

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

al proiectului

Descifrând misterul din spatele aderenței puternice a polidopaminei: o abordare originală bazată pe introducerea de markeri izotopici locali

Cod proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-1463, Contract de Finanțare nr. PCE 201 / 23.02.2021

Perioada: 04.01.2021 – 31.12.2023

1. Introducere:

Polidopamina (PDA) este un material biomimetic cu aderență similară midiilor, descoperit în 2007. De atunci, interesul în utilizarea PDA ca strat intermediar pentru dezvoltarea de suprafețe funcționale a crescut în mod exponențial, în special datorită procesului simplu de depunere, aderenței puternice la aproape orice substrat, biocompatibilității și reactivității chimice. În ciuda creșterii numărului de aplicații ale PDA, identificarea mecanismului concret care să explice aderența sa atât de puternică la orice substrat rămâne o provocare de ordin fundamental, nerezolvată încă. Metodele analitice convenționale, inclusiv spectroscopia RMN pe solide pe probe în abundență naturală, furnizează doar informații globale, lipsite de selectivitate asupra pozițiilor moleculare substrat - PDA aflate în interacțiune. În acest context, soluția propusă a fost de a introduce markeri locali în PDA care pot să “raporteze” asupra interacțiunii lor cu atomii de la suprafața substratului. Ideea este implementată prin marcarea izotopică cu $2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ a fiecărei poziții chimice distincte din monomerul de dopamină (marcare selectivă): monomerii marcați selectiv vor fi utilizați pentru a sintetiza probe PDA@substrat, iar investigarea lor prin RMN pe solide va oferi informații cu rezoluție atomică. Schema propusă este originală, reprezentând prima abordare experimentală care poate rezolva într-un mod realist problema aderenței PDA, la nivel atomic, cu rezultate de mare impact asupra domeniului.

2. Obiective prevăzute/realizate ale proiectului:

O.1 Stabilirea protocolului de preparare a probelor cu proprietăți optimizate pentru experimentele RMN propuse: nanoparticule de SiO_2 decorate cu polidopamină (PDA) marcată selectiv cu $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv au fost realizate următoarele activități:

A.1.1. Prepararea substratelor de SiO_2 sub formă de nanoparticule (NP) adecvate pentru experimentele propuse.

Am optimizat un protocol experimental de obținere de nanoparticule (NP) de SiO_2 cu proprietăți controlate, care să poată fi utilizate ulterior drept substrat cu dimensiuni ajustabile pentru

depunerea de filme subțiri de polidopamină (PDA). Protocolul constă în metoda de sinteză a NP de SiO₂ cu diametrele dorite și în metode de control al calității NP obținute. Concret, am efectuat caracterizarea morfologică prin microscopie electronică SEM și TEM, urmată de analiza prin spectroscopie RMN pe solide (RMN-s) a caracteristicilor interne și de suprafață: abundență relativă a unităților structurale Q4/Q3/Q2, precum și identificarea speciilor chimice prezente la suprafața NP (grupări silanol și respectiv molecule de apă adsorbite pe suprafață).

Au fost testate două metode de preparare a NP de SiO₂:

a) reacția de hidroliză a TEOS (tetraetilortosilicat) în prezența sulfatului de dodecil sodiu (SDS), folosind hidroxid de amoniu (concentrație 0.5 M) ca și catalizator, iar solventul folosit a fost etanol - procedură raportată în literatură de Nishimori [I.H. Nishimori, M. Tatsumisago and T. Minami, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **9** (1997) 25–31] și

b) metoda sol-gel care implică reacții de hidroliză și condensare a tetraortosilicatului (TEOS, Si(OC₂H₅)₄) în prezența unei baze (NH₃) ca și catalizator – metodă raportată în literatură de Rahman [I.A. Rahman, V. Padavettan, *J. of Nanomaterials* **2012** (2012) Article ID 132424].

În cazul primei metode experimentele au avut loc la temperatura camerei, sub agitare magnetică (1000 rpm) prin adăugarea succesivă a reactanților. A fost studiată influența procentului masic de surfactant folosit și timpul de reacție asupra dimensiunii nanoparticulelor și omogenității acestora. În urma analizei prin microscopie SEM/TEM am observat că această metodă conduce la formarea de nanoparticule care nu sunt dispersate, ele fiind aglomerate în clusteri. În plus, forma nanoparticulelor obținute este neregulată.

În cazul celei de a doua metode prin reacția de hidroliză a moleculelor de TEOS se formează grupări silanol. Reacțiile de condensare/polimerizare între grupările silanol sau între grupările silanol și etoxi conduc la obținerea de lanțuri siloxan (Si-O-Si). S-a folosit metoda adăugării succesive a reactanților, urmând o procedură raportată în literatură. Concentrațiile reactanților pentru prepararea nanoparticulelor au fost:

Etanol (mol L ⁻¹)	TEOS (mol L ⁻¹)	[H ₂ O]/TEOS	NH ₄ OH (mol L ⁻¹)
4	0.012	1167	14

În procesul de preparare al nanoparticulelor au fost variați următorii parametri: timpul de reacție și scala de reacție. Condițiile optime de preparare sunt: concentrațiile de reactanți prezentate în tabel și agitare magnetică timp de 8 ore. În Fig. 1 se ilustrează faptul că, pentru condițiile de sinteză amintite mai sus, se obțin NP de SiO₂ cu diametre grupate majoritar în jurul valorii de aproximativ 150 nm. În continuare aceasta va fi metoda folosită pentru prepararea NP de SiO₂.

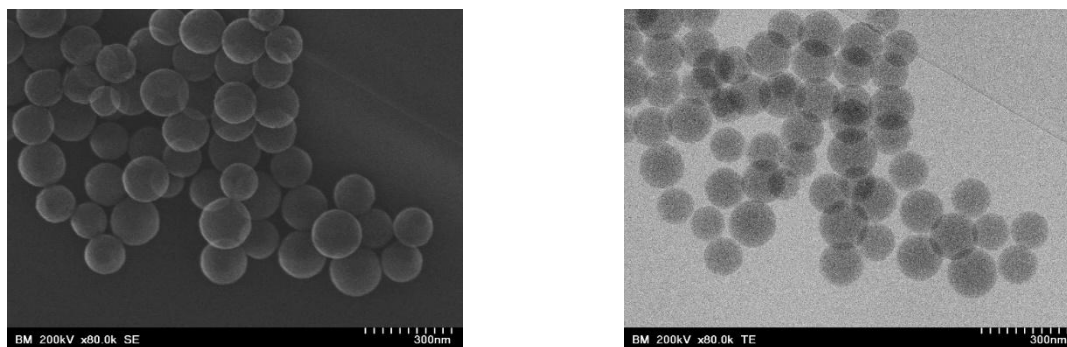


Fig. 1 Imagini SEM (stânga) și TEM (dreapta) ale unui cluster de NP de SiO₂ sintetizate conform metodei b)

descrișă în text.

Analiza prin spectroscopie RMN pe solide (RMN-s) a NP de SiO₂ sintetizate a urmărit cuantificarea unităților structurale de tip Q₄, Q₃ și Q₂ prezente în probe, precum și a speciilor care implică atomi de hidrogen la suprafața NP, de exemplu grupări silanol și molecule de apă. În primul caz am înregistrat spectre de ²⁹Si obținute prin excitare directă (cu un puls), iar din deconvoluția spectrului am obținut următoarea abundență relativă a unităților structurale din matricea de silice: Q₄ = 68%, Q₃ = 29% și Q₁ = 3% (Fig. 2a). De asemenea, din spectrul ¹H RMN-s (Fig.2b) se observă prezența preponderent a moleculelor de apă adsorbite la suprafața NP de SiO₂ și cuplate între ele prin legături de hidrogen, în timp ce grupările silanol se identifică prin prezența unei linii de absorbție la 1.4 ppm mult mai puțin intense.

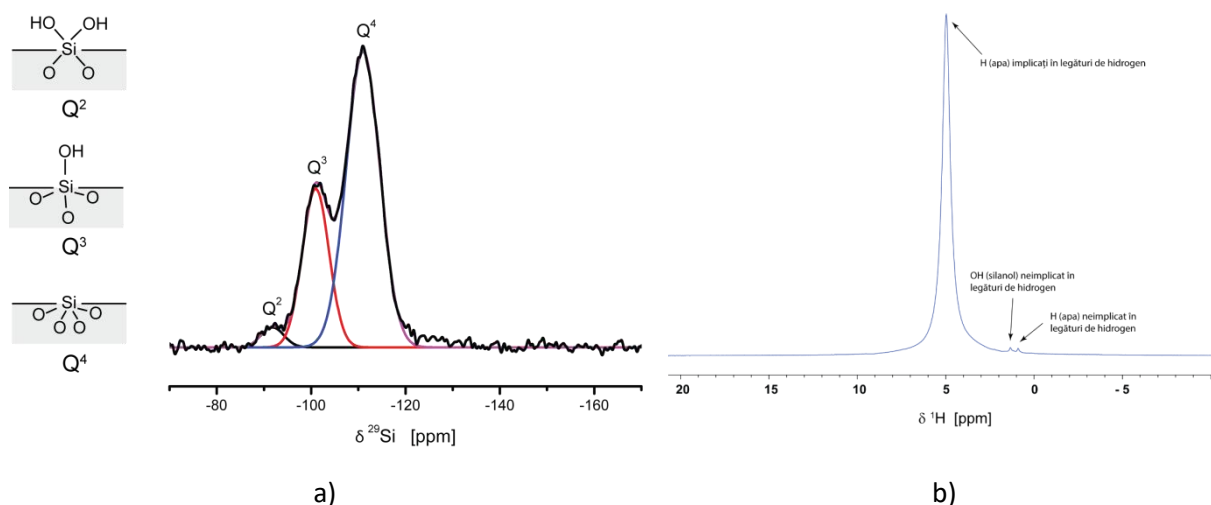


Fig. 2. a) Spectrul ²⁹Si RMN-s obținut prin excitare directă cu un puls, deconvoluția liniilor spectrale corespunzătoare unităților structurale Q₄ (-110.4 ppm), Q₃ (-101.3 ppm) și Q₂ (-91.8 ppm). Reprezentarea grafică a structurii specifice acestor unități structurale; b) Spectrul ¹H RMN-s obținut prin excitare directă cu un puls.

A1.2. Optimizarea procesului de preparare a nanoparticulelor de SiO₂ decorate cu PDA.

În cadrul acestei activități, NP de SiO₂ au fost utilizate cu scopul de a obține compozite de tip PDA@SiO₂, optimizate în raport cu uniformitatea și grosimea stratului de PDA depus. Protocolul de lucru a constat în două etape: (i) utilizând discuri plate de sticlă drept sisteme model pentru substrat, un studiu sistematic AFM ne-a furnizat mai întâi caracteristicile morfologice ale stratului de PDA depus, în funcție de condițiile de sinteză și (ii) pentru diferite condiții de sinteză selectate în urma studiului AFM, am preparat apoi compozite PDA@SiO₂ sub formă de nanoparticule, care au fost investigate prin microscopie electronică SEM/TEM și respectiv ¹³C RMN-s.

Studiu AFM asupra morfologiei stratului PDA de acoperire

Studiul experimental a urmărit influența metodei de sinteză, a timpului de depunere și a post-procesării prin ultrasonare asupra următoarelor caracteristici morfologice ale stratului de PDA obținut: uniformitatea filmului, grosimea de strat și rugozitatea medie. În acest raport vom prezenta rezultatele obținute pentru metoda convențională de oxidare a sării de Dopamină·HCl (DA·HCl) utilizând ca agent oxidant O₂ din aer, dizolvat în soluția apoasă de reacție. Cealți parametri experimentali utilizați sunt: concentrația de DA·HCl, 10.6 mM (2mg / ml), buffer de Tris la

concentrația de 10 mM, pH 8.5 la un volum total de reacție de 4 ml, agitare prin rotire în plan la 400 rpm. Discurile de sticlă curățate au fost plasate în interiorul vaselor de reacție pe durate de polimerizare (de depunere) de 1, 2, 6 și 24 ore. Fiecare experiment de depunere a fost repetat de trei ori. Discurile scoase din vasul de reacție au fost spălate cu apă distilată de trei ori și uscate în jet de azot. În final, aceste discuri au fost tăiate în două jumătăți și supuse analizei AFM: o jumătate a fost păstrată ca atare, iar cealaltă jumătate a fost supusă în plus ultrasonării timp de ½ h. Au rezultat în acest fel 12 probe distincte. Pentru a putea măsura grosimea stratului de PDA, pe fiecare dintre aceste jumătăți de discuri a fost trasată o zgârietură cu ajutorul unui ac de oțel. Pentru măsurarea grosimii de strat, de-a lungul zgârieturii trasate au fost considerate cel puțin trei zone diferite de scanare, iar pentru estimarea rugozității medii, s-au ales cel puțin trei zone de scanare la distanță de zona zgâriată, pentru fiecare zonă considerând cel puțin două arii de scanare (20 μm x 20 μm și 10 μm x 10 μm), iar în anumite cazuri și arii mici pentru analiza morfologică detaliată a stratului (1 μm x 1 μm). În final, studiul a cuprins un număr de peste 90 de imagini AFM care achiziționate per probă, prelucrate și analizate, cu scopul principal de a estima atât domeniul de variație a parametrilor urmăriți, cât și acela de a evidenția limitele de reproductibilitate ale metodei de depunere. Principalele concluzii care se desprind în urma analizei sistematice efectuate sunt prezentate în tabelul sintetic de mai jos (Tabel 1) iar în Fig.3 este prezentat un exemplu de imagine AFM de-a lungul zgârieturii pe proba PDA_O2_1h_us, și a metodei de determinare a grosimii de strat.

Tabel 1. Limitele de variație ale grosimii și rugozității medii a filmelor de PDA depuse pe substratele de sticlă, pentru fiecare dintre probele specificate. Rugozitatea medie este redată separat pe cele trei arii de scanare considerate – ariile de (1 μm x 1 μm) au fost măsurate doar în acele cazuri în care au putut fi identificate regiuni fără agregate de PDA de dimensiuni mari depuse pe suprafață.

Cod probă	Grosime [nm]	Rugozitate medie [nm]		
		(20 μm x 20 μm)	(10 μm x 10 μm)	(1 μm x 1 μm)
PDA_O2_1h_sp	4 ÷ 6	5 ÷ 6	4 ÷ 5	-
PDA_O2_1h_us	5 ÷ 6	2 ÷ 4	1 ÷ 3	0.5
PDA_O2_2h_sp	9 ÷ 10	8 ÷ 16	6 ÷ 12	-
PDA_O2_2h_us	8 ÷ 10	3 ÷ 4	2 ÷ 4	0.6
PDA_O2_6h_sp	18 ÷ 22	23 ÷ 27	18 ÷ 22	-
PDA_O2_6h_us	19 ÷ 20	4 ÷ 5	3 ÷ 6	1.2
PDA_O2_24h_sp	45 ÷ 50	128 ÷ 157	29 ÷ 56	-
PDA_O2_24h_us	42 ÷ 45	5 ÷ 7	5 ÷ 6	1.3

Pe baza rezultatelor listate în tabel se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Grosimea filmului de PDA depus pe substrat prezintă domenii de variație în general cuprinse între 1 - 4 nm, cu o dispersie mai mare, de 3-5 nm, pentru filmele obținute la 1 h durată de depunere.
2. Valorile absolute ale grosimilor măsurate concordă relativ bine cu rezultatele raportate în literatură (pentru probele procesate doar prin spălare). Procesarea suplimentară prin ultrasonare prezintă un efect neglijabil asupra mărimii acestui parametru.
3. Rugozitatea medie crește cu creșterea timpului de depunere, valoarea ei depinde și de aria de scanare considerată și poate fi redusă semnificativ prin ultrasonare, în special pentru durate mai mari de depunere.

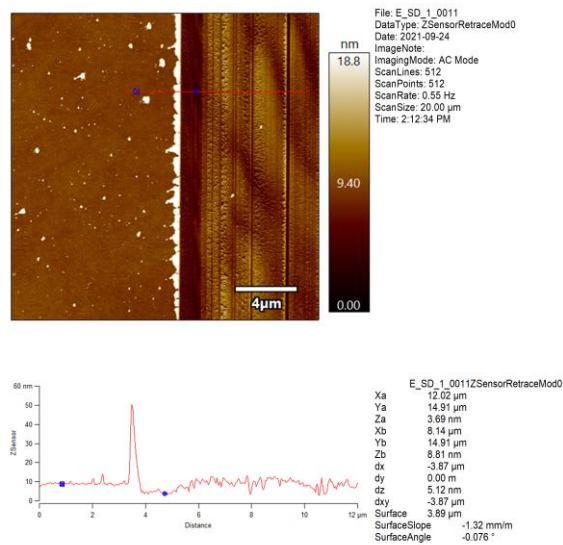


Fig. 3. Exemplu de imagine AFM de-a lungul zgârieturii pe proba PDA_O2_1h_us, și a metodei de determinare a grosimii de strat: linia roșie trasată în imaginea AFM reprezintă secțiunea utilizată pentru analiză. Grosimea stratului de PDA în această zonă a fost măsurată la $dz = 5.1 \text{ nm}$.

Studiu SEM/TEM pe compozite PDA@SiO₂

Studiul SEM/TEM efectuat pe compozite PDA@SiO₂-1h(6h) obținute la 1 h, respectiv 6 h timp de depunere confirmă formarea unui film uniform de PDA la suprafața NP de SiO₂ cu grosimi în concordanță cu rezultatele AFM, dar indică și faptul că nu toate nanoparticulele sunt acoperite – Fig. 4. În consecință, procesul de depunere de PDA pe NP de SiO₂ va trebui optimizat în continuare.

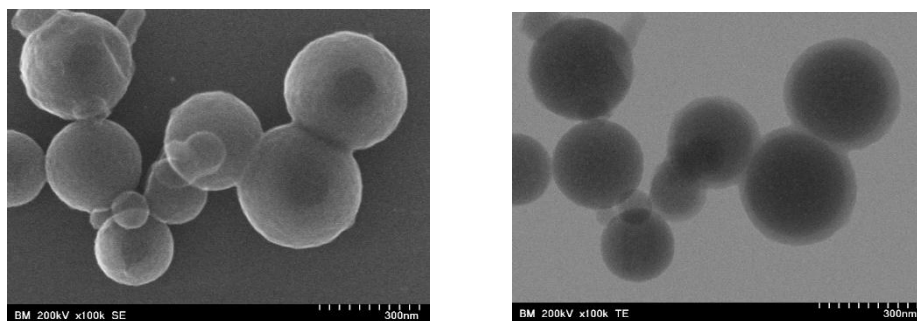


Fig. 4. Imagini SEM și TEM ale NP compozite de tip PDA@SiO₂ obținute la 6h timp de depunere. Stratul de PDA se observă în TEM sub forma unui halou de nuanță mai deschisă: grosimea estimată, de peste 40 nm, este în concordanță cu rezultatele AFM. De asemenea, imaginea arată că nu toate NP de SiO₂ sunt acoperite cu filmul de PDA. În SEM, PDA@SiO₂ se evidențiază printr-o suprafață mai puțin netedă în comparație cu NP de SiO₂.

¹³C RMN-s pe compozite PDA@SiO₂

Pentru analiza la nivel molecular a cele două tipuri de nanocompozite, spectrele ¹³C RMN-s înregistrate (Fig. 5) confirmă formarea filmului de PDA în ambele cazuri și evidențiază diferențe de intensități relative de linii între grupările alifaticе și cele aromatice. Cu toate că au fost acumulate foarte multe scanări (275k pentru PDA@SiO₂-1h și 81k pentru PDA@SiO₂-6h) raportul semnal/zgomot este unul foarte scăzut, ceea ce motivează pe deplin utilizarea de probe marcate izotopic pentru studiile ulterioare.

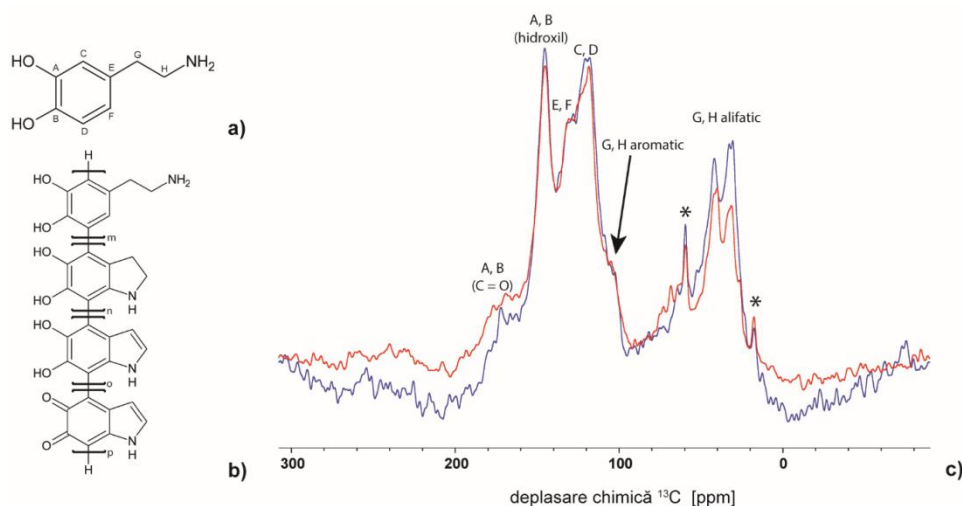
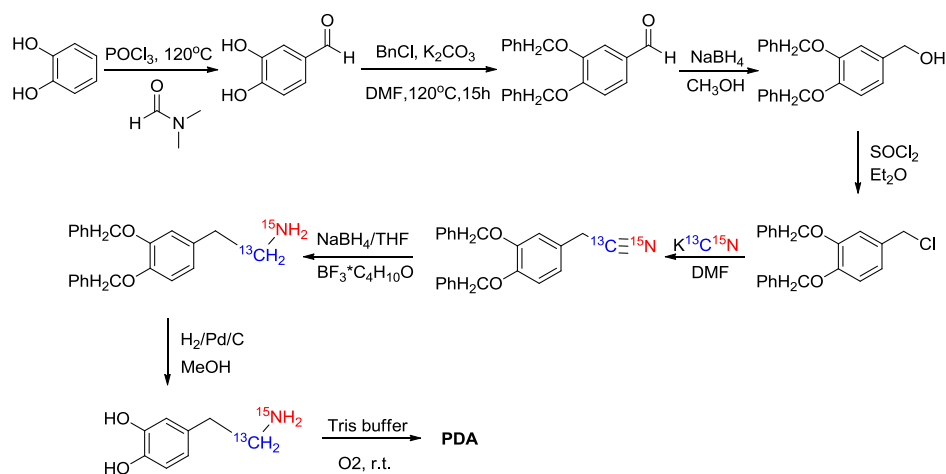


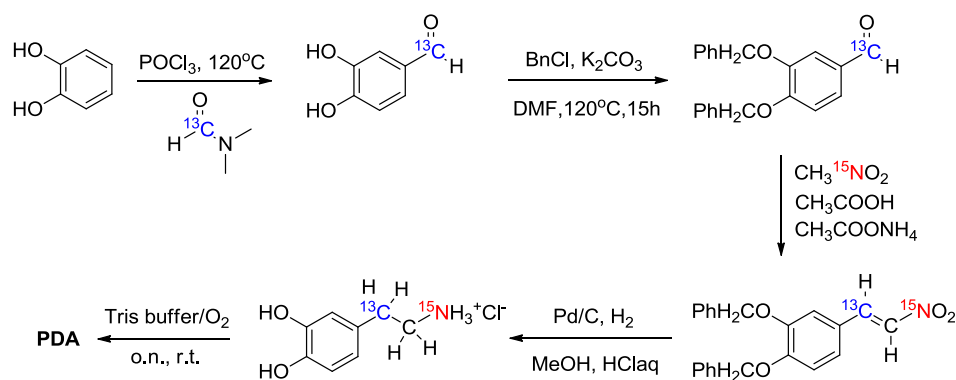
Fig.5. a) Structura chimică a moleculei de dopamină; b) model structural al polidopaminei și c) spectrele ^{13}C CP-MAS ale nano-compozitelor PDA@SiO₂-1h(6h) obținute la o oră (albastru) și respectiv șase ore (roșu) timp de depunere. Liniile spectrale marcate cu asterisk indică prezența urmelor de etanol folosit în procesul de sinteză a NP de SiO₂. Atribuirea liniilor spectrale diferitor grupări chimice confirmă formarea filmului de PDA la suprafața NP de SiO₂, iar diferențele de intensități relative din zona alifatică față de liniile grupărilor aromatice în cele două cazuri indică o eficiență mai ridicată a transferului de polarizare pentru PDA@SiO₂-1h, adică pentru filmul de PDA mai subțire.

A1.3. Marcarea izotopică selectivă a dopaminei cu ^2H , ^{13}C și ^{15}N .

Au fost obținute șase variante de marcarea izotopică selectivă a dopaminei cu ^{13}C , ^{15}N și ^2H . În primă instanță, s-a optimizat tehnologia de laborator pentru marcarea pozițiilor chimice de carbon și de azot de pe catena laterală. În vederea obținerii de dopamină marcată în cele două poziții de interes ale catenei laterale, anume C1 și C2, s-a urmat o strategie care presupune un șir de reacții succesive. S-a pornit de la catecol, un compus comercial ușor accesibil și s-au urmat o serie de pași care au dus în final la compusul țintit conform **Schemei 1** pentru marcarea la C1, respectiv **Schemei 2** pentru marcarea la C2. Așa cum se poate observa, primii doi pași de sinteză sunt identici, ceea ce duce la o diminuare a timpilor de lucru, sinteza efectuându-se pe o cantitate de materie primă mai mare inițial, și apoi continuând cu reacțiile specifice pentru fiecare compus țintă.



Schema 1. Pașii de sinteză pentru obținerea DA marcată cu ^{13}C și la poziția C1 și cu ^{15}N la gruparea amino din catena laterală



Schema 2. Pașii de sinteză pentru obținerea DA marcată cu ^{13}C și la poziția C2 și cu ^{15}N la gruparea amino din catena laterală

Schemele de reacții sunt ilustrate pentru marcarea simultană cu ^{15}N și ^{13}C a pozițiilor C1 sau C2, însă acestea se pot aplica și separat, pentru carbon sau azot. În cel mai general caz vor rezulta cinci variante distincte de compuși marcați selectiv cu ^{15}N și/sau ^{13}C pe catena laterală (lanțul alchilic) al dopaminei. În toate cazurile, produsul final se obține sub forma sării de clor a dopaminei. Randamentul global cu care se obține produsul final este de aproximativ 78% în cazul schemei 1, și respectiv 75% pentru schema 2.

Marcarea cu ^2H a pozițiilor de hidrogen de pe lanțul catecholic s-a efectuat conform tehnologiei de laborator dezvoltate de către noi în cadrul Programului Nucleu.

O.2 Caracterizarea interacțiunilor PDA – substrat la scală atomică prin RMN pe PDA marcată selectiv cu $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ și depozitată pe nanoparticule de silice; elaborarea unui model consistent, capabil să explice aderența puternică a polidopaminei.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv au fost realizate următoarele activități:

A.2.1. Fabricarea de compozite PDA marcate izotopic – SiO_2

S-a urmărit obținerea unor nanocompozite PDA@ SiO_2 având un strat de PDA marcată cu ^2H cât mai subțire, deoarece investigarea interacțiunii PDA – suprafața SiO_2 prin RMN-s necesită reducerea cât mai mult a semnalului RMN corespunzător PDA bulk.

Intr-o primă etapă, folosind nanoparticule (NP) de SiO_2 obținute prin protocolul experimental optimizat în cadrul activității A.1.1., au fost preparate patru sisteme PDA@ SiO_2 , testându-se influența timpilor de depunere și a tipului de agent de oxidare asupra grosimii stratului de PDA nemarcată izotopic de pe NP de SiO_2 . Procedura experimentală de preparare a NP de SiO_2 decorate cu PDA a fost următoare: NP de SiO_2 au fost suspendate în soluție tampon TRIS pH=8.5 și amestecul a fost supus ultrasonării timp de 30 de minute cu scopul de a dispersa nanoparticulele. Apoi a fost adăugat clorhidratul de dopamină și oxidantul (în cazul folosirii NaIO_4) iar amestecul de reacție a fost supus agitării magnetice (1000 rpm) pentru diferite intervale de timp. Nanoparticulele decorate cu PDA au fost separate din amestecul de reacție prin centrifugare (30 de minute, 4800 rpm) și au fost spălate cu apă distilată (3x 45 mL). Detaliile experimentale sunt prezentate în Tabelul 2.

Analiza SEM/TEM a NP de SiO_2 obținute și folosite pentru decorarea cu PDA indică formarea de nanoparticule cu dimensiuni între 100 și 300 nm (Fig.6).

Tabel 2. Detalii experimentale ale obținerii sistemelor PDA@SiO₂

Cod experiment	Oxidant	Cantitate oxidant (mg)	Cantitate NP SiO ₂ (mg)	Cantitate dopamine (mg)	Volum TRIS pH = 8.5 (mL)	Timp de reacție (h)
NPD 5	O ₂	- ^a	60	60	30	1
NPD 6	O ₂	- ^a	60	60	30	2
NPD 7	NaIO ₄	135.34	60	60	30	1/2
NPD 8	NaIO ₄	135.34	60	60	30	1

^a Reacția a avut loc în prezența aerului, neadăugând nici un tip de oxidant

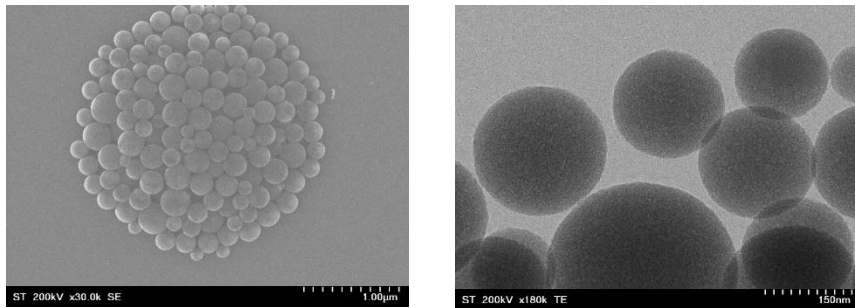


Fig.6. Imagini SEM (stânga) și TEM (dreapta) a NP SiO₂

În cazul probei NPD5, din analiza imaginile SEM/TEM (Fig.7a) se observă că PDA s-a depus sub forma unui strat subțire, relativ uniform, pe nanoparticulele de siliciu și că s-a format o cantitate foarte mică de PDA bulk. Comparativ cu proba NPD5, imaginile SEM/TEM ale probei NPD6 (Fig.7b), cu timp de reacție dublu față aceasta, prezintă depunerea unui strat mai gros și mai neuniform de PDA, precum și formarea unei cantități mici de PDA bulk.

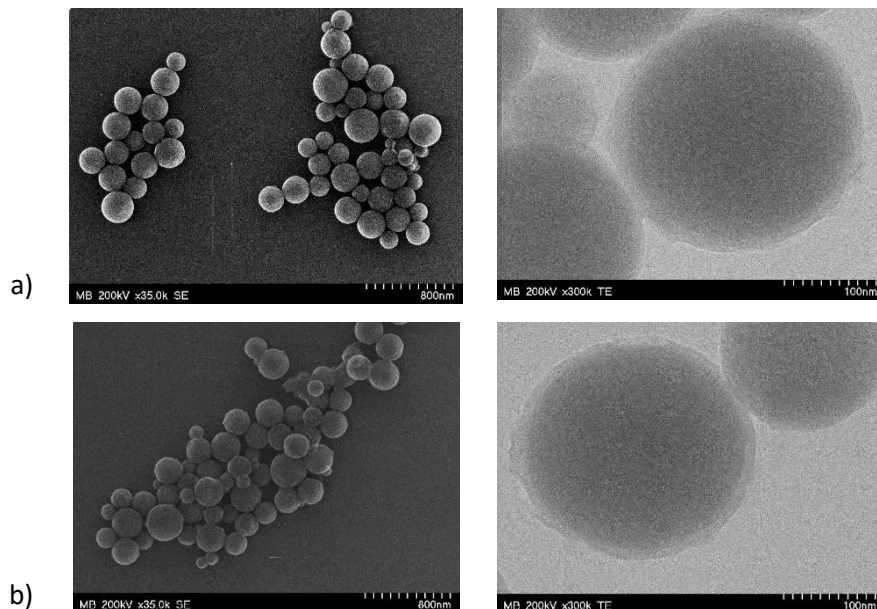


Fig.7. Imagini SEM (stânga) și TEM (dreapta) ale probelor NPD5(a) și NPD6 (b)

Spre deosebire de probele NPD5 și NPD6, în cazul probelor NPD7 și NPD8, pentru obținerea cărora s-a folosit ca și agent de oxidare NaIO₄, s-a constatat formarea unei cantități însemnate de PDA bulk,

chiar și la timpi de reacție de doar 0.5 ore. În plus, NP de SiO₂ sunt acoperite foarte puțin cu PDA, unele nefiind acoperite deloc. Imaginile SEM/TEM ale acestor probe sunt prezentate în Fig.8.

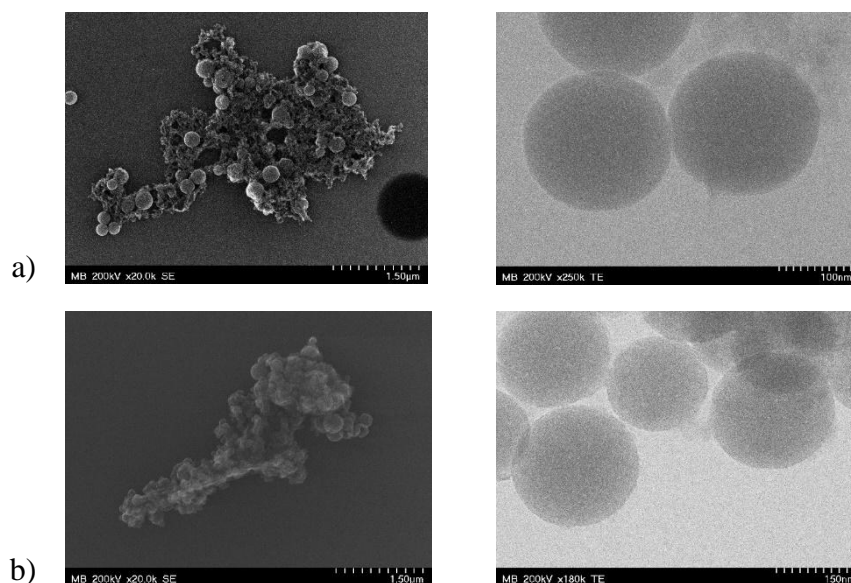


Fig.8. Imagini SEM (stânga) și TEM (dreapta) ale probelor NPD7(a) și NPD8 (b)

Considerând caracteristicile probelor NPD 5-8, în vederea obținerii unor nanoparticule acoperite cu un strat cât mai subțire de PDA și fără urme de PDA bulk în probă, s-a încercat o polimerizare folosind același protocol experimental cu agent oxidant aerul cu un timp de reacție scurt, de 0.5h (NPD11) și de 1h (NPD9). Imaginile SEM/TEM ale probei NPD11 sunt prezentate în Fig. 9. Se observă că PDA s-a depus sub forma unui strat foarte subțire și că s-a format o cantitate foarte mică de PDA bulk.

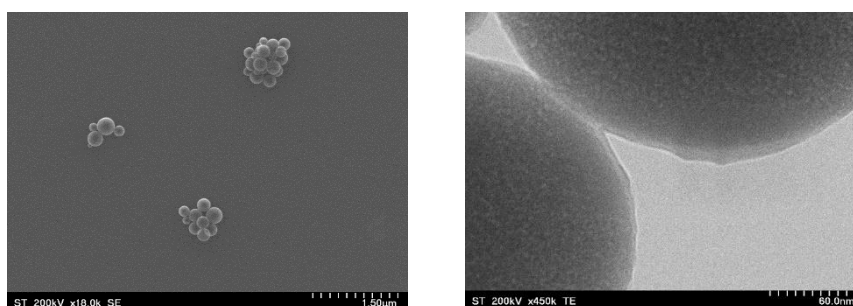


Fig.9. Imagini SEM (stânga) și TEM (dreapta) ale probei NPD11

Tinând cont de aceste rezultatele, în vederea investigării prin RMN, folosind dopamină marcată cu ²H și protocolul experimental utilizat în cazul sistemului NPD11, s-au preparat două sisteme PDA@SiO₂, detaliile experimentale fiind sintetizate în Tabelul 3.

Tabel 3. Detalii experimentale ale obținerii sistemelor PDA@SiO₂ cu PDA marcată izotopic cu ²H

Cod experiment	Oxidant	Cantitate oxidant (mg)	Cantitate NP SiO ₂ (mg)	Cantitate dopamină marcată cu ² H (mg)	Volum TRIS pH = 8.5 (mL)	Timp de reacție (h)
NPD 12	O ₂	- ^a	100	100	50	1/2
NPD 13	O ₂	- ^a	100	100	50	1

^a Reacția a avut loc în prezența aerului

Imaginile SEM/TEM ale acestor probe marcate izotopic cu ^2H sunt prezentate în Fig.10. În cazul ambelor probe stratul PDA marcat izotopic depus este foarte subțire, sub limita de detecție prin această tehnică. Chiar dacă în cazul NPD13 imaginea TEM (Fig.10b) prezintă o margine foarte luminoasă la suprafața nanoparticulei nu se poate afirma cu certitudine dacă este PDA depus sau un artefact.

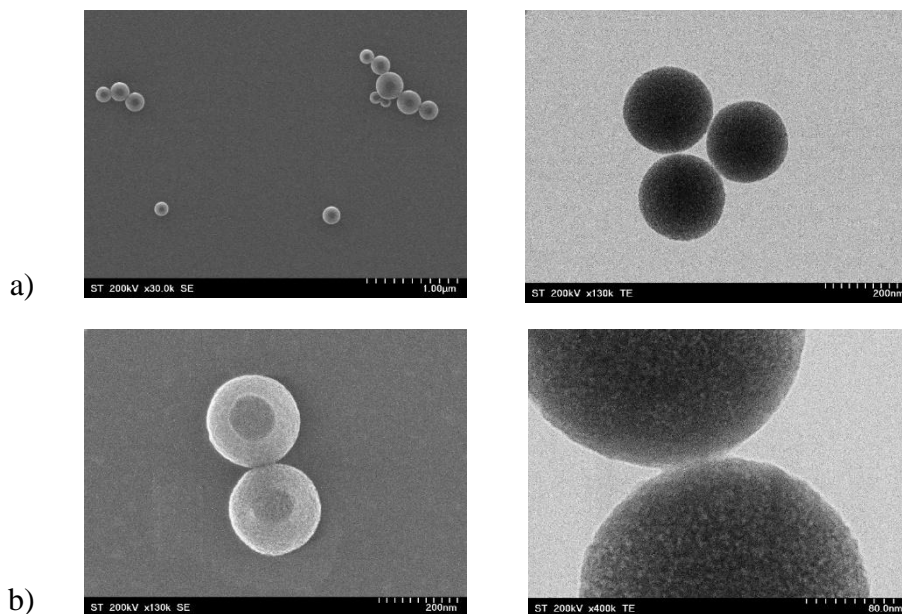


Fig.10. Imagini SEM (stânga) și TEM (dreapta) ale probei NPD12 (a) și NPD13 (b)

A2.2 Caracterizarea interacțiunii PDA – substrat prin spectroscopie RMN pe solide.

În cadrul acestei activități s-au caracterizat prin spectroscopie RMN pe solide probele NPD9, NPD11 și NPD12, utilizând secvențele de pulsuri ^{13}C CP-MAS (Cross-Polarization under Magic-Angle-Spinning) la o rotație a probei de 14 kHz și respectiv ^2H Spin-Echo, la o rotație de 10 kHz. Aceste experimente ne-au permis să monitorizăm efectul grosimii stratului de PDA depus, asupra spectrului ^{13}C CP-MAS al polidopaminei (prin comparația dintre probele NPD9 și NPD11), și de asemenea efectul substituirii izotopului ^1H cu ^2H pe inelul catecholic din monomerul de plecare, dopamina.

Principalele rezultate și concluzii ale acestor studii experimentale sunt redate în continuare. În Fig. 11.a, pentru referință, este prezentat spectrul ^{13}C CP-MAS al polidopaminei în bulk. Atribuirea peak-urilor spectrale pozițiilor de carbon din diferite unități structurale presupuse a exista în lanțurile oligomerice este prezentată în Fig.11.b.

Figura 12 prezintă spectrele ^{13}C CP-MAS al stratului de polidopamină pe nanoparticule de SiO_2 la timpuri de depunere de $\frac{1}{2}$ (NPD11), 1 oră (NPD9), a stratului de polidopamină marcată cu ^2H la pozițiile de pe inelul catecholic și PDA bulk. În cazul probelor NPD9 și NPD11 se remarcă scăderea progresivă a raportului semnal / zgomot pe măsură ce grosimea stratului se reduce de la ~ 10 nm la $\sim 6-7$ nm. Deși aceleași peak-uri RMN se observă în ambele cazuri, care sunt similar cu cele obținute pe polidopamina în bulk, se constată unele modificări în intensitățile relative între cele două cazuri. Surprinzător este în schimb spectrul ^{13}C CP-MAS al probei marcate izotopic: deși am considerat aceeași durată de depunere de $\frac{1}{2}$ oră, spectrele ^{13}C CP-MAS provenite de la polidopamina marcată izotopic și cea nemarcată prezintă diferențe majore. Proba marcată cu ^2H dă naștere la trei linii înguste în regiunea alifatică, la 21.9, 26.5 și 44.4 ppm, atipic pentru spectrul polidopaminei, care este caracterizat de linii ^{13}C RMN foarte largi. Regiunea aromatică, care dă benzile cele mai intense în

spectrul polidopaminei nemarcată, pare să conțină un semnal foarte larg și de intensitate aproape neglijabilă. Acest fapt relevă fie faptul că stratul de polidopamină obținut din dopamina marcată cu ^2H la pozițiile inelului catecolic este mult mai subțire (datorită unei cinetici mai lente a procesului de oxidare în acest caz), fie o scădere considerabilă a eficienței procesului de cross-polarizare comparativ cu polidopamina nemarcată.

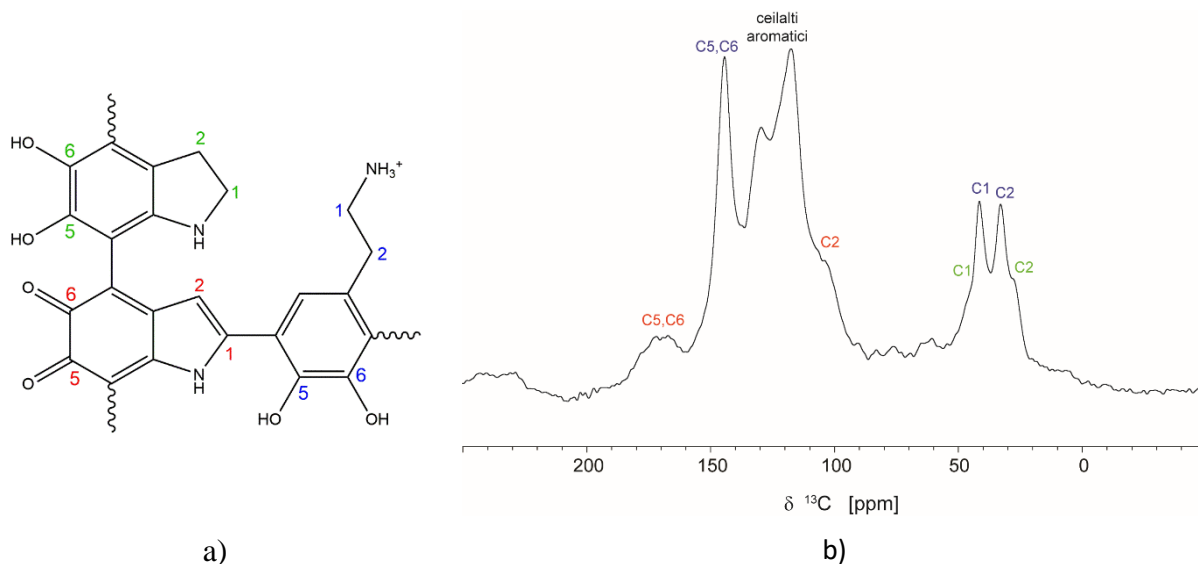


Fig.11. a) Posibile unități oligomerice în structura polidopaminei; b) Spectrul ^{13}C RMN pe solide al polidopaminei și atribuirea liniilor spectrale ^{13}C RMN

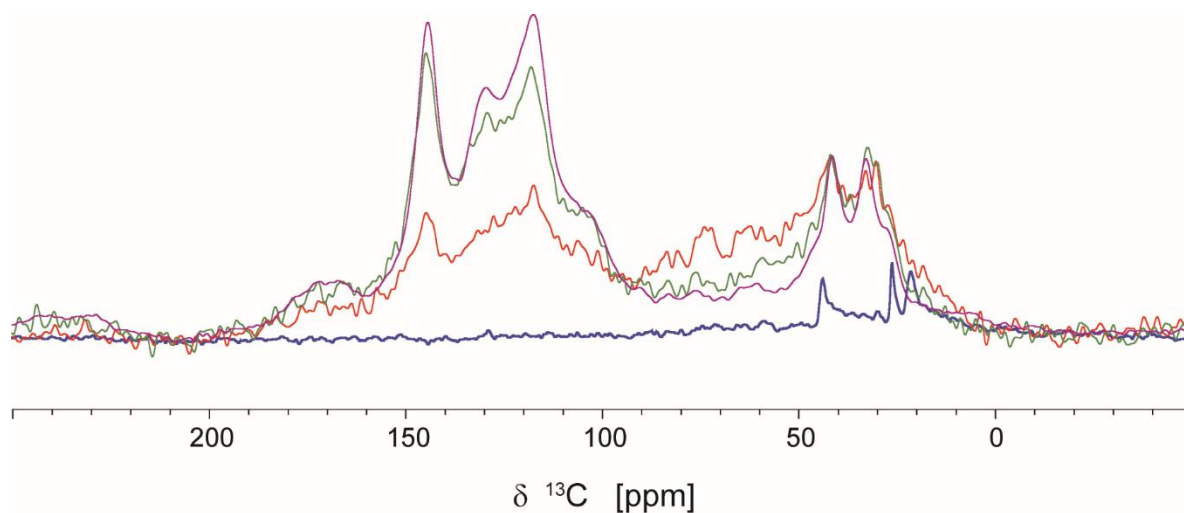


Fig.12 Spectrele ^{13}C RMN pe solide ale: PDA bulk (violet), straturilor de polidopamină de pe nanoparticulele de SiO_2 obținute la timpi de depunere de 1/2 h (roșu) și 1 h (verde), stratului de polidopamină marcată cu ^2H la pozițiile de pe inelul catecolic (albastru).

În Fig. 13 este prezentat spectrul ^2H MAS RMN al stratului de polidopamină pe nanoparticule de SiO_2 obținut la 1/2 oră timp de depunere, plecând de la dopamină marcată izotopic cu ^2H la pozițiile de pe inelul catecolic. Acest spectru ^2H RMN confirmă formarea stratului de polidopamină la suprafața substratului, distribuția de benzi rotaționale observată fiind aproape identică cu cea obținută pe polidopamina în bulk [M. Cîrcu, C. Filip *Polym. Chem.* **9**, (2018) 3379-3387].

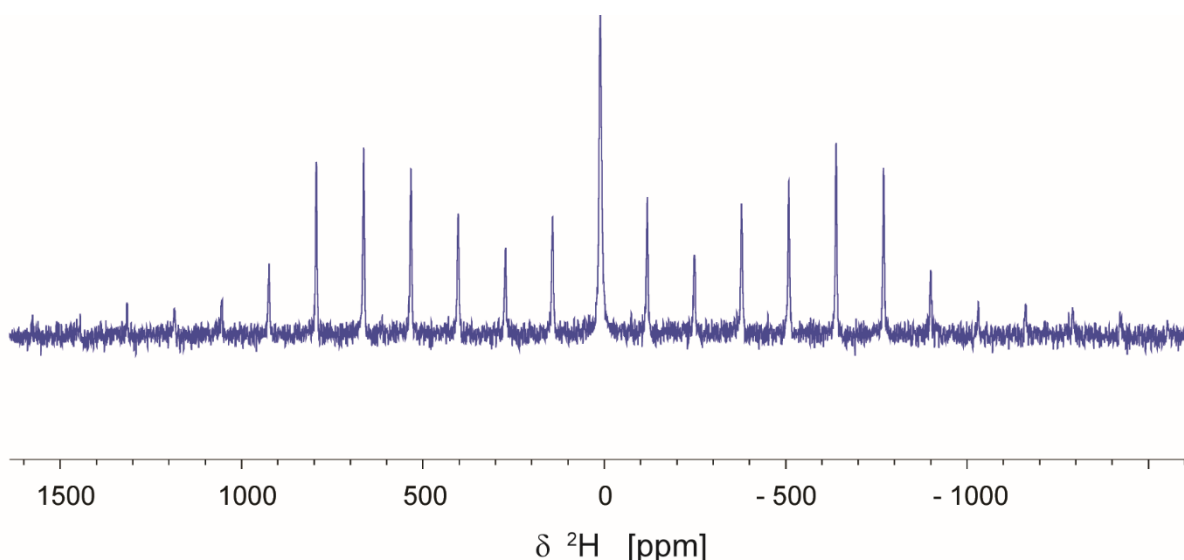


Fig.13. Spectrul ^2H RMN pe solide al stratului de polidopamină de pe nanoparticulele de SiO_2 la 1/2 h durată de depunere, pornind de la dopamină marcată cu ^2H la pozițiile inelului catecolic

A3.1 Determinarea mecanismului de aderență al polidopaminei la substrat prin corelarea informațiilor furnizate prin spectroscopie RMN pe solide

Rezultatele obținute pe durata desfășurării activităților proiectului au fost sistematizate și s-au corelat informațiile obținute prin diferite metode de spectroscopie RMN pe solide (RMN-s) cu scopul de a identifica efecte produse de interacțiunea dintre filmul de polidopamină (PDA) și substrat, în final de a le integra pe acestea în ipoteze asupra mecanismului de aderență al PDA. S-a evidențiat dezvoltarea metodologiei de sinteză a unor nanocompozite de tip PDA@SiO_2 cu caracteristici morfologice controlate (diametrul miezului de SiO_2 și grosimea stratului exterior de polidopamină, în funcție de condițiile de depunere). Principalele concluzii ale studiilor RMN-s efectuate pe aceste nanocompozite, preparate cu polidopamină marcată izotopic în poziții chimice selectate și în varianta nemarcată, sunt următoarele:

- ✓ spectroscopie RMN-s prezintă suficientă sensibilitate pentru a identifica efectele de suprafață (suprafața liberă și stratul de interfață dintre filmul PDA și substrat) care apar în spectru pentru grosimi ale filmului mai mici decât 5 nm
- ✓ Spectrele ^{13}C RMN-s indică o creștere a intensității liniilor alifatiche cu scăderea grosimii stratului de PDA, ceea ce este echivalent cu concentrație mai mare de unități structurale de tip "open-chain" la suprafețele filmului, inclusiv la interfața cu substratul
- ✓ Spectrele ^{15}N RMN-s prezintă o creștere intensității relative a liniei $-\text{NH}_3^+$ comparativ cu celelalte linii ^{15}N în PDA, ceea ce confirmă rezultatele obținute pe ^{13}C

Corelarea cu rezultate raportate în literatură.

Rezultatele obținute prin spectroscopie ^{13}C RMN-s pe compozite PDA@SiO_2 indică o abundență mai mare a configurațiilor alifatiche de tip "open-chain" în comparație cu cele aromatice de tip "closed-ring" ale unităților structurale derivate din dopamină, în zona de interfață dintre filmul de PDA și substrat. Aceste rezultate sunt în concordanță cu concluziile unui studiu comparativ [M.L. Alfieri et al, *ACS Appl. Mater. Interf.* **10** (2018) 7670] între PDA și produsul rezultat în urma polimerizării oxidative a di-hidroxi-indolului, adică varianta de tip "closed-ring" a dopaminei – Fig. 14. Concret, faptul că filmele de PDA cu grosimi de sub 5 nm au o concentrație crescută a unităților structurale de tip open-

chain se datorează afinității scăzute a substratului față de unitățile de tip DHI, similar cu concluziile din studiul menționat [M.L. Alfieri et al, *ACS Appl. Mater. Interf.* **10** (2018) 7670].

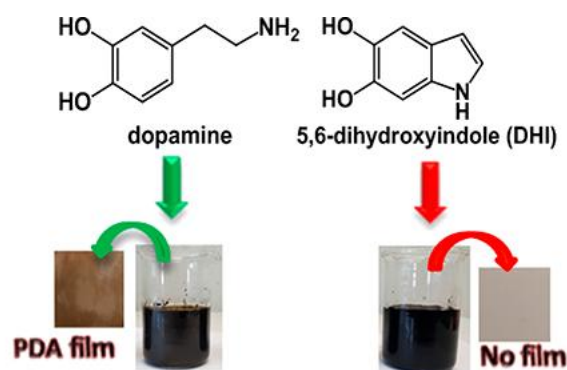


Fig. 14 Demonstrarea experimentală a faptului ca poli-indolul nu poate forma un film subțire aderent la substrat, spre deosebire de cazul polidopaminei

Principalul rezultat obținut din analiza spectrelor ^{15}N RMN-s pe compozite PDA@SiO_2 , respectiv creșterea abundenței de grupări amino protonate, $-\text{NH}_3^+$, la interfața dintre filmul de PDA și substrat se corelează cu concluziile unui alt studiu [S. Hong, Y. Wang, S.Y. Park, H. Lee, *Sci. Adv.* **4** (2018) 7457], care analizează rolul acestei grupări în formarea agregatelor de PDA prin intermediul unor interacțiuni de tip *cation- π* . În cadrul acestui studiu, s-a observat că un film de PDA depus pe substrat se dezassemblează în urma imersării într-o soluție alcalină (pH 10) de NaOH, dar se reformează prin adăugarea de ioni de potasiu (KCl). Procesul a fost demonstrat prin spectroscopie XPS (Fig. 15). În primă fază, deprotonarea grupării amino, $-\text{NH}_3^+ \rightarrow -\text{NH}_2$, introduce ioni de Na^+ în sistem, dar aceștia nu pot asigura o legătură suficient de puternică pentru a menține lanțurile oligomerice de PDA în stare agregată. Înlocuirea acestora cu ioni de K^+ determină interacțiuni *cation- π* mai puternice, capabile să restaureze filmul de PDA prin reagregarea lanțurilor oligomerice. În analogie cu aceste rezultate, studiile noastre indică de asemenea o importanță crescută a grupărilor $-\text{NH}_3^+$ în vecinătatea substratului, și pot explica în acest mod interacțiunea puternică dintre filmul de PDA și suprafața substratului.

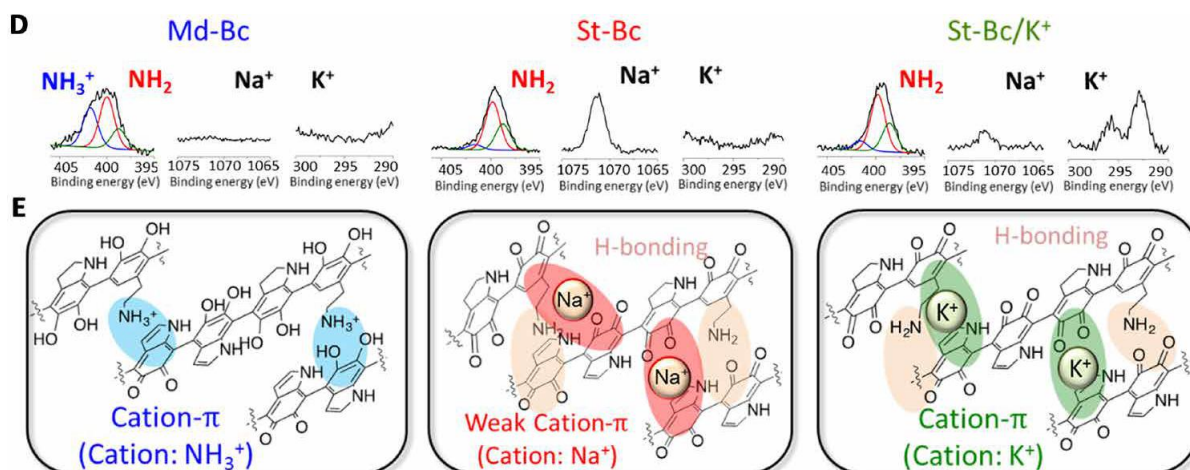


Fig. 15 Reformarea stratului de polidopamina în prezența ionilor K^+ în condiții de dezasamblare în mediu puternic alcalin (pH 10)

Ipoteze asupra mecanismului de aderență al polidopaminei la substrat

În ciuda numărului mare de aplicații ale PDA, în special ca strat de acoperire al suprafețelor, *identificarea mecanismelor moleculare care să explice aderența sa atât de puternică la orice substrat* a constituit o provocare de ordin fundamental. Principalul motiv este dat de faptul că metodele analitice convenționale furnizează doar informații globale, lipsite de selectivitate asupra pozițiilor moleculare substrat - PDA aflate în interacțiune. În acest context, proiectul IZO-PDA a implementat o soluție originală, prin intermediul căreia am reușit în final să aducem o contribuție semnificativă la rezolvarea acestei provocări. Corelând informațiile obținute de către noi prin analiza datelor $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ RMN-s cu informațiile existente în literatură, în final s-a conturat următoarea imagine privind interacțiunile cele mai probabile dintre oligomerii de PDA aflați în contact direct cu substratul și suprafața acestuia din urmă: (i) la suprafața agregatelor de PDA domină unitățile structurale de tip dopamină, adică fără închiderea lanțului alchilic în grupări de tip indol/indolină; (ii) gruparea amino se află în starea protonată, adică încărcată electric ($-\text{NH}_3^+$), ceea ce generează interacțiuni electrostatice între PDA și regiunile polarizate negativ ale substratului; (iii) interacțiunile puternice ($-\text{NH}_3^+$)-substrat creează puncte în care stratul de PDA este puternic "ancorat" la suprafața acestuia, între ele putând să apară și alte interacțiuni mai slabe, de exemplu legături de hidrogen (prin intermediul inelelor catecholice/chinonice), van der Waals (implicand inelele aromatice), etc.

O.3 Crearea unei echipe de cercetare multidisciplinare, specializată în caracterizarea materialelor eterogene / dezordonate cu ajutorul tehnologiilor izotopice.

Echipa de implementare a proiectului IZO-PDA o câștigat prin competiție un proiect M-ERA.NET, *Interfețe bio-inspirate pentru dezvoltarea materialelor multifazice degradabile de generație următoare – InsBIOration*, <http://www.insbioration.de/project-description/>. Proiectul se derulează în perioada 2022-2025 în cadrul unui consorțiu din care mai fac parte Leibniz Institute of Polymer Research - Dresden (coordonator), Charles Sadron Institut - Strasbourg, National Institute of Chemistry - Ljubljana, University of Turku – Turku, Kunststofftechnik Bernt GmbH (parteneri). Partenerul român, INCDTIM, a primit o finanțare de 200.000 EUR.

Echipa de implementare a proiectului este implicată într-o nouă propunere de proiect, cu titlul *Puterea deuteriului: noi abordări în caracterizarea proceselor dinamice, de la scală moleculară la cea micro, în polidopamină și analogi ai acesteia*, depusă în cadrul competiției PCE 2023. Propunerea se află în stadiul de evaluare.

3. Prezentarea rezultatelor obținute, a indicatorilor de rezultat realizați; a nerealizărilor înregistrate față de rezultatele estimate prin cererea de finanțare (dacă este cazul), cu justificarea acestora

(1) **Două protocoale experimentale**, fiecare alcătuit din metodă de sinteză și procedură de caracterizare a calității produsului final: primul protocol se referă obținerea de NP de SiO_2 cu dimensiuni controlabile, iar cel de-al doilea se referă la obținerea de nano-compozite de tip PDA@ SiO_2 cu caracteristici ajustabile ale filmului de PDA depus. Protocoalele optimizate au stat la baza preparării tuturor sistemelor compozite de tip PDA@ SiO_2 utilizate pe parcursul derulării proiectului.

(2) Produse noi

- ✓ dopamină marcată izotopic cu: ^2H în pozițiile inelului catecolic, ^{15}N la poziția grupării amino și/sau cu ^{13}C în cele două poziții, C1 și C2, ale catenei laterale. În total au rezultat șase noi compuși marcați izotopic introduși în oferta de produse a institutului, <http://ro.itim-cj.ro/servicii/produse/>
- ✓ nano-compozite de tip PDA@SiO₂ cu caracteristici morfologice ajustabile (diametru miez de SiO₂ între 150-250 nm și grosime înveliș de PDA între 5-30 nm), în funcție de condițiile de sinteză

Diseminare:

(1) Articole în reviste cotate ISI

1. G. Melinte, O. Hosu, G. Ștefan, D. Bogdan, C. Cristea, G. Marrazza, "Poly-L-Lysine@gold nanostructured hybrid platform for Lysozyme aptamer sandwich-based detection", *Electrochimica Acta* **403**, (2022) 139718
2. D. Bogdan, I.G. Grosu, A. Moț, C. Filip, "How thick, uniform and smooth are the polydopamine coating layers obtained under different oxidation conditions? An in-depth AFM study" *Appl. Surf. Sci.* **597** (2022) 153680
3. M. Szukowska, Ł. Popena, E. Coy, C. Filip, J. Grajewski, M. Kempniński, Y. Kim, R. Mrówczyński "Replacing amine by azide: dopamine azide polymerization triggered by sodium periodate" *Polym. Chem.* **13** (2022) 3325-3334
4. X. Filip, A. Simion, I.G. Grosu, A-M.R. Gherman, C. Lar, C. Filip, „Structural comparison between polydopamine precipitate and coating layer down to nanometer film thicknesses”, *Appl. Surf. Sci.* - trimisă spre publicare

(2) Comunicări la conferințe științifice

1. D. Bogdan, I.G. Grosu, C. Filip, "Morphological characterization of polydopamine coated surfaces", *Advances in Applied Physics & Materials Science Congress – 11th APMAS-21, Oludeniz, Turkey*
2. C. Filip, I.G. Grosu, X. Filip, "Solid-state NMR as a powerful tool in polydopamine characterization", *Advances in Applied Physics & Materials Science Congress – 11th APMAS-21, Oludeniz, Turkey*
3. D. Bogdan, I.G. Grosu, M. Bocăneală, C. Filip "Polydopamine coatings morphology on spherical nanoparticles vs flat substrates" *Advances in Applied Physics & Materials Science Congress – 12th APMAS-22, Oludeniz, Turkey*
4. C. Filip, I.G. Grosu, A. Petran, M. Bocăneală, C. Lar, X. Filip "Study of polydopamine strong adhesion by solid-state NMR" *Advances in Applied Physics & Materials Science Congress – 12th APMAS-22, Oludeniz, Turkey*
5. D. Bogdan, C. Filip, I.G. Grosu, "Morphological characterization of quercetine@polydopamine coated surfaces" *Advances in Applied Physics & Materials Science Congress – 13th APMAS-23, Oludeniz, Turkey*

6. C. Filip, I.G. Grosu, X. Filip, A-M. R. Gherman, C. Lar, A. Petran "PDA@SiO₂ nanocomposite as a platform for studying Polydopamine adhesion" *Advances in Applied Physics & Materials Science Congress – 13th APMAS-23, Oludeniz, Turkey*

(3) Pagina web a proiectului, <https://www.itim-cj.ro/PNCDI/izopda/>

4. Impactul estimat al rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.

Impactul rezultatelor proiectului

Proiectul s-a finalizat cu obținerea unei serii de rezultate cu impact în cadrul comunității științifice din domeniu. Ele au o relevanță atât științifică, contribuind la mai buna cunoaștere a mecanismelor care contribuie la aderența puternică a polidopaminei (PDA) la orice tip de substrat, dar și tehnologică, prin introducerea unei metodologii originale în studiul procesului de aderență. Concret, au fost create nanocompozite de tip PDA@SiO₂ care, prin introducerea de markeri izotopici locali au permis investigarea prin spectroscopie RMN pe solide (RMN-s), cu rezoluție atomică, a interacțiunii dintre filmul subțire de PDA și substrat. Rezultatele finale, dar și cele parțiale obținute în etapele intermediare ale proiectului, au generat următoarele efecte:

- i. Au fost optimizate metodologiile de marcarea izotopică selectivă a dopaminei: cu izotopul ¹³C în pozițiile C1 și C2, precum și cu ¹⁵N la poziția grupării amino. Acești compuși marcați nu există în ofertele producătorilor / furnizorilor de pe piață, au fost obținuți pentru prima dată în cadrul proiectului și au fost incluși în oferta institutului (atât pentru o eventuală comercializare, cât și pentru susținerea unor viitoare colaborări). Polidopamina marcată izotopic sintetizată pornind de la dopamina marcată în diferite poziții a fost utilizată ulterior pentru investigațiile prin spectroscopie RMN-s prevăzute în cadrul proiectului.
- ii. A fost optimizată și implementată metodologia de fabricare a unor nanocompozite formate din nanoparticule de SiO₂ (cu diametre medii între 120-150 nm), acoperite cu straturi subțiri de PDA (de la câțiva nm până la 10-15 nm, în funcție de condițiile concrete de depunere), utilizând inclusiv marcarea izotopică selectivă a stratului de PDA. Tehnicile utilizate pentru controlul caracteristicilor morfologice ale nanocompozitelor PDA@SiO₂ sunt microscopia de forță atomică (AFM), respectiv microscopia electronică de scanare (SEM/TEM). Rezultatele au fost publicate: ref. [2] în lista de lucrări a proiectului.
- iii. Studiile efectuate pe nanocompozitele PDA@SiO₂ prin spectroscopie RMN-s au demonstrat că: (i) PDA sub formă de precipitat (bulk) este echivalentă structural cu PDA sub forma de strat de acoperire, spectrele fiind identice pentru grosimi ale stratului PDA de peste 10 nm; (ii) pentru grosimi mai mici ale stratului de PDA încep să fie detectate efectele de suprafață, ceea ce a permis identificarea grupărilor chimice cele mai afectate de interacțiunea cu substratul; (iii) spectroscopia RMN-s este o tehnică analitică adecvată detectării interacțiunilor PDA-substrat pentru grosimi ale stratului de acoperire mai mici de 5 nm. Rezultatele au fost publicate: ref. [4] în lista de lucrări a proiectului.

- iv. Rezultatele obținute pe parcursul derulării proiectului au avut un impact și asupra creșterii prestigiului și vizibilității internaționale a echipei de implementare: o parte din aceste rezultate ne-au permis implicarea în colaborări internaționale care au dus la publicarea a două articole științifice, ref. [1] și [3] în lista de lucrări a proiectului.

Rezultatul cel mai semnificativ:

Polidopamina (PDA) este un material biomimetic descoperit în 2007, care prezintă aderență similară midiilor. De atunci, interesul în utilizarea PDA ca strat intermediar pentru dezvoltarea de suprafețe funcționale a crescut în mod exponențial, în special datorită procesului simplu de depunere, aderenței puternice la aproape orice substrat, biocompatibilității și reactivității chimice. În ciuda creșterii numărului de aplicații ale PDA, *identificarea mecanismelor moleculare care să explice aderența sa atât de puternică la orice substrat* a constituit o provocare de ordin fundamental. Metodele analitice convenționale furnizează doar informații globale, lipsite de selectivitate asupra pozițiilor moleculare substrat - PDA aflate în interacțiune. În acest context, proiectul IZO-PDA a implementat o soluție originală, prin intermediul căreia am reușit în final să aducem o contribuție semnificativă la rezolvarea acestei provocări. Ea este bazată pe utilizarea de markeri izotopici $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ locali, care au oferit informații utile asupra interacțiunii PDA cu suprafața substratului în urma investigațiilor efectuate cu ajutorul spectroscopiei RMN pe solide. Ideea a fost implementată prin fabricarea de nanocompozite de tip PDA@SiO₂ cu morfologie controlată, urmată de o analiză comparativă a datelor RMN-s obținute pe straturi de PDA cu grosimi variabile, de la câțiva nm la 10-15 nm. Metodologia propusă este originală, reprezentând prima schemă experimentală care abordează problema aderenței PDA, la nivel atomic, cu rezultate de mare impact asupra domeniului. Astfel, *rezultatul cel mai important* îl reprezintă identificarea diferențelor structurale dintre oligomierii aflați la suprafața stratului de PDA (deci inclusiv la interfața cu substratul) și cei aflați la interiorul acestuia. Analiza rezultatelor ne-a permis în final să elaborăm ipoteze fundamentate experimental cu privire la mecanismele de aderență ale polidopaminei la orice tip de substrat: ele relevă rolul important al interacțiunilor electrostatice prin intermediul grupărilor amino protonate ($-\text{NH}_3^+$), în concordanță și cu datele raportate în literatură privind contribuția acestor grupări și la agregarea oligomerilor de PDA prin intermediul interacțiunilor de tip cation- π .

Rezultatele obținute sunt prezentate succint pe pagina web:

<https://www.itim-cj.ro/PNCDI/izopda/>

Director Proiect,

Dr. Claudiu Filip