



ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

**DERIVAȚI DE CHITOSAN SOLUBILI ÎN APĂ PENTRU APLICAȚII
BIOMEDICALE**

Rezumatul tezei de doctorat

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
CS I Dr. Habil. Luminița MARIN**

**DOCTORAND,
Chim. Bianca-Iustina ANDREICA**

2023

ACADEMIA ROMÂNĂ
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

Nr. 4363/26.09.2023

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **20 octombrie 2023**, ora **11:00**, în **Sala de Conferințe a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași**, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat „*Derivați de chitosan solubili în apă pentru aplicații biomedicale*”, autor Bianca-Iustina Andreica, în vederea acordării titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE: *CS I Dr. Valeria Harabagiu*

CONDUCĂTOR

ȘTIINȚIFIC: *CS I Dr. Habil. Luminița Marin*
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

REFERENȚI: *Prof. univ. Dr. Habil. Rodica Mihaela DINICĂ*
Universitatea "Dunărea de Jos", Galați

Conf. univ. Dr. Dalila BELEI
Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași

CS I Dr. Habil. Gheorghe FUNDUEANU
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Director,

Dr. Valeria Harabagiu



M. Harabagiu

Mulțumiri

Cuvintele nu sunt suficiente pentru a descrie mulțumirea, aprecierea și recunoștința pe care le port față de toți oamenii care m-au îndrumat, susținut și inspirat pe parcursul studiilor doctorale.

Mulțumiri deosebite conducătorului științific, doamnei **Dr. Luminița Marin**, pentru inițierea mea în lumea plină de provocări a științei și ghidarea pașilor spre succes. Îi sunt recunoscătoare pentru încrederea, sprijinul științific și moral și răbdarea de care a dat dovadă pe parcursul acestei perioade. Dumneaei a depășit granițele îndrumării științifice, contribuind totodată la dezvoltarea mea personală, motivându-mă în mod constant să ținesc cât mai sus și să devin cea mai bună versiune a mea.

Profunde mulțumiri doamnelor **Dr. Rodica Dinică** și **Dr. Dalila Belei** și domnului **Dr. Gheorghe Fundueanu** pentru disponibilitatea de a face parte din comisia de evaluare a tezei de doctorat, pentru timpul acordat analizei acesteia și pentru recomandările formulate.

Sincere și alese mulțumiri comisiei de îndrumare, formată din doamnele **Dr. Liliana Mititelu-Tarțău**, **Dr. Alina Nicolescu** și **Dr. Daniela Ailincăi**, care m-au sprijinit pe parcursul tuturor studiilor demarate. Mai mult, **Danielei** îi voi fi mereu recunoscătoare pentru sprijinul oferit încă din prima zi în care am intrat în laborator și pentru prietenia consolidată.

Mulțumesc **Academiei Române** pentru suportul financiar acordat pe parcursul stagiului de doctorat.

Mulțumesc de asemenea **conducerii Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** din Iași pentru sprijinul acordat în elaborarea tezei de doctorat și în instruirea mea ca tânăr cercetător.

Deosebite mulțumiri colegilor din cadrul **Laboratorului de Policondensare și Polimeri Termostabili**, prezența lor a contribuit semnificativ la frumusețea acestei perioade, iar sprijinul lor este incomensurabil. De asemenea, tuturor colegilor din departamentul **Intelcentru** cât și colegilor din **Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** doresc să le mulțumesc pentru contribuția importantă pe care au avut-o la săvârșirea acestei teze.

Mulțumiri speciale colectivelor din **cadruul Institutului de Fizică din Sao Paulo, Brazilia**, pentru primirea călduroasă pe care mi-au oferit-o pe parcursul stagiului, dar și pentru toate lecțiile de bunătate și de apreciere a vieții.

Le voi fi mereu recunoscătoare celor care mi-au devenit din colege, surori de suflet, **Anda** și **Monica**, dar și prietenelor mele **Magda** și **Anca**, care mi-au fost alături încă din momentul în care ziua de astăzi părea doar un vis îndepărtat.

Dragostea, recunoștința și mulțumirile adresate **familiei mele** nu sunt suficiente pentru a compensa tot ceea ce mi-au oferit de-a lungul vieții. În special, doresc să îi mulțumesc **mamei mele**, modelul meu pentru tot ceea ce înseamnă dăruință, muncă, iubire și putere.

Vă mulțumesc!

Cuprins

<i>Listă de abrevieri</i>	<i>1</i>
INTRODUCERE	5
CAPITOLUL I	11
<i>Derivați de chitosan solubili în apă</i>	<i>11</i>
I.1. Date generale. Obținere, proprietăți, solubilitate	11
I.1.1. Chitosanul. Proveniență, istoric și importanță	11
I.1.2. Proprietățile chitosanului	13
I.1.3. Solubilitatea chitosanului	14
I.2. Principalele clase de derivați de chitosan solubili în apă	16
I.2.1. Carboximetil chitosan	16
I.2.2. Chitosan PEGilat	16
I.2.3. Chitosan tiolat	19
I.3. Săruri cuaternare de amoniu	21
I.3.1. Generalități	21
I.3.2. Săruri cuaternare legate direct de lanțul de chitosan (<i>N,N,N</i> -trimetil chitosan – TMCS)	22
I.3.3. Limitarea efectelor secundare ale cuaternizării directe	25
I.3.3.1. Limitarea impactului bazei anorganice prin înlocuirea cu baze organice	25
I.3.3.2. Alchilarea prealabilă a chitosanului	25
I.3.3.3. Înlocuirea solventului	27
I.3.3.4. Înlocuirea iodurii de metil cu dimetil sulflat	27
I.3.3.5. Protejarea prealabilă a grupărilor hidroxil ale chitosanului	28
I.3.3.6. Efectul contra-ionului	29
I.3.4. Săruri cuaternare legate indirect de lanțul de chitosan	30
I.3.4.1. Legarea indirectă prin reacția dintre chitosan și clorura de glicidil trimetil amoniu	30
I.3.4.2. Legarea indirectă prin reacția selectivă la gruparea hidroxil primară	31
I.3.4.3. Legarea indirectă prin reacția selectivă la gruparea amino primară	32
I.4. Materiale pe bază de săruri cuaternare de chitosan utilizate în domeniul biomedical	35
I.4.1. Nanofibre pe bază de chitosan cuaternizat	35

I.4.1.1. Utilizarea aditivilor funcționali	36
a) Utilizarea alcoolului polivinilic (PVA)	36
b) Utilizarea acidului polilactic (PLA)	40
c) Utilizarea grafenului	40
I.4.1.2. Modificarea la suprafață	41
a) Cuaternizarea fibrelor comerciale	41
b) Cuaternizarea fibrelor sintetice	42
c) Cuaternizarea fibrelor naturale	44
I.4.2. Hidrogeluri pe bază de chitosan cuaternizat	46
1.4.2.1. Reticularea cu TPP	47
1.4.2.2. Reticularea cu GP	48
1.4.2.3. Reticularea cu dopamină	50
1.4.3.4. Alte clase de reticulanti	51
I.5. Concluzii	54
CAPITOLUL II	57
<i>Hidrogeluri pe bază de chitosan cuaternizat</i>	<i>57</i>
II.1. Introducere	57
II.2. Rezultate și discuții	60
II.2.1. Sinteza chitosanului cuaternizat	60
II.2.2. Prepararea hidrogelurilor și investigarea mecanismului de reticulare	62
II.2.3. Investigarea reologică	67
II.2.3. Investigarea morfologiei	70
II.2.4. Investigarea comportamentului de umflare	71
II.2.5. Evaluarea proprietăților adezive	73
II.2.6. Evaluarea activității antimicrobiene	74
II.2.7. Evaluarea hemocompatibilității <i>ex vivo</i>	76
II.2.8. Evaluarea biocompatibilității <i>in vivo</i> și a toxicității locale	77
II.2.9. Evaluarea biodegradabilității în sol	81
II.3. Concluzii	83
CAPITOLUL III	85
<i>Nanofibre pe bază de chitosan cuaternizat</i>	<i>85</i>
III.1. Nanofibre binare de chitosan/chitosan cuaternizat	85
III.1.1. Introducere	85

III.1.2. Rezultate și discuții	87
III.1.2.1. Prepararea și caracterizarea structurală și morfologică a nanofibrelor	87
III.1.2.2. Caracterizare supramoleculară și termică	90
III.1.2.3. Investigarea comportamentului nanofibrelor în soluții apoase; solubilizare, umflare, degradare și retenție de apă	92
III.1.2.4. Investigarea proprietăților mecanice și adezive	98
III.1.2.5. Investigarea activității antibacteriene	102
III.1.2.6. Investigarea biocompatibilității in vitro și in vivo	104
III.1.3. Concluzii	109
III.2. Nanofibre compozite pe bază de imino-chitosan/chitosan cuaternizat	111
III.2.1. Introducere	111
III.2.2. Rezultate și discuții	114
III.2.2.1. Prepararea și caracterizarea structurală și morfologică a nanofibrelor	114
III.2.2.2. Caracterizarea supramoleculară și termică	117
III.2.2.3. Investigarea comportamentului nanofibrelor în soluții apoase; umflare, degradare și cinetica de eliberare a vanilinei	120
III.2.2.4. Investigarea proprietăților mecanice	124
III.2.2.5. Investigarea activității antioxidante	125
III.2.2.6. Investigarea activității antimicrobiene	127
III.2.2.7. Investigarea proprietăților adezive și a ratei de transmitere a vaporilor de apă	128
III.2.2.8. Investigarea capacității de coagulare a sângelui	130
III.2.2.9. Investigarea biocompatibilității in vitro	134
III.2.2.10. Investigarea biodegradabilității în sol	135
III.2.3. Concluzii	137
CAPITOLUL IV	139
<i>Derivați de chitosan greșați cu lanțuri policarbonat alifatic</i>	139
IV.1. Introducere	139
IV.2 Rezultate și discuții	141
IV.2.1. Sinteza homopolimerilor de referință și a copolimerilor	141
IV.2.1.1. Obținerea poli(trimetilen carbonat)-ului utilizat ca referință	142
IV.2.1.2. Obținerea derivaților de chitosan greșați cu poli(trimetilen carbonat)	143

IV.2.2. Propunerea unui mecanism pentru obținerea copolimerilor și confirmarea acestuia _____	148
IV.2.3. Evaluarea solubilității _____	151
IV.2.4. Caracterizare morfologică și de suprafață _____	154
IV.2.5. Evaluarea biocompatibilității <i>in vitro</i> și a biodegradabilității _____	157
IV.3. Concluzii _____	161
<i>CAPITOLUL V _____</i>	<i>163</i>
<i>Partea experimentală _____</i>	<i>163</i>
V.1. Materiale _____	163
V.2. Echipamente _____	164
V.3. Metode _____	166
V.4. Sinteză și caracterizare _____	178
V.4.1. Sinteza clorurii de <i>N</i> -[(2-hidroxi-3-trimetilamoniu)propil] chitosan __	180
V.4.2. Sinteza și caracterizarea hidrogelurilor _____	184
V.4.3. Sinteza și caracterizarea nanofibrelor binare CS/HTCC _____	193
V.4.4. Sinteza și caracterizarea nanofibrelor compozite de imino-CS/HTCC	200
V.4.5. Sinteza homopolimerilor și a copolimerilor pe bază de chitosan _____	205
<i>CONCLUZII GENERALE _____</i>	<i>221</i>
<i>Bibliografie _____</i>	<i>231</i>

Chitosanul, a cărui istorie începe încă din 1859, este un biopolimer natural derivat din chitină, un component principal al resturilor de crustacee, exoscheletele insectelor și unele tipuri de fungi. Acesta a atras o atenție specială în domeniul aplicațiilor biomedicale, datorită proprietăților sale unice și potențialelor beneficii, generate de structura sa chimică. Biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, toxicitatea redusă și proprietățile antimicrobiene îl recomandă ca un candidat atractiv pentru o gamă largă de aplicații medicale, cu accent pe vindecarea rănilor, sisteme de transport al medicamentelor, ingineria tisulară și terapia genică. Cu toate acestea, chitosanul prezintă și un dezavantaj, solubilitatea sa limitată în medii apoase neutre sau bazice, aspect ce poate împiedica eficacitatea sa pentru anumite aplicații biomedicale. Această limitare a condus la dezvoltarea *derivaților de chitosan solubili în apă*, al căror scop a fost să păstreze proprietățile benefice ale chitosanului, în timp ce depășesc bariera indusă de solubilitatea restrânsă la mediul acid.

Solubilitatea limitată în apă a chitosanului derivă din structura sa chimică, care facilitează formarea de legături de hidrogen intra- și inter-moleculare, și în consecință un grad mare de cristalinitate. Derivații de chitosan solubili în apă sunt creați pentru a depăși această problemă, prin modificarea chimică a structurii chitosanului, fără însă a afecta catena principală. Aceste modificări pot implica metode precum grefarea, carboxialchilarea sau cuaternizarea, tehnici care introduc grupări care imprimă solubilitate în apă sau modifică distribuția globală a sarcinilor macromoleculii de chitosan.

Derivații de chitosan solubili în apă oferă mai multe avantaje distincte pentru aplicațiile biomedicale. În primul rând, aceștia pot fi ușor încorporați în soluții apoase, facilitând integrarea lor în formulări pentru sisteme de transport al medicamentelor, pansamente pentru răni și hidrogeluri cu multiple funcționalități. Solubilitatea lor îmbunătățită favorizează eliberarea controlată a compușilor bioactivi, conducând la o biodisponibilitate și eficacitate îmbunătățită. În plus, acești derivați pot îmbunătăți interacțiunile cu moleculele biologice, cum ar fi proteinele și acizii nucleici, aspect benefic pentru aplicații precum terapia genică și ingineria tisulară. Natura lor solubilă în apă favorizează, de asemenea, compatibilitatea lor cu sistemele biologice, reducând potențialul apariției reacțiilor adverse și îmbunătățind biocompatibilitatea.

În acest context, teza de doctorat a avut ca scop principal obținerea unor derivați de chitosan solubili în apă și a unor materiale pe baza acestora, vizând aplicarea lor în domeniul biomedical. Atingerea obiectivului general a fost urmărită în strânsă legătură

cu obiectivele specifice propuse la începutul stagiului: **O1** – Obținerea de chitosan cuaternizat cu un grad de cuaternizare care să asigure un echilibru între solubilitate și proprietăți, cu referire specifică la biocompatibilitate; **O2** – Design-ul și obținerea unor materiale pe bază de chitosan cuaternizat, cu aplicații biomedicale distincte, în acord cu necesitățile societății contemporane și **O3** – Dezvoltarea unei noi metode de modificare chimică a chitosanului, pentru a obține derivați cu solubilitate îmbunătățită și potențial aplicativ.

Așadar, teza de doctorat intitulată „*Derivați de chitosan solubili în apă pentru aplicații biomedicale*” a fost concepută și condusă astfel: (i) Sinteza și caracterizarea unor hidrogeluri pe bază de chitosan cuaternizat și o monoaldehidă naturală și evaluarea potențialului de a utiliza aceste materiale ca geluri biocide dezinfectante; (ii) Obținerea și caracterizarea unor nanofibre binare de chitosan/chitosan cuaternizat prin tehnica de electrofilare, cu rol potențial în medicina regenerativă și ingineria tisulară; (iii) Obținerea și caracterizarea unor nanofibre compozite pe bază de imino-chitosan/chitosan cuaternizat și investigarea acestora cu rol de pansamente hemostatice capabile să contribuie la vindecarea rănilor și (iv) Sinteza și caracterizarea unor noi derivați de chitosan, prin grefarea unor lanțuri de poli(trimetilen carbonat) și investigarea proprietăților esențiale pentru aplicații biomedicale.

Teza este structurată în două părți principale care cuprind cinci capitole: **Partea I** include **Capitolul I**, în care sunt prezentate succint datele de literatură relevante pentru tema studiată și **Partea II** ce cuprinde **Capitolele II, III, IV** în care sunt expuse rezultatele obținute în urma cercetării proprii și **Capitolul V** ce include prezentarea materialelor, tehnicilor și echipamentelor și datelor experimentale suplimentare.

Capitolul I este destinat prezentării datelor de literatură cu privire la tehnicile generale abordate pentru obținerea derivaților de chitosan solubili în apă, cu accent pe obținerea chitosanului cuaternizat. De asemenea, au fost prezentate și informații referitoare la stadiul actual al cercetării în domeniul hidrogelurilor și al nanofibrelor pe bază de chitosan cuaternizat utilizate în domeniul biomedical.

În **Capitolul II** sunt prezentate date despre obținerea și caracterizarea unor săruri cuaternare de chitosan și ulterior a hidrogelurilor pe bază de chitosan cuaternizat și salicilaldehidă, concepute pentru utilizarea ca geluri dezinfectante biocide. A fost realizată atât caracterizarea completă a hidrogelurilor din punct de vedere structural, supramolecular și morfologic, cât și investigarea proprietăților relevante pentru aplicația vizată, precum biodegradabilitatea, activitatea antibacteriană, biodegradabilitatea și biocompatibilitatea *in vivo*.

Capitolul III este divizat în două subcapitole; primul descrie obținerea de nanofibre de chitosan/chitosan cuaternizat, iar cel de-al doilea vizează extinderea

design-ului prin includerea vanilinei bioactive. Primul subcapitol evidențiază potențialul obținerii de nanofibre binare fără defecte, pornind de la un amestec de electrofilare care conține poli(etilen oxid) cu rol de agent de co-filare, pas urmat de eliminarea lui selectivă și totală din fibre. Fibrele au fost complet caracterizate din punct de vedere structural, morfologic și termic și au fost investigate în vederea evaluării comportamentului acestora în mediu apos, activitatea antibacteriană, muco- și bioadezivitatea, biodegradabilitatea, cât și biocompatibilitatea lor *in vitro* și *in vivo*. Cel de-al doilea subcapitol tratează obținerea de fibre încapsulate *in situ* cu vanilină, prin reacția de iminare a acesteia atât cu chitosanul, cât și cu derivatul cuaternizat. De asemenea, a fost realizată caracterizarea completă a fibrelor prin tehnicile menționate anterior. Aplicația urmărită pentru aceste fibre a fost de pansamente hemostatice cu rol în vindecarea rănilor, iar în acest sens a fost evaluată cinetica de eliberare a vanilinei, activitatea antioxidantă a fibrelor, și capacitatea acestora de sorbție și coagulare a sângelui, cât și de aderență a celulelor roșii.

În **Capitolul IV** este prezentată obținerea unui nou derivat de chitosan solubil în apă, prin grefarea de lanțuri de poli(trimetilen carbonat) pe catena principală a acestuia. Metoda de grefare a fost bazată pe capacitatea grupărilor hidroxil ale chitosanului de a acționa ca în reacția de polimerizare cu deschidere de ciclu a trimetilen carbonatului. Au fost evaluate diferite condiții de reacție în raport cu proprietățile derivaților obținuți, pentru a obține un raport optim solubilitate / proprietăți. Compușii care au prezentat solubilitate în apă au fost supuși caracterizării structurale, morfologice și de suprafață și a fost evaluată biodegradabilitatea și biocompatibilitatea *in vitro* a acestora.

Capitolul V prezintă pe larg partea experimentală care susține rezultatele prezentate în capitolele anterioare și cuprinde materialele, echipamentele și tehnicile utilizate pe parcursul studiilor efectuate. De asemenea, sunt descrise protocoalele de sinteză și de lucru, precum și informații suplimentare celor redată în capitolele precedente, precum spectre, grafice și imagini.

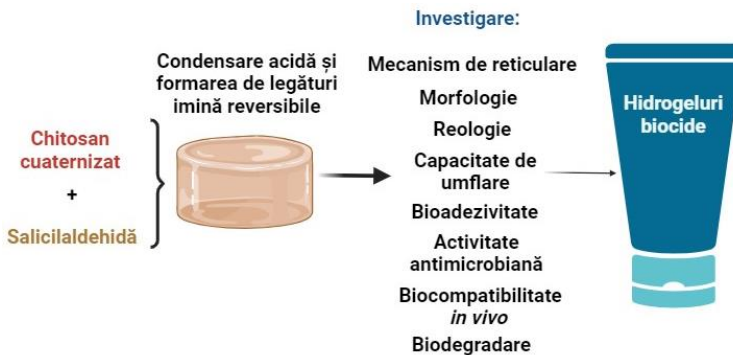
Teza se încheie cu prezentarea activității de diseminare realizată pe parcursul celor trei ani de studii doctorale, susținerea financiară care a contribuit la realizarea studiilor, mobilitățile efectuate pe perioada doctoratului și bibliografia consultată în vederea însușirii de noi informații și pentru interpretarea corectă a rezultatelor proprii.

Capitolul II

Hidrogeluri pe bază de chitosan cuaternizat

II.1. Introducere

Evenimentele globale recente, cum ar fi pandemia de COVID-19, au evidențiat importanța crucială a practicilor adecvate de igienă și nevoia de dezinfectanți eficienți pentru a preveni infecțiile cu bacterii și virusuri. Compușii cuaternari de amoniu sunt ingrediente bine-cunoscute ale dezinfectanților fără alcool, fiind capabili să interacționeze cu membranele bacteriilor, însă există anumite preocupări cu privire la ciclul lor de viață și impactul asupra mediului înconjurător, precum și sustenabilitatea limitată în obținerea lor [1]. O alternativă promițătoare este utilizarea sărurilor cuaternare de amoniu ale chitosanului, care prezintă avantajele originii naturale, bio- și mucoadezivitate, biodegradabilitate și biocompatibilitate, având totodată activitate antibacteriană cu spectru larg [2]. Mai mult, studii recente au raportat activitatea antivirală a clorurii de *N*-[(2-hidroxi-3-trimetilamoniu)propil] chitosan (HTCC) împotriva coronavirusurilor, inclusiv SARS-CoV-2 [3]. Luând în considerare toate aceste aspecte, scopul prezentului studiu a fost obținerea de hidrogeluri biocompatibile, biodegradabile și bactericide, pe bază de chitosan cuaternizat (HTCC) reticulat cu salicilaldehidă (SA) prin legături reversibile imină. Alegerea salicilaldehidei s-a bazat pe originea sa naturală și pe capacitatea sa de a forma legături imină cu chitosanul [4]. Hidrogelurile obținute au fost complet caracterizate din punct de vedere structural, morfologic, supramolecular și reologic. Pentru aplicația vizată, a fost evaluată activitatea lor antibacteriană într-o manieră dependentă de timp, precum și biocompatibilitatea *in vivo* și degradarea în sol (Schema II.1).



Schema II.1. Plan experimental pentru obținerea și caracterizarea hidrogelurilor.

au modificat semnificativ la încălzire, spre deosebire de cazul HTCC-ului pur, lucru care arată că interacțiunile intermoleculare din HTCC se diminuează pe măsură ce temperatura crește.

Capacitatea de auto-vindecare a hidrogelurilor a fost evaluată prin reometrie dinamică, dar și vizual, prin injectarea a două hidrogeluri într-un flacon, unul martor, compus numai din HTCC și SA și altul care conține și Rodamină B, pentru un contrast mai bun (Fig. II.4). Testul tubului inversat a permis observarea vizuală a conectării celor două hidrogeluri. Mai mult, hidrogelul a fost capabil să se reformeze complet după ce a fost distrus mecanic și împrăștiat pe pereții recipientului, fapt confirmat și prin testul inversării tubului. Astfel, acest test a demonstrat atât capacitatea de auto-vindecare a hidrogelurilor salicil-imino-HTCC, cât și capacitatea lor de a fi ușor injectate, caracteristici importante în vederea aplicării ca materiale bactericide topice, deoarece permit depozitarea acestora într-un tub și aplicarea ușoară pe piele.

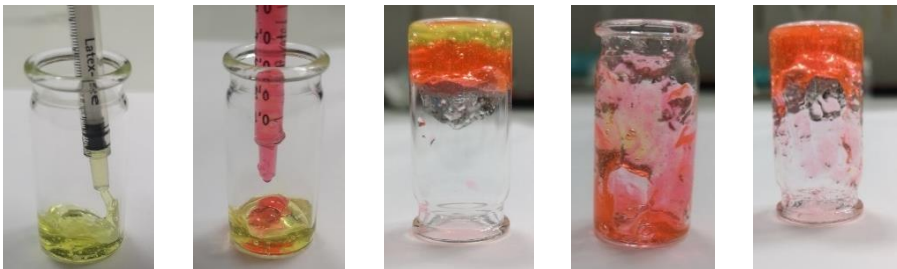


Figura II.4. Imagini care demonstrează capacitatea de auto-vindecare a hidrogelurilor analizate (proba reprezentativă HS3).

Una dintre îmbunătățirile semnificative aduse de legarea unităților cuaternare de amoniu pe structura de bază a chitosanului este îmbunătățirea proprietăților adezive [2]. Forța adezivă a hidrogelurilor a fost măsurată față de pielea de pui ca model de țesut, în comparație cu un gel igienic disponibil comercial (pe bază de alcool și carbomer) (Fig. II.7b). Cea mai mare forță adezivă (0,46 N) a fost obținută pentru hidrogelul cu cel mai mare grad de iminare, iar valorile au scăzut pe măsură ce gradul de iminare a scăzut, ajungând la 0,13 N pentru proba HS5. În comparație cu hidrogelul antibacterian comercial, HS1 a fost semnificativ statistic mai aderent ($p < 0,0001$), HS3 nu a condus la diferențe semnificative statistic, iar HS5 a fost mai puțin aderent ($p < 0,5$). Aceste date demonstrează potențialul ridicat al hidrogelurilor studiate pentru a fi utilizate ca dezinfectanți, prezentând o adeziune pe piele similară cu gelurile deja utilizate pe scară largă de către consumatori.

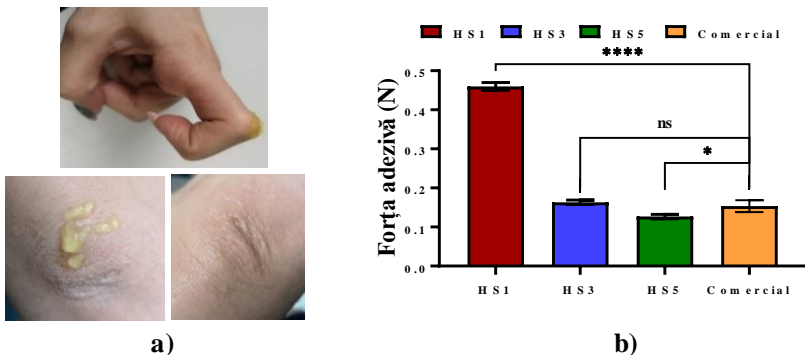


Figura II.6. a) Adezivitatea hidrogelului HS3, investigată pe piele umană și b) Forța adezivă măsurată pe piele de pui ca țesut model (**** $p < 0,0001$; * $p < 0,5$).

Proprietatea cea mai relevantă pentru aplicația vizată este activitatea antimicrobiană a hidrogelurilor. În cazul tulpinii bacteriene Gram-pozitive reprezentată de *S. aureus*, proba cu cel mai mare grad de iminare (HS1) a fost cea mai eficientă, suprimând complet creșterea bacteriilor după 15 minute, cu o viabilitate celulară a bacteriilor mai mică de 20% după 5 minute (Fig. II.7a). În cazul coloniilor bacteriene Gram-negative reprezentate de *E. coli*, s-a observat că toate hidrogelurile au fost capabile să suprimă creșterea celulelor bacteriene cu peste 60% în primele 15 minute, iar efectul a crescut în timp până la o viabilitate de 1% după 6 ore și 0% după 24 de ore (Fig. II.7b).

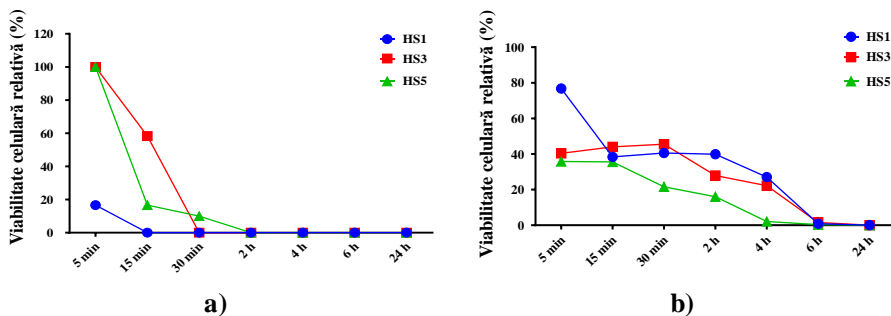


Figura II.7. Evaluarea activității antimicrobiene a hidrogelurilor împotriva a) *S. aureus* și b) *E. coli*.

Hemocompatibilitatea hidrogelurilor studiate a fost investigată *ex vivo* prin măsurarea procentului de hemoliză atunci când probele au fost în contact cu sânge prelevat de la șoareci, în comparație cu Triton X-100 și ser fiziologic (SF), utilizate drept control pozitiv și, respectiv, negativ [6]. Nu s-au observat deviații semnificative statistic

pentru hidrogeluri (~2,75%) comparativ cu serul fiziologic, fapt ce sugerează că hidrogelarea cu SA nu a condus la materiale cu efect distructiv asupra celulelor roșii.

Toxicitatea acută și sistemică a hidrogelurilor a fost investigată *in vivo* pe șoareci, prin aplicarea locală a unor plasturi sterilizați îmbibați cu hidrogeluri pe pielea acestora, folosind ser fiziologic (SF) drept control negativ. Utilizarea hidrogelurilor HS1, HS3 și HS5 nu a produs modificări semnificative din punct de vedere hematologic, biochimic și imunologic și nu a influențat în mod evident anumiți parametri specifici ai stresului oxidativ, comparativ cu utilizarea plasturilor îmbibați cu soluție salină. Aceste date indică faptul că hidrogelurile investigate au o bună biocompatibilitate *in vivo* și nu prezintă riscuri potențiale în vederea aplicațiilor biomedicale, fie în contact direct cu pielea, fie pentru dezinfectarea suprafețelor.

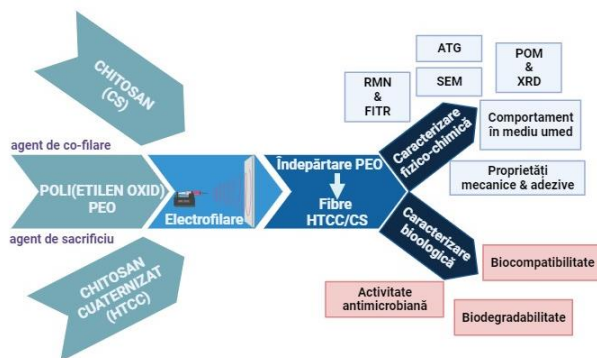
Capitolul III

Nanofibre pe bază de chitosan cuaternizat

III.1. Nanofibre binare de chitosan/chitosan cuaternizat

III.1.1. Introducere

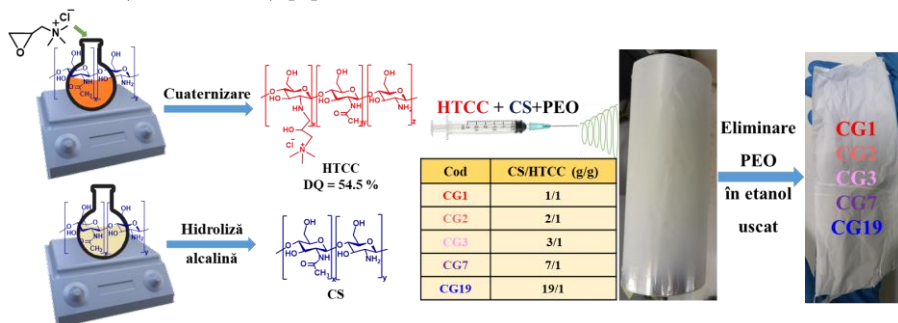
Nanofibrele pe bază de chitosan reprezintă unul dintre subiectele de mare interes în comunitatea științifică, datorită morfologiei specifice asemănătoare cu cea a țesuturilor naturale, fiind astfel potrivite pentru numeroase aplicații biomedicale [7,8]. Deși avantajele lor sunt numeroase, fibrele de chitosan sunt dificil de obținut prin electrofilare, din cauza caracterului policationic al chitosanului, iar pentru depășirea acestei dificultăți s-a recurs la utilizarea agenților de co-filare precum poli(etilen oxid)-ul sau alcoolul polivinilic [7]. Dezavantajul major al acestor fibre îl constituie utilizarea de agenți de cofilare sintetici, lipsiți de biodegradabilitate, care limitează aplicarea lor *in vivo*. În acest context, scopul studiului a fost obținerea de nanofibre binare de chitosan (CS) și chitosan cuaternizat (HTCC), cu aplicații potențiale în biomedicină, precum ingineria tisulară și medicina regenerativă, dar nu numai. În vedea atingerii acestui scop, s-a pornit de la un amestec ternar care conține poli(etilen oxid) (PEO) cu rol de agent de co-filare, pas urmat de eliminarea lui selectivă din nanofibre prin spălare într-un nonsolvent pentru ceilalți doi componenți (Schema III.1).



Schema III.1. Plan experimental pentru obținerea și caracterizarea nanofibrelor.

III.1.2. Rezultate și discuții

Fibre binare de chitosan/HTCC au fost preparate prin electrofilarea unor soluții ternare de CS/HTCC/PEO, în diferite rapoarte de masă între componente, dar păstrând mereu constant procentul de PEO (CS-HTCC/PEO = 4/1, m/m), iar eliminarea agentului de sacrificiu PEO a fost realizată prin imersarea fibrelor în etanol uscat anterior pe site moleculare (Schema III.2) [9].



Schema III.2. Reprezentarea schematică a obținerii fibrelor binare de CS/HTCC.

Strategia s-a dovedit a fi eficientă, deoarece în urma electrofilării și îndepărtării PEO-ului, au fost obținute fibre cu o morfologie netedă, fără defecte, chiar și la concentrații ridicate de HTCC, care au format o rețea tridimensională cu pori interfibrilari cu dimensiuni de sub 2 μm (Fig. III.1).

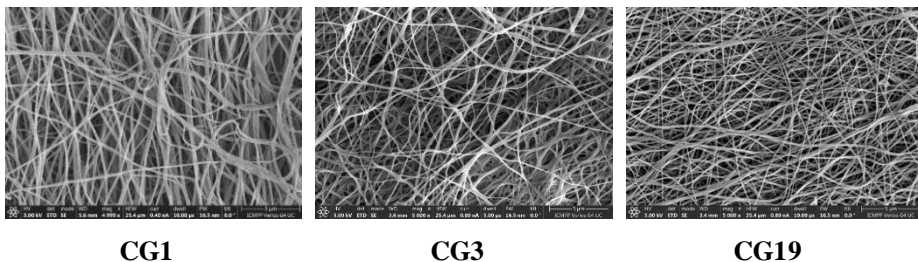


Figura III.1. Imagini SEM ale fibrelor binare de CS/HTCC.

Caracterizarea supramoleculară a nanofibrelor binare de CS/HTCC a fost realizată cu ajutorul difracției de raze X la unghi larg. Difractogramele au indicat natura semicristalină a fibrelor, fapt datorat alinierii lanțurilor macromoleculare pe parcursul procesului de electrofilare (Fig. III.3a). Profilul difractogramelor este oarecum similar celui caracteristic derivatului cuaternizat, sugerând perturbarea rețelei de legături de hidrogen inter- și intra-moleculare, în concordanță cu apariția forțelor repulsive puternice între sarcinile pozitive permanente.

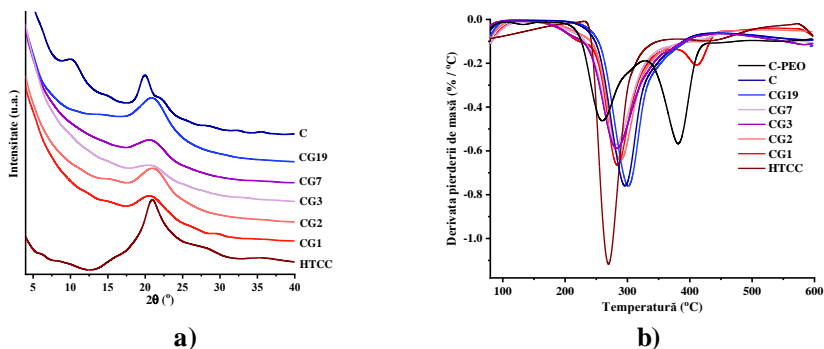


Figura III.3. a) Difractogramele de raze X și d) Derivatele curbelor ATG (C-PEO – reprezintă fibrele de chitosan/PEO).

Analiza termogravimetrică (ATG) a fost utilizată atât pentru a confirma eliminarea PEO-ului din fibre, cât și pentru a evalua stabilitatea lor termică. Curbele ATG și derivatele acestora înregistrate pentru fibrele binare prezintă două etape principale de pierdere în greutate, prima cu maximum la aproximativ 100 °, atribuită evaporării urmelor de apă și a doua la 270 °, caracteristică scindării legăturilor σ din lanțurile de chitosan (Fig. III.3d). Stadiul de degradare caracteristic PEO-ului, în intervalul 300-400 ° [10], este absent în cazul fibrelor binare, confirmând astfel eliminarea selectivă și totală a acestuia.

Pentru a simula comportamentul nanofibrelor în medii de pH variabil, caracteristic organismelor vii, a fost realizat un experiment de biodegradare în medii al căror pH a variat similar cu cel al exsudatului rănilor pe parcursul perioadei de vindecare [11]. La pH bazic de 8,5, întâlnit cel mai adesea în prima zi de la formarea unei răni/arsuri, pierderea masică a fibrelor a atins valori de aproape 18%, a crescut ușor până la 25% pe parcursul a 14 zile și a crescut brusc până la 100% în mediu de pH 5,5, caracteristic dermei (țesut sănătos) (Fig. III.4d). Așadar, nanofibrele binare de chitosan/HTCC sunt candidați ideali pentru a fi aplicate ca bandaje resorbabile în tratarea rănilor, degradându-se complet doar după parcurgerea tuturor etapelor caracteristice vindecării rănilor, când pH-ul revine la valoarea normală.

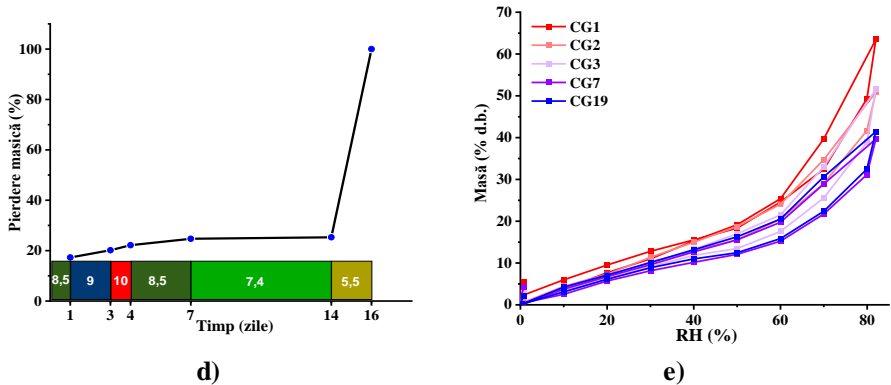


Figura III.4. Pierderea în greutate a probelor în d) soluție de lizozimă la diferite valori de pH, pentru proba CG7 și e) Curbele DVS.

Pentru a evalua capacitatea fibrelor de a reține umiditatea, au fost realizate experimente de sorbție a vaporilor de apă în regim dinamic (DVS). Fibrele cu cel mai ridicat conținut de HTCC (CG1) au atins valori ale capacității maxime de sorbție a umidității de 63% într-un mediu cu umiditate relativă (RH%) de 85%, valori care au scăzut o dată cu scăderea conținutului de HTCC, până la 41% pentru CG19, și la numai 35% pentru fibrele de chitosan C [12]. O altă caracteristică importantă observată în urma efectuării experimentelor DVS este capacitatea fibrelor de a desorbi complet umiditatea reținută pe parcursul ciclului de scădere a RH-ului, evidențiind astfel respirabilitatea lor, proprietate importantă pentru aplicarea ca pansamente.

Fibrele au fost supuse testelor mecanice și au fost analizate curbele stres-deformare. Fibrele de chitosan suportă un stres maxim la tracțiune de 33,7 MPa înainte de rupere [13]. Această valoare a crescut considerabil la 49,39 MPa pentru CG3, scăzând apoi la 29,9 MPa pentru NCG7 și 24,1 MPa pentru NCG19. Lipsa unei corespondențe între rezistența la tracțiune (TS) și conținutul de HTCC poate fi cauzată de orientarea

aleatorie a fibrelor și de variația dimensiunii porilor inter- și intra-fibrilari creați prin îndepărtarea PEO-ului. Fibrele au rezistat la modificări de formă fără deteriorări, atingând valori de alungire la rupere (EB) de la 5 până la 9,14%. Cea mai mică valoare a fost înregistrată pentru proba CG19 și nu există o relație clară între conținutul de HTCC și EB, atribuită aceleiași distribuții neregulate a fibrelor. Pe de altă parte, o creștere clară a modulului lui Young de la 8 N/m² pentru C la 19 N/m² pentru CG3 a sugerat faptul ca HTCC-ul potențează elasticitatea fibrelor, posibil datorită influenței sale asupra gradului de cristalinitate, după cum a indicat difracția de raze X.

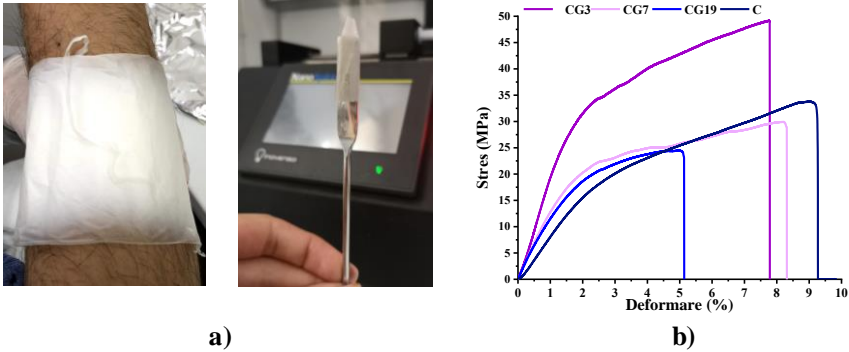


Figura III.7. a) Imagini ale fibrelor, confirmând proprietățile lor mecanice superioare, și adezivitatea față de diverse suprafețe și b) Curbele stres-deformare ale nanofibrelor investigate.

În ceea ce privește activitatea antimicrobiană, cantități mici de probe care conțin HTCC au inhibat creșterea *E. coli* și *S. aureus* în mai puțin de 6 ore și, respectiv, 24 h, în timp ce fibrele pe bază de chitosan au prezentat un efect antimicrobian limitat. Testate pe fibroblaști dermici umani normali, probele au arătat citocompatibilitate adecvată pentru aplicare ca dispozitive medicale, în timp ce testarea *in vivo* pe șobolani prin implantare subcutanată a demonstrat lipsa toxicității asupra sângelui, ficatului și rinichilor, cât și asupra țesuturilor la locul de implantare și lipsa efectului nociv asupra sistemului imunitar.

III.2. Nanofibre compozite pe bază de imino-chitosan/chitosan cuaternizat

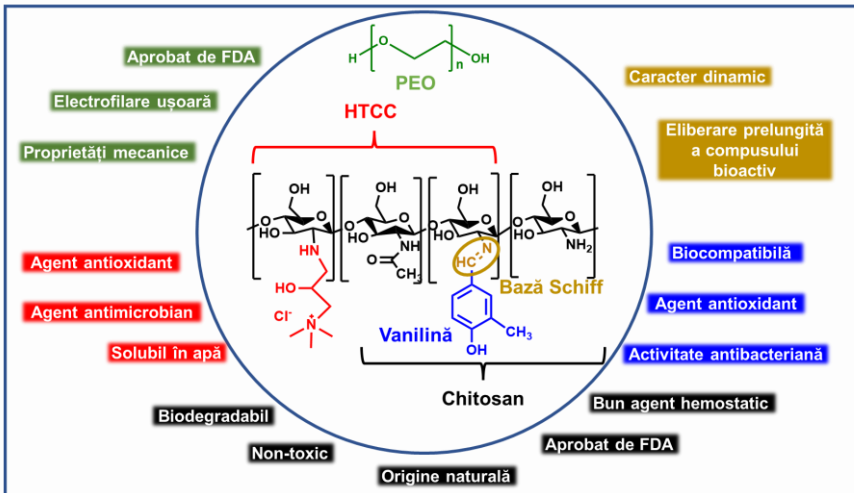
III.2.1. Introducere

Sângerarea necontrolată reprezintă una dintre principalele cauze ale deceselor la nivel mondial, fiind responsabilă pentru mai mult de 5 milioane de decese pe an, cu un cost estimat de 518 miliarde de dolari la nivel global [14]. Prin urmare, limitarea pierderii de sânge este imperativă și a dat un impuls pentru dezvoltarea de materiale hemostatice pentru tratamentul de urgență în situații traumatiche civile și pe câmpul de

luptă [15]. S-a demonstrat că prin alegerea potrivită a componentelor, pot fi obținute pansamente active, care pe lângă stoparea hemoragiei, contribuie la vindecarea rapidă a rănilor. Dintre materiale, nanofibrele prezintă avantajul porozității ridicate și raportului ridicat suprafață-volum, conformabilitate, sunt ușoare și simplu de utilizat. Toate aceste avantaje explică interesul manifestat pentru obținerea de pansamente hemostatice pe bază de nanofibre compozite de chitosan, care este în trend ascendent.

În acest context, scopul acestui studiu a fost obținerea de nanofibre compozite, cu efect hemostatic rapid și capacitate de vindecare a rănilor. În vederea atingerii acestui scop, componentele fibrelor au fost alese luând în considerare proprietățile lor, și anume: *chitosanul (CS)*, *chitosanul cuaternizat (HTCC)*, *vanilina (V)* și *poli(etilen oxid)-ul (PEO)* (Schema III.3).

Nanofibre – raport mare suprafață-volum, materiale valoroase pentru obținerea pansamentelor



Schema III.3. Design-ul rațional al nanofibrelor propuse ca materiale hemostatice.

III.2.2. Rezultate și discuții

Fibrele compozite au fost obținute pe baza protocolului stabilit în subcapitolul anterior, prin varierea raportului masic între HTCC și CS, păstrând constant conținutul de PEO. Vanilina a fost adăugată în soluțiile de electrofilare în raport molar 4/1 între grupările aldehydă și grupările amino ale chitosanului.

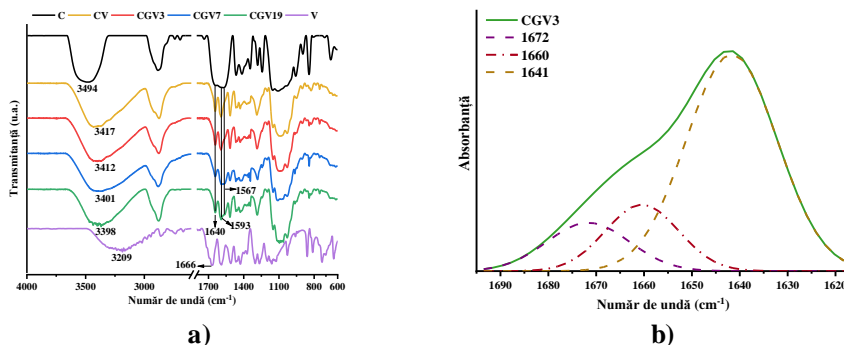


Figura III.13. Caracterizarea structurală a nanofibrelor prin: a) spectroscopie FTIR; b) deconvoluție a zonei spectrale 1700-1620 cm^{-1} pentru CGV3.

Din cauza naturii multicomponente a fibrelor, spectrele FTIR au fost complexe, cu multe benzi suprapuse. Cu toate acestea, succesul reacției dintre grupările amino ale CS și HTCC cu grupările aldehydă ale vanilinei a fost confirmat prin prezența unei benzi ascuțite la 1640 cm^{-1} , caracteristică vibrației de întindere a legăturilor imină (Fig. III.13a) [16]. Deconvoluția domeniului spectral $1700\text{-}1620 \text{ cm}^{-1}$ a indicat și prezența a două benzi, în jurul valorilor 1660 și 1672 cm^{-1} , specifice grupărilor amidă I din chitosan/HTCC și urmelor de aldehydă nereacționată (Fig. III.13b).

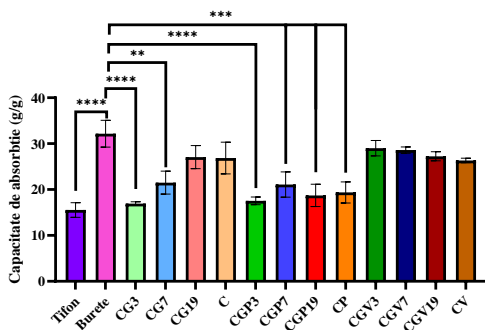


Figura III.16. Capacitatea de sorbție a fibrelor în c) sânge.

sorbție a sângelui de 32 g/g , semnificativ mai mare decât cea a tifonului, a cărei performanță a fost la jumătate. Fibrele compozite au prezentat o capacitate de sorbție a sângelui cuprinsă între $20\text{-}30 \text{ g/g}$, asemănătoare rezultatelor obținute în mediile apoase. Surprinzător, rezultatele indică prezența PEO-ului în fibre ca având un impact negativ, scăzând capacitatea fibrelor de a reține sângele. Pe de altă parte, datele arată că vanilina

eficiența nanofibrelor de a reține sângele a fost evaluată atât pentru nanofibrele compozite, dar și pentru fibrele binare de CS/HTCC (abreviate CG), respectiv fibrele ternare CS/HTCC/PEO (abreviate CGP), pentru a aprecia influența fiecărui component. De asemenea, ca martori, au fost testate două materiale: tifonul și un burete hemostatic disponibil comercial. Natura superporoasă a buretelui hemostatic comercial a permis o

are un rol important în design-ul acestor materiale, anihilând impactul negativ al PEO-ului.

Vanilina poate preveni riscul apariției infecțiilor, asociat perioadei inflamatorii, dar poate contribui și la o vindecare mai ușoară, având rol benefic în procesul de reepitelizare [17]. Având în vedere faptul că vanilina este legată de chitosan și HTCC prin legături reversibile covalente imină, a fost evaluată capacitatea fibrelor de a elibera vanilina într-o manieră controlată de consumul acesteia, în mediu de apă ultrapură și PBS 7,4 [18]. Eliberarea cumulativă a fost evaluată pe parcursul a 24 de ore, în urma a 12 cicluri succesive de îndepărtare/reîmprospătare de supernatant, la diferite momente de timp. Probele au prezentat o eliberare progresivă a vanilinei în ambele medii, cu o eliberare cumulativă inferioară în PBS (aproximativ 76%) comparativ cu apa (aproximativ 100%) (Fig. III.18).

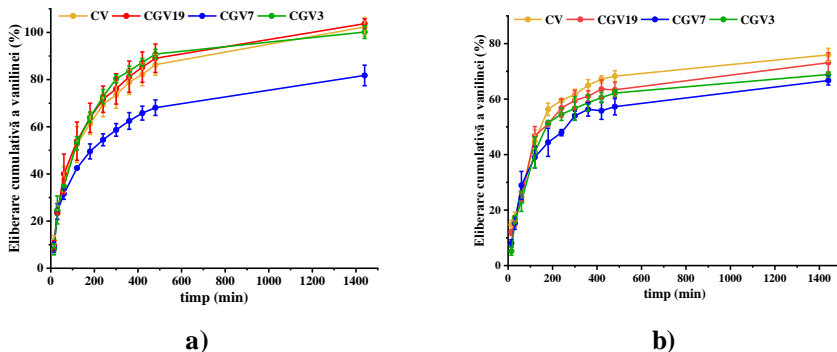
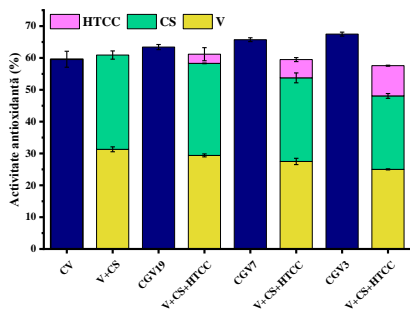
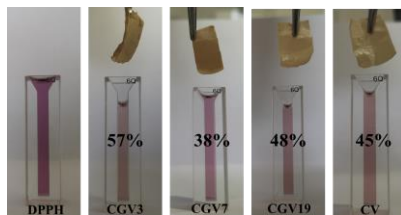


Figura III.18. Cinetica de eliberare a vanilinei în mediu de a) apă ultrapură și b) PBS 7,4.

Activitatea antioxidantă a fibrelor nou dezvoltate a fost evaluată în două moduri, prin investigarea capacității de a lega radicali DPPH în (i) soluție și (ii) în stare solidă. În soluția apoasă acidă, capacitatea antioxidantă a crescut odată cu creșterea conținutului HTCC, de la 60% pentru fibrele fără HTCC (CV), la 68% în cazul nanofibrelor cu cel mai mare conținut de HTCC (CGV3) (Fig. III.19a). Mai mult, activitatea fibrelor a fost mai mare decât suma activității componentelor, diferența accentuându-se pe măsură ce conținutul de HTCC a crescut, demonstrând efectul sinergic al acestuia. Activitatea antioxidantă s-a manifestat în mod similar atunci când nanofibrele au fost imersate în soluții DPPH. După aproximativ o oră, soluția de DPPH s-a decolorat, în timp ce nanofibrele și-au păstrat culoarea, în conformitate cu capacitatea antioxidantă a acestora, care a atins valori de până la 57% pentru proba CGV3 (Fig. III.19b). Acest lucru întărește ipoteza că fibrele studiate sunt capabile să asigure o barieră fizică pentru radicalii liberi, contribuind la vindecarea normală a rănilor.



a)



b)

Figura III.19. Activitatea antioxidantă a fibrelor în a) soluție și b) stare solidă (indicată ca procent inserat pe imagini).

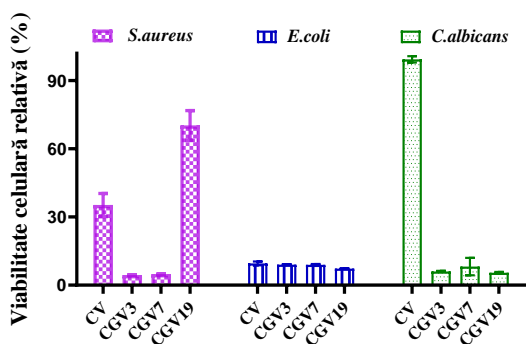
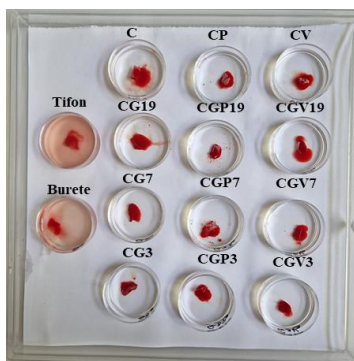


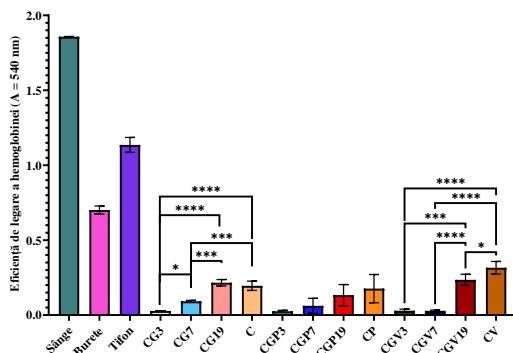
Figura III.20. Activitatea antimicrobiană a nanofibrelor, investigată pe tulpini de *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*.

O caracteristică importantă a materialelor destinate vindecării rănilor este capacitatea acestora de a inhiba apariția infecțiilor microbiene. Fibrele s-au dovedit extrem de eficiente în distrugerea bacteriilor Gram-negative (91%), indiferent de compoziția lor. Cu toate acestea, efectul a fost dependent de compoziție atunci când au fost testate pe bacterii Gram-pozitive și drojdii. (Fig. III.20).

Evaluarea capacității nanofibrelor de a acționa ca pansamente hemostatice cu acțiune rapidă și eficientă a fost realizată pe baza unui experiment de investigare a capacității de coagulare a sângelui. După 10 minute de contact, sângele necoagulat a fost spălat cu PBS 7,4. Se poate observa în Fig. III.23a că soluția cu cea mai mare tentă spre roșu, culoare asociată capacității scăzute de coagulare, este în cazul tifonului, iar buretele hemostatic a avut un efect coagulant ușor mai mare. Prin comparație, toate soluțiile fibrelor, atât cele compozite pe bază de imino-chitosan/chitosan cuaternizat, cât și cele binare sau care conțin PEO au avut un efect hemostatic net superior, soluțiile de spălare fiind incolore, cu diferențe foarte mici între probe.



a)



b)

Figura. III.23. Investigarea capacității de coagulare a nanofibrelor a) în regim dinamic, prin observare vizuală și b) prin înregistrarea absorbanțelor soluțiilor de spălare la 540 nm (* $p < 0.5$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$. **** $p < 0.0001$ pentru toate probele raportat la sânge, tifon și burete).

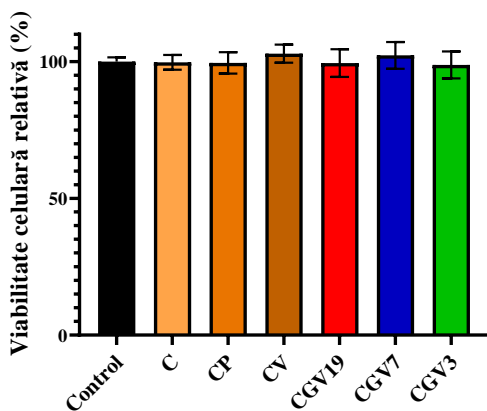


Figura III.25. Rezultatele testelor de biocompatibilitate *in vitro* pentru probele de nanofibre compozite, obținute prin testul MTS, reprezentate ca medie \pm D.S.

Biocompatibilitatea nanofibrelor compozite a fost evaluată *in vitro* pe celule NHDF, în conformitate cu standardul ISO-10093 pentru dispozitive medicale [19], care prevede că un material poate fi aplicat în contact cu un țesut dacă viabilitatea celulară relativă este mai mare de 70%. Toate fibrele investigate au respectat acest criteriu (Fig. III.25), având viabilitatea celulară apropiată de 100%. Astfel, se poate concluziona că toate fibrele sunt sigure din punct de vedere al biocompatibilității pentru a fi utilizate în contact direct cu fibroblastele.

Capitolul IV

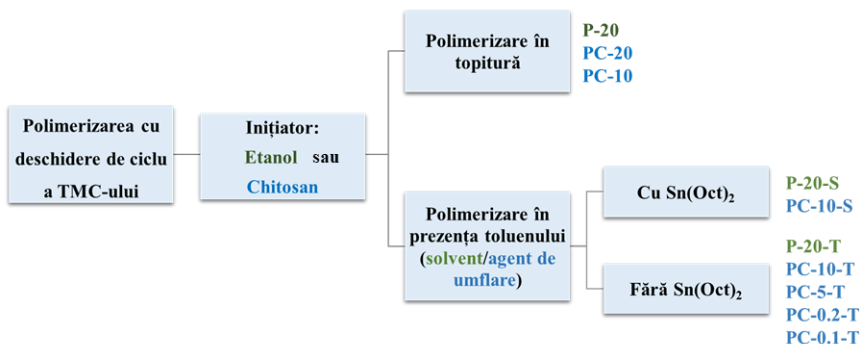
Derivați de chitosan grefați cu lanțuri policarbonat alifatic

IV.1. Introducere

Deși au fost sintetizate și caracterizate numeroase clase de derivați de chitosan cu solubilitate îmbunătățită în apă și aplicabilitate în biomedicină, necesitățile vieții cotidiene și adaptarea rapidă a microorganismelor la compușii utilizați în mod curent încurajează cercetătorii să investigheze noi căi sintetice. În acest context, studiul prezent a propus obținerea de noi derivați de chitosan solubili în apă și evaluarea principalelor proprietăți în vederea utilizării acestora în domeniul biomedical. Realizarea acestui studiu s-a bazat pe utilizarea chitosanului ca macroinițiator hidrofil pentru a obține poli(trimetilen carbonat) grefat pe lanțurile de chitosan, prin tehnica de polimerizare cu deschidere de ciclu. S-a estimat că în acest mod, proprietățile chitosanului pot fi îmbunătățite, în special solubilitatea acestuia, ținându-se obținerea de copolimeri biocompatibili, cu potențial de a fi utilizați în domeniul biomedical.

IV.2 Rezultate și discuții

Pentru stabilirea procedurii sintetice în vederea obținerii derivaților vizați, au fost variate diferite condiții de reacție, cum ar fi (i) raportul molar dintre unitățile de glucozamină ale chitosanului și TMC, (ii) prezența/absența catalizatorului octanoat de staniu ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) și (iii) prezența/absența solventului (toluen) cu rol de agent de umflare al chitosanului (Schema IV.1). Sinteza homopolimerului PTMC a fost efectuată în condiții similare, pentru a avea o referință clară în interpretarea datelor de caracterizare a derivaților de chitosan. Copolimerii au fost notați ținând cont de (i) principalele unități structurale constitutive: chitosan (C) și poli(trimetilen carbonat) (P); (ii) raportul molar dintre TMC și inițiator (etanol sau glucozamină în cazul chitosanului) (TMC/etanol sau TMC/glucozamină); (iii) prezența catalizatorului $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (S) sau a toluenului (T).



Schema IV.1. Reprezentarea schematică a tehnicilor utilizate pentru obținerea derivaților de chitosan grefați cu PTMC.

Derivatul PC-10-T, obținut în raport molar monomer/inițiator 10/1, în prezența toluenului, a prezentat solubilitate în apă. Acesta a fost caracterizat prin spectroscopie $^1\text{H-RMN}$ (Fig. IV.1) și au fost observate toate semnalele caracteristice, atât cele ale chitosanului, H2-H6 în intervalul 3,2-3,8 ppm și protonii corespunzători grupărilor acetil la 1,96 ppm, cât și semnalele care confirmă formarea PTMC-ului. Semnalul grupării metilen de referință, care corespunde la 2 protoni, s-a suprapus cu protonii H2-H6 din lanțul de chitosan, fapt ce a îngreunat determinarea gradului de polimerizare. Pe baza raportului dintre valorile integralelor semnalelor protonilor grupărilor terminale și cele ale protonilor corespunzători unităților repetitive, s-a determinat un grad de polimerizare de 7. O estimare a gradului de substituție al grupărilor hidroxil primare ale chitosanului cu lanțuri de PTMC a fost realizată utilizând raportul dintre valoarea integralei protonilor grupării metil din unitatea de glucozamină acetilată a chitosanului și cele ale grupărilor terminale ale lanțurilor de PTMC, obținând valoarea de 5%.

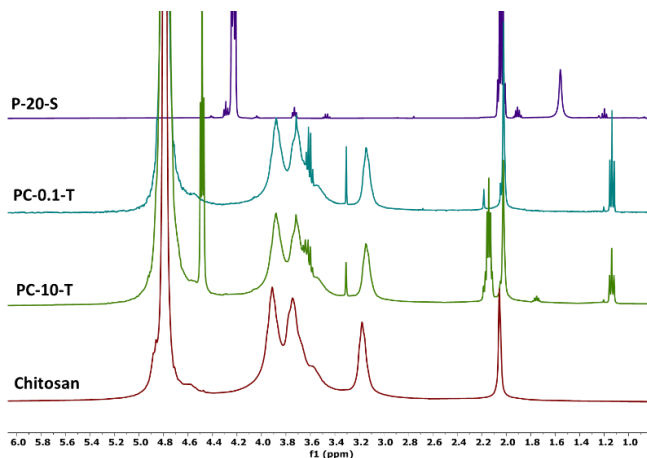
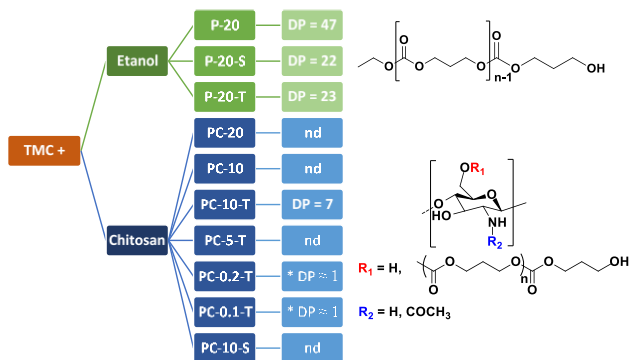


Figura IV.1. Spectrul ^1H -RMN comparativ al derivaților PC-10-T și PC-0.1-T, al homopolimerului P-20-S și al chitosanului de referință.

Așadar, prin analizarea datelor caracterizării structurale s-a observat că în cazul utilizării unei cantități mici de monomer (PC-0.2-T, PC-0.1-T), reacția are loc cu formarea unei singure unități de TMC legată de chitosan, explicând astfel apariția multipletului din spectrele RMN. Mai mult, lanțurile grefate pot forma legături de hidrogen non-clasice cu grupările hidroxil vecine [20], cauzând dezechilibrarea nucleelor și, astfel, deplasarea semnalelor la valori mai mici [21]. O reprezentare schematică a rutelor sintetice utilizate și a derivaților obținuți a fost redată în Schema IV.2.



Schema IV.2. Rute sintetice de obținere a chitosanului grefat cu poli(trimetilen carbonat) și a homopolimerilor de referință și gradul de polimerizare corespunzător fiecărui compus. *DP = grad de polimerizare obținut pe baza spectrelor ^1H -RMN, nd – nedeterminat, din cauza insolubității compușilor.

Testele de solubilitate pe baza observațiilor vizuale au indicat faptul că probele PC-10-T și PC-0.1-T prezintă solubilitate în apă, la concentrația de 1% (Fig. IV.5). În plus, PC-10-T a fost, de asemenea, solubil în DMSO, în timp ce PC-5-T și PC-0.1-T au prezentat doar solubilitate parțială în acest solvent. Interesant, în solventul mai puțin polar, DMF, solubilitatea a crescut odată cu scăderea conținutului de PTMC: PC-0.1-T a prezentat solubilitate parțială, PC-5-T s-a umflat, în timp ce proba PC-10-T a fost complet insolubilă. În solventul cel mai polar, metanolul, toate probele au fost insolubile. Astfel, se poate estima că solubilitatea copolimerilor este controlată de raportul dintre chitosanul hidrofil și PTMC-ul hidrofob. Derivatul PC-10-T, care are solubilitate bună în apă și DMSO, pare a fi cel mai promițător pentru utilizarea în bioaplicații.

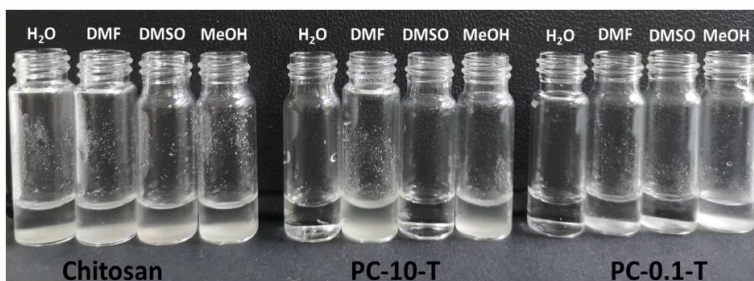


Figura IV.5. Observarea vizuală a solubilității copolimerilor pe bază de chitosan și PTMC, în raport cu martorul de chitosan nemodificat.

Pentru aplicațiile *in vivo*, gradul deordonare și suprafața materialelor prezintă o importanță ridicată, o suprafață nanostructurată fiind benefică pentru creșterea de celule [22]. Pentru a evalua influența grefării PTMC-ului asupra proprietăților de suprafață ale chitosanului, au fost depuse filme din soluții apoase ale derivaților sintetizați și au fost observate cu ajutorul microscopiei optice în lumină polarizată (POM) și a microscopiei de forță atomică (AFM). Imaginile POM obținute pentru chitosan (pudră sau film) (Fig. IV.7) au confirmat natura sa semicristalină, prin apariția unei texturi birefringente, granulare fine, semn al gradului lui ridicat deordonare [23]. În contrast cu acesta, imaginile POM ale homopolimerului poli(trimetilen carbonat) nu au evidențiat prezența birefringenței, indicând natura lui amorfă, datorită flexibilității dată de lanțurile liniare. Grefarea de lanțuri de PTMC pe catena chitosanului nu a indus modificări semnificative asupra texturii filmelor (Fig. IV.7). Cu toate acestea, o analiză mai amănunțită a imaginilor a evidențiat prezența unei texturi mai clare în cazul derivatului PC-10-T (insertii din Fig. IV.7).

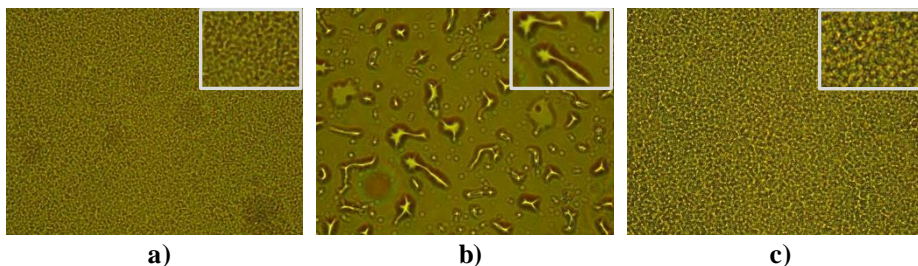


Figura IV.7. Imagini POM ale filmelor de a) chitosan, b) P-20-T și c) PC-10-T.

Modificarea chitosanului ridică semne de întrebare cu privire la alterarea proprietăților sale principale, cum ar fi biocompatibilitatea. Proba PC-10-T a prezentat o viabilitate celulară superioară față de cea a chitosanului, la toate concentrațiile investigate. În timp ce chitosanul a prezentat biocompatibilitate pentru concentrații mai mici de 200 $\mu\text{g/mL}$, PC-10-T a prezentat o biocompatibilitate bună la concentrații de până la 300 $\mu\text{g/mL}$. Mai mult, în timp ce toate celulele au murit în contact cu soluția de chitosan de concentrație 400 $\mu\text{g/mL}$, cele în contact cu PC-10-T la aceeași concentrație au prezentat viabilitate celulară de aproximativ 60%. Totodată, aspectul celulelor tratate cu soluțiile compușilor investigați este similar cu cel al celulelor netratate utilizate ca mator, pentru probele cu viabilitate celulară peste 70% (Fig. IV.10).

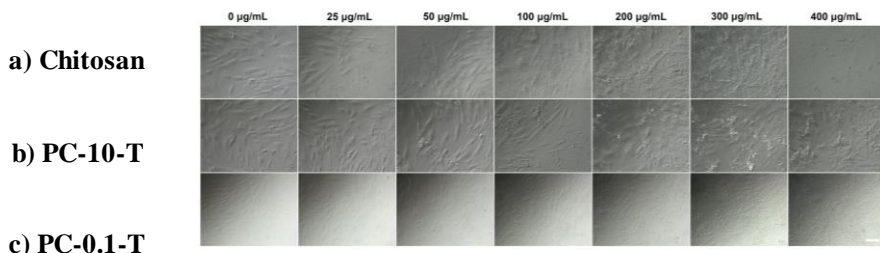


Figura IV.10. Comportarea celulelor NHDF în contact cu soluțiile testate de a) Chitosan, b) PC-10-T și c) PC-0.1-T.

Biodegradabilitatea compușilor a fost investigată în soluție tampon de lizozimă (pH= 7,4) timp de 21 de zile. Chitosanul pur a arătat o pierdere de masă de 66%, în timp ce PC-10-T a ajuns la o pierdere masică de 81%. Biodegradarea mai avansată a derivatului PC-10-T a fost pusă pe seama solubilității îmbunătățite a acestuia la pH fiziologic, indusă de grefarea lanțurilor laterale de PTMC pe scheletul chitosanului. Această ipoteză a fost susținută de imagini SEM înregistrate pe probe înainte și după degradare. Acestea au indicat un proces de eroziune a suprafeței probelor pe direcția exterior-interior, datorită proceselor de degradare/dizolvare.

Concluzii generale

Teza de doctorat intitulată „**Derivați de chitosan solubili în apă pentru aplicații biomedicale**” conține 272 pagini divizate în cinci capitole, care includ 19 tabele, 108 figuri, 19 scheme și 446 referințe bibliografice. Teza este structurată în două părți: Partea I (*Capitolul I*) conține un studiu de literatură și Partea II (*Capitolele II-V*) conține contribuțiile proprii și se încheie cu concluziile generale.

Datele de literatură prezentate în *Partea I* consolidează importanța temei abordate, prin expunerea succintă a celor mai importante informații despre căile de sinteză ale derivaților de chitosan solubili în apă, cu accent pe clasa sărurilor cuaternare de amoniu. De asemenea, sunt redate informații despre progresele făcute în dezvoltarea materialelor pe baza acestor compuși, cu precădere nanofibre și hidrogeluri cu rol în biomedicină.

Partea II prezintă rezultatele originale obținute pe parcursul stagiului de doctorat, în acord cu obiectivele propuse, după cum urmează:

- ✚ Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri pe bază de imino-chitosan cuaternizat.
- ✚ Obținerea, caracterizarea și investigarea de nanofibre pe bază de chitosan/chitosan cuaternizat.
- ✚ Sinteza unor derivați de chitosan solubili în apă prin grefarea de lanțuri poli(trimetilen carbonat) și caracterizarea lor.

Concluziile generale desprinse în urma efectuării acestor studii sunt:

1. Au fost sintetizate săruri cuaternare de amoniu ale chitosanului, utilizând tehnica de legare indirectă a grupării cuaternare prin intermediul unui spațiator alifatic.

- Efectuarea sintezei în apă neutră, în mediu eterogen, a condus la substituția selectivă a grupărilor amino ale chitosanului.
- Prin optimizarea condițiilor de sinteză (variarea raportului molar între grupările amino ale chitosanului și clorura de glicidiltrimetil amoniu (GTMAC), a temperaturii și a timpului de reacție) s-au obținut derivați cuaternizați de chitosan cu grad de substituție diferit.
- Derivați de chitosan cu solubilitate bună atât în medii de pH neutru cât și bazic, au fost obținuți pentru un grad de substituție mai mare de 43%.

- Caracterizarea structurală a derivaților a fost realizată prin spectroscopie RMN și FTIR, confirmând prezența tuturor semnalelor și benzilor caracteristice. Gradul de cuaternizare a fost determinat prin titrare conductometrică.
- Chitosanul cuaternizat prezintă o morfologie semicristalină, cu un grad de cristalinitate inferior chitosanului martor, evidențiat prin WXR. Imaginile înregistrate cu un microscop cu lumină polarizată au evidențiat un grad ridicat de ordonare, prin prezența birefringenței puternice.
- Chitosanul cuaternizat a prezentat biocompatibilitate *in vivo*, pe șoareci experimentali, confirmând faptul că gradul de cuaternizare ales nu a indus toxicitate compusului.

2. A fost sintetizată o serie de 15 hidrogeluri biocide dezinfectante, prin reacția de iminare în soluție apoasă neutră, condensarea având loc între grupările amino libere ale chitosanului cuaternizat și grupările aldehydă ale salicilaldehidei, o monoaldehidă naturală.

- Mecanismul de hidrogelare se bazează pe reacția de iminare, urmată de auto-asamblarea unităților imină în clusteri stratificați cu rol de noduri de reticulare.
- Demonstrarea mecanismului a fost realizată prin spectroscopie ¹H-RMN și FTIR, care au arătat formarea legăturilor imină și prin difracție de raze X și microscopie POM care au demonstrat prezența de structuri supramoleculare stratificate. Mai mult, metodele spectroscopice au indicat natura reversibilă a legăturilor imină, care există într-o stare de echilibru cu reactanții, precum și contribuția majoră a derivatului de chitosan cuaternizat în procesul de hidrogelare prin formarea de legături fizice puternice.
- Starea de hidrogel, comportamentul tixotrop, capacitatea de auto-vindecare, precum și injectabilitatea hidrogelurilor au fost confirmate prin analiza reologică.
- Hidrogelurile au dovedit capacitate superabsorbantă, atingând un grad de umflare de până la 43 000%.
- Natura dinamică a legăturilor imină a favorizat biodegradarea hidrogelurilor, atât în medii umede cât și în sol, în decursul a cinci zile.
- Hidrogelurile au prezentat adezivitate ridicată pe suprafețe de sticlă, oțel și piele, cu valori ale forței de adeziune comparabile sau mai mari decât ale gelurilor dezinfectante comerciale. În plus, au dovedit capacitate de aplicare ușoară și hidratare a pielii.

- Activitatea antimicrobiană a hidrogelurilor a fost ridicată, conducând la suprimarea completă a viabilității bacteriilor *S. aureus* și *E. coli*, într-o manieră dependentă de timp și compoziție.
- Hidrogelurile obținute au dovedit hemocompatibilitate în conformitate cu standardele pentru dispozitivele medicale destinate utilizării în contact cu sângele, iar aplicarea acestora pe pielea șoarecilor de laborator nu a indus hepatotoxicitate, nefrotoxicitate, imunotoxicitate sau alterarea speciilor reactive de oxigen, indicând o bună biocompatibilitate *in vivo*.

3. A fost obținută și caracterizată o serie de 5 nanofibre binare pe bază de chitosan/chitosan cuaternizat în diferite rapoarte masice, prin tehnica de electrofilare, cu rol potențial în ingineria tisulară și în vindecarea rănilor.

- Nanofibre binare de chitosan/chitosan cuaternizat au fost obținute prin electrofilare, utilizând poli(etilen oxid)-ul ca agent de co-filare, urmată de îndepărtarea selectivă și totală a acestuia din sistem.
- Succesul strategiei adoptate a fost dovedit pe baza tehnicilor de spectroscopie FTIR și RMN, care au confirmat prezența celor doi biopolimeri în fibre și analiza ATG care a dovedit îndepărtarea totală a polimerului sintetic.
- Imaginile SEM au indicat obținerea de neșesute din fibre, fără defecte, cu diametrul mediu în jur de 160 nm și pori interfibrilari de aproximativ 2 μm.
- Difrakția de raze X coroborată cu microscopia optică în lumină polarizată a indicat natura semicristalină a fibrelor, cu un grad de cristalinitate inferior fibrelor pure de chitosan.
- Investigarea capacității de umflare a fibrelor în apă și în mediu care simulează pH-ul fiziologic a condus la grade de umflare de 24, respectiv, 18 (g/g), similare cu cele ale pansamentelor comerciale utilizate pentru tratarea rănilor.
- Nanofibrele s-au dizolvat parțial în apă și PBS, iar în prezență de lizozimă s-au degradat cu viteză controlată de conținutul de chitosan cuaternizat și de pH-ul mediului. În mediu care simulează exsudatul pe parcursul perioadei de vindecare a rănilor, fibrele au atins biodegradare completă în 16 zile.
- Fibrele binare au prezentat sorbție/desorbție reversibilă a vaporilor de apă, indicând o respirabilitate bună și o capacitate maximă de sorbție a umidității de până la 63%, similară cu cea a pansamentelor comerciale.
- Proprietățile mecanice au avut valori comparabile cu cele ale unor fibre pe bază de polimeri sintetici și ale pielii umane, cu valori de până la 49 MPa pentru

rezistența la tracțiune, 9% pentru alungirea la rupere și 19 N/m² pentru modulul Young.

- Forța adezivă la contactul cu un model de țesut viu a crescut pe măsură ce conținutul de chitosan cuaternizat din fibre a crescut, ajungând la valori de 1,36 N, caracteristice unei bioadezivități bune. De asemenea, cuaternizarea a avut un impact pozitiv asupra interacțiunilor între fibre și mucină, ceea ce a dus la o mucoadezivitate îmbunătățită în comparație cu fibrele de chitosan, demonstrată prin măsurători UV-vis și de potențial Zeta.
- Evaluarea activității antimicrobiene a demonstrat că prezența chitosanului cuaternizat a îmbunătățit substanțial capacitatea fibrelor de a inhiba creșterea *E. coli* și *S. Aureus*, chiar în condițiile în care testarea s-a realizat pe cantități foarte mici de probă. Acestea au inhibat total creșterea bacteriilor în mai puțin de 6 ore și, respectiv, 24 h, în timp ce fibrele de chitosan au prezentat un efect antimicrobian limitat.
- Testate pe fibroblaști dermici umani normali, probele au prezentat citocompatibilitate adecvată pentru aplicare ca dispozitive medicale, în timp ce testarea *in vivo* pe șobolani prin implantare subcutanată a demonstrat lipsa toxicității asupra sângelui, ficatului și rinichilor și țesutului la locul de implantare și nu au afectat sistemul imunitar.

4. A fost obținută o serie de 3 nanofibre compozite de imino-chitosan/chitosan cuaternizat/poli(etilen oxid), prin încapsularea *in situ* a vanilinei, vizând dezvoltarea de pansamente hemostatice cu rol de vindecare a rănilor.

- Spectroscopia FTIR și RMN a demonstrat legarea covalentă a vanilinei de chitosan și chitosan cuaternizat, prin unități reversibile de imină și dezvoltarea de forțe intermoleculare între componente.
- Difrakția cu raze X și microscopia POM au indicat natura semicristalină a fibrelor, în principal datorită segregării de fază a unor domenii cristaline bogate în PEO, iar microscopia SEM a relevat formarea unei rețele de nanofibre cu diametrul mediu de 140 nm.
- Fibrele au prezentat stabilitate termică îmbunătățită și proprietăți mecanice bune pentru aplicația vizată: valoarea stresului de tracțiune de 3,8 MPa, alungirea la rupere de 10,6% și modulul lui Young de 0,99 MPa.
- Natura fibroasă a permis sorbția ridicată a umidității în jurul valorii de 30 g/g, dar și o capacitate ridicată de sorbție a sângelui (20-30 g/g). Fibrele au avut un grad de degradare ridicat pe parcursul a 21 de zile, exprimat printr-o pierdere de

masă de aprox. 44% în mediu de PBS, 54% în prezența lizozimei și 100% în sol după 7 săptămâni.

- Reversibilitatea legăturilor imină a permis eliberarea prelungită a vanilinei, controlată de viteza de îndepărtare a acesteia, indicând posibilitatea eliberării „la cerere” sub acțiunea stimulilor externi, cum ar fi consumarea ei în procesul de inhibare a agenților patogeni.
- Chitosanul cuaternizat a determinat îmbunătățirea activității antioxidante a fibrelor până la 50% chiar și în stare solidă, printr-un efect sinergic de activare a grupărilor hidroxil ale celorlalte componente.
- Fibrele au prezentat un efect ridicat de inhibare a agenților patogeni relevanți, a bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative și a drojdiilor.
- Adezivitatea și capacitatea de transport a vaporilor de apă au avut valori comparabile altor pansamente hemostatice comerciale.
- Evaluarea capacității de coagulare a sângelui, evaluată vizual, prin UV-Vis sau prin SEM, a relevat valori superioare unui burete hemostatic disponibil comercial, fibrele fiind capabile să rețină și să coaguleze într-un timp scurt cantități mari de sânge raportat la greutatea lor.

5. Au fost obținuți noi derivați de chitosan solubili în apă, cu potențial de aplicare în domeniul biomedical, prin grefarea poli(trimetilen carbonat)-ului, utilizând tehnica de polimerizare cu deschidere de ciclu.

- Reacția de deschidere a ciclului trimetilen carbonatului a fost inițiată de grupările nucleofile hidroxil ale chitosanului, care pot juca rol de inițiatori.
- Reacția a avut loc cu succes în mediu eterogen, în toluen, în care chitosanul are capacitatea de a se umfla, asigurând un contact bun între reactanți.
- Condițiile de reacție, precum raportul molar între reactanți, temperatura și timpul de reacție, au fost optimizate în vederea obținerii de derivați solubili, care pot fi prelucrați ușor din soluție.
- Solubilitate bună în biodispersanții apă și DMSO a fost atinsă pentru un grad de substituție al chitosanului în jur de 5%, cu lanțuri laterale de poli(trimetilen carbonat) având un grad de polimerizare de aproximativ 7.
- Solubilitatea în apă a permis evitarea utilizării acizilor pentru prepararea soluțiilor, cu consecințe asupra îmbunătățirii biocompatibilității *in vitro* a compușilor obținuți, atingând o valoare a viabilității celulare de ~80% comparativ cu mai puțin de 50% pentru chitosanul martor, pentru soluții de concentrație 300 μg/mL.

- Solubilitatea îmbunătățită a noilor derivați de chitosan sintetizați a determinat și o viteză mai mare de biodegradare, cu o pierdere de masă de 81% în comparație cu 66% pentru chitosanul martor, după 21 de zile, în mediu de lizozimă.
- Mai mult, funcționalizarea s-a dovedit a fi benefică pentru îmbunătățirea hidrofilității filmelor depuse din soluții apoase, demonstrată prin măsurători ale unghiului de contact cu apa.

O parte dintre rezultatele obținute pe parcursul tezei de doctorat au fost publicate sub formă de articole științifice, în reviste internaționale cotate ISI.

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. Bianca-Iustina Andreica, Daniela Ailincăi, Andreea-Isabela Sandu, Luminita Marin, Amphiphilic chitosan-g-poly(trimethylene carbonate) – A new approach for biomaterials design, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2021) 193. **(FI ISI: 8,2)**

2. Bianca-Iustina Andreica, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Aurelian Sorin Pasca, Liliana Mititelu-Tartau, Luminita Marin, Quaternized chitosan/chitosan nanofibrous mats: An approach toward bioactive materials for tissue engineering and regenerative medicine, *Carbohydrate Polymers*, (2023) 302. **(FI ISI: 11,2)**

3. Luminita Marin, Bianca-Iustina Andreica, Alexandru Anisie, Sandu Cibotaru, Maria Bardosova, Elsa Maria Materon, Osvaldo Novais Junior Oliveira, Quaternized chitosan (nano)fibers: A journey from preparation to high performance applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2023) 242. **(FI ISI: 8,2)**

4. Bianca-Iustina Andreica, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Luminita Marin, Quaternized chitosan-based nanofibers with strong antibacterial and antioxidant activity designed as ecological active food packaging, *Food Packaging and Shelf Life*, (2023) 39. **(FI ISI: 8)**

5. Bianca-Iustina Andreica, Liliana Mititelu-Tartau, Irina Rosca, Irina Mihaela Pelin, Erwan Nicol, Luminita Marin, Biocompatible hydrogels based on quaternary ammonium salts of chitosan with high antimicrobial activity as biocidal agents for disinfection, *Carbohydrate Polymers*, *trimis spre publicare*. **(FI ISI: 11,2)**

6. Bianca-Iustina Andreica, Alexandru Anisie, Manuela-Maria Iftime, Razvan Vasile Ababei, Lacramioara Ochiuz, Decebal Vasincu, Ingrid-Andrada Vasilache, Constantin Volovăț, Diana Boboc, Vladimir Poch, Lucian Eva, Maricel Agop, Dragos-Viorel

Scripcariu, Simona Ruxandra Volovăț, Swelling and biodegradation profile of chitosan/quaternized chitosan nanofibers in media mimicking wound exudate. A theoretical model – experimental approach, *Pharmaceutics*, în curs de evaluare. (FI ISI: 5,4)

Lucrări publicate în reviste cotate ISI (rezultate care nu sunt incluse în teză):

1. Sandu Cibotaru, Daniela Ailincăi, **Bianca-Iustina Andreica**, Xinjian Cheng, Luminita Marin, TEGylated Phenothiazine-Imine-Chitosan Materials as a Promising Framework for Mercury Recovery. *Gels*, (2022) 8. (FI ISI: 4,6)
2. Alexandru Anisie, **Bianca-Iustina Andreica**, Liliana Mititelu-Tartau, Corneliu Coman, Rostyslav Bilyy, Galyna Bila, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Evžen Amler, Luminita Marin, Biodegradable trimethyl chitosan nanofiber mats by electrospinning as bioabsorbable dressings for wound closure and healing, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2023) 249. (FI ISI: 8,2)
3. Andrei Bejan, Alexandru Anisie, **Bianca-Iustina Andreica**, Irina Rosca, Luminita Marin, Chitosan nanofibers encapsulating copper oxide nanoparticles: a new approach towards multifunctional ecological membranes with high antimicrobial and antioxidant efficiency, *International Journal of Biological Macromolecules*, trimis spre publicare. (FI ISI: 8,2)

Cereri brevet:

1. „Netesuta de chitosan cu co-eliberare controlata de antibiotic si principii active”, Luminita Marin, Alexandru Anisie, Daniela Ailincăi, Sandu Cibotaru, **Bianca Andreica**, Irina Rosca, Nr. înregistrare CBI : A / 00478 / 08.08.2022.
2. „Procedeu de electrofilare de nanofibre de chitosan și chitosan/chitosan cuaternizat”, Luminita Marin, Alexandru Anisie, **Bianca Andreica**, Liliana Mititelu Tartău, Nr. înregistrare CBI : A / 00749 / 21.11.2022.

Mobilități desfășurate pe parcursul stagiului de doctorat:

1. *Institutul de Molecule și Materiale Le Mans (IMMM)*, Universitatea Le Mans, Le Mans, Franța, sub îndrumarea Dr. Erwan Nicol, 9-22.05.2022.
2. *Institutul de Fizica Sao Carlos (IFSC)*, Universitatea Sao Paolo, Sao Carlos, Brazilia, sub îndrumarea Dr. Oliveira Osvaldo N. Jr., 10.01.-9.04.2023.

Participări la sesiuni științifice naționale și internaționale:

a) Comunicări orale

1. **Bianca-Iustina Andreica**, Daniela Ailincăi, Luminita Marin, *Ring-Opening Polymerization as a technique for the obtaining of soluble chitosan derivatives*, Sesiunea de comunicări științifice a tinerilor cercetători: ICMPP – Poartă Deschisă spre Viitor (MacroYouth'2020), Ediția 1, Iași, România, 19 Noiembrie 2020.
2. **Bianca-Iustina Andreica**, Irina Rosca, Luminita Marin, *Synthesis and characterization of novel imine derivatives of quaternary ammonium salt of chitosan*, Sesiunea de comunicări științifice a tinerilor cercetători: ICMPP – Poartă Deschisă spre Viitor (MacroYouth'2021), Ediția a2-a, Iași, România, 19 Noiembrie 2021.
3. **Bianca-Iustina Andreica**, Irina Rosca, Luminita Marin, *Development of biomaterials based on quaternized chitosan*, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași, Pregătim viitorul promovând excelența, Ediția a XXXII-a, Iași, România, 28 Februarie – 2 Martie 2022.
4. Alexandru Anisie, **Bianca-Iustina Andreica**, Luminita Marin, *Chitosan-based nanofibers for wound dressing applications*, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași, Pregătim viitorul promovând excelența, Ediția a XXXII-a, Iași, România, 28 Februarie – 2 Martie 2022.
5. **Bianca-Iustina Andreica**, Irina Rosca, Luminita Marin, *Design and properties of newly developed imino-quaternized chitosan biomaterials*, Conferința Internațională de Știința Materialelor și Inginerie (BraMat 2022), Ediția a12-a, Brașov, România, 9-11 Martie 2022.
6. Alexandru Anisie, **Bianca-Iustina Andreica**, Luminita Marin, *Biodegradable chitosan/quaternized chitosan nanofibers as wound dressings*, Conferința Internațională de Știința Materialelor și Inginerie (BraMat 2022), Ediția a12-a, Brașov, România, 9-11 Martie 2022.
7. Luminita Marin, Alexandru Anisie, **Bianca-Iustina Andreica**, Liliana Mititelu-Tartau, Rostyslav Bilyy, Galyna Bila, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Evžen Amler, *Quaternized chitosan based nanofibers as bioabsorbable wound dressings*, International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS 2023), Ediția a14-a, Siglufjörður, Islanda, 11– 14 Septembrie 2023.
8. **Bianca-Iustina Andreica**, Irina Rosca, Luminita Marin, *Composites nanofibers based on quaternized chitosan for food packaging*, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference (EPNOE 2023), Graz, Austria, 18 – 22 Septembrie 2023.

9. Sandu Cibotaru, Daniela Ailincăi, **Bianca-Iustina Andreica**, Luminita Marin, *TEGylated phenothiazine-chitosan based frameworks for mercury recovery*, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference (EPNOE 2023), Graz, Austria, 18 – 22 Septembrie 2023.

10. Luminita Marin, Alexandru Anisie, **Bianca-Iustina Andreica**, Liliana Mititelu-Tartau, Rostyslav Bilyy, Galyna Bila, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Evžen Amler, *Nanofibers based on quaternized chitosan as bioabsorbable wound dressings*, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference (EPNOE 2023), Graz, Austria, 18 – 22 Septembrie 2023.

b) Postere

1. **Bianca-Iustina Andreica**, Irina Rosca, Luminita Marin, *Biomaterials based on imino-quaternary ammonium salts of chitosan; synthesis and characterization*, EPF European Polymer Congress 2022, Praga, Republica Cehă, 26 Iunie - 1 Iulie 2022.

2. **Bianca-Iustina Andreica**, Daniela Ailincăi, Luminita Marin, *Synthesis of chitosan based derivatives with improved solubility in water, towards biomaterials' design*, EPF European Polymer Congress 2022, Praga, Republica Cehă, 26 Iunie - 1 Iulie 2022.

3. Alexandru Anisie, **Bianca-Iustina Andreica**, Luminita Marin, *Electrospinning of chitosan/quaternary salts of chitosan nanofibers for biomedical applications*, EPF European Polymer Congress 2022, Praga, Republica Cehă, 26 Iunie - 1 Iulie 2022.

4. **Bianca-Iustina Andreica**, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Liliana Mititelu-Tartau, Luminita Marin, *Binary chitosan/quaternized chitosan nanofibers – from design to possible applications*, Workshop do Instituto Nacional de Eletronica Organica (INEO) 2023, Nazare Paulista, Brazilia, 2 – 6 Aprilie 2023.

5. Sandu Cibotaru, Daniela Ailincăi, **Bianca-Iustina Andreica**, Luminita Marin, *Mercury recovery frameworks based on TEGylated phenothiazine-chitosan xerogels*, Workshop of Instituto Nacional de Eletronica Organica (INEO) 2023, Nazare Paulista, Brazil, 2 – 6 April 2023.

6. **Bianca-Iustina Andreica**, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Liliana Mititelu-Tartau, Luminita Marin, *Chitosan/quaternized chitosan nanofibers designed for biomedical applications*, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference (EPNOE 2023), Graz, Austria, 18 – 22 Septembrie 2023.

Suștinerea financiară care a contribuit la obținerea rezultatelor tezei de doctorat a fost asigurată din proiectele: *PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0569* *PN-III-P2-2.1-PED-2019-5071*, *PN-III-P4-ID-PCE-2020-2717*, *H2020-MSCA-RISE-2019* (nr. 873123).

Bibliografie selectivă

1. Arnold, W.A.; Blum, A.; Branyan, J.; Bruton, T.A.; Carignan, C.C.; Cortopassi, G.; Datta, S.; DeWitt, J.; Doherty, A.-C.; Halden, R.U.; et al. Quaternary Ammonium Compounds: A Chemical Class of Emerging Concern. *Environ Sci Technol* **2023**, *57*, 7645–7665, doi:10.1021/acs.est.2c08244.
2. Andreica, B.-I.; Cheng, X.; Marin, L. Quaternary Ammonium Salts of Chitosan. A Critical Overview on the Synthesis and Properties Generated by Quaternization. *Eur Polym J* **2020**, *139*, 110016, doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.110016.
3. Kerwald, J.; de Moura Junior, C.F.; Freitas, E.D.; Ochi, D.; Sorrechia, R.; Pietro, R.C.L.R.; Beppu, M.M. Coating of Surgical Masks with Quaternized Chitosan Aiming at Inactivating Coronavirus and Antibacterial Activity. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2023**, *5*, 100315, doi:10.1016/j.carpta.2023.100315.
4. Iftime, M.-M.; Morariu, S.; Marin, L. Salicyl-Imine-Chitosan Hydrogels: Supramolecular Architecturing as a Crosslinking Method toward Multifunctional Hydrogels. *Carbohydr Polym* **2017**, *165*, 39–50, doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.027.
5. Olaru, A.-M.; Marin, L.; Morariu, S.; Pricope, G.; Pinteala, M.; Tartau-Mititelu, L. Biocompatible Chitosan Based Hydrogels for Potential Application in Local Tumour Therapy. *Carbohydr Polym* **2018**, *179*, 59–70, doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.066.
6. Pauna, A.-M.R.; Mititelu Tartau, L.; Bogdan, M.; Meca, A.-D.; Popa, G.E.; Pelin, A.M.; Drochioi, C.I.; Pricop, D.A.; Pavel, L.L. Synthesis, Characterization and Biocompatibility Evaluation of Novel Chitosan Lipid Micro-Systems for Modified Release of Diclofenac Sodium. *Biomedicines* **2023**, *11*, 453, doi:10.3390/biomedicines11020453.
7. Anisie, A.; Oancea, F.; Marin, L. Electrospinning of Chitosan-Based Nanofibers: From Design to Prospective Applications. *Reviews in Chemical Engineering* **2023**, *39*, 31–70, doi:10.1515/revce-2021-0003.
8. Lungu, R.; Anisie, A.; Rosca, I.; Sandu, A.-I.; Ailincăi, D.; Marin, L. Double Functionalization of Chitosan Based Nanofibers towards Biomaterials for Wound Healing. *React Funct Polym* **2021**, *167*, 105028, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105028.
9. Andreica, B.-I.; Anisie, A.; Rosca, I.; Sandu, A.-I.; Pasca, A.S.; Tartau, L.M.; Marin, L. Quaternized Chitosan/Chitosan Nanofibrous Mats: An Approach toward Bioactive Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Carbohydr Polym* **2023**, *302*, 120431, doi:10.1016/j.carbpol.2022.120431.
10. Corazzari, I.; Nisticò, R.; Turci, F.; Faga, M.G.; Franzoso, F.; Tabasso, S.; Magnacca, G. Advanced Physico-Chemical Characterization of Chitosan by Means of TGA Coupled on-Line with FTIR and GCMS: Thermal Degradation

- and Water Adsorption Capacity. *Polym Degrad Stab* **2015**, *112*, 1–9, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006.
11. Ono, S.; Imai, R.; Ida, Y.; Shibata, D.; Komiya, T.; Matsumura, H. Increased Wound PH as an Indicator of Local Wound Infection in Second Degree Burns. *Burns* **2015**, *41*, 820–824, doi:10.1016/j.burns.2014.10.023.
 12. Minsart, M.; Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Mignon, A. Commercial Wound Dressings for the Treatment of Exuding Wounds: An in-Depth Physico-Chemical Comparative Study. *Burns Trauma* **2022**, *10*, doi:10.1093/burnst/tkac024.
 13. Maccaferri, E.; Cocchi, D.; Mazzocchetti, L.; Benelli, T.; Brugo, T.M.; Giorgini, L.; Zucchelli, A. How Nanofibers Carry the Load: Toward a Universal and Reliable Approach for Tensile Testing of Polymeric Nanofibrous Membranes. *Macromol Mater Eng* **2021**, *306*, 2100183, doi:10.1002/mame.202100183.
 14. The American Association for Surgery of Trauma Trauma Facts.
 15. Lu, X.; Li, X.; Yu, J.; Ding, B. Nanofibrous Hemostatic Materials: Structural Design, Fabrication Methods, and Hemostatic Mechanisms. *Acta Biomater* **2022**, *154*, 49–62, doi:10.1016/j.actbio.2022.10.028.
 16. Marin, L.; Stoica, I.; Mares, M.; Dinu, V.; Simionescu, B.C.; Barboiu, M. Antifungal Vanillin–Imino–Chitosan Biodynamic Films. *J Mater Chem B* **2013**, *1*, 3353, doi:10.1039/c3tb20558d.
 17. Ghosh, T.; Mohammed, Y.; Murahari, M.; Samual, S.E.; Deveswaran, R.; Basavaraj, B.V. Vanillin Based Crosslinked Films of CMCh-PVA for Wound Healing Application. *J Drug Deliv Sci Technol* **2023**, *83*, 104400, doi:10.1016/j.jddst.2023.104400.
 18. Bracchi, M.E.; Fulton, D.A. Orthogonal Breaking and Forming of Dynamic Covalent Imine and Disulfide Bonds in Aqueous Solution. *Chemical Communications* **2015**, *51*, 11052–11055, doi:10.1039/C5CC02716K.
 19. ISO - ISO 10993-5:2009 - Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity Available online: <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed on 31 August 2022).
 20. Marin, L.; Shova, S.; Dumea, C.; Bicu, E.; Belei, D. Self-Assembled Triazole AIE-Active Nanofibers: Synthesis, Morphology, and Photophysical Properties. *Cryst Growth Des* **2017**, *17*, 3731–3742, doi:10.1021/acs.cgd.7b00351.
 21. Hansen, P.E.; Spanget-Larsen, J. NMR and IR Investigations of Strong Intramolecular Hydrogen Bonds. *Molecules* **2017**, *22*, 552, doi:10.3390/molecules22040552.
 22. Richert, L.; Vetrone, F.; Yi, J.-H.; Zalzal, S.F.; Wuest, J.D.; Rosei, F.; Nanci, A. Surface Nanopatterning to Control Cell Growth. *Advanced Materials* **2008**, *20*, 1488–1492, doi:10.1002/adma.200701428.
 23. Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *Eur Polym J* **2013**, *49*, 780–792, doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.