



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
Școala Doctorală a Facultății de Inginerie Chimică
și Protecția Mediului



MICRO ȘI NANOPARTICULE MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE CU APLICAȚII ÎN DETOXIFIEREA SÂNGELUI

- Rezumatul tezei de doctorat -

Conducător de doctorat:

Prof. univ. dr. ing. Marcel Ionel Popa

Doctorand:
Bioing. Vera Bălan

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GH. ASACHI" IAȘI
RECTORATUL

Către.....

Vă facem cunoscut că în ziua de **10.11. 2011, la ora 13⁰⁰**, în sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**"MICRO ȘI NANOPARTICULE MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE
CU APLICAȚII ÎN DETOXIFIEREA SÂNGELUI"**

elaborată de doamna bioing. **Vera Bălan** în vederea conferirii titlului științific de doctor în chimie.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

Prof.univ.dr.ing. Teodor MALUȚAN	președinte
Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" din Iași	
Prof.univ.dr.ing. Ionel Marcel POPA	conducător științific
Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" din Iași	
Prof.univ.dr.ing. Marcel POPA	membru
Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" din Iași	
CS I.dr.chim. Aurica CHIRIAC	membru
Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni"	
Conf.univ.dr.ing. Liliana VEREȘTIUC	membru
Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T.Popa" din Iași	

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,
Prof. univ. dr. ing. ION GIURMA



Secretar universitate,
Ing. Cristina Nagăț

Recunoștință și alese mulțumiri conducătorului de doctorat prof.dr.ing. Marcel Ionel Popa, pentru sprijinul și îndrumările științifice acordate pe parcursul elaborării și redactării tezei de doctorat.

Un gând deosebit și sincere mulțumiri doamnei conf.dr.ing Liliana Vereștiuc pentru continua sa îndrumare și încurajare, pentru sprijinul și susținerea acordată pe parcursul formării mele profesionale.

Mulțumiri domnului dr. Eugen Barbu și domnului dr. John Tzibouklis, pentru sprijinul și sfaturile acordate pe parcursul stagiului de cercetare efectuat în cadrul Universității din Portsmouth Anglia.

Recunoștință și mulțumiri doamnei CS.I.dr.chim. Aurica Chiriac și colectivului dumneaei cu care am colaborat pe parcursul acestei teze și doamnei conf.dr. Gabriela Lisă și doamnei dr.ing. Doina Hrițcu, pentru sprijinul acordat în diverse ocazii.

Mulțumiri prietenilor mei: Luciana, Gianina, Simona, Ana-Maria, Edi și Ovidiu cu care am împărtășit multe momente speciale de-a lungul acestor ani.

Aș vrea să mulțumesc familiei mele, care mi-a fost aproape și m-a susținut în tot acest timp.

Dedic această teză soțului meu, cel care mi-a fost alături în orice moment, care a crezut în mine chiar și în cele mai grele momente și fetei mele.

Cu respect tuturor,

Bălan Vera

CUPRINS

INTRODUCERE

CAPITOLUL I

Tehnici și metode de detoxifiere sangvină	1
I.1. Tehnici și metode actuale. Descriere, avantaje și limite	2
I.1.1. Dializa	2
I.1.2. Plasmafereza	3
I.1.3. Hemoperfuzia	5
I.1.4. Imunoabsorția extracorporeală	6
I.1.5. Injectarea directă de anticorpi sau de chelatori	6
I.2. Tehnica de separare magnetică în gradient înalt de câmp (HGMS)	8
I.2.1. Principiile tehnicii HGMS	8
I.2.2. Caracteristicile separatorului magnetic HGMS utilizat în detoxifierea sangvină	11

CAPITOLUL II

Particule magnetice funcționalizate cu aplicații în detoxifierea sângelui	17
II.1. Caracteristicile particulelor magnetice funcționalizate cu aplicații în detoxifierea sângelui	17
II.2. Metode de sinteză a materialelor magnetice	23
II.3. Metode de modificare a suprafeței particulelor magnetice	27
II.3.1. Modificarea suprafeței particulelor magnetice cu polimeri naturali	27
II.3.1.1. Modificarea suprafeței particulelor magnetice cu dextran	27
II.3.1.2. Modificarea suprafeței particulelor magnetice cu chitosan	28
II.3.2. Modificarea suprafeței particulelor magnetice cu polimeri sintetici	37
II.4. Metode de funcționalizare a particulelor magnetice	38
II.4.1. Funcționalizarea particulelor magnetice cu liganzi biologic activi	41

CAPITOLUL III

Strategia experimentală	47
III.1. Conceptul experimental	47
III.2. Materiale și reactivi utilizați în prepararea particulelor magnetice funcționalizate	49
III.3. Metode de preparare a particulelor	50
III.3.1. Metoda generală de obținere a materialului magnetic (magnetită)	50
III.3.2. Prepararea particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită	51
III.3.3. Prepararea particulelor magnetice biotinite pe bază de chitosan și magnetită	51
III.3.4. Prepararea particulelor magnetice biotinite pe bază de PSI-b-PEG și magnetită	51
III.3.5. Prepararea a particulelor magnetice funcționalizate cu streptavidină (SA)	52
III.3.6. Testarea <i>in vitro</i> a eficienței de captare a unei toxine model pe particulele magnetice funcționalizate	53
III.4. Metode de caracterizare a particulelor magnetice funcționalizate	53
III.4.1. Metode de caracterizare structurală	53
III.4.1.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	53
III.4.1.2. Difrakția cu raze X (XRD)	54
III.4.1.3. Spectroscopia de protoni de rezonanță magnetică nucleară (¹ H-RMN)	55
III.4.2. Metode de caracterizare morfologică	56
III.4.2.1. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)	56

III.4.2.2. Microscopia electronică de transmisie (TEM)	57
III.4.3. Determinarea dimensiunii particulelor	58
III.4.4. Determinarea potențialului Zeta	58
III.4.5. Metode de analiză termică. Analiza termogravimetrică	60
III.4.6. Determinarea proprietăților magnetice	61
III.4.7. Spectroscopia UV- VIS	62
III.4.8. Determinarea gradului de biotinilare	63
III.5. Evaluarea caracteristicilor biologice ale particulelor biotinilate	65
III.5.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a hemocompatibilității particulelor biotinilate	65
III.5.2. Evaluarea biocompatibilității particulelor biotinilate	65
III.5.2.1. Izolarea și cultivarea celulelor	65
III.5.2.2. Evaluarea viabilității celulare prin microscopie confocală-metoda directă	66
III.5.2.3. Evaluarea viabilității celulare prin tehnica MTS	67
CAPITOLUL IV	
Particule magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită	68
IV.1. Prepararea materialului magnetic (magnetită)	69
IV.2. Caracterizarea materialului magnetic	72
IV.2.1. Difracția cu raze X (XRD)	72
IV.2.2. Microscopie electronică de transmisie (TEM)	73
IV.2.3. Determinarea dimensiunilor medii și a potențialului Zeta pentru suspensiile magnetice	74
IV.2.4. Analiza elementală	74
IV.2.5. Spectroscopie FT-IR	74
IV.2.6. Determinarea proprietăților magnetice	76
IV.3. Prepararea particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită	77
IV.4. Caracterizarea particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită	78
IV.4.1. Spectroscopie FT-IR	78
IV.4.2. Tehnici de microscopie electronică (TEM, SEM)	81
IV.4.3. Analiza elementală	83
IV.4.4. Difracția cu raze X (XRD)	84
IV.4.5. Analiza termogravimetrică	85
IV.5. Influența parametrilor de reacție asupra caracteristicilor particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită	87
IV.5.1. Influența masei molare a polimerului asupra dimensiunii particulelor	88
IV.5.2. Influența concentrației de surfactant asupra caracteristicilor particulelor	88
IV.5.3. Influența raportului masic chitosan/TPP asupra caracteristicilor particulelor	90
IV.6. Prepararea particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită	92
IV.7. Caracterizarea particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită	93
IV.7.1. Spectroscopia FT-IR	93
IV.7.2. Spectroscopia de rezonanță magnetică de protoni (^1H -NMR)	94
IV.7.3. Analiza elementală	96
IV.7.4. Determinarea dimensiunii medii și a potențialului Zeta al particulelor biotinilate	88
IV.7. 5. Tehnici de microscopie electronică (TEM, SEM)	98
IV.7. 6. Determinarea proprietăților magnetice	98
IV.8. Influența parametrilor de reacție asupra caracteristicilor particulelor biotinilate	100

IV.8.1. Influența raportului molar chitosan/biotină asupra caracteristicilor particulelor biotinilate	100
IV.8.2. Influența raportului molar biotină/EDAC asupra caracteristicilor particulelor biotinilate	102
IV.9. Determinarea conținutului de biotină prin tehnica HABA –Avidină	104
IV.10. Teste de redispersie ale particulelor biotinilate în medii de interes biologic	105
IV.11. Evaluarea caracteristicilor biologice ale particulelor biotinilate	109
IV.11.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a hemocompatibilității particulelor biotinilate	109
IV.11.2. Evaluarea biocompatibilității particulelor	113
IV.11.2.1. Evaluarea viabilității celulare prin microscopie confocală-metoda directă	113
IV.11.2.2. Evaluarea viabilității celulare prin tehnica MTS	114
IV.12. Concluzii	115
CAPITOLUL V	
Particule magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG și magnetită	117
V.1. Prepararea particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG și magnetită	118
V.2. Caracterizarea particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG și magnetită	120
V.2.1. Spectroscopia FT-IR	120
V.2.2. Spectroscopia de rezonanță magnetică de protoni (^1H -NMR)	121
V.2.3. Determinarea dimensiunii medii și a potențialului Zeta al particulelor biotinilate	123
V.2.4. Determinarea conținutului de biotină prin tehnica HABA-Avidină	124
V.2.5. Microscopie electronică (TEM, SEM)	124
V.2.6. Analiza termogravimetrică	126
V.2.7. Difrakția cu raze X (XRD)	128
V.2.8. Determinarea proprietăților magnetice	129
V.3. Teste de redispersie ale particulelor biotinilate în medii de interes biologic	130
V.4. Evaluarea caracteristicilor biologice ale particulelor biotinilate	131
V.4.1. Determinarea <i>in vitro</i> a hemocompatibilității particulelor biotinilate	131
V.5. Concluzii	132
Capitolul VI	
Evaluarea performanțelor particulelor magnetice funcționalizate în detoxifierea sângelui	133
VI.1. Prepararea particulelor magnetice funcționalizate cu streptavidină (SA)	133
VI.2. Determinarea dimensiunii și al potențialului Zeta al particulelor magnetice funcționalizate cu streptavidină	136
VI. 3. Determinarea cantitativă a SA imobilizată pe particulele magnetice funcționalizate	137
VI. 4. Testarea <i>in vitro</i> a eficienței de captare a unei toxine model pe particulele magnetice funcționalizate cu SA	137
VI.4.1. Determinarea cantitativă a toxinei model captate pe particulele magnetice funcționalizate cu SA	138
VI. 5. Concluzii	139
	140
Capitolul VII	
Concluzii generale	140
Referințe bibliografice	145

INTRODUCERE

Detoxifierea extracorporeală a sângelui poate fi realizată, în prezent, prin tehnici foarte variate care, în funcție de procesele patologice caracteristice bolilor supuse tratamentului sunt reprezentate de: hemodializă, plasmafereză, hemoperfuzie sau imunoadsorție. Aceste tehnici prezintă numeroase avantaje dar sunt limitate în ceea ce privește eficacitatea, repetabilitatea și aplicabilitatea numai în zona biologică de interes. De asemenea, metodele enumerate nu se bazează pe tehnici de legare selectivă a toxinelor sangvine motiv pentru care majoritatea biohazardelor provocate de expunerea la diverși factori nocivi, de intoxicația medicamentoasă și de toxinele generate în organism (toxine auto-imune) nu pot fi tratate adecvat.

Astfel a apărut necesitatea îmbunătățirii acestor metode precum și dezvoltarea de noi tehnici de detoxificare a sângelui, necesare în special în cazul atacurilor bioteroriste. În acest sens, strategia a numeroase grupuri de cercetare din lumea întreagă este direcționată asupra folosirii particulelor superparamagnetice funcționalizate cu compuși cu specificitate și selectivitate mare față de toxine, care odată introduse în circulația sangvină, prin simpla injectare, să fixeze toxina, iar ulterior, folosind un sistem de separare magnetică în gradient înalt de câmp, să fie eliminate din circulația sangvină.

În general, particulele magnetice sunt particule cu dimensiuni de ordinul nano- sau micrometrilor, alcătuite din substanțe cu un caracter magnetic foarte pronunțat (fier, oxizi de fier – magnetită, diverse ferite), particule ce prezintă, în consecință, un moment magnetic mare și cu ajutorul cărora pot fi manipulate în câmpuri magnetice diverse entități nemagnetice, cum ar fi: celule, substanțe biologice active (anticorpi, antigene, enzime, acizi nucleici, medicamente), agenți patogeni, xenobiotice, toxine.

Una dintre cele mai noi direcții de cercetare în domeniul micro și nanotehnologiilor biomedicale o constituie acoperirea particulelor magnetice cu polimeri sintetici sau naturali biodegradabili și biocompatibili, ca vehiculanți de receptori specifici, datorită avantajelor extrem de importante pe care le oferă utilizarea acestor materiale ca strat de acoperire, și anume: biocompatibilitatea și versalitate, posibilitatea adsorbției și a legării chimice de substanțe biologice active prin intermediul grupelor lor funcționale de pe suprafață.

Înscriindu-se în tendința manifestată la nivel mondial, această teză de doctorat are ca obiective principale prepararea unor micro- și nanoparticule magnetice acoperite cu polimeri biocompatibili, naturali și sintetici, funcționalizate cu compuși cu specificitate pentru toxine sangvine și evaluarea performanțelor particulelor preparate în tehnica de detoxifiere a sângelui.

Lucrarea este alcătuită din două părți distincte: *partea I*, o parte teoretică, de studiu bibliografic al stadiului actual al cercetărilor privind micro- și nanoparticulele magnetice funcționalizate cu aplicații în detoxifierea sângelui și *partea a-II-a*, experimentală, în care sunt prezentate rezultatele originale obținute. **Capitolul I**, intitulat „*Tehnici și metode actuale de detoxifiere sangvină*” prezintă stadiul actual al tehnicilor de detoxifiere sangvină extracorporeală reprezentate de hemodializă, plasmafereză, hemoperfuzie, injectarea directă de anticorpi și chelatori și tehnici bazate pe imunoadsorție și evidențiază limitele acestora din care derivă necesitatea implementării unei noi tehnici de detoxifiere bazată pe particule magnetice funcționalizate și separarea magnetică în gradient înalt de câmp.

Capitolul II, intitulat „*Particule magnetice funcționalizate cu aplicații în detoxifierea sângelui*” descrie caracteristicile pe care trebuie să le îndeplinească particulele magnetice funcționalizate pentru a putea fi utilizate cu succes în tehnicile de detoxifiere sangvină (hemo- și biocompatibilitate, dimensiune cuprinsă în intervalul 1-3 μm , magnetizare de saturație ridicată și comportament superparamagnetic, capacități de recunoaștere și captare a toxinelor sangvine) precum și cercetările efectuate privind prepararea materialelor magnetice, modificarea suprafeței acestor materiale magnetice cu polimeri naturali și sintetici în vederea obținerii unor compozite de tip material magnetic-polimer și funcționalizarea particulelor magnetice cu diverși compuși. De asemenea, realizează o trecere în revistă a studiilor de literatură referitoare la obținerea particulelor magnetice funcționalizate cu potențiale aplicații în detoxifierea sângelui și, respectiv, a tipurilor de separatoare magnetice utilizate.

Partea experimentală este structurată pe cinci capitole. În **capitolul III**, intitulat „*Strategia experimentală*” sunt prezentate: conceptul experimental, materialele utilizate în prepararea particulelor magnetice funcționalizate și metodele de caracterizare ale acestor particule.

Capitolul IV, „*Particule magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită*”, prezintă rezultatele originale obținute în prepararea și caracterizarea particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită. Aceste particule au fost preparate în trei etape: în prima etapă s-a sintetizat materialul magnetic, magnetită, stabilizat în suspensie cu Pluronic F127, CTAB sau Tween 20. A doua etapă a fost reprezentată de prepararea particulei magnetice pe bază de chitosan prin mecanismul de gelifiere ionică a chitosanului cu tripolifosfat de sodiu (TPP) în prezența magnetitei și stabilizarea acesteia cu tensioactiv. În etapa a treia s-a realizat biofuncționalizarea particulelor prin imobilizarea biotinei pe suprafață, procedeul adoptat valorificând posibilitatea formării unor legături amidice între gruparea carboxil a biotinei și gruparea amino a chitosanului, reacție mediată de carbodiimide solubile în apă (1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimidă hidroclorurată) (EDAC). Particulele magnetice biotinilate au fost caracterizate din punct de vedere compozițional, structural și morfologic, al dimensiunilor și a distribuției dimensionale, a

potențialului Zeta, al proprietăților magnetice și al caracteristicilor biologice prin tehnici moderne de analiză. S-a evaluat capacitatea de redispersie a particulelor magnetice biotinilate în medii biologice simulate precum și proprietățile biologice (bio- și hemocompatibilitate) ale acestora.

În **Capitolul V**, „*Particule magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG și magnetită*” sunt prezentate rezultatele obținute în urma preparării și caracterizării particulelor magnetice biotinilate pe bază de poli(succinimidă)-bloc-poli(etilen glicol) (PSI-b-PEG) și magnetită. Particulele magnetice pe bază de PSI-b-PEG au fost preparate în cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară Petru Poni, Iași prin procedeul policondensării *in situ* iar în cadrul acestei teze s-a realizat biotinilarea acestor particule prin intermediul legăturilor esterice formate între gruparea carboxil a biotinei și gruparea hidroxil a PEG-ului. Tehnici de spectroscopie (FT-IR și ^1H -RMN), de microscopie electronică, de difracție și de analiză termică au fost utilizate în caracterizarea particulelor magnetice biotinilate. S-au determinat dimensiunile medii ale particulelor, potențialul Zeta al acestora, proprietățile magnetice și comportamentul acestora în soluții de interes biologic. S-a evaluat hemocompatibilitatea particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG prin teste de coagulare ale sângelui în contact cu particulele magnetice biotinilate.

Capitolul VI, intitulat „*Evaluarea performanțelor particulelor magnetice funcționalizate în detoxifierea sângelui*” prezintă rezultatele obținute privind funcționalizarea cu streptavidină a celor două tipuri de particule magnetice biotinilate pe bază de chitosan și respectiv PSI-b-PEG și magnetită și evaluarea performanțelor acestor particule în captarea și separarea unei toxine model. Atât particulele magnetice biotinilate pe bază de chitosan cât și particulele magnetice pe bază de PSI-b-PEG au fost funcționalizate cu streptavidină și s-a analizat capacitatea acestora de captare a toxinelor, sanguine.

Capitolul VII, „*Concluzii generale*” prezintă într-o manieră succintă cele mai importante rezultate experimentale obținute în cadrul acestui studiu și evidențiază, în același timp, contribuțiile originale ale acestei lucrări în domeniul particulelor magnetice funcționalizate cu aplicații în tehnici de detoxifiere a sângelui.

Rezultatele obținute pe parcursul acestei teze au fost valorificate prin publicarea și trimiterea spre publicare a 5 lucrări, dintre care 3 articole cu factor ISI, comunicarea rezultatelor obținute la 13 manifestări științifice interne și internaționale precum și participarea în colectivul de lucru a 3 contracte de cercetare.

Rezumatul tezei de doctorat respectă denumirea capitolelor, numerotarea figurilor, tabelelor și a referințelor bibliografice din teză.

III.1. CONCEPTUL EXPERIMENTAL

Obținerea unor particule superparamagnetice funcționalizate cu aplicații în tehnici de detoxifiere sangvină constituie obiectul de studiu a numeroase colective de cercetare din întreaga lume. Studiile au fost orientate pe de o parte în direcția preparării acestor tipuri de particule magnetice și pe de altă parte conceperii de sisteme de separare magnetică care să permită îndepărtarea eficientă și rapidă a particulelor magnetice din sânge. Interesul pentru această direcție de studiu derivă din limitările tehnicilor actuale de detoxifiere sangvină dar și din potențialul particulelor magnetice de a fi utilizate cu succes în scopuri ce implică contactul direct cu sângele. Particulele magnetice prezintă numeroase aplicații biomedicale precum transportul și eliberarea țintită de medicamente, separarea celulară și repararea țesuturilor, imagistica prin rezonanță magnetică și tehnici de hipertermie [31,32,33].

În urma analizei rezultatelor științifice raportate în literatura de specialitate privind particulele magnetice și aplicațiile lor biomedicale s-a optat pentru lucrarea de față la o strategie experimentală care a avut ca obiectiv principal:

Studii privind obținerea de micro- și nanoparticule magnetice funcționalizate pe bază de polimeri naturali și sintetici și evaluarea performanțelor acestora în detoxifierea sângelui

Materialul magnetic selectat pentru studiu a fost reprezentat de oxidul de fier, în varianta magnetită. Motivele care au stat la baza selecției acestui tip de material magnetic au fost reprezentate, în primul rând, de proprietățile sale magnetice excelente care-i permit manipularea în câmp magnetic și în al doilea rând de faptul că este un material biocompatibil. Magnetita a fost obținută prin metoda Massart care constă în co-precipitarea în mediu bazic a soluțiilor apoase de săruri de Fe^{2+} și Fe^{3+} . Cu scopul de a obține o suspensie magnetică stabilă coloidal s-au testat diverși surfactanți (doi neionici și anume: Pluronic F127 și Tween 20 și unul cationic: CTAB) în prepararea nanoparticulelor de magnetită pentru a preveni agregarea acestora.

Pluronic F127 a fost selectat deoarece este un surfactant hidrofil, biocompatibil ce prezintă un potențial ridicat de a controla dimensiunea și stabilitatea particulelor de magnetită [196]. Motivul principal care a stat la baza selecției CTAB-ului a fost reprezentat de faptul că studiile de literatură indică potențialul acestui tensioactiv de a stabiliza particule

de chitosan-TPP simple în dispersii apoase [185]. Tween 20 este un surfactant neionic, utilizat pentru stabilizarea produselor farmaceutice și pentru creșterea gradului lor de hidratare [200].

Pentru obținerea particulelor magnetice de tip compozit magnetită-polimer s-a optat pentru doi polimer: un polimer natural reprezentat de chitosan și un polimer sintetic reprezentat de copolimerul, PSI-b-PEG. Au fost selectați acești polimeri ca materiale de acoperire a suprafeței magnetitei datorită proprietăților lor biologice excelente (biocompatibilitate, biodegradabilitate) dar și a funcționalității remarcabile (prezența grupărilor amino a chitosanului și a grupărilor hidroxil a PSI-b-PEG-ului).

Metoda de obținere a particulelor magnetice de tip compozit magnetită-chitosan a fost reprezentată de gelifierea ionică a chitosanului cu tripolifosfat de sodiu (TPP), în prezența magnetitei. S-a optat pentru această metodă, în detrimentul reticulării chimice, deoarece este o metodă simplă, ușor de reprodus și nu necesită utilizarea unor reactivi toxici pentru organismul uman. S-a studiat influența unor parametri de reacție (masa molară a polimerului, raportul masic polimer/agent de reticulare, natura surfactantului, concentrația acestuia, pH-ul) asupra caracteristicilor compozitelor magnetită-chitosan, pentru a controla prin intermediul acestor parametri caracteristicile particulelor magnetice pe bază de chitosan.

Particulele magnetice de tip compozit magnetită-polimer au fost biofuncționalizate, prin legarea biotinei pe suprafața acestora prin intermediul unei carbodiimide solubile în apă, EDAC, care are rolul de activator al grupării carboxil a biotinei. Biotinilarea particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită s-a realizat prin formarea unor legături amidice între gruparea amino a chitosanului și gruparea carboxil a biotinei și prin legături de tip ester între gruparea hidroxil terminală a PEG-ului și gruparea carboxil a biotinei în cazul particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG și magnetită. A fost aleasă această metodă, deoarece nu afectează organizarea conformațională a biotinei și nici nu presupune implicarea unor grupe funcționale care să împiedice ulterior formarea complexului cu receptori de toxine (SA-streptavidină).

S-a studiat posibilitatea formulării particulelor magnetice biotinilate ca suspensii injectabile prin redispersarea lor în medii care simulează mediile biologice. Au fost evaluate caracteristicile de bio-și hemocompatibilitate ale acestor particule magnetice biotinilate.

Funcționalizarea particulelor magnetice s-a realizat cu sisteme biologice de tip biotină/streptavidină. A fost aleasă această metodă deoarece sistemele biologice biotină/receptor de tip avidină prezintă caracteristici unice care se referă atât la stabilitatea legăturilor formate cât și la numărul mare de compuși bioactivi (integrine, toxine, imunofactori) ce pot fi recunoscuți și captați.

III.3.1. Metoda generală de obținere a materialului magnetic (magnetită)

Materialul magnetic a fost obținut prin metoda Massart, descrisă în continuare. Soluțiile de clorură ferică și clorură feroasă obținute prin dizolvarea clorurii ferice hexahidratate (0,0551 mol) în 84 mL apă bidistilată, amestecată cu 36 mL soluție de agent tensioactiv (20 mg/mL) (Pluronic F127 [186], CTAB sau Tween 20), și a clorurii feroase tetrahidratate (0,0275 mol) în 84 mL apă bidistilată, amestecată cu 36 mL soluție de agent tensioactiv (20 mg/mL), au fost introduse într-un balon cu trei găuri de 500 mL prevăzut cu agitator mecanic. Soluția bazică obținută prin dizolvarea a 12,8 g de hidroxid de sodiu în 120 mL apă bidistilată a fost adăugată prin picurare, cu ajutorul unei pompe peristaltice, menținând un debit constant de 10 mL/min. Reacția a fost condusă în atmosferă de azot, la o temperatură constantă, de 65 °C, timp de 30 min.

Precipitatul obținut (culoare neagră) a fost separat cu ajutorul unui magnet puternic. Purificarea precipitatului s-a realizat prin cicluri repetate de spălare-sedimentare în apă bidistilată. Materialul magnetic preparat (codificat, în funcție de surfactantul folosit astfel: MP pentru Pluronic F127, MC pentru CTAB și MT pentru Tween 20) se păstrează sub formă de suspensie concentrată, în apă bidistilată. Pentru fiecare lot de magnetită sintetizat, s-a determinat cantitatea de probă uscată din suspensie (1,5 g -1,8 g/100 mL).

III.3.2. Prepararea particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită

Particule magnetice pe bază de chitosan au fost preparate prin metoda de gelifiere ionică. Modul de lucru este descris în continuare. Într-un balon cu trei găuri, se introduc 200 mL soluție de chitosan (1 mg/mL) dizolvat în acid acetic (5 mg/mL). Suspensia de magnetită, sintetizată în prealabil, se ultrasonează timp de 5 min. Apoi o cantitate de suspensie magnetică corespunzătoare (raportul masic chitosan /magnetită 1/1) se amestecă cu 11 mL surfactant (2 mg/mL) și se ultrasonează timp de 15 min, după care se adaugă peste soluția de polimer. Reacția a fost condusă la temperatura camerei și sub agitare mecanică (viteza de rotație: 800 rot/min). Se omogenizează amestecul timp de 1 oră. După 1 oră se adaugă soluția de TPP (1 mg/mL) (raportul masic polimer/ agent de reticulare a fost de 3/1, 5/1 sau 6/1), prin picurare, cu ajutorul unei pompe peristaltice și se continuă agitarea încă 2 ore. Amestecul de reacție se păstrează la rece, până a doua zi, pentru a permite maturarea particulelor formate. Particulele magnetice pe bază de chitosan obținute (codificate, în funcție de surfactantul folosit astfel: MPCs pentru Pluronic F127, MCCs pentru CTAB și MTCs pentru Tween 20) au fost purificate prin cicluri de centrifugare/redispersie în apă bidistilată și uscate prin liofilizare.

III.3.3. Prepararea particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită

100 mg de particule magnetice pe baza de chitosan (MPCs, MCCs sau MTCs) au fost redispersate în apă bidistilată, prin procedeul de ultrasonare și adăugate într-un balon cu trei găuri. Într-un amestec de DMSO și apă (1/3, v/v) s-au dizolvat 140 mg de biotina (raport molar chitosan/biotina 1/1) activată cu EDAC (rapoarte molare biotină /EDAC 1/1, 1/1,5, 1/2, 1/2,5), la temperatura de 4 °C. După 30 min, acest amestec s-a adăugat peste particulele magnetice redispersate. Reacția a fost condusă timp de 24 ore, sub agitare mecanică lentă. Particulele magnetice biotinilate obținute (codificate în funcție de surfactantul folosit astfel: MPCsB pentru Pluronic F127, MCCs B pentru CTAB și MTCsB pentru Tween 20) au fost separate din suspensie prin centrifugare, purificate prin cicluri de centrifugare/redispersie în apă bidistilată, pentru îndepărtarea compuşilor nereacționați și uscate prin liofilizare.

III.3.4. Prepararea particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG și magnetită

Particulele magnetice pe bază de polimer sintetic (PSI-b-PEG) au fost preparate în cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară Petru Poni, Iași prin procedeul policondensării *in situ*. Reacția a fost condusă în două etape: într-o primă etapă a fost sintetizat precursorul, poli(succinimidă) (PSI), prin metoda policondensării acidului aspartic în dodecan, în prezența catalizatorului acid o-fosforic, iar în a doua etapă a sintezei PSI a fost supusă procedeului de policondensare cu PEG 4000, în prezența magnetitei sintetizată anterior prin metoda co-precipitării sărurilor de fier în mediu bazic.

S-au preparat două loturi de particule magnetice pe bază de polimer sintetic cu compoziții diferite în magnetită : lotul codificat MPP₅ care conține teoretic 5% magnetită și lotul codificat MPP₁₁ care conține teoretic 11% magnetită.

Metoda de preparare a particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG este descrisă în continuare. Astfel, 200 mg de particule magnetice (MPP₅ și MPP₁₁) au fost redispersate în apă bidistilată, prin procedeul de ultrasonare. Suspensia magnetică obținută a fost introdusă într-un balon cu trei găuri. Cantitatea de biotină (raport masic polimer sintetic/biotină 5/1) dizolvată în 200 mL apă bidistilată a fost activată cu EDAC (raport molar biotină/EDAC de 1/1,5) la temperatura de 4 °C. După 30 min, acest amestec s-a adăugat peste suspensia magnetică. Reacția a fost condusă timp de 24 ore, sub agitare mecanică lentă. Particulele biotinilate obținute (codificate MPP₅B pentru lotul care conține teoretic 5 % magnetită și respectiv MPP₁₁B pentru lotul care conține teoretic 11 % magnetită) au fost separate prin centrifugare, purificate prin cicluri de centrifugare/redispersie în apă bidistilată, pentru îndepărtarea produşilor intermediari de reacție și uscate prin liofilizare.

III.3.5. Prepararea particulelor magnetice funcționalizate cu streptavidină (SA)

Imobilizarea SA pe particulele magnetice biotinilate s-a realizat valorificând principiul interacțiunilor biologice de mare afinitate de tip ligand-receptor. Prepararea particulelor magnetice funcționalizate este descrisă în continuare. Astfel, 10 mg particule biotinilate au fost dispersate în 10 mL soluție tampon fosfat (0,05 M, pH = 7,4) pe baie de ultrasonare, timp de 15 min, după care s-a adăugat 10 mL soluție SA (0,1 mg/mL în același tampon fosfat). Reacția a fost condusă timp de 3 ore, sub agitare lentă. În paralel s-a pregătit și o probă martor astfel: 10 mg particule biotinilate au fost dispersate în 10 mL soluție tampon fosfat peste care s-a adăugat doar 10 mL soluție tampon fosfat. Particulele magnetice funcționalizate (codificate în funcție de surfactantul folosit în prepararea particulelor pe bază de chitosan astfel: MPCsB-SA pentru Pluronic F127, MCCsB-SA pentru CTAB și MTCsB-SA pentru Tween 20 și respectiv MPP₅B-SA pentru particulele magnetice pe bază de PSI-b-PEG care conțin 5 % magnetită) au fost separate din supernatant prin centrifugare și purificate prin cicluri de centrifugare/redispersie în apă bidistilată și uscate prin liofilizare. Cantitatea de streptavidină imobilizată pe particule a fost determinată prin spectroscopie UV-VIS.

III.3.6. Testarea *in vitro* a eficienței de captare a unei toxine model pe particulele magnetice funcționalizate

Testarea *in vitro* a eficienței de captare a particulelor magnetice funcționalizate s-a realizat folosind o toxină model, și anume peroxidaza din hrean (HRP). Modul de lucru este descris în continuare. Astfel, 4 mg particule magnetice funcționalizate au fost dispersate în 16 mL soluție tampon fosfat (0,05 M, pH = 7,4). Suspensia obținută a fost incubată cu 10 mL soluție de HRP (0,375 mg/mL), timp de 2 ore, sub agitare lentă. Complexul particulă-toxină format a fost separat din supernatant prin centrifugare, purificat prin cicluri de centrifugare/redispersie în apă bidistilată și uscat prin liofilizare. Eficiența de legare a toxinei pe particulele funcționalizate a fost determinată prin spectroscopie UV-VIS.

CAPITOLUL IV

PARTICULE MAGNETICE BIOTINILATE PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI MAGNETITĂ

Din clasa polizaharidelor studiate ca materiale de acoperire-modificare a particulelor magnetice cu aplicații biomedicale, se remarcă chitosanul datorită numeroaselor avantaje precum prezența grupelor funcționale ce permit derivatizări ulterioare în funcție de aplicația vizată, proprietățile biologice excelente, ușurința formulării acestuia ca sisteme particulate și costul relativ scăzut al acestui polimer [104]. Procesul de biotinilare al particulelor pe bază de chitosan și magnetită prezintă numeroase avantaje furnizate de tehnologia biotină/receptor tip avidină, care se referă atât la stabilitatea legăturilor ulterioare cu receptorul pentru toxină (reprezentat în cadrul acestui studiu de streptavidină) cât și la numărul mare de compuși ce pot fi recunoscuți și captați ulterior de acest receptor [177].

Acest capitol este dedicat prezentării rezultatelor obținute în prepararea și caracterizarea particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită. Cele trei etape care au stat la baza preparării particulelor magnetice biotinilate ce conțin chitosan și magnetită sunt prezentate schematic în Figura 38 și descrise în continuare.

IV.1. Prepararea materialului magnetic (magnetită)

În cadrul acestui studiu materialul magnetic selectat a fost reprezentat de magnetită datorită proprietăților magnetice excelente și a biocompatibilității deja demonstrate [187]. Materialul magnetic a fost obținut prin metoda Massart care constă în co-precipitarea în mediu bazic a soluțiilor apoase de săruri de Fe^{2+} și Fe^{3+} .

Dezavantajul principal al metodei de co-precipitare constă în necesitatea controlului atent a valorii pH-ului atât în etapa de sinteză a materialului magnetic cât și în cea de purificare, etapa critică a acestui proces. Acest dezavantaj demonstrează că precipitarea simplă nu este aplicabilă deoarece în această etapă particulele cresc în dimensiune și se asociază pentru a micșora energia liberă superficială totală [192]. Datorită interacțiunilor hidrofobe dintre particule, acestea au tendința de a se aglomera în agregate cu dimensiuni mari. Agregatele formate interacționează prin atracții magnetice puternice de tip dipol-dipol. Când două agregate de dimensiuni mari vin în contact, fiecare intră sub acțiunea câmpului magnetic al celuilalt, ceea ce conduce la creșterea magnetizării și implicit a tendinței de agregare. Mai mult, particulele au tendința de a flocula datorită forțelor van der Waals. Toți acești factori conduc la concluzia că de cele mai multe ori modificarea suprafeței este indispensabilă [193], motiv pentru care s-a optat pentru utilizarea unor agenți tensioactivi în procesul de sinteză a magnetitei. Adăugarea unui surfactant are rolul de a asigura particulelor

magnetice stabilitate coloidală sterică sau electrostatică [194, 195] cu scopul de a preveni formarea de agregate care influențează negativ proprietățile magnetice.

Pentru stabilizarea suspensiei magnetice s-au folosit trei agenți tensioactivi, și anume: Pluronic F127, CTAB și Tween 20.

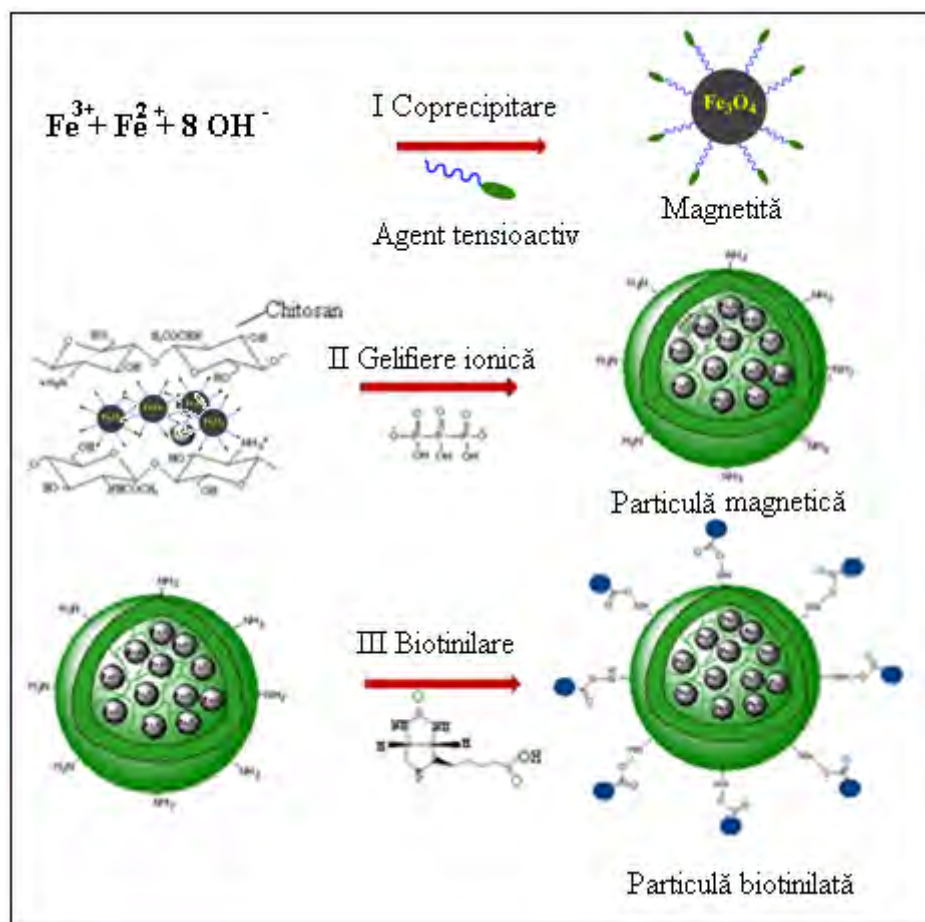


Figura 38. Etapele obținerii particulelor magnetice biotinizate pe bază de chitosan și magnetită.

IV.2. Caracterizarea materialului magnetic

IV.2.1. Difracția cu raze X (XRD)

Materialele magnetice preparate (MP, MC, MT) au fost analizate prin difracție cu raze X cu scopul de a identifica tipul de material magnetic care s-a format, structura sa cristalografică precum și dimensiunea cristalelor formate. Difractogramele XRD a materialelor magnetice sintetizate sunt prezentate în Figura 42. Cele 3 tipuri de particule prezintă unghiurile de difracție 2θ caracteristice pentru magnetită, și anume: $30,3^\circ$; $35,6^\circ$; $43,4^\circ$; $53,5^\circ$; $57,4^\circ$ și $62,8^\circ$ unghiuri care pot fi indexate planurilor (220), (311), (400), (422), (511), și (440) aparținând unei celule cubice. Difractogramele obținute corespund cu

difractograma magnetitei standard raportată de Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). Aria largă delimitată de unghiuri indică faptul că cristalele de magnetită formate au dimensiuni mici [202], în timp ce intensitatea unghiului de difracție maxim confirmă existența unei singure faze pure de magnetită [203]. Analiza XRD confirmă că materialele magnetice preparate sunt reprezentate de cristale de magnetită pură cu structură cristalină.

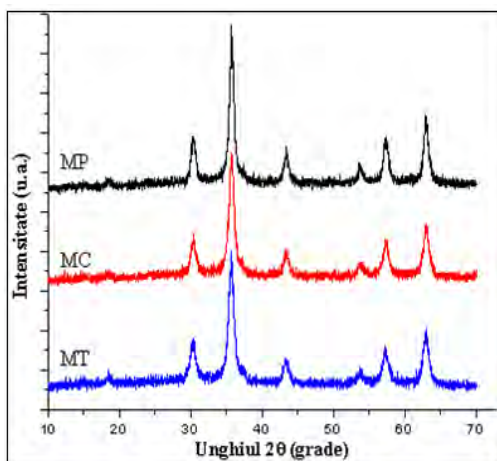


Figura 42. Difractogramele XRD ale loturilor de magnetită.

Plecând de la ipoteza ca toate cristalele obținute au forma sferică și folosind ecuația lui Scherer (1)

$$L = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

unde L reprezintă dimensiunea medie a cristalelor, λ -lungimea de undă a radiației X (0,154 nm), k este constanta corelată cu forma cristalelor și este egală cu unitatea, β este măsurat experimental și reprezintă lățimea (banda) la jumătatea înălțimii (exprimat în radiani), θ -este unghiul de 35,6 °, datele XRD au permis determinarea dimensiunii medii a unui cristal individual de magnetită.

Dimensiunea medie a cristalelor de magnetită calculată pentru fiecare lot sintetizat este de 11,64 nm pentru MP; 8,72 nm pentru MC și, respectiv, 11,63 nm pentru MT.

IV.2.2. Microscopie electronică de transmisie (TEM)

Morfologia particulelor de magnetită (lotul MP) a fost prin studiată prin tehnica TEM (Figura 43). Se constată că particulele de magnetită sunt relativ bine dispersate iar forma acestora este cvasisferică. Tehnica TEM a fost utilizată și pentru a determina dimensiunea aproximativă a unei particule de magnetită; astfel imaginea indică o dimensiune de ordinul a 10 nm. Aceste rezultate sunt în corelație cu dimensiunile particulelor de magnetită calculate din datele XRD.

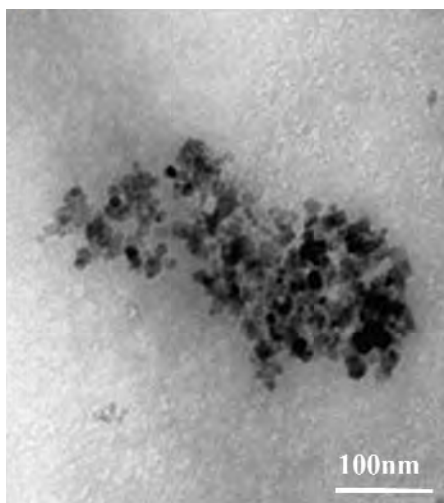


Figura 43. Imagine TEM a lotului de magnetită MP.

IV.2.3. Determinarea dimensiunii medii și a potențialului Zeta pentru suspensiile magnetice

Loturile de magnetită preparate sunt păstrate sub formă de suspensii coloidale în apă, cunoscute și sub numele de ferrofluide. Aceste ferrofluide au fost analizate din punct de vedere al dimensiunilor și a potențialului Zeta (Figura 44). Dimensiunea loturilor de magnetită determinată prin tehnica DLS (164,8 nm pentru MP, 180 nm pentru MC și respectiv 163 nm pentru MT) este mult mai mare decât cea determinată prin tehnicile XRD și TEM. Această diferență de dimensiune este datorată faptului că, particulele de magnetită dispersate în apă favorizează asocierea mai multor particule cu formarea de agregate care duc la creșterea semnificativă a dimensiunii măsurate [205].

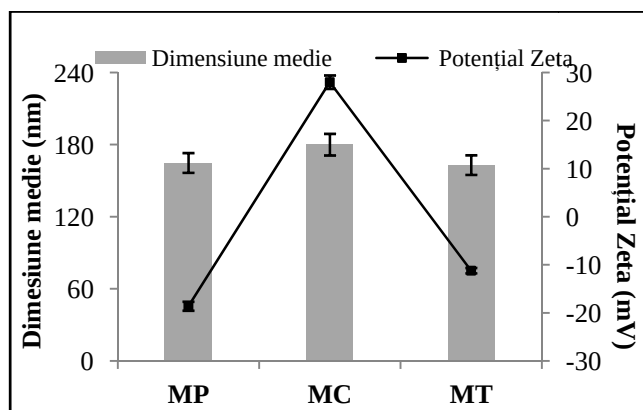


Figura 44. Dimensiunea medie și potențialul Zeta a loturilor de magnetită.

Potențialul Zeta (Figura 44) are valori negative pentru loturile de magnetită stabilizate prin adăugarea de surfactanți neionici (Pluronic F127 și Tween 20) și pozitive în cazul

surfactantului cationic (CTAB). Valorile obținute confirmă faptul că în soluții apoase, lanțurile hidrofobe ale surfactanților folosiți sunt dispuse pe suprafața nanoparticulelor de magnetită iar lanțurile lor hidrofile rămân la exterior, conferă stabilitate sterică particulelor și imprimă caracterul negativ, respectiv pozitiv al potențialului Zeta, în funcție de natura grupărilor lor hidrofile.

IV.2.4. Analiza elementală

Pentru a confirma prezența surfactanților pe suprafața particulelor de magnetită, pentru toate loturile de magnetită s-a determinat conținutul lor în carbon (C). Calculând conținutul teoretic în C al surfactanților puri corelat cu conținutul în C al loturilor de magnetită (care poate proveni doar din structura surfactanților) și conținutul în reziduu se poate concluziona că particulele de magnetită conțin aproximativ 10-15 % surfactant și 85-90 % magnetită (Tabelul 7).

Tabelul 7. Date de analiză elementală a loturilor de magnetită

Tip de magnetită	Conținut C (%)	Conținut Reziduu (%)
MP	11,20	84,90
MC	10,70	88,20
MT	9,30	90,10

IV.2.6. Determinarea proprietăților magnetice

Proprietățile magnetice au fost determinate prin măsurarea magnetizării de saturație și al coercitivității, cu scopul de a stabili dacă particulele de magnetită sintetizate prezintă comportament superparamagnetic, precum și magnetizare adecvată aplicațiilor ulterioare.

Curbele de magnetizare înregistrate descriu comportarea materialelor în câmp magnetic și redau valoarea magnetizării de saturație (M , emu/g) în raport cu intensitatea câmpului magnetic aplicat (Figura 46).

Magnetizarea acestor materiale a crescut direct proporțional cu intensitatea câmpului magnetic aplicat, până când s-a atins valoarea magnetizării de saturație (magnetizarea maximă a materialului studiat). Valorile magnetizării de saturație pentru materialele analizate au fost 55,66 emu/g pentru MC; 56,91 emu/g pentru MT și 69,34 emu/g pentru MT. De asemenea, din analiza curbelor de magnetizare se constată că materialele analizate nu prezintă magnetizare remanentă și nu sunt caracterizate de histerezis. Lipsa histerezisului reprezintă una din caracteristicile esențiale necesare identificării unui material cu comportare superparamagnetică [207].

Superparamagnetismul este o proprietate caracteristică materialelor nanostructurate și se referă la capacitatea acestora de a răspunde în câmp magnetic fără a reține magnetismul după îndepărtarea câmpului. Această caracteristică este extrem de importantă pentru aplicațiile biomedicale ale acestor materiale deoarece dacă ar prezenta magnetizare remanentă, aceasta ar favoriza aglomerarea particulelor în mediul sangvin și ocluzia capilarelor.

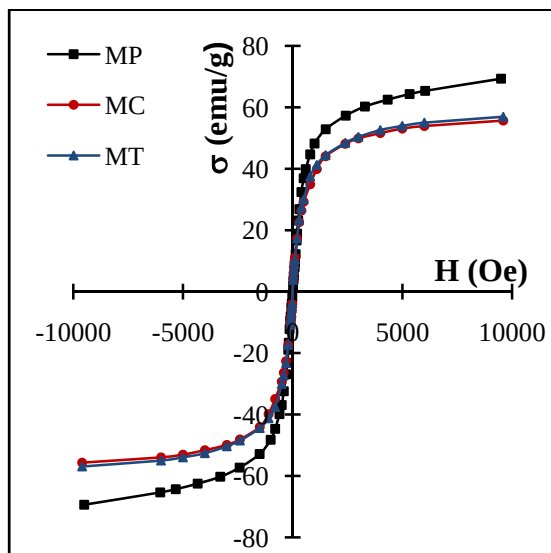


Figura 46. Curbele de magnetizare pentru loturile de magnetită

Comportarea superparamagnetică este dependentă de dimensiunea particulelor și este caracteristică particulelor cu dimensiuni mai mici de 20 nm. Aceste rezultate confirmă existența unui singur domeniu [208] în materialele magnetice preparate și sunt corelate cu dimensiunile materialelor magnetice determinate prin tehnicile XRD și TEM.

IV.3. Prepararea particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită

Chitosanul, un polimer natural cu grupe funcționale, este un candidat ideal pentru acoperirea materialelor magnetice atât datorită proprietăților sale biologice excelente (biodegradabilitate, biocompatibilitate, bioactivitate) cât și a celor chimice (polication în soluții slab acide, prezența grupărilor reactive hidroxil și aminice) [104]. În cadrul acestui studiu particulele magnetice pe bază de chitosan s-au obținut prin mecanismul de gelifiere ionică. Această metodă constă în complexarea chitosanului cationic cu compuși anionici urmată de formarea de particule sferice. Ca moleculă anionică s-a optat pentru TPP, o sare netoxică, ce conține trei grupe fosfat care determină creșterea pH-ului și a tăriei ionice a

soluției, și favorizează interacțiunile electrostatice cu grupările aminice al chitosanului [209, 210].

IV.4. Caracterizarea particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită

IV.4.1. Spectroscopie FT-IR

Particulele magnetice pe bază de chitosan preparate (MPCs, MCCs și MTCs) au fost analizate prin spectroscopie FT-IR. În Figura 48 sunt prezentate spectrele înregistrate pentru loturile de magnetită, chitosan, surfactanții utilizați și particulele magnetice pe bază de chitosan și magnetită obținute.

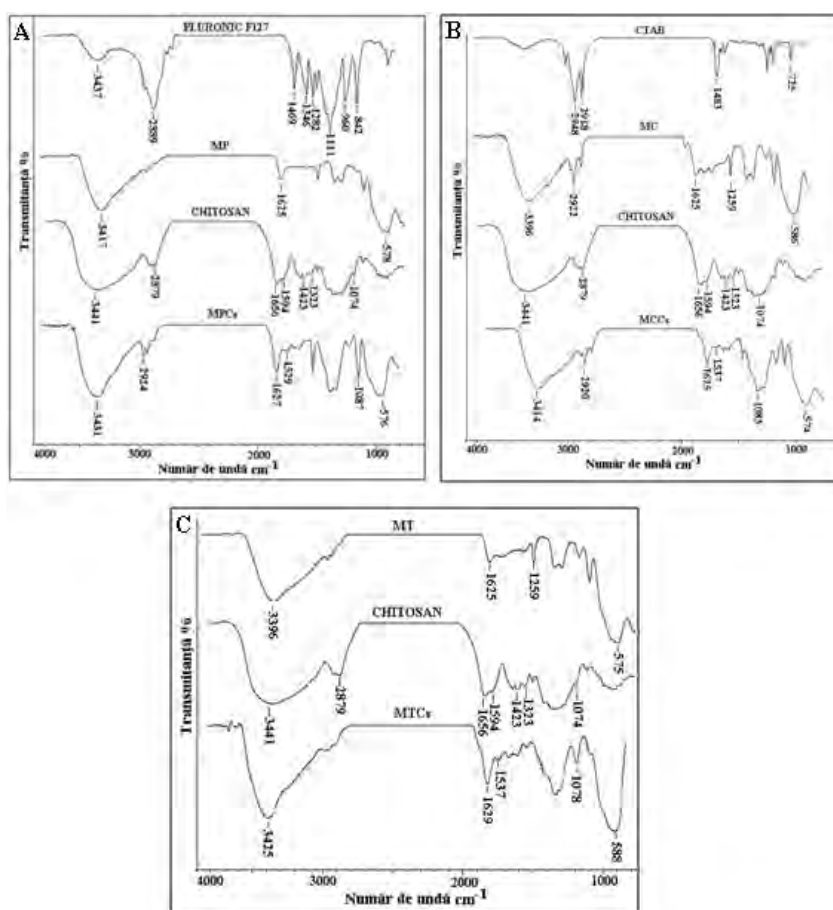


Figura 48. Spectre FTIR: A) Pluronic F127, chitosan, MP și MPCs; B) CTAB, chitosan, MC și MCCs și C) MT, chitosan și MTCs

Spectrul FTIR al chitosanului prezintă un pic larg la 3441 cm^{-1} corespunzător atât vibrațiilor de întindere a grupării (N-H) cât și grupărilor hidroxil, în timp ce picul de la 2879 cm^{-1} este atribuit grupării metilen. Benzile de la 1656 cm^{-1} și 1594 cm^{-1} sunt reprezentative pentru amida primară, respectiv amida secundară (C=O), picul de la 1423 cm^{-1} este

corespunzător deformației simetrice a grupării (C-H). La 1323 cm^{-1} se află picul caracteristic vibrației de întindere a legăturii C-N în timp ce picul de la 1074 cm^{-1} este atribuit vibrației de absorbție a grupării (C-O-C) [211, 212].

Spectrele particulelor magnetice pe bază de chitosan (Figura 48) prezintă atât benzile caracteristice ale chitosanului cât și ale magnetitei (în jurul valorii de 560 cm^{-1}) și confirmă astfel formarea compozitului magnetită-chitosan. În plus, banda de la 1656 cm^{-1} din structura chitosanului dispare din spectrele FT-IR al compozitelor și noi benzi apar la 1627 cm^{-1} și 1529 cm^{-1} (MPCs), la 1625 cm^{-1} și 1537 cm^{-1} (MCCs) și respectiv la 1629 cm^{-1} și 1537 cm^{-1} (MTCs) fenomen care poate fi atribuit legării TPP de chitosan [216]. De asemenea, în spectrele particulelor magnetice pe bază de chitosan se observă o creștere în intensitate a picului de la 3441 cm^{-1} indicând faptul că se formează noi legături de hidrogen [217].

IV.4.2. Microscopie electronică (TEM, SEM)

Particulele magnetice pe bază de chitosan, MPCs au fost vizualizate prin tehnica de microscopie electronică de transmisie (TEM) cu scopul de a evidenția morfologia particulelor de magnetită în interiorul compozitelor. Imaginea TEM (Figura 51) confirmă formarea compozitelor magnetice care conțin mai multe particule de magnetită de dimensiuni nanometrice (zonele mai închise la culoare) încorporate în matricea polimerică (zonele mai deschise la culoare sunt reprezentate de chitosan).

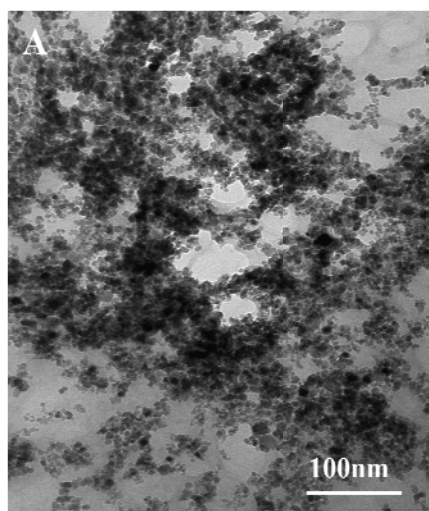


Figura 51. Imagine TEM a particulelor MPCs

Loturile MPCs și MCCs au fost vizualizate în stare hidratată, pregătirea probelor de analiză realizându-se astfel: s-au preparat suspensii diluate în apă bidistilată a celor două loturi de particule care au fost ultrasonate, timp de 30 min, după care o picătură din această suspensie s-a pus la uscat pe un suport metalic și apoi au fost vizualizate prin tehnica SEM. Imaginile obținute sunt prezentate în Figura 53.

Din analiza imaginilor SEM se constată că prin acest mod de vizualizare particulele pot fi bine individualizate și că s-au format mai multe populații de particule cu dimensiuni medii cuprinse între 200 și 400 nm [218].

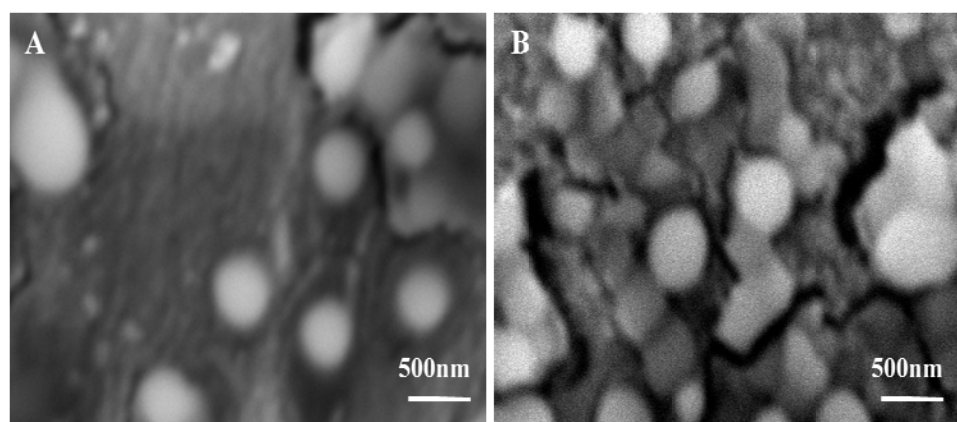


Figura 53. Imagini SEM pentru particule: A-MPCs, B-MCCs

IV.4.3. Analiza elementală

Particulele magnetice pe bază de chitosan preparate au fost analizate din punct de vedere al compoziției chimice (Tabelul 8); au fost determinate conținutul în azot (N) și carbon (C) cu scopul de a evidenția prezența compusului organic în compozitele magnetice preparate. Comparativ cu conținutul în C al magnetitei stabilizate cu surfactant, în cazul compozitelor magnetice, acesta crește, confirmând prezența chitosanului și a surfactantului în compozite.

Tabelul 8. Date de analiză elementală pentru compozitele magnetită-chitosan

Tip de compozit	Conținut N (%)	Conținut C (%)	Conținut Reziduu (%)
MPCs	1,67	27,54	56,10
MCCs	2,12	28,45	48,40
MTCs	1,87	29,36	51,20

Carbonul din compozitele magnetice provine în cea mai mare parte din structura chitosanului dar și din structura surfactanților prezenți pe suprafața nanoparticulelor de magnetită, în procent mult mai mic. Conținutul în reziduu al compozitelor este de aproximativ 50 % față de conținutul în reziduu al loturilor de magnetită care este de aproximativ 90 % și confirmă că s-au obținut cu succes compozite magnetită-chitosan. Reziduu rezultat în urma analizei elementale este datorat prezenței magnetitei dar și produșilor rezultați în urma degradării. Corelarea conținutului în azot (care poate proveni doar din grupările amino și acetamidă ale chitosanului) al acestor compozite cu conținutul

lor în reziduu, comparativ cu conținutul în reziduu al loturilor de magnetită corespunzătoare sugerează că aceste compozite conțin aproximativ 40-45 % magnetită.

IV.4.4. Difracția cu raze X (XRD)

Particulele magnetice pe bază de chitosan și magnetită preparate (MPCs, MCCs, MTCs) au fost analizate prin difracție cu raze X cu scopul de a confirma prezența materialului magnetic în interiorul compozitului și natura acestuia. Difractogramele XRD ale celor 3 compozite magnetice sunt prezentate în Figura 54.

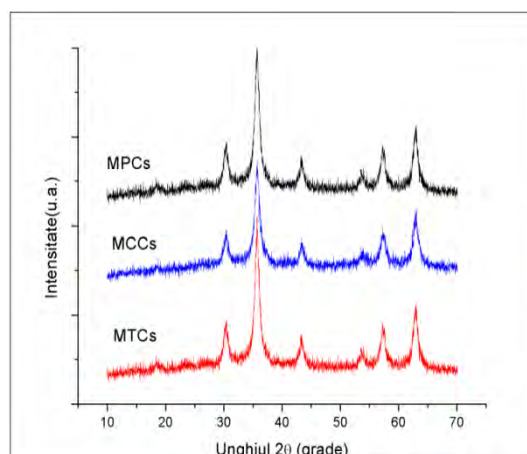


Figura 54. Difractogramele XRD ale compozitelor magnetice

Toate cele 3 probe prezintă unghiurile 2θ caracteristice pentru magnetită, și anume: $30,3^\circ$; $35,6^\circ$; $43,4^\circ$; $53,5^\circ$; $57,4^\circ$ și $62,8^\circ$ confirmând prepararea compozitelor magnetită-chitosan. Intensitatea unghiurilor compozitelor magnetice comparativ cu intensitatea unghiurilor materialelor magnetice precursoră se reduce aproape la jumătate, indicând astfel, că compozitul format conține aproximativ 40 % - 50 % magnetită. Aceste rezultate sunt în corelație cu datele de analiză elementală.

IV.5. Influența parametrilor de reacție asupra caracteristicilor particulelor magnetice pe bază de chitosan

Procesul de gelifiere ionică a chitosanului cationic cu compuși anionici este spontan dar sensibil la numeroși factori, precum masa molară a polimerului și raportul masic polimer/agent de reticulare motiv pentru care, în ultimii ani, s-au făcut numeroase studii referitoare la prepararea particulelor simple de chitosan-TPP [219, 221, 223]. Luând în considerare o parte din aspectele menționate în aceste studii, dar mai ales faptul că nu s-au găsit în literatură informații despre obținerea de particule magnetice pe bază de chitosan prin

procedeul gelifierii ionice cu TPP s-a considerat necesar efectuarea unor studii privind influența unor parametri precum masa molară a polimerului, raportul masic polimer/agent de reticulare, natura surfactantului folosit și concentrația acestuia asupra caracteristicilor particulelor magnetice cu scopul de a optimiza atât dimensiunea lor finală cât și comportamentul acestor particule în medii lichide.

IV.5.1. Influența masei molare a polimerului asupra dimensiunii particulelor

Dimensiunile particulelor obținute cu 3 loturi de chitosan cu mase molare diferite (codificate MPCs1 pentru chitosan LMW, MPCs2 pentru chitosan MMW și MPCs3 pentru chitosan HMW) sunt prezentate în Figura 58. Se poate constata că particulele cu cele mai mici dimensiuni s-au obținut utilizând chitosanul LMW [224] motiv pentru care pentru studiile ulterioare se va folosi acest lot de chitosan. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele raportate în literatura de specialitate, pentru particule chitosan-TPP simple [220].

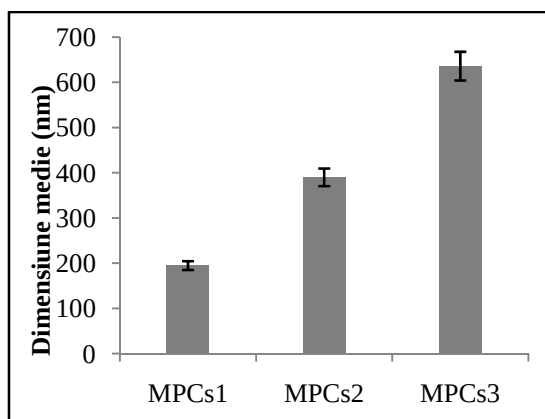


Figura 58. Influența masei molare a polimerului asupra dimensiunilor medii ale particulelor MPCs

IV.5.2. Influența concentrației de surfactant asupra caracteristicilor particulelor

Pentru a studia influența concentrației surfactantului asupra caracteristicilor compozitelor s-au utilizat 3 concentrații ale agentului tensioactiv în soluție (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL și 1 mg/mL) și s-a determinat dimensiunea medie și potențialul Zeta al particulelor [225]. Pentru toate loturile de compozite magnetice obținute (Figura 59) se constată că dimensiunea particulelor descrește pe măsură ce crește concentrația surfactantului în soluție.

În privința potențialului Zeta, se observă că acesta nu se modifică semnificativ în cazul compozitelor MCCs (Figura 59B) probabil datorită faptului că atât chitosanul cât și CTAB-ul prezintă sarcini pozitive pe suprafață, în timp ce pentru compozitele MPCs (Figura 59A), potențialul Zeta scade semnificativ concomitent cu creșterea concentrației acestui

surfactant în soluție. În cazul compozitelor MTCs (Figura 59C) nu se constată diferențe importante în valorile potențialului Zeta atunci când crește concentrația de la 0,25 mg/mL la 0,5 mg/mL dar acesta crește semnificativ la concentrația de 1 mg/mL.

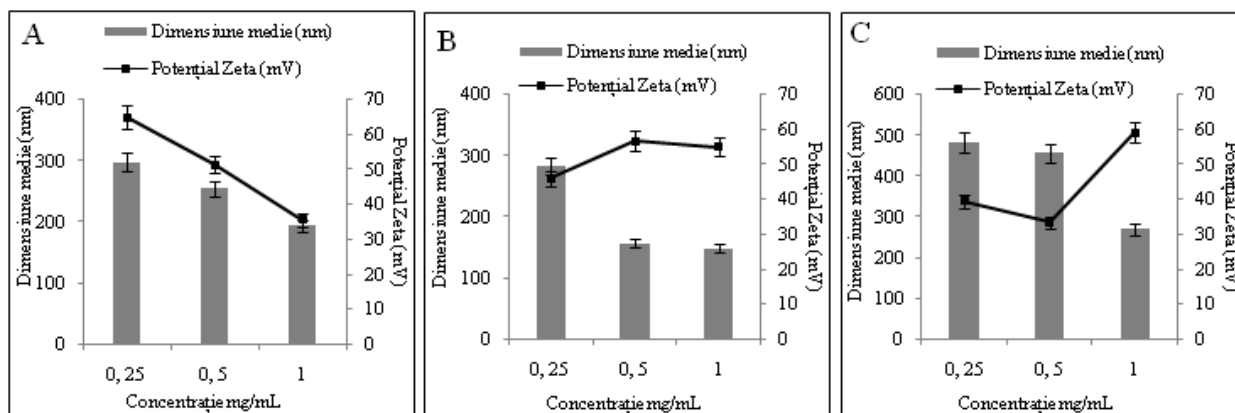


Figura 59. Influența concentrației de surfactant asupra caracteristicilor particulelor magnetice pe bază de chitosan A) MPCs; B) MCCs și C) MTCs

Referitor la modul cum poate influența natura surfactantului folosit dimensiunea particulelor, se constată că pentru toate cele trei concentrații folosite, cele mai mici dimensiuni le prezintă lotul MCCs (Figura 59B).

IV.5.3. Influența raportului masic chitosan/TPP asupra caracteristicilor particulelor

În urma studiului bibliografic efectuat în prealabil, s-au utilizat trei rapoarte masice de chitosan/agent de reticulare, și anume: 3/1 la 5/1 și 6/1, pentru fiecare surfactant în parte, și s-a determinat atât dimensiunea medie cât și potențialul Zeta al particulelor obținute în scopul selectării raportului optim chitosan/TPP care duce la formarea unor compozite magnetice cu dimensiuni adecvate aplicației vizate. Analizând rezultatele obținute (Figura 62) se poate concluziona că particulele obținute cu un raport Cs/TPP de 5/1 [229] au cele mai mici dimensiuni, motiv pentru care acest raport a fost folosit pentru studiile ulterioare. În privința potențialului Zeta, valoarea acestuia a crescut cu creșterea raportului polimer/agent de reticulare, aceste rezultate fiind în acord cu datele de literatură raportate pentru particule simple de Cs/TPP [228].

Pentru toate rapoartele Cs/TPP studiate, s-au obținut distribuții bimodale ale dimensiunii particulelor, în sensul că, pe lângă picul principal, care reprezintă dimensiunea majorității particulelor obținute, apare și un pic de intensitate mică, care reprezintă particule de dimensiuni mult mai mici care se formează deoarece loturile de chitosan comerciale sunt polidisperse [230].

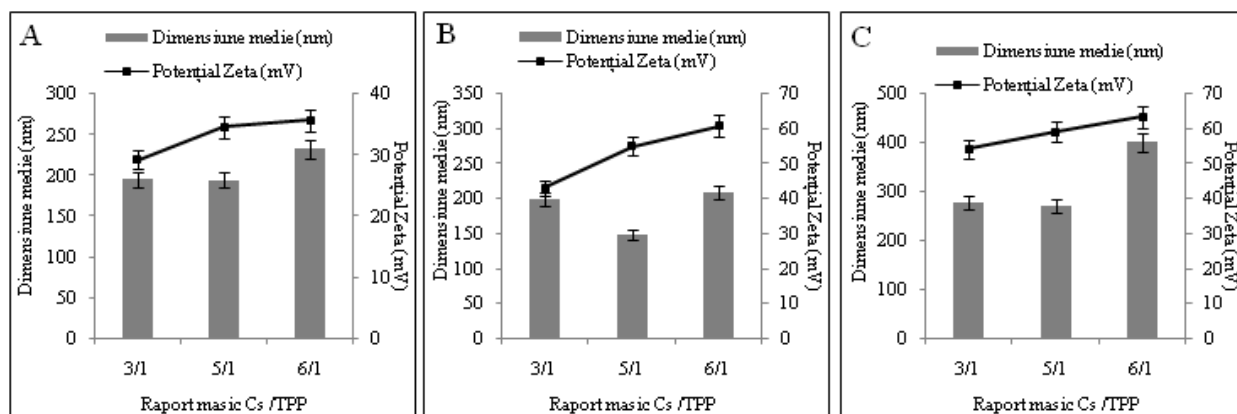


Figura 62. Influența raportului masic chitosan/TPP asupra caracteristicilor particulelor magnetice pe bază de chitosan: A) MPCs; B) MCCs și C) MTCs

IV.6. Prepararea particulelor magnetice biotinite pe bază de chitosan și magnetită

Prepararea particulelor magnetice biotinite pe bază de chitosan s-a realizat prin legarea biotinei pe suprafața particulelor prin formarea unei legături covalente amidice între gruparea amino a chitosanului și gruparea carboxil a biotinei (Figura 65). Reacția a fost activată prin intermediul unui agent de complexare, o carbodiimidă solubilă în apă, EDAC care are rolul de activator al grupării carboxil a biotinei.

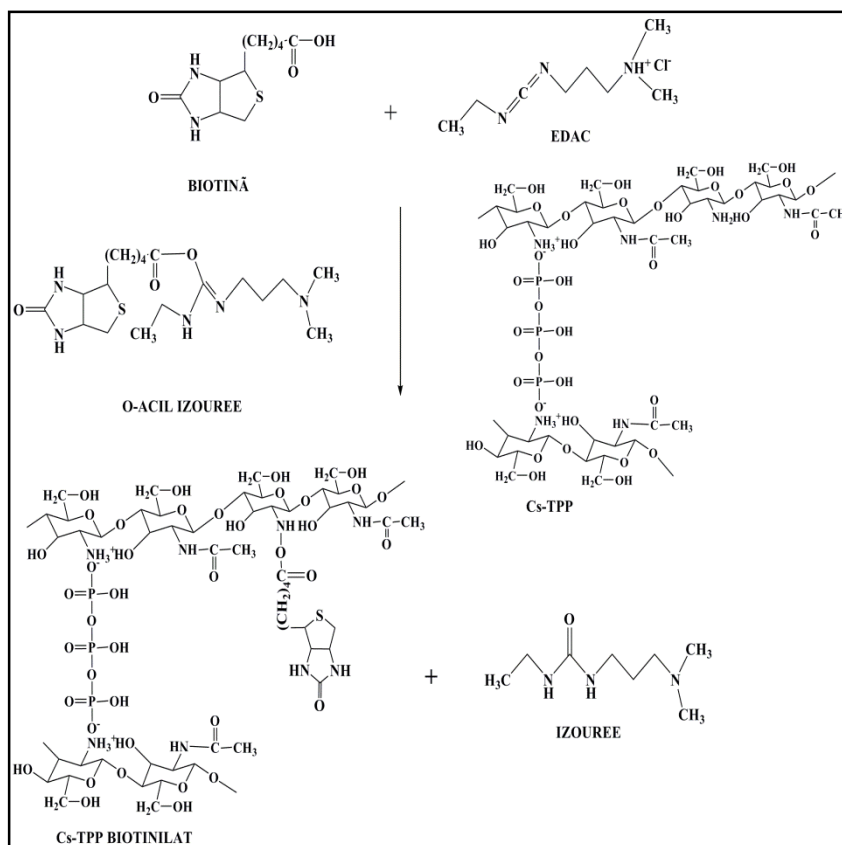


Figura 65. Mecanismul de biotinilare al chitosanului

IV.7. Caracterizarea particulelor magnetice biotinite pe bază de chitosan și magnetită

IV.7.1. Spectroscopia FT-IR

Spectrele FT-IR ale biotinei și ale particulelor biotinite sunt prezentate în Figura 66. Spectrul biotinei prezintă banda de la 3306 cm^{-1} caracteristică pentru heterociclul imidazolului [231]; picurile de la 2931 cm^{-1} și 2850 cm^{-1} corespund vibrațiilor de deformare și întindere ale grupării metilenice; banda de la 1639 cm^{-1} este caracteristică vibrației de deformare a grupării C-O; banda de la 1481 cm^{-1} este specifică vibrației de întindere a grupării COO^- iar benzile de la 1316 cm^{-1} și 1269 cm^{-1} sunt caracteristice pentru vibrațiile de deformare a legăturii C-C din structura moleculei de biotină [231]. În spectrul particulelor biotinite (Figura 66) banda de absorbție caracteristică pentru heterociclul imidazolic de la 3300 cm^{-1} se suprapune cu benzile caracteristice grupărilor hidroxil din structura chitosanului situate în aceeași zonă.

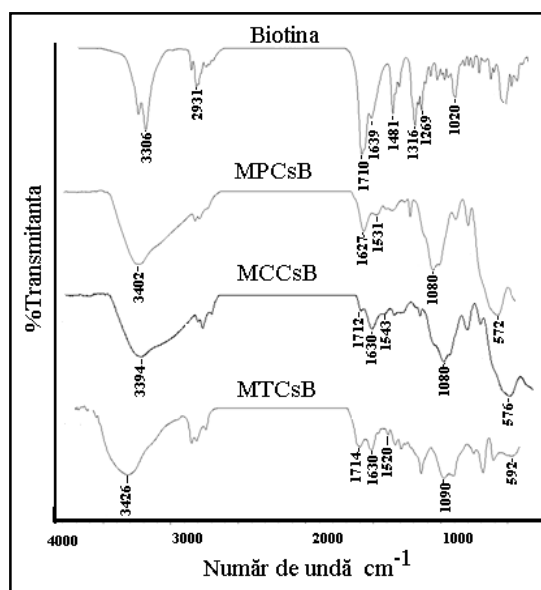


Figura 66. Spectre FT-IR ale biotinei și ale particulelor magnetice biotinite pe bază de chitosan

De asemenea, în spectrele acestor particule (MPCsB, MCCsB și MTCsB) se pot identifica două benzi specifice legăturii amidice formate între gruparea carboxil a biotinei și gruparea amino a chitosanului, la 1630 cm^{-1} și 1530 cm^{-1} . Aceste benzi sunt caracteristice vibrațiilor de întindere a grupării (C-O) și respectiv ($-\text{NH}$) și deși sunt prezente și în spectrele compozitelor magnetice pe bază de chitosan, în spectrele particulelor biotinite se constată o intensificare a acestora care indică formarea unor noi legături amidice [232]. Prezența picurilor din zona 1710 cm^{-1} poate fi datorată formării unor legături de tip ester

între gruparea carboxil a biotinei și gruparea hidroxil a chitosanului. Spectroscopia FT-IR confirmă astfel obținerea particulelor magnetice biotinilate.

IV.7. 2. Spectroscopia de rezonanță magnetică de protoni (^1H -NMR)

Tehnica de spectroscopie de rezonanță magnetică de protoni a fost utilizată pentru a confirma natura legăturilor chimice care s-au format între biotină și chitosan. În acest scop, aceeași reacție de biotinilare a fost realizată pe chitosan, păstrând aceleași condiții și parametri utilizați pentru reacția de biotinilare a particulelor magnetice: raport molar Cs/B de 1/2 și B/EDAC de 1/1,5. Spectrele ^1H -NMR ale biotinei, chitosanului și chitosanului biotinilat sunt prezentate în Figura 67.

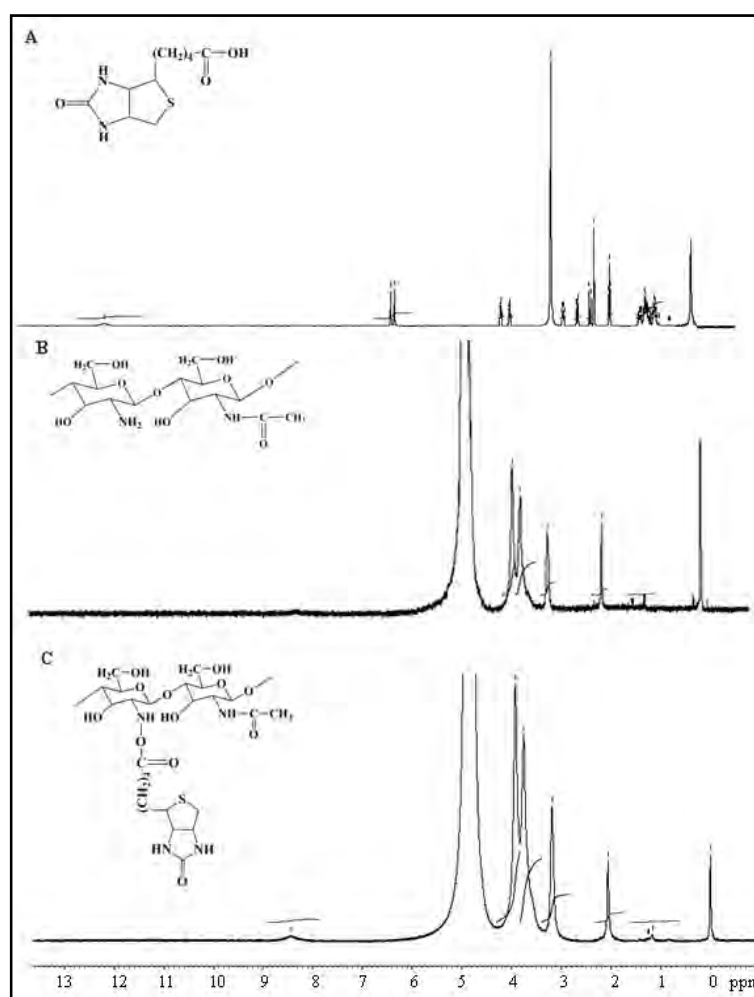


Figura 67. Spectre ^1H -NMR pentru A) chitosan, B) biotina și C) chitosan biotinilat

În spectrul ^1H -NMR a chitosanului (Figura 67B) se identifică tripletul de la 2,0-2,1 ppm care corespunde celor trei protoni ai grupării metil din N-acetil glucozamină și picul de la 3,1-3,2 ppm care reprezintă cei doi protoni ai grupării amino. Semnalele protonilor non-anomerici din structura chitosanului se pot observa în intervalul 3,5-4 ppm în timp ce

protonul iminic din gruparea acetilată apare la 4,8 ppm pentru și la 4,6 ppm pentru gruparea deacetilată [233].

Spectrul ^1H -NMR al biotinei (Figura 67A) prezintă doi protoni de tip uree (H-1, H-2 la 6,35 ppm și 6,45 ppm), doi protoni din gruparea metin (H-3, H-4 la 4,3 ppm și respectiv 4,2 ppm), protonii din grupul metilen în zona 1.4–3.2 ppm și protonul din gruparea carboxil de la 12 ppm.

În spectrul ^1H -NMR al chitosanului biotinilat (Figura 67C) se poate constata că nu apare protonul grupării hidroxil din structura biotinei de la 12 ppm indicând că biotina a reacționat cu chitosanul și în plus apare un nou pic la 8-9 ppm caracteristic protonului din legătura amidică nou formată între gruparea amino a chitosanului și gruparea carboxil a biotinei.

Spectroscopia de rezonanță magnetică de protoni (^1H -NMR) a confirmat faptul că biotina formează legături amidice cu chitosanul, atunci când reacția este condusă prin intermediul unei carbodiimide solubile în apă, dar nu prezintă dovezi ale formării și a unor legături esterice.

IV.7.4. Determinarea dimensiunii medii și a potențialului Zeta pentru particulele biotinilate

Pentru biotinilare s-au selectat loturile MPCs, MCCs și, respectiv, MTCs preparate în condiții de raport masic Cs/TPP de 5/1 și concentrație de surfactant în soluție de 1 mg/mL. Reacția de biotinilare a fost condusă, într-o primă etapă în condiții de raport molar Cs/B de 1/2 și raport molar B/EDAC 1/1,5. Dimensiunea medie și potențialul Zeta al particulelor biotinilate sunt prezentate în Figura 68.

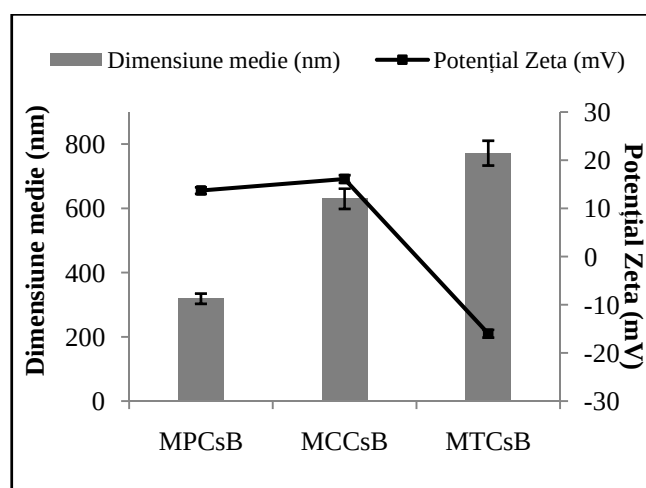


Figura 68. Dimensiunile particulelor biotinilate și potențialul Zeta (raport molar Cs/B 1/2, raport molar B/EDAC 1/1,5)

Din analiza rezultatelor obținute se constată că procesul de biotinilare determină creșterea dimensiunii medii a particulelor. Această creștere se manifestă diferit pentru fiecare tip de tensioactiv utilizat la prepararea particulelor. Explicația acestui fapt poate fi atribuită atât legării biotinei dar și capacității diferite a fiecărui surfactant folosit de a asigura stabilitatea coloidală a particulelor înainte de biotinilare. În plus, dimensiunile medii ale particulelor determinate prin tehnica DLS sunt calculate ca o medie între particulele cu dimensiuni diferite, motiv pentru care de multe ori această valoare poate fi mai mare decât cea reală. Acest fapt este confirmat de valorile indicelui de polidispersitate al particulelor magnetice pe bază de chitosan: 0,51 pentru lotul MPCsB; 0,49 pentru lotul MCCsB și respectiv 0,36 pentru lotul MTCsB, valori ce indică existența a mai multor populații de particule.

Referitor la valorile potențialului Zeta, după biotinilare acestea scad semnificativ, până la valori negative în cazul particulelor MTCsB, confirmând astfel că o parte din grupările amino sunt implicate în legarea biotinei.

IV.7. 5. Microscopie electronică (TEM, SEM)

Morfologia particulelor biotinite (MCsPB) a fost studiată prin tehnici de microscopie. Imaginea TEM (Figura 69A) sugerează că procesul de biotinilare determină o compactare a chitosanului pe suprafața magnetitei și confirmă prezența materialului magnetic în interiorul particulelor biotinite. Din imaginile SEM ale particulelor biotinite (Figura 69B) se poate constata o tendință scăzută de aglomerare a particulelor MPCsB, acestea putând fi vizualizate ca particule bine delimitate [235]. Procesul de biotinilare nu modifică morfologia particulelor iar dimensiunile particulelor MPCsB, approximate din tehnicile de microscopie electronică sunt în corelație cu cele determinate prin tehnica DLS.

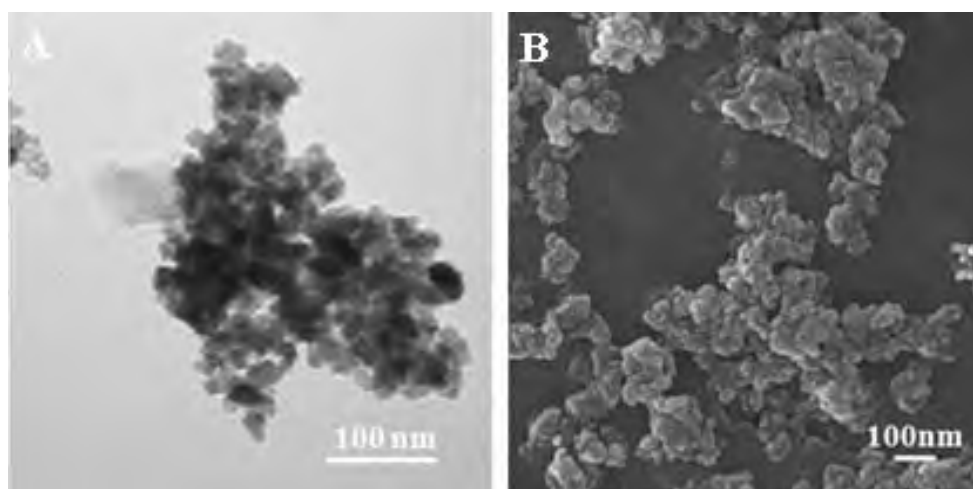


Figura 69. Imagini TEM (A) și SEM (B) ale particulelor biotinite (MPCsB)

IV.7. 6. Determinarea proprietăților magnetice

Proprietățile magnetice au fost determinate prin măsurarea magnetizării de saturație și a coercitivității. Curbele de magnetizare înregistrate pentru particulele biotinite sunt prezentate în Figura 70. Pentru comparație sunt prezentate și curbele de magnetizare ale loturilor de magnetită și ale particulele magnetice pe baza de chitosan înainte de biotinilare.

Valorile magnetizării de saturație pentru materialele studiate au fost: 69,34 emu/g, 43,65 emu/g și 48.11 emu/g pentru MP, MPCs și respectiv MPCsB (Figura 70A); 55,66 emu/g, 19,03 emu/g și 21.65 emu/g pentru MC, MCCs și respectiv MCCsB (Figura 70B) și 56,91 emu/g; 15,97 emu/g și 21,99 emu/g pentru MT, MTCs și respectiv MTCsB (Figura 70C). Deoarece pentru determinările proprietăților magnetice s-au folosit aceleași cantități de materiale, scăderea magnetizării de saturație se poate explica în primul rând prin diferența de dimensiune a materialelor analizate. În al doilea rând această scădere confirmă prezența stratului de chitosan pe suprafața magnetitei. Aceste rezultate sunt corelate cu datele de analiză elementală și difractogramele XRD.

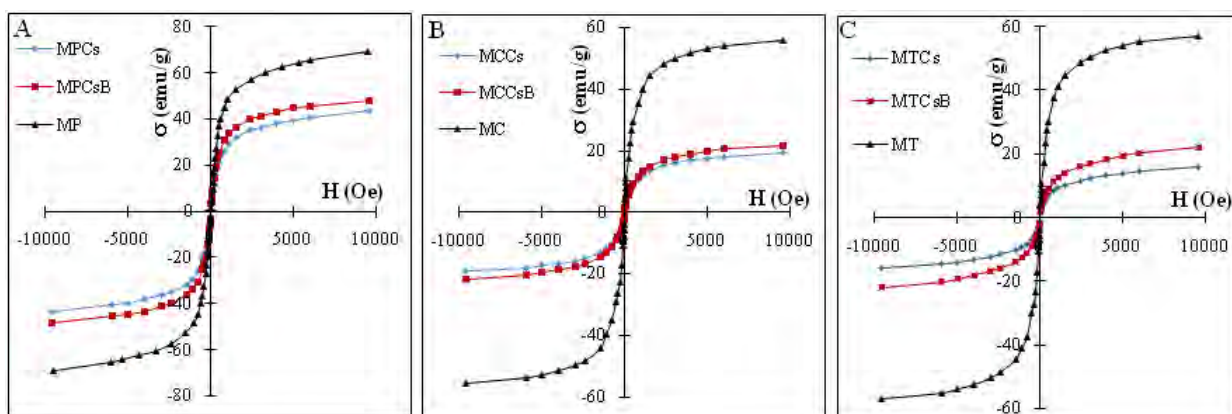


Figura 70. Curbe de magnetizare pentru particulele obținute cu A) Pluronic F127, B) CTAB, C) Tween 20

Analizând curbele de magnetizare se constată că particulele biotinite nu prezintă magnetizare remanentă și nu sunt caracterizate de histerezis. Aceste rezultate confirmă că particulele biotinite prezintă comportare superparamagnetică [236]. Comparând magnetizarea de saturație a particulelor înainte și după biotinilare se observă o ușoară creștere a magnetizării de saturație a particulelor biotinite pentru toate cele probe analizate care poate fi pusă pe seama proprietăților diamagnetice ale biotinei și a distribuției acesteia pe suprafața particulelor [237].

Particulele magnetice biotinite obținute prezintă magnetizare de saturație adecvată dar și comportament superparamagnetic, proprietăți care le recomandă pentru aplicații biologice de separare magnetică.

IV.9. Determinarea conținutului de biotină prin tehnica HABA-Avidină

Conținutul de biotină a fost determinat prin tehnica HABA-Avidină pentru toate loturile de particule biotinilate, preparate în diferite condiții de raport molar Cs/B și respectiv raport molar B/EDAC și este prezentat în tabelul 10.

Din analiza datelor obținute se poate constata că cel mai mare grad de biotinilare prezintă loturile de particule biotinilate preparate cu un raport molar teoretic de Cs/B de 1/2 și respectiv B/EDAC de 1/1,5. De asemenea, se constată că gradul de biotinilare al celor trei tipuri de particule are valori comparabile și este cuprins între 238×10^3 mmoli/g particulă și 297×10^3 mmoli/g particulă.

Tabelul 10. Gradul de biotinilare a loturilor de particule biotinilate obținute

Particulă biotinilată	Raport molar Cs/B	Raport molar B/EDAC	Conținut biotină $10^3 \times$ (mmoli/g particulă)
MPCsB	1/1	1/1,5	34
MPCsB	1/1,5	1/1,5	121
MPCsB	1/2	1/1,5	297
MPCsB	1/1,5	1/2	142
MPCsB	1/1,5	1/ 2,5	106
MPCsB	1/1,5	1/1	72
MCCsB	1/1	1/1,5	164
MCCsB	1/1,5	1/1,5	142
MCCsB	1/2	1/1,5	265
MCCsB	1/1,5	1/1	75
MCCsB	1/1,5	1/2	186
MCCsB	1/1,5	1/ 2,5	159
MTCsB	1/1	1/1,5	154
MTCsB	1/1,5	1/1,5	177
MTCsB	1/2	1/1,5	238
MTCsB	1/1,5	1/1	186
MTCsB	1/1,5	1/2	225
MTCsB	1/1,5	1/2,5	46

IV.10. Teste de redispersie a particulelor biotinite în medii de interes biologic

Aplicația acestor particule magnetice în mediul sangvin este sub formă de suspensii injectabile, motiv pentru care se impune realizarea de teste de redispersii a acestor particule în medii adecvate aplicației. Două dintre mediile selectate au fost reprezentate de soluția de glucoză (10 % wt) și serul fiziologic (0,9 % NaCl wt), ținând cont de faptul că acestea se folosesc în domeniul medical ca soluții injectabile. Celelalte medii au fost reprezentate de trei soluții tampon: două cu pH slab bazic și una cu pH slab acid: Tris pH = 7,4, tampon fosfat pH = 7,4 și respectiv tampon fosfat pH = 5 (Rezultatele obținute pentru aceste medii nu sunt prezentate în acest rezumat). Pentru toate loturile de particule biotinite s-au determinat dimensiunea și potențialul Zeta, caracteristici care pot furniza informații privind comportamentul acestor particule în mediul sangvin.

Din analiza rezultatelor obținute pentru loturile redispersate în soluție de glucoză 10% (Figurile 82, 83) se poate observa că dimensiunile particulelor variază în limite cuprinse între 1 μm și 4 μm , în timp ce potențialul Zeta are valori preponderent negative. Trebuie remarcat faptul că atât dimensiunea (cuprinsă între 1-2 μm) cât și potențialul Zeta (cuprinse între -10 mV și -2 mV) ale celor 3 loturi cu cel mai mare grad de biotinitare (MPCsB, MCCsB și MTCsB) preparate la un raport molar Cs/ B de 1/2 și raport molar B/EDAC de 1/1,5) au valori adecvate aplicației în mediul sangvin. În ser fiziologic (Figurile 84, 85) particulele biotinite analizate prezintă dimensiuni cuprinse între 1 μm și 3 μm și valori ale potențialului Zeta care variază într-un domeniu mic de la -10 mV la 5 mV.

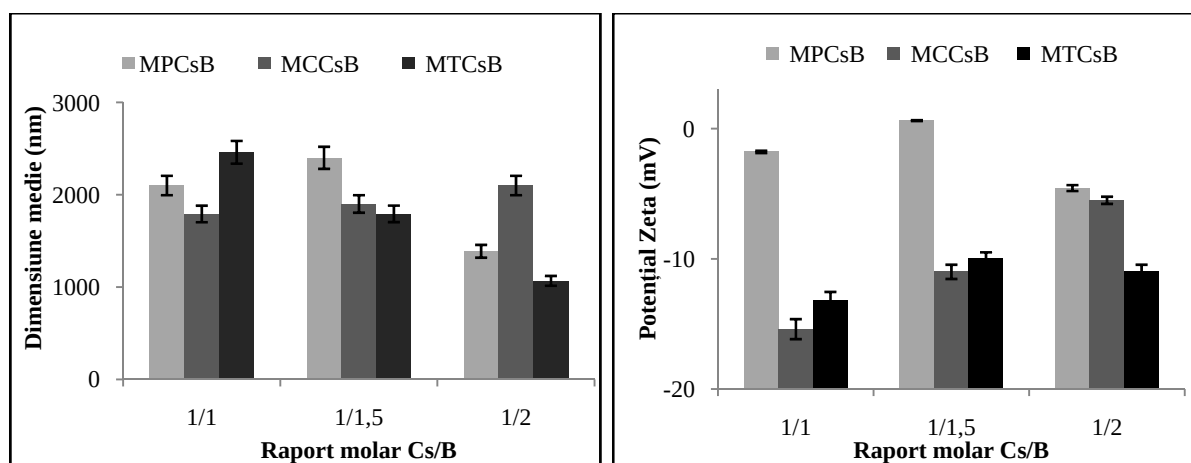


Figura 82. Dimensiunile medii și potențialul Zeta pentru particulele biotinite (raport molar Cs/B diferit) redispersate în soluție de glucoză 10 %

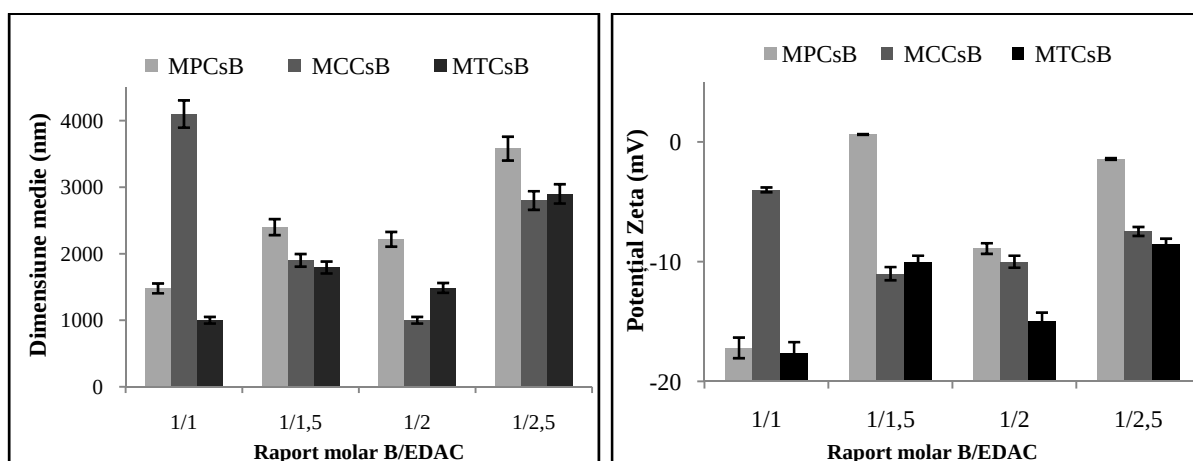


Figura 83. Dimensiunile medii și potențialul Zeta pentru particulele biotinizate (raport molar B/EDAC diferit) redispersate în soluție de glucoză 10 %

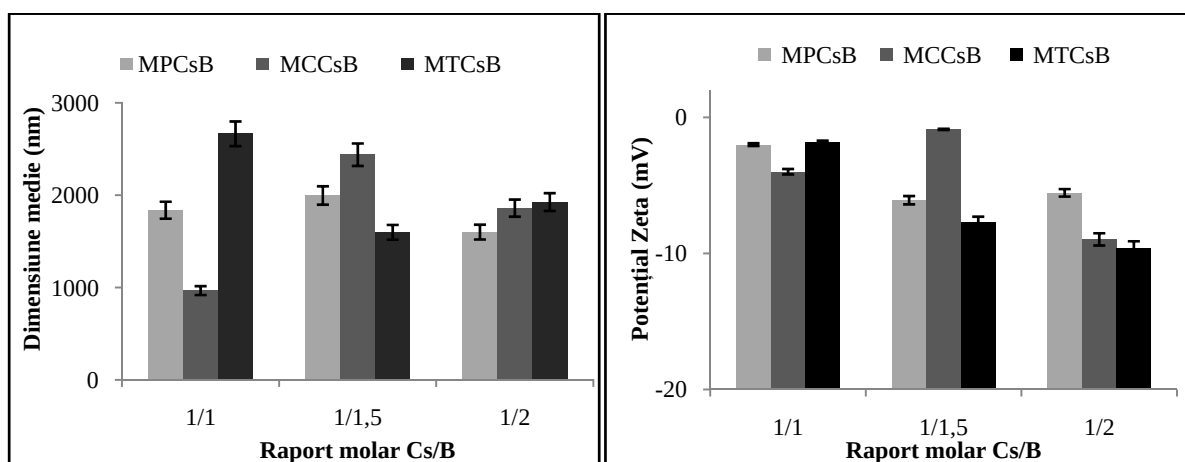


Figura 84. Dimensiunile medii și potențialul Zeta pentru particulele biotinizate (raport molar Cs/B diferit) redispersate în ser fiziologic

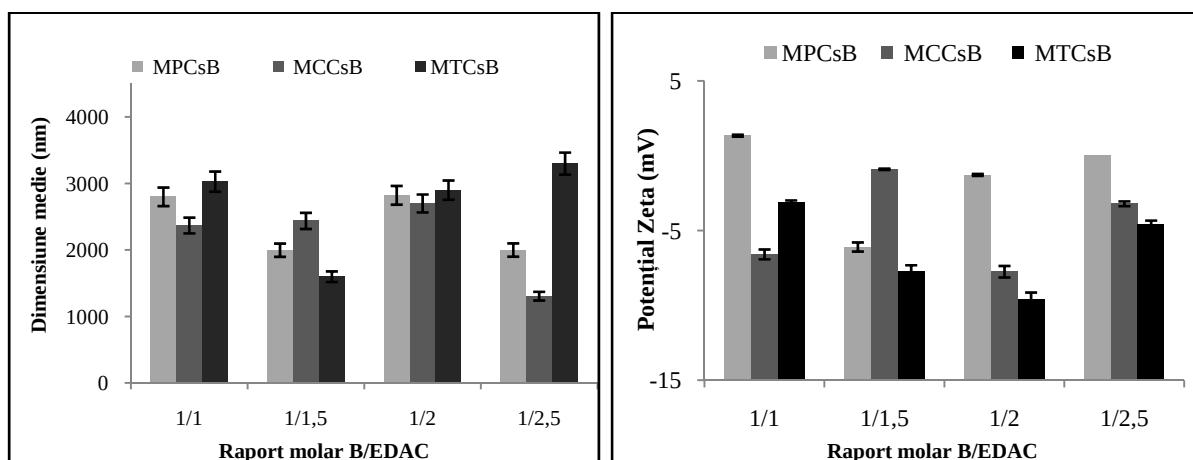


Figura 85. Dimensiunile medii și potențialul Zeta pentru particulele biotinizate (raport molar B/EDAC diferit) redispersate în ser fiziologic

Ca o remarcă suplimentară se constată că și în ser fiziologic cele 3 loturi cu cel mai mare grad de biotinilare prezintă dimensiuni și valori ale potențialului Zeta adecvate aplicației în mediul sangvin.

Din punct de vedere al dimensiunii și sarcinii de suprafață necesare pentru aplicațiile ulterioare ale particulelor biotinite în mediul sangvin, loturile cu cel mai mare grad de biotinilare prezintă caracteristici comparabile și adecvate injectării, sugerând că procesul de biotinilare poate influența pozitiv stabilitatea particulelor magnetice în mediul sangvin.

IV.11. Evaluarea caracteristicilor biologice ale particulelor biotinite

IV.11.1. Evaluarea *in vitro* a hemocompatibilității particulelor biotinite

O caracteristică esențială a particulelor magnetice cu aplicații în tehnica de detoxifiere sangvină este hemocompatibilitatea. Gorbet sugerează că hemocompatibilitatea se referă în primul rând la răspunsul trombogen indus de material sau dispozitiv când acesta este în contact cu sângele, răspuns care include o serie de reacții imediate ale sângelui reprezentate de formarea de trombi sau cheaguri care conduc, în final, la activarea mecanismului de coagulare al sângelui [38].

Pentru a studia efectele particulelor biotinite în contact cu sângele, s-au realizat teste clinice convenționale de coagulare care au constatat în măsurarea timpului de protrombină (TP), a indicelui de protrombină (IP) și a indicelui normalizat internațional (INI). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 11.

TP reprezintă timpul de declanșare a procesului de coagulare, exprimat prin formarea trombului în urma contactului sângelui cu particulele magnetice biotinite și evaluează calea extrinsecă a coagulării. Acesta furnizează informații privind prezența și activitatea a cinci factori ai coagulării (factorii I, II, V, VII, și X). IP reprezintă valoarea timpului de protrombină în raport cu o proba martor. Referitor la valorile normale ale INI, acestea sunt cuprinse între 1-2.

Tabelul 11. Valorile TP și INI ale particulelor biotinite

Parametru	Sânge	Probă etalon ²	MPCsB	MCCsB	MTCsB
TP (s)	16,3±0,10 ¹	17,4±0,25	15,5±0,22	14,6±0,43	16,3±0,24
IP (%)	54,0±0,23	48,4±0,18	60,0±0,10	67,6±0,30	54,3±0,34
INI	1,68±0,01	1,88±0,02	1,55±0,03	1,40±0,02	1,68±0,01

¹ – valorile reprezintă media a trei determinări ± deviația standard ² - sânge diluat cu ser fiziologic (1/7 v/v)

Valorile obținute pentru particulele biotinilate (Tabelul 11) sunt comparabile cu cele ale sângelui; nu s-au observat modificări importante ale nici unui parametru analizat (TP, IP, INI) ceea ce indică ca particulele biotinilate nu afectează activitatea protrombinei și confirmă că aceste particule sunt hemocompatibile.

IV.11.2. Evaluarea biocompatibilității particulelor biotinilate

IV.11.2.1. Evaluarea viabilității celulare prin microscopie confocală-metoda directă

Biocompatibilitatea particulelor magnetice biotinilate (MPCsB, MTCsB) a fost evaluată într-o primă etapă prin tehnica viabilității celulare directe care constă în vizualizarea celulelor endoteliale microvasculare dermale umane (HDMEC) după contactul acestora cu particulele biotinilate. Morfologia celulelor a fost vizualizată prin tehnica de microscopie confocală după marcarea cu compus fluorescent (calcein AM), după 48 ore și respectiv 120 ore și analizată în raport cu o probă control (Figura 89).

Din analiza imaginilor se constată că particulele magnetice biotinilate nu determină o scădere a viabilității celulare; atât după 48 ore cât și după 120 ore, numărul celulelor viabile este similar cu al controlului, particulele magnetice biotinilate nu afectează morfologia celulelor și nu împiedică proliferarea acestora și confirmă astfel că aceste particule sunt biocompatibile.

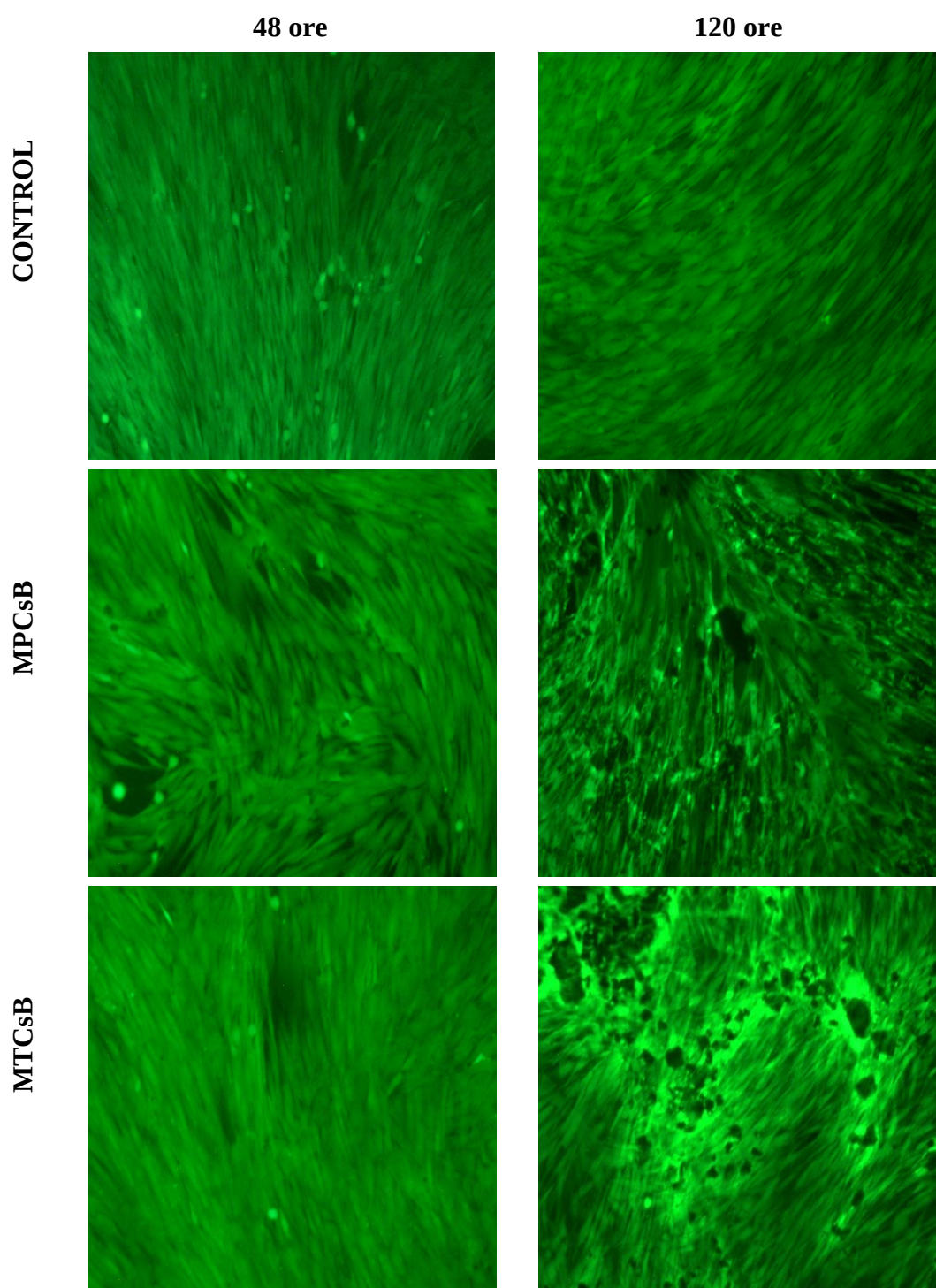


Figura 89. Vizualizarea celulelor la 48 ore și 120 ore în comparație cu o probă control

IV.11.2.2. Evaluarea viabilității celulare prin tehnica MTS

Biocompatibilitatea particulelor biotinizate a fost evaluată și prin tehnica MTS care se bazează pe cuantificarea spectrofotometrică a cantității de formazan produsă de celulele viabile, cantitate care este direct proporțională cu numărul de celule viabile. Rezultatele testului MTS pentru loturile MPCsB și MTCsB sunt prezentate în Figura 90.

Analizând datele obținute se poate observa că cele două loturi nu afectează viabilitatea celulară, care prezintă valori comparabile după 72 ore și aceeași tendință de creștere în timp, indicând astfel că particulele biotinilate sunt materiale biocompatibile. Rezultatele obținute în urma evaluării biocompatibilității prin cele două metode, coroborate cu datele obținute la testele de hemocompatibilitate indică că aceste particule magnetice biotinilate pot fi utilizate în aplicații biomedicale, și în special în aplicații ce vizează mediul sangvin.

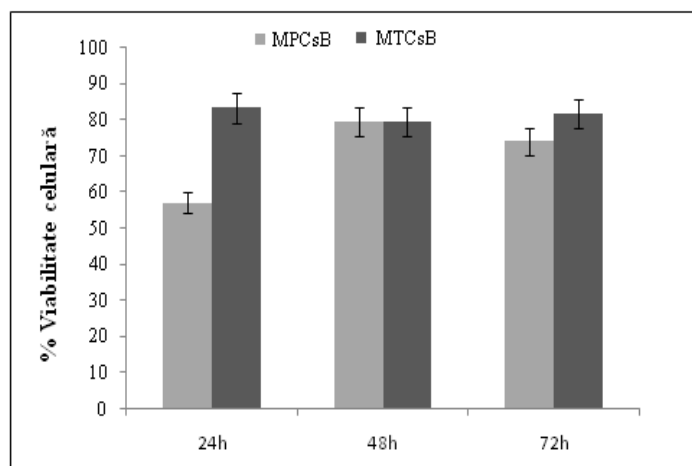


Figura 90. Viabilitatea celulară a loturilor MPCsB și MTCsB

IV.12. CONCLUZII

1. S-au obținut particule magnetice biotinilate pe bază de chitosan, în 3 etape. Analiza XRD a confirmat că materialele magnetice preparate sunt reprezentate de cristale de magnetită pură cu o dimensiune medie a cristalelor de ordinul a 10 nm. Prin tehnica TEM a fost evidențiată formarea particulelor de magnetită cu dimensiuni de ordinul a 10nm și formă cvasisferică stabilizată de surfactant. Potențialul Zeta are valori negative pentru particulele de magnetită stabilizate prin adăugarea de surfactanți neionici și pozitivi în cazul celui cationic. Analiza proprietăților magnetice confirmă faptul că loturile de magnetită preparate prezintă comportare superparamagnetică.

2. Particule magnetice au fost acoperite cu un strat de chitosan, prin procesul de gelificare ionică utilizând ca agent de reticulare tripolifosfatul de sodiu (TPP). Spectrele compozitelor relevă atât benzile caracteristice ale chitosanului cât și ale magnetitei, evidențiind astfel prezența magnetitei în matricea polimerică. Analiza elementală confirmă acoperirea particulelor magnetice cu chitosan și indică că particulele preparate conțin aproximativ 50 % polimer. Dimensiunea medie a particulelor crește cu masa molară a chitosanului (în concordanță cu alte rezultate raportate în literatură), scade cu creșterea

concentrației tensioactivului și crește ușor cu raportul masic chitosan/TPP. Potențialul Zeta depinde de aceeași parametri menționați anterior.

3. Biotinilarea particulelor magnetice s-a realizat prin formarea unei legături covalente amidice între gruparea amino a chitosanului și gruparea carboxil a biotinei; particulele biofuncționalizate au fost caracterizate din punct de vedere structural și morfologic. S-au determinat dimensiunile medii, potențialul Zeta și proprietățile magnetice ale acestor particule. Tehnicile de spectroscopie (^1H -NMR și FT-IR) au confirmat reacția de legare a biotinei pe chitosan. În urma procesului de biotinilare dimensiunea particulelor a crescut în timp ce potențialul Zeta al acestora a scăzut dar caracteristicile rămân în domeniul de valori adecvat aplicațiilor în contact cu fluidul sangvin. Tehnicile de microscopie electronică indică că particulele biotinite conțin magnetită și că procesul de biotinilare nu modifică morfologia acestora.

4. Procesul de biotinilare nu afectează comportamentul superparamagnetic al particulelor acestea păstrând aceleași proprietăți magnetice. Particulele magnetice biotinite prezintă proprietăți magnetice excelente (magnetizare de saturație ridicată și comportament superparamagnetic) și proprietăți biologice adecvate (hemo- și biocompatibilitate), pot fi formulate ca suspensii injectabile, caracteristici care le recomandă pentru aplicații în contact cu sângele.

CAPITOLUL V

PARTICULE MAGNETICE BIOTINILATE PE BAZĂ DE PSI-b-PEG ȘI MAGNETITĂ

În ultimii ani s-a manifestat un interes deosebit pentru obținerea de polimeri biodegradabili și biocompatibili pe bază de poli (α -hidroxil acizii) și poli(α -amino acizii) cu aplicații biomedicale și farmaceutice. Materialele polimerice sintetice cu potențiale aplicații în medicină trebuie să îndeplinească următoarele cerințe: biocompatibilitate, hidrofilie, o cinetică adecvată de degradare iar produșii de degradare să nu fie toxici. Cele mai utilizate biomateriale hidrofile conțin poli(etilenglicol) (PEG) cu unitatea structurală $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$. PEG este un polimer liniar, de tip polieter, cu diverse mase molare, solubil în apă și în majoritatea solvenților organici. PEG este utilizat în aplicații medicale datorită bio- și hemocompatibilității, toxicității și antigenității minime. În plus, PEG-ul prezintă capacitatea de a forma sisteme binare în soluții apoase cu alți polimeri sau săruri (PEG – dextran, PEG – sulfați sau fosfați). Această proprietate are aplicații în separarea și purificarea materialelor biologice precum: proteine, enzime, viruși, cloroplaste, acizi nucleici, celule de origine animală sau vegetală. În același timp polimerul este netoxic, reține o cantitate mare de apă, își menține activitatea enzimatică și biologică chiar după ce este cuplat cu enzime, proteine și diferite medicamente. Grefarea PEG-ului pe suprafețe solide are ca efecte diminuarea adsorbției de proteine, a adeziunii celulare și a plachetelor sangvine [238].

Polimerii sintetici utilizați în aplicațiile biomedicale trebuie să prezinte grupe funcționale care să permită legarea covalentă a medicamente sau alte substanțe active din punct de vedere biologic. PEG-ul nu răspunde acestei cerințe, motiv pentru care acest polimer a fost combinat cu alți polimeri sintetici ce conțin diverse grupe funcționale. Polimerii sintetici ce conțin resturi de aminoacizi în lanțul principal sau în cel lateral, sunt exemple de polimeri cu funcționalități multiple utilizați în domeniul biomedical.

Poli(acidul aspartic) (PAS), aparținând familiei polipeptidelor sintetice, este un polimer solubil în apă, biocompatibil și biodegradabil. Datorită prezenței grupelor carboxilice, PAS prezintă câteva asemănări în privința proprietăților chimice cu poli(acidul acrilic). Datorită biocompatibilității, a lipsei efectelor toxice sau mutagenice, PAS poate fi utilizat cu succes în medicină, cosmetică și industria alimentară.

În particular, poli(succinimida) (PSI) ca produs intermediar în sinteza poli(acidului aspartic) din acid D,L-aspartic, datorită biocompatibilității, biodegradabilității și lipsei de toxicitate, este unul dintre cele mai promițătoare suporturi macromoleculare.

Combinarea în compoziția unui copolimer a caracteristicilor de hidrofilie a PEG-ului și hidrofobie datorată PSI-ei este importantă pentru potențialele aplicații biologice și

farmaceutice, ce necesită solubilizare în mediu apos și capacitatea de a furniza locuri pentru funcționalizări ulterioare de-a lungul lanțului macromolecular.

Acest capitol este dedicat prezentării rezultatelor obținute în prepararea și caracterizarea particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG și magnetită. Particulele magnetice pe bază PSI-b-PEG și magnetită au fost preparate anterior iar în cadrul acestei lucrări s-a realizat biotinilarea și ulterior funcționalizarea acestora cu streptavidină.

V.1. Prepararea particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG și magnetită

Biotinilarea particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG și magnetită s-a realizat prin legarea biotinei pe suprafața particulelor magnetice activând reacția cu o carbodiimidă solubilă în apă, EDAC care conduce la formarea unei legături covalente esterice între gruparea hidroxil a PEG-ului și gruparea carboxil a biotinei (Figura 91).

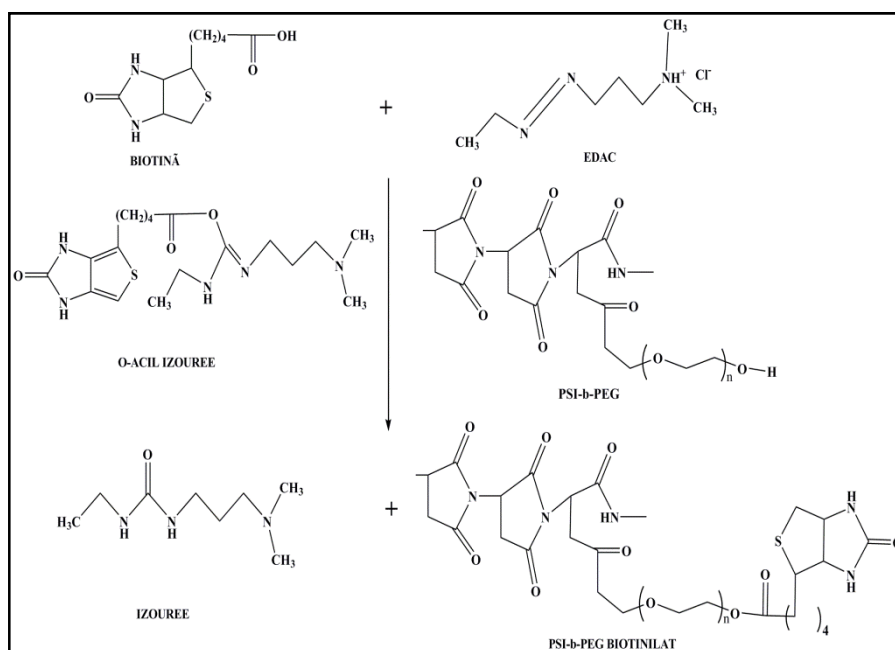


Figura 91. Reacția de biotinilare a PSI-b-PEG

Gradul de biotinilare al particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG și magnetită este dependent atât de numărul de grupări funcționale terminale de tip hidroxil ale PEG-ului cât și de modul de dispunere al copolimerului pe suprafața materialului magnetic, ultimul putând influența accesibilitatea grupărilor hidroxil și, implicit, cantitatea de biotină imobilizată.

V.2. Caracterizarea particulelor magnetice biotinite pe bază de PSI-b-PEG și magnetită

V.2.1. Spectroscopia FT-IR

Spectre FT-IR ale biotinei, copolimerului PSI-b-PEG și ale particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG înainte și după reacția de biotinilare sunt prezentate în Figura 93.

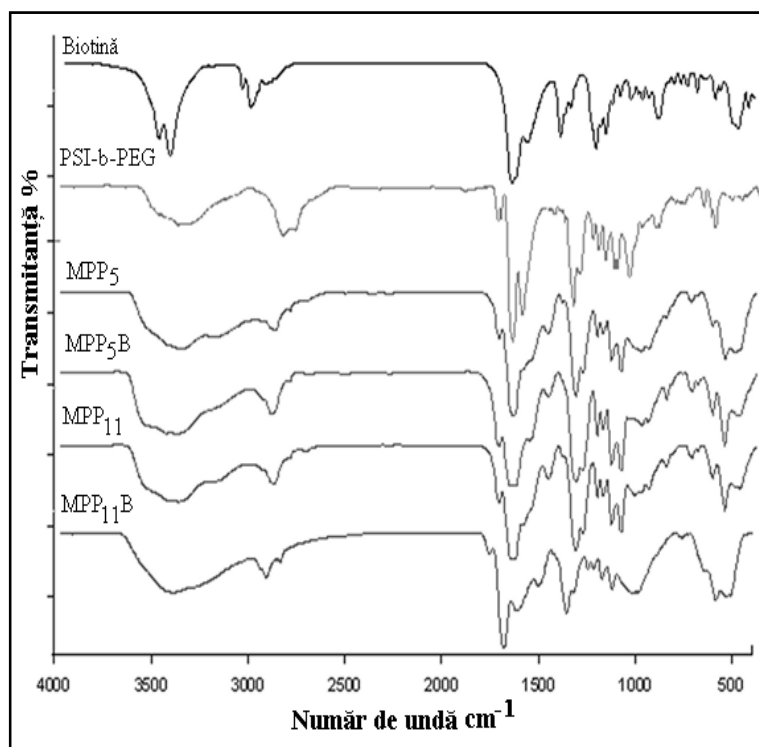


Figura 93. Spectre FT-IR ale biotinei, PSI-b-PEG, MPP₅, MPP₅B, MPP₁₁ și MPP₁₁B

Spectru FT-IR al copolimerului PSI-b-PEG este caracterizat prin prezența benzilor caracteristice pentru ambii compuși, atât PSI cât și PEG și confirmă prepararea cu succes a copolimerului bloc. Astfel, în urma analizei spectrului acestui compus se evidențiază mai multe aspecte, prezentate în continuare. În regiunea 900 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} sunt prezente benzile de la 1663 cm^{-1} (amida I) și 1534 cm^{-1} (amida II) din structura PSI și banda de la 953 cm^{-1} caracteristică legăturii C-O din structura PEG-ului, în timp ce în regiunea 3200 cm^{-1} - 3600 cm^{-1} sunt prezente numeroase benzi care se suprapun. Astfel, în această zonă apare o bandă ascuțită la 3407 cm^{-1} , care este atribuită vibrațiilor ν (N-H) ale grupei imidice și se suprapune peste o bandă largă situată în regiunea 3200 cm^{-1} - 3600 cm^{-1} ce apare ca urmare a vibrațiilor de întindere ale grupărilor hidroxil. În aceeași zonă se regăsește și banda cuprinsă între 3440 cm^{-1} - 3424 cm^{-1} , bandă caracteristică vibrațiilor de întindere ale legăturii de hidrogen intramoleculare (O-H) din structura PEG-ului. Două benzi proeminente de la $\sim 1716\text{ cm}^{-1}$ și 1393 cm^{-1} , împreună cu o bandă cu intensitate mai scăzută de la ~ 1793

cm^{-1} sunt caracteristice imidelor și sunt datorate structurii inelului succinimic. PSI a rezultat în urma polimerizării acidului L-aspartic cu deschiderea ciclului, deschidere evidențiată de benzile amidice de $\sim 1663 \text{ cm}^{-1}$ și semnalele grupării libere carboxil de la $\sim 1393 \text{ cm}^{-1}$. Rezultate FTIR sunt în conformitate și cu datele bibliografice, pentru aceste tipuri de legături [239].

Spectrul PSI-b-PEG prezintă banda de la $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$ ce corespunde deformării în plan a grupării O-H, benzile de la 1099 cm^{-1} și 1257 cm^{-1} pentru vibrațiile simetrice ale C-O și respectiv ale (C-O-C) precum și benzile de la 1393 cm^{-1} pentru vibrațiile C-H din structura PEG. Toate vibrațiile caracteristice legăturii C-H sunt situate la 2946 cm^{-1} .

În spectrele particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG sunt prezente atât benzile caracteristice pentru copolimer cât și benzile specifice componentei magnetice și confirmă prepararea cu succes a compozitelor magnetice. Componenta magnetică este reprezentată de benzile din regiunea $400 \text{ cm}^{-1} - 700 \text{ cm}^{-1}$ (453 cm^{-1} , 553 cm^{-1} , 585 cm^{-1} și 678 cm^{-1}) asociate cu vibrațiile de întindere și torsiune ale legăturii Fe-O [240].

În spectrele particulelor biotinilate nu se observă modificări semnificative ale benzilor caracteristice, decât în regiunea $3200 \text{ cm}^{-1} - 3500 \text{ cm}^{-1}$ datorită faptului că o parte din grupările hidroxil ale PEG-ului sunt implicate în legarea biotinei pe suprafață prin intermediul legăturilor esterice și în zona $2800 \text{ cm}^{-1} - 2900 \text{ cm}^{-1}$, unde se observă o intensificare a benzilor datorită introducerii unor noi grupări metilenice ce aparțin biotinei.

V.2.2. Spectroscopia de rezonanță magnetică de protoni (^1H -NMR)

Tehnica de spectroscopie de rezonanță magnetică de protoni a fost utilizată pentru a confirma natura legăturilor chimice care s-au format între biotină și PSI-b-PEG. În acest scop, aceeași reacție de biotinilare a fost realizată pe copolimerul PSI-b-PEG păstrând condițiile și parametrii utilizați pentru reacția de biotinilare a particulelor magnetice: raport masic Cs/B de 1/5 și B/EDAC de 1/1,5. Spectrele ^1H -NMR ale biotinei, PSI-b-PEG și PSI-b-PEG biotinilat sunt prezentate în Figura 94. Spectrul ^1H -NMR al biotinei (Figura 94A) a fost discutat în secțiunea IV.7.2.

În spectrul ^1H -NMR al copolimerului (Figura 94B) se disting: semnalele din regiunile 2,5 ppm - 2,8 ppm și 3,1 ppm - 3,25 ppm care sunt atribuite protonilor metilen din structura succinimidei, respectiv etilen glicolului; semnalele din regiunea 3,6 ppm - 3,8 ppm și 5,25 ppm - 5,5 ppm sunt caracteristice protonilor metin în timp ce protonii din gruparea amidă formată prin deschiderea ciclului succinic dau semnale caracteristice situate în regiunea 7,9 ppm, 8,1 ppm, 8,3 ppm, 8,7 ppm [241]. Semnalul de la 3,38 ppm este atribuit protonului grupării hidroxil a PEG-ului.

În spectrul ^1H -NMR al copolimerului biotinilat se observă următoarele modificări: intensitatea semnalului protonului grupării hidroxil de la 3,38 ppm scade în intensitate față

de spectrul copolimerului înainte de biotinilare, în spectrul copolimerului biotinilat identificându-se doar un „umăr” care indică existența unui număr mic de grupări hidroxil libere în structura copolimerului biotinilat. Rezultatele indică faptul că gradul de esterificare al grupărilor hidroxil și implicit gradul de biotinilare nu este total. În plus, în spectrul ^1H -NMR al copolimerului biotinilat apar semnale noi în regiunea 0,5 ppm - 1,7 ppm, semnale care sunt atribuite protonilor celor patru grupări metilen ale biotinei și se intensifică semnalele din regiunea 4 ppm - 5 ppm, datorită introducerii unor noi grupări $-\text{CH}-$, ale biotinei. Rezultatele spectroscopiei de rezonanță magnetică de protoni confirmă formarea copolimerului PSI-g-PEG biotinilat în urma legării biotinei prin intermediul legăturilor esterice formate între grupările hidroxil ale PEG-ului și gruparea carboxil a biotinei [242].

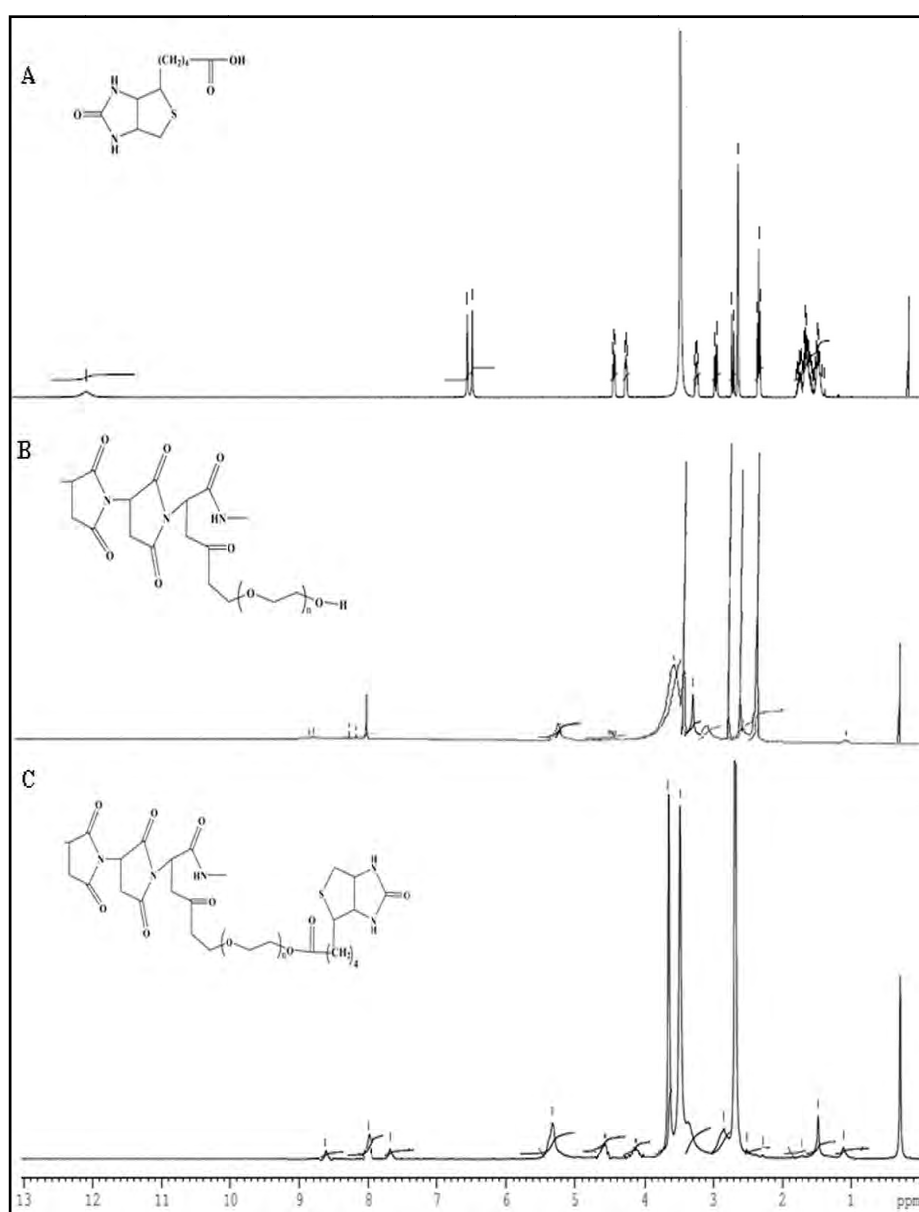


Figura 94. Spectre ^1H -NMR ale A) biotinei, B) PSI-b-PEG și C) PSI-b-PEG biotinilat

V.2.3. Determinarea dimensiunii medii și a potențialului Zeta pentru particulele biotinilate

Dimensiunile medii și potențialul Zeta al particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG și magnetită înainte și după biotinilare sunt prezentate în Figura 95.

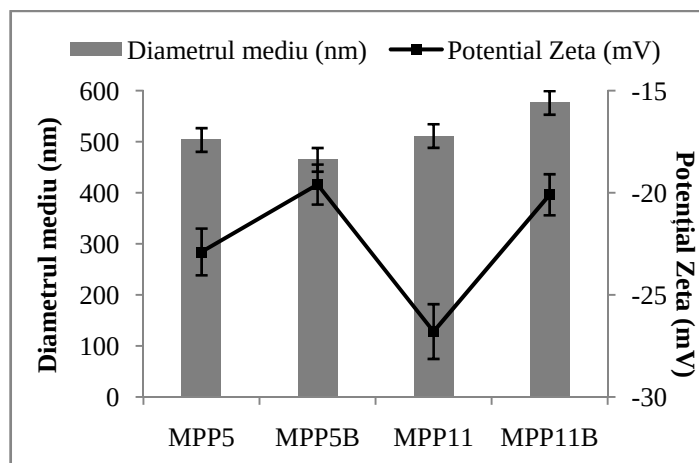


Figura 95. Dimensiunile și potențialul Zeta pentru particulele magnetice pe bază de PSI-b-PEG și magnetită

Din analiza rezultatelor obținute se constată că procesul de biotinilare nu a determinat o modificare semnificativă a dimensiunii medii a particulelor. Biotina este o moleculă cu volum molecular redus și, prin urmare, fixarea acesteia pe particulă nu determină variații esențiale de dimensiune ale acestora. Toate loturile de particule prezintă dimensiuni de ordinul a 500 nm și valori negative ale potențialului Zeta, cu mențiunea că pentru particulele biotinilate se constată o tendință de creștere a valorii acestui potențial. Această tendință confirmă că o parte din grupările hidroxil terminale ale PEG-ului au fost implicate în legarea biotinei prin formarea unor legături esterice [243].

Variația potențialului Zeta s-a manifestat diferit pentru cele două tipuri de particule, constatându-se o tendință de creștere a potențialului Zeta mult mai pronunțată în cazul lotului MPP₁₁B, fapt care confirmă că reacția de biotinilare este dependentă de concentrația PEG de pe suprafața particulelor magnetice. Această tendință sugerează că lotul MPP₁₁B prezintă un grad de biotinilare mai ridicat.

Caracteristicile DLS ale particulelor biotinilate indică faptul că gradul de biotinilare al particulelor nu este total și sunt corelate cu rezultatele analizelor de spectroscopie (FT-IR și ¹H-NMR).

V.2.4. Determinarea conținutului de biotină prin tehnica HABA-Avidină

Conținutul de biotină de pe particulele magnetice a fost determinat prin tehnica HABA-Avidină și este prezentat în Tabelul 12. Din analiza datelor obținute se observă că gradul de biotinilare al particulelor este cuprins între 140×10^{-3} mmoli/g și 210×10^{-3} mmoli/g. Se constată, de asemenea, că valorile conținutului de biotină sunt diferite pentru cele două loturi de particule biotinilate, cel mai mare grad de biotinilare înregistrându-se pentru lotul MPP₅B, motiv pentru care acest lot a fost selectat pentru imobilizarea ulterioară a streptavidinei. Rezultatele obținute prin tehnica HABA-Avidină sunt în corelație cu datele obținute prin celelalte analize prezentate anterior.

Tabelul 12. Gradul de biotinilare al particulelor magnetice

Particulă biotinilată	Conținut biotină $10^3 \times$ (mmoli/g particulă)
MPP ₅ B	210
MPP ₁₁ B	140

V.2.5. Microscopie electronică (TEM, SEM)

Morfologia particulelor biotinilate a fost studiată prin tehnici de microscopie electronică. Din analiza imaginii TEM a lotului MPP₁₁B (Figura 96) se poate observa că compozitul magnetic biotinilat este format din mai multe particule de magnetită (zonele mai închise la culoare) încorporate într-un strat de copolimer biotinilat (zonele mai deschise la culoare).

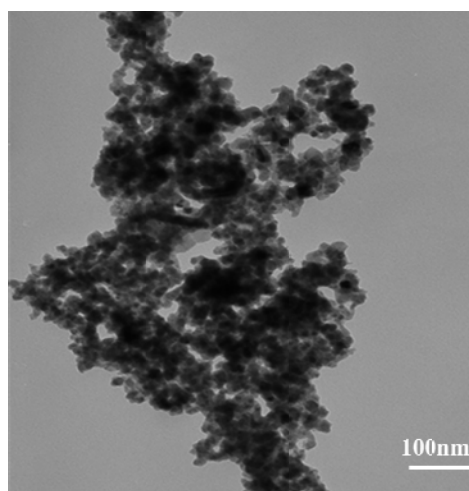


Figura 96. Imagine TEM a lotului MPP₁₁B

Tehnica SEM a fost utilizată pentru a studia comparativ morfologia particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG, înainte (lotul MPP₁₁) și după biotinilare (lotul MPP₁₁B). Din imaginea SEM a lotului MPP₁₁ (Figura 97A) se observă prezența copolimerului care acoperă uniform particulele de magnetită, confirmând astfel capacitatea copolimerilor de tip bloc de a încorpora materiale magnetice. Deși au o structură compozită, nu se observă o limită de separare al celor două faze, fapt care indică că materialul magnetic a fost acoperit uniform de către copolimer. Prezența unor aglomerări de particule poate fi datorată interacțiunilor de tip particulă-particulă. După biotinilare (Figura 97B), morfologia particulelor nu se modifică. Imaginile SEM confirmă rezultatele obținute prin tehnica DLS (legarea biotinei pe suprafața particulelor magnetice nu determină o modificare semnificativă a dimensiunii particulelor).

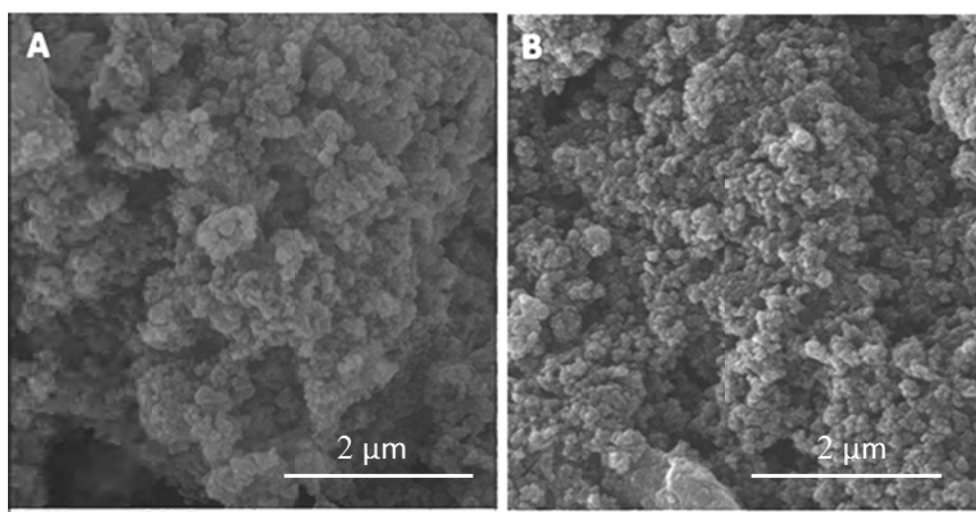


Figura 97. Imagini SEM: A- MPP₁₁, B-MPP₁₁B

Diametrul mediu al particulelor determinat din imaginile SEM este de 200 nm - 300 nm; valorile sunt mai mici decât cele determinate prin tehnica DLS (500 nm), diferența fiind dată de faptul că prin tehnica imagistică se determină dimensiunea particulelor în stare uscată.

V.2.7. Analiza prin difracție cu raze X (XRD)

Particulele magnetice biotinilate preparate (MPP₅B și MPP₁₁B) au fost analizate prin difracție cu raze X pentru a identifica tipul de material magnetic care s-a format, structura sa cristalografică și dimensiunea cristalelor formate. Difractogramele XRD ale particulelor magnetice biotinilate (MPP₁₁B și MPP₅B) sunt prezentate în Figura 100. Ambele probe analizate prezintă unghiurile de difracție 2θ caracteristice pentru magnetită, și anume: $30,3^\circ$; $35,6^\circ$; $43,4^\circ$; $53,5^\circ$; $57,4^\circ$ și $62,8^\circ$ care pot fi indexate planurilor (220), (311), (400), (422),

(511), și (440) aparținând unei celule cubice. În plus, se constată prezența unghiului 2θ de la 18° care este atribuit copolimerului. Aria largă delimitată de unghiuri indică faptul că cristalele de magnetită formate au dimensiuni mici [202], în timp ce intensitatea unghiului de difracție maxim confirmă existența unei singure faze pure, de magnetită [203]. Analiza XRD confirmă astfel, că particulele magnetice preparate conțin cristale de magnetită pură. Din analiza comparativă a intensităților unghiurilor de difracție se observă o diferență semnificativă între cele două loturi de particule biotinilate, sugerând existența unui conținut diferit de magnetită al loturilor respective. Astfel, conținutul de magnetită al lotului $MPP_{11}B$ este de aproximativ de 2 ori mai mare decât conținutul în magnetită al lotului MPP_5B . Rezultatele sunt corelate cu datele obținute în urma analizei termogravimetrice, și se consideră a fi datorate îndepărtării unei părți din faza organică (în special PEG) în timpul procesului de biotinilare.

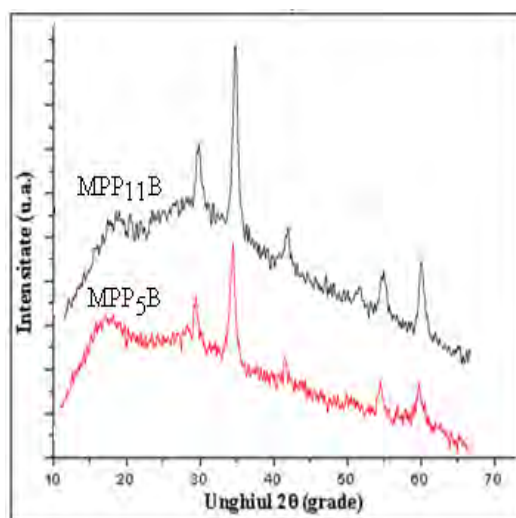


Figura 100. Difractogramele XRD ale particulelor biotinilate, MPP_5B și $MPP_{11}B$

V.2.8. Determinarea proprietăților magnetice

Curbele de magnetizare ale particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG, înainte și după biotinilare, sunt prezentate în Figura 101. Valoarea magnetizării de saturație este determinată de cantitatea de magnetită din compoziția particulelor; pentru lotul MPP_5 se înregistrează o valoare a magnetizării de saturație de 7,49 emu/g în timp ce pentru lotul MPP_{11} magnetizarea de saturație este de 10,29 emu/g. Din analiza valorilor magnetizării de saturație ale particulelor magnetice înainte și după biotinilare se constată că în urma procesului de biotinilare magnetizarea de saturație crește de la 7,49 emu/g la 12,70 emu/g pentru lotul MPP_5B respectiv de la 10,29 emu/g la 23,58 emu/g pentru lotul $MPP_{11}B$. Creșterea mult mai semnificativă a magnetizării de saturație lotului $MPP_{11}B$ este corelată cu datele obținute prin analiză termogravimetrică și difractogramele XRD.

De asemenea, se confirmă, ca și în cazul particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan că proprietățile diamagnetice ale biotinei pot determina creșterea capacității maxime a unui material de a se magnetiza.

Din analiza curbelor de magnetizare se constată că particulele magnetice preparate nu prezintă magnetizare remanentă. Aspectul cubelor indică comportamentul superparamagnetic al particulelor, această caracteristică fiind dată de dimensiunea foarte mică a particulelor de magnetită înglobată în copolimer. Procesul de biotinilare nu afectează comportamentul superparamagnetic al particulelor acestea păstrând aceeași caracteristică și după biotinilare.

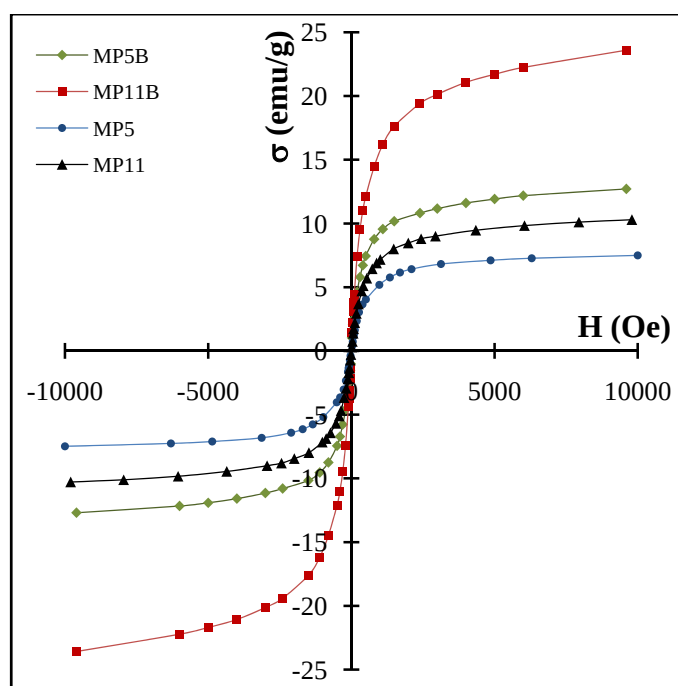


Figura 101. Curbe de magnetizare pentru particulele MPP₅, MPP₁₁, MPP₅B și MPP₁₁B.

V.3. Teste de redispersie a particulelor biotinilate în medii de interes biologic

Deoarece se urmărește ca aplicarea particulelor magnetice în mediul sangvin să se realizeze sub formă de suspensii injectabile se impune efectuarea de teste de redispersii a acestor particule în medii de interes biologic. Astfel, testele de redispersie ale particulelor biotinilate s-au realizat în două medii comune care se folosesc în domeniul medical ca soluții injectabile și anume: serul fiziologic 0,9 % NaCl și soluția de glucoză 10 %. S-au determinat dimensiunea și potențialul Zeta al particulelor biotinilate redispersate iar rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 102.

Dimensiunea medie a particulelor biotinilate redispersate în cele două medii este cuprinsă în intervalul 500 nm - 700 nm, dimensiune adecvată aplicației particulelor magnetice în mediul sangvin. Această caracteristică confirmă potențialul acestor particule de a fi formulate ca suspensii injectabile. În privința potențialului Zeta, toate loturile de particule au prezentat valori cuprinse între ale -18 mV și -15 mV, cu mențiunea că valorile diferite ale potențialului Zeta sunt datorate interacțiunii particulelor biotinilate cu ioni prezenți în mediile de redispersie.

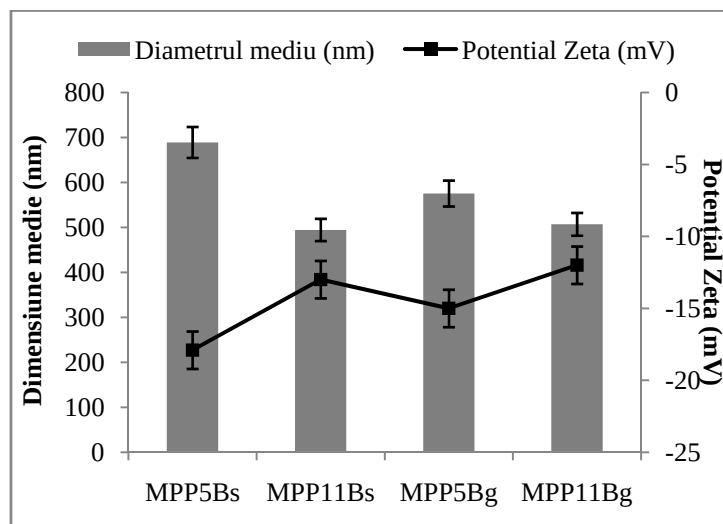


Figura 102. Dimensiunile și potențialul Zeta pentru particulele biotinilate redispersate în ser fiziologic (MPP₅Bs și MPP₁₁Bs) și glucoză (MPP₅Bg și MPP₁₁Bg)

V.4. Evaluarea caracteristicilor biologice ale particulelor biotinilate

V.4.1. Determinarea *in vitro* a hemocompatibilității particulelor biotinilate

Aplicația acestor particule presupune utilizarea lor în mediul sangvin, motiv pentru care o caracteristică necesară a acestor particule vizează în primul rând hemocompatibilitatea acestora [247]. Orice modificare a procesului de coagulare în urma contactului cu diferite tipuri de materiale reprezintă o indicație a interacțiunii acestor materiale cu componentele sangvine care pot duce la activarea răspunsului trombogenic [248]. Pentru a studia efectele particulelor biotinilate în contact cu sângele, s-au determinat o parte din indicatorii coagulării sângelui: timpul de protrombină (TP), timpul de protrombină parțial activată (aPTT) și indicele normalizat internațional (INI). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 13.

Tabelul 13. Valorile TP, aPTT, INI și ale particulelor biotinite

Parametru	Sânge	Probă etalon ²	MPP ₅ B	MPP ₁₁ B
TP (s)	15.80±0.20 ¹	16.30±0.25	17.40±0.20	16.73±0.98
aPTT(s)	45.80±0.20	45.40±0.18	48.65±0.25	48.00±1.00
INI	1.39±0.02	1.44±0.03	1.56±0.02	1.49±0.10
Fibrinogen (mg/dL)	258	258	258	258

¹ – valorile reprezintă media a trei determinări ± deviația standard ²-sânge diluat cu ser fiziologic (1/7 v/v)

Valorile înregistrate pentru plasmă și probă etalon, care este reprezentată de sânge în contact cu ser fiziologic, sunt prezentate pentru comparație. TP evaluează calea extrinsecă și calea comună de activare a coagulării sângelui în timp ce aPTT evaluează calea intrinsecă și calea comună a coagulării.

Din analiza datelor obținute se constată că nu există modificări semnificative între valorile TP și aPTT ale ambelor probe și valorile plasmei și ale probei etalon. Rezultatelor obținute indică o bună compatibilitate a particulelor biotinite cu mediul sangvin.

Atunci când un material este adus în contact cu sângele, primul fenomen care apare este reprezentat de adsorbția nespecifică a proteinelor pe suprafața materialului [41]. Una dintre cele mai importante proteine care se adsorb pe suprafața materialului și induce ulterior adeziunea plachetară care declanșează răspunsul trombogenic este reprezentată de fibrinogen. Această proteină este convertită în fibrină insolubilă care determină formarea trombusului [45,249]. Cu scopul de a evalua adsorbția proteinelor pe suprafața particulelor biotinite, fibrinogenul plasmatic a fost determinat, înainte și după contactul particulelor biotinite cu sângele. Din analiza rezultatelor obținute, prezentate în tabelul 12 se poate observa că valoarea fibrinogenului plasmatic nu se modifică după contactul particulele biotinite cu sângele, fapt care indică că aceste particule nu determină adsorbția fibrinogenului plasmatic, atât datorită prezenței biotinei pe suprafața particulelor cât și a PEG-ului, a cărui hemocompatibilitate a fost deja demonstrată. În plus, diverse studii raportate evidențiază faptul că adsorbția fibrinogenului este mult mai scăzută pe materialele hidrofile precum PEG, decât pe materiale hidrofobe [250]. Datele obținute confirmă că particulele biotinite pe bază de PSI-b-PEG sunt hemocompatibile.

V.5. CONCLUZII

1. S-au obținut particule magnetice biotinite pe bază de PSI-b-PEG și magnetită prin imobilizarea biotinei pe suprafața particulelor magnetice prin intermediul legăturilor

covalente de tip ester între gruparea hidroxil terminală a PEG-ului și gruparea carboxil a biotinei.

2. Datele de spectroscopie FTIR pentru particulele magnetice biotinilate relevă atât benzile caracteristice copolimerului cât și cele ale magnetitei oferind astfel dovezi ale prezenței magnetitei în matricea copolimerică. Spectroscopia de rezonanță magnetică de protoni a confirmat natura chimică a legăturii dintre biotină și copolimerul PSI-b-PEG.

3. Procesul de biotinilare nu a determinat o modificare semnificativă a dimensiunii medii a particulelor, aceste particule prezentând dimensiuni de ordinul a 500 nm, dar a determinat o creștere a potențialului Zeta, ceea ce indică că o parte din grupările hidroxil terminale ale PEG-ului sunt implicate în legarea biotinei. Gradul de biotinilare este diferit pentru cele două loturi de particule biotinilate, cel mai mare grad de biotinilare înregistrându-se pentru lotul MPP₅B, lot care a fost selectat pentru imobilizarea ulterioară a receptorului pentru toxină (streptavidină).

4. Datele de microscopie electronică TEM au confirmat formarea de compozit magnetic biotinilat, compus din mai multe particule de magnetită încorporate într-un strat de copolimer PSI-b-PEG-Biotină. Imaginile SEM au evidențiat faptul că după biotinilare, morfologia particulelor nu se modifică și că dimensiunea medie a particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG, în stare uscată este de aproximativ 200-300nm.

5. Analiza XRD a confirmat că loturile de particulele magnetice biotinilate preparate conțin cristale de magnetită pură cu un conținut diferit în magnetită, determinat de condițiile preparative.

6. Particulele magnetice biotinilate obținute prezintă comportament superparamagnetic și magnetizare de saturație adecvată aplicațiilor în contact cu fluidul sangvin, pot fi formulate ca suspensii injectabile și sunt hemocompatibile, proprietăți care le recomandă pentru aplicații biologice de separare magnetică a toxinelor circulante.

CAPITOLUL VI

EVALUAREA PERFORMANȚELOR PARTICULELOR MAGNETICE FUNCȚIONALIZATE ÎN DETOXIFIEREA SÂNGELUI

Analize detaliate structurale ale sistemului biotină-SA au demonstrat că afinitățile ridicate ale acestui sistem se bazează pe multiple legături de hidrogen, cuplate cu interacțiunile hidrofobe create de resturile aromatice [251]. Între biotină și SA se formează 8 legături de hidrogen, dintre care în 6 dintre ele este implicat ciclul ureic astfel: atomii de oxigen ai grupării ureido a biotinei formează trei legături de hidrogen cu aminoacizii asparagină-23, serină-2 și tirozină-43; grupările NH formează legături de hidrogen cu aminoacizii serina-45 și respectiv acidul aspartic-128 și o legătură de hidrogen se formează prin intermediul tioeterului cu aminoacidul tirozină-90. Celelalte 2 legături de hidrogen le formează restul lateral valerianic astfel: una dintre ele cu lanțul principal N-H al aminoacidului asparagină-49 și cealaltă cu aminoacidul serină-88.

Locul specific de legare al biotinei din structura SA este format din patru lanțuri de triptofan, dintre care 3 sunt situate pe o unitate monomerică (Triptofan-79, Triptofan-92 și Triptofan-108) iar al patrulea (Triptofan-120) este situat pe o unitate monomerică adiacentă (Figura 104A) și are rolul de a fixa ireversibil biotina. Referitor la natura interacțiunilor care apar în urma legării biotinei, sunt emise ipoteze diferite legate de natura coordinativă sau necoordinativă a interacțiunilor [252].

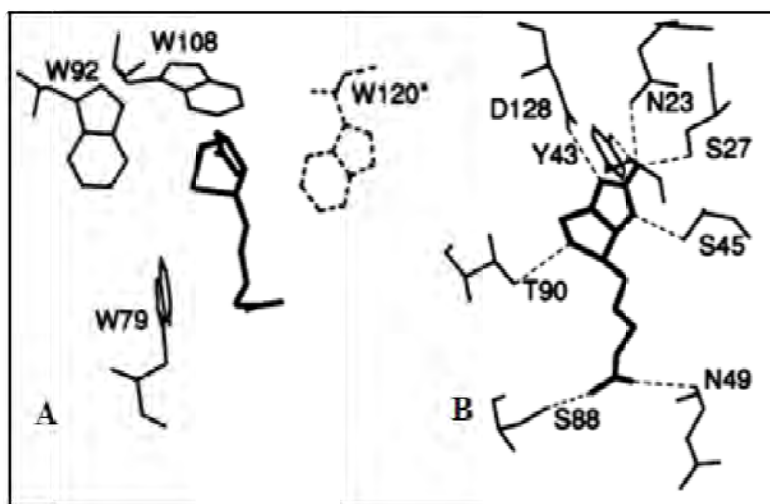


Figura 104. Modul de legare al biotinei de SA: A. Lanțurile hidrofobe prezente în locul de legare al biotinei din structura SA: Triptofan-79, Triptofan-92 și Triptofan-108 dintr-un monomer și Triptofan-120 (linie punctată) din structura monomerului adiacent și B. Legăturile de hidrogen dintre biotină și streptavidină.

Deși SA prezintă o structură preorganizată pentru a furniza locuri specifice de interacțiune cu biotina, după principiul “lacăt-cheie”, după imobilizarea biotinei, în structura SA pot avea loc modificări structurale care pot conduce la dezactivarea receptorului (Figura 105A). Atunci când biotina este imobilizată pe diferite suprafețe, posibilitățile de manifestare a interacțiunilor cu modificări structurale se diminuează și permit receptorului să rămâne disponibil pentru interacțiuni ulterioare cu diverși compuși, precum toxinele sangvine [253].

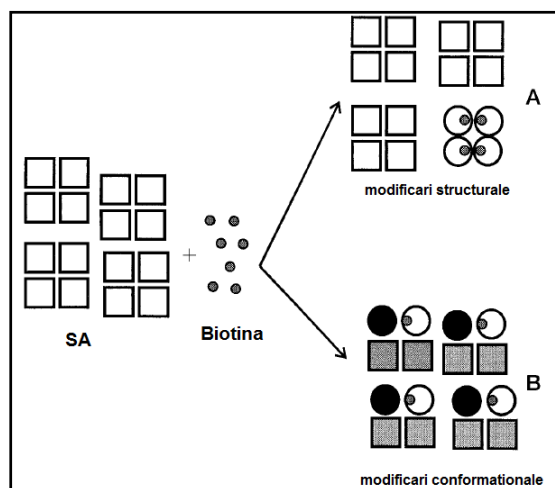


Figura 105. Interacțiunile dintre biotină și SA

Din punct de vedere al aplicațiilor, este unanim acceptată teoria conform căreia, modificarea lanțului valerian nu influențează semnificativ afinitatea dintre biotină și SA. În plus, în cele mai multe cazuri materialele biotinilate au capacitatea de păstra proprietățile lor biologice și fizico-chimice. Această caracteristică permite biotinilarea oricărei macromolecule și interacțiunea acesteia cu SA, cu păstrarea proprietăților intacte ale receptorului [254].

Capitolul 6 al lucrării prezintă rezultatele obținute privind funcționalizarea cu streptavidină a celor două tipuri de particule magnetice biotinilate. Funcționalizarea particulelor magnetice s-a realizat prin intermediul legăturilor de mare afinitate de tip ligand-receptor. Particulele magnetice funcționalizate preparate au fost caracterizate din punct de vedere al dimensiunii și încărcării electrice a suprafeței iar cantitatea de streptavidină imobilizată pe particulele magnetice a fost determinată prin spectroscopia UV-VIS.

De asemenea, acest capitol este dedicat evaluării performanțelor particulelor magnetice funcționalizate ca agenți de detoxifiere extracorporeală a sângelui, ceea ce constituie obiectivul principal al acestei lucrări. Particulele magnetice funcționalizate au fost testate din punct de vedere al performanțelor de captare a unei toxine model. Toxina model selectată a fost reprezentată de peroxidaza din hrean, HRP. Cantitatea de toxină captată pe particulele magnetice a fost determinată prin spectroscopia UV-VIS.

VI.1. Prepararea particulelor magnetice funcționalizate cu streptavidină (SA)

Reacția de imobilizare a SA a fost studiată pe loturile de particule magnetice cu grad de biotinilare maxim obținut prin tehnica aplicată. Astfel au fost selectate pentru reacție particulele magnetice biotinilate pe bază de chitosan codificate MPCsB, MTCsB, MCCsB (preparate la un raport molar Cs/B de 1/2 și un raport molar B/ EDAC de 1/1,5) și particulele magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG, codificate MPP₅B MCCsB (preparate la un raport masic Cs/B de 1/5 și un raport molar B/ EDAC de 1/ 1,5). Imobilizarea SA pe particulele biotinilate s-a realizat prin intermediul interacțiunilor specifice de tip ligand-receptor. Interacțiunile de tip ligand-receptor, caracterizate de constante de afinitate ridicate (constantă de disociere mică, $K_d = 10^{-15} \text{ M}$) se realizează foarte rapid, sunt ireversibile și nu pot fi desfăcute de factorii comuni de denaturare, precum variații de pH sau solvenții organici, ruperea legăturii biotină-streptavidină putându-se realiza doar în urma degradării legăturilor peptidice.

VI. 2. Determinarea dimensiunii și a potențialului zeta pentru particule magnetice funcționalizate cu SA

Dimensiunea medie finală și potențialul Zeta al particulelor magnetice funcționalizate cu streptavidină sunt prezentate în Figura 106.

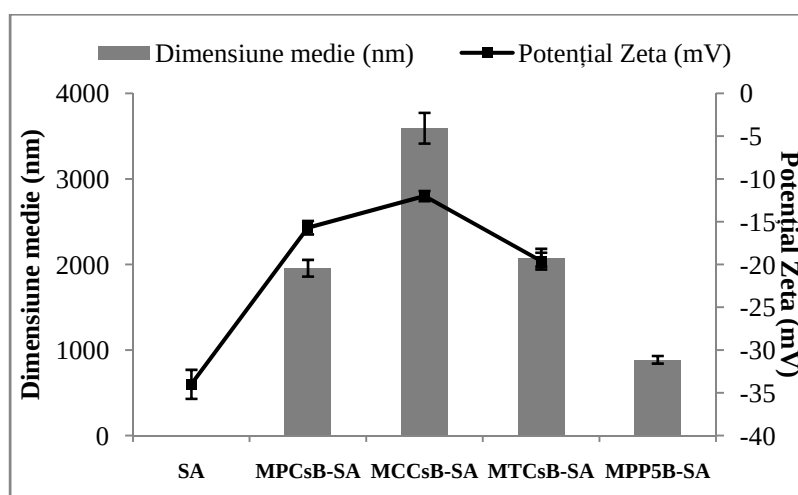


Figura 106. Dimensiunile și potențialul Zeta pentru particulele magnetice funcționalizate

Din analiza rezultatelor obținute se constată că procesul de complexare cu SA determină creșterea dimensiunii medii a particulelor și scăderea valorii potențialul Zeta, comparativ cu particulele magnetice biotinilate. Astfel, după funcționalizare, dimensiunea

medie finală a particulelor MPP₅B-SA este de ordinul a 900 nm, în timp ce pentru loturile MPCsB-SA și MTCsB-SA este de ordinul a 2 μm și respectiv > 3 μm pentru lotul MCCsB-SA.

Dimensiunea medie a particulelor MPP₅B-SA, MPCsB-SA și MTCsB-SA este adecvată aplicațiilor acestor particule în mediul sangvin, în timp ce dimensiunea lotului MCCsB exclude posibilitatea utilizării acestui lot în tehnici de detoxifiere sangvină, în contact cu sângele aceste particule putând determina ocluzia capilarelor, prin dimensiunile mai mari de 3 μm.

Particulele magnetice funcționalizate prezintă valori negative ale potențialului Zeta cuprinse între -27 mV și -12 mV. Creșterea dimensiunii medii a particulelor în urma funcționalizării cu SA, corelată cu scăderea valorii potențialul Zeta confirmă prepararea particulelor magnetice biofuncționalizate.

VI. 3. Determinarea cantitativă a SA imobilizată pe particulele magnetice funcționalizate

Cantitatea de SA imobilizată pe particule a fost determinată prin spectroscopia UV-VIS. Pe baza curbei de etalonare a SA anterior trasate s-a determinat SA din supernatant iar prin diferență s-a calculat cantitatea de SA legată de particulele magnetice biotinite. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 14. Din analiza valorilor se constată dependența directă a cantității de SA imobilizată pe particule de gradul de biotinitare al acestora, în sensul că cea mai mare cantitate de SA s-a legat pe lotul MPCsB cu cel mai ridicat grad de biotinitare.

Tabelul 14. Cantitatea de SA imobilizată pe particulele biotinite

Particulă cu SA	MPCsB-SA	MCCsB-SA	MTCsB-SA	MPP5B-SA
Cantitate SA				
10³ x mmoli/g particulă	150	120	110	102

VI. 4. Testarea *in vitro* a eficienței de captare a unei toxine model pe particulele magnetice funcționalizate cu SA

Testarea *in vitro* a eficienței de captare a particulelor magnetice funcționalizate s-a realizat folosind o toxină model: peroxidaza din hrean (HRP). HRP este o enzimă izolată din rădăcina de hrean și aparține clasei de peroxidaze feroprotoporfirinice. Această enzimă are capacitatea de a oxida o varietate largă de substraturi, precum cele cromogenice, chemiluminiscente (luminol și izoluminol) și fluorogenice (tiramină, acidiul homovanilic).

Din punct de vedere structural HRP, este o polipeptidă liniară care prezintă în structură 4 punți disulfidice. Această glicoproteină conține aproximativ 18 % carbohidrați, precum galactoză, arabinoză, xiloză, fucoză, manoză manozamină și galactozamină aflate în diverse rapoarte în funcție de tipul enzimei [256].

VI. 4. 1. Determinarea cantitativă a toxinei model captate pe particulele magnetice funcționalizate cu SA

Cantitatea de toxină model captată pe particulele magnetice funcționalizate cu SA a fost determinată prin metoda spectrofotometrică, măsurându-se valoarea absorbantei soluției inițiale de toxină corespunzătoare maximului lungimii de undă la care absoarbe acest compus (405 nm), în raport cu valoarea absorbantei supernatantului rezultat în urma centrifugării particulelor pentru separarea toxinei libere. Pe baza curbei de etalonare a HRP trasate anterior s-a determinat cantitatea de toxină din supernatant iar prin diferență s-a calculat cantitatea de toxină captată de particulele magnetice funcționalizate. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 15.

Din analiza rezultatelor se constată că cantitatea de toxină pe particulele magnetice funcționalizate este cuprinsă în intervalul 24×10^3 mmoli/g particulă și 38×10^3 mmoli/g particulă și faptul că eficiența de legare a toxinei este dependentă de cantitatea de SA imobilizată pe particule, în sensul că cu cât cantitatea de SA imobilizată pe particulele funcționalizate este mai mare cu atât cantitatea de toxină captată este mai mare.

Tabelul 15. Cantitatea de HRP captată pe particulele magnetice funcționalizate

Complex particulă HRP	MPCsB- SA-HRP	MCCsB-SA- HRP	MTCsB-SA- HRP	MPP ₅ B- SA-HRP
Cantitate HRP				
$10^3 \times$ mmoli/g particulă	38	34	28	24

VI. 5. CONCLUZII

1. S-au obținut particule magnetice funcționalizate prin imobilizarea SA pe suprafața particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită, respectiv a particulelor magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG prin intermediul legăturilor de tip ligand-receptor.

2. Particulele magnetice funcționalizate preparate au fost caracterizate din punct de vedere al dimensiunilor și al potențialului Zeta. În urma complexării cu SA dimensiunea

medie a particulelor crește în timp ce potențialul Zeta al acestora scade. Cantitatea de streptavidină imobilizată pe particulele magnetice a fost determinată prin spectroscopia UV-VIS.

3. Particulele magnetice funcționalizate au fost testate din punct de vedere al performanțelor de captare a unei toxine model. Cantitatea de toxină captată pe particulele magnetice a fost determinată prin spectroscopia UV-VIS. Particulele magnetice funcționalizate prezintă capacitatea de legare a toxinelor, cu mențiunea că cantitatea de streptavidină imobilizată pe particule este dependentă de gradul de biotinilare al particulelor iar eficiența de legare a toxinelor depinde de cantitatea de streptavidină imobilizată.

4. Proprietățile fizico-chimice coroborate cu rezultatele testelor de bio- și hemocompatibilitate precum și cu proprietățile magnetice excelente indică o potențială aplicație a acestor particule magnetice în detoxifierea sangvină.

CAPITOLUL VII

CONCLUZII GENERALE

Această lucrare și-a propus să aducă contribuții originale în domeniul preparării particulelor magnetice funcționalizate pe bază de polimeri naturali și sintetici și evaluării acestor particule ca sisteme suport cu aplicații în tehnici de detoxifiere sangvină. Cercetările efectuate în cadrul acestei teze, au permis schematizarea următoarelor concluzii generale:

1. Tehnica de separare magnetică în gradient înalt de câmp (HGMS) bazată pe particule magnetice funcționalizate se poate constitui ca o alternativă a metodelor actuale de detoxifiere sangvină. Această tehnică de detoxifiere sangvină presupune formularea particulelor magnetice funcționalizate sub formă de suspensii injectabile care pot fi introduse în sânge unde trebuie să recunoască și să capteze toxinele sangvine. Ulterior, prin tehnică extracorporeală sângele este circulat printr-un separator magnetic care are rolul de a capta și reține complexii particulă magnetică-toxină, apoi sângele purificat este reintrodus în organism. Separatorul magnetic trebuie să fie constituit din elemente care să permită contactul cu fluidul sangvin, să aibă capacitate mare de filtrare, să fie caracterizat de eficiență de captare a particulelor mai mare de 90 % pentru o singură trecere prin filtru; să aibă volum și greutate care să-l facă portabil și ușor de utilizat.

2. Pentru a putea fi folosite cu succes în această tehnică, particulele magnetice funcționalizate trebuie să îndeplinească anumite cerințe legate atât de structură cât și de proprietăți. Astfel, în primul rând trebuie să conțină un material magnetic caracterizat de magnetizare de saturație ridicată și comportament superparamagnetic pentru a putea fi captate cu ușurință în separatorul magnetic. Suprafața materialului magnetic trebuie să fie modificată cu compuși naturali sau sintetici care să-i asigure bio și hemocompatibilitate, stabilitate coloidală precum și care să prezinte grupări funcționale care permit atașarea fizică/chimică a unor compuși biologic activi. Particulele magnetice trebuie să fie funcționalizate cu compuși cu selectivitate și specificitate ridicată care au rolul de a recunoaște și capta toxinele sangvine. Aceste particule trebuie să fie bio- și hemocompatibile iar dimensiunea lor finală trebuie să fie cuprinsă în intervalul 1-3 μm .

3. Materialele magnetice utilizate cu precădere în aplicațiile biomedicale sunt reprezentate de oxizii de fier (Fe_3O_4 și $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) datorită proprietăților magnetice excelente precum magnetizare de saturație ridicată care permite manipularea acestor materiale în câmp magnetic și a comportamentului superparamagnetic care este compatibil cu utilizarea acestora în mediul intern al organismului.

4. Chitosanul este un polimer natural care se remarcă prin proprietăți biologice precum biocompatibilitate și bioadeziune dar și bune proprietăți chimice (prezența grupărilor funcționale de tip amino și hidroxil care permit atașarea chimică a compușilor

biologic activi). Biopolimerul poate fi cu ușurință formulat prin “tehnologii “curate” în sisteme particulare. Aceste proprietăți recomandă chitosanul ca un material adecvat pentru acoperirea particulelor magnetice.

5. Copolimerul bloc poli(succinimidă)-bloc-poli(etilen glicol)(PSI-b-PEG) îmbină proprietățile de bio- și hemocompatibilitate și capacitatea de a furniza nuclee pentru funcționalizări ulterioare, proprietăți care indică potențialul acestui copolimer de a fi utilizat ca material de acoperire a particulelor magnetice.

6. În cadrul lucrării de doctorat s-au preparat prin tehnici de lucru originale două noi tipuri de particule magnetice funcționalizate: particule magnetice cu matrice polimerică din polimer natural, și anume chitosanul, și particule magnetice cu polimer sintetic, reprezentat de PSI-b-PEG.

7. Particulele magnetice funcționalizate pe bază de chitosan și magnetită s-au preparat în 4 etape. Într-o primă etapă au fost preparate materialele magnetice reprezentate de magnetită. În timpul preparării s-au utilizat trei agenți tensioactivi reprezentați de Pluronic F127, CTAB și Tween 20. Particulele magnetice pe bază de chitosan și magnetită au fost obținute prin procesul de gelifiere ionică utilizând ca agent de reticulare tripolifosfatul de sodiu (TPP). A treia etapă a constat în biotinilarea particulelor magnetice pe bază de chitosan prin formarea unei legături covalente amidice între gruparea amino a chitosanului și gruparea carboxil a biotinei. În a patra etapă particulele magnetice biotinilate au fost funcționalizate cu streptavidină.

8. Prin tehnica XRD s-a confirmat că materialele magnetice preparate în prima etapă sunt reprezentate de cristale de magnetită. Dimensiunea medie a cristalelor de magnetită este de ordinul a 10 nm, dimensiune care asigură o comportare superparamagnetică a acestor materiale, comportare evidențiată și în curbele de magnetizare.

9. Datele de spectroscopie FT-IR coroborate cu datele analiza elementală și difractogramele XRD au evidențiat structura și compoziția particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită. Dimensiunea medie și încărcarea electrică a particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită preparate prin mecanismul de gelifiere ionică cu TPP pot fi controlate prin intermediul unor parametri, precum: masa molară a chitosanului utilizat, concentrația tensioactivului în soluție și raportul masic dintre chitosan/agent de reticulare.

10. Tehnicile de spectroscopie (^1H -NMR și FT-IR) au confirmat funcționalizarea cu biotină a particulelor magnetice pe bază de chitosan și magnetită. În urma procesului de biotinilare dimensiunea particulelor a crescut în timp ce potențialul Zeta al acestora a scăzut dar caracteristicile rămân în domeniul de valori adecvat aplicațiilor în contact cu fluidul sangvin. Tehnicile de microscopie electronică indică că particulele biotinilate conțin magnetită și că procesul de biotinilare nu modifică morfologia acestora. Particulele

magnetice biotinilate preparate prezintă magnetizare de saturație adecvată utilizării în aplicații biologice de separare magnetică dar și comportament superparamagnetic

11. Particulele obținute prezintă capacitate de redispersie în medii care pot interacționa cu mediul sangvin (soluții tampon fosfat cu pH slab bazic și respectiv pH slab acid, soluție de glucoză 10 % wt și ser fiziologic 0,9 % NaCl wt) și pot fi formulate ca suspensii magnetice cu administrare intravasculară. Hemocompatibilitatea particulelor magnetice biotinilate pe bază de chitosan și magnetită a fost demonstrată prin teste clinice convenționale de coagulare care au constatat în măsurarea timpului de protrombină și a indicelui normalizat internațional.

12. Dimensiunea finală a particulelor magnetice funcționalizate pe bază de chitosan și magnetită este cuprinsă în intervalul 1-3 μm , dimensiune adecvată aplicării acestor particule în mediul sangvin, deoarece particulele cu dimensiuni mai mici de 1 μm sunt eliminate rapid din circulația sangvină în timp ce particulele mai mari de 3 μm pot determina ocluzia capilarelor.

13. Particulele magnetice funcționalizate pe bază de PSI-b-PEG și magnetită au fost obținute tot în patru etape, prepararea magnetitei și respectiv a particulelor magnetice pe bază de PSI-b-PEG și magnetită realizându-se în cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară Petru Poni, Iași. În cadrul acestei lucrări s-a realizat biotinilarea particulelor printr-un procedeu care valorifică formarea legăturilor covalente de tip ester între gruparea hidroxil terminală a PEG-ului și gruparea carboxil a biotinei urmată de, biofuncționalizarea particulelor biotinilate cu streptavidină. Tehnica de spectroscopie ^1H -NMR a confirmat natura chimică a legăturii dintre biotină și copolimerul PSI-b-PEG. Difractogramele XRD au arătat că loturile de particulele magnetice biotinilate preparate conțin cristale de magnetită pură cu un conținut diferit în magnetită. Particulele magnetice biotinilate pe bază de PSI-b-PEG prezintă capacitate de redispersie în soluție de glucoză de concentrație 10 % wt și ser fiziologic (0,9 % NaCl wt) indicând posibilitatea de a fi administrate ca suspensii magnetice injectabile. Aceste particule magnetice biotinilate prezintă caracteristici de hemocompatibilitate.

14. Particulele magnetice funcționalizate preparate sunt de tip compozit magnetic. Acestea conțin mai multe particule de magnetită înglobate într-o matrice polimerică, în cazul chitosanului, respectiv copolimerică în cazul PSI-b-PEG-ului. Biofuncționalizarea particulelor magnetice s-a realizat valorificând principiul legăturilor de tip ligand-receptor. În urma complexării cu SA dimensiunea medie a particulelor crește în timp ce potențialul Zeta al acestora scade. Cantitatea de streptavidină imobilizată pe particulele magnetice depinde de conținutul de biotină al particulelor magnetice, în sensul că cu cât gradul de biotinilare al particulelor este mai mare cu atât cantitatea de streptavidină este mai mare.

15. Particulele magnetice funcționalizate au fost testate din punct de vedere al performanțelor de captare a unei toxine model. Particulele magnetice funcționalizate

prezintă capacitatea de legare a toxinelor, cu mențiunea că eficiența de legare a toxinelor depinde de cantitatea de SA imobilizată, adică cu cât cantitatea de SA este mai mare, cu atât cantitatea de toxină captată de particule este mai ridicată.

16. Particulele magnetice funcționalizate preparate prezintă proprietăți de recunoaștere și captare a toxinelor, proprietăți care coroborate cu caracteristicile de bio- și hemocompatibilitate și proprietățile magnetice excelente, le recomandă pentru utilizarea în tehnici extracorporeale de detoxifiere sangvină.

Rezultatele obținute pe parcursul acestei teze au fost valorificate prin următoarele publicații și comunicări științifice:

Lucrări publicate sau trimise spre publicare în reviste cu factor de impact:

1. Doina Hrițcu, Marcel I. Popa, Niculina Popa, Vasile Bădescu, **Vera Bălan**, Preparation and characterization of magnetic chitosan nanospheres, Turk.J.Chem. 33(2009), 785-796.
2. **V. Bălan**, M.I. Popa, L. Vereștiuc, A.P. Chiriac, I. Neamțu, L.E. Niță, M.T. Nistor, Functionalized magnetic composites based on block copolymers poly (succinimide)-b-poly(ethylene glycol) with potential applications în blood detoxification, Composites Part B: Engineering, in press, 10.1016/j.compositesb.2011.10.011.
3. **Vera Bălan**, Ivona Andreea Petrache, Marcel Ionel Popa, Maria Butnaru, Eugen Barbu, John Tsibouklis, Liliana Vereștiuc, Biotinylated chitosan-based SPIONs for blood-contacting applications, Journal of Nanoparticle Research, in press.

Lucrări publicate în volume de specialitate:

1. **V. Bălan**, M.I.Popa, L.Vereștiuc, Hemocompatible Biofunctionalized Magnetic Composites for Blood Detoxification Techniques, International Conference on e-Health and Bioengineering, EHB 2011, 24-26 noiembrie 2011-Iași-România.
2. **V. Bălan**, M. I.Popa, L. Vereștiuc, Preparation and characterization of magnetic particles based on chitosan, International Conference Applied Sciences - Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2010, Bacau – Slănic Moldova, 8-11 aprilie 2010.

Lucrări comunicate la Congrese Naționale și Internaționale:

1. **V. Bălan**, M.I. Popa, L.Vereștiuc, Hemocompatible Biofunctionalized Magnetic Composites for Blood Detoxification Techniques, International Conference on e-Health and Bioengineering, EHB 2011, 24-26 noiembrie 2011-Iași-România.
2. **Vera Bălan**, Liliana Vereștiuc, Marcel Ionel Popa, Ivona Andreea Petrache, Maria Butnaru, Eugen Barbu, John Tsibouklis, Biofunctionalized SPIONs with Potential Applications în Blood Detoxifying, 24th European Conference on Biomaterials, 4 – 9, Septembrie, Dublin 2011.
3. Andreea Ivona Petrache, **Vera Bălan**, Liliana Vereștiuc, Nanoparticule magnetice funcționalizate cu potențiale aplicații în tehnici de detoxifiere extracorporeală a

sângelui. Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, ediția a XIV-a, Iași 19-22 mai 2011.

4. **Vera Bălan**, Liliana Vereștiuc, Geanina Dodi, Marcel Ionel Popa, Tibor Adrian Ovari, Horia Chiriac, Gheorghe Iacob, Synthetic polymers as biocompatible coatings for magnetic nanostructured sensitive devices with biomedical applications, 5th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules, Olanda, Amsterdam, 26-28 Ianuarie 2011.
5. **Vera Bălan**, Gianina Dodi, Doina Hritcu, Niculina Popa, Vasile Bădescu, Marcel Ionel Popa, Obținerea și caracterizarea particulelor composite polimeri-magnetită, The XXXI-st Romanian Chemistry Conference, Ramnicu-Valcea, Romania, 6-8 Octombrie 2010.
6. **V. Bălan**, A.M.Vasi, M.Butnaru, V.Bădescu, M.I.Popa, L.Vereștiuc, Synthesis and characterization of functionalized chitosan-magnetite particles, 4th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering and Medical Devices, Sinaia, Romania, 23-25 Septembrie 2010.
7. Văsi Ana-Maria, **Bălan Vera**, Vereștiuc Liliana, Popa Ionel Marcel, Particule superparamagnetice funcționalizate cu potențiale aplicații în tehnici noi de detoxifiere sangvină. Simpozionul Național de Bioinginerie Medicală pentru Studenți și Tineri Cercetători Ediția a XIII-a 17-23 Mai 2010-Iași-România.
8. **V. Bălan**, M.I.Popa, L. Vereștiuc, Preparation and characterization of magnetic particles based on chitosan, International Conference Applied Sciences - Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2010, Bacau – Slănic Moldova, 8-11 Aprilie 2010.
9. **Vera Bălan**, Marcel I.Popa, Liliana Vereștiuc, Sinteza, caracterizarea și influența diverșilor factori asupra caracteristicilor particulelor magnetice, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, ediția a VI-a, "Noi frontiere în chimie și inginerie chimică", Iași- Romania, 18-20 Noiembrie 2009.
10. **Vera Bălan**, Liliana Vereștiuc, Marcel I.Popa, Chitosan-magnetite nanocomposites with potential applications în blood detoxification, a VII-a Ediție a Simpozionului Național de Biomateriale "Biomateriale și Aplicații Medico-Chirurgicale", 21-22 Octombrie 2009- București, România.
11. **Vera I. Bălan**, M. I. Popa, L. Vereștiuc, Nanocompozite magnetită-chitosan cu aplicații biomedicale, Zilele academice iesene, Progrese în știința compusilor organici și macromoleculari, Iași, Romania, 8-10 Octombrie, 2009.
12. **V.Bălan**, E.Tănase, M.I.Popa, D.Hrițcu L.Vereștiuc, Synthesis and characterization of chitosan-magnetite particles with biomedical applications, 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne-Switzerland, 7-11 Septembrie 2009.

13. **Vera I. Bălan**, M. I. Popa, D. Hrițcu, L. Vereștiuc, Nanocompozite magnetită-chitosan cu potențiale aplicații în detoxificarea sângelui. Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, ediția a V-a, "Materiale și procese inovative" Iași, 19-21 Noiembrie 2008.

Premii-burse:

1. Bursa Rudolf Cimdins a Societății Europene de Biomateriale (ESB), obținut la Congresul „22nd European Conference on Biomaterials, The annual conference of the European Society for Biomaterials” 7-11 septembrie 2009, Lausanne, Elveția.
2. Premiul I, Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, ediția a XIV-a, Iași 19-22 mai 2011, pentru lucrarea „Nanoparticule magnetice funcționalizate cu potențiale aplicații în tehnici de detoxifiere extracorporeală a sângelui”, autori: Andreea Ivona Petrache, Vera Bălan, Liliana Vereștiuc.

Membru în echipa de cercetare:

1. Proiect PNCDI-II, nr. 81051/3/12.09.2007, Cercetări privind implementarea separării magnetice în detoxifierea sângelui uman utilizând particule magnetice suport, perioada 2007-2010.
2. Contract nr. 12-110-2/2008 – Competitie PN II - Parteneriate în domeniile prioritare, Microsenzori magnetici implantabili pentru aplicații medicale, perioada 2008-2011.
3. Contract de finantare nr. 466/22.01.2009 (2009-2011) - Proiect în cadrul programului IDEI, Cercetări în domeniul design-ului matricilor polimerice pentru structuri senzitive, perioada 2009-2011.

Bibliografie selectivă

- [31] Arbab A.S., Bashaw L.A., Miller B.R., Jordan E.K., Lewis B.K., Kalish H., Frank J.A. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*. 2003, 229, 838–846.
- [32] Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys*. 2003, 36, 167–181.
- [33] Arruebo M., Pacheco F.R., Ibarra M.R. and Santamaria J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*. 2007, 2, 22-32.
- [186] Doina Hritcu, Marcel I.Popa, Niculina Popa, Vasile Badescu, Vera Balan, Preparation and characterization of magnetic chitosan nanospheres, *Turk.J.Chem.* 33(2009), 785-796.
- [184] Bao H., Li L., Zhang H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan–TPP nanoparticles in aqueous solutions. *J. Colloid Interf. Sci.* 2008, 328, 270-277.
- [195] Liaw, Lin J. YC Source. Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl. *J. Control. Release*. 2000, 68, 273-282.
- [199] Jaime E. Ramirez-V., Garcia A.A., Lee J. Immobilization of silver ions onto paramagnetic particles for binding and release of a biotin-labeled oligonucleotide. *React. Funct. Polym.* 2000, 43, 53–62.
- [104] Gui-yin, Huang, K., Jiang, Y., Ding, P., Yang D., 2008: *Biochemical Engineering Journal*, 40, p. 408-414.
- [177] Lesch H.P. *et al.* Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert Opin Drug Del.* 2010, 7, 551-564.
- [187] Schwertmann U., Cornell R.M. Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization. Weinheim, Cambridge: VCH. 1991.
- [192] Held G.A., Grinstein G., Doyle H., Sun S., Murray C.B. Competing interactions in dispersions of superparamagnetic nanoparticles. *Phys. Rev.* 2001, 64, 1240-1248.
- [193] Hamley I. W., Nanotechnology with soft materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42.
- [194] Hiemenz P.C., Rajagopalan R. Principles of Colloid and Surface Chemistry. 3rd Ed. Marcel Dekker. New York. 1997.
- [195] Robert J.H. Foundations of Colloid Science. Oxford University Press. New York. 1991
- [202] Lazhen S., Yongsheng Q., Yong G. and Junru T. Preparation of nanometer-sized black iron oxide pigment by recycling of blast furnace flue dust. *J. Hazard. Mater.* 2010, 177, 495–500.
- [203] Ma H., Qi X., Maitani Y. and Nagai T. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *Int. J. Pharm.* 2007, 333, 177-186.
- [205] Chen J. P., Yang P.C., Ma Y.H. and Wu T. Characterization of chitosan magnetic nanoparticles for in situ delivery of tissue plasminogen activator. *Carbohydr. Polym.* 2011, 84, 364-372.
- [²⁰⁷] Sun C., Lee J. and Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2008, 60, 1252–1265.
- [208] Mikhaylova M., Kim D.K., Bobrysheva N., Osmolowsky M., Semenov V., Tsakalakos T. and Muhammed M. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification *Langmuir*. 2007, 20, 2472-2477.
- [209] Aral C., Akugba J. Alternative approach to the preparation of chitosan beads. *Int. J. Pharm.* 1998, 168, 9- 15.
- [210] Mi F.L., Shyu S.S., Chen C.T., Schoung J.Y. Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and *in vitro* release. *Biomaterials*. 1999, 20, 1603- 1612.

- [211] Su Y.L., Wang J. and Liu H.Z. FTIR Spectroscopic investigation of effects of temperature and concentration on PEO–PPO–PEO block copolymer properties in aqueous solutions. *Macromolecules*. 2002, 35, 6426–6431.
- [212] Chesnutt B.M., Viano A.M., Yuan Y., Yang Y., Guda T., Appleford M.R., Ong J.L., Haggard W.O., Bumgardner J.D. Design and characterization of a novel chitosan/ nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. B*. **2008**, **88**, 491 – 502.
- [216] Papadimitriou S., Bikiaris D., Avgoustakis K., Karavas E., Georgarakis M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydr. Polym.* 2008, 73, 44–54.
- [217] Wu Y., Yang W., Wang C., Hu J., Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 2005, 295, 235–245.
- [218] **V. Bălan**, M. I. Popa, L. Verestiuc, Preparation and characterization of magnetic particles based on chitosan, International Conference Applied Sciences - Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2010, Bacau – Slănic Moldova, 8-11 aprilie 2010.
- [219] Grenha A., Seijo B., Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005, 25, 427-437.
- [220] Gan Q., Wang T., Cochrane C., McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf. B*. 2005, 44, 65-73.
- [221] Lopez-Leon T., Carvalho E.L.S., Seijo B., Ortega-Vinuesa J.L., Bastos-Gonzalez D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid. Interface. Sci.* 2005, 283, 344-351.
- [224] **V. Bălan**, E. Tănase, M. I. Popa, D. Hritcu, L. Verestiuc, Synthesis and characterization of chitosan-magnetite particles with biomedical applications, 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne-Switzerland, 7-11 Septembrie 2009.
- [225] **Vera Bălan**, Gianina Dodi, Doina Hritcu, Niculina Popa, Vasile Bădescu, Marcel Ionel Popa, Obținerea și caracterizarea particulelor composite polimeri-magnetită, The XXXI-st Romanian Chemistry Conference, Ramnicu-Valcea, Romania, 6-8 Octombrie 2010.
- [229] **V. Bălan**, M. I. Popa, L. Verestiuc, Preparation and characterization of magnetic particles based on chitosan, International Conference Applied Sciences - Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2010, ISSN 2066-7817, 322-327, Bacau – Slănic Moldova, 8-11 aprilie 2010.
- [228] Zhang H., Oh M., Allen C., Kumacheva E.. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery” *Biomacromolecules*, 2004, 5, 2461-2468.
- [230] Janes K.A., Alonso M.J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003, 88, 2769-2776.
- [231] Young A.G., Mc Quillan A.J. and Green D.P. In situ IR spectroscopy of avidin–biotin bioconjugation reaction on CdS particles films. *Langmuir*. 2009, 25, 7416–7423.
- [232] **Balan V.**, Petrache I.A., Popa M.I., Butnaru M., Barbu E., Tsibouklis J, Vereștiuc L., Biotinylated chitosan-based SPIONs for blood-contacting applications, *Journal of Nanoparticle Research*, in press.
- [233] Kasaai M.R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review *Carbohydr. Polym.* 2010, 79, 801–810.
- [235] **V. Bălan**, A.M. Vasi, M. Butnaru, V. Bădescu, M. I. Popa, L. Verestiuc, Synthesis and characterization of functionalized chitosan-magnetite particles, 4th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering and Medical Devices, ISSN 2069-0193, Sinaia, Romania, 23-25 Septembrie 2010.
- [236] Nielsen V.G., Khan E.S., Kirklin J.K., George J.F. Carbon Monoxide Releasing Molecule-2 Enhances Coagulation and Diminishes Fibrinolytic Vulnerability in Subjects Exposed to Warfarin. *Thrombosis. Res.* 2010, 126, 68-73.
- [237] Petrache A.I, **Bălăn V.**, Vereștiuc L., Nanoparticule magnetice funcționalizate cu potențiale aplicații în tehnici de detoxifiere extracorporeala a sângelui. Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, ediția a XIV-a, Iași 19-22 mai 2011.

- [238] Hansson K.M., Tosatti S., Isaksson J., Wettero J., Textor M., Lindahl T.L., Tengvall P. Whole blood coagulation on protein-adsorption resistant-PEG and functionalized PEG-coated titanium surfaces. *Biomaterials*. 2005, 26, 861-872.
- [239] Li F., Jun Y., Tian W. Effect of drying process on structure and property of polyaspartic acid resin. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2006, 40, 89–99.
- [240] Yamaura M., Camilo R.L., Sampaio L.C., Macedo M.A., Nakamura M., Toma H.E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2004, 279, 210–217.
- [241] K. Matsubara, T. Nakato, M. Tomida. ¹H and ¹³C NMR Characterization of Poly(succinimide) Prepared by Thermal Polycondensation of L-Aspartic Acid. *Macromolecules*. 1997, 30, 2305-2312.
- [243] **V Bălan**, M I Popa, L Verestiuc, A P Chiriac, I Neamtu, L E Nita, M T Nistor, Functionalized magnetic composites based on block copolymers poly (succinimide)-b-poly(ethylene glycol) with potential applications în blood detoxification, *Composites Part B: Engineering*, in press, 10.1016/j.compositesb.2011.10.011.
- [244] Patil Y., Sadhukha T., Ma L., Panyam J. Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J. Control. Release*. 2009, 136, 21–29.
- [247] Zhu S., Huang N., Xu L., Zhang Y., Liu H., Lei Y., Sun H., Yao Y. Biocompatibility of Fe-O films synthesized by plasma immersion ion implantation and deposition. *Surf Coat Tech* 2009, 203, 1523-1529.
- [248] Amarnath L.P., Srinivas A., Ramamurthi A. *In vitro* hemocompatibility testing of UV-modified hyaluran hydrogels. *Biomaterials*. 2006, 27, 1416-1424.
- [41] Chen H., Yuan L., Song W., Wub Z., Li Dan. Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. *Progr. Polym. Sci.* 2008, 33, 1059–108.
- [45] Sivaraman B., Latour R.A., The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials*. 2010, 31, 832–839.
- [249] Ma W.J., Ruys A.J., Mason R.S., Martin P.H., Bendavid A., Liu Z., Ionescu M., Zreiqat H. DLC coatings: effects of physical and chemical properties on biological response. *Biomaterials*. 2007, 28, 1620–1628.
- [250] Zhang M.G., Nguyenb Q.T., Ping Z.H. Hydrophilic modification of poly (vinylidene fluoride) microporous membrane. *J. Mem. Sci.* 2009, 327, 78-86.
- [251] Hua X., Von Zelewsky. Enantiomerically Pure Chiral Rull(L-L)₂ Building Blocks for Coordination Compounds. *A. Inorg. Chem.* 1995, 34, 5791-5797.
- [252] Dyson R.M., Maeder M., Neuhold Y.M., Puxty G. Analyses of 3-way data from equilibrium and kinetic investigations. *Anal. Chim. Acta*. 2003, 490, 99-108.
- [253] Yadav S.C., Kumari A., Yadav R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*. 2011, 32, 173-187.
- [254] A. Loosli, UE. Rusbandi, J. Gradinaru, K. Bernauer, CW Schlaepfer, M.Meyer et al., (Strept)avidin as Host for Biotinylated Coordination Complexes: Stability, Chiral Discrimination, and Cooperativity. *Inorganic Chemistry*. 2006, 45, 660 -668.
- [256] Deshpande S.S., *Enzyme Immunoassays, From Concept to product Development*, Chapman and hall, 1996, 169-171.