

Academia Română
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”

Nr. 4487/3 X 2023

Doamnei/Domnului

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **30 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 pentru dezvoltarea de pansamente destinate vindecării rănilor”*, autor Alexandru Anisie, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE:

CS I Dr. Valeria Harabagiu

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

CS I Dr. Habil. Luminița Marin

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT ÎN COTUTELĂ:

Prof. Dr. Habil. Liliana Mititelu-Tarțău

Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore. T. Popa”, Iași

REFERENȚI:

CS I Dr. Habil. Mariana Pinteală

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

Prof. Dr. Habil. Paizs Csaba

Universitatea „Babeș-Bolyai”, Cluj

Prof. Dr. Ionel Mangalagiu

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, 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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "V. Harabagiu", with a stylized flourish at the end.

Mulțumiri

Cu onoare și bucurie dedic această teză de doctorat tuturor celor ca m-au sprijinit și încurajat în ultimii trei ani de aventură.

*În primul rând, aș dori să îi mulțumesc doamnei **Dr. Luminița Marin**, conducătorul meu științific, pentru că m-a îndrumat cu profesionalism, răbdare și înțelepciune. A fost pentru mine un mentor și un model care mi-a oferit nu numai cunoștințe și sfaturi academice, ci și încredere și motivație. De asemenea, aș dori să îi mulțumesc doamnei **Dr. Liliana Mititelu-Tarțău**, fără de care complexitatea studiilor nu ar fi fost aceeași.*

*Mulțumesc doamnei **Dr. Dalila Belei** pentru inițierea și îndrumarea în cercetare, începând cu studiile de licență și până în momentul de față.*

*Aș dori să le mulțumesc membrilor comisiei de evaluare, doamna **Dr. Mariana Pinteală** și domnilor **Dr. Csaba Paizs** și **Dr. Ionel Mangalagiu** pentru participarea la acest eveniment important din viața mea și pentru sugestiile formulate.*

*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 cercetător.*

*Le sunt recunoscător colegilor din **Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** pentru frumoasa colaborare pe care am avut-o. În special aș dori să le mulțumesc colegilor mei din colectivul **Policondensare și Polimeri Termostabili** care a fost întotdeauna lângă mine cu ajutor, sfaturi și încurajări. Mulțumiri colegilor din departamentul **Intelcentru** pentru realizarea studiilor de biocompatibilitate și activitate antimicrobiană.*

*În final, dar nu în ultimul rând, aș dori să le mulțumesc celor mai dragi persoane din viața mea: **familia mea**. Le sunt nespus de recunoscător **părinților, surorii și iubitei mele**, care m-au susținut necondiționat în toți acești ani. Ei au fost sursa mea de inspirație, de energie și de iubire.*

Cuprins

LISTĂ ABREVIERI	1
INTRODUCERE	7
STUDIU DE LITERATURĂ	11
CAPITOLUL I. FIBRE DE CHITOSAN. OBȚINERE. PROPRIETĂȚI. APLICAȚII	11
1.1 <i>Introducere</i>	11
1.2 <i>Electrofilarea chitosanului</i>	13
1.2.1 Electrofilarea chitosanului din soluții de acid trifluoroacetic.....	13
1.2.2 Electrofilarea chitosanului din soluții de acid acetic	14
1.2.3 Electrofilarea chitosanului din solvenți organici	15
1.2.4 Prepararea indirectă a fibrelor de chitosan	16
1.2.5 Observații cu privire la electrofilarea fibrelor de chitosan	17
1.2.6 Probleme legate de obținerea fibrelor de chitosan.....	18
1.3 <i>Electrofilarea amestecurilor de chitosan/poli(etilenoxid)</i>	21
1.3.1 Influența chitosanului asupra proprietăților fizico-chimice ale amestecurilor CS/PEO.....	21
1.3.2 Modularea morfologiei fibrelor CS/PEO și a funcționalității acestora	22
1.3.3 Reticularea fibrelor de CS/PEO.....	31
1.3.4 Factori care influențează morfologia fibrelor de CS/PEO.....	33
1.4 <i>Electrofilarea amestecurilor de CS/PVA</i>	36
1.5 <i>Electrofilarea amestecurilor de chitosan/acid polilactic</i>	39
1.6 <i>Electrofilarea amestecurilor de chitosan/policaprolactonă</i>	40
1.7 <i>Electrofilarea amestecurilor de chitosan/alți polimeri sintetici</i>	41
1.8 <i>Electrofilarea amestecurilor de chitosan/polimeri naturali</i>	43
1.9 <i>Electrofilarea chitosanului cuaternizat</i>	44
1.9.1 Electrofilarea directă a chitosanului cuaternizat.....	44
1.9.2 Prepararea indirectă a fibrelor de chitosan cuaternizat.....	46
1.10 <i>Concluzii</i>	48
CAPITOLUL II. RĂNILI ȘI VINDECAREA ACESTORA	49
2.1 Aspecte generale. Clasificarea rănilor.....	49
2.2 Vindecarea rănilor. Etape ale vindecării	52
2.3 Factori ce influențează vindecarea rănilor	53
CONTRIBUȚII PROPRII	57
CAPITOLUL III: OBȚINEREA DE FIBRE DE CHITOSAN ȘI FUNCȚIONALIZAREA ACESTORA CU ACID 2-FORMILFENILBORONIC	57
3.1 <i>Introducere. Argumentarea designului propus în contextul datelor de literatură</i>	57
3.2 <i>Studiu preliminar privind obținerea de fibre de chitosan și funcționalizarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic</i>	60
3.2.1 Prepararea de nanofibre de chitosan și studiul reacției de iminare.....	60
3.2.2 Caracterizare structurală	62
3.2.3 Caracterizare morfologică	65
3.2.4 Activitatea antimicrobiană.....	67
3.2.5 Concluzii.....	68
3.3 <i>Fibre microporoase de chitosan pentru obținerea de biomateriale biodegradabile cu activitate antimicrobiană</i>	69
3.3.1 Caracterizarea structurală a fibrelor de imino-chitosan.....	70

3.3.2 Morfologia fibrelor	75
3.3.3 Comportamentul la umflare.....	79
3.3.4 Biodegradarea materialului fibrilar.....	80
3.3.5 Activitatea antimicrobiană.....	83
3.3.6 Biocompatibilitatea in vitro	87
3.3.7 Concluzii.....	88
CAPITOLUL IV: NANOFIBRE DE CHITOSAN CU UMPLUTURĂ DE NORFLOXACINĂ PENTRU VINDECAREA ARSURILOR	91
4.1 Introducere	91
4.2 Prepararea pansamentelor pe bază de chitosan și compoziția acestora	92
4.3 Caracterizare morfologică.....	97
4.4 Comportamentul fibrelor în mediu umed. Umflarea, biodegradarea și eliberarea in vitro a medicamentului.....	99
4.5 Activitatea antimicrobiană.....	104
4.6 Biocompatibilitatea in vitro	106
4.7 Biocompatibilitatea in vivo	107
4.8 Vindecarea rănilor	110
4.9 Concluzii.....	115
CAPITOLUL V: NANOFIBRE BIODEGRADABILE DE CHITOSAN/TRIMETIL CHITOSAN PENTRU APLICAREA CA PANSAMENTE BIOABSORBABILE PENTRU ÎNCHIDEREA ȘI VINDECAREA RĂNILOR.....	117
5.1 Introducere	117
5.2 Obținerea fibrelor binare de chitosan/trimetil chitosan și caracterizarea lor structurală și morfologică	118
5.3 Comportamentul fibrelor în mediu apos. Solubilitate, umflare, biodegradare, sorbție de vapori de apă	124
5.4 Proprietăți mecanice și de adeziune	127
5.5 Activitatea antimicrobiană in vitro	129
5.6 Biocompatibilitatea in vitro și in vivo.....	130
5.7 Vindecarea rănilor	135
5.8 Discuții.....	137
5.9 Concluzii.....	140
CAPITOLUL VI: NANOFIBRE DE CHITOSAN ȘI CHITOSAN CUATERNIZAT CARE ÎNCAPSULEAZĂ NANOPARTICULE DE OXID DE CUPRU	143
6.1 Introducere	143
6.2 Design, morfologie și compoziție.....	145
6.3 Proprietățile mecanice	155
6.4 Activitatea antioxidantă.....	156
6.5 Activitatea antimicrobiană.....	157
6.6 Permeabilitatea/respirabilitatea și capacitatea de îndepărtare a prafului	158
6.7 Umflare și biodegradare	162
6.8 Biodegradare în sol.....	163
6.9 Concluzii.....	166
CAPITOLUL VII: PARTEA EXPERIMENTALĂ	167
7.1 Materiale	167
7.2 Prepararea fibrelor	167
7.2.1 Studiu preliminar privind obținerea fibrelor de chitosan și funcționalizarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic	167
7.2.2 Fibre microporoase de chitosan pentru obținerea de biomateriale biodegradabile cu activitate antimicrobiană.....	168

7.2.3 Formulări pe bază de fibre de chitosan pentru eliberare controlată de norfloxacină...	170
7.2.4 Nanofibre biodegradabile de chitosan/trimetil chitosan ca pansamente bioabsorbabile pentru închiderea și vindecarea rănilor	171
7.2.5 Nanofibre de chitosan și chitosan cuaternizat care încapsulează nanoparticule de oxid de cupru.....	174
7.3 Metode de caracterizare	175
ANEXE	189
8.1 Obținerea de fibre de chitosan și funcționalizarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic.....	189
8.2 Nanofibre de chitosan cu umplutură de norfloxacină pentru vindecarea arsurilor.....	195
8.3 Nanofibre biodegradabile de chitosan/trimetil chitosan ca pansamente bioabsorbabile pentru închiderea și vindecarea rănilor	217
8.4 Nanofibre de chitosan și chitosan cuaternizat care încapsulează nanoparticule de oxid de cupru.....	223
CONCLUZII GENERALE	225
REFERINȚE	237

Introducere

Chitosanul este un biopolimer ce atrage atenția cercetătorilor datorită potențialelor aplicații ale acestuia în diverse domenii, cum ar fi agricultura, medicina și industria. Este un derivat de chitină, o polizaharidă naturală care se găsește în abundență în carapacea crustaceelor și în peretele celular al fungilor. Chitina este a doua cea mai abundentă polizaharidă de pe Pământ după celuloză și joacă un rol deosebit în structura și funcțiile multor organisme.

Istoria chitosanului începe încă din secolul al XIX-lea, când chitina a fost descoperită și numită de chimiștii francezi Henri Braconnot și Auguste Odier. Chitosanul a fost obținut pentru prima dată de Rouget în anul 1859 prin tratarea chitinei cu hidroxid de potasiu, dar numele de chitosan a fost folosit pentru prima dată de Hoppe - Seyler în 1894. De atunci, chitosanul a fost studiat și modificat de mulți cercetători, care au explorat proprietățile sale chimice, și a fost folosit pentru diferite scopuri, cum ar fi ca agent de limpezire în vinificație, ca biopesticid în agricultură, ca pansament pentru răni în medicină și ca material de acoperire în industrie. Datorită faptului că este un biopolimer versatil și durabil, biocompatibil, biodegradabil, cu activitate antimicrobiană și toxicitatea scăzută, care poate fi adaptat pentru a satisface diferite nevoi și provocări, chitosanul este de asemenea investigat pentru aplicațiile sale în domenii emergente, cum ar fi biomedicina, nanotehnologia și biotehnologia.

Electrofilarea este o tehnică de producere a nanofibrelor din soluții sau topituri de polimeri prin aplicarea unei tensiuni electrice ridicate. Electrofilarea are o istorie lungă, care datează încă din secolul al XVII-lea, când mișcarea lichidelor prin forța electrostatică a fost observată pentru prima dată de William Gilbert. Primul patent privind electrofilarea a fost depus de John Francis Cooley în 1900, care a folosit o duză conectată la un câmp electric pentru a trage fibre dintr-un lichid. În 1914, John Zeleny a publicat un studiu despre comportamentul picăturilor de lichid la capătul capilarelor metalice, care a pus bazele modelării matematice a electrofilării. De atunci, electrofilarea a fost dezvoltată și îmbunătățită de mulți cercetători, care au explorat principiile, parametrii și aplicațiile sale.

Electrofilarea chitosanului a fost cercetată pe scară largă pentru aplicații potențiale în eliberarea controlată de medicamente, ingineria țesuturilor, vindecarea rănilor și tratarea apei. Cu toate acestea, electrofilarea chitosanului este o provocare din cauza solubilității și vâscozității sale scăzute. Prin urmare, au fost dezvoltate diferite strategii pentru a îmbunătăți electrofilabilitatea chitosanului, cum ar fi amestecarea cu alți polimeri, modificarea structurii, adăugarea de solvenți sau aditivi și optimizarea parametrilor de proces.

Electrofilarea poate modifica proprietățile nanofibrelor de chitosan în comparație cu materialul original sau soluția sa. De exemplu, prin electrofilare, raportul suprafață-volum al nanofibrelor de chitosan crește foarte mult, aspect care conduce la îmbunătățirea suprafeței active și prin urmare la îmbunătățirea proprietăților, de exemplu capacitatea de adsorbție, bioactivitatea și comportamentul de eliberare a medicamentelor. Electrofilarea poate afecta și cristalinitatea, orientarea, porozitatea și rezistența mecanică a nanofibrelor de chitosan în funcție de parametrii de proces cum ar fi tensiunea, debitul, distanța, umiditatea și temperatura. De asemenea, prin electrofilare se pot obține materiale compozite prin introducerea de umpluturi în soluțiile de electrofilat sau prin electrofilare coaxială, care pot îmbunătăți funcționalitatea și performanța fibrelor pentru aplicații specifice.

Nanofibrele de chitosan au fost folosite pentru a dezvolta noi materiale pentru vindecarea rănilor și biomateriale inteligente datorită diferitelor funcționalități, cum ar fi natura netoxică, biocompatibilitatea, potențialul antimicrobian, capacitatea de a absorbi exsudatul rănilor și de a menține un mediu umed, și promovarea regenerării pielii, eliminând în același timp și riscul apariției unei infecții. Aceste aspecte sunt foarte importante în procesul de vindecare, deoarece infecția este una dintre cele mai frecvente complicații care poate încetini procesul de

vindecare a rănilor, în special în cazul arsurilor care sunt exsudează abundent și sunt mai predispușe infectării.

În lumina acestor date de literatură, teza de doctorat intitulată „*Derivați de chitosan pentru dezvoltarea de pansamente destinate vindecării rănilor*” are ca scop dezvoltarea de materiale pe bază de fibre de chitosan bioactive ce pot fi utilizate în tratarea rănilor cauzate de arsuri.

Teza este structurată în două părți principale, divizate în șapte capitole. Prima parte este alcătuită din două capitole, în **Capitolul I** sunt prezentate date de literatură referitoare la obținerea materialelor pe bază de chitosan prin metoda de electrofilare, iar în **Capitolul II** sunt discutate sumar aspecte generale cu privire la vindecarea rănilor. Cea de-a doua parte este dedicată prezentării contribuțiilor proprii la dezvoltarea domeniului, împărțită în cinci capitole. **Capitolele III, IV, V și VI**, corespund la patru direcții diferite de obținere de materiale pentru vindecarea rănilor, iar **Capitolul VII** include prezentarea materialelor, metodelor și echipamentelor utilizate pentru obținerea rezultatelor.

Capitolul I se axează pe prezentarea principalelor căi raportate în literatură pentru electrofilarea chitosanului, punând accentul pe impactul parametrilor utilizați în procesul de electrofilare și caracteristicile morfologice ale fibrelor obținute. De asemenea, sunt discutate avantajele și dezavantajele fiecărei rute și potențialele aplicații ale materialelor obținute.

În **Capitolul II** sunt discutate aspecte cu privire la răni, tipurile de răni, vindecarea acestora și factori care îngreunează procesul de vindecare, cu accent pe particularitățile rănilor provocate de arsuri.

Capitolul III descrie obținerea de fibre de chitosan și funcționalizarea acestora cu o aldehydă cu proprietăți bioactive. Acesta este structurat în trei subcapitole, primul fiind dedicat argumentării designului materialului propus, subcapitolul II este un studiu preliminar de electrofilare a chitosanului și iminare a fibrelor obținute în vederea stabilirii protocolului de obținere a materialului dorit, iar subcapitolul III abordează o metodă nouă de obținere de fibre de chitosan mezoporoase și funcționalizarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic.

Capitolul IV se concentrează pe obținerea de bandaje pentru tratarea rănilor cauzate de arsurile produse prin opărire, bandaje ce au la bază fibre mezoporoase de chitosan încărcate cu antibiotic cu spectru larg de acțiune (norfloxacină) și sigilarea acestuia în pori prin modificarea fibrelor la suprafață prin iminare cu acid 2-formilfenilboronic. Studiul a urmărit atât caracterizarea noilor materiale din punct de vedere structural, supramolecular și morfologic, cât și determinarea proprietăților relevante pentru vindecarea rănilor și investigarea capacității de vindecare pe modele de arsuri la șobolani.

În **Capitolul V** s-au obținut nanofibre pe bază de chitosan funcționalizat cu grupări cuaternare de amoniu. Alegerea acestui derivat de chitosan a luat în calcul proprietățile sale îmbunătățite în comparație cu chitosanul, cum ar fi mucoadezivitatea, bioadezivitatea, proprietățile antimicrobiene și antioxidante, caracteristici promițătoare pentru obținerea de pansamente bioresorbabile active. Compoziția, morfologia și proprietățile fibrelor au fost determinate, iar fibrele biocompatibile cu un raport optim între cei doi componenți au fost investigate în experimente de vindecare a arsurilor la șobolani.

Capitolul VI cuprinde o serie de materiale multifuncționale proiectate cu scopul de a răspunde provocărilor aplicațiilor de înaltă performanță. Studiul se concentrează pe electrofilarea de nanofibre de chitosan/chitosan cuaternizat dopate cu nanoparticule de oxid de cupru pentru a obține biomateriale multifuncționale cu activitate antimicrobiană. S-a utilizat tehnica de electrofilare fără ac pentru producție în masă și s-au evaluat caracteristicile nanofibrelor rezultate, inclusiv proprietățile mecanice, activitatea antimicrobiană, antioxidantă, biodegradarea și capacitatea de a crea o barieră fizică față de impuritățile din mediul înconjurător, proprietăți relevante pentru vindecarea rănilor dar și pentru designul de materiale pentru măști de protecție sau filtre de aer.

În **Capitolul VII** este redată partea experimentală ce cuprinde metodele de preparare a fibrelor bazate pe chitosan, materialele, echipamentele și procedeele de lucru utilizate pentru efectuarea studiilor, spectre, figuri și tablele cu date suplimentare care consolidează rezultatele prezentate în capitolele anterioare.

Capitolul III: Obținerea de fibre de chitosan și funcționalizarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic

3.1 Introducere. Argumentarea designului propus în contextul datelor de literatură

Nanofibrele de chitosan, obținute prin tehnica de electrofilare sunt materiale cu aplicații semnificative în biomedicină, industria alimentară, protecția mediului și electronică, datorită suprafeței mari și a performanțelor lor remarcabile (sunt biocompatibile, biodegradabile și au proprietăți antimicrobiene).

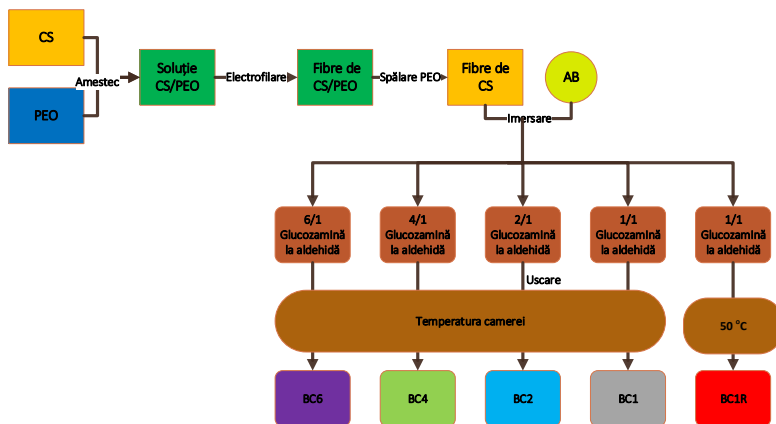
Unul dintre domeniile de cercetare promițătoare este tratarea rănilor cauzate de arsuri, o problemă majoră de sănătate. Nanofibrele de chitosan, datorită similitudinii lor structurale cu matricea extracelulară naturală, sunt candidați ideali pentru bandaje.

În căutarea unei soluții, s-au propus noi biomateriale multifuncționale bazate pe nanofibre de chitosan microporoase, funcționalizate cu un agent antimicrobian. Aceste fibre pot îmbunătăți schimbul de gaze, pot elibera agenți antimicrobieni la cerere și se pot biodegrada treptat în prezența enzimelor din exsudatul rănilor, evitând astfel traumele asociate îndepărtării mecanice. Această abordare ar putea revoluționa tratamentul rănilor, în special al arsurilor, reducând riscul de infecții și accelerând procesul de vindecare.

3.3 Fibre microporoase de chitosan pentru obținerea de biomateriale biodegradabile cu activitate antimicrobiană

S-a preparat o serie de nanofibre de imino-chitosan cu un conținut diferit de unități iminice, prin reacția de condensare în sistem eterogen a fibrelor de chitosan cu acid 2-formilfenilboronic în etanol.

Sinteza a fost efectuată, prin varierea rapoarte molare diferite între unitățile glucosamină ale chitosanului și aldehidă (**Schema 11**).



Schema 11. Protocolul de preparare al nanofibrelor de imino-chitosan

3.3.4 Caracterizarea structurală a fibrelor de imino-chitosan

Iminarea fibrelor de chitosan a fost studiată prin spectroscopie FTIR, $^1\text{H-RMN}$ și UV-Vis.

Spectroscopia FTIR a demonstrat formarea legăturilor iminice prin apariția unei benzi la 1624 cm^{-1} . Banda grupării formil a acidului 2-formilfenilboronic nu a fost observată, ceea ce indică faptul că nu există aldehidă nereacționată în probele de fibre funcționalizate.

Spectroscopia $^1\text{H-RMN}$ a confirmat reacția de iminare și a furnizat informații cantitative despre gradul de conversie a grupărilor amino în unități imino. Gradul de conversie crește cu creșterea raportului molar dintre amină și aldehidă și atinge o valoare maximă de 52.87%.

Spectroscopia UV-Vis a demonstrat reversibilitatea legăturii iminice. Echilibrul reacției de iminare este deplasat către formarea de reactanți pe măsura ce aldehida este îndepărtată din sistem, putând spune că aldehida se eliberează la nevoie.

3.3.5 Morfologia fibrelor

Analiza SEM a probelor electrofilate din soluția de CS/PEO au arătat o morfologie fibrilară fină, fără defecte de tip mărgelă și diametru de $137 \pm 21\text{ nm}$. Prin eliminarea PEO-ului din fibre, diametrul mediu a fost unul mai mare de $176 \pm 33\text{ nm}$. Prin iminare, materialele fibrilare au devenit mai puțin omogene, cu un diametru mediu cuprins între 139 ± 14 și $185 \pm 28\text{ nm}$ și pori inter-fibrilari în jur de $1\text{ }\mu\text{m}$ și micropori intra-fibrilari de până la 2 nm (fapt demonstrat prin sorbția de vapori de apă). Atunci când probele au fost analizate utilizând microscopia optică în lumină polarizată, acestea au prezentat o textură birefringentă continuă, indicând faptul că macromoleculele de chitosan s-au aliniat în timpul procesului de electrofilare.

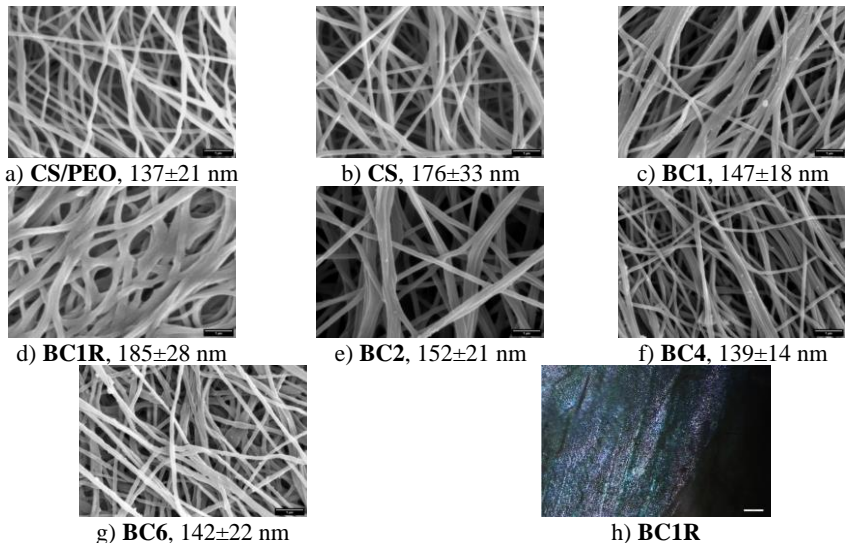


Figura 16. Imagini reprezentative SEM (a-g) ale fibrelor de CS/PEO, CS și ale celor de imino-chitosan (scala de $1\text{ }\mu\text{m}$), h) imagine reprezentativă POM a probei BC1R (scala $100\text{ }\mu\text{m}$)

3.3.6 Comportamentul la umflare

Fibrele de chitosan și imino-chitosan au prezentat o umflare rapidă în contact cu apa, atingând un MES de aproximativ 30 g/g în mai puțin de o oră. Această capacitate de umflare este importantă pentru utilizarea fibrelor ca bandaje în vindecarea rănilor, deoarece permite drenarea exsudatului în timp ce menține un mediu umed, necesar pentru procesul de vindecare.

3.3.7 Biodegradarea materialului fibrilar

În prima etapă a vindecării, când pH-ul este de 8,5, începe biodegradarea fibrelor, eliberând aldehida bioactivă. Biodegradarea se intensifică în cea de a doua etapă a vindecării când pH-ul atinge valoarea de 10, iar fibrele se descompun în cea de a treia etapă a vindecării când pH-ul rănii atinge o valoare de 5,5, pH-ul dermei sănătoase. Se poate estima că fibrele microporoase de chitosan ar trebui să se descompună în timpul perioadei de vindecare a rănilor, evitând astfel debridarea traumatică a rănilor.

3.3.8 Activitatea antimicrobiană

Activitatea antimicrobiană a nanofibrelor a fost testată împotriva unor bacterii reprezentative Gram-pozitive (*S. aureus*) și Gram-negative (*E. coli*), drojdii (*C. albicans*) și fungi (*A. brasiliensis*).

Deși chitosanul este bine cunoscut ca având proprietăți antimicrobiene [1], fibrele de chitosan nu au inhibat creșterea microbiană în proximitatea acestora. În cazul fibrelor de imino-chitosan (BC1-BC6), a apărut o zonă de inhibiție împotriva *C. albicans* (Figura 13b), *S. aureus* (Figura 13c) și *A. brasiliensis* (Figura 13d). Activitatea fibrelor a fost direct proporțională cu gradul de iminare al probelor, însă s-a observat o activitate puternică chiar și pentru proba BC6, ce a avut cel mai mic grad de iminare.

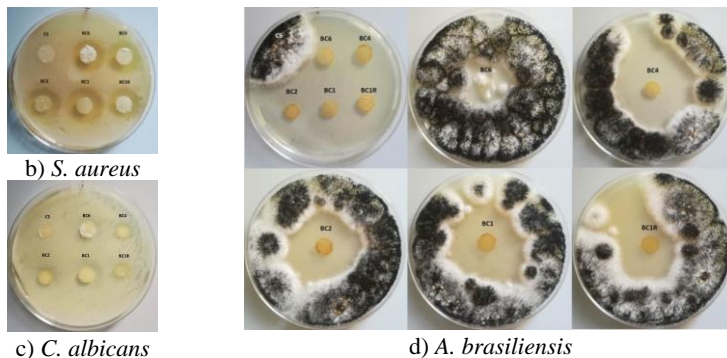
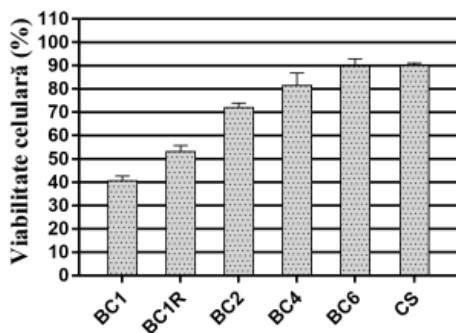


Figura 13. Activitatea antimicrobiană a fibrelor împotriva tulpinilor b) *S. aureus*, c) *C. albicans* și c) *A. brasiliensis*

3.3.9 Biocompatibilitatea in vitro

Rezultatele au indicat că, cu excepția probelor BC1 și BC1R, toate probele au îndeplinit condițiile evaluării biocompatibilității (Figura 25a). Citotoxicitatea probelor BC1 și BC1R a fost cauzată de cantitatea mare de unități imină la suprafața fibrelor, și se așteaptă să scadă odată ce cantitatea de aldehydă este consumată în procesul de vindecare.



a)

Figura 25. a) Viabilitatea celulară relativă a celulelor NHDF (Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm S.E.M. (eroarea standard a mediei), $n = 9$)

3.3.10 Concluzii

Prepararea de nanofibre microporoase de chitosan și condensarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic pentru a atinge un grad de iminare de 16 % a chitosanului, a condus la obținerea de biomateriale cu (i) capacitate de a se umfla și astfel de a drena exsudatul plăgii favorizând un mediu umed adecvat pentru vindecare; (ii) biocompatibilitate și bioadezivitate benefică pentru repararea țesuturilor; (iii) activitate antimicrobiană benefică pentru prevenirea infecției plăgii în primele etape de vindecare și (iv) viteza de biodegradare care se potrivește bine perioadei de vindecare a plăgii, indicând posibilitatea evitării debridării traumatice. Toate aceste proprietăți cumulate care satisfac cerințele unui pansament ideal încurajează investigații ulterioare pentru a oferi un produs comercializabil. Mai mult, acest studiu aduce în atenția cercetătorilor un nou design promițător pentru pansamentele pentru plăgi, constând din nanofibre de chitosan microporoase funcționalizate prin iminare cu agenți antimicrobieni.

Capitolul IV: Nanofibre de chitosan cu umplutură de norfloxacină pentru vindecarea arsurilor

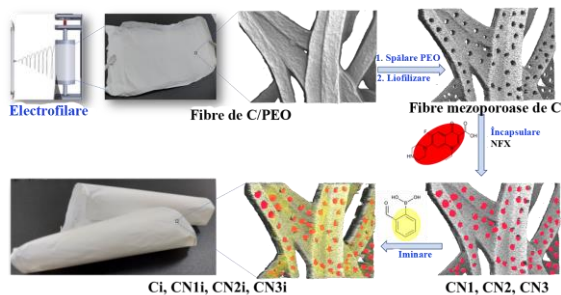
4.1 Introducere

Ideea acestui studiu a fost să dezvolte pansamente bioabsorbabile capabile să vindece arsurile. În dezvoltarea designului unui pansament potrivit, s-a ținut cont de rezultatele obținute și expuse în capitolele precedente. Astfel, studiile anterioare au demonstrat că fibre de chitosan pot fi obținute prin electrofilarea unei soluții de chitosan/PEO, urmată de îndălăturarea PEO-ului [2–4]. Această strategie conferă fibrelor de chitosan pori intra-fibrilari, care aduc avantaje suplimentare, cum ar fi o capacitate de absorbție ridicată și o viteză mare de biodegradare. Un alt aspect interesant este funcționalizarea chitosanului prin legături covalente reversibile de tip imină, caz în care s-a demonstrat că se obțin materiale cu proprietăți dinamice, capabile să răspundă la stimuli externi cum ar fi pH-ul sau consumarea componentelor [2,3,5]. În acest mod, realizând reacția de iminare cu o aldehydă ce prezintă proprietăți antimicrobiene, pot rezulta materiale capabile să elibereze aldehyda antimicrobiană „la cerere”, prin deplasarea echilibrului reacției de iminare către reacțanți pe măsură ce aldehyda este consumată în procesul de inactivare a agenților patogeni [6]. Astfel, în acest context, au fost obținute fibre mezoporoză de chitosan încărcate cu un antibiotic cu spectru larg de acțiune, norfloxacină (NFX), modificate la suprafață prin iminare cu o aldehydă cu activitate antimicrobiană, acidul 2-formilfenilboronic (AB). Materialele au fost investigate în detaliu, urmărindu-se compoziția, morfologia și proprietățile acestora necesare pentru vindecarea rănilor.

4.2 Prepararea pansamentelor pe bază de chitosan și compoziția acestora

Nanofibrele compozite au fost obținute în trei etape.

(1) Fibre mezoporoase de chitosan (C) au fost obținute prin electrofilarea unei soluții de CS/PEO urmata de îndepărtarea PEO-ului. Astfel, soluția de CS/PEO (2/1, m/m) cu o concentrație de 2,1 % în acid acetic 80 %, a fost electrofilată utilizând parametrii de electrofilare: voltaj = 7kV, debit = 0,4 mL/h, distanță ac-colector = 10 cm, diametrul interior al acului = 0,8 mm, viteză rotație colector rotativ = 800 rpm, temperatură = 27 – 28 °C. PEO-ul a fost înlăturat prin spălarea fibrelor cu o soluție de NaOH (5 %)



Schema 12. Reprezentarea schematică a etapelor de preparare ale nanofibrelor compozite

%) pentru neutralizarea acidului acetic rezidual și spălarea cu apă până la pH neutru. În vederea conservării porilor intra-fibrilari creați, fibrele au fost apoi liofilizate din stare umedă.

(2) Etapa de încărcare cu NFX a fost realizată prin metoda de adsorbție la echilibru, prin imersarea fibrelor într-o soluție saturată de norfloxacină, utilizând diferite condiții de încărcare și incubarea acestora timp de 24 de ore în vase de PlexiGlass. După aceasta, fibrele au fost uscate în condiții atmosferice și mai apoi sub vacuum.

(3) Etapa de modificare la suprafață a fibrelor a fost realizată prin șpreierea probelor cu o soluție de AB 0,28 %, astfel încât raportul molar dintre glucozamină/aldehidă să fie de 10/1.

Designul fibrelor compozite, descrise în **Schema 12**, a fost demonstrat prin analiză termogravimetrică (ATG), sorbție dinamică de vapori (DVS), spectroscopie FTIR și ¹H-RMN.

Spectrele FTIR și ¹H-RMN au evidențiat eficiența încărcării medicamentului și a iminării fibrelor de chitosan, dar au adus de asemenea informații cu privire la interacțiunile fizice între componente. Astfel, spectrele FTIR au confirmat încapsularea NFX-ului prin apariția benzilor caracteristice: benzile de vibrație de întindere a grupării carbonil la 1636 cm⁻¹ și cele de forfecare a NH-ului chinolinic la 1618 cm⁻¹. Iminarea fibrelor cu AB a fost confirmată de spectrele FTIR, care au arătat apariția unei benzi de vibrație caracteristică la 1625 cm⁻¹. În cazul spectrelor RMN, încapsularea NFX-ului în fibre a condus la lărgirea semnalelor caracteristice și deplasarea acestora de la 8,52 - 6,94 ppm la 8,9 - 7,2 ppm, în concordanță cu modificarea vecinătăților chimice prin apariția de legături de hidrogen intermoleculare cu macromoleculele de chitosan.

4.3 Caracterizare morfologică

Imaginile SEM au arătat formarea de fibre încălcite continue cu un diametru mediu de aproximativ 170 nm, pentru a forma un material super poros cu micro- și submicro- pori cu diametre de până la 4 μm. Compararea imaginilor SEM cu o mărire mare (100 000 x) a relevat o topografie mai rugoasă a fibrelor încărcate cu NFX, dar nu au fost detectate cristale de medicament, susținând ipoteza încapsulării medicamentului în interiorul acestora. Birefrința puternică a fibrelor sub lumină polarizată indică un grad de cristalinitate, rezultat în procesul de electrofilare datorită alinierii macromoleculelor în câmpul electric [7].

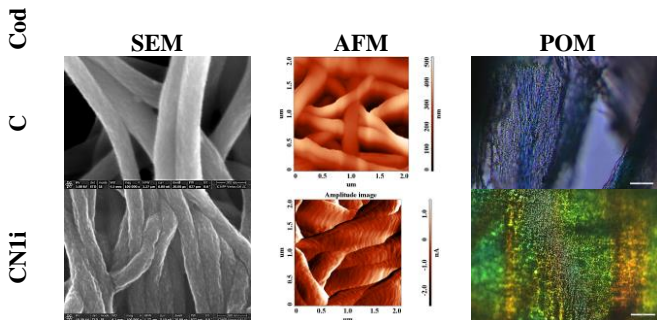


Figura 27. Imagini SEM, AFM și POM ale probelor studiate

4.4 Comportamentul fibrelor în mediu umed. Umflarea, biodegradarea și eliberarea *in vitro* a medicamentului

Atunci când fibrele sunt imersate într-un mediu cu pH-ul caracteristic pentru prima etapă de vindecare a răni (pH=7,4-10), fibrele de **C** se umflă rapid atingând un grad de umflare de aproximativ 17 g/g, în mai puțin de 15 minute (Figura 29a). Când acestea sunt încărcate cu NFX, adsorbția medie a fibrelor scade la o valoare de aproximativ 7 g/g, și scade mai mult după iminare, la o valoare de aproximativ 5 g/g (Figura 29a).

Fibrele au prezentat o eliberare controlată a NFX-ului timp de 8 ore, eliberarea fiind corelată cu pH-ul mediului: pentru un pH mai mare s-a înregistrat o viteză de eliberare mai mare, datorită solubilității mai bune a norfloxacinii în pH alcalin (Figura 29b,c). S-a observat că iminarea probelor a încetinit eliberarea medicamentului. De exemplu, dacă pentru proba **CN1** s-a obținut o eliberare de 66 % după 4 ore, iar pentru proba **CN1i** s-a înregistrat o eliberare a norfloxacinii de 53 %.

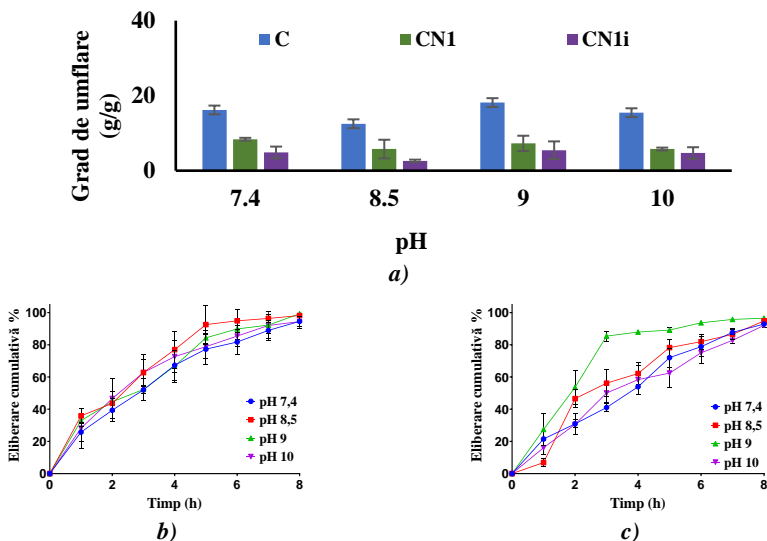


Figura 29. Comportamentul probelor în mediu umed: a) Gradul de umflare în medii cu pH-uri diferite a probelor **C**, **CN1** și **CN1i**; eliberarea *in vitro* a medicamentului în medii cu pH-uri diferite pentru b) **CN1** și c) **CN1i**

4.5 Activitatea antimicrobiană

Activitatea antimicrobiană a fost determinată pe tulpini microbiene reprezentative pentru rănilor infectate, bacterii Gram-negativ și Gram-pozitive, precum și tulpini de drojdie și de fungi. Analiza comparativă a rezultatelor a arătat că probele compozite au activitate antimicrobiană puternică cu un spectru larg de acțiune împotriva tuturor agenților patogeni studiați, rezultată prin contribuția fiecărui component. Astfel, activitatea slabă a fibrelor de chitosan (C) împotriva *E. coli* și *K. pneumoniae* a fost îmbunătățită cu proprietăți antimicrobiene împotriva *S. aureus*, *E. faecalis* și *P. aeruginosa* atunci când fibrele au fost încărcate cu NFX (CN1) și cu activitate împotriva *C. glabrata* și *A. brasiliensis* când fibrele au fost iminate cu AB (CN1i vs. CN2i).

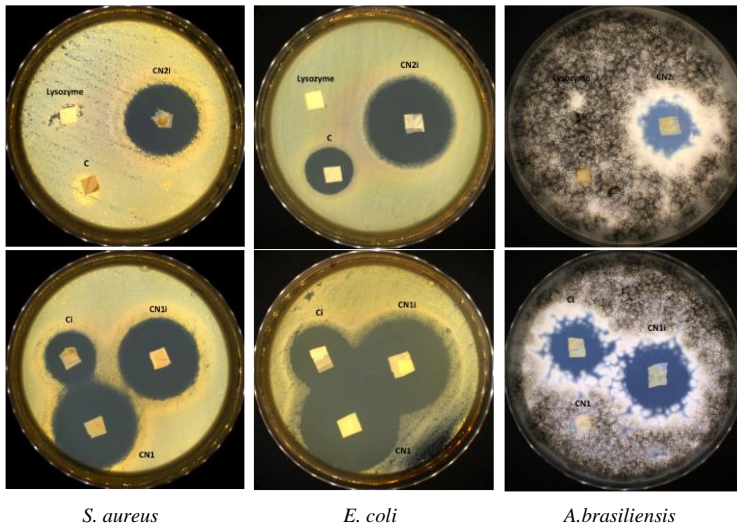
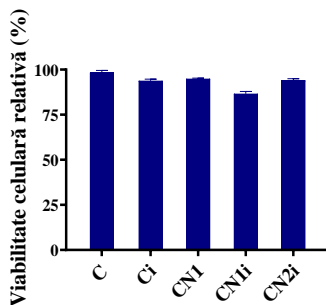


Figura 31. Imagini reprezentative ale zonelor de inhibiție dezvoltate de probele studiate împotriva tulpinilor reprezentative, după 24 ore de incubare (pentru tulpinile de bacterii și drojzii) și 72 de ore (pentru tulpinile fungice)

4.6 Biocompatibilitate *in vitro*



Rezultatele au arătat că viabilitatea celulară a fost mai mare de 85 % pentru toate probele, depășind pragul de 70 % impus pentru dispozitivele medicale utilizate în contact cu țesuturile vii (**Figura 32a**).

Figura 32. Reprezentarea grafică a viabilității celulare relative a celulelor NHDF după un contact de 48 de ore cu probele studiate, în comparație cu celulele netratate. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie \pm eroarea standard a mediei (S.E.M.), $n = 9$

4.7 Biocompatibilitate *in vivo*

Impactul probelor asupra țesutului viu a fost investigat *in vivo* pe șobolani, prin evaluarea parametrilor biochimici care oferă informații asupra stadiului clinic și funcția metabolică a organelor și țesuturilor

Evaluarea biochimică și histopatologică, arată că administrarea subcutanată a probelor nu a produs daune în timpul biodegradării asupra circulației sanguine ficatului, rinichilor și sistemului imunitar.

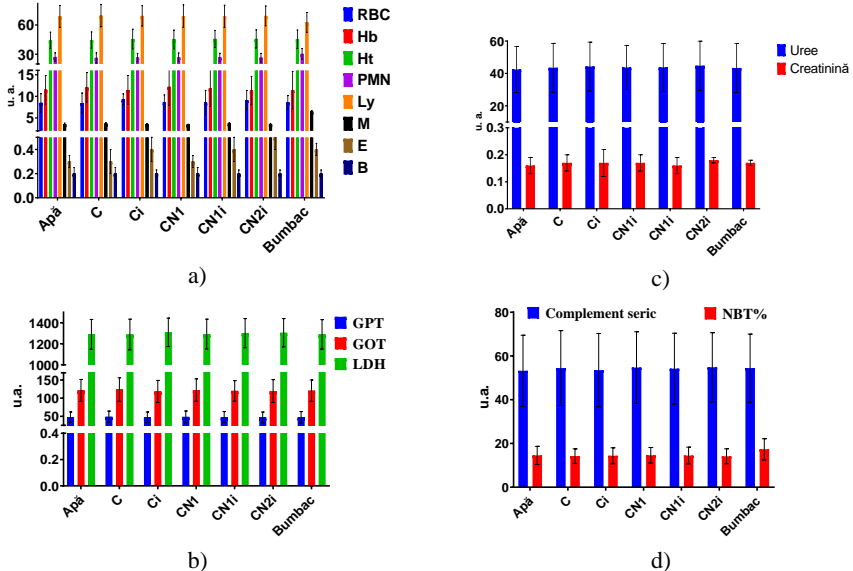


Figura 33. Nivelul a) parametrilor hematologici; b) produșilor finali ai metabolismului; c) enzimelor plasmatic și d) parametrilor imunologici, măsurați după 24 de ore de la implantarea subcutanată a probelor la șobolani

4.8 Vindecarea rănilor

Studiul de vindecare a rănilor a evaluat eficiența fibrelor în cazul tratării rănilor dermice profunde la șobolani, pe o perioadă de 25 de zile. S-au analizat parametrii macroscopici (aspectul, suprafața, escara, epitelizarea) și criteriile microscopice (coagularea, straturile celulare, angiogeneza, celulele inflamatorii, depozitele de fibrină, epitelizarea). Un pansament de tifon și vaselină a fost utilizat ca grup de control pozitiv. Imaginile arsurilor au fost documentate în diferite etape de timp.

De remarcat este faptul că fibrele mezoporoase de chitosan utilizate în studiu au demonstrat o vindecare mai rapidă decât alte fibre pe bază de chitosan, precum chitosanul/PEO. Această diferență poate fi atribuită absenței PEO-ului și prezenței mezoporiilor în interiorul fibrelor, care facilitează o umflare rapidă și o umiditate favorabilă pentru vindecarea rănilor.

Studiul comparativ privind vindecarea rănilor a arătat că utilizarea nanofibrelor de chitosan promovează o vindecare mai rapidă și o sinteză fibrilară intensă. Nanofibrele de chitosan acționează ca un factor activ în vindecarea rănilor, interacționând direct cu rana, spre deosebire de tifon, care are un rol mai pasiv de protecție.

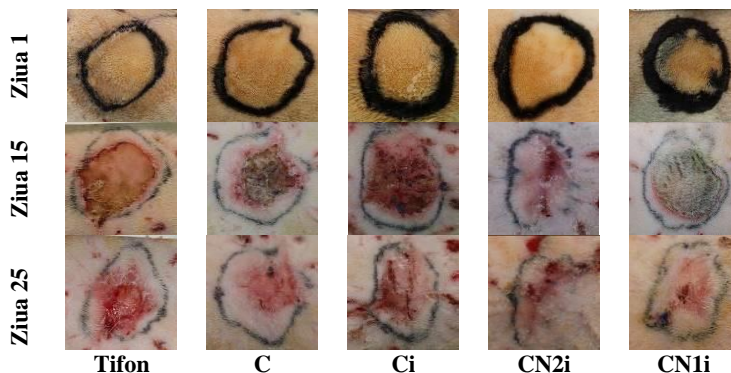


Figura 35. Aspectul rănilor în zilele 1, 15 și 25 a grupelor control pozitiv și a probelor studiate. Tatuajul a persistat pentru toate leziunile (cu excepția unuia, care nu a interferat cu conturul), acest lucru făcând vizualizarea clară a liniei în timpul măsurătorilor digitale)

La sfârșitul studiului, **CN2i** a înregistrat rezultate superioare în etapa de maturare și epitelizare, cu inflamație redusă, urmată de **Ci** și **CN1i**. Grupul **C** a prezentat inflamație tardivă și dezvoltare mai lentă, dar totuși mai rapidă decât grupul de control cu tifon. Mobilitatea redusă a lanțurilor de chitosan în exsudat a influențat evoluția grupului **C**. În schimb, **CN1i** și **CN2i** au prezentat un răspuns mai favorabil în mod constant.

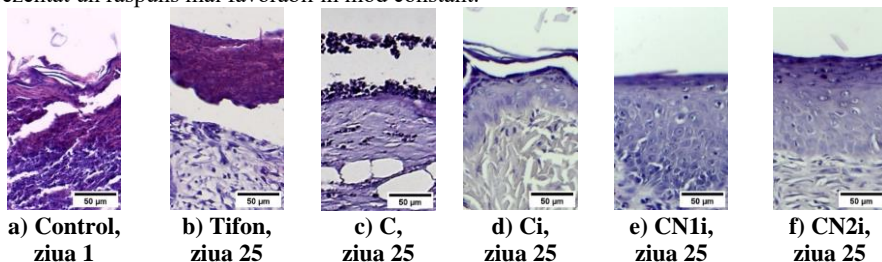


Figura 36. Scorul de vindecare a rănilor și imagini histologice reprezentative pe probe de țesut colectate în prima zi de la apariția rănilor a) și în ziua 25 de vindecare, când au fost aplicate b) tifon, c) C, d) Ci, e) CN1i și f) CN2i

Rezultatele acestui studiu deschid calea pentru cercetări ulterioare în domeniul vindecării rănilor cauzate de arsuri. Înțelegerea interacțiunii nanofibrelor de chitosan cu procesele fiziologice complexe ale vindecării rănilor poate aduce noi perspective în dezvoltarea de pansamente.

4.9 Concluzii

În acest studiu, s-au dezvoltat nanofibre mezoporoase de chitosan încărcate cu norfloxacină și acoperite cu un agent antifungic prin legături imino. Acestea au fost testate pentru aplicabilitatea lor în tratarea rănilor, cum ar fi arsurile. Fibrele au o structură poroasă, care le permite să se umfle rapid și să rețină umiditatea. Acest lucru le face potrivite pentru tratarea rănilor, deoarece umiditatea este esențială pentru vindecare. Materialele compozite au trecut testele de biocompatibilitate și nu au prezentat efecte dăunătoare asupra animalelor de laborator. Experimentele de tratare a rănilor cauzate de arsuri au arătat că fibrele mezoporoase de chitosan

favorizează sinteza fibrilară precoce. Adăugarea agentului antifungic îmbunătățește regenerarea țesuturilor prin inhibarea dezvoltării agenților patogeni. Încărcarea fibrelor cu norfloxacină și sigilarea lor cu agentul antifungic a dus la închiderea completă a rănilor și la o reepitelizare intensă. În concluzie, utilizarea nanofibrelor mezoporoase de chitosan încărcate cu norfloxacină și acoperite cu un agent antifungic prin legături imino se dovedește benefică în accelerarea procesului de vindecare a rănilor și îmbunătățirea calității pielii noi formate. Acest compozit ternar prezintă potențial pentru aplicațiile medicale în tratarea rănilor.

Capitolul V: Nanofibre biodegradabile de chitosan/trimetil chitosan pentru aplicarea ca pansamente bioabsorbabile pentru închiderea și vindecarea rănilor

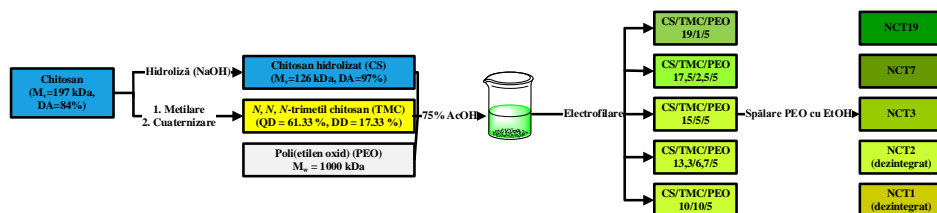
5.1 Introducere

Funcționalizarea chitosanului cu grupări cuaternare de amoniu, prin transformarea grupărilor amino în săruri cuaternare, de exemplu trimetil chitosan (TMC), sau prin grefarea de spațiatori laterali ce poartă unități cuaternare, de exemplu, *N*-(2-hidroxi)propil-3-trimetil amoniu chitosan (HTCC), este benefică pentru îmbunătățirea proprietăților chitosanului, cum ar fi mucoadezivitatea, bioadezivitatea, proprietățile antimicrobiene, anticoagulante, antioxidante și imunomodulatoare, făcând chitosanul mai potrivit pentru inginerie tisulară și transport transdermal de medicamente [8–10].

Eforturile au fost îndreptate spre dezvoltarea unei proceduri de electrofilare a unui amestec ternar de CS/TMC/PEO, în care PEO-ul joacă rol de aditiv de sacrificiu, care este înlăturat pentru a rezulta fibre biodegradabile de CS/TMC. Design-ul a fost ales considerând proprietățile îmbunătățite ale TMC-ului vs. chitosan, dar și faptul că TMC-ul pur, datorită gradului mare de cuaternizare, poate induce un grad de toxicitate [10]. S-a presupus că, odată cu combinarea TMC-ului cu chitosanul, beneficiile TMC-ului vor fi păstrate în timp ce citotoxicitatea va fi scăzută, la un nivel acceptat pentru dispozitivele biomedicale. Compoziția, morfologia și proprietățile fibrelor de CS/TMC au fost investigate, iar fibrele biocompatibile cu un raport optim între CS/TMC care a condus la o rată progresivă de biodegradare, au fost investigate în experimente de vindecare a rănilor.

5.2 Obținerea fibrelor binare de chitosan/trimetil chitosan și caracterizarea lor structurală și morfologică

Fibre binare de CS/TMC au fost preparate prin electrofilarea unei soluții ternare CS/TMC/PEO, cu un conținut de 20 % (w/w) PEO și diferite rapoarte de CS/TMC, etapă urmată de înlăturarea selectivă a PEO prin spălări succesive cu etanol (Schema 13).



Schema 13. Reprezentarea grafică a preparării fibrelor binare TMC/CS

Prezența celor doi biopolimeri în fibrele binare, CS și TMC, a fost confirmată prin spectroscopie FTIR și ¹H-RMN, care au evidențiat prezența tuturor benzilor caracteristice celor două componente (Figura 38b,c). Astfel, spectrele FTIR ale fibrelor de CS/TMC au evidențiat o bandă de absorbție în jurul valorii de 1461 cm⁻¹ caracteristică vibrației de întindere asimetrică a

legăturii C-H din gruparea metil a $-N(CH_3)_3$. Spectrul 1H -RMN a evidențiat deplasările chimice specifice TMC-ului de la 4,2-4,5 pentru protonii H6'-H2' din unitățile glucozamină substituie cu $-N(CH_3)_3$ și 3,5 - 4 ppm și 3,1 ppm pentru protonii H6-H3 și respectiv protonii H2 din unitățile glucozamină care nu sunt substituie cu $-N(CH_3)_3$, 3,31 ppm pentru protonii $N(CH_3)_3$ și 3,03 ppm pentru protonii $-N(CH_3)_2$.

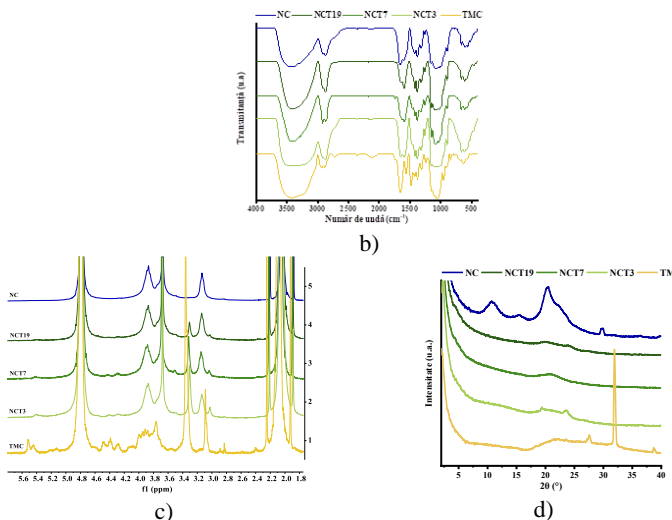


Figura 38. Caracterizarea fibrelor binare prin b) FTIR, c) 1H -RMN și d) XRD

Difracția de raze X a fibrelor CS/TMC a arătat doar o bandă largă de intensitate slabă, cu maximul în jur de 21° , indicând faptul că fibrele sunt amorfe, în timp ce NC și TMC au arătat benzi de difracție mai ascuțite în conformitate cu un anumit grad de cristalinitate (**Figura 38d**), acest lucru sugerând că forțele fizice dintre CS și TMC au determinat o încălcire aleatorie a lanțurilor lor, împiedicând alinierea în timpul electrofilării.

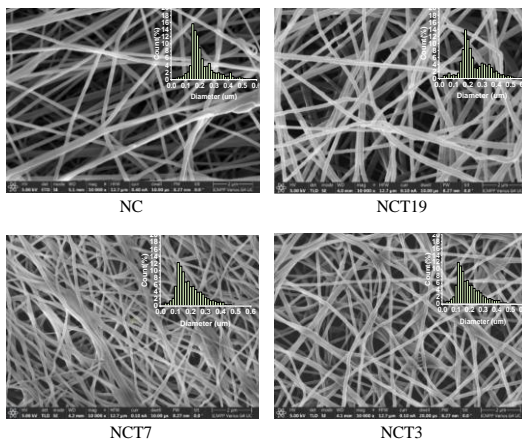


Figura 39. Imagini SEM ale fibrelor binare NCT și referința NC. Inserție: histograme de distribuție ale diametrului fibrelor

Fibre cu integritate bună au fost obținute pentru un conținut scăzut de TMC (NCT19, NCT7, NCT3), în timp ce cele cu un conținut ridicat (NCT1, NCT2) s-au dezintegrat parțial în etanol în timpul procesului de îndepărtare a PEO-ului, motiv pentru care au fost excluse din studiu. Imaginile obținute prin analiza SEM au arătat că probele NCT19, NCT7 și NCT3 sunt fibre cu suprafața netedă, fără defecte, în timp ce fibrele NCT1 și NCT2 recuperate după îndepărtarea etanolului au prezentat defecte de tip mărgele (Figura 39)

5.3 Comportamentul fibrelor în mediu apos. Solubilitate, umflare, biodegradare, sorbție de vapori de apă

Din punct de vedere al umflării, probele au atins un grad maxim de umflare cu valori semnificativ statistic mai mari ($*p < 0,05$) pentru probele NCT3 și NCT7 în apă, care au atins un maxim de 35 g/g. Capacitatea de a reține lichide s-a diminuat ușor în timp, rămânând încă ridicată după 24 de ore de experiment, cu diferențe nesemnificative statistic ale gradului de umflare între probe, în jur de 20 g/g în apă și 12 g/g în PBS.

Degradarea enzimatică, monitorizată în soluție de lizozimă în PBS (pH=7,4) timp de 7 zile, a arătat creșterea vitezei de biodegradare de-a lungul creșterii conținutului de TMC, atingându-se valori semnificativ statistic mai mari ale pierderii în greutate în comparație cu fibrele de chitosan (23 % - 44 % versus 10 %) (Figura 42c). Într-un mediu care mimează evoluția pH-ului exsudatului în perioada de vindecare a rănilor, în primele 4 zile a avut loc o scădere în greutate în jur de 20 %, a crescut ușor la 22 % până în ziua 14 și a crescut brusc la 100 % în ziua 17 (Figura 42d).

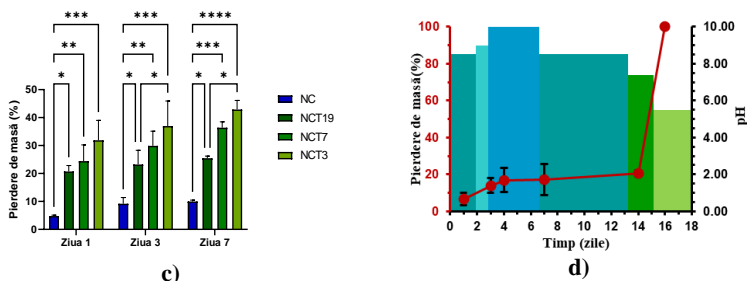


Figura 42. Biodegradarea enzimatică în c) soluție de lizozimă (376 U/ml) în PBS și d) medii de lizozimă care imită pH-ul exsudatului în perioada de vindecare a plăgii, exemplificat pentru proba NCT7

5.5 Activitatea antimicrobiană in vitro

Activitatea antimicrobiană a fost investigată împotriva tulpinilor de *S. aureus* și *E. coli*, tulpini reprezentative pentru bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative. Investigațiile au fost realizate în medii ce mimează exsudatul rănilor, în prezența de lizozimă care a fost utilizată drept control. Toate probele ce au avut TMC în compoziție au fost foarte eficiente împotriva *E. Coli*, cu o zonă de inhibiție pentru NCT3 de până la 32 mm, iar probele NCT7 și NCT3 au fost eficiente și împotriva *S. aureus*.

Tabel 12. Activitatea antimicrobiană a compușilor testați împotriva tulpinilor de referință (mm)

Tulpini	Zona de inhibiție (mm)				
	C	NC	NCT3	NCT7	NCT19
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	-	15.50 ± 0.15	19.93 ± 0.17	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	-	31.85 ± 0.21	28.80 ± 3.39	26.90 ± 3.96

5.6 Biocompatibilitatea *in vitro* și *in vivo*

Viabilitatea fibroblaștilor dermici umani normali (NHDF) la contactul cu probele studiate a fost investigată prin testul MTS, timp de 24 de ore, în concordanță cu standardul ISO pentru dispozitive medicale (**Figura 45**) [11].

Evaluate *in vivo*, implantarea fibrelor nu a provocat nici o abatere statistic semnificativă a parametrilor biochimici relevanți pentru starea clinică și activitatea metabolică a organelor și țesuturilor. Astfel, parametri hematologici: hemoglobină (Hb), hematocrit (Ht), globule roșii (RBC) și globule albe: neutrofile polimorfonucleare (PMN), limfocite (Ly), eritrocite (E), monocite (M) și bazofile (B) au avut valori similare cu cele ale martorului negativ, indicând faptul că produșii de biodegradare ai probelor care au ajuns în sânge nu au modificat capacitatea de transport a oxigenului și nu au indus stres toxic [12]. În plus, lipsa modificării nivelului de eozinofile și bazofile a indicat că probele implantate nu au declanșat reacții alergice. Similar, nu s-au observat modificări ale nivelului de enzime caracteristice ficatului, a produșilor metabolismului care constituie markeri ai funcționării normale a rinichilor, și a parametrilor caracteristici sistemului imunitar, indicând faptul că fibrele sunt lipsite de toxicitate și pot fi utilizate în siguranță.

5.7 Vindecarea rănilor

Capacitatea fibrelor **NCT7** de a favoriza tratarea rănilor a fost investigată pe modele de arsuri profunde (de gradul doi/trei) pe șobolani, comparativ cu un pansament standard neaderent de tifon impregnat cu vaselină (G) utilizat ca și control negativ și tifon îmbibat cu sulfadiazină (G-SFT) ca și control pozitiv, pe o perioadă corespunzătoare primei închideri a plăgii (**Figura 49**). După 22 zile de experiment, procentul mediu de închidere a plăgii a probei **NCT7** a fost 49 %, pentru G-SFT a fost 22 % și pentru G a fost 19 %.

În probele de țesut ale plăgii acoperite cu proba G (**Figura 49**), observarea histologică a evidențiat un strat de exsudat care acoperă suprafața răni (cadru portocaliu) și s-a observat infiltrarea abundentă a leucocitelor sub acest strat. În cazul probelor G-SFT și **NCT7**, refacerea epitelului a fost evidentă, dar în timp ce în G-SFT a fost observată sub un strat de exsudat (deasupra cadrului verde), în situația **NCT7** epitelii au avut un aspect complet funcțional cu prezența stratului cornificat protector superior. În cazul martorului pozitiv și al probei de fibre, infiltrarea leucocitelor a fost prezentă sub epitelu, sugerând vindecarea activă a plăgii. Epiteliul șobolanilor de control netratați a fost prezentat ca termen de comparație pentru a demonstra grosimea epitelului nedeteriorat.

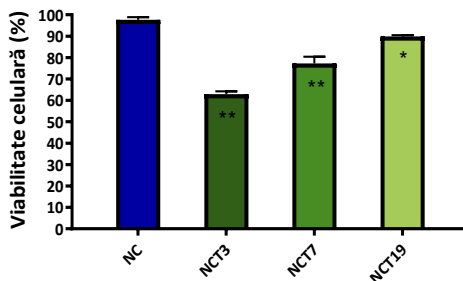


Figura 45. Biocompatibilitatea nanofibrelor. Datele sunt prezentate ca medie \pm S.E.M. (eroarea standard a mediei), $n = 9$; ** $p \leq 0,0001$ (NC vs NCT3; NC vs NCT7) și * $p < 0,05$ (NC vs NCT19)

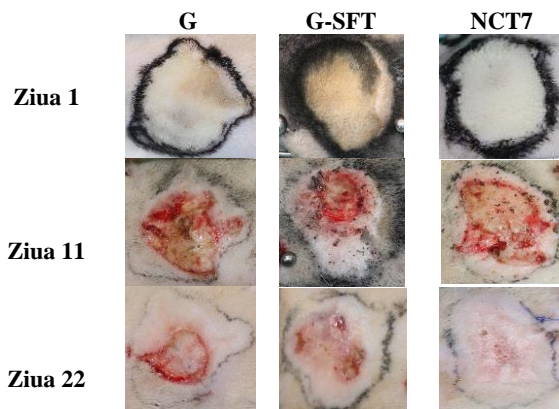


Figura 49. Imaginea arsurii după provocare (ziua 1) și în zilele 11 și 22, ale grupurilor de control negativ (G) și pozitiv (G-SFT) și NCT7. Plaga a avut un diametru de 2,5 cm și a fost conturată cu un tatuaj pentru monitorizarea ușoară a procentului de închidere a plăgii.

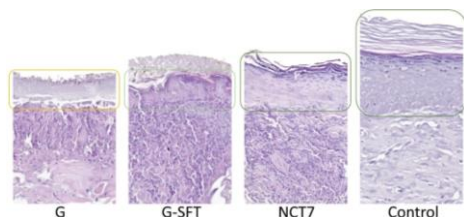


Figura 50. Analiza histologică a probelor de țesut în ziua 11. Formarea epiteliului este prezentată cu dreptunghi verde. Exsudatul care acoperă rana este încadrat într-un dreptunghi portocaliu. Obiectiv: 60x 0.9 NA WI

Similar studiului precedent, fibrele **NCT7** au fost încărcate cu NFX și sigilate prin iminare cu AB și testate în vederea stabilirii capacității de vindecare a rănilor. După cum era de așteptat, prezența medicamentului cu spectru larg de acțiune și a agentului antifungic a favorizat un proces de vindecare favorabil comparativ cu fibra martor **NCT7**.

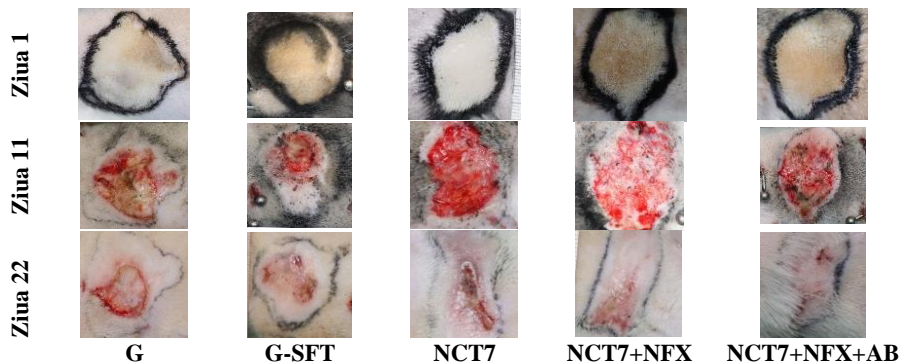


Figura 51. Imaginea arsurii după provocare (ziua 1) și în zilele 11 și 22, ale grupurilor de control negativ (G) și pozitiv (G-SFT), NCT7, NCT7+NFX și NCT7+NFX+AB. Plaga a avut un diametru de 2,5 cm și a fost conturată cu un tatuaj pentru monitorizarea ușoară a procentului de închidere a plăgii. Tatuajul a fost persistent, permițând astfel vizualizarea clară a conturului în timpul măsurării digitale

5.8 Concluzii

Studiul raportează pentru prima dată obținerea de nanofibre de chitosan/trimetil chitosan, printr-o strategie care implică utilizarea PEO-ului ca agent de co-filare și aditiv de sacrificiu. Această abordare a furnizat noi materiale biocompatibile, cu o morfologie particulară constând în nanofibre mezoporoase, care au favorizat adsorbția de lichide și donarea lor către mediu. Această abordare a furnizat noi materiale biocompatibile, cu o morfologie particulară constând în nanofibre mezoporoase, care au favorizat adsorbția de lichide și donarea lor către mediu. Ele sunt materiale asemănătoare tifonului care pot fi manipulate ușor fără nici o deteriorare, cu proprietăți mecanice similare țesuturilor vii. În comparație cu fibrele de chitosan, acestea au prezentat o biodegradare îmbunătățită, controlată de conținutul de TMC și de pH-ul mediului. TMC-ul a înzestrat materialele cu muco- și bioadezivitate îmbunătățite, și activitate antimicrobiană împotriva agenților patogeni Gram-pozitivi și Gram-negativi. S-a demonstrat că un procent de 13 % TMC în fibrele de chitosan a condus la biocompatibilitate in vitro pe fibroblaste dermice umane normale, în conformitate cu cea reglementată de standardele pentru dispozitivele biomedicale, în timp ce testele in vivo pe șobolani experimentali au arătat că acestea nu afectează starea clinică și activitatea metabolică a organelor și țesuturilor și nu provoacă niciun efect alergen sau răspuns al sistemului imunitar. Mai mult, fibrele cu cea mai buna balanță de proprietăți au promovat închiderea totală și vindecarea activă a plăgilor de arsură de gradul II/III la șobolani, cu biodegradare totală pe parcursul a 11 zile, indicând potențialul de a funcționa ca pansamente bioresorbabile eficiente.

Capitolul VI: Nanofibre de chitosan și chitosan cuaternizat care încapsulează nanoparticule de oxid de cupru

6.2 Design. Morfologie și compoziție

În acest studiu, s-au obținut fibre nanocompozite bazate pe un amestec de polimeri (chitosan, HTCC și PEO) și nanoparticule de oxid de cupru (CuONP). Compoziția fibrelor a fost concepută pentru a combina proprietățile benefice ale fiecărui component:

- Chitosanul este o matrice biocompatibilă și biodegradabilă care poate ancora nanoparticulele prin legături dative.
- HTCC -ul are activitate antimicrobiană ridicată și un efect stabilizator asupra nanoparticulelor pe bază de metale.
- PEO-ul este un aditiv de electrofilare, un agent tensioactiv pentru nanoparticule și poate îmbunătăți proprietățile mecanice ale fibrelor.
- Nanoparticulele de CuO au activitate antimicrobiană și antivirală puternică și pot îmbunătăți procesul de electrofilare prin îmbunătățirea conductivității.

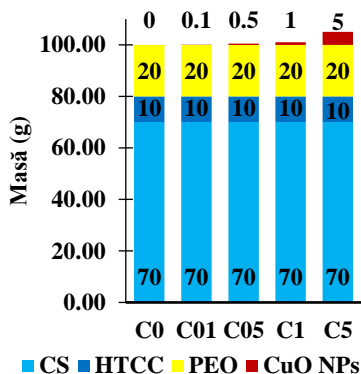


Figura 52. Reprezentarea grafică a compoziției fibrelor studiate

Fibrele nanocompozite au fost obținute prin electrofilare, conducând la o dispersie fină a nanoparticulelor în fibre, ceea ce este important pentru a obține proprietăți îmbunătățite.

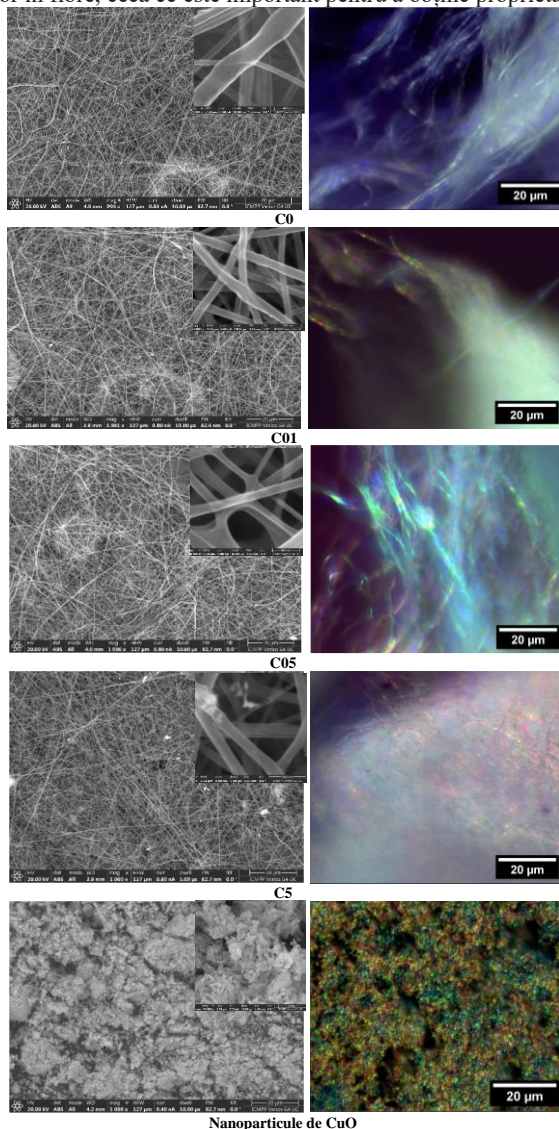


Figura 53. Imagini SEM și POM ale probelor studiate (scala imaginilor inserate: 400 nm)

Fibre fără defecte au fost obținute pentru toate compozițiile, fără pierderi de masă în timpul procesului de electrofilare. Suprafața fibrelor a fost netedă, fără aglomerări evidente de nanoparticule, indicând o distribuție fină a acestora în interiorul fibrelor (**Figura 53**). Mai mult, datele din spectrele FTIR și $^1\text{H-NMR}$ au demonstrat prezența celor trei polimeri.

O imagine mult mai aprofundată a stării componentelor în fibrele nanocompozite a fost adusă de difracția de raze X (**Figura 58a**). Difractograma de raze X a nanoparticulelor de CuONP a arătat reflexii Bragg ascuțite în domeniul 32,6 - 75 °, cu două benzi foarte intense la 35,5 ° și 38,8 °. Dimpotrivă, fibrele au prezentat o difracție largă cu două vârfuri mai ascuțite la 19,3 și 23,5 °, care sunt caracteristice fazei cristaline a PEO-ului [15]. O dovadă a stabilizării CuONP în amestecul polimeric a fost adusă de spectrele de absorbție UV-vis ale filmelor subțiri preparate din soluția de electrofilare în comparație cu spectrul suspensiei CuONP în apă (**Figura 58b**). Atât filmele, cât și suspensiile au prezentat o bandă de absorbție la aproximativ 259 nm, caracteristică pentru CuONP, confirmând că nanoparticulele nu au suferit modificări în soluția de electrofilare [16–20].

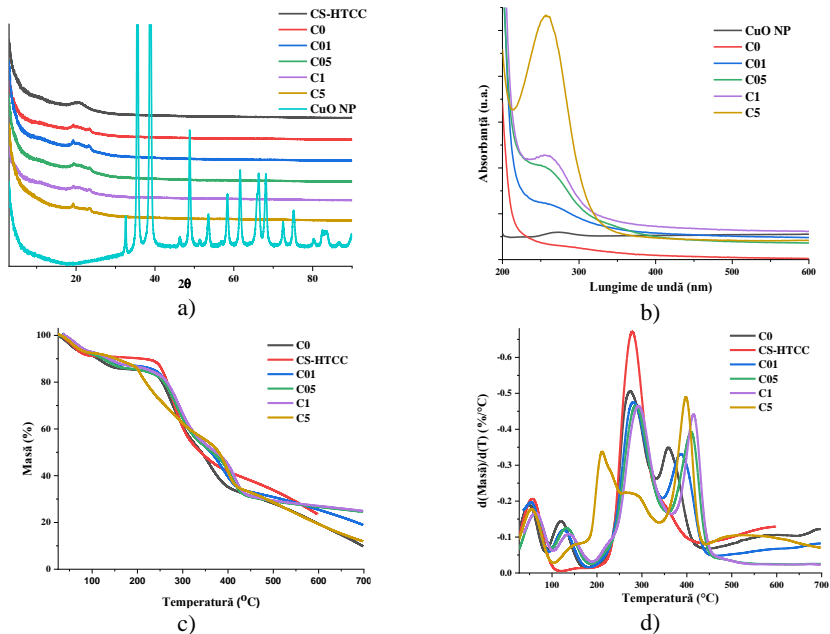


Figura 58. a) Difractograme de raze X, b) spectre UV-vis și curbe c) ATG și d) Derivatele ATG ale nanofibrelor compozite cu CuONP în comparație cu nanofibrele de referință fără CuONP

6.3 Proprietăți mecanice

Influența nanoparticulelor CuONP asupra proprietăților mecanice ale fibrelor a fost evaluată prin analiza unei serii de parametri: tensiunea la tracțiune, alungirea la rupere și modulul lui Young.

Rezultatele au arătat că tensiunea la tracțiune a fibrelor a crescut odată cu creșterea conținutului de CuONP, de la 5 la 10 MPa. Această creștere a rezistenței la tracțiune a fost atribuită forțelor puternice dezvoltate între nanoparticule și matricea polimerică. În schimb, alungirea la rupere a scăzut odată cu creșterea conținutului de CuONP. Această reducere a elasticității a fost cauzată de rigidizarea fibrelor și de discontinuitățile structurale induse de clusterelor ordonate formate în jurul cristalelor de CuONP și PEO. Modulul lui Young, care măsoară elasticitatea fibrelor, a crescut, de asemenea, odată cu creșterea conținutului de CuONP.

6.5 Activitatea antimicrobiană

Toate probele testate au prezentat o activitate antibacteriană foarte ridicată împotriva tulpinii bacteriene Gram-pozitive reprezentate de *S. aureus* și, de asemenea, împotriva tulpinii bacteriene Gram-negative reprezentate de *K. pneumoniae*, reducând viabilitatea celulară cu peste 85 % (Figura 62).

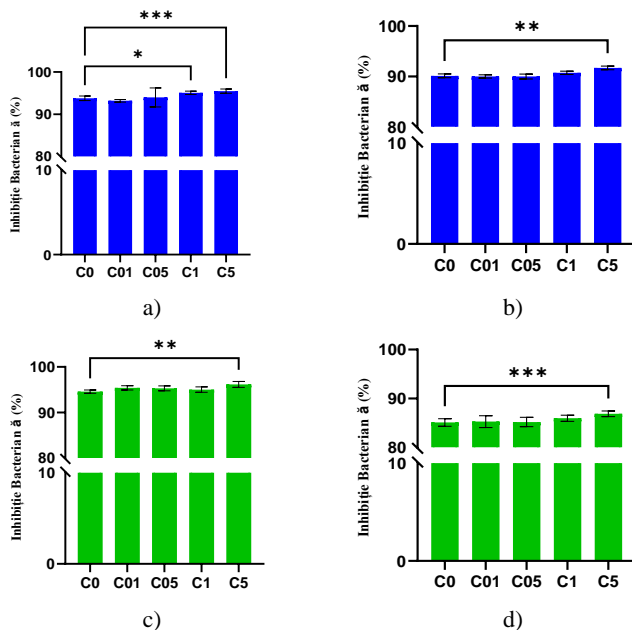


Figura 62. Inhibirea bacteriană a tulpinilor a,b) *S. aureus* (albastru) și c,d) *K. pneumoniae* (verde) atunci când sunt în contact cu fibrele de 2x2 cm² (a,c) și respectiv 0,5x0,5 cm² (b,d) (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001)

6.6 Permeabilitatea/respirabilitatea și capacitatea de îndepărtare a prafului

Rata de pătrundere a vaporilor de apă prin neșesutele de fibre în condiții statice a fost înregistrată în decurs de 7 zile. După primele 24 de ore, permeabilitatea a fost ridicată, în jur de 750 g/m² zi, indiferent de conținutul de CuONP.

În ceea ce privește permeabilitatea la aer, fibrele **C01** au prezentat valori similare cu cele ale **C0**, în jur de 3,6 m³/m²min, și au scăzut la aproximativ 0,67 m³/m²min pentru fibrele **C5** cu conținut maxim de 5 % CuONP. Această performanță este comparabilă cu cea a altor nanofibre pe bază de chitosan sau nanofibre pe bază de polimeri sintetici, cum ar fi poliuretananul, polialcoolul vinilic sau poliamida [21–24].

Determinarea eficienței de filtrare a particulelor de 2,5 μm (PM2,5) și, respectiv, 10 μm (PM10) a evidențiat valori de aproximativ 62 % și, respectiv, 80,57 %. Valorile au crescut ușor odată cu creșterea conținutului de CuONP, în acord cu scăderea diametrului fibrei și, în consecință, a porilor inter-fibrilari. În toate cazurile, numărul particulelor din camera curată a fost mai mic de 3 % și, respectiv, 1,5 %, comparativ cu 100 % în camera poluată. Așa cum era de așteptat, capacitatea de filtrare a fost îmbunătățită prin creșterea grosimii neșesutei, ajungând la 65 % și, respectiv, 90 % pentru proba **C5**, valori comparabile cu cele ale materialului filtrant din măștile PFE.

6.8. Biodegradare în sol

Chitosanul este cunoscut ca un polimer biodegradabil, ale cărui produse de descompunere sunt îngrășăminte pentru sol [25]. Influența compoziției chimice a fibrelor studiate asupra descompunerii lor a fost investigată printr-un test de îngropare în sol. Nanoparticulele de oxid de cupru au întârziat descompunerea într-o manieră dependentă de doză. Astfel, în timp ce probele **C0**, **C01** și **C05** s-au dezintegrat complet și s-au absorbit în sol până în ziua 7, proba **C1** a dispărut până în ziua 8, în timp ce **C5** a dispărut complet după 15 zile. Acest lucru este în strânsă corelație cu densitatea mai mare a forțelor intermoleculare puternice dezvoltate de CuONP.

6.9. Concluzii

În acest studiu, s-a dezvoltat o nouă metodă pentru a încorpora nanoparticule de oxid de cupru (CuONP) în nanofibre pe bază de chitosan. Nanofibrele rezultate au proprietăți mecanice, antioxidante, antimicrobiene și de filtrare îmbunătățite. Măsurătorile SEM au arătat că CuONP au subțiat fibrele de la 270 la 126 nm. Încorporarea cu succes a CuONP a fost demonstrată prin analize EDAX, UV-vis, FTIR, ¹H-RMN și ATG. Difracția de raze X a indicat natura semicristalină a fibrelor. CuONP au îmbunătățit proprietățile mecanice ale fibrelor, atingând valori ale deformației la tracțiune de până la 10 MPa și modulul lui Young de 270 MPa. Chitosanul cuaternizat și CuONP au îmbunătățit activitatea antioxidantă a fibrelor, reducând radicalii liberi. Fibrele au prezentat o activitate antimicrobiană puternică, reducând *S. aureus* Gram-pozitiv și *K. pneumoniae* Gram-negativ cu până la 96 %. Fibrele au o rată bună de transmisie a vaporilor de apă și permeabilitate la aer. De asemenea, au o eficiență de îndepărtare a particulelor fine PM2.5 și PM10 comparabilă cu cea a nanofibrelor sintetice. Fibrele sunt biodegradabile, cu o biodegradare de aproximativ 40% în 21 de zile. Aceste rezultate sugerează că nanofibrele CuONP/chitosan/chitosan cuaternizat/PEO ar putea fi utilizate pentru a dezvolta o gamă largă de produse, inclusiv pansamente, măști și filtre de aer.

Concluzii generale

Teza de doctorat intitulată „**Derivați de chitosan pentru dezvoltarea de pansamente destinate vindecării rănilor**” are 282 pagini împărțite în șapte capitole care includ 43 tabele, 90 figuri, 14 scheme și 400 note bibliografice. Teza a fost structurată în două părți, un studiu de literatură care este reprezentat de **Capitolul I și II**, și partea de contribuții personale (**Capitolele III-VII**). Teza se încheie cu o serie de concluzii generale.

Rezultatele originale sunt prezentate în cinci capitole și vizează:

- Obținerea de fibre de chitosan și funcționalizarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic
- Obținerea de pansamente pe bază de chitosan încărcate cu norfloxacină și sigilate cu acid 2-formilfenilboronic
- Obținerea de pansamente pe bază de chitosan și trimetil chitosan
- Obținerea de materiale multifuncționale pe bază de chitosan și chitosan cuaternizat care încapsulează nanoparticule de oxid de cupru

Din aceste studii, s-au desprins următoarele concluzii:

1. Studiu preliminar de obținere de fibre de chitosan și funcționalizarea acestora cu acid 2-formilfenilboronic.
 - Fibre de chitosan au fost obținute prin utilizarea de poli(etilen oxid) ca agent de cofilare și matrice de sacrificiu. Soluții binare de chitosan și poli(etilen oxid) în acid acetic concentrat au fost electrofilate și fibrele binare obținute au fost spălate succesiv cu o soluție de NaOH și apă în vederea neutralizării acidului acetic rezidual și înlăturarea polimerului sintetic.
 - Morfologia fibrilară și porozitatea materialelor obținute au fost demonstrate prin microscopie electronică de baleiaj și microscopie de forță atomică.
 - Fibre de imino-chitosan au fost obținute prin reacția de iminare în sistem eterogen a fibrelor poroase de chitosan cu o aldehydă cu proprietăți anti-patogenice.
 - Gradul de conversie al grupărilor amino din chitosan în unități iminice a variat în funcție de polaritatea solventului utilizat pentru prepararea fazei lichide (apă, etanol, toluen), cel mai mare randament al reacției fiind atins pentru fibrele ce au fost umflate în apă înainte de efectuarea sintezei.
 - Fibrele au prezentat activitate antimicrobiană, în special împotriva *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină.
2. Proiectarea de biomateriale multifuncționale pe bază de fibre de chitosan microporoase funcționalizate prin legătură iminică cu acid 2-formilfenilboronic cu scopul de a fi utilizate drept pansamente pentru plăgi.
 - Nanofibre microporoase de chitosan, cu diametre medii mai mici de 200 nm, pori interfibrilari în jur de 1 μm și micropori intra-fibrilari de până la 2 nm, au fost obținute prin electrofilarea unor amestecuri de CS/PEO, urmată de eliminarea PEO prin spălare.
 - Funcționalizarea fibrelor prin iminare în sistem eterogen cu acid 2-formilfenilboronic a permis controlul gradului de iminare (52,8 la 14,7 %) și fixarea unităților de imină în micropori sau la suprafața fibrei prin varierea raportului molar al grupărilor funcționale și viteza de îndepărtare a solventului din sistemul de reacție.
 - Reacția de iminare a fost demonstrată prin spectroscopie în infraroșu, această metodă punând în evidență banda de vibrație specifică legăturilor iminice nou formate.
 - Spectroscopia ¹H-RMN a confirmat reacția de iminare și a permis evaluarea cantitativă a gradului de conversie a grupărilor amino din chitosan în unități imino.
 - Natura microporoasă a fibrelor a favorizat umflarea rapidă în apă și în soluții tampon fosfat cu pH-uri diferite, atingând un MES remarcabil în jurul valorii de 30 g/g.

- Biodegradarea enzimatică în medii de pH diferit, corespunzătoare evoluției pH-ului în perioada de vindecare a rănilor, a evidențiat o creștere a biodegradării la creșterea pH-ului la valoarea 10, corespunzătoare primelor două etape de vindecare a rănilor, și biodegradarea rapidă în mediu de pH 5,5 caracteristic dermei normale.
 - Funcționalizarea cu acid 2-formilfenilboronic a conferit fibrelor activitate antimicrobiană împotriva agenților patogeni precum *S. aureus*, *A. brasiliensis* și *C. albicans* chiar și pentru cel mai scăzut grad de iminare (14,75 %), corelat cu deplasarea echilibrului de iminare spre producții de reacție în medii umede.
 - Testele de biocompatibilitate pe fibroblaste dermice umane normale, au indicat că fibrele pot fi utilizate în siguranță în aplicații care implică contactul direct cu țesutul viu, pentru un grad de iminare de până la 20 %, în timp ce un grad de iminare de până la 16 % a determinat aderența și proliferarea celulară.
3. Obținerea de pansamente pe bază de fibre mezoporoase de chitosan încărcate cu un antibiotic cu spectru larg de acțiune, norfloxacină, modificate la suprafață prin iminare cu o aldehidă cu activitate antimicrobiană, acid 2-formilfenilboronic.
- S-au preparat fibre mezoporoase de chitosan încărcate cu norfloxacină și acoperite cu un agent antifungic prin intermediul legăturilor reversibile imino, și acestea au fost investigate din punct de vedere al proprietăților ce influențează vindecarea rănilor.
 - Fibrele au avut un diametru de aproximativ 170 nm cu pori intrafibrilari de aproximativ 2,7 nm și pori interfibrilari mai mici de 4 μm.
 - Natura mezoporoasă a fibrelor a favorizat o umflare rapidă, atingând o umflare masică la echilibru de până la 20 g/g în mai puțin de 15 minute, și un procent al biodegradării de până la 30 % în 14 zile, ambele procese fiind controlate de pH-ul mediului.
 - Fibrele au prezentat abilitatea de adsorbție/desorbție de lichide, indicând capacitate de control a umidității și respirabilitate, umiditatea maximă reținută având valori de până la 35 %, valori care îndeplinesc cerințele pentru tratarea rănilor cauzate de arsuri.
 - Încapsularea norfloxacinii în fibrele mezoporoase a favorizat o eliberare lentă în timp, într-o manieră controlată.
 - Combinația dintre chitosan, norfloxacină și agentul antifungic a oferit materialului compozit un spectru larg de acțiune împotriva bacteriilor Gram-negative și Gram- pozitive, dar și împotriva tulpinilor de fungi și drojdii.
 - Materialele obținute au trecut testele de biocompatibilitate impuse dispozitivelor biomedicale, și implantarea lor subcutanată la șobolani nu a indus efecte nocive asupra sângelui, ficatului și rinichilor, și nici reacții alergice sau vreun răspuns al sistemului imunitar.
 - Investigarea materialelor compozite drept pansamente în experimentele de tratare a rănilor cauzate de arsuri la șobolani au demonstrat beneficiile aduse de acest compozit ternar. Fibrele mezoporoase de chitosan au favorizat sinteza fibrilară precoce, dar vindecarea a fost îngreunată de prezența proceselor inflamatorii. Iminarea acestora cu aldehida antifungică a îmbunătățit semnificativ regenerarea țesuturilor. Încărcarea fibrelor cu o cantitate mică de norfloxacină urmată de iminarea la suprafață cu aldehida antifungică, a favorizat o închidere totală a răniilor și refacerea țesutului.

4. Obținerea de biomateriale pe bază de nanofibre biodegradabile de chitosan/trimetil chitosan pentru aplicarea ca pansamente bioabsorbabile pentru închiderea și vindecarea rănilor.
- S-au preparat fibre mezoporoase binare de CS/TMC fără defecte, cu integritate bună pentru un procent maxim de 25 % TMC, cu un diametru de până la 153 nm și cu pori intrafibrilari cu un diametru de aproximativ 3 nm, porozitate rezultată prin îndepărtarea poli(etilenoxidului), polimer utilizat drept agent de agent de co-filare și matrice de sacrificiu.
 - Fibrele au prezentat o umflare masivă la echilibru de 30 g/g în apă și 15 g/g în PBS, rezultatele fiind similare cu a pansamentelor comerciale ce sunt utilizate în tratarea rănilor care exsudează abundent.
 - Fibrele CS/TMC au prezentat un grad de biodegradare de până la 45 % în medii de pH fiziologic în 3 zile, favorizat de solubilitatea TMC-ului, degradarea enzimatică în prezența lizozimei (enzimă existentă în fluidele biologice) și natura lor mezoporoasă care a favorizat un acces facil al solventului și moleculelor enzimei.
 - Prezența TMC-ului a îmbunătățit semnificativ mucoadeziunea fibrelor datorită capacității mai mari a sarcinilor pozitive permanente de a interacționa cu mucina încărcată negativ pentru a forma agregate. Fibrele au bioaderență bună, și aderă cu ușurință la piele, caracteristici importante pentru biomaterialele implantabile.
 - Fibrele sunt flexibile și pot fi manipulate fără deteriorări, chiar dacă TMC-ul a diminuat modulul lui Young provocând un grad de friabilitate sub presiunea unei forțe mari. Valoarea rezistenței lor la tracțiune, în jur de 10 MPa pentru NCT7 și NCT19, este apropiată de cea a țesutului pielii (2-16 MPa), indicând utilitatea lor în protejerea rănilor în timpul activităților normale ale pacientului
 - Prezența TMC-ului în fibre le-a înzestrat cu activitate antimicrobiană puternică, în special împotriva bacteriilor Gram-negative, care sunt cei mai comuni patogeni colonizatori ai rănilor și formatori prolifici de biofilm.
 - Testele pe fibroblaste umane normale au arătat că fibrele cu un conținut TMC mai mic de 13 % (NCT7, NCT19) pot fi utilizate în siguranță ca dispozitive medicale.
 - Implantarea subcutanată a fibrelor la șobolanii Wistar nu a provocat devieri semnificative statistic ale parametrilor biochimici relevanți pentru starea clinică și activitatea metabolică a organelor și țesuturilor, indicând potențialul lor de utilizare *in vivo* în condiții de siguranță. Acesta este un rezultat important, având în vedere că până în prezent nu au fost raportate teste de biocompatibilitate *in vivo* pe fibre de chitosan cuaternizat.
 - Fibrele CS/TMC cu aproximativ 13 % TMC au prezentat cea mai bună balanță de proprietăți pentru bioaplicații, iar utilizarea lor în experimentele de vindecare a rănilor au dovedit închiderea totală și vindecarea activă a plăgilor de arsură de gradul II/III la șobolani, cu biodegradare totală pe parcursul a 11 zile, indicând potențialul de a funcționa ca pansamente bioresorbabile eficiente.
5. Obținerea de nanofibre de chitosan și chitosan cuaternizat care încapsulează nanoparticule de oxid de cupru cu scopul de a obține noi biomateriale multifuncționale.
- Fibre nanocompozite bazate pe un amestec de polimeri (chitosan, HTCC și PEO) și diferite cantități de CuONP au fost obținute prin electrofilare fără ac, utilizând tehnologia *NanoSpider*, acest studiu raportând pentru prima dată acest tip de material.
 - Măsurătorile SEM au arătat că nanoparticulele CuONP au favorizat subțierea fibrelor de la 270 la 126 nm.
 - Incorporarea cu succes a CuONP a fost demonstrată prin analiza EDAX și UV-vis.

- Spectroscopia FTIR și ¹H-RMN precum și analiza TGA au confirmat prezența chitosanului, chitosanului cuaternizat și poli (etilen oxidului) și formarea unor forțe intermoleculare puternice cu nanoparticule de oxid de cupru.
- Difracția de raze X a indicat natura semicristalină a fibrelor conferită de segregarea de fază a domeniilor cristaline bogate în PEO în matricea bogată în chitosan semicristalin.
- Nanoparticulele de CuONP au îmbunătățit proprietățile mecanice ale fibrelor, atingând valori ale deformației la tracțiune de până la 10 MPa și modulul lui Young de 270 MPa.
- Chitosanul cuaternizat și CuONP au îmbunătățit activitatea antioxidantă printr-un efect sinergic, constând în eliberarea unităților de hidroxil și amină din rețeaua legăturilor de H și slăbirea energiei de disociere a legăturilor covalente O-H și N-H, făcând atomii de hidrogen mai predispuși la scindare heterolitică.
- Fibrele au prezentat o activitate antimicrobiană puternică, în principal datorită chitosanului cuaternizat și îmbunătățită de nanoparticulele de oxid de cupru, reducând *S. aureus* Gram-pozitiv până la 95,5 % și *K. pneumoniae* Gram-negativ până la 96,2 %.
- Fibrele au o rată bună de transmisie a vaporilor de apă de 750g /m² /zi, permeabilitate la aer între 0,75 - 22,5 m³/m² zi și eficiență de îndepărtare a particulelor fine PM2.5 în jur de 65 % și PM10 în jur de 92 %, valori comparabile cu cele ale nanofibrelor sintetice.
- Originea naturală a chitosanului și a chitosanului cuaternizat a determinat o biodegradare de aproximativ 40 % în 21 de zile și o degradare rapidă a fibrelor în sol în mai puțin de 15 zile.
- Toate aceste caracteristici indică nanofibrele studiate CuONP/chitosan/chitosan cuaternizat/PEO ca o platformă promițătoare pentru a dezvolta ecomateriale pentru un domeniu larg de aplicații, cum ar fi pansamente, măști și filtre de aer.

Rezultatele originale prezentate în teză au fost publicate sub formă de articole științifice în reviste internaționale și naționale cotate ISI.

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. Anisie, A., Bostanaru, A.-C., Mares, M. & Marin, L. (2021) Imination of chitosan nanofibers in a heterogeneous system. synthesis optimization and impact on fiber morphology. *Cellulose Chemistry and Technology* 55(7-8),785-793. 10.35812/CelluloseChemTechnol.2021.55.65 **F.I.= 1.3**
2. Anisie, A., Rosca, I., Sandu, A.-I., Bele, A., Cheng, X., & Marin, L. (2022) Imination of Microporous Chitosan Fibers—A Route to Biomaterials with “On Demand” Antimicrobial Activity and Biodegradation for Wound Dressings. *Pharmaceutics*, 14(1), 117. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010117> **F.I. = 5.4**
3. Anisie, A., Oancea, F. & Marin, L. (2023) Electrospinning of chitosan-based nanofibers: from design to prospective applications. *Reviews in Chemical Engineering* 39 (1), 31-70. <https://doi.org/10.1515/revce-2021-0003> **F.I. = 4.7**
4. Anisie, A., Andreica, B.-I., Mititelu-Tartau, L., Coman, G. C., Bilyy, R., Bila, G., Rosca, I., Sandu, A.-I., Amler, E. & Marin, L. (2023) Biodegradable trimethyl chitosan nanofiber mats by electrospinning as bioabsorbable dressings for wound closure and healing. *International Journal of Biological Macromolecules* 249, 126056, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126056> **F.I. = 8.2**
5. Ailincăi, D., Cibotaru, S., Anisie, A., Coman, C. G., Pasca, A. S., Rosca, I., ... & Marin, L. (2023). Mesoporous chitosan nanofibers loaded with norfloxacin and coated with phenylboronic acid perform as bioabsorbable active dressings to accelerate the healing of burn wounds. *Carbohydrate Polymers*, 121135. 10.1016/j.carbpol.2023.121135 **F.I. = 11.2**

6. Bejan, A., Anisie, A., Andreica, B.-I., Rosca, I., Marin, L., 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 **F.I. = 8.2**

Patente

1. „Neșesută de chitosan cu co-eliberare controlată de antibiotic și principii active”, Luminita Marin, **Alexandru Anisie**, Ailincăi Daniela, Sandu Cibotaru, Bianca Andreica, Irina Rosca, număr 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 Tarțau , număr înregistrare CBI : A / 00749 / 21.11.2022

Lucrări proceeding

1. Anisie, A., Rosca, I. & Marin, L. (2020) Functionalized Chitosan Nanofibers with Enhanced Antimicrobial Activity for Burn Wound Healing Applications. *Proceedings of the First International Conference on “Green” Polymer Materials*, doi:10.3390/CGPM2020-07216

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

1. Marin, L., Popa, M., Anisie, A., Irimiciuc, S.-A., Agop, M., Petrescu, T.-C., Vasincu, D., & Himiniuc, L. (2021). A Theoretical Model for Release Dynamics of an Antifungal Agent Covalently Bonded to the Chitosan. *Molecules*, 26(7), 2089. <https://doi.org/10.3390/molecules26072089> **F.I. = 4.6**
2. Lungu, R., Anisie, A., Rosca, I., Sandu, A.-I., Ailincăi, D., & Marin, L. (2021). Double functionalization of chitosan based nanofibers towards biomaterials for wound healing. *Reactive and Functional Polymers*, 167, 105028. <https://doi.org/10.1016/j.reactfuncpolym.2021.105028> **F.I. = 5.1**
3. Serbezeanu, D., Vlad-Bubulac, T., Onofrei, M. D., Doroftei, F., Hamciuc, C., Ipate, A.-M., Anisie, A., Lisa, G., Anghel, I., Șofran, I.-E., & Popescu, V. (2022). Phosphorylated Poly(vinyl alcohol) Electrospun Mats for Protective Equipment Applications. *Nanomaterials*, 12(15), 2685. <https://doi.org/10.3390/nano12152685> **F.I. = 5.3**
4. Andreica, B.-I., Anisie, A., Rosca, I., Sandu, A.-I., Pasca, A. S., Tartau, L. M., & Marin, L. (2023). Quaternized chitosan/chitosan nanofibrous mats: An approach toward bioactive materials for tissue engineering and regenerative medicine. *Carbohydrate Polymers*, 302, 120431. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120431> **F.I. = 11.2**
5. Marin, L., Andreica, B.-I., Anisie, A., Cibotaru, S., Bardosova, M., Materon, E. M., & Oliveira, O. N. (2023). Quaternized chitosan (nano)fibers: A journey from preparation to high performance applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 125136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125136> **F.I. = 8.2**
6. Andreica, B.-I., Anisie, A., Iftime, M., Ababei, R.-V., Ochiuz, L., Vasincu, D., Vasilache, I.-A., Volovat, C., Boboc D., Poroch, V., Eva, L., Agop, M., Scripcariu, D.-V., Volovat S.R., Swelling and biodegradation profile of chitosan/quaternized chitosan nanofibers in media mimicking wound exudate. A theoretical model – experimental approach, *Pharmaceutics* - trimis spre publicare **F.I. = 8.2**

Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:

1. Eco-nanomateriale bazate pe chitosan pentru aplicații de interes contemporan (ECO-MAT), PN-III-P4-ID-PCE-2020-2717
2. Bandaj resorbabil cu eliberare controlată de norfloxacin pentru vindecarea arsurilor (BurnHeal), PN-III-P2-2.1-PED-2019-5071

3. Pansamente pentru vindecarea inteligenta a rănilor (SWORD), PN-III-P3-3.6-H2020-2020-0138
4. Smart Wound Monitoring Restorative Dressings (SWORD), H2020-MSCA-RISE-2019: (no. 873123)
5. Innovative Electrospun Membranes based on Phosphorus-containing Polymers for Protective Clothing (InELPHoPRo), PN-III-P1-1.1-TE-2019-0639
6. New “green” technology for advanced water treatment based on functionalized polysulfones/ionic liquids membranes (GreenTechMembr), PN-III-P2-2.1-PED-2019-301

Participări la sesiuni științifice naționale și internaționale

Comunicări orale

1. **Anisie, A.**, Rosca, I., Marin, L., (2020) Iminoboronate-chitosan nanofibers with antimicrobial activity for burn wound healing applications, Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth, Iasi, Romania.
2. **Anisie, A.**, Rosca, I., Marin, L., (2020) Functionalized chitosan nanofibers with enhanced antimicrobial activity for burn wound healing applications The First International Conference on “Green” Polymer Materials .
3. **Anisie, A.**, Rosca, I., Sandu, A.-I., Bele, A., Marin, L., (2021) Biodegradable imino-chitosan nanofibers as wound dressing materials macroyouth Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth Second Edition Iasi, Romania.
4. **Anisie, A.**, Andreica, B.-I., Marin, L., (2022) Chitosan based nanofibers for wound dressing applications XXXIInd edition of the International Congress of “Apollonia” University of Iasi, , Iași, România.
5. **Anisie, A.**, Andreica, B.-I., Marin, L.,(2022) Biodegradable chitosan/quaternized chitosan nanofibers as wound dressings 12th International Conference On Materials Science & Engineering (BRAMAT),Brașov, România.
6. Cibotaru S., Ailincăi D., **Anisie A.**, Marin L.,(2022) Bandages based on chitosan nanofibers for burn healing applications, 12th International Conference on Materials Science and Engineering, Brasov, Romania.
7. Marin L., Ailincăi D., Iftime M.-M., Craciun A.-M., Bejan A., **Anisie A.**, Andreica B.-I., (2022) Chitosan imination: an opportunity towards biomaterials with broad application spectrum, 7th International Congress on Biomaterials and Biosensors (BIOMATSEN 2022), Muğla, Turkey.
8. Marin L., Ailincăi D., Cibotaru S., **Anisie A.**, Rosca I., Mititelu-Tartau L., (2022) Biodegradable chitosan based nanofibers with broad spectrum antimicrobial activity for wound healing applications, EPF European Polymer Federation, Prague, Czech Republic.
9. Marin L., **Anisie A.** , Andreica B.I. , Mititelu-Tartau L. , Coman C. , Bilyy R., Bila G. , Rosca I. , Sandu A.I. , Amler E. (2023) Quaternized chitosan based nanofibers as bioabsorbable wound dressings, The 14th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS 2023) and the 15th International Conference on Chitin and Chitosan (15th ICC), Siglufjörður, Iceland
10. Bejan A., **Anisie A.**, Marin L., (2023) Chitosan/quaternized chitosan – based nanofibers mesh as promising materials for air filtration, The 14th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS 2023) and the 15th International Conference on Chitin and Chitosan (15th ICC), Siglufjörður, Iceland

11. **Anisiei A.**, Bejan A., Marin L., (2023) Copper oxide nanoparticle-doped nanofiber mats for effective air filtration, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference, Graz, Austria.
12. Marin L, **Anisiei A.** , Andreica B.I. , Mititelu-Tartau L. , Coman C. , Bilyy R., Bila G. , Rosca I. , Sandu A.I. , Amler E. (2023) Nanofibers based on quaternized chitosan as bioabsorbable wound dressings, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference, Graz, Austria.
13. Ailincăi D. , Cibotaru S. , **Anisiei A.** , Rosca I. , Mititelu-Tartau L. , Marin L. (2023) Chitosan nanofibers for burn healing applications, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference, Graz, Austria.

Prezentare de postere

1. **Anisiei, A.**, Andreica, B.-I., Marin, L., (2022) Electrospinning of chitosan/quaternary salts of chitosan nanofibers for biomedical application. EPF European Polymer Congress, Praga, Republica Cehă.
2. **Anisiei, A.**, Rosca, I., Sandu, A.-I., Bele, A., Marin, L., (2022) Imination of chitosan fibers towards potential antimicrobial wound dressings EPF European Polymer Congress, Praga, Republica Cehă.
3. Lungu R., **Anisiei A.**, Rosca I., Sandu A.-I., Ailincăi D., Marin L., (2021) Double-functionalized chitosan nanofibers for wound healing, Progress in Organic and Macromolecular Compounds, 28th Edition, Iasi, Romania
4. Cibotaru S., Ailincăi D., **Anisiei A.**, Marin L., (2022) Drug delivery systems based on imino-chitosan nanofibers for burn healing applications, EPF European Polymer Federation 2022, Prague, Czech Republic.
5. Andreica B.-I. , **Anisiei A.** Rosca I. , Sandu A.-I. , Mititelu-Tartau L. , Marin L., (2023) Chitosan/quaternized chitosan nanofibers designed for biomedical applications, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference, Graz, Austria.
6. **Anisiei A.**, Bejan A., Cibotaru S. *, Marin L. Quaternized chitosan nanofibers for bone regeneration, 8th EPNOE International Polysaccharides Conference, Graz, Austria.

Mobilități desfășurate pe parcursul stagiului de doctorat:

1. InoCure, Praga, Republica Cehă, sub îndrumarea Dr. Evzen Amler
15.10.-15.12.2022

Bibliografie selectivă:

- [1] R.C. Goy, D. de Britto, O.B.G. Assis, *Polímeros* 19 (2009) 241–247.
- [2] A. Anisie, I. Rosca, A.-I. Sandu, A. Bele, X. Cheng, L. Marin, *Pharmaceutics* 14 (2022) 117.
- [3] R. Lungu, A. Anisie, I. Rosca, A.-I. Sandu, D. Ailincăi, L. Marin, *React Funct Polym* 167 (2021) 105028.
- [4] L. Marin, B. Dragoi, N. Olaru, E. Perju, A. Coroaba, F. Doroftei, G. Scavia, S. Destri, S. Zappia, W. Porzio, *Eur Polym J* 120 (2019) 109214.
- [5] L. Marin, D. Ailincăi, M. Mares, E. Paslaru, M. Cristea, V. Nica, B.C. Simionescu, *Carbohydr Polym* 117 (2015) 762–770.
- [6] L. Marin, A. Anisie, D. Ailincăi, S. Cibotaru, B.-I. Andreica, I. Rosca, *Chitosan Non-Woven Mat with Co-Delivery of Antibiotic and Active Principles*, 2022.
- [7] A. Anisie, F. Oancea, L. Marin, *Reviews in Chemical Engineering* 39 (2023) 31–70.
- [8] S. Guo, Y. Ren, R. Chang, Y. He, D. Zhang, F. Guan, M. Yao, *ACS Appl Mater Interfaces* 14 (2022) 34455–34469.
- [9] H. Xue, Z. Zhang, Z. Lin, J. Su, A.C. Panayi, Y. Xiong, L. Hu, Y. Hu, L. Chen, C. Yan, X. Xie, Y. Shi, W. Zhou, B. Mi, G. Liu, *Bioact Mater* 18 (2022) 552–568.
- [10] B.-I. Andreica, X. Cheng, L. Marin, *Eur Polym J* 139 (2020) 110016.
- [11] ISO 10993-5:2009(en), (2009).
- [12] G. Silva-Santana, J.C. Bax, D.C.S. Fernandes, D.T.L. Bacellar, C. Hooper, A.A.S.O. Dias, C.B. Silva, A.M. de Souza, S. Ramos, R.A. Santos, T.R. Pinto, M.A. Ramão, A.L. Mattos-Guaraldi, *Animal Model Exp Med* 3 (2020) 304–315.
- [13] K. Satoh, J.E. Poelma, L.M. Campos, B. Stahl, C.J. Hawker, *Polym. Chem.* 3 (2012) 1890–1898.
- [14] B.-I. Andreica, A. Anisie, I. Rosca, A.-I. Sandu, A.S. Pasca, L.M. Tartau, L. Marin, *Carbohydr Polym* 302 (2023) 120431.
- [15] S. Yang, Z. Liu, Y. Liu, Y. Jiao, *J Mater Sci* 50 (2015) 1544–1552.
- [16] H.M. Alhusaiki Alghamdi, *Opt Mater (Amst)* 134 (2022) 113101.
- [17] D. Renuga, J. Jeyasundari, A.S. Shakthi Athithan, Y. Brightson Arul Jacob, *Mater Res Express* 7 (2020) 045007.
- [18] D. Raj Preeth, M. Shairam, N. Suganya, R. Hootan, R. Kartik, K. Pierre, C. Suvro, S. Rajalakshmi, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 24 (2019) 633–645.
- [19] K. Dulta, G. Koşarsoy Ağçeli, P. Chauhan, R. Jasrotia, P.K. Chauhan, J.O. Ighalo, *Sustainable Environment Research* 32 (2022) 2.
- [20] S. Kumar, J. Koh, *Int J Mol Sci* 13 (2012) 6102–6116.
- [21] Y. Kong, W. Zhang, T. He, X. Yang, W. Bi, J. Li, W. Yang, W. Chen, *Carbohydr Polym* 304 (2023) 120485.
- [22] R. Nawalakhe, Q. Shi, N. Vitthali, J. Noar, J.M. Caldwell, F. Breidt, M.A. Bourham, X. Zhang, M.G. McCord, *J Appl Polym Sci* 129 (2013) 916–923.
- [23] A. Nazir, N. Khenoussi, T. Hussain, S. Abid, L. Schacher, D. Adolphe, A. Zahir, M.B. Qadir, Z. Khaliq, A. Shahzad, *Polymer Bulletin* 77 (2020) 5155–5173.
- [24] C. Akduman, N. Oglakcioglu, A. Kumbasar PA, B. Sari, *Journal of Fashion Technology & Textile Engineering* s4 (2018).
- [25] M.M. Iftime, G.L. Ailiesei, E. Ungureanu, L. Marin, *Carbohydr Polym* 223 (2019) 115040.