caracteristicilor statice de dispozitiv.

CAPITOLUL 7. CONTRIBUȚII ORIGINALE ASUPRA SINTEZEI DE PEPTIDE PE SUPPORT NANOSTRUCTURAT MAGNETIC (NSS)

În acest capitol este prezentată testarea noilor sisteme nanostructurate sintetizate, ca suport solid pentru sinteza de peptide pe suport solid. Protocolul de lucru a implicat „*strategia de sinteză Fmoc*”.

7.1 Obiectivele cercetării experimentale

- (1) Sinteza de peptide pe suport nanostructurat magnetic
- (2) Caracterizarea și identificarea fragmentelor peptidice obținute

7.2 Sinteza de peptide pe suport nanostructurat magnetic

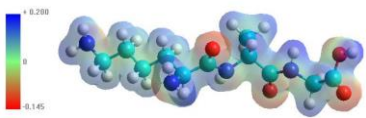
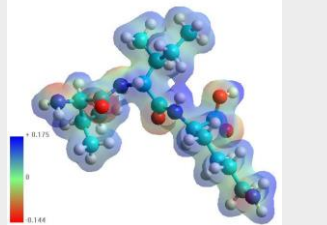
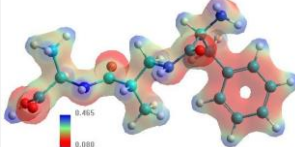
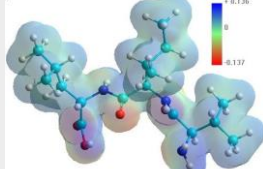
S-a folosit metoda de sinteză de peptide în fază solidă pe suport solid nanostructurat magnetic numită *Sinteza pe Suport Nanostructurat (NSS)*, pentru a depăși problema solubilității, oferind avantajul accesului reactanților la centrul de reacție; dar și o separare rapidă a produșilor intermediari și finali din mediul de reacție în câmp magnetic. Eficiența noilor sisteme nanostructurate sintetizate, a fost demonstrată prin folosirea acestora ca suport solid în sinteza de peptide conform Tabelului 7.2. utilizând principiul SPPS.

Tabel 7.2. Secvențele peptidice obținute prin strategia NSS

<i>Suport nanostructurat magnetic</i>	<i>Secvența peptidică</i>	<i>m/z teoretic</i>	<i>m/z experimental</i>	<i>Metoda caracterizare</i>
Fe₃O₄-PABA-GA-PPD	Lys-Ala-Gly	275.17	275.08	LC-MS
Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA	Val-Ile-Lys	359.26	359.34	HR-MS
Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH	Gly-Ala-Phe	359.34	294.20	LC-MS
Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH_{mw}	Leu-Ile-Val	344.25	344.22	LC-MS

Criteriile de alegere ale amino acizilor utilizați în sinteza de peptide au avut drept scop obținerea unor peptide cu importanță biologică care se regăsesc în peptide întâlnite în natură sau care prezintă proprietăți biologice/farmacologice importante. De asemenea, pentru a determina limitele între care poate fi folosită această metodă de sinteză în fază solidă s-au folosit amino acizi ce prezintă catena laterală ramificată, precum și alte grupări funcționale care necesită operații suplimentare de protejare/deprotejare. Influența împiedicării sterice asupra performanțelor metodei de sinteză în fază solidă pe diferitele tipuri de suport solid nou sintetizate a fost estimată prin folosirea de amino acizi cu volume diferite ale catenelor laterale. Informațiile asupra volumului și structurii spațiale a peptidelor sintetizate au fost obținute cu ajutorul programului de modelare moleculară Hyperchem 8.0. Amino acizii utilizați au fost: glicina, alanina, lizina, fenilalanina, valina, leucina, izoleucina.

Tabel 7.3. Informațiile asupra volumului și structurii spațiale a peptidelor sintetizate obținute cu ajutorul programului de modelare moleculară Hyperchem 8.0

<i>Secvența peptidică</i>	<i>Structura secvenței peptidice optimizate în Hyperchem 8.0</i>
Lys-Ala-Gly (KAG)	
Val-Ile-Lys (VIK)	
Gly-Ala-Phe (GAF)	
Leu-Ile-Val (LIV)	

Rezultatele experimentale obținute prin FT-MS (Tabel 7.2.) arată obținerea cu succes a secvențelor peptidice propuse; precum și fezabilitatea metodei de sinteză de peptide utilizând ca suport solid un sistem nanostructurat magnetic prin strategia de sinteză Fmoc.

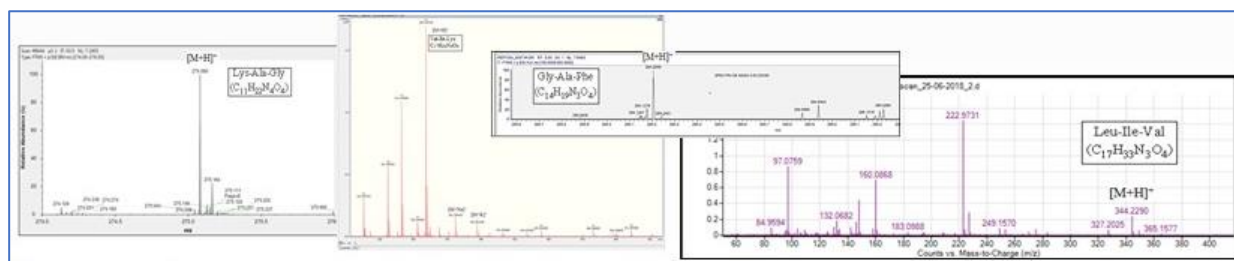


Figura 7.21. Analiza FT-MS pentru peptidele sintetizate

7.2.2 Obținerea și caracterizarea peptidei Val-Ile-Lys

Secvența peptidică **Val-Ile-Lys** a fost sintetizată folosind ca suport solid atât sistemul nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3-APS-HMBA** cât și sistemul nanostructurat **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4-APS-HMBA**.

În spectrul de masă (Fig 7.22.) obținut prin HR-MS utilizând tehnica de ionizare ESI și introducerea probei prin infuzie directă, poate fi observat ionul molecular protonat $[M+H]^+$ la m/z 359.34 în acord cu valorile calculate cu ajutorul soft-ului disponibil online PROTEOMICS

TOOLKIT. De asemenea, pot fi observate picurile la m/z 381,32 corespunzător $[M+Na]^+$ și m/z 397,30 corespunzător $[M+K]^+$. Picurile izotopice de tip $([M+H]^+ + 1)$, $([M+H]^+ + 2)$, $([M+H]^+ + 3)$ derivă de la ionul molecular protonat $[M+H]^+$. Ca urmare, acestea se vor situa la 2, 3, 4 uam diferență față de ionul molecular.

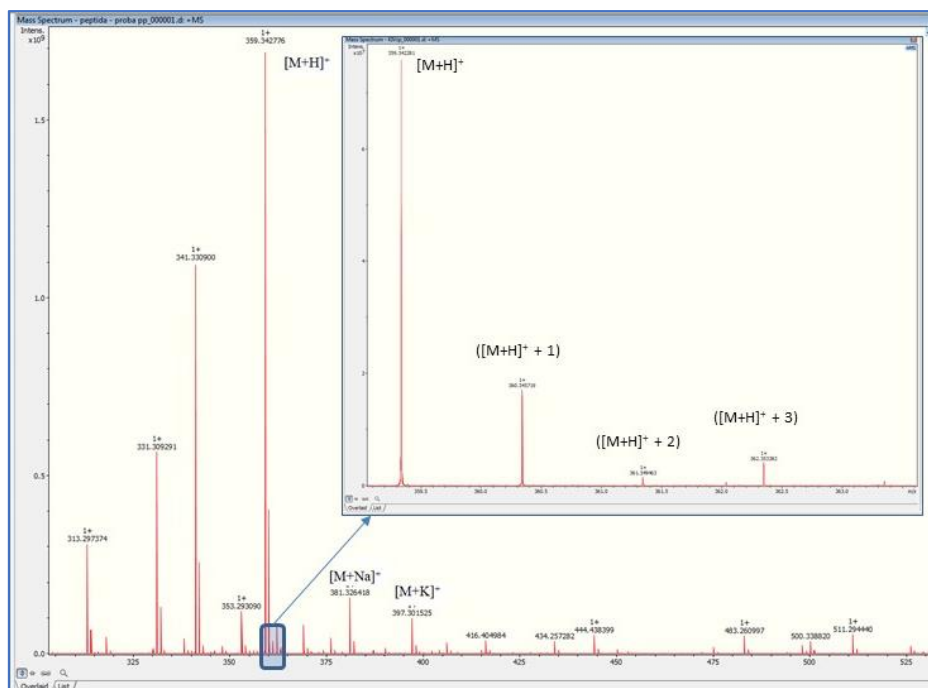


Figura 7.22. Analiza HR-MS a peptidei Val-Ile-Lys

7.3. Identificarea peptidelor și a fragmentelor posibile obținute prin analiza FT-MS

Spectrometria de masă este folosită pentru analiza peptidelor și proteinelor datorită vitezei, sensibilității și versatilității sale. Poate fi utilizată pentru determinarea secvențelor de amino acizi ale peptidelor, dar și pentru a caracteriza o mare varietate de modificări post-translaționale, cum ar fi fosforilarea și glicozilarea [193].

În timpul ionizării, protonarea apare pe site-urile bazice, iar diferitele forme protonate ale unei peptide sau a unei proteine depind atât de energia internă a ionilor cât și de bazicitatea pozițiilor implicate în procesul de protonare. Prezența unei sarcini la un anumit site poate favoriza fragmentarea legăturilor adiacente [194]. Fragmentele pot fi detectate doar dacă prezintă cel puțin o sarcină. Dacă sarcina este la capătul N-terminal, ionii sunt denumiți a, b sau c. Dacă sarcina este la capătul C-terminal, ionii sunt denumiți x, y sau z [193].

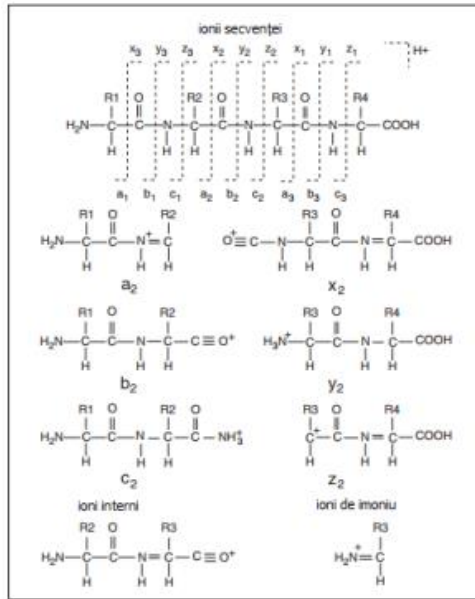


Figura 7.16. Nomenclatura pentru ionii fragmentelor peptidice rezultați în urma reacțiilor de fragmentare (R – catena laterală a amino acizilor) [193]

7.3.2. Identificarea Val-Ile-Lys și a fragmentelor posibile

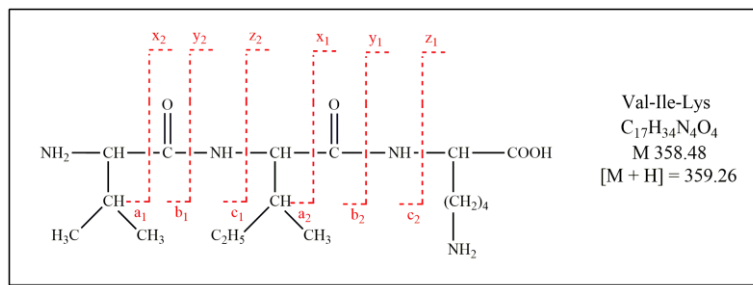
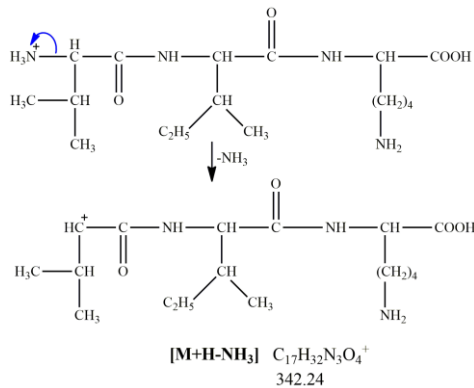


Figura 7.18. Tipurile de fragmente care se pot obține pentru peptida **Val-Ile-Lys**

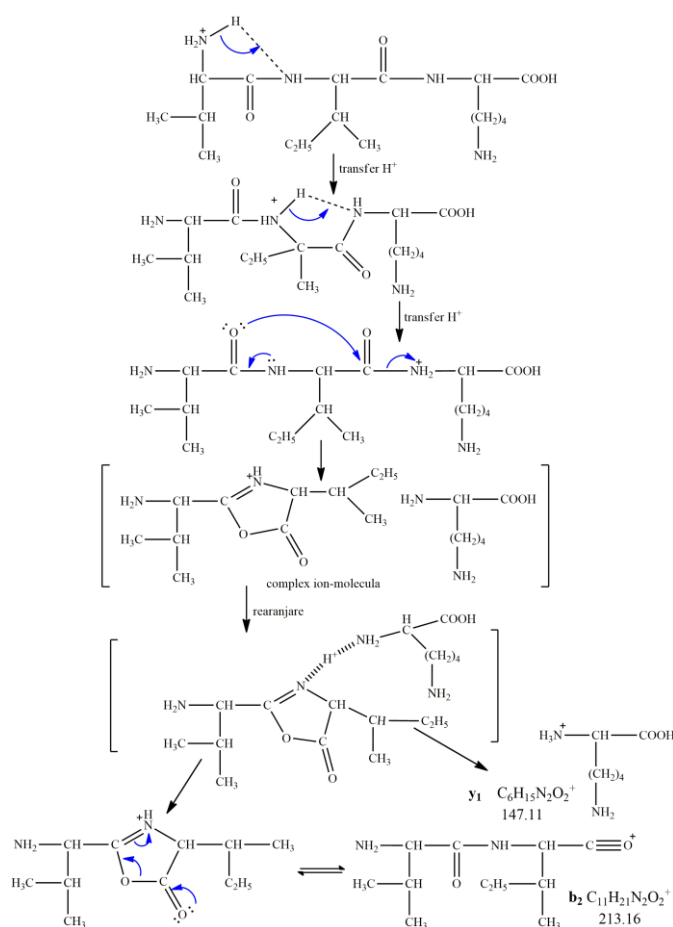
Mecanismele posibile de formare ale fragmentelor de tip $[M+H-NH_3]^+$, b_1 , b_2 , y_1 , a_1 , a_2 , y_1-NH_3 , y_2-NH_3 pot fi observate în Schema 7.8, Schema 7.9, Schema 7.10., Schema 7.11 (Schema 7.9, Schema 7.10. adaptate după ref. [197]; Schema 7.11. adaptată după ref. [199]):



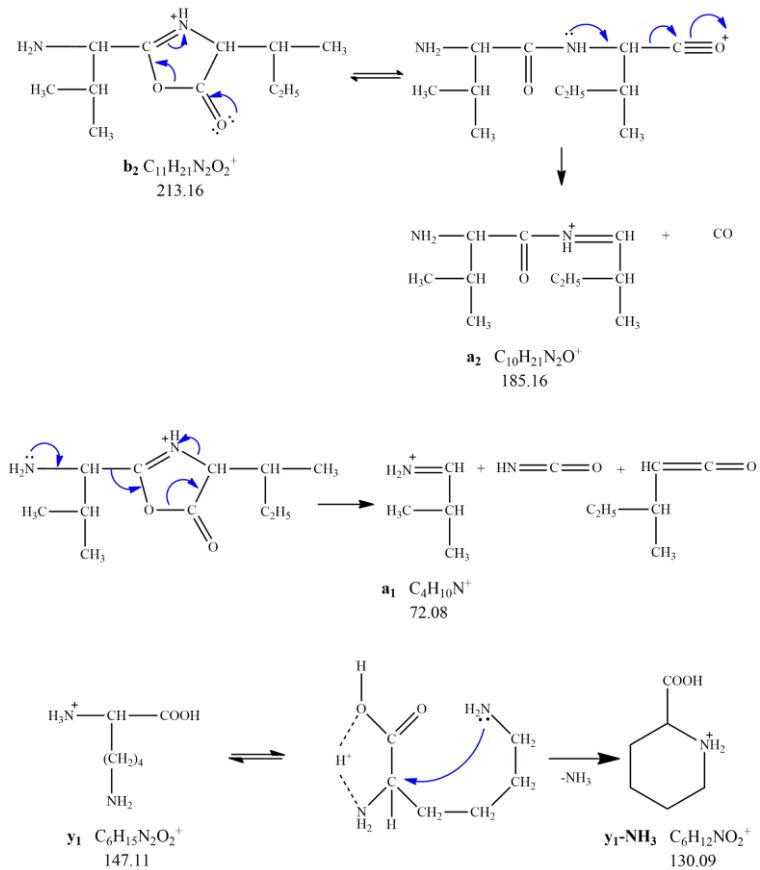
Schema 7.8. Mecanismul posibil de formare al fragmentului $[M+H-NH_3]^+$

Folosirea disocierii induse prin coliziune pentru ionii precursori conduce la ruperi ale legăturilor amidice ale peptidelor protonate, conducând în principal, a ionilor de tip *y* și de tip *b*. Acest comportament este inițiat prin transferul de proton către atomul de azot implicat în legătura amidică, ceea ce duce la slăbirea legaturilor peptidice și la ruperea acestora cu formarea fragmentelor corespunzătoare. Prin urmare, un astfel de transfer de proton implică existența unui proton "mobil", iar atomul de carbon implicat în legătura amidică poate suferi un atac nucleofil pentru a forma prin ciclizare oxazolona corespunzătoare în forma protonată și eliberarea ulterioară a fragmentului C-terminal al peptidei.

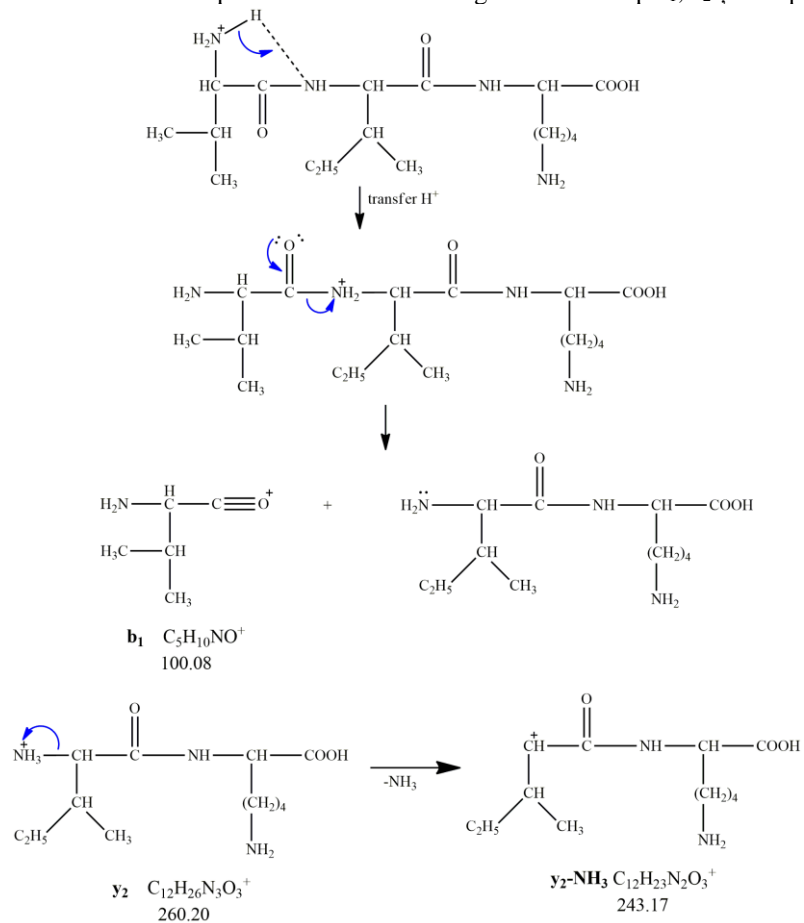
După cum se poate vedea în mecanismul propus în Schema 7.9., fragmentul N-terminal și C-terminal al peptidei exemplificate pot fi atașate prin asociere necovalentă formând un complex ion-dipol, care suferă o rearanjare prin formarea unui dimer legat în punte prin proton care poate duce în mod competitiv la formarea unui ion de tip *y* sau al unui ion de tip *b*, în funcție de afinitatea relativă a protonului; fragmente care pot suferi fragmentări ulterioare după cum se poate observa în Schema 7.10 [197].



Schema 7.9. Mecanismul posibil de formare al fragmentelor de tip b_2 și de tip y_1



Schema 7.10. Mecanismul posibil de formare al fragmentelor de tip a_1 , a_2 și de tip $y_1\text{-NH}_3$



Schema 7.11. Mecanismul posibil de formare al fragmentelor de tip b_1 și $y_2\text{-NH}_3$

Tabel 7.6. Alte tipuri de fragmente corespunzătoare peptidei **Val-Ile-Lys**

<i>Tip fragment</i>	<i>Formula chimică</i>	<i>m/z teoretic</i>	<i>m/z experimental</i>
[M+H-H₂O]⁺	C ₁₇ H ₃₃ N ₄ O ₃ ⁺	341.25	341.26
[M+H-CO-H₂O]⁺	C ₁₆ H ₃₃ N ₄ O ₂ ⁺	313.26	313.22
[M+H-NH₃]⁺	C ₁₇ H ₃₂ N ₃ O ₄ ⁺	342.23	342.26
[M-H₂O+Na]⁺	C ₁₇ H ₃₂ N ₄ O ₃ Na ⁺	363.23	363.30
[M+H-2H₂O]⁺	C ₁₇ H ₃₁ N ₄ O ₂ ⁺	323.24	323.24

În spectrele MS-MS (ANEXA 2) au fost identificate următoarele tipuri de fragmente corespunzătoare peptidei **Val-Ile-Lys**: c₁, y₁, z₁ cu m/z 117.43, 130.16, respectiv 147.99 (Fig. A2.7.); x₁ și a₂ cu m/z 173.00, respectiv 185.92 (Fig. A2.8.); b₂, c₂ și z₂ cu m/z 213.90, 230.99, respectiv 243.80 (Fig. A2.9.); x₂ și y₂ cu m/z 286.82 și 260.88 (Fig. A2.10.) și [M+H-H₂O]⁺, [M+H-CO-H₂O]⁺, [M+H-NH₃]⁺, [M-H₂O+Na]⁺, [M+H-2H₂O]⁺ cu m/z 341.26, 313.22, 342.26, 363.30, respectiv 323.24 (Fig. A2.11.).

7.4. Concluzii

Sistemele nanostructurate sintetizate: **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** au fost testate prin cuplarea cu succes a câte trei aminoacizi diferiți protejați Fmoc. Diferitele morfologii ale shell-ului secundar de silice influențează dispersabilitatea sistemelor nanostructurate în solvenții folosiți în sinteza în fază solidă, dar nu afectează performanța sintezei de peptide prezentată.

Rezultatele experimentale obținute prin FT-MS arată obținerea cu succes a secvențelor peptidice propuse (**Lys-Ala-Gly**, **Val-Ile-Lys**, **Gly-Ala-Phe** și **Lys-Ile-Val**), precum și fezabilitatea metodei de sinteză de peptide utilizând ca suport solid un sistem nanostructurat magnetic prin strategia de sinteză Fmoc.

CAPITOLUL 8. CONCLUZII GENERALE

Sinteza de peptide în fază solidă reprezintă una dintre principalele metode de sinteză a peptidelor. Performanța SPPS depinde în mare măsură de tipul suportului solid utilizat și poate fi îmbunătățită prin utilizarea nanoparticulelor magnetice ca suport solid în locul suportului clasic polimeric oferind avantajul obținerii unei suprafețe specifice ridicate, proprietățile magnetice ale miezului magnetic permițând extragerea rapidă și ușoară a produsului din amestecul de reacție. De asemenea, accesibilitatea la funcționalitățile suprafeței este îmbunătățită prin accesul direct la centrul de reacție, iar sedimentarea magnetică facilitează întreaga operațiune de spălare intermediară, permițând astfel, o gestionare mai bună a reactanților.

Obiectivul cercetării al acestei teze de doctorat a fost centrat pe dezvoltarea unei noi abordări SPPS, și anume sinteza de peptide pe suport nanostructurat magnetic. În acest scop, în locul suportului solid standard, format dintr-o rășină funcționalizată, am dezvoltat noi tipuri de suport solid constituite din nanoparticule de ferită de tip core-shell cu PABA, shell secundar de silice și diferite sisteme linker cu grupare terminală polară, labile în condițiile finale de clivare, capabile să lege eficient aminoacizi blocați N-terminal și compatibile cu toate etapele sintezei de peptide menționată. Abilitatea de atașare a noilor sisteme nanostructurate utilizând principiul SPPS a fost testată prin cuplarea succesivă a câte trei aminoacizi diferiți protejați Fmoc.

Nanoparticulele magnetice core-shell **Fe₃O₄-PABA** au fost sintetizate prin metoda coprecipitării. Structura cristalină a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** a fost demonstrată prin analiza XRD și SAED; iar dimensiunea și morfologia acestora prin DLS, TEM și SEM. Prezența shell-ului de PABA a fost confirmată prin FT-IR. Suprafața specifică a fost estimată prin analiza BET iar proprietățile magnetice au fost măsurate cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrantă (VSM). Biodisponibilitatea nanoparticulelor magnetice **Fe₃O₄-PABA** a fost determinată folosind modelul membranei corioalantoidiene (CAM) de embrion de pui și modelul murin. Shell-ul de PABA pe suprafața nanoparticulelor Fe₃O₄ permite persistența în circulație și o manevrare facilă sub acțiunea unui câmp magnetic static a nanoparticulelor feromagnetice pe care le funcționează. Nanoparticulele de tipul **Fe₃O₄-PABA** sunt biocompatibile și prezintă un risc emboligen scăzut la administrarea intravenoasă.

Shell-ul secundar de silice a fost obținut printr-o metodă sol-gel modificată folosindu-se o soluție de silicat de sodiu ($\rho=1.39 \text{ g mL}^{-1}$) și TEOS ca surse de silice. S-a efectuat un studiu comparativ de îndepărtare a template-ului prin calcinare respectiv, spălare cu solvenți. Spălarea cu EtOH/Acid acetic 5% urmată de spălarea cu EtOH a permis o îndepărtare eficientă a

template-ului. Structura și morfologia nanoparticulelor magnetice obținute **Fe₃O₄-PABA-SiO₂** a fost investigată folosind tehnicile avansate de analiză, și anume: XRD, SEM, TEM, EDX, FT-IR. Pentru a stabili regimul de tratament termic a fost efectuată analiza TGA, iar suprafața specifică a materialului obținut a fost estimată prin analiza BET. Proprietățile magnetice au fost măsurate cu ajutorul unui magnetometru cu probă vibrantă (VSM).

Au fost proiectate patru noi tipuri de sisteme nanostructurate pe bază de nanoparticule magnetice cu shell organic (PABA) și shell secundar de silice care să constituie suportul solid pentru sinteza de peptide în fază solidă: **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA**, **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OHmw**.

Sistemul nanostructurat magnetic **Fe₃O₄-PABA-GA-PPD** proiectat pentru a fi utilizat ca suport solid pentru sinteza de peptide a fost obținut folosind nanoparticule magnetice de tip core-shell, **Fe₃O₄-PABA** și un sistem linker ambident cu grupare -NH₂ liberă, compatibil cu toate etapele de sinteză. Ca linker s-a folosit glutaraldehida (GA) iar pentru a obține o grupare -NH₂ reactivă la capătul sistemului linker, capabilă să lege eficient aminoacizii blocați N-terminal, s-a grefat *p*-fenilendiamina (PPD). Prezența glutaraldehidei grefate pe suprafața nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA** și atașarea ulterioară a *p*-fenilendiaminei a fost confirmată prin spectrometrie FT-IR.

Noul sistem nanostructurat magnetic **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-APS-HMBA** proiectat pentru a fi utilizat ca suport solid în SPPS a fost obținut prin acoperirea suprafeței nanoparticulelor magnetice cu shell secundar de silice (**Fe₃O₄-PABA-SiO₂-3** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4**) cu 3-aminopropiltrimetoxisilan (APTMS) cu scopul de a obține grupări -NH₂ reactive libere. Ca linker s-a folosit acidul 4-hidroximetilbenzoic (HMBA), linker utilizat frecvent în SPPS. Materialele intermediare și finale, au fost caracterizate prin spectrometrie FT-IR.

Sistemul nanostructurat magnetic **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** nou sintetizat pentru a fi utilizat ca suport solid în sinteza de peptide a fost obținut prin grefarea pe suprafața nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-1** a unui nou sistem linker organic **SiL-OH** cu grupare -CH₂-OH liberă, similar cu HMBA, obținut din 1,4-dimetilolbenzen și *gamma*-izicianatopropil trietoxi silan. Structura noului sistem linker **SiL-OH** sintetizat a fost confirmată prin ¹H RMN, ¹³C RMN și FT-IR iar structura noului sistem nanostructurat magnetic **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH** a fost confirmată prin FT-IR.

Noul sistem nanostructurat magnetic **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OHmw** sintetizat pentru a fi folosit ca suport solid în SPPS a fost obținut prin funcționalizarea secvențială a nanoparticulelor **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-2**, cu *gamma*-izocianatopropil trietoxi silan și 1,4-

dimetilolbenzen la microunde în prezență de dibutiltin dilaurat. Structura noului sistem nanostructurat magnetic **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-SiL-OH_{mw}** a fost confirmată prin FT-IR.

Noile sisteme nanostructurate sintetizate au fost testate prin cuplarea cu succes a câte trei aminoacizi diferiți protejați Fmoc. Diferitele morfologii ale shell-ului secundar de silice influențează dispersabilitatea sistemelor nanostructurate în solvenții folosiți în sinteza în fază solidă, dar nu afectează performanța sintezei de peptide prezentată.

Rezultatele experimentale obținute prin FT-MS arată obținerea cu succes a secvențelor peptidice propuse (**Lys-Ala-Gly**, **Val-Ile-Lys**, **Gly-Ala-Phe**, **Leu-Ile-Val**); precum și fezabilitatea metodei de sinteză de peptide utilizând ca suport solid un sistem nanostructurat magnetic prin strategia de sinteză Fmoc.

Au fost investigate de asemenea, și proprietățile electrice ale **nanofilmelor Fe₃O₄-PABA** și **Fe₃O₄-PABA-SiO₂ dopat cu DPPH** obținute prin metoda Dip-Coating.

Caracterul de semiconductor de tip „p” al nanofilmului **Fe₃O₄-PABA** a fost demonstrat prin măsurători electrice. Nanofilmul **Fe₃O₄-PABA** de tip „p” a intrat în regim de epuizare cu curent de scurgere mai mic la o tensiune pozitivă pe poartă. Filmele subțiri, de grosimi diferite (200, 400 și 600 nm) au fost depuse prin metoda Dip Coating. Măsurătorile electrice ale nanofilmului **Fe₃O₄-PABA** au demonstrat că modelul OTFT (tranzistor organic cu film subțire) fabricat prezintă un comportament de tip „p”.

Caracterul de tip „n” al nanofilmului **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4 dopat cu radical DPPH** a fost dovedit prin măsurători statice. Nanofilmul **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4 dopat cu radical DPPH** a fost obținut prin metoda Dip Coating. Omogenitatea depunerii filmului a fost evidențiată prin omogenitatea răspunsului spectral utilizând următoarele tehnici de caracterizare: MALDI și microscopie FT-IR. Nanofilmul **Fe₃O₄-PABA-SiO₂-4** a fost utilizat și ca matrice în analiza MALDI. Măsurătorile electrice înregistrate au dovedit un comportament de tranzistor (tip TFT - tranzistor cu film subțire) cu film de tip „n”.

ANEXA 2 (Capitol 7) - Identificarea fragmentelor peptidice

2. Identificarea în spectrele MS a fragmentelor peptidei VIK

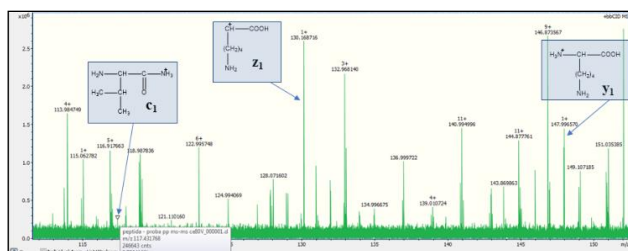


Figura A2.7. Identificarea în spectrul MS a fragmentelor de tip c_1 , y_1 , z_1 cu m/z 117.43, 130.16, respectiv 147.99

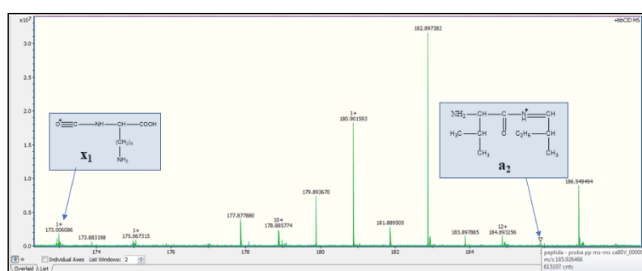


Figura A2.8. Identificarea în spectrul MS a fragmentelor de tip x_1 și a_2 cu m/z 173.00, respectiv 185.92

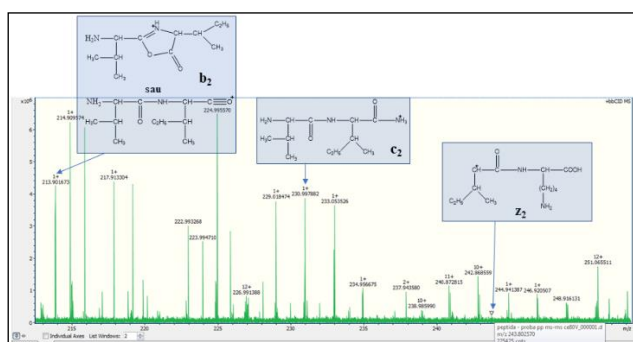


Figura A2.9. Identificarea în spectrul MS a fragmentelor de tip b_2 , c_2 și z_2 cu m/z 213.90, 230.99, respectiv 243.80

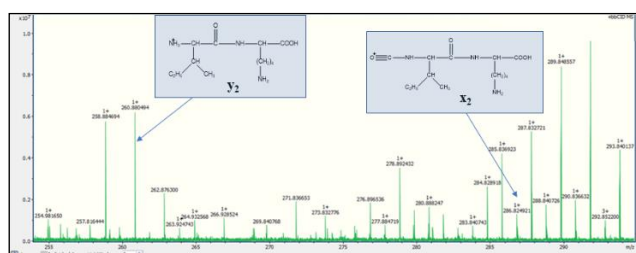


Figura A2.10. Identificarea în spectrul MS a fragmentelor de tip x_2 și y_2 cu m/z 286.82 și 260.88

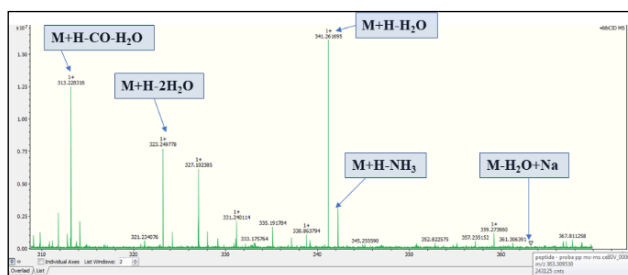


Figura A2.11. Identificarea în spectrul MS a fragmentelor de tip $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-CO-H_2O]^+$, $[M+H-NH_3]^+$, $[M-H_2O+Na]^+$, $[M+H-2H_2O]^+$ cu m/z 341.26, 313.22, 342.26, 363.30, respectiv 323.24

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [26] C. Stutz, I. Bilecka, A.F. Thünemann, M. Niederberger, H.G. Börner, Superparamagnetic core-shell nanoparticles as solid supports for peptide synthesis, *Chemical Communications*, 48 (2012) 7176–7178.
- [59] G.G. Nedelcu, A. Nastro, L. Filippelli, M. Cazacu, M. Iacob, C.O. Rossi, A. Popa, D. Toloman, M. Dobromir, F. Iacomi, Structural characterization of copolymer embedded magnetic nanoparticles, *Applied Surface Science*, 352 (2015) 109–116.
- [62] K. Tadyszak, A. Kertmen, E. Coy, R. Andruszkiewicz, S. Milewski, I. Kardava, B. Scheibe, S. Jurga, K. Chybczynska, Spectroscopic and magnetic studies of highly dispersible superparamagnetic silica coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 433 (2017) 254–261.
- [65] M. Abbas, P.B. Rao, M.N. Islam, S.M. Naga, M. Takahashi, C. Kim, Highly stable- silica encapsulating magnetite nanoparticles (Fe₃O₄/SiO₂) synthesized using single surfactantless polyol process, *Ceramics International*, 40 (2014) 1379–1385.
- [78] G. Krylova, M.I. Bodnarchuk, U.I. Tromsdorf, E.V. Shevchenko, D.V. Talapin, H. Weller, Synthesis, Properties and Applications of Magnetic Nanoparticles, in: G. Schmid (Ed.) *Nanoparticles From Theory to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, 2010, pp. 239–297.
- [107] R.K. Singh, T.-H. Kim, K.D. Patel, J.C. Knowles, H.-W. Kim, Biocompatible magnetite nanoparticles with varying silica-coating layer for use in biomedicine: physicochemical and magnetic properties, and cellular compatibility, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100 (2012) 1734–1742.
- [136] A. Moroşan, D.E. Mihaiescu, D. Istrati, G. Voicu, A. Fudulu, R. Stan, Polar shell magnetic nanostructured systems for heterogeneous nanophase reactions, *UPB Scientific Bulletin, Series B*, 80 (2018) 53–64.
- [137] C. Ravariu, D.E. Mihaiescu, A. Moroşan, D. Istrati, B. Purcăreanu, R. Cristescu, R. Truşcă, B.Ş. Vasile, Solution for green organic thin film transistors: Fe₃O₄ nano-core with PABA external shell as p-type film, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, (2020) 1–11.
- [138] A. Moroşan, D.E. Mihaiescu, D. Istrati, G. Voicu, M. Radu, A. Hanganu, R. Stan, Functionalized silica shell magnetic nanoparticles for nanophase peptide synthesis applications, *Microporous and Mesoporous Materials*, 286 (2019) 45–56.
- [141] P. Launer, Infrared Analysis of Organosilicon Compounds in: B. Arkles, G.L. Larson (Eds.) *Silicon Compounds: Silanes and Silicones*, Gelest, Inc., Morrisville, 2013, pp. 177–180.
- [150] L. Guerrini, R.A. Alvarez-Puebla, N. Pazos-Perez, Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids *Materials*, 11 (2018) 1–28.
- [151] D. Mishra, R. Arora, S. Lahiri, S.S. Amritphale, N. Chandra, Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles by Solvothermal Method, *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 50 (2014) 628–631.
- [167] H. Chen, C. Deng, X. Zhang, Synthesis of Fe₃O₄@SiO₂@PMMA Core-Shell-Shell Magnetic Microspheres for Highly Efficient Enrichment of Peptides and Proteins for MALDI ToF MS Analysis, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 607–611.
- [170] R. Roto, Surface Modification of Fe₃O₄ as Magnetic Adsorbents for Recovery of Precious Metals, in: M.A. Chowdhury (Ed.) *Advanced Surface Engineering Research*, IntechOpen, London, 2018, pp. 128–139.
- [173] E. Petrovský, V. Kropáček, M.J. Dekkers, C. deBoer, V. Hoffmann, A. Ambatiello, Transformation of hematite to maghemite as observed by changes in magnetic parameters: Effects of mechanical activation?, *Geophysical Research Letters*, 23 (1996) 1477–1480.
- [181] V.K. Singh, B. Mazhari, Accurate characterization of organic thin film transistors in the presence of gate leakage current, *AIP Advances*, 1 (2011) 042123–042121–042111.
- [186] H. Yang, R. Su, J.S. Wishnok, N. Liu, C. Chen, S. Liu, S.R. Tannenbaum, Magnetic silica nanoparticles for use in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of labile biomolecules such as oligosaccharides, amino acids, peptides and nucleosides, *Microchimica Acta*, 186 (2019) 1–8.
- [193] G. Zhang, R.S. Annan, S.A. Carr, T.A. Neubert, Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry, *Current Protocols in Protein Science*, 62 (2010) 16.11.11–16.11.30.
- [194] K.F. Faull, A.N. Dooley, F. Halgand, L.D. Shoemaker, A.J. Norris, C.M. Ryan, A. Laganowsky, J.V. Johnson, J.E. Katz, An Introduction to the Basic Principles and Concepts of Mass Spectrometry-Protein Mass Spectrometry, in: J.P. Whitelegge (Ed.) *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier Science, Amsterdam, 2008, pp. 1–40.
- [197] C. Afonso, R.B. Cole, J.-C. Tabet, Dissociation of Even-Electron Ions, in: R.B. Cole (Ed.) *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2010, pp. 632–659.
- [199] D.P. Demarque, A.E.M. Crotti, R. Vessecchi, J.L.C. Lopes, N.P. Lopes, Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products, *Natural Product Reports*, 33 (2016) 432–455.

DISEMINARE REZULTATE

1. A. Moroşan, D. E. Mihaiescu, D. Istrati, G. Voicu, A. Fudulu, R. Stan, Polar shell magnetic nanostructured systems for heterogeneous nanophase reactions, **U.P.B. Sci. Bull. Ser B**, 2018, 80 (3) 53-64, ISSN 1454-2331
2. A. Moroşan, D. E. Mihaiescu, D. Istrati, G. Voicu, M. Radu, A. Hanganu, R. Stan, Functionalized silica shell magnetic nanoparticles for nanophase peptide synthesis applications, **Microporous and Mesoporous Materials**, 2019, 286, 45–56. DOI: 10.1016/j.micromeso.2019.05.018 (IF= 4.551)
3. C. Ravariu, D. E. Mihaiescu, A. Moroşan, D. Istrati, B. Purcăreanu, R. Cristescu, R. Truşcă, B. Ş. Vasile, „Solution for green organic thin film transistors: Fe₃O₄ nano-core with PABA external shell as p-type film”, **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, 2020, 1-11. (IF= 2.220)

CONFERINŢE INTERNAŢIONALE

Prezentări orale

1. A. Moroşan, D. Istrati, D. E. Mihaiescu, **Peptide synthesis on magnetic nanostructured support using Fmoc strategy**, Seminar: "ACS on Campus", Universitatea POLITEHNICA din Bucureşti, 13.05.2016, Bucureşti, Romania
2. A. Moroşan, R. Stan, D. Istrati, D. E. Mihaiescu, **Alternative hybrid nanostructured support for solid phase peptide synthesis**, 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, September 6-9, 2017, Poiana Brasov, Romania

Postere

3. A. Moroşan, D. Istrati, D. E. Mihaiescu, A. Fudulu, A. Marton, R. Stan, **Synthese des peptides sur support magnetique nanostructure à l'aide de la strategie Fmoc**, 9^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée (COFrRoCA), 29 Juin-1 Juillet 2016, Clermont Ferrand, France
4. A. Moroşan, D. Istrati, R.L.Stan, B. Trică, G. Vasilievici, D.E. Mihaiescu, **Functionalized silica shell magnetic nanoparticles for nanophase peptide synthesis applications**, 15th ICNN – NN18-NANOTECHNOLOGY 2018, 2-7.07.2018, Thessaloniki, Greece
5. A. Moroşan, D. E. Mihaiescu, D. Istrati, R. Stan, G. Voicu, B. Vasile, **New approaches of peptides synthesis**, 9th ICOSECS 2019, 8-11.05.2019, Targoviste, Romania
6. A. Moroşan, D. Istrati, D. E. Mihaiescu, C. Ravariu, B. Vasile, **Nanocomposites Based on SET – Active Organic Compounds for Electron Transfer Applications in Electronics**, 31st International Conference and Expo on Nanosciences and Nanotechnology, 18-19.11.2019, Paris, France (moderator)

Premii

Prix au meilleur poster: „Synthese des peptides sur support magnetique nanostructure à l'aide de la strategie Fmoc”, 9^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée (COFrRoCA), 29 Juin-1 Juillet 2016, Clermont Ferrand, France