



ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE CHIMICE
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ „PETRU PONI” IAȘI
Domeniul CHIMIE

**DEZVOLTARE DE MATERIALE MULTIFUNCȚIONALE PE BAZĂ DE
DERIVAȚI IMINICI DE CHITOSAN**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat:

CS I DR. HABIL. LUMINIȚA MARIN

Student-doctorand:

RAMONA SOCEA (Căsătorita LUNGU)

ACADEMIA ROMÂNĂ
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

Nr. 5622/16.8.2025

Doamnei/Domnului

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **7 noiembrie 2025**, ora **10:00**, în **Sala de Conferințe a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”**, Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat „*Dezvoltare de materiale multifuncționale pe bază de derivați iminici de chitosan*”, autor Ramona Socea (Căsătorită Lungu), în vederea acordării titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE:

CS I Dr. Mariana Pinteală
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

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

REFERENȚI:

Conf. Dr. Cătălina Anișoara Peptu
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași

Prof. Dr. Ionel Mangalagiu
Universitatea „Alexandru Ioan Cuza”, Iași

CS I Dr. Gheorghe Fundueanu-Constantin
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.



Mulțumiri

Dedic această teză tuturor celor care m-au susținut, încurajat și îndrumat pe parcursul acestei călătorii doctorale.

Doresc să îmi exprim profunda recunoștință față de îndrumătorul meu de doctorat, doamna **Dr. Luminița Marin**, pentru îndrumarea, sprijinul și sfaturile valoroase pe care mi le-a oferit pe parcursul întregii perioade de cercetare. Experiența și susținerea sa au fost esențiale pentru finalizarea acestei teze. Îi mulțumesc, de asemenea, pentru bunăvoința și empatia de care a dat dovadă în această perioadă.

De asemenea, doresc să mulțumesc doamnelor **Dr. Maria Brumă** și **Dr. Elena Hamciuc**, care mi-au îndrumat primii pași în cercetare cu mult tact și răbdare. De la domniile lor am deprins noțiunile de bază în acest domeniu vast al polimerilor și am înțeles că fiecare eșec experimental reprezintă un pas spre un nou început.

Alese mulțumiri doamnei **Dr. Iuliana Spiridon** pentru îndrumarea pe care mi-a oferit-o și colaborarea frumoasă pe care am avut-o pe parcursul acestui stagiul doctoral. Mulțumesc și celorlalți membri din **Comisia mea de îndrumare**, doamnelor **Dr. Ramona Dănac** și **Dr. Anda-Mihaela Crăciun** și domnului **Dr. Călin Deleanu**, care mi-au oferit sprijin, sugestii valoroase și încurajare pe parcursul întregului proces de cercetare.

Aș dori să mulțumesc **membrilor Comisiei de Evaluare**, doamnei **Dr. Cătălina Peptu**, domnilor **Prof. Dr. Ionel Mangalagiu** și **Dr. Gheorghe Fundueanu-Constantin** pentru participarea la acest eveniment important și pentru sugestiile formulate.

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

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

Le sunt recunoscătoare tuturor colegilor mei din **Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** și în special colegilor din **Departamentul Policondensare și Polimeri Termostabili** pentru sfaturile profesionale, buna colaborare și încurajările personale. Mulțumesc colegilor din departamentul **Intelcentru** pentru realizarea studiilor de biocompatibilitate și activitate antimicrobiană.

În final, îi mulțumesc lui **Dumnezeu** că mi-a dat puterea, perseverența și claritatea necesare pentru a finaliza acest parcurs doctoral și că m-a binecuvântat cu o **familie minunată - părinții, soțul și copiii mei** - a căror iubire, sprijin și prezență constantă au fost cea mai mare sursă de încurajare pentru mine.

Cuprins

Listă abrevieri	1
INTRODUCERE	3
Capitolul 1. Hidrogeluri, fibre și acoperiri pe bază de derivați iminici de chitosan: obținere, proprietăți și aplicații	9
1.1. Chitosan. Generalități	9
1.2. Imine: Istoric. Reversibilitatea legăturii imină. Importanță	13
1.2.1. Date generale	13
1.2.2. Iminarea – reacție reversibilă	15
1.2.2.1. Mecanismul general al reacției de iminare	15
1.2.2.2. Stabilitatea legăturii de tip imină.....	17
1.2.2.3. Influența apei asupra reacției de iminare	18
1.2.3. Modalități de exploatare a dinamismului legăturii iminice	19
1.2.3.1. Chimie dinamică constituțională. Dinameri. Librărie dinamică	19
1.2.3.2. Modificarea de suprafețe	20
1.2.3.3. Fluorescența	21
1.2.3.4. Autovindecarea ("self-healing").....	22
1.2.3.5. Eliberare de medicamente	25
1.3. Hidrogeluri pe bază de chitosan	26
1.3.1. Metode de obținere a hidrogelurilor pe bază de chitosan	27
1.3.1.1. Hidrogeluri obținute prin reticularea fizică a chitosanului	27
1.3.1.2. Hidrogeluri obținute prin reticularea chimică a chitosanului	29
1.3.2. Proprietățile hidrogelurilor pe bază de chitosan	33
1.3.2.1. Proprietăți morfologice	33
1.3.2.2. Permeabilitatea	33
1.3.2.3. Textura hidrogelurilor	34
1.3.2.4. Proprietăți mecanice	34
1.3.2.5. Sensibilitatea la stimuli externi	36
1.3.2.6. Biocompatibilitatea	36
1.3.2.7. Biodegradabilitatea.....	36

1.3.2.8. Activitatea antioxidantă.....	37
1.3.2.9. Proprietăți antimicrobiene	37
1.3.2.10. Autovindecarea ("Self-healing")	37
1.3.3. Domenii de aplicare a hidrogelurilor pe bază de chitosan.....	38
1.3.3.1. Domeniul biomedical și farmaceutic	39
1.3.3.2. Domeniul industriei alimentare	42
1.3.3.3. Domeniul agricol.....	43
1.4. Nanofibre pe bază de chitosan	43
1.4.1. Metode de obținere a nanofibrelor pe bază de chitosan.....	43
1.4.1.1. Electrofilarea	43
1.4.1.2. Alte metode de obținere	45
1.4.2. Domenii de aplicare a nanofibrelor pe bază de chitosan	46
1.4.2.1. Domeniul biomedical și farmaceutic	46
1.4.2.2. Domeniul industrial.....	48
1.4.2.3. Cosmetică.....	49
1.4.2.4. Protecția mediului	49
1.4.3. Metode de îmbunătățire a proprietăților nanofibrelor de chitosan.....	50
1.4.3.1. Încapsularea de principii active	50
1.4.3.2. Modificarea la suprafață a fibrelor de chitosan	51
1.5. Acoperiri pe bază de derivați de chitosan	52
1.5.1. Modalități de acoperire	53
1.5.1.1. Uscarea prin pulverizare.....	53
1.5.1.2. Acoperire prin pulverizare.....	54
1.5.1.3. Pulverizare electrostatică (Electospray)	54
1.5.1.4. Acoperire prin imersie.....	55
1.5.1.5. Depunere electroforetică	55
1.5.1.6. Acoperirea prin centrifugare ("spin coating")	56
1.5.1.7. Imprimarea 3D	56
1.5.1.8. Acoperirea prin turnare („casting”).....	56
1.5.1.9. Metoda de depunere multistrat („layer-by-layer”).....	57
1.5.2. Aplicații ale acoperirilor pe bază de derivați de chitosan.....	57

1.5.2.1. Alimentație.....	57
1.6. Concluzii.....	61
Capitolul 2. Hidrogeluri pe bază de imino-chitosan pentru aplicații biomedicale	64
2.1. Sinteza și caracterizarea unui nou hidrogel pe bază de chitosan și acid 2-formilfenilboronic	64
2.1.1. Introducere	64
2.1.2. Rezultate și discuții	65
2.1.2.1. Caracterizarea structurală și supramoleculară	65
2.1.2.2. Proprietăți biologice <i>in vitro</i>	68
2.1.2.3. Evaluarea biodegradării <i>in vitro</i>	69
2.1.2.4. Rezultatele aplicării algoritmilor de analiză fractală și lacunară	72
2.1.3. Concluzii.....	76
2.2. Reticularea chitosanului cu amestecuri de monoaldehide bioactive	77
2.2.1. Introducere	77
2.2.2. Rezultate și discuții	79
2.2.2.1. Caracterizare structurală prin spectroscopie FTIR	81
2.2.2.2. Caracterizare structurală prin ¹ H-RMN	83
2.2.2.3. Caracterizare supramoleculară prin WXRd și POM.....	87
2.2.2.4. Studiul morfologic prin SEM	90
2.2.2.5. Studiul comportamentului viscoelastic al hidrogelurilor	92
2.2.2.6. Studii de eliberare <i>in vitro</i>	94
2.2.2.7. Studii de degradare enzimatică.....	95
2.2.2.8. Activitate antimicrobiană	97
2.2.2.9. Activitate antioxidantă	99
2.2.2.10. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i>	100
2.2.3. Concluzii.....	102
Capitolul 3. Nanofibre funcționalizate cu citral și aldehydă boronică	104
3.1. Introducere.....	104
3.2. Rezultate și discuții.....	105
3.2.1. Sinteza.....	105
3.2.2. Caracterizarea structurală.....	106

3.2.3. Caracterul dinamic al unităților imină.....	110
3.2.4. Morfologia	112
3.2.5. Comportarea la umflare.....	114
3.2.6. Biodegradarea enzimatică	116
3.2.7. Biocompatibilitatea in vitro.....	117
3.2.8. Proprietăți antimicrobiene	118
3.3 Concluzii.....	121
Capitolul 4. Ambalaje ecologice alimentare pe bază de derivați iminici de chitosan	122
4.1. Introducere.....	122
4.2. Rezultate și discuții.....	124
4.2.1 Caracterizare structurală prin spectroscopie FTIR	124
4.2.2. Proprietățile morfologice ale hârtiei acoperite	129
4.2.3 Proprietățile termice.....	132
4.2.4 Proprietăți de rezistență.....	133
4.2.5. Proprietățile de barieră	136
4.2.5.1. Capacitatea de adsorbție a apei (Cobb60)	136
4.2.5.2. Umectabilitatea suprafeței.....	138
4.2.5.3. Permeabilitatea la gaze	138
4.2.6. Conservarea alimentelor.....	139
4.2.6.1. Eliberarea citralului	139
4.2.6.2. Evaluarea vizuală și testul hedonic.....	142
4.2.6.3. Culoarea	145
4.2.6.4. Fermitatea.....	146
4.2.6.5. Proprietățile antimicrobiene	147
4.3. Concluzii.....	149
Capitolul 5. Partea experimentală.....	150
5.1. Materiale.....	150
5.2. Prepararea materialelor	151
5.2.1. Sinteza și caracterizarea unui nou hidrogel pe bază de chitosan și acid 2-formilfenilboronic	151
5.2.2. Hidrogeluri pe bază de chitosan și monoaldehide cu activitate biologică	151

5.2.3. Prepararea nanofibrelor funcționalizate cu citral și aldehydă boronică.....	152
5.2.4. Sinteza derivaților hidrofobi de citril-imină ai chitosanului.....	154
5.3. Metode de caracterizare	155
<u>Concluzii generale</u>	168
<u>Bibliografie</u>	178

Societatea contemporană este marcată de o preocupare globală tot mai intensă pentru protecția mediului și sănătatea umană, factori care impun reconsiderarea materialelor utilizate în industrie, biomedicină și alte domenii conexe. În acest sens, dezvoltarea de materiale polimerice sustenabile și multifuncționale a devenit o prioritate strategică la nivel internațional.

Deși polimerii sintetici au revoluționat numeroase industrii, de la medicină, industria auto și aerospațială până la electronică, ambalaje și alimentație, aceștia sunt, în mare parte, nedegradabili și contribuie la poluarea mediului. Aceste limitări au impus reorientarea cercetării științifice către identificarea unor alternative ecologice, în special **biopolimeri**, care să ofere performanțe funcționale similare sau superioare celor ale polimerilor convenționali. Din această perspectivă, **tema de cercetare** propusă în această teză este motivată de necesitatea urgentă de a identifica soluții alternative bazate pe biopolimeri, cu performanțe funcționale comparabile sau superioare celor sintetici.

Chitosanul, un derivat al chitinei, se evidențiază drept unul dintre cei mai promițători astfel de compuși, datorită unui profil funcțional complex: biodegradabilitate, biocompatibilitate, lipsă de toxicitate, activitate antimicrobiană, antifungică, hemostatică, imunomodulatoare și antioxidantă. Aceste proprietăți îl recomandă pentru aplicații variate în domeniul biomedical, biotehnologic, alimentar sau în realizarea de ambalaje ecologice. Interesul crescut față de chitosan este confirmat de numeroase publicații științifice, proiecte internaționale și aplicații industriale în continuă expansiune. Din punct de vedere istoric, chitosanul a fost obținut pentru prima dată în anul 1859 de către Charles Marie Benjamin Rouget, prin tratarea chitinei cu hidroxid de potasiu, rezultând un derivat solubil în acid, denumit inițial „chitine modifiée”. Termenul de „chitosan” a fost oficializat ulterior, în 1894, de Felix Hoppe-Seyler. Deși potențialul său a fost recunoscut încă din primele decenii ale secolului XX, dezvoltarea sa a fost încetinită de dominația polimerilor sintetici. Începând cu anii 1970, conștientizarea impactului negativ al acestora asupra mediului a determinat reevaluarea și valorificarea proprietăților unice ale chitosanului.

Odată cu creșterea cererii pentru materiale ecologice, s-a accentuat și interesul pentru **materialele multifuncționale**, capabile să îndeplinească simultan mai multe funcții într-o singură aplicație. În acest cadru, **modificarea chimică a chitosanului** la nivelul grupărilor hidroxil și amină reactive, a devenit o strategie eficientă de îmbunătățire a performanțelor sale. Reacția cu diverse aldehide sau cetone duce la **formarea de baze Schiff (legături imină dinamice)**, generând materiale inteligente, capabile să răspundă la stimuli externi precum pH, temperatură sau lumină.

Printre materialele bazate pe **derivați iminici ai chitosanului**, cele mai studiate sunt: (i) **hidrogelurile**, care pot reține cantități mari de apă și își mențin stabilitatea structurală, fiind ideale pentru aplicații precum regenerarea tisulară, eliberarea controlată de medicamente sau vindecarea rănilor; (ii) **nanofibrele**, obținute prin tehnici precum electrofilarea, care oferă o suprafață specifică mare și porozitate ajustabilă, calități esențiale în pansamente, biosenzori, membrane de filtrare sau purificarea apei; (iii) **acoperirile funcționale**, în special cele comestibile, utilizate în industria alimentară ca alternative sustenabile la ambalajele sintetice, oferind protecție împotriva

contaminării microbiene și prelungind prospețimea produselor perisabile. Astfel, **materialele pe bază de derivați iminici ai chitosanului**, prin versatilitatea lor structurală și funcțională, dețin un potențial remarcabil în medicina regenerativă, biotehnologie, agricultură și industria alimentară, susținând tranziția globală către tehnologii durabile, eficiente și prietenoase cu mediul.

În cadrul acestui context științific și tehnologic, teza de doctorat intitulată „**Dezvoltare de materiale multifuncționale pe bază de derivați iminici de chitosan**” se înscrie într-o direcție de cercetare actuală, interdisciplinară și strategică, atât la nivel internațional cât și național.

Ipoteza de cercetare pornește de la premisa că modificarea chimică a chitosanului prin reacții de **iminare cu aldehide bioactive** poate conduce la obținerea de **materiale inteligente, dinamice și multifuncționale**, capabile să răspundă la stimuli externi și să asigure o eliberare controlată a substanțelor active, cu aplicații în vindecarea rănilor și ambalaje alimentare active.

Pe baza acestei ipoteze, **obiectivele științifice** ale lucrării au fost următoarele: **O1-** Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri supramoleculare pe bază de derivați iminici ai chitosanului, cu potențial în tratamentul rănilor; **O2-** Dezvoltarea de nanofibre funcționalizate pentru aplicații medicale, cu accent pe activitatea antimicrobiană și biocompatibilitate; **O3-** Formularea de acoperiri funcționale antimicrobiene pentru ambalaje pe bază de hârtie celulozică, destinate industriei alimentare.

Teza este organizată în **două părți principale** și cuprinde cinci capitole. **Partea I** conține **Capitolul 1**, care oferă o trecere succintă în revistă a literaturii de specialitate privind chitosanul, modificările sale chimice, precum și principalele metode de sinteză, proprietățile și aplicațiile celor mai reprezentative materiale pe bază de chitosan și derivații lor iminici. **Partea a-II-a** prezintă rezultatele cercetării proprii și include **Capitolele 2, 3, 4** împreună cu **Capitolul 5**, în care sunt detaliate materialele, metodele de sinteză și caracterizare, echipamentele utilizate, cât și datele experimentale suplimentare.

Capitolul 1 este structurat în cinci subcapitole, fiecare tratând aspecte importante privind chitosanul și derivații săi. **Subcapitolul 1** oferă o prezentare generală a chitosanului, concentrându-se pe proprietățile sale fizico-chimice, așa cum sunt evidențiate în date recente de literatură, precum și pe principalele strategii utilizate pentru modificarea structurală a acestuia. **Subcapitolul 2** explorează modificarea chitosanului prin reacții de iminare, prezentând elemente generale de chimie a iminelor, natura reversibilă a legăturilor de tip imină și modalitățile de valorificare a comportamentului lor dinamic. **Subcapitolele 3, 4 și 5** trec în revistă literatura de specialitate privind metodele de obținere a hidrogelurilor, nanofibrelor și acoperirilor pe bază de chitosan, punând accent pe proprietățile acestora și pe aplicațiile potențiale în diverse domenii.

Capitolul 2 este dedicat obținerii și caracterizării unor hidrogeluri supramoleculare dinamice pe bază de iminochitosan și este structurat în două subcapitole: (i) dezvoltarea unui hidrogel obținut prin reticularea chitosanului cu aldehida boronică, evaluat pentru potențialul său în tratamentul rănilor; (ii) elaborarea unor hidrogeluri hibride pe bază de chitosan, în care doi agenți bioactivi sunt încorporați prin legături reversibile de tip imină, vizând aplicații în vindecarea rănilor. *Primul subcapitol* are ca obiectiv specific evaluarea degradării enzimatică a hidrogelului în funcție de pH, simulând compoziția variabilă a exudatului în timpul procesului de

vindecare a plăgilor. *Al doilea subcapitol* explorează o abordare nouă în chimia hidrogelurilor pe bază de chitosan: reticularea chitosanului cu două aldehide bioactive și impactul asupra mecanismului de hidrogelare, morfologiei și funcționalității hidrogelurilor obținute.

Atât hidrogelul reticulat cu aldehida boronică, cât și hidrogelurile hibride, obținute prin utilizarea unui amestec echimolar de câte două aldehide: salicilaldehidă, 4-hidroxibenzaldehidă, vanilină, piperonal, citral și aldehidă boronică au fost caracterizate din punct de vedere structural, supramolecular și morfologic. În vederea validării potențialului lor de aplicare în domeniul medical a fost evaluată degradarea enzimatică în medii cu pH variabil pentru a corela stabilitatea hidrogelurilor cu etapele fiziologice ale vindecării rănilor, activitatea antimicrobiană și antioxidantă, precum și biocompatibilitatea demonstrată prin teste *in vitro*. În plus, a fost evaluată reversibilitatea legăturii imină, corelarea cu eliberarea treptată a aldehydelor bioactive, și influența asupra funcționalității hidrogelurilor.

Capitolul 3 prezintă obținerea și caracterizarea unor noi materiale multifuncționale de tip nanofibre pe bază de derivați iminici ai chitosanului, cu proprietăți funcționale îmbunătățite. În acest scop, nanofibrele de chitosan au fost funcționalizate prin reacția de condensare utilizând un amestec de două aldehide bioactive, aldehidă boronică și citral, în proporții variate. Materialele obținute au fost caracterizate din punct de vedere al compoziției și morfologiei și au fost evaluate forțele dintre componentele fibrelor care au un rol esențial asupra proprietăților acestora. De asemenea, au fost investigate proprietăți relevante pentru aplicarea lor ca pansamente biodegradabile destinate tratamentului rănilor: capacitatea de umflare, activitatea antimicrobiană, cinetica de eliberare a aldehydelor și biocompatibilitatea *in vitro*.

Capitolul 4 prezintă obținerea unor noi formulări pe bază de citril-imino-chitosan cu activitate antimicrobiană, dezvoltate în vederea utilizării ca acoperiri funcționale pentru ambalaje realizate din hârtie celulozică. Formulările au fost sintetizate prin reacția de iminare dintre chitosan și citral, un compus ales datorită proprietăților sale antimicrobiene și hidrofobe, ce pot contribui la îmbunătățirea rezistenței la apă a suportului celulozic. Materialele obținute au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic și termic, utilizând metode analitice specifice. O atenție deosebită a fost acordată investigării impactului acoperirii hârtiei asupra modificărilor proprietăților mecanice și de barieră, urmată de evaluarea eficienței formulărilor în prelungirea duratei de valabilitate a produselor alimentare, prin efectuarea unor teste funcționale relevante pe un aliment model.

Capitolul 5 prezintă partea experimentală, care include metodele de preparare a hidrogelurilor, fibrelor și acoperirilor pe bază de derivați iminici ai chitosanului, precum și materialele, echipamentele și tehnicile utilizate în desfășurarea studiilor. De asemenea, sunt incluse spectrele, figurile și tabelele cu date suplimentare care susțin și completează rezultatele obținute și prezentate în capitolele 2, 3 și 4.

Teza de doctorat propusă reprezintă o contribuție semnificativă și de actualitate în domeniul științei materialelor și în domeniul biomedical, prin explorarea și dezvoltarea de **materiale multifuncționale** cu proprietăți remarcabile sub formă de **hidrogeluri**, **nanofibre** și **acoperiri**. Noutatea și importanța acestei lucrări rezidă în abordarea sa unică, care combină trei elemente cheie:

În primul rând, utilizarea **chitosanului** ca polimer de bază. Fiind un biopolimer biocompatibil și biodegradabil, chitosanul reprezintă un punct de plecare excelent pentru designul unor materiale pentru aplicații medicale, minimizând riscul de respingere și promovând integrarea naturală în țesuturi. Această alegere strategică subliniază orientarea tezei către soluții sigure și eficiente pentru sănătate.

În al doilea rând, inovația majoră constă în utilizarea de **aldehide biologice active** în structura materialelor sintetizate. Aldehidele selectate în cadrul studiilor prezentate în teză nu sunt alese întâmplător; ele dețin proprietăți esențiale, precum activitate **antimicrobiană** și/sau **antioxidantă, fiind totodată biocompatibile**. Această abordare duală, utilizată în Capitolele 2 și 3 este vitală în contextul clinic, unde infecțiile și stresul oxidativ sunt factori majori care pot compromite procesul de vindecare. În Capitolul 4, alegerea citralului se bazează pe caracterul său hidrofob, care contribuie la îmbunătățirea rezistenței la apă a suportului celulozic. Prin integrarea acestor agenți activi, sistemele obținute capătă un rol terapeutic extins, depășind simpla funcție de suport fizic.

În al treilea rând, elementul definitoriu al acestei teze este formarea **legăturilor iminice reversibile între chitosan și aldehide**. Această chimie dinamică permite nu doar obținerea unor materiale inteligente și adaptabile, dar și o **eliberare controlată și susținută a aldehydelor** la locul de acțiune. Reversibilitatea legăturilor iminice contribuie, de asemenea, la **biodegradarea materialului** într-un mod controlat, evitând necesitatea unor intervenții suplimentare pentru îndepărtare. Această caracteristică poziționează sistemele dezvoltate ca soluții avansate, cu un potențial semnificativ în aplicații precum vindecarea rănilor, unde eliberarea țintită a agenților terapeutici și o degradare sigură sunt esențiale.

Astfel, această teză de doctorat contribuie în mod semnificativ, nu doar la extinderea cunoștințelor fundamentale în chimia și ingineria materialelor, ci deschide și noi orizonturi pentru dezvoltarea de soluții terapeutice personalizate și eficiente, cu un impact direct și pozitiv asupra sănătății umane.

Rezultatele cercetării au fost diseminate prin articole științifice, participări la conferințe și au fost susținute financiar prin proiecte de cercetare naționale și internaționale, reflectând impactul și relevanța temei abordate.

2.1. Sinteza și caracterizarea unui nou hidrogel pe bază de chitosan și acid 2-formilfenilboronic

2.1.1. Introducere

Rănilor extinse, cauzate de afecțiuni precum arsurile sau diabetul, reprezintă o problemă majoră de sănătate, deoarece vindecarea lentă crește riscul de infecții și complicații grave [1–3]. De aceea, cercetătorii caută soluții pentru o închidere rapidă a rănilor, inclusiv prin dezvoltarea de hidrogeluri polimerice, în special cele pe bază de polizaharide, care sunt non-toxice, biodegradabile și biocompatibile [4–7]. Chitosanul se remarcă printre aceste polizaharide, accelerând vindecarea rănilor prin stimularea hemostazei, proliferării celulare și a depunerii de collagen [8,9]. Conform studiilor, materialele pe bază de chitosan, în special cele cu agenți antibacterieni, pot preveni infecțiile [10]. Deoarece îndepărtarea pansamentelor tradiționale poate deteriora țesutul nou, studiile se axează pe crearea de pansamente biodegradabile care se resorb odată cu vindecarea [11]. De aceea, chitosanul este un candidat promițător în acest sens. Acest studiu a investigat viteza de biodegradare a unui hidrogel pe bază de chitosan (reticulat cu acid 2-formilfenilboronic) în funcție de pH-ul exsudatului plăgii. Scopul a fost de a crea un biomaterial biodegradabil, biocompatibil și antimicrobian pentru vindecarea rănilor, monitorizând pierderea de masă și observând probele prin microscopie SEM la diferite pH-uri, corespunzătoare etapelor de vindecare.

2.1.2. Rezultate și discuții

2.1.2.1. Caracterizarea structurală și supramoleculară

Hidrogelul **H2** a fost obținut prin reacția de condensare acidă a chitosanului (**Ch**) cu acidul 2-formilfenilboronic, denumită în continuare aldehydă boronică (**2-FPBA**) (**Figura 2.1.**). Protocolul experimental de obținere al hidrogelului prezentat în literatură a fost modificat, prin realizarea sintezei în apă, evitându-se utilizarea altor solvenți organici. Formarea hidrogelului a fost validată vizual prin testul tubului inversat (**Figura 2.4.c**).

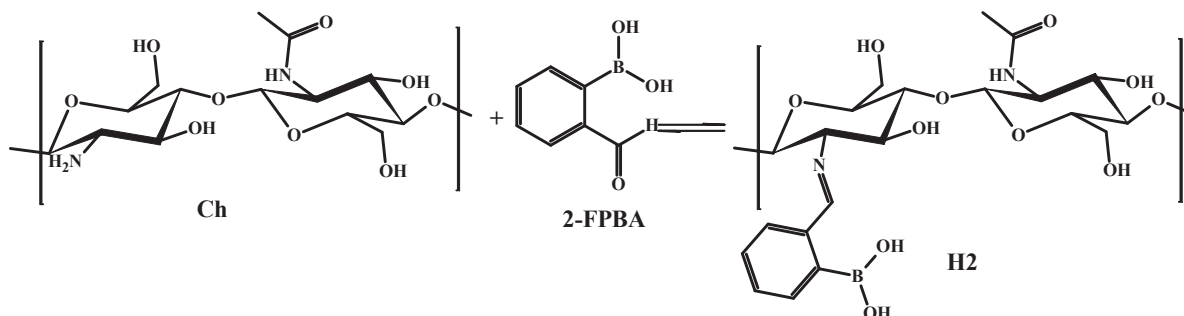


Figura 2.1. Reacția de iminare a chitosanului cu aldehyda boronică

Analiza structurală (^1H -RMN și FTIR) a confirmat formarea legăturilor imină în hidrogel, indicând un echilibru de iminare reversibil, influențat de mediul apos al reacției. Investigațiile ^1H -RMN realizate la diferite intervale timp au arătat o creștere a gradului de conversie a aldehidei în legături imină, de la 18,9% în momentul inițial la 26,1% după 24 de ore, stabilizându-se ulterior la această valoare.

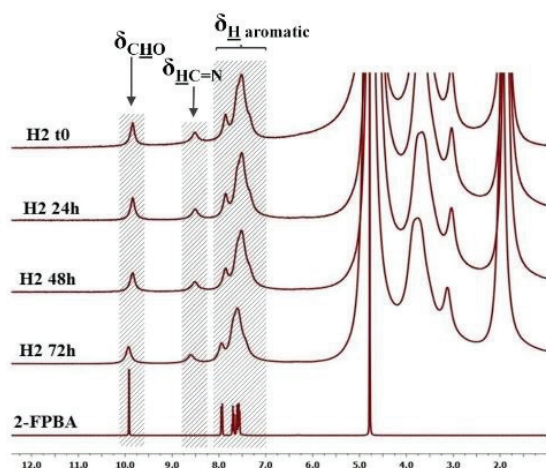


Figura 2.2. Spectrele ^1H -RMN ale hidrogelului și aldehidei 2-FPBA

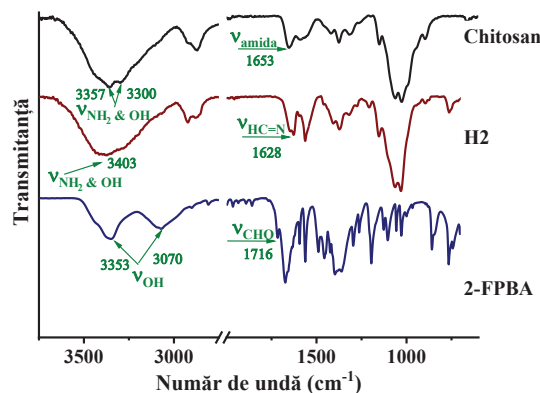


Figura 2.3. Spectre FTIR ale chitosanului, 2-FPBA și al hidrogelului liofilizat

Pe de altă parte, în spectrul FTIR al hidrogelului liofilizat a putut fi observată apariția benzii de absorbție caracteristică legăturii imină la 1628 cm^{-1} și absența benzii de absorbție a grupării aldehidă [12], dovedind că echilibrul reacției de iminare a fost deplasat către produși în timpul procesului de liofilizare, odată cu îndepărtarea apei (**Figura 2.3.**).

Imaginile POM ale hidrogelului au prezentat birefrință luminoasă cu o textură în formă de benzi datorată autoordonării unităților imină formate în timpul hidrogelării în clusteri ce au rol de noduri de reticulare (**Figura 2.4. a,b**) [13]. În plus, hidrogelul a prezentat o emisie de lumină albastră atunci când este iluminat cu o lampă UV, în concordanță cu formarea de fluorofori supramoleculari (**Figura 2.4.d**) [14].

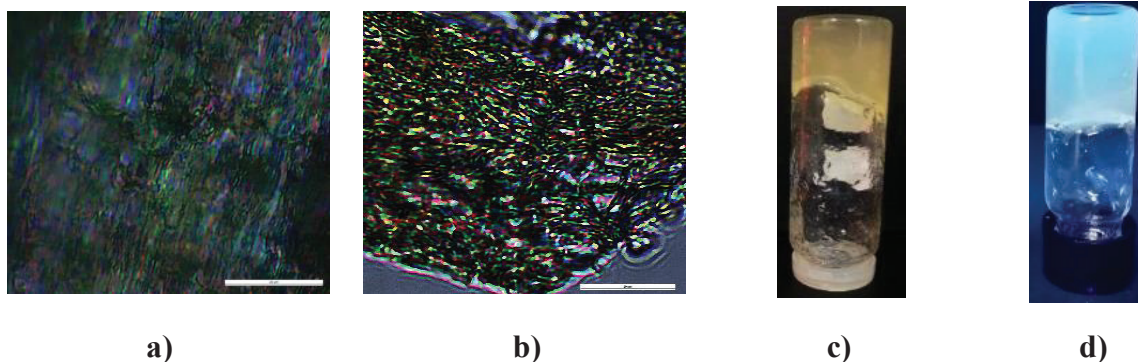


Figura 2.4. Imaginile hidrogelului în lumină polarizată (scală: $20\text{ }\mu\text{m}$), realizate pe proba de hidrogel **a)** groasă și **b)** subțire și imagini ale hidrogelului **c)** în lumină normală și **d)** la iluminare cu o lampă UV

2.1.2.2. Proprietăți biologice *in vitro*

Viabilitatea celulară a fibroblastelor dermice umane normale a fost testată pentru a evalua citotoxicitatea hidrogelului, conform standardului ISO 10993-5:2009(E). Rezultatele au arătat că, la concentrații de 2-FPBA sub 0,284%, hidrogelul nu este citotoxic și are o viabilitate celulară de peste 70% (**Figura 2.5.**), ceea ce indică faptul că sistemele pot fi utilizate în siguranță pentru bioaplicații care impun contactul cu celulele fibroblaste [15].

Evaluarea proprietăților antimicrobiene ale hidrogelului **H2** a evidențiat că acesta prezintă activitate antibacteriană puternică împotriva unor agenți patogeni relevanți, atingând zone de inhibiție de 9 mm (*S. Aureus*), 15 mm (*E.coli*) și 17 mm (*C. albicans*) [16]. Activitatea antimicrobiană a fost corelată cu reversibilitatea legăturii imină, care a favorizat deplasarea echilibrului către reactivi odată ce aceștia au fost consumați în procesul de distrugere a agenților patogeni.

2.1.2.3. Evaluarea biodegradării *in vitro*

A fost realizat un studiu de biodegradare a hidrogelului în medii cu valori diferite ale pH-ului, similare cu valorile pH-ului exsudatului pe parcursul perioadei de vindecare a rănilor. Hidrogelul s-a degradat progresiv într-un mediu similar cu cel specific rănilor. În primul rând, se poate observa că pierderea de masă în prezența lizozimei este semnificativ mai mare decât în absența ei (45% vs. 17%), indicând clar efectul lizozimei în degradarea chitosanului (**Figura 2.6.**). În plus, se poate observa că pH-ul soluției de lizozimă a influențat viteza de biodegradare. Astfel la pH-uri alcaline (8,5 și 9), specifice rănilor în faza inițială de vindecare, biodegradarea este ușor mai accelerată și a permis o eliberare mai rapidă a agentului antimicrobian.

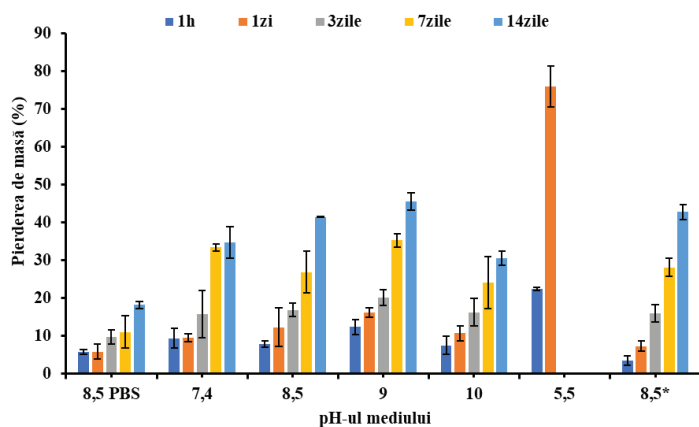


Figura 2.6. Pierderea de masă a hidrogelului pe parcursul a 14 zile

La pH 10, specific fazelor ulterioare de vindecare, viteza a scăzut ușor, în timp ce la pH 5,5, specific pielii normale, hidrogelul s-a degradat foarte rapid, fiind complet absorbit în prima zi. Evoluția degradării a fost susținută de imaginile SEM, care au indicat o morfologie poroasă în medii cu pH bazic și transformarea acesteia într-una fibroasă în medii cu pH acid (5,5), adecvată pentru regenerarea țesuturilor.

Acest date sugerează că hidrogelul prezintă potențial de a fi adsorbit rapid de țesutul nou format, fără a fi nevoie de o debridare traumatică. Astfel ar putea fi favorizată regenerarea fără traume a țesutului și deci o vindecare a rănilor fără cicatrici.

2.2. Reticularea chitosanului cu amestecuri de monoaldehide bioactive

2.2.1. Introducere

Hidrogelurile pe bază de chitosan sunt esențiale în biomedicină, deși reticularea tradițională cu dialdehide prezintă probleme de toxicitate [17]. Studii recente au dezvoltat o metodă inovatoare de reticulare a chitosanului cu aldehide monofuncționale, mai puțin toxice și care în plus pot prezenta bioactivitate. Aceasta implică formarea de legături imină reversibile și auto-asamblarea lor în clusteri hidrofobi, conferind hidrogelurilor proprietăți controlabile precum activitate antimicrobiană, caracter chiral și autovindecare [18]. Pentru a obține biomateriale multifuncționale, studiul prezentat în acest subcapitol propune reticularea chitosanului cu amestecuri de aldehide bioactive. Obiectivul este dezvoltarea de hidrogeluri pentru vindecarea rănilor, prin încapsularea agenților cu efect antimicrobian și/sau antioxidant, valorificând sinergismul acestora și natura dinamică a legăturilor imină pentru eliberare controlată și biodegradare [19].

2.2.2. Rezultate și discuții

A fost sintetizată o serie de 15 hidrogeluri hibride prin reacția de condensare a chitosanului cu amestecuri binare de 6 aldehide bioactive: salicilaldehida (SA), p-hidroxibenzaldehida (PHB), vanilina (V), piperonalul (P), citralul (C), aldehida boronica (BA) (**Tabel 2.1.** și **Schema 2.1.**). În plus, au fost obținute șase hidrogeluri martor, fiecare cu o singură aldehydă, pentru a facilita o interpretare mai clară a rezultatelor. Majoritatea hidrogelurilor au fost obținute la o concentrație de 2% a chitosanului (Tabel 2.1.- culoare neagră). Totuși, cele care conțineau vanilină și p-hidroxibenzaldehidă au necesitat o concentrație mai mare, de 3%, pentru a hidrogela (Tabel 2.1. culoare albastră).

Tabel 2.1. Compoziția hidrogelurilor hibride și a celor martor

Probă	Aldehydă (e)	Probă	Aldehyde	Probă	Aldehyde
H-SA	SA	H2	PHB /V	H9	SA/BA
H-BA	BA	H3	PHB /P	H10	V/P
H-P	P	H4	PHB /C	H11	V/C
H-C	C	H5	PHB /BA	H12	V/BA
H-V	V	H6	SA/V	H13	P/C
H-PHB	PHB	H7	SA/P	H14	P/BA
H1	PHB/SA	H8	SA/C	H15	C/BA

Analiza spectrelor ^1H -RMN (**Figura 2.12.**) a evidențiat echilibrul dinamic aldehydă–imină în procesele de gelifiere a chitosanului, raportul integralelor protonilor de imină/aldehydă (I_I/I_A) și gradul de iminare fiind utilizați ca parametri comparativi. În soluțiile de 2%, sistemele au arătat creșteri progresive ale raportului I_I/I_A , sugerând consolidarea rețelelor de hidrogel, în timp ce altele au prezentat scăderi, indicând o gelifiere predominant fizică. Stabilitatea legăturilor imină depinde de particularitățile structurale ale aldehydelor (segregare π - π , hidrofobicitate, stabilizare prin legături de H). Astfel, SA, BA și C au prezentat conversii ridicate (până la 47%), spre deosebire de V, P și PHB ($\approx 5\%$). În sistemele hibride, iminarea concomitentă a dus la grade mai mari de conversie decât suma celor individuale, efect favorizat de creșterea vâscozității. În cazul aldehydelor cu reactivitate antagonică, gradul de iminare a fost determinat de cea mai reactivă, confirmând rolul vâscozității în deplasarea echilibrului spre produși.

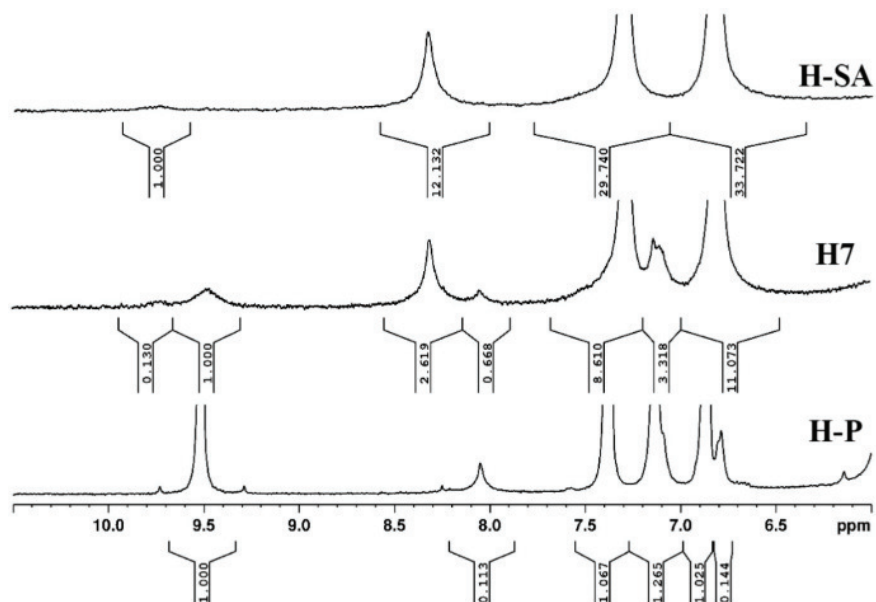
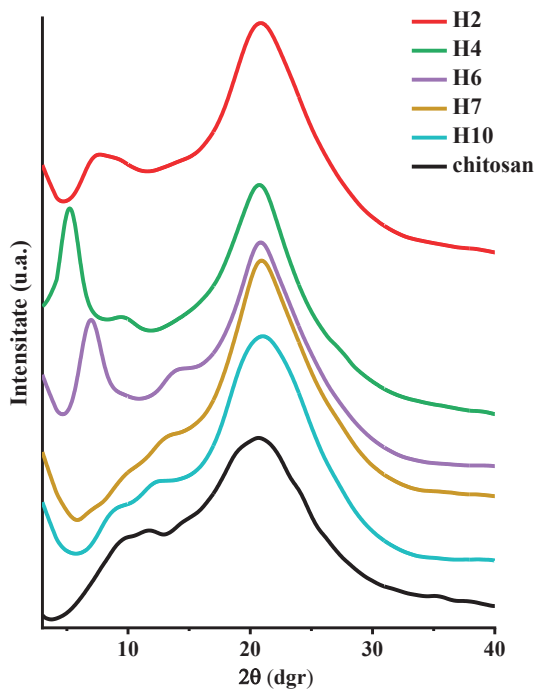


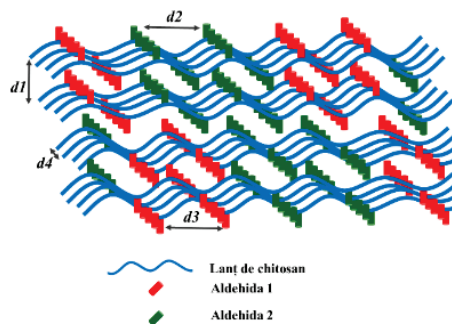
Figura 2.12. Spectrul ^1H -RMN a hidrogelului hibrid **H7** (SA/P) comparativ cu hidrogelurile martor

2.2.2.3. Caracterizare supramoleculară prin WXRd și POM

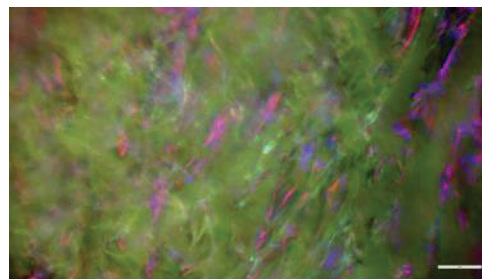
Difracția de raze X (XRD) a evidențiat prezența reflexiilor la unghiuri mici, indicând o structură ordonată, cu distanțe mari între straturi. Deși se observă o oarecare contribuție a ambelor aldehyde în cazul amestecurilor, majoritatea dovezilor susțin ipoteza că reticularea are loc predominant prin formarea de clusteri omogeni, adică din imine de același tip. Microscopia optică în lumină polarizată (POM) a evidențiat o birefrință puternică, similară celei observate în cazul hidrogelurilor pure (**Figura 2.13.**).



a)



d)



e)

Figura 2.13. a) Difractograme de raze X obținute pe xerogeluri, d) reprezentarea schematică a unei porțiuni ordonate din arhitectura supramoleculară a xerogelurilor și e) imagine POM a xerogelului H8 (SA/C) (scală: 20 μm)

2.2.2.4. Studiul morfologic prin SEM

Morfologia hidrogelurilor este esențială pentru proprietățile lor funcționale (viteza de hidratare, umflarea, mucoadezivitatea și difuzia diferitelor principii bioactive). Studiul a arătat că, în timp ce xerogelurile obținute din hidrogelurile de referință pe bază de BA, P au o rețea poroasă bine definită și interconectată, cele care conțin PHB și V prezintă o morfologie fragmentată și pereți perforați, o caracteristică des întâlnită în rețelele interpenetrante. Acest aspect a fost evidențiat și în cazul hidrogelurilor hibride. De asemenea, s-a observat că dimensiunea porilor în hidrogelurile hibride este mai mică față de cea a hidrogelurilor de referință.

2.2.2.5. Studiul comportamentul viscoelastic al hidrogelurilor

Analiza reologică a confirmat că majoritatea probelor au format hidrogeluri stabile, având modulul elastic superior modulului plastic. Excepție face H2 (V, PHB) care conform ^1H -RMN prezintă cel mai scăzut grad de iminare și ca urmare nu a putut genera o rețea tridimensională. S-a constatat că gradul de iminare a influențat proprietățile viscoelastice, cele mai elastice hidrogeluri fiind obținute la un grad mediu de iminare. Mai mult, agenții de reticulare au jucat un rol important în procesul de gelifiere.

De exemplu, salicilaldehida (SA) a produs hidrogeluri foarte elastice, ca în cazul hidrogelurilor H1 (PHB/SA) și H7 (SA/P), în timp ce boronaldehida (BA) a redus elasticitatea, sugerând o contribuție a forțelor fizice în reticulare, precum H9 (SA/BA) (**Figura 2.15**).

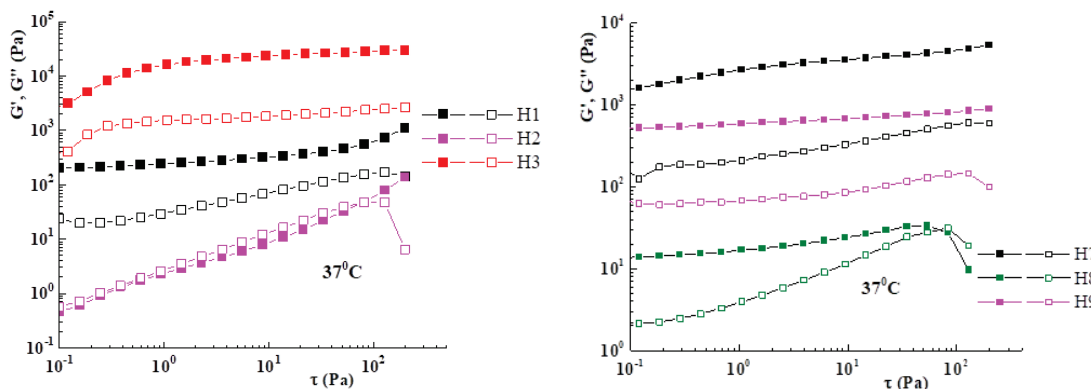


Figura 2.15. Parametrii reologici pentru hidrogeluri hibride reprezentative

Funcționalitate biologică

2.2.2.6. Studii de eliberare *in vitro*

Eliberarea s-a putut monitoriza în cazul hidrogelurilor care conțin aldehide a căror benzi de absorbție nu s-au suprapus în UV-Vis. Toate hidrogelurile testate au prezentat o eliberare rapidă a aldehidei în primele 8 ore, fenomen mai pronunțat în cazul probelor H12 (V/BA) și H14 (P/BA) și mai puțin evident în cazul probei H9 (SA/BA). Acest comportament este determinat de valorile gradului de iminare: un grad de iminare mai mic a determinat o eliberare mai rapidă și un procent mai mare de aldehydă eliberată.

2.2.2.7. Studii de degradare enzimatică

Hidrogelurile hibride au avut o degradare rapidă de la 50% inițial pentru H14 (P/BA), până la 85% după 21 de zile în cazul H8 (SA/C). Această accelerare este legată de instabilitatea clusterilor micști de imine și accesibilitatea crescută a apei. Mai mult, gradul de iminare a determinat viteza de degradare: reticularea redusă favorizează pierderi de masă mai mari, ex. H14 (P/BA), H15 (C/BA), în timp ce un grad de iminare ridicat stabilizează rețeaua, ex. H10 (V/P). În imaginile SEM după degradare pot fi observate structuri poroase și fibre încâlcite similare cu modelul rețelelor semi-interpenetrante, ca în cazul probelor H8 (SA/C) și H15 (C/BA) (**Figura 2.17**).

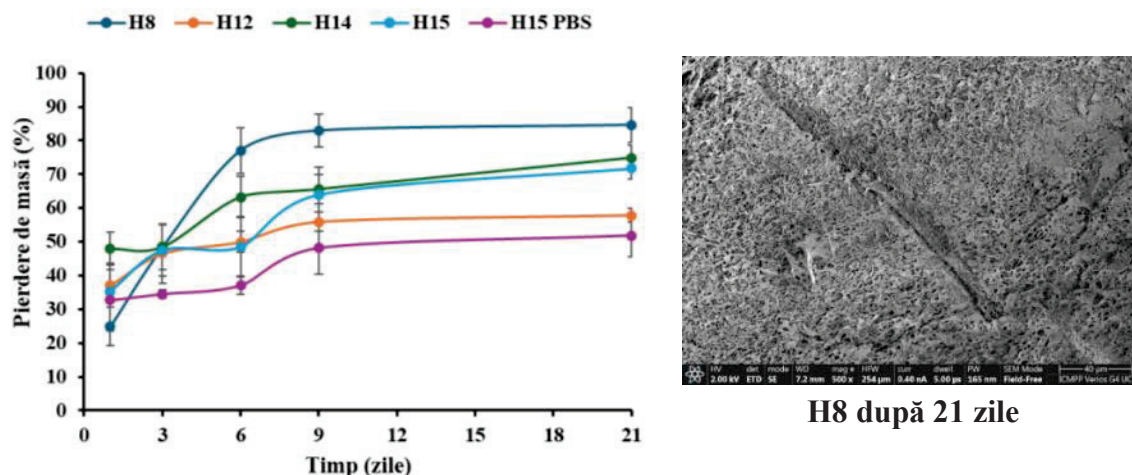


Figura 2.17. Pierderea de masă în urma degradării enzimatice și microfotografii SEM ale xerogelului H8 în urma procesului de biodegradare

2.2.2.8. Activitate antimicrobiană

Majoritatea hidrogelurilor hibride au demonstrat o activitate antimicrobiană eficientă împotriva bacteriilor *E. coli* (Gram-negativă), *S. aureus* (Gram-pozitivă) și a fungului *C. albicans*. Cele mai bune rezultate antifungice au fost obținute pentru H14 (BA/P), cu zone de inhibiție de până la 48,84 mm împotriva *C. albicans* și 34 mm împotriva *S. aureus*. În cazul tulpinii Gram-negativă *E. coli*, hidrogelul H9 a prezentat cea mai bună activitate, cu o zonă de inhibiție de până la 35 mm (Figura 2.18.).

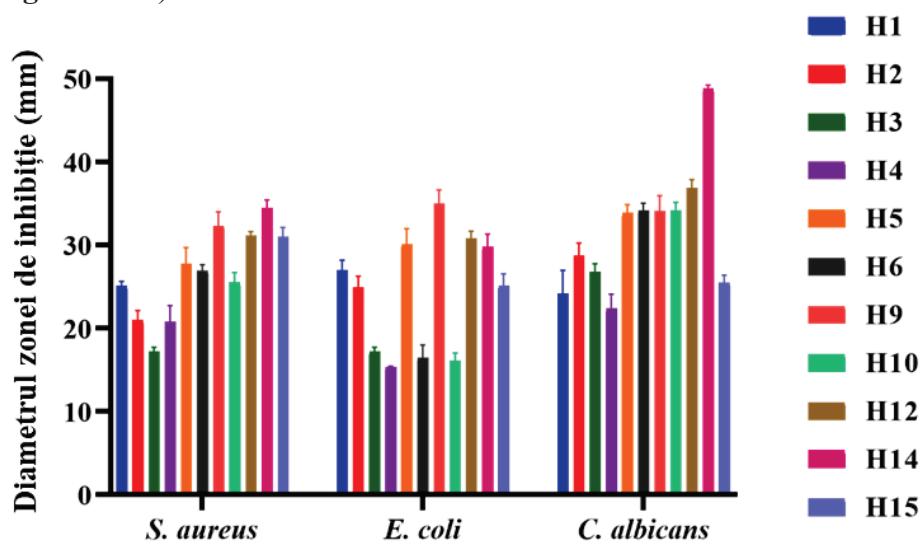


Figura 2.18. Activitatea antimicrobiană a probelor analizate

2.2.2.9. Activitate antioxidantă

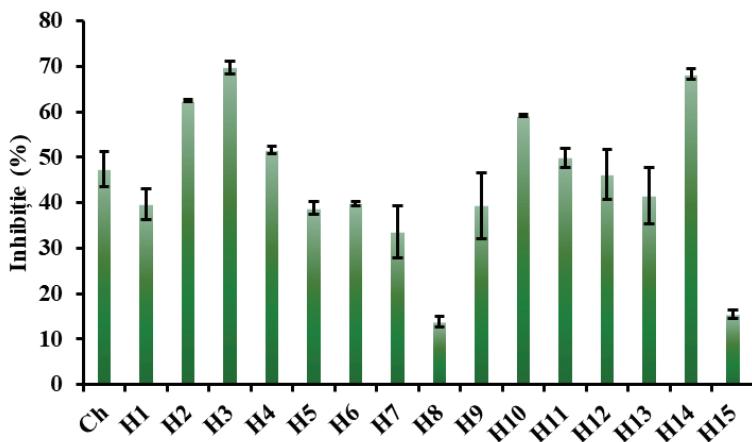


Figura 2.19. Activitatea antioxidantă împotriva DPPH a hidrogelurilor în comparație cu chitosanul

Evaluarea activității antioxidante prin testul DPPH a arătat că toate monoaldehidele, în special vanilina, au capacitatea de a inhiba acest radical liber. Nu s-a observat un sinergism clar în amestecurile de aldehide, dar nici o inhibare reciprocă a activității. Hidrogelurile au prezentat o activitate antioxidantă mult mai mare decât monoaldehidele individuale, datorită contribuției chitosanului (**Fig. 2.19**).

Pentru H7 (SA/P), H9 (BA /SA), H13 (P/C) și H14 (BA/P), s-a observat chiar un potențial sinergism între chitosan și aldehide. Datele obținute indică faptul că hidrogelurile prezintă un potențial ridicat de inhibare a radicalilor liberi, aspect util în aplicațiile biomedicale pentru care diminuarea stresului oxidativ este un aspect benefic, cum ar fi biomaterialele destinate vindecării rănilor.

Capitolul 3. Nanofibre funcționalizate cu citral și aldehydă boronică

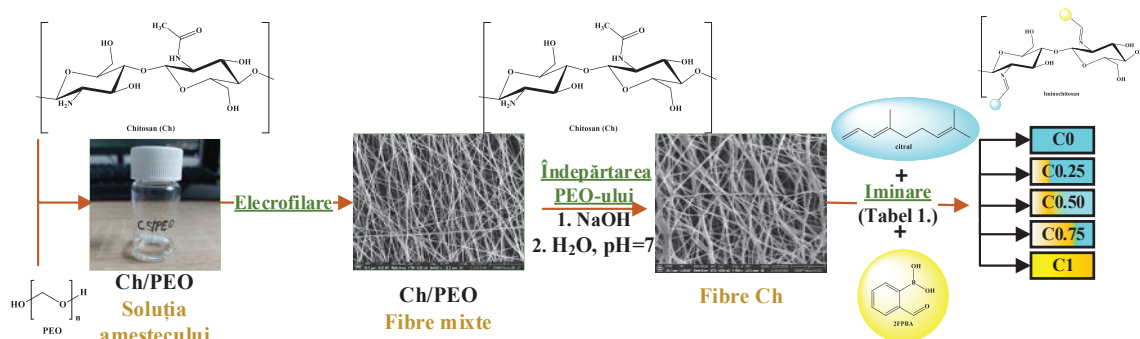
3.1. Introducere

Tratamentul rănilor, în special al celor cronice și al arsurilor, reprezintă o problemă majoră de sănătate publică din cauza vindecării lente și a riscului crescut de infecții invazive [21]. Nanofibrele pe bază de chitosan s-au dovedit promițătoare datorită proprietăților lor favorabile: biocompatibilitate, porozitate, activitate antimicrobiană și hemostatică [22,23]. Pentru a îmbunătăți multifuncționalitatea nanofibrelor pe bază de chitosan în vederea creșterii capacității de vindecare a rănilor ar trebui identificate soluții pentru a controla viteza de eliberare a compusului antimicrobian și biodisponibilitatea acestuia la locul infecției. În acest context, studiul următor propune funcționalizarea nanofibrelor de chitosan prin legături imină cu două aldehide bioactive (acid 2-formilfenilboronic și citral) pentru a obține un efect antimicrobian sinergic și controlat. Această abordare inovatoare, neexplorată anterior, ar putea duce la dezvoltarea unor materiale eficiente pentru vindecarea rănilor.

3.2. Rezultate și discuții

3.2.1. Obținere

Fibrele funcționalizate au fost preparate în trei etape: obținerea fibrelor de chitosan/polietilenoxid (Ch/PEO) prin electrofilare, îndepărtarea PEO-ului pentru a obține fibre de chitosan pure, și funcționalizarea acestora prin reacția de iminare cu amestecuri de aldehidă boronică și citral în diverse rapoarte molare. Probele au fost notate în funcție de fracția de aldehidă boronică (Schema 3.1.).



Schema 3.1. Reprezentarea schematică a preparării fibrelor de chitosan funcționalizate și codurile acestora

Analizele FTIR și ¹H-RMN pe fibrele de chitosan au confirmat că ambele aldehide, citralul și aldehida boronică, au interacționat cu grupele amină. S-a observat că gradul de conversie al grupelor amină în legături imină a fost maxim 56% atunci când a fost folosită doar aldehida boronică și a scăzut odată cu creșterea proporției de citral, cel mai probabil din cauza reactivității mai scăzute a celei din urmă.

3.2.3. Caracterul dinamic al unităților imină

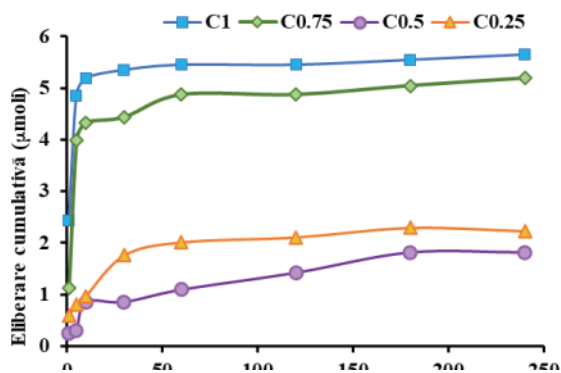


Figura 3.5. Compararea cantităților de aldehidă boronică eliberată în timp pentru probele C1, C0.75, C0.5, C0.25

Monitorizarea eliberării aldehydilor în soluția salină de PBS prin UV-Vis a indicat o eliberare mai rapidă de 2-FPBA în comparație cu citralul. Acest lucru poate fi explicat prin caracterul hidrofil al 2-FPBA care a favorizat deplasarea echilibrului de iminare către reactivi, în timp ce caracterul hidrofob al citralului a împiedicat eliberarea. Comparând cantitățile de 2-FPBA eliberate din probele ce o conțin s-a putut observa o tendință similară cu cea a gradului de iminare, adică cantități mai mari de 2-FPBA au fost eliberate din probele cu grade mai mari de

iminare. Astfel, cantitatea de 2-FPBA eliberată în 240 de minute a corespuns cu cea grefată pe chitosan prin iminare (**Figura 3.5.**).

3.2.4. Morfologia

Microscopia SEM a arătat că fibrele nefuncționalizate au o morfologie netedă și porozitate bine definită. Funcționalizarea cu citral a condus la fibre rugoase și interconectate, în timp ce 2-FPBA a generat fibre mai netede și cu diametru mai mic. Funcționalizarea cu ambele aldehide generează fibre cu rugozitate și diametre intermediare. Comportamentul diferit a fost pus pe seama naturii hidrofile/hidrofobe a celor două aldehide. În lumina polarizată, fibrele de chitosan prezintă birefringență, semn al alinierii lanțurilor de chitosan în timpul electrofilării și al fazei ordonate. Aceasta se menține la fibrele cu 2-FPBA, dar este diminuată la cele cu citral, probabil din cauza acoperirii cu lanțuri alifaticе.

3.2.5. Comportarea la umflare

În vederea aplicării *in vivo*, a fost evaluată umflarea fibrelor în PBS la 37 °C. Fibrele de chitosan au avut un grad de umflare superior celor funcționalizate, confirmând diminuarea

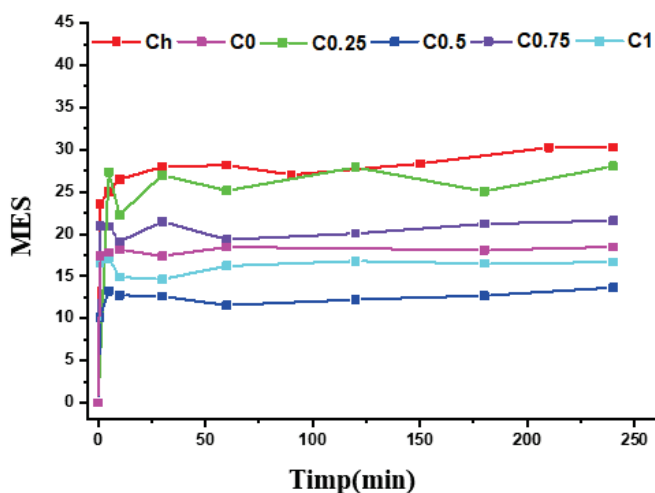


Figura 3.9. Cinetica de umflare a fibrelor studiate

porozității prin funcționalizarea preponderent la suprafață. Toate probele s-au umflat rapid inițial, apoi au avut o scădere ușoară a MES, urmată de stabilizare, indicând păstrarea formei și favorizarea transportului de agenți bioactivi. Proba C0.25 a prezentat o creștere/descrereștere alternantă a valorilor MES, posibil corelată cu o îndepărtare alternantă a celor două aldehide, comportament de interes pentru dispozitivele medicale cu eliberare de medicamente. (**Figura 3.9. a**). Concluzia principală a studiului comportamentului de umflare este că toate fibrele sunt

capabile să se umfle rapid, având potențial de a adsorbi exsudatul rănilor fără a-și schimba semnificativ forma și astfel de a asigura un transport bun al agenților bioactivi.

3.2.6. Biodegradarea enzimatică

Biodegradarea fibrelor în mediu de lizozimă a fost monitorizată timp de 21 de zile. După o zi, fibrele de chitosan au pierdut 35% din masă, cele cu aldehida boronică (C1) în jur de 20%, iar probele cu citral sub 15%. Ulterior, degradarea a fost mai lentă, ajungând în final în jur de 40% pentru C1 și mai redusă pentru probele cu citral. Aceste aspecte confirmă că citralul hidrofob

inhibă procesul de biodegradare. Imaginile SEM au evidențiat coalescența și exfolierea fibrelor, indicând o biodegradare preponderent la suprafață.

3.2.7. Biocompatibilitatea in vitro

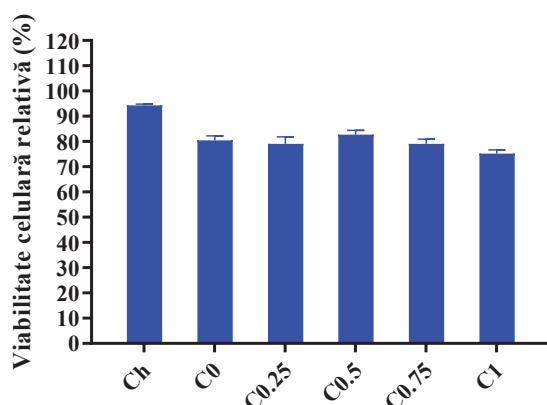


Figura 3.11. Viabilitatea celulelor NHDF în contact cu nanofibrele studiate

Biocompatibilitatea noilor biomateriale sintetizate a fost testată pe fibroblaste dermice umane normale (NHDF). Fibrele de chitosan au indicat o viabilitate celulară de aproximativ 95%, care a scăzut la 80% în cazul probelor care conțin unități citril-imină și la 75% pentru cele care conțin unități de imină pe bază de 2-FPBA (**Figura 3.11.**). Probele care conțin ambele tipuri de imină au păstrat o viabilitate celulară mai mare de 80%. Aceste date au indicat că toate biomaterialele sintetizate îndeplinesc criteriul de evaluare a biosiguranței și pot fi aplicate ca

dispozitive biomedicale care vin în contact cu țesuturile vii.

3.2.8. Proprietăți antimicrobiene

Deși chitosanul este cunoscut ca antimicrobian, fibrele nefuncționalizate nu au prezentat zone de inhibiție, probabil din cauza mobilității scăzute a macromoleculelor în stare solidă. Fibrele funcționalizate cu 2-FPBA (C0.5, C0.75, C1) au arătat însă inhibiție clară, mai ales împotriva *A. brasiliensis* (**Fig. 3.12c**). Activitatea mai ridicată a fibrelor cu citral-imină sugerează un efect sinergic între citral și 2-FPBA, indicat și de proba C1, pentru care creșterea conținutului de 2-FPBA nu a dus la o eficiență suplimentară. Toate probele funcționalizate (inclusiv cele cu citral) au împiedicat aderarea și formarea biofilmului bacterian și fungic (*S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. brasiliensis*), demonstrând rolul lor de barieră protectoare pentru plăgi.



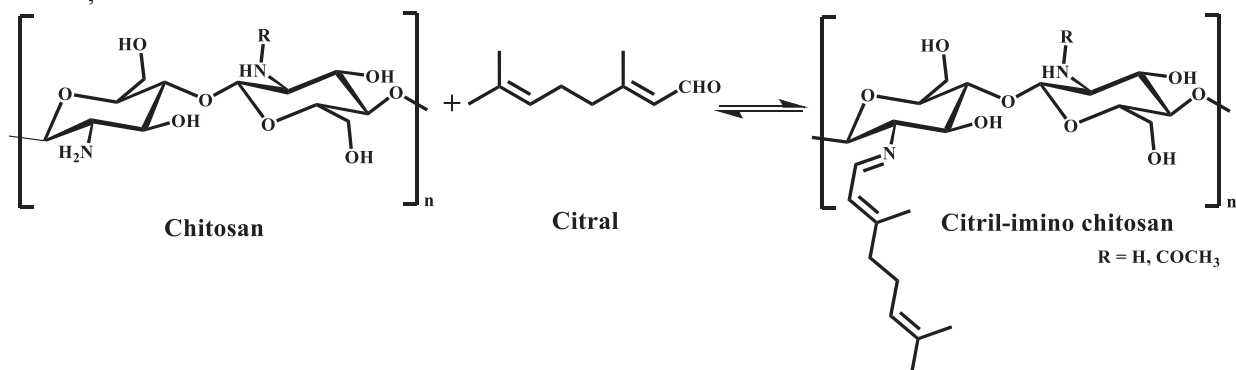
Figura 3.12. c) Activitatea antifungică a pansamentelor testate împotriva *A. brasiliensis*

4.1. Introducere

Din cauza problemelor de mediu cauzate de ambalajele tradiționale din plastic, materialele pe bază de celuloză, cum ar fi hârtia, reprezintă o alternativă sustenabilă [24]. Cu toate acestea, proprietățile hidrofobe și de barieră reduse ale hârtiei limitează utilizarea sa, necesitând îmbunătățiri. O soluție eficientă este acoperirea hârtiei cu biopolimeri precum chitosanul, un material natural, biodegradabil și cu proprietăți antimicrobiene [25]. Acest studiu se concentrează pe o tehnică ecologică de acoperire a hârtiei cu un derivat al chitosanului, obținut prin reacția cu citralul, o aldehydă naturală cu proprietăți antimicrobiene și hidrofobe [26]. Scopul este de a îmbunătăți proprietățile mecanice și de barieră ale hârtiei, în special rezistența la apă, pentru a prelungi durata de valabilitate a alimentelor. Astfel, se creează un ambalaj multifuncțional, ecologic și eficient.

4.2. Rezultate și discuții

Derivații de citril-imină ai chitosanului au fost sintetizați anterior aplicării, prin reacția de condensare acidă a chitosanului cu citralul (**Schema 5.1.**), în rapoarte molare diferite ale unităților glucozamină/aldehydă, și anume 1/1 (cod C1) și 2/1 (cod C2), iar soluțiile obținute au fost aplicate apoi pe hârtie. Soluția de chitosan nefuncționalizat (cod C) a fost aplicată în condiții similare cu derivații iminici.



Schema 5.1. Sinteza derivaților de citril-imină ai chitosanului

Analiza structurală a confirmat formarea legăturii imină atât în cazul derivaților de chitosan-citril-imină cât și a hârtiei acoperite cu fiecare dintre aceștia prin apariția unei benzi de absorbție la 1641 cm^{-1} în FTIR respectiv a unor deplasări chimice la 179, 180, 181 ppm în C^{13} -RMN. Mai mult, spectrele FTIR au oferit informații utile cu privire la potențialele interacțiuni între suprafața hârtiei și chitosan sau citril-imino-chitosan, pe de-o parte prin creșterea densității legăturilor de hidrogen și a indicelui de cristalinitate în cazul tuturor eșantioanelor de hârtie acoperite, iar pe de altă parte prin prezența unei benzi noi de absorbție la 1651 cm^{-1} atribuită vibrației unor legături imină ce s-ar putea forma între grupele aldehydă ale ligninei reziduale din hârtia kraft și grupele amină din chitosan.

4.2.3 Proprietățile termice

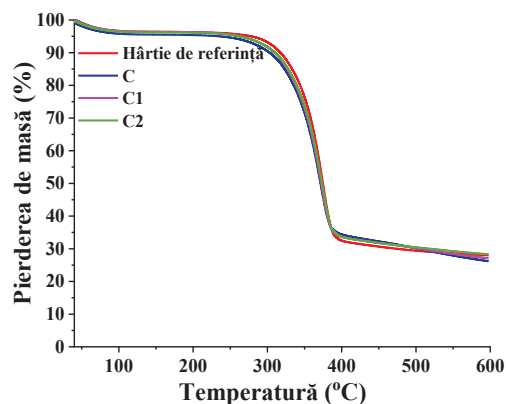


Figura 4.5. Curbele TGA ale probelor studiate

Analiza termogravimetrică (TGA) a arătat că hârtia de referință s-a degradat la 375 °C. Acoperirea cu chitosan sau cu derivatul de citril-imino-chitosan a redus ușor temperatura de descompunere din cauza stabilității termice mai scăzute a chitosanului. Totuși, derivatul de citril-imino-chitosan a oferit o stabilitate termică ușor superioară față de chitosan, consolidând fibrele de hârtie. În plus, temperatura de degradare a hârtiei acoperite este mult mai mare decât cea necesară procesului de ambalare sau chiar sterilizare, fapt ce indică o utilizare sigură a acestora fără risc de degradare (**Figura 4.5.**).

4.2.4 Proprietăți de rezistență

Tratarea hârtiei cu chitosan și derivații săi iminici, îi îmbunătățește semnificativ proprietățile mecanice. Astfel, hârtia devine mai rezistentă la tracțiune, plesnire și îndoiri repetate, dar și mai flexibilă (**Figura 4.6.**). Aceste îmbunătățiri sunt rezultatul formării de legături noi între polimerii de acoperire și fibrele de celuloză. Acoperirea cu soluție de citril-imino-chitosan s-a dovedit mai eficientă datorită vâscozității sale mai reduse și a capacității de reticulare a citralului, care facilitează o integrare mai bună în structura hârtiei.

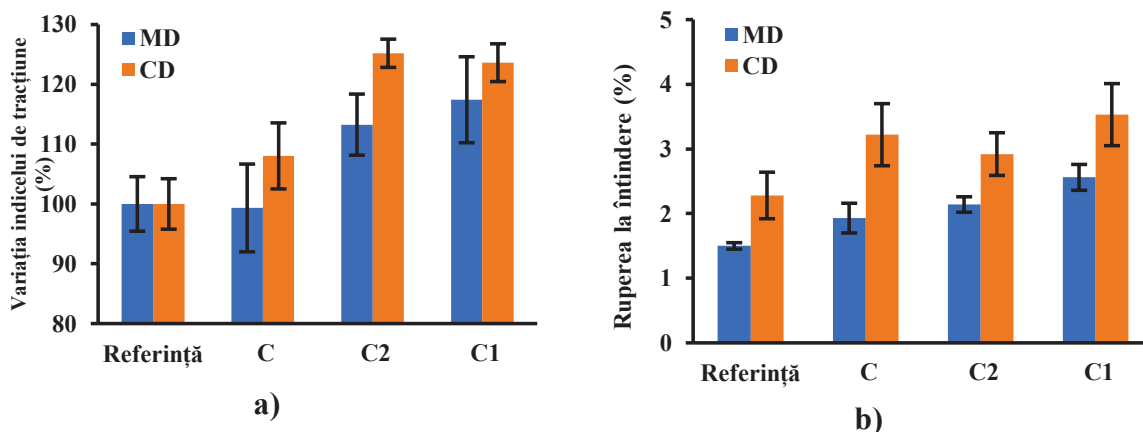


Figura 4.6. a) variația indicelui de tracțiune (TI) și b) deformarea la întindere a probelor de hârtie acoperite în comparație cu hârtia de referință

4.2.5. Proprietățile de barieră

Acoperirea hârtiei cu citril-imino-chitosan îi îmbunătățește semnificativ proprietățile de barieră împotriva apei și gazelor. Aceasta reduce adsorbția de apă (valoarea Cobb) (**Figura 4.8.**

a) și crește hidrofobicitatea (unghiul de contact), în special pe fața mai poroasă a hârtiei, prin umplerea porilor. În plus, acoperirea creează o barieră eficientă care scade viteza de transmisie a vaporilor de apă, ajutând la menținerea prospețimii produselor ambalate. Deși vâscozitatea redusă a soluției permite o penetrare mai profundă decât în cazul chitosanului și o ușoară creștere a permeabilității la aer (**Figura 4.9. a**), capacitatea de barieră a materialului rămâne adecvată pentru ambalaje.

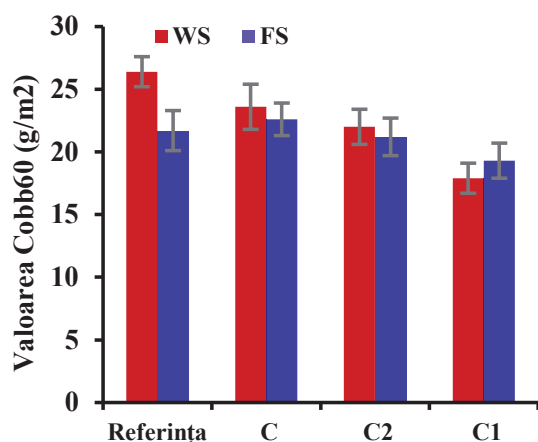


Figura 4.8. a) Capacitatea de adsorbție a apei feței de sârmă (WS-cea acoperită) și al feței de pâslă (FS) din probele acoperite cu soluțiile C, C1, C2

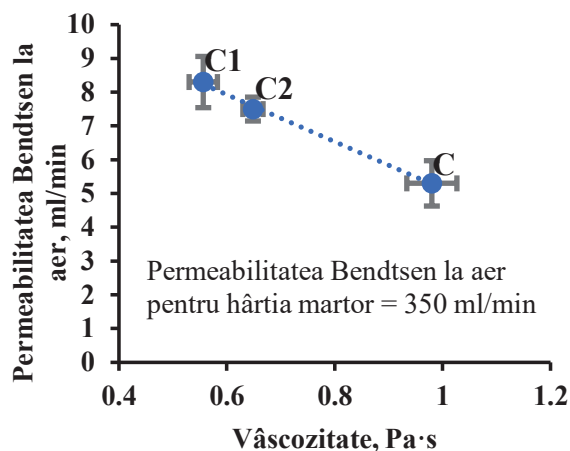
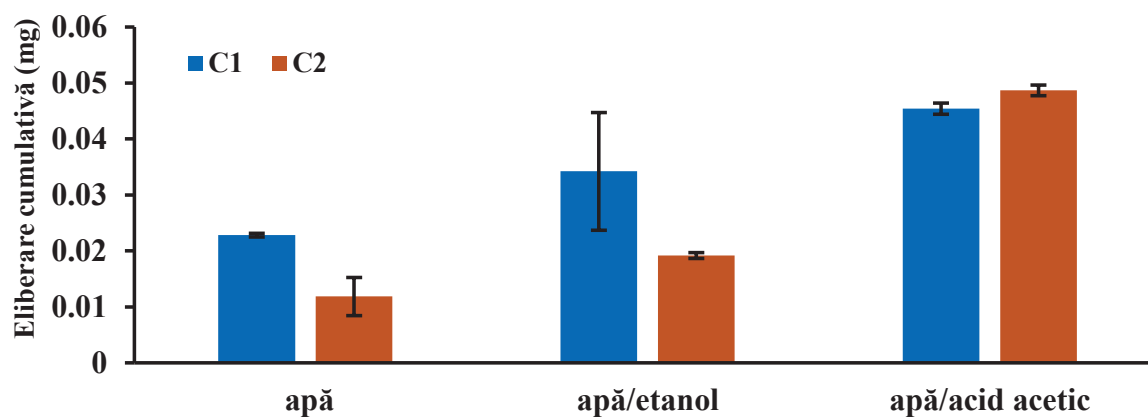


Figura 4.9. a) Relația dintre permeabilitatea la aer Bendsen a probelor de hârtie acoperite și vâscozitatea soluțiilor de acoperire

4.2.6. Conservarea alimentelor

4.2.6.1. Eliberarea citralului

Eliberarea citralului din hârtia acoperită, pe parcursul a 24 de ore, a fost studiată în soluții care reproduc medii alimentare: apă, etanol 50% și o soluție apoasă cu pH = 3,84 (caracteristică fructelor acide, precum zmeura) (**Figura 4.11.c**). Rezultatele au evidențiat că eliberarea a fost cea mai rapidă în mediul acid, datorită deplasării echilibrului de iminare spre reactanți, urmată de etanol, unde citralul prezintă o solubilitate mai ridicată, și în final de apă. În etanol și apă, cantitatea de citral eliberată a fost proporțională cu cantitatea inițială, în timp ce în mediul acid s-a remarcat o tendință inversă. Într-un experiment paralel, cu o singură prelevare la 24 h, nu s-au înregistrat diferențe statistice semnificative între probe, valorile fiind comparabile cu cele obținute cumulativ în experimentul precedent. Prin urmare, procesul de eliberare este unul dinamic, influențat de pH și de limita de solubilitate, adică de proprietățile mediului de eliberare.

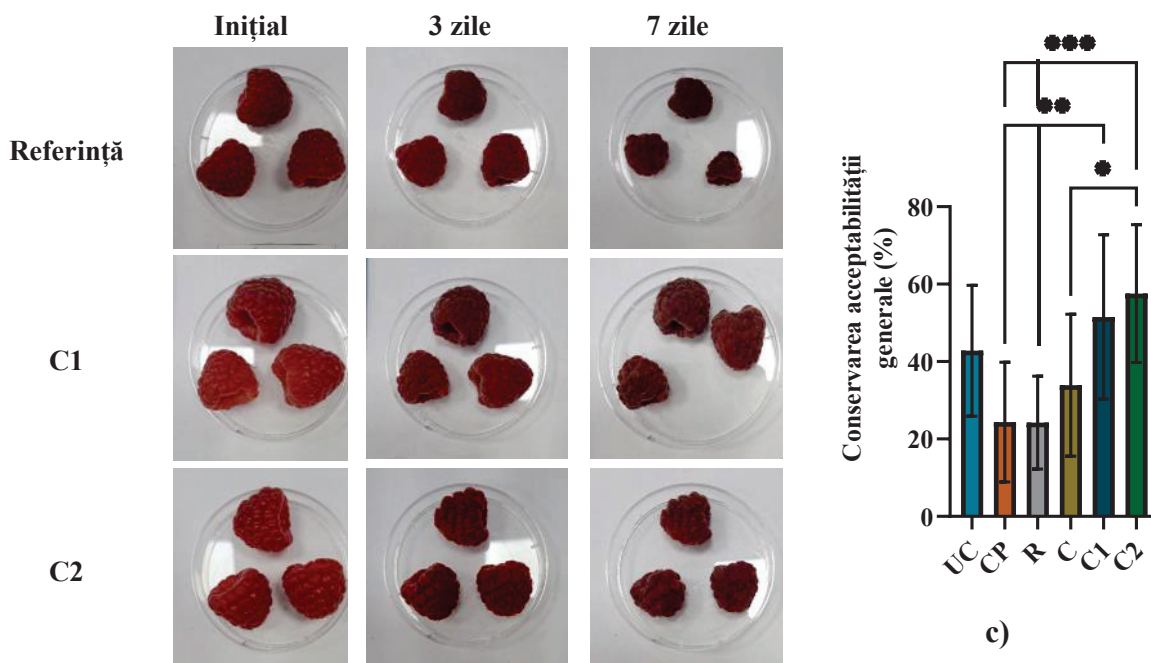


c)

Figura 4.11. Reprezentarea grafică a cantității de citral c) eliberată cumulativ din C1 și C2

4.2.6.2. Evaluarea vizuală și testul hedonic

Pentru a evalua potențialul hârtiei acoperite de a prelungi termenul de valabilitate al alimentelor a fost selectat ca aliment model zmeura din cauza perisabilității și susceptibilității ei la contaminarea cu mușegai. Pe parcursul celor 7 zile de experiment s-a observat vizual o conservare mult mai bună a zmeurei acoperite cu hârtie impregnată cu citril-imino-chitosan. Această observație a fost susținută și de rezultatele testului hedonic, care au prezentat scoruri mai mari pentru toate cele cinci criterii: aspect, culoare, aromă, textură și acceptabilitate generală (Figura 4.12.).



c)

Figura 4.12. Imagini reprezentative ale fructelor pe parcursul celor 7 zile de experiment și c) Reprezentarea grafică a conservării acceptabilității generale (UC: neacoperit; CP: ambalaj comercial; R: referință) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

4.2.6.3. Culoarea

Valorile indicelui diferenței de culoare (ΔE) au indicat că fructele acoperite au avut o degradare cromatică mult mai lentă ($\Delta E \sim 6,5$) comparativ cu grupul martor neacoperit ($\Delta E \sim 11$), confirmând efectul protector al acoperirii. Deși toate probele au prezentat o degradare a culorii în timp, totuși acoperirile au încetinit semnificativ acest proces.

4.2.6.4. Fermitatea

În comparație cu ambalajul comercial, fructele acoperite cu hârtie impregnată au prezentat o fermitate mai mare. Cele mai bune rezultate au fost obținute pe fructele acoperite cu eșantionul **C2**, care au necesitat o forță medie de 6 N pentru a fi comprimate. Diferența nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic față de fructele acoperite cu ambalajul comercial care au necesitat aplicarea unei forțe de 4 N (**Figura 4.13.**).

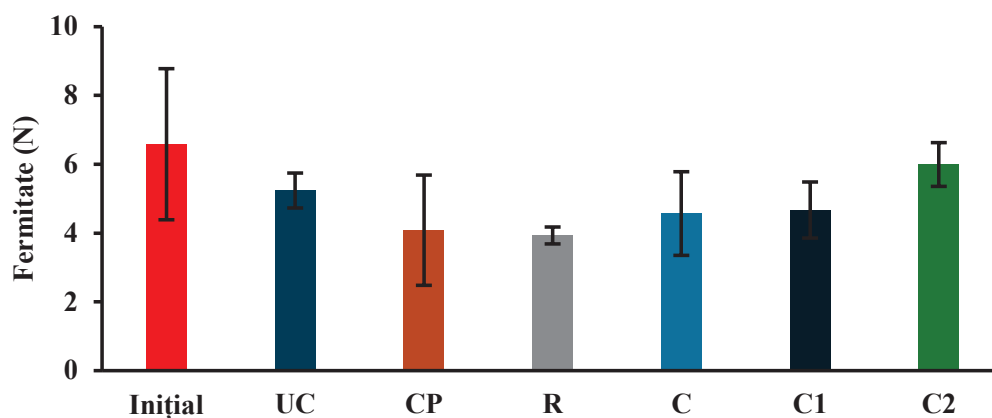


Figura 4.13. Reprezentarea fermității fructelor (UC: neacoperit; CP: ambalaj comercial; R: referință)

4.2.6.5. Proprietățile antimicrobiene

Pentru a consuma fructe în siguranță, este esențială absența microorganismelor. Ambalajul cu film de chitosan a creat o barieră eficientă împotriva agenților patogeni, iar adăugarea de citral a dublat această eficiență de inhibiție (**Tabel 4.5. și Figura 4.14.**).

Tabelul 4.5. Valorile medii ale numărului de bacterii mezofile viabile și ale drojdiilor/mucegaiurilor ($\log \text{CFU g}^{-1}$) din zmeură după 7 zile de incubare

Probe	Bacterii	Drojdiile/Mucegaiuri
Neacoperit	6,45 ± 0,03	5,91 ± 0,02
Ambalaj comercial	6,06 ± 0,04	5,76 ± 0,04
Referință	6,30 ± 0,03	5,85 ± 0,02
C	5,76 ± 0,01	5,80 ± 0,02
C1	5,02 ± 0,03	5,35 ± 0,04
C2	4,74 ± 0,04	4,84 ± 0,04

Acest efect a fost vizibil și în cazul drojdiilor și mucegaiurilor, unde numărul de tulpini viabile a scăzut semnificativ în cazul probei C2 față de ambalajului comercial, demonstrând o protecție superioară.

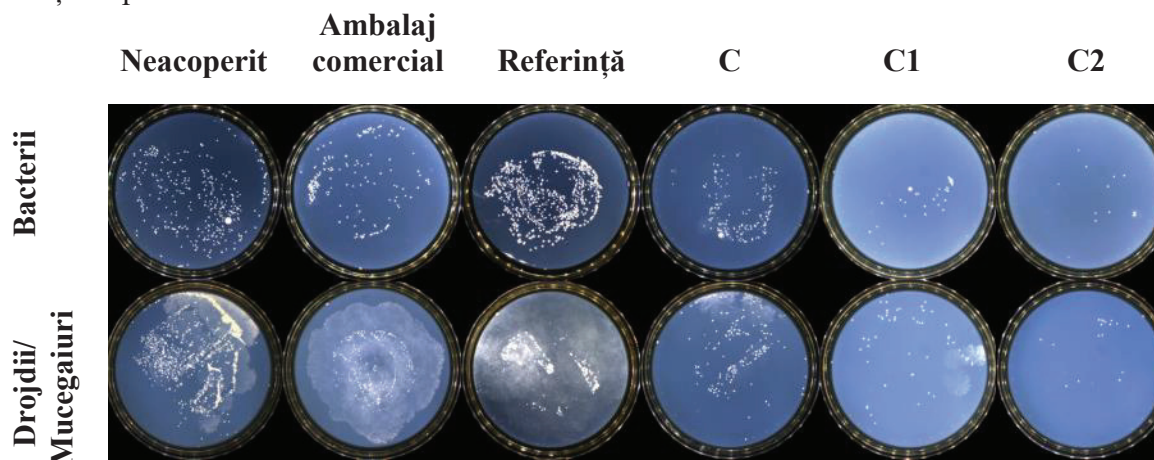


Figura 4.14. Încărcarea microbiologică a zmeurei după 7 zile de depozitare.

Teza de doctorat intitulată „**Dezvoltare de materiale multifunctionale pe bază de derivați iminici de chitosan**” are 178 pagini împărțite în **5** capitole care includ 14 tabele, 56 figuri, 7 scheme și 401 note bibliografice. Teza a fost structurată în două părți, un studiu de literatură care este reprezentat de Capitolul 1 și partea de contribuții personale (Capitolele 2-5). Teza se încheie cu o serie de concluzii generale.

Rezultatele originale sunt prezentate în trei capitole și vizează:

- Sinteza și caracterizarea de noi hidrogeluri pe bază de imino-chitosan pentru aplicații biomedicale
- Obținerea și caracterizarea unor serii de nanofibre funcționalizate cu citral și acid 2-formilfenilboronic
- Sinteza și caracterizarea unor noi ambalaje ecologice alimentare pe bază de derivați iminici de chitosan

Pe baza studiilor efectuate, au fost desprinse următoarele concluzii generale:

Capitolul 2. Hidrogeluri pe bază de imino-chitosan pentru aplicații biomedicale

➤ Sinteza și caracterizarea unui nou hidrogel pe bază de chitosan și acid 2-formilfenilboronic

- A fost obținut un hidrogel printr-o procedură ce implică reacția de condensare acidă a grupărilor amino ale chitosanului (Ch) cu gruparea formil a acidului 2-formilfenilboronic (2-FPBA) în apă. Starea de hidrogel a fost confirmată prin testul tubului inversat.
- Spectrele ^1H -RMN au indicat stabilirea unui echilibru de iminare în timpul hidrogelării, cu prezența deplasărilor chimice specifice protonilor iminei și ai aldehydei. Gradul de conversie al aldehydei în imină a crescut de la 18,9% în primele minute la 26,1% după o oră, în concordanță cu deplasarea echilibrului de iminare către produși în timpul hidrogelării.
- Spectrul FTIR al hidrogelului liofilizat a confirmat apariția benzii de absorbție caracteristice legăturii imină la 1628 cm^{-1} demonstrând succesul reacției de iminare. Au fost observate modificări spectrale în domeniul legăturilor de hidrogen, în conformitate cu formarea de interacțiuni intermoleculare între 2-FPBA și chitosan, precum și interacțiuni intramoleculare formate de către derivatul iminic de chitosan.
- Imaginile de microscopie în lumină polarizată au indicat birefringență puternică cu o textură în formă de benzi, caracteristică arhitecturilor supramoleculare stratificate formate prin segregarea hidrofob/hidrofilă a unităților imino în clusteri ordonați cu rol de noduri de reticulare.

- Evaluarea biocompatibilității *in vitro* a hidrogelului, pe fibroblaste dermice umane normale (NHDF) a relevat o viabilitate celulară de peste 70% pentru un conținut al 2-FPBA mai mic de 0,284%, indicând faptul că hidrogelul poate fi utilizat în siguranță ca dispozitiv biomedical.
- Hidrogelul a demonstrat activitate antimicrobiană puternică, inhibând agenți patogeni relevanți: *S. Aureus*, *E. coli* și *C. Albicans*, pentru concentrații ale 2-FPBA la care hidrogelul este citocompatibil. Astfel, pentru concentrația de 0,142% 2-FPBA, hidrogelul a redus semnificativ încărcătura de *C. albicans* în 24 de ore (99,999%), această eficacitate fiind atribuită reversibilității legăturii iminice care permite o acțiune continuă împotriva patogenilor.
- Evaluarea degradării enzimaticice în condiții care mimează evoluția pH-ului exsudatului rănilor pe parcursul vindecării a evidențiat potențialul hidrogelului de a funcționa ca unguent resorbabil, evitând astfel debridarea traumatică și susținând regenerarea țesutului fără cicatrici.
- A fost observat că la pH fiziologic (7,4), pierderea de masă a hidrogelului este moderată (32%), dar crește la 45% la pH alcalin (8,5-9) specific exsudatului rănilor în primele ore de la producere, favorizând o biodegradare mai rapidă și eliberarea aldehidei antimicrobiene pentru protecția împotriva infecțiilor. Degradarea crește ușor la creșterea concentrației de lizozimă la un nivel caracteristic exsudatului din țesuturile infectate și accelerează la pH acid, specific pielii (pH= 5,5), biodegradarea totală a hidrogelului fiind atinsă în două zile.
- Investigarea morfologiei hidrogelului în etape diferite ale biodegradării a confirmat influența drastică a prezenței lizozimei și a pH-ului mediului: (i) la pH ridicat (9,5–10), hidrogelul suferă o degradare accentuată dar păstrează o structură poroasă, (ii) la pH scăzut (5,5) degradarea masivă conduce la o structură fibroasă, ideală pentru regenerarea țesuturilor, în timp ce (iii) în absența enzimelor, porii colapsează, reflectând o degradare parțială și o eliberare limitată a aldehidei.

➤ **Reticularea chitosanului cu amestecuri de monoaldehide bioactive**

- O serie de 15 hidrogeluri hibride au fost sintetizate prin reacția de condensare acidă între chitosan și un amestec echimolar de două aldehide (salicilaldehidă, 4-hidroxibenzaldehidă, vanilină, piperonal, aldehidă boronică și citral), pentru un raport molar 2:1 între unitățile de glucozamină și formil. În condiții similare, au fost obținute cinci hidrogeluri martor prin reacția chitosanului cu monoaldehidele.
- Atribuirea preliminară a formării hidrogelurilor a fost realizată prin testul tubului inversat, care a permis reevaluarea protocoalelor de lucru pentru cazurile în care gelifierea nu a avut loc. Specific, în cazurile utilizării 4-hidroxibenzaldehidei și vanilinei și a unor amestecuri ale acestora, concentrația de chitosan a fost crescută de la 2% la 3% pentru a obține solide moi care indică formarea de hidrogel.
- Spectrele FTIR au confirmat formarea legăturilor imină, prin prezența benzilor specifice în proximitatea valorii 1630 cm^{-1} . În cazul hidrogelurilor hibride, a fost observată suprapunerea benzilor specifice celor două grupări imină, confirmând contribuția ambelor aldehide la procesul

hidrogelării. De asemenea, au fost observate modificări în domeniile spectrale corespunzătoare grupărilor amino și hidroxil, reflectând schimbări în structura supramoleculară.

- Analiza $^1\text{H-NMR}$ a confirmat natura dinamică a hidrogelurilor, datorată reversibilității formării legăturii imină. Hidrogelurile cu 2% chitosan au prezentat un raport imină/aldehidă și un grad de iminare crescute, semnătură a unei rețele chimice consolidate, în timp ce hidrogelurile cu 3% chitosan au indicat un raport imină/aldehidă și un grad de iminare scăzute, indicativ al unei gelifieri preponderent fizice. Sistemele hibride au demonstrat un efect sinergic în deplasarea echilibrului de iminare către produși.
- Difrakția de raze X a evidențiat apariția unei reflexii la unghi mic, corespunzător periodicității unor distanțe mari, caracteristice autoorganizării stratificate a unităților imină pe lanțurile de chitosan, în clusteri ordonați. În difractogramele hidrogelurilor hibride, aceste reflexii apar la valori intermediare celor din hidrogelurile de referință, sugerând o asamblare comună a iminelor, dominată de aldehida cu cea mai mare reactivitate și stabilitate.
- Morfologia xerogelurilor martor a evidențiat o rețea poroasă, cu arhitectură fragmentată în cazul celor generate de 4-hidroxibenzaldehidă și vanilină. Prin comparație, hidrogelurile hibride au prezentat o morfologie poroasă distinctă, cu goluri în structura pereților porilor, caracteristică morfologică ce sugerează formarea unei rețele secundare, asemănător formării rețelelor interpenetrate.
- Starea de hidrogel a fost confirmată de analiza reologică, care a demonstrat valori ale modulului elastic mai mari decât cele ale modulului plastic pentru majoritatea sistemelor studiate. Studiile reologice au evidențiat de asemenea influența gradului de iminare asupra proprietăților viscoelastice, indicând faptul că natura chimică și interacțiunile fizice ale aldehidelor co-reticulate joacă un rol determinant în stabilirea stării gelului și în modularea comportamentului tixotrop.
- Eliberarea aldehidelor din hidrogeluri, monitorizată prin analiza UV-Vis, a arătat o eliberare inițială rapidă în primele 8 ore, dependentă de gradul de iminare: o eliberare mai accentuată pentru sistemele cu un grad scăzut de iminare, în acord cu prezența unei cantități mari de aldehidă liberă, și o eliberare mai lentă pentru hidrogelurile cu grad ridicat de iminare.
- Hidrogelurile hibride au prezentat o degradare accelerată comparativ cu hidrogelurile de referință, cu o pierdere de masă de până la 85% în 21 de zile. Acest comportament a fost corelat cu formarea de clusteri ordonați hibridi, cu defecte de structură, mai susceptibili infiltrării mediului lichid.
- Hidrogelurile au prezentat activitate antioxidantă, cu o capacitate de inhibare a radicalilor liberi de până la 70%, și o îmbunătățire proporțională cu activitatea aldehidelor reticulante.
- Majoritatea hidrogelurilor au prezentat proprietăți antimicrobiene remarcabile, corelate cu activitatea aldehidelor constitutive. Astfel, sistemele obținute din aldehide cu activitate complementară au condus la hidrogeluri cu spectru larg de acțiune.

- Testul MTS a indicat că, cu excepția a 4 hidrogeluri, sistemele studiate nu au afectat viabilitatea celulelor fibroblaste, menținând valori ale citocompatibilității mai mari de 70%, în concordanță cu standardul aplicat dispozitivelor biomedicale. Mai mult, imaginile obținute prin microscopie optică au confirmat că majoritatea celulelor și-au menținut forma alungită și morfologia fără modificări semnificative, susținând datele testului MTS și potențialul ridicat pentru aplicații ce implică contact direct cu țesuturile vii. Totuși, lipsa unei corelații clare a gradului de viabilitate celulară cu structura chimică sau gradul de iminare a hidrogelurilor, fac necesară reluarea acestei investigații.

Capitolul 3. Nanofibre funcționalizate cu citral și aldehydă boronică

- Pentru obținerea de biomateriale multifuncționale, au fost preparate fibre de chitosan funcționalizate printr-un proces în trei etape: electrofilarea fibrelor Ch/PEO, îndepărtarea PEO-ului pentru obținerea fibrelor pure de chitosan și funcționalizarea acestora prin reacția de iminare cu un amestec de 2-FPBA și citral în diferite rapoarte molare.
- Spectrele FTIR au demonstrat că funcționalizarea la suprafață a fibrelor a condus la formarea de unități imină în cazul ambelor aldehide (citral și 2-FPBA), evidențiate prin benzi de vibrație caracteristice la 1646 cm^{-1} (citral) și 1634 cm^{-1} (2-FPBA). Modificările spectrale în domeniul $3680 - 3000\text{ cm}^{-1}$ au indicat schimbări ale rețelei legăturilor de hidrogen, prin formarea de legături noi, atât intermoleculare cât și intramoleculare.
- Randamentul reacției de iminare cu 2-FPBA la suprafața fibrelor este influențat atât de concentrația reactantului cât și de prezența citralului, care prezintă o reactivitate superioară și conduce la o inhibare a iminării cu 2-FPBA prin colmatarea suprafeței.
- Studiul de eliberare UV-Vis a evidențiat o eliberare semnificativ mai rapidă a 2-FPBA comparativ cu citralul, datorită caracterului său hidrofil. Eliberarea s-a desfășurat în două etape și profilul de eliberare a fost în strânsă interdependență cu gradul de iminare, fără să fie afectat semnificativ de prezența citralului. Rezultatele sugerează că echilibrul de iminare poate fi deplasat spre reactanți sub acțiunea unor stimuli externi.
- Microscopia optică în lumină polarizată a arătat birefrință pentru toate fibrele, înainte și după funcționalizare, în concordanță cu alinierea lanțurilor de chitosan în timpul electrofilării, conducând la un grad de cristalinitate și, în consecință, proprietăți mecanice bune.
- Toate probele au prezentat o umflare inițială rapidă, urmată de o ușoară scădere a gradului de umflare la echilibru corespunzătoare eliberării de aldehydă și dizolvării chitosanului, și apoi de stabilizarea acestuia la valori cuprinse în intervalul $12 - 27\text{ g/g}$ pe parcursul investigației timp de 14 zile. Acest comportament arată pe de o parte capacitatea fibrelor de a adsorbi lichid, cum este exsudatul din răni, și pe de altă parte posibilitatea de a transporta agenți bioactivi, aspecte importante în designul pansamentelor pentru tratarea rănilor.

- Biodegradarea enzimatică a prezentat un trend invers proporțional cu conținutul de citral hidrofof: fibrele cu citral au prezentat pierderi de masă reduse, sugerând că acesta inhibă acțiunea lizozimei prin interacțiune directă sau ecranare structurală.
- Testarea citotoxicității fibrelor pe linia celulară NHDF, a arătat viabilitate celulară peste pragul de biosiguranță (>70%), conform standardului ISO 10993-5, confirmând potențialul lor pentru aplicații biomedicale în contact cu țesuturile vii.
- Fibrele funcționalizate cu 2-FPBA și citral au demonstrat activitate antifungică și antibiofilm, în special împotriva *A. brasiliensis*, sugerând un posibil efect sinergic al celor două aldehide. Lipsa formării biofilmului indică potențialul acestor materiale de a acționa ca barieră fizică în prevenirea infectării plăgilor.

Capitolul 4. Ambalaje ecologice alimentare pe bază de derivați iminici de chitosan

- Pentru a evalua influența chitosanului funcționalizat cu citral asupra proprietăților hârtiei, au fost acoperite eșantioane de hârtie comercială albă kraft cu două soluții de citril-iminochitosan și cu o soluție de chitosan, folosită ca martor. Soluțiile de citril-iminochitosan utilizate pentru acoperire au fost obținute prin reacția de condensare acidă a chitosanului cu citral în rapoarte molare diferite ale unităților glucozamină/aldehidă, și anume 1/1 și 2/1.
- Obținerea derivaților de citril-iminochitosan a fost dovedită de spectrele FTIR prin apariția benzii specifice legăturii imină la 1641 cm^{-1} .
- Hârtia acoperită a prezentat o suprafață mai netedă, cu porii interfibrilari umpluți, indicând că soluția de acoperire, de chitosan sau derivat iminic de chitosan, a pătruns între fibrele de celuloză de pe suprafața hârtiei. Diferențele de uniformitate observate între probe se explică prin variațiile de vâscozitate ale soluțiilor aplicate și posibila infiltrare a aerului în pori.
- Observarea probelor sub lumină polarizată, a evidențiat că birefringența intensă a hârtiei neacoperite, specifică fibrelor de celuloză, a fost diminuată prin acoperirea cu chitosan și intensificată prin acoperirea cu citril-iminochitosan. Această observație este în concordanță cu capacitatea de autoasamblare prin segregare hidrofof/hidrofilă a derivatului iminic și sugerează o reticulare fizică a lanțurilor de chitosan ancorate pe fibrele de celuloză prin legături de hidrogen și unități imină, formând o peliculă semicristalină subțire și contribuind la o consolidare mai bună a hârtiei.
- Acoperirea hârtiei nu a afectat semnificativ stabilitate termică a acesteia, temperatura maximă de degradare fiind foarte puțin deplasată către valori mai ridicate, datorită reticulării.
- Acoperirea hârtiei cu chitosan sau citril-iminochitosan a îmbunătățit semnificativ proprietățile mecanice, crescând rezistența la tracțiune, alungirea și flexibilitatea, prin optimizarea aderenței interfaciale și a interacțiunilor intermoleculare între fibrele de celuloză și stratul de acoperire.

- Indicele de absorbție a energiei de tracțiune (TEA) a crescut substanțial, la valori duble față de hârtia referință, indicând o rezistență îmbunătățită la solicitări repetate, importantă pentru ambalaje.
- Acoperirea hârtiei cu citril-iminohitosan a determinat o creștere semnificativă a rezistenței la plesnire, cu aproximativ 50%, depășind performanța chitosanului simplu, atribuită vâscozității reduse și reticulării eficiente induse de citral.
- Acoperirea cu chitosan și citril-iminohitosan a condus la creșteri semnificative ale rezistenței la îndoire (150–350% față de 100%), datorită formării legăturilor de hidrogen și interacțiunilor intermoleculare suplimentare, favorizate de structura citril-iminică.
- Acoperirea cu citril-iminohitosan a redus semnificativ adsorbția de apă (de la 22-26 g/m² la 17-19 g/m²), datorită umplerii porilor de suprafață și caracterului hidrofob conferit de citral.
- Acoperirea a crescut semnificativ hidrofobicitatea suprafeței, cu o creștere a unghiului de contact cu apa de la 110° la 121°. Acest lucru se datorează umplerii porilor cu chitosan și lanțuri hidrofobe de citril-iminici, precum și reorientării structurii moleculare care direcționează lanțurile hidrofobe către exterior.
- Acoperirea a redus semnificativ viteza de transmisie a vaporilor de apă, de la 400 – 270 g/m² la 170-150 g/m² datorită caracterului hidrofob al acoperirilor de citril-iminohitosan, aspect promițător pentru conservarea bună a alimentelor prin reducerea transferului de umiditate.
- Experimente de eliberare *in vitro* a citralului au demonstrat influența semnificativă a pH-ului mediului și solubilității citralului: în mediu acid, eliberarea este mai rapidă datorită deplasării echilibrului reacției de iminare spre reactanți, iar în etanol, eliberarea este superioară celei în apă datorită solubilității mai bune a citralului. Astfel, eliberarea este un proces dinamic, menținută prin îndepărtarea continuă a citralului din mediul de eliberare.
- Materialele obținute au fost evaluate pentru a stabili capacitatea lor de a extinde termenul de valabilitate al alimentelor, alegând pentru acest studiu zmeura ca fruct model. S-a stabilit că prezența citralului a contribuit la stabilitatea culorii prin reducerea proceselor de brunificare și degradare. De asemenea, acoperirile au încetinit deshidratarea și acumularea de antociani, întârziind coacerea și deteriorarea, și atenuând îngălbenirea/brunificarea.
- Fructele acoperite cu hârtie impregnată au prezentat o fermitate mai mare comparativ cu ambalajul comercial. Proba cu cel mai scăzut conținut de citral a fost cea mai eficientă în păstrarea fermității fructelor.
- Acoperirea fructelor a creat o barieră împotriva contaminării cu agenți patogeni prin creșterea activității antipatogene de până la aproximativ două ori, în cazul prezenței citralului.

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

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. **R. Lungu**, A. Anisie, I. Rosca, A.I. Sandu, D. Ailincăi, L. Marin, *Double functionalization of chitosan based nanofibers towards biomaterials for wound healing*, *Reactive and Functional Polymers*, 167, 105028, **2021**, <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105028> **F.I.2024= 5,1**
2. **R. Lungu**, M. A. Paun, D. Peptanariu, D. Ailincăi, L. Marin, M. V. Nichita, V. P. Paun, *Biocompatible Chitosan-Based Hydrogels for Bioabsorbable Wound Dressings*, *Gels*, 8(2), 107, **2022**, <https://doi.org/10.3390/gels8020107> **F.I.2024= 5,3**
3. L. Marin, B. I. Andreica, D. Ailincăi, A. Anisie, **R. Lungu**, *Chitosan: a critical review on structural characteristics – properties relationship*, *Cellulose Chemistry and Technology*, 59 (7-8), 747-759, **2025**, **F.I.2024= 1,1**
4. **R. Lungu**, F. Ciolacu, L. Marin, I. Spiridon, *Chitosan-Citral Coated Paper: A Simple and Sustainable Approach to Eco-Friendly Food Packaging*, *Cellulose*, **2025**, **F.I.2024= 4,8**, în evaluare.
5. M. Iftime, **R. Lungu**, D. Bejan, S. Shova, *The impact of supramolecular ordering on the thermotropic behavior of asymmetrical azomethine liquid crystals*, *Crystal Growth & Design*, **2025**, **F.I.2024= 3,4** în evaluare.

Lucrări proceeding

1. **R. Lungu**, A. Anisie, I. Rosca, A.I. Sandu, D. Ailincăi, L. Marin, *Double-functionalized chitosan nanofibers for wound healing*, *Progres in Organic and Macromolecular Compounds Proceedings*, 7-9 octombrie, MacroIasi, **2021**.

Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:

1. „Pansamente pentru vindecare inteligenta a rănilor” (SWORD), PN-III-P3-3.6-H2020-2020-0138, nr. 47/2021, membru, **2021**.

Participări la sesiuni științifice naționale și internaționale:

Comunicări orale

1. **R. Lungu**, D. Ailincăi, L. Marin, *pH influence on the biodegradation of chitosan based hydrogels*, *International Congress of the "Apollonia" University of Iași „Preparing for the future by promoting excellence”*, Iași, 29 februarie – 3 martie, **2024**.
2. **R. Lungu**, D. Ailincăi, L. Marin, *An experimental study on chitosan-based hydrogels biodegradation for wound healing*, *International Conference Chimia 2024 „New trends in applied chemistry”*, Constanta, 30 mai – 1 iunie, **2024**.
3. **R. Lungu**, D. Ailincăi, L. Marin, *Iminoboronate chitosan hydrogels for bioapplications: synthesis and characterization*, *"Chemistry - open frontier to knowledge"*, ediția XV, Iași, 27 iunie, **2024**.
4. **R. Lungu**, A. Anisie, I. Rosca, A.I. Sandu, D. Ailincăi, L. Marin, *Chitosan nanofibers for wound dressings*, *International Congress of the "Apollonia" University of Iași „Preparing for the future by promoting excellence”*, ediția XXXV, Iași, 27 februarie – 1 martie, **2025**.

Prezentare de postere

1. **R. Lungu**, A. Anisie, I. Rosca, A.I. Sandu, D. Ailincăi, L. Marin, Double-functionalized chitosan nanofibers for wound healing, *Progres in Organic and Macromolecular Compounds*, MacroIasi, 7-9 octombrie, **2021**.
2. **R. Lungu**, L. Marin, I. Spiridon, F. Ciolacu, *Chitosan citryl imine derivatives used as coatings for food packaging*, International Congress of the "Apollonia" University of Iași „Preparing for the future by promoting excellence”, Iasi, 29 februarie – 3 martie, **2024**.
3. **R. Lungu**, L. Marin, I. Spiridon, F. Ciolacu, *Coating formulations based on imine chitosan derivatives used in food packaging*, International Conference Chimia 2024 „New trends in applied chemistry”, Constanta, 30 mai – 1 iunie, **2024**.
4. **R. Lungu**, L. Marin, I. Spiridon, F. Ciolacu, *New eco-friendly food packaging based on imine-chitosan derivatives*, "Chemistry - an open frontier to knowledge", ediția 15, Iasi, 27 iunie, **2024**.
5. **R. Lungu**, A. Anisie, I. Rosca, A.I. Sandu, D. Ailincăi, L. Marin, Design of biocompatible chitosan nanofibers for wound healing, IasiCHEM 2024 Conference, ediția 6t, Iasi, 31 octombrie - 1 noiembrie, **2024**.
6. **R. Lungu**, A. Anisie, I. Rosca, A.I. Sandu, D. Ailincăi, L. Marin, Modified chitosan nanofibers for bioabsorbable wounds dressing, Open door to the future scientific communications of young researchers, ediția 5, MacroYouth, 15 noiembrie, **2024**.

Bibliografie selectivă

- [1] G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M.T. Longaker, Wound repair and regeneration, *Nature* 453 (2008) 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>.
- [2] A. Shpichka, D. Butnaru, E.A. Bezrukov, R.B. Sukhanov, A. Atala, V. Burdukovskii, Y. Zhang, P. Timashev, Skin tissue regeneration for burn injury, *Stem Cell Res Ther* 10 (2019) 94. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1203-3>.
- [3] A.H. Hall, L. Mathieu, H.I. Maibach, Acute chemical skin injuries in the United States: a review, *Crit Rev Toxicol* 48 (2018) 540–554. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1493085>.
- [4] O. Yazarlu, M. Iranshahi, H.R.K. Kashani, S. Reshadat, S. Habtemariam, M. Iranshahy, M. Hasanpour, Perspective on the application of medicinal plants and natural products in wound healing: A mechanistic review, *Pharmacol Res* 174 (2021) 105841. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105841>.
- [5] P. Ghandforoushan, N. Golafshan, F. Babu Kadumudi, M. Castilho, A. Dolatshahi-Pirouz, G. Orive, Injectable and adhesive hydrogels for dealing with wounds, *Expert Opin Biol Ther* 22 (2022) 519–533. <https://doi.org/10.1080/14712598.2022.2008353>.
- [6] A. Anisie, F. Oancea, L. Marin, Electrospinning of chitosan-based nanofibers: from design to prospective applications, *Reviews in Chemical Engineering* 39 (2023) 31–70. <https://doi.org/10.1515/revce-2021-0003>.
- [7] M.S. Kamińska, A.M. Cybulska, K. Skonieczna-Żydecka, K. Augustyniuk, E. Grochans, B. Karakiewicz, Effectiveness of Hydrocolloid Dressings for Treating Pressure Ulcers in Adult Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Int J Environ Res Public Health* 17 (2020) 7881. <https://doi.org/10.3390/ijerph17217881>.
- [8] H. Liu, C. Wang, C. Li, Y. Qin, Z. Wang, F. Yang, Z. Li, J. Wang, A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing, *RSC Adv* 8 (2018) 7533–7549. <https://doi.org/10.1039/C7RA13510F>.
- [9] S. Alven, B.A. Aderibigbe, Chitosan and Cellulose-Based Hydrogels for Wound Management, *Int J Mol Sci* 21 (2020) 9656. <https://doi.org/10.3390/ijms21249656>.
- [10] R. Golmohammadi, S. Najar-Peerayeh, T. Tohidi Moghadam, S.M.J. Hosseini, Synergistic Antibacterial Activity and Wound Healing Properties of Selenium-Chitosan-Mupirocin Nanohybrid System: An in Vivo Study on Rat Diabetic Staphylococcus aureus Wound Infection Model, *Sci Rep* 10 (2020) 2854. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59510-5>.
- [11] S. Ono, R. Imai, Y. Ida, D. Shibata, T. Komiya, H. Matsumura, Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns, *Burns* 41 (2015) 820–824. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.10.023>.
- [12] A. Anisie, I. Rosca, A.-I. Sandu, A. Bele, X. Cheng, L. Marin, Imination of Microporous Chitosan Fibers - A Route to Biomaterials with “On Demand” Antimicrobial Activity and Biodegradation for Wound Dressings, *Pharmaceutics* 14 (2022) 117. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010117>.

- [13] L. Marin, M. Popa, A. Anisie, S.-A. Irimiciuc, M. Agop, T.-C. Petrescu, D. Vasincu, L. Himiniuc, A Theoretical Model for Release Dynamics of an Antifungal Agent Covalently Bonded to the Chitosan, *Molecules* 26 (2021) 2089. <https://doi.org/10.3390/molecules26072089>.
- [14] M.-M. Iftime, S. Morariu, L. Marin, Salicyl-imine-chitosan hydrogels: Supramolecular architecturing as a crosslinking method toward multifunctional hydrogels, *Carbohydr Polym* 165 (2017) 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.027>.
- [15] B.-I. Andreica, D. Ailincăi, A.-I. Sandu, L. Marin, Amphiphilic chitosan-g-poly(trimethylene carbonate) – A new approach for biomaterials design, *Int J Biol Macromol* 193 (2021) 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.174>.
- [16] L. Marin, D. Ailincăi, M. Mares, E. Paslaru, M. Cristea, V. Nica, B.C. Simionescu, Imino-chitosan biopolymeric films. Obtaining, self-assembling, surface and antimicrobial properties, *Carbohydr Polym* 117 (2015) 762–770. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.050>.
- [17] F. Hong, P. Qiu, Y. Wang, P. Ren, J. Liu, J. Zhao, D. Gou, Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review, *Food Chem X* 21 (2024) 101095. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101095>.
- [18] D. Ailincăi, L. Mititelu-Tartau, L. Marin, Citryl-imine-PEG-ylated chitosan hydrogels – Promising materials for drug delivery applications, *Int J Biol Macromol* 162 (2020) 1323–1337. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.218>.
- [19] K. Sharma, S. Guleria, V.K. Razdan, V. Babu, Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds, *Ind Crops Prod* 154 (2020) 112569. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112569>.
- [20] D. Ailincăi, L. Marin, S. Morariu, M. Mares, A.-C. Bostanaru, M. Pinteala, B.C. Simionescu, M. Barboiu, Dual crosslinked iminoboronate-chitosan hydrogels with strong antifungal activity against *Candida* planktonic yeasts and biofilms, *Carbohydr Polym* 152 (2016) 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.007>.
- [21] L. Martinengo, M. Olsson, R. Bajpai, M. Soljak, Z. Upton, A. Schmidtchen, J. Car, K. Järbrink, Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies, *Ann Epidemiol* 29 (2019) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.10.005>.
- [22] A.S. Ribeiro, S.M. Costa, D.P. Ferreira, R.C. Calhelha, L. Barros, D. Stojković, M. Soković, I.C.F.R. Ferreira, R. Figueiro, Chitosan/nanocellulose electrospun fibers with enhanced antibacterial and antifungal activity for wound dressing applications, *React Funct Polym* 159 (2021) 104808. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104808>.
- [23] A. Anisie, B.-I. Andreica, L. Mititelu-Tartau, C.G. Coman, R. Bilyy, G. Bila, I. Rosca, A.-I. Sandu, E. Amler, L. Marin, Biodegradable trimethyl chitosan nanofiber mats by electrospinning as bioabsorbable dressings for wound closure and healing, *Int J Biol Macromol* 249 (2023) 126056. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126056>.

- [24] The Commission Of The European Communities, Commission regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food, [https://Eur-Lex.Europa.Eu/LexUriServ/LexUriServ.Do?Uri=OJ:L:2009:135:0003:0011:EN:PDF](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?Uri=OJ:L:2009:135:0003:0011:EN:PDF) (2009).
- [25] A. Boonmahitthisud, C. Booranapunpong, C. Pattaradechakul, S. Tanpichai, Development of water-resistant paper using chitosan and plant-based wax extracted from banana leaves, *Int J Biol Macromol* 240 (2023) 124412. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124412>.
- [26] I. Yoplac, L. Vargas, P. Robert, A. Hidalgo, Characterization and antimicrobial activity of microencapsulated citral with dextrin by spray drying, *Heliyon* 7 (2021) e06737. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06737>.