



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

FORMULĂRI PE BAZĂ DE CHITOSAN PENTRU
ELIBERAREA CONTROLATĂ DE ANTIBIOTICE
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducători de doctorat:

CS I DR. HABIL. MARIN LUMINIȚA
PROF. DR. HABIL. MITITELU-TARȚĂU LILIANA

Student-doctorand:

FARM. PLATON VERA-MARIA

ACADEMIA ROMÂNĂ
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

Nr.

Doamnei/Domnului

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **09 decembrie 2025**, ora **11:00**, la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat *„Formulări pe bază de chitosan pentru eliberarea controlată de antibiotice”*, autor **Farm. Vera-Maria Platon**, în vederea acordării titlului științific de doctor.

PRESEDINTE: **CS I Dr. Habil. Marcela Mihai**
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

CONDUCĂTORI

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

Prof. Dr. Habil. Liliana Mititelu-Tarțău
Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa”, Iași

REFERENȚI: **Conf. Dr. Eliza Grațîela Popa**
Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa”, Iași

Prof. Dr. Habil. Leonard Ionuț Atanase
Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi”, Iași

CS II Dr. Alexandru Rotaru
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

Această teză este dedicată, cu inima plină de recunoștință, celor care m-au susținut necondiționat și au crezut în mine pe parcursul acestui drum plin de provocări și împliniri.

*În primul rând, doresc să îmi exprim profunda recunoștință față de conducătorul meu științific, **doamna Dr. Luminița Marin**, pentru ghidarea competentă și dedicația cu care mi-a împărtășit tainele cercetării academice și m-a susținut pe întregul parcurs al acestei lucrări. Aș dori să îi mulțumesc și **doamnei Dr. Liliana Mititelu-Tarțau**, pentru susținerea științifică, contribuind astfel la interdisciplinaritatea lucrării.*

*Adresez mulțumiri tuturor membrilor **comisiei** de susținere pentru interesul acordat activității mele și pentru prezența la acest eveniment marcant în parcursul meu personal și profesional.*

*Mulțumesc **Academiei Române** pentru oportunitatea oferită și pentru sprijinul financiar acordat pe durata stagiului doctoral. Alese mulțumiri adresez conducerii **Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași** pentru contribuția valoroasă în formarea mea ca cercetător.*

*Adresez recunoștința mea colegilor din **Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** pentru colaborarea armonioasă în întreaga activitate desfășurată. Aș dori să le mulțumesc în mod deosebit colegilor mei din cadrul **Laboratorului de Policondensare și Polimeri Termostabili** care au fost întotdeauna lângă mine cu ajutor, sfaturi și încurajări. Aș dori să mulțumesc de asemenea colegilor din departamentul **Intelcentru** pentru cooperare și disponibilitate în realizarea studiilor experimentale.*

În final, vreau să le mulțumesc celor mai apropiate persoane din viața mea. Adresez recunoștința mea deosebită familiei și prietenilor, fără de care realizarea acestei teze nu era posibilă. Doresc să mulțumesc părinților și mătușii mele, care m-au susținut necondiționat în toți acești ani, dar și prietenilor din copilărie și din facultate, pentru că au fost sursa mea de inspirație, de energie și de iubire.

Vă mulțumesc!

Cuprins

LISTĂ DE ABREVIERI	1
INTRODUCERE	3
CAPITOLUL I Formulări pe bază de chitosan pentru eliberarea controlată de antibiotice	7
I.1. Chitosan	7
I.1.1. Chitosanul ca biomaterial	7
I.1.2. Formulări curente pe bază de chitosan pentru eliberarea antibioticelor	13
I.1.2.1. Nanofibre pe bază de chitosan	13
I.1.2.2. Hidrogeluri pe bază de chitosan și derivați	17
I.1.2.3. Nanoparticule pe bază de chitosan	19
I.2. Eritromicină	22
I.2.1. Noțiuni generale.....	22
I.2.1.1. Relația structură chimică-activitate	22
I.2.1.2. Proprietăți fizico-chimice	23
I.2.1.3. Mecanism de acțiune	23
I.2.1.4. Indicații terapeutice și posologie	24
I.2.1.5. Proprietăți farmacocinetice	24
I.2.2. Limitări	25
I.2.2.1. Dezavantajele terapiei cu eritromicină	25
I.2.2.2. Mecanismul degradării în mediu acid al eritromicinei	29
I.2.2.3. Soluții existente pentru optimizarea tratamentului cu eritromicină	31
I.2.3. Formulări curente ale eritromicinei cu chitosan	32
I.2.3.1. Formulări ale eritromicinei sub formă de nanofibre	32
I.2.3.2. Formulări ale eritromicinei sub formă de membrane	33
I.2.3.3. Formulări ale eritromicinei sub formă de hidrogeluri.....	35
I.2.3.4. Formulări ale eritromicinei sub formă de nano-/microparticule	37
I.3. Norfloxacină	44
I.3.1. Noțiuni generale.....	44
I.3.1.1. Relație structură chimică-activitate	44
I.3.1.2. Proprietăți fizico-chimice	45
I.3.1.3. Mecanism de acțiune	45
I.3.1.4. Indicații terapeutice și posologie	45

I.3.1.5. Proprietăți farmacocinetice	46
I.3.2. Limitări	46
I.3.3. Formulări curente ale norfloxacinii cu chitosan	47
I.3.3.1. Formulări ale norfloxacinii sub formă de nanofibre	47
I.3.3.2. Formulări ale norfloxacinii sub formă de hidrogeluri	50
I.3.3.3. Formulări ale norfloxacinii sub formă de nano-/microparticule	51
CAPITOLUL II.....	54
Formulări pentru eliberarea controlată a eritromicinii.....	54
II.1. Nanofibre de chitosan/chitosan cuaternizat ce încapsulează eritromicină, funcționalizate la suprafață cu 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehidă	54
II.1.1. Introducere.....	54
II.1.2. Rezultate și discuții.....	58
II.1.2.1. Studiu preliminar: nanofibre binare funcționalizate	58
II.1.2.2. Preparare, caracterizare structurală și termică	65
II.1.2.3. Caracterizare supramoleculară și morfologică	73
II.1.2.4. Comportamentul fibrelor în medii apoase	76
II.1.2.5. Evaluarea proprietăților adezive.....	79
II.1.2.6. Cuantificarea substanțelor active și cinetica lor de eliberare.....	80
II.1.2.7. Evaluarea activității antioxidante	84
II.1.2.8. Evaluarea activității antimicrobiene	86
II.1.2.9. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i>	89
II.1.2.10. Evaluarea toxicității acute <i>in vivo</i>	92
II.1.3. Concluzii.....	102
II.2. Lipozomi acoperiți cu oligomeri de chitosan ce încapsulează eritromicină	104
II.2.1. Introducere.....	104
II.2.2. Rezultate și discuții.....	105
II.2.2.1. Studii preliminare de optimizare a formulării lipozomale	105
II.2.2.2. Obținerea și caracterizarea structurală a nanoparticulelor	111
II.2.2.3. Caracterizare supramoleculară și morfologică	116
II.2.2.4. Dimensiune, potențial zeta, eficiența de încapsulare și stabilitate... ..	120
II.2.2.5. Proprietăți biologice: mucoadezivitate, activitate antioxidantă, activitate antibacteriană, biocompatibilitate <i>in vitro</i>	125
II.2.3. Concluzii.....	131
CAPITOLUL III	132

Formulări pentru eliberarea controlată a norfloxacinii	132
III.1. Nanofibre binare de chitosan/chitosan cuaternizat funcționalizate cu acid 2-formilfenilboronic ce încapsulează norfloxacină	132
III.1.1. Introducere	132
III.1.2. Rezultate și discuții	134
III.1.2.1. Preparare, caracterizare structurală și termică.....	134
III.1.2.2. Caracterizare morfologică și supramoleculară.....	138
III.1.2.3. Proprietăți mecanice, de umflare, antioxidante și adezivitate	140
III.1.2.4. Biodegradarea și cinetica de eliberare.....	144
III.1.2.5. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i> și a activității antimicrobiene.....	146
III.1.2.6. Evaluarea toxicității acute <i>in vivo</i>	149
II.1.3. Concluzii.....	152
CAPITOLUL IV	153
Partea experimentală.....	153
IV.1. Materiale	153
IV.2. Echipamente	154
IV.3. Metode.....	157
IV.4. Obținere și caracterizare	169
IV.4.1. Obținerea și caracterizarea nanofibrelor binare CS/HTCC funcționalizate cu 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehidă ce încapsulează eritromicină	169
IV.4.2. Prepararea lipozomilor acoperiți cu oligomeri de chitosan ce încapsulează eritromicină	187
IV.4.3. Obținerea nanofibrelor binare CS/HTCC funcționalizate cu acid 2-formilfenilboronic ce încapsulează norfloxacină	192
CONCLUZII GENERALE	197
BIBLIOGRAFIE.....	207

INTRODUCERE

Chimioterapeuticele antibacteriene reprezintă una dintre cele mai importante descoperiri ale medicinei moderne, jucând un rol esențial în tratamentul infecțiilor bacteriene și în reducerea mortalității asociate acestora. Cu toate acestea, utilizarea lor excesivă și deseori inadecvată a condus la apariția unor probleme majore de sănătate publică, dintre care cea mai alarmantă este rezistența bacteriană. Apariția speciilor bacteriene multirezistente limitează semnificativ eficiența tratamentelor convenționale, crescând durata spitalizărilor, costurile medicale și mortalitatea.

În paralel, administrarea sistemică a antibioticelor este asociată adesea cu efecte secundare marcante, inclusiv toxicitate, dezechilibre ale microbiotei și reacții de hipersensibilitate. În acest context, se impune dezvoltarea unor strategii terapeutice inovatoare, care să asigure un profil de siguranță optim și o eficiență crescută a tratamentului cu antibiotice.

Una dintre direcțiile promițătoare în acest sens este reprezentată de utilizarea sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor, care permit menținerea concentrației optime a substanței active la locul infecției, printr-o eliberare treptată a acesteia, reducând astfel efectele adverse sistemice și riscul apariției rezistenței microbiene. Dintre materialele biocompatibile investigate pentru formularea acestor sisteme, chitosanul se remarcă prin proprietățile sale excepționale: biodegradabilitate, permeabilitate selectivă și activitate antimicrobiană intrinsecă.

Această teză și-a propus să exploreze potențialul chitosanului în formularea de sisteme avansate pentru eliberarea controlată a antibioticelor, punând accent pe caracterizarea structurală, morfologică și a comportamentului *in vitro* și *in vivo* al acestora, contribuind astfel la dezvoltarea unor soluții sustenabile și eficiente în lupta împotriva infecțiilor bacteriene rezistente. Astfel, elaborarea și coordonarea tezei de doctorat intitulată „**Formulări pe bază de chitosan pentru eliberarea controlată de antibiotice**” s-a realizat după cum urmează: **(i)** Obținerea și caracterizarea unor nanofibre pe bază de chitosan și chitosan cuaternizat care încapsulează eritromicină și sunt iminate la suprafață cu o aldehidă monofuncțională cu activitate antioxidantă, cu scopul de a dezvolta biomateriale de nouă generație pentru controlul infecțiilor, reglarea răspunsului imun și regenerare tisulară; **(ii)** Obținerea și caracterizarea unor lipozomi ce încapsulează eritromicină, acoperiți cu oligomeri de chitosan, în urma unui studiu amplu de optimizare a parametrilor de preparare, urmărind dezvoltarea unui sistem nanotransportor cu stabilitate superioară, potențial antioxidant, proprietăți mucoadezive și eficiență antibacteriană, vizând depășirea limitărilor terapiei convenționale cu eritromicină și **(iii)** Obținerea și caracterizarea unor nanofibre care încorporează norfloxacină, pe bază de chitosan și chitosan cuaternizat iminate la suprafață cu acid 2-formilfenilboronic, investigând potențialul acestora ca pansamente pentru răni și arsuri.

Lucrarea este compusă din două părți principale, cuprinzând în total patru capitole: **Partea I** este alcătuită din **Capitolul I**, unde sunt expuse date din literatură relevante pentru subiectul tezei și **Partea a-II-a** care cuprinde **Capitolele II, III**, dedicate prezentării rezultatelor obținute în urma cercetării proprii, și **Capitolul IV** în care sunt descrise materialele, metodele și echipamentele utilizate în cercetarea proprie, precum și date experimentale adiționale.

Capitolul I este dedicat integral prezentării datelor din literatura științifică asupra temelor relevante, precum formulările curente pe bază de chitosan (nanofibre, membrane, geluri, nano-/microparticule) destinate încorporării de antibiotice, dar și o scurtă prezentare a celor două

substanțe medicamentoase ce fac tema cercetărilor proprii, eritromicină și norfloxacină, cu accent pe limitările acestora în terapia actuală și pe formulările specifice studiate până în prezent ale celor două, pe bază de chitosan.

Capitolul II este dedicat formulărilor dezvoltate pentru eliberarea eritromicinei, fiind alcătuit din două subcapitole distincte. Astfel, în *primul subcapitol* este redată obținerea și caracterizarea nanofibrelor binare de chitosan/HTCC funcționalizate cu 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehidă ce conțin eritromicină, realizându-se în prealabil un studiu preliminar de validare a tehnicii de funcționalizare utilizate. Nanofibrele obținute au fost analizate complet din punct de vedere structural și morfologic, evaluându-se totodată și proprietățile acestora, precum profilul de eliberare al celor două substanțe active, biodegradabilitatea, capacitatea de umflare, proprietățile adezive, capacitatea antioxidantă, activitatea antimicrobiană și profilul de siguranță atât prin studii *in vitro* pe linii celulare umane cât și studii preclinice *in vivo* într-un model murin. În cel de-al doilea subcapitol este prezentată optimizarea, obținerea și caracterizarea lipozomilor acoperiți cu oligomeri de chitosan ce încapsulează eritromicină, atât din punct de vedere structural și supramolecular, cât și prin determinarea modelului de eliberare, activității antioxidante, mucoadezivității, proprietăților antibacteriene și biocompatibilității *in vitro*.

Capitolul III abordează dezvoltarea de biomateriale pentru eliberarea norfloxacinei, prin obținerea și caracterizarea de nanofibre binare de chitosan/TMC ce conțin norfloxacină și sunt funcționalizate la suprafață cu acid 2-formilfenilboronic. În mod asemănător fibrelor cu eritromicină, acestea au fost caracterizate din punct de vedere structural și morfologic, fiind evaluate proprietățile acestora, precum profilul de eliberare al norfloxacinei, proprietățile mecanice, biodegradabilitatea, capacitatea de umflare, proprietățile adezive, capacitatea antioxidantă, activitatea antimicrobiană precum și profilul de siguranță prin studii preclinice *in vitro*, pe linii celulare umane, și *in vivo*, utilizând un model murin. Aplicația vizată pentru aceste fibre a fost de pansamente pentru vindecarea rănilor și arsurilor.

În **Capitolul IV** sunt prezentate în detaliu date suplimentare legate de partea experimentală a tezei, inclusiv materialele, tehnicile și echipamentele utilizate în realizarea studiilor cuprinse în teză, precum și informații detaliate asupra procesului de obținere și caracterizare a formulărilor, conținând imagini, grafice și tabele care susțin afirmațiile din capitolele II, III.

Lucrarea se încheie cu o sinteză a activităților de diseminare științifică desfășurate pe parcursul stagiului doctoral, reflectând contribuția la avansarea cunoașterii în domeniu prin publicarea de articole în reviste de specialitate, participarea la conferințe naționale și internaționale, precum și prin implicarea în proiecte de cercetare. Sunt de asemenea evidențiate formele de sprijin financiar care au susținut realizarea programului doctoral, contribuind semnificativ la desfășurarea activităților de cercetare. Sunt prezentate mobilitățile academice efectuate în această perioadă, care au facilitat schimbul de idei, colaborarea interdisciplinară și extinderea perspectivei științifice. Secțiunea finală cuprinde bibliografia de specialitate consultată, ce a reprezentat un reper esențial pentru aprofundarea cunoștințelor și pentru interpretarea rezultatelor obținute în cadrul prezentei teze.

CAPITOLUL II

Formulări pentru eliberarea controlată a eritromicinei

II.1. Nanofibre de chitosan/chitosan cuaternizat ce încapsulează eritromicină, funcționalizate la suprafață cu 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehidă

II.1.1. Introducere

Din punct de vedere terapeutic, utilizarea nanofibrelor pentru a obține formulări de medicamente pentru aplicații topice este una avantajoasă, datorită suprafeței specifice considerabil mai mare față de cea a pansamentelor tradiționale și structurii poroase care permite încapsularea eficientă de substanțe active. Chitosanul (CS) este un biopolimer cunoscut pentru proprietățile sale precum biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, mucoadezivitatea și activitatea antimicrobiană intrinsecă, acționând ca un bun promotor de absorbție pentru substanțele medicamentoase, favorizând totodată îmbunătățirea biodisponibilității medicamentelor [1].

Unul dintre principalele dezavantaje ale CS este dat de solubilitatea sa redusă în apă, și pentru rezolvarea acestuia a fost dezvoltat chitosanul cuaternizat, cum este clorura de *N*-(2-hidroxi)propil-3-trimetil amoniu chitosan (HTCC) [2]. Prin procesul de iminare a CS se pot obține materiale cu proprietăți mecanice superioare și capacitate de a modula stabilitatea fibrelor la diferențele de pH, temperatură sau umiditate. 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehida (2H5MB) este un compus natural, izomer al vanilinei, care se regăsește în diverse plante și posedă o serie de proprietăți active benefice administrării topice [3].

Eritromicina (ERY) este un antibiotic cu spectru larg utilizat pentru tratamentul infecțiilor pielii, căilor respiratorii și țesuturilor moi, fiind de asemenea investigată în unele arii terapeutice emergente [4]. Cu toate acestea, utilizarea sa clinică este limitată de solubilitatea scăzută în soluții apoase, instabilitatea în mediu acid și biodisponibilitatea limitată [5]. Fiind un antibiotic macrolidic, utilizat atât intern, cât și extern, există un potențial larg de aplicabilitate al nanofibrelor ce conțin ERY. Extern, acestea pot fi aplicate în profilaxia infecțiilor plăgilor superficiale, în tratarea rănilor infectate, în tratamentul acneei bacteriene și al altor afecțiuni dermatologice. În timp ce ERY a fost încorporată în diferite formulări, încapsularea sa în nanofibre rămâne în mare parte neexplorată.

Pentru validarea acestui model, au fost preparate 12 formulări de nanofibre, cu diverse compoziții, evaluându-se sistematic proprietățile fizico-chimice ale acestora, precum capacitatea de reținere a lichidelor, profilele de eliberare *in vitro* ale ambilor agenți bioactivi, biodegradabilitatea, mucoadezivitatea, activitatea antimicrobiană și antioxidantă. În plus, un studiu aprofundat al toxicității acute *in vivo* a evaluat impactul acestora asupra parametrilor fiziologici cheie într-un model de rozătoare (șobolani Wistar). Această abordare cuprinzătoare a avut ca scop stabilirea nanofibrelor de chitosan/chitosan cuaternizat încărcate cu ERY ca fiind biomateriale inovatoare pentru aplicare în ingineria tisulară, vindecarea rănilor și controlul infecțiilor.

În etapa preliminară a studiului, au fost elaborate 6 materiale suplimentare pentru a confirma metoda de sigilare a fibrelor martor, ale căror compoziții au fost ulterior integrate în analiza finală.

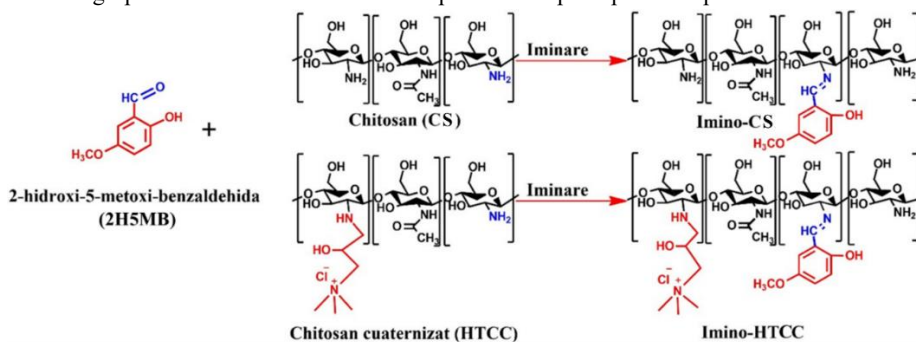
II.1.2. Rezultate și discuții

II.1.2.1. Studiu preliminar: nanofibre binare funcționalizate

În prima etapă a studiului au fost preparate fibre de chitosan ternare prin electrofilarea unui amestec de CS/HTCC/PEO cu o concentrație de 2,5% solubilizat în acid acetic (AcOH), utilizând diverse proporții între CS/HTCC (3:1, 7:1, 19:1 m/m) și păstrând constantă cantitatea de PEO folosită în toate trei formulările. Astfel, au fost obținute probele **C1***, **C2*** și **C3***, unde cifra 1 reprezintă raportul 3:1, cifra 2 raportul 7:1, iar cifra 3 raportul 19:1 dintre CS/HTCC, iar * indică faptul că materialele sunt preliminare.

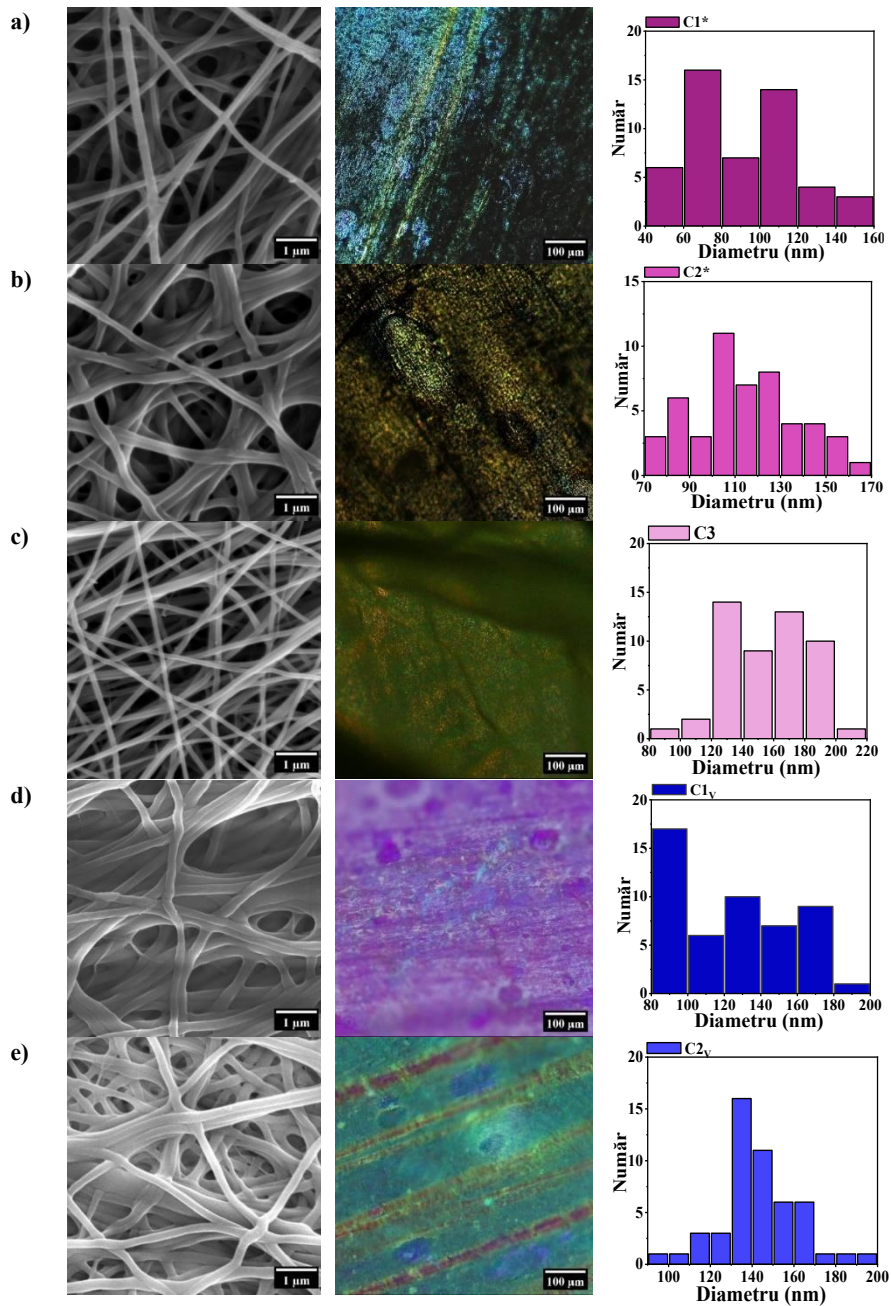
Pentru a obține fibrele binare de CS/HTCC, PEO-ul a fost îndepărtat din compoziția materialului prin spălare cu etanol supus în prealabil uscării pe site moleculare. Fibrele au fost imersate de 4 ori în etanol pe durata a 24 de ore, schimbând mediul de spălare cu unul proaspăt de fiecare dată, într-un incubator la 35 °C și 25 rpm. Îndepărtarea totală a PEO-ului a fost confirmată prin cântărirea masei de reziduu extras care a fost corespunzătoare celei din soluția inițială de electrofilare, după care au fost realizate teste complementare precum ATG, FTIR și ¹H-RMN pentru validare suplimentară.

Reacția de iminare cu 2H5MB (Schema II.1.) s-a realizat pe suprafața nanofibrelor prin pulverizarea unei soluții etanolice de aldehydă de 0,25% pe ambele fețe ale materialelor, după care acestea au fost lăsate la uscat într-un spațiu închis, pentru a avea loc reacția completă (obținându-se probele **C1v***, **C2v*** și **C3v***, unde v reprezintă sigilarea cu monoaldehydă). Cantitatea de 2H5MB utilizată a fost calculată astfel încât să se atingă un raport molar de 10:1 între unitățile de glucozamină ale CS și unitățile formil ale 2H5MB. Conversia totală a grupărilor amino în grupări iminice a fost confirmată în primul rând prin spectroscopia FTIR.



Schema II.1. Schema reacției de iminare la suprafața a fibrelor de chitosan/chitosan cuaternizat

Din punct de vedere al morfologiei fibrelor, acestea au fost studiate utilizând microscopia SEM și POM (Figura II.2.), analizele dezvăluind o morfologie fină, lipsită de defecte, cu un diametru mediu de 87 ± 28 nm, 112 ± 23 nm, 155 ± 26 nm pentru fibrele martor compuse din CS/HTCC în proporții de 3/1, 7/1 și respectiv 19/1. În urma reacției de iminare, valorile medii ale diametrelor fibrelor au fost de 123 ± 30 nm, 142 ± 19 nm și 144 ± 25 nm pentru C1v*, C2v* și respectiv C3v*. Diametrul mărit al fibrelor iminate față de cele martor poate fi atribuit umflării și colapsării fibrelor în timpul procesului de modificare/uscare, acestea aparent lipindu-se între ele.



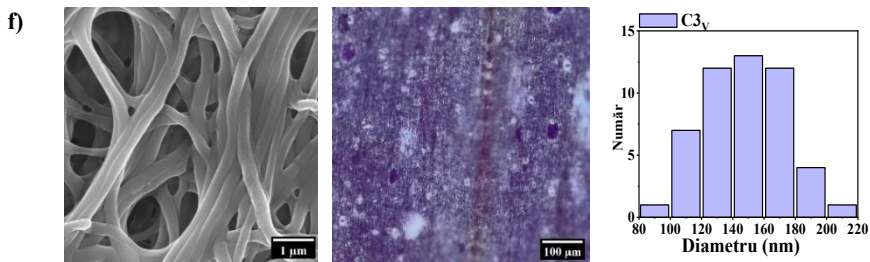
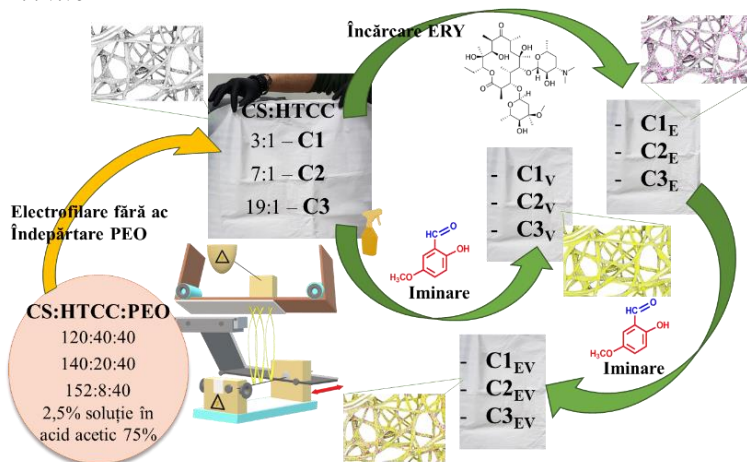


Figura 11.2. Caracterizarea morfologică a fibrelor obținute (în ordine de la stânga la dreapta: Imagini SEM, imagini POM și reprezentarea grafică a distribuției diametrului fibrelor **a)** C1*, **b)** C2*, **c)** C3*, **d)** C1v*, **e)** C2v*, **f)** C3v*

Imaginile obținute prin microscopie optică sub lumină polarizată au dezvăluit birefrință, fapt ce sugerează o ordonare cristalină a macromoleculelor de CS/HTCC în cadrul procesului de electrofilare, sau un grad mare de aliniere a nanofibrelor.

II.1.2.2. Preparare, caracterizare structurală și termică

O serie amplă de nanofibre pe bază de chitosan, încărcate cu eritromicină și/sau modificate cu 2H5MB, cunoscută pentru capacitatea sa de a reacționa ușor cu chitosanul prin legături iminice, au fost preparate cu scopul de a identifica un nou design de biomateriale, potrivit aplicațiilor *in vivo*.



Schema 11.2. Reprezentare schematică a protocolului de preparare pentru nanofibrele studiate, alături de codurile aferente. În diagramă, culoarea roz indică încăpsularea ERY în fibre, iar culoarea galben denotă iminarea fibrelor la suprafață cu 2H5MB

Nanofibrele au fost preparate similar metodei descrise în capitolul II.1.2.1., folosind de data aceasta un aparat ce utilizează o tehnică de electrofilare fără ac, aplicată unui amestec polimeric ternar de CS, HTCC și PEO, urmată de îndepărtarea PEO-ului. Fibrele au fost funcționalizate prin încărcare cu ERY și/sau reacționare cu 2H5MB la suprafață (Schema II.2.).

Având în vedere că HTCC este bine cunoscut pentru activitatea sa antimicrobiană, dar poate fi citotoxic la concentrații mari, au fost selectate diferite rapoarte CS:HTCC (3:1, 7:1, 19:1 m/m) pentru a optimiza echilibrul între profilul de siguranță și bioactivitate.

Spectrele **FTIR** ale fibrelor au prezentat benzi corespunzătoare tuturor componentelor, acestea fiind mai ușor identificate prin comparare cu martorii (Figura II.7.). Concret, spectrele fibrelor iminate la suprafață (C_{IV} și C_{IEV}) au prezentat apariția unei benzi cu maximum în jurul valorii de 1637 cm^{-1} , caracteristică legăturilor imină, față de cele neimate (C_I și C_{IE}). În plus, banda ascuțită și intensă de la 1661 cm^{-1} , caracteristică grupării formil din 2H5MB, a fost absentă în spectrele C_{IV} și C_{IEV} , susținând conversia totală a acestora în legături imină. Pentru probele care conțin ERY (C_{IE} și C_{IEV}), în comparație cu cele lipsite de medicament (C_I și C_{IV}), a fost observată o bandă largă, de intensitate scăzută, în jurul a 1715 cm^{-1} , caracteristică benzii de întindere a grupării carbonil a inelului lactonic din antibiotic.

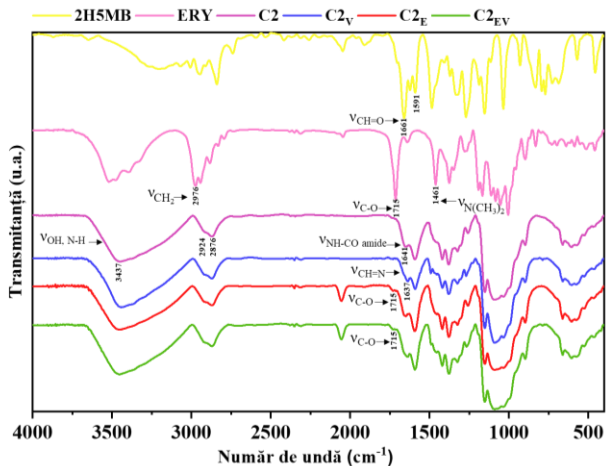


Figura II.7. Spectrele FTIR ale probelor studiate față de martorii 2H5MB și ERY (d);

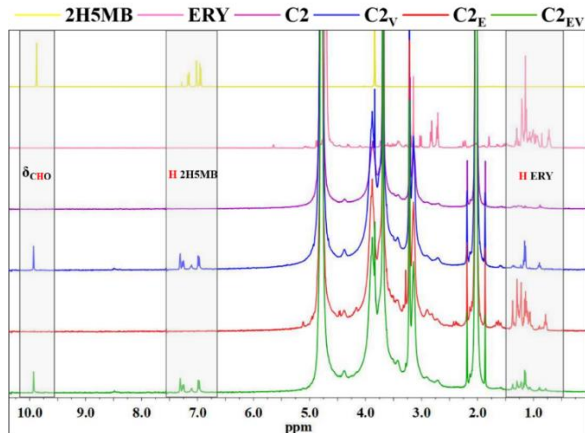


Figura II.8. Spectrul ^1H -RMN al seriei C2, comparativ cu martorii 2H5MB și ERY

O metodă complementară de validare a prezenței ERY în fibre, precum și a reacției de iminare cu 2H5MB, a fost furnizată de spectrele ^1H -RMN. Chiar dacă semnalele protonilor s-au suprapus în mare măsură, cele specifice ERY, corespunzătoare grupărilor metil legate de atomi de C din regiunea 0,78-1,4 ppm, dar și cele de la 2,4 ppm ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$) și 5,1 ppm (CH vecin atomului de oxigen din fragmentul de cladinoză și, respectiv, din inelul lactonă) au putut fi observate în spectrele ^1H -RMN ale fibrelor ce conțin antibioticul (C_E și C_EV) (Figura II.8.) [6]. Pe de altă parte, în spectrele ^1H -RMN au fost regăsite semnalele protonilor imină, la aproximativ 8,47 ppm, în probele C_IV și C_IEV , confirmând formarea legăturilor imină. Pe baza spectrelor ^1H -RMN, a fost calculat gradul de substituție al CS/HTCC cu unități de vanilină, rezultând valori apropiate celor obținute din UV-vis.

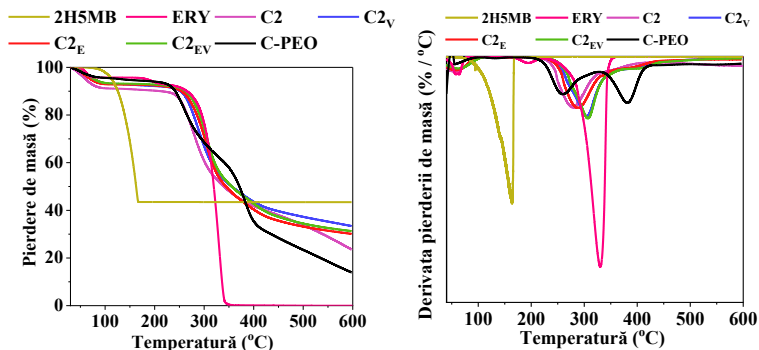


Figura II.9. Curbele ATG (stânga) și DTG (dreapta) ale seriei C2 comparativ față de ERY, 2H5MB și mărtoșul Chitosan-PEO

Analiza termogravimetrică a fost folosită pentru validarea componentelor fibrelor, prin monitorizarea etapelor lor specifice de degradare (Figura II.9.). Etapa de descompunere de la 380 °C (caracteristică degradării PEO) a fost absentă, confirmând astfel eliminarea totală a acestuia din toate probele studiate [7].

II.1.2.3. Caracterizare supramoleculară și morfologică

Modelul **XRD** al tuturor probelor a evidențiat o reflexie largă de intensitate scăzută în jurul valorii de $20^\circ 2\theta$, caracteristică pentru starea semicristalină a fibrelor pe bază de chitosan. Microscopia în lumină polarizată, a confirmat starea semicristalină prin observarea texturilor birefringente.

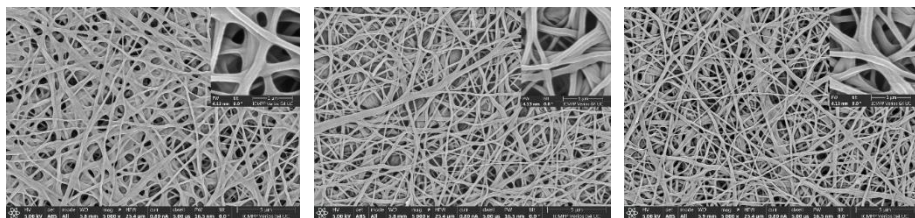


Figura II.12. Imagini SEM ale probelor seriei C2 și diametrul mediu al acestora (nm)

Morfologia fibrelor observată prin **SEM** a evidențiat o rețea tridimensională de fibre încâlcite, formând o nețesută cu pori interfibrilari neregulați. Diametrul mediu al fibrelor a scăzut pe măsură ce conținutul de HTCC a crescut, dar fără relevanță statistică (Figura II.12.). Diametrul fibrelor nu a fost afectat în mod semnificativ de încărcarea cu ERY și/sau de iminarea cu 2H5MB.

II.1.2.4. Comportamentul fibrelor în medii apoase

Capacitatea fibrelor de a absorbi lichide a fost determinată prin experimente de **sorbție dinamică a vaporilor de apă** care au arătat că toate probele de fibre au o capacitate mare de reținere a apei, variind de la 37% la 130%, într-un mediu cu 85% umiditate relativă, valori comparabile cu cele ale pansamentelor recomandate pentru rănille cu exsudare moderat-puternică, cum ar fi Aquacel și Hydrosorb [8].

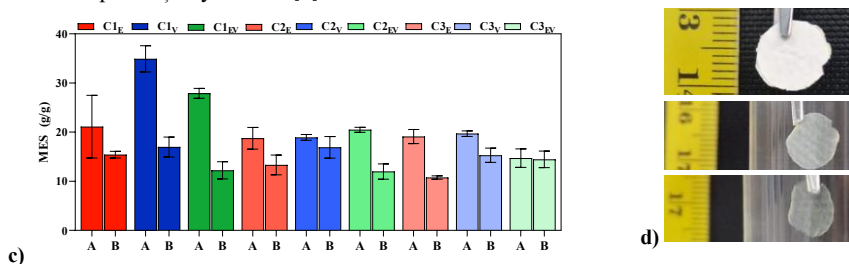


Figura II.13. Comportamentul probelor în mediu umed: **c)** Umflarea masică la echilibru în A) apă și B) PBS 7,4; **d)** Imagini ale probei C2EV înainte și după imersare în apă și PBS;

Capacitatea mare de absorbție a apei măsurată prin metoda DVS a fost confirmată de valorile umflării masice la echilibru (**MES**) de 34,91 g/g în apă și 16,89 g/g în PBS (Figura II.13.c) [8]. Degradarea enzimatică în mediu cu lizozimă a urmat o tendință similară cu cea a umflării, cea mai mare pierdere de masă fiind de aproximativ 40% pentru fibrele cu cel mai mare conținut de HTCC, pierdere atribuită în principal dizolvării acestuia.

II.1.2.5. Evaluarea proprietăților adezive

Caracterul **mucoadeziv** al fibrelor studiate a fost investigat prin măsurarea transmitanței soluțiilor acestora, înainte și după amestecarea cu mucină. Datele colectate (Figura II.16.a) au arătat o scădere semnificativă a transmitanței, atribuit formării de agregate între componentele fibrelor și mucină, confirmând caracterul mucoadeziv al acestora.

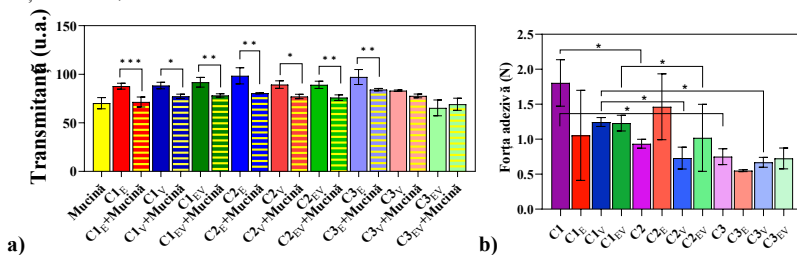


Figura II.16. **a)** Transmitanța soluțiilor de mucină și de nanofibre față de componentele utilizate; **b)** Reprezentare grafică a forței de adeziune necesară desprinderii fibrelor de pielea de pui (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

Acest lucru a fost confirmat de testele *in vitro* pe piele de pui (țesut model), care a prezentat valori ale **forței adezive** ce au crescut direct proporțional cu conținutul de HTCC din fibre (Figura II.16.b). Forța moderată (de la 0,5 la 2 N), necesară pentru a desprinde fibrele de țesut, sugerează că acestea ar fi ideale pentru aplicarea pe mucoase, cum ar fi în cazul sistemelor de administrare a medicamentelor sau pansamentelor chirurgicale, unde este necesar un timp de contact susținut fără aderență excesivă care ar putea cauza disconfort sau leziuni tisulare [9].

II.1.2.6. Cuantificarea substanțelor active și cinetica lor de eliberare

Determinări cantitative prin spectroscopie UV-vis, au arătat că procentul de 2H5MB legată chimic de chitosan a fost aproximativ 3% din masa totală a fibrelor, corespunzând unui grad de substituție al CS/HTCC cu unități de vanilină de aproximativ 3%. Nu au fost observate

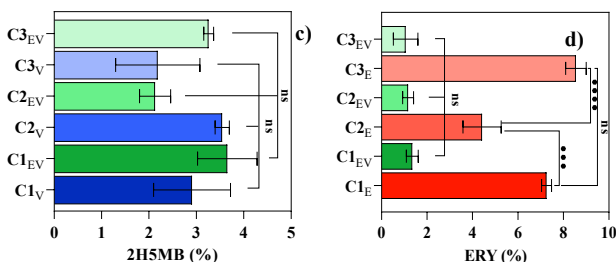


Figura II.17. Gradul de încărcare a: c) 2H5MB și d) ERY raportat la masa fibrelor

progresivă în primele 8 ore, urmată de un proces mai lent, cu o eliberare vizibil mai rapidă din probele **C_{iv}** comparativ cu **C_{iEV}** (Figura II.19.a). În ceea ce privește **eliberarea ERY**,

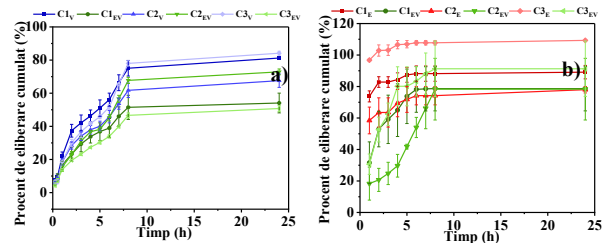


Figura II.19. Cinetica de eliberare: a) 2H5MB și b) ERY în PBS timp de 24 de ore, 37 °C

între antibiotic și 2H5MB, contribuind la stabilizarea îmbunătățită a substanței medicamentoase în fibre.

II.1.2.7. Evaluarea activității antioxidante

Activitatea antioxidantă a fibrelor a fost evaluată prin comparare cu cea a componentelor individuale, la concentrații echivalente (Figura II.21.). După cum era anticipat, 2H5MB a prezentat o capacitate mare de captare a radicalilor liberi, de aproximativ 90%. ERY a prezentat, de asemenea, o ușoară activitate, în jur de 20%, în concordanță cu structura sa chimică bogată în

diferențe semnificative statistic între probe, indicând omogenitatea reacției la suprafață (Figura II.17.c.).

În schimb, determinarea cantitativă a ERY a indicat un procent mare de ERY în probele **C_{iE}** (~7%), și o cantitate foarte mică în probele **C_{iEV}** (~1%). 2H5MB a demonstrat o eliberare

progresivă a ERY, similară cu cea a 2H5MB. Această corelație susține o influență reciprocă

grupări hidroxil. Incorporarea ERY, 2H5MB, precum și combinația celor două, a dus la o creștere progresivă și semnificativă statistic a activității antioxidante, aceasta atingând valori cu până la 40% peste cea a fibrelor martor (AA= 90%).

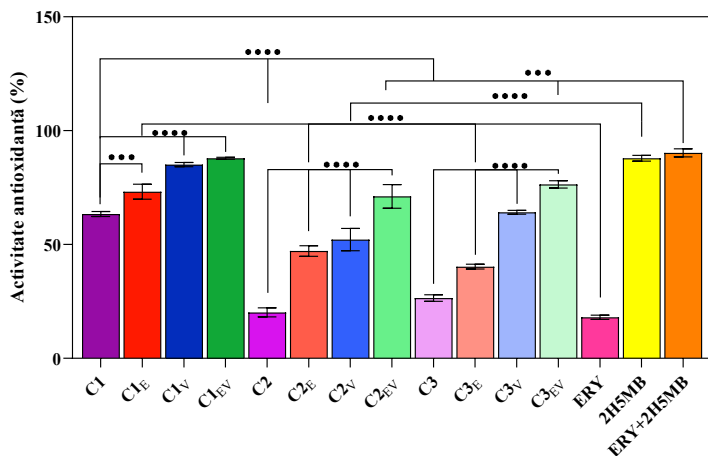


Figura II.21. Reprezentarea grafică a activității antioxidante a probelor testate față de ERY și 2H5MB

II.1.2.8. Evaluarea activității antimicrobiene

Sensibilitatea microorganismelor la nanofibrele formulate a fost evaluată atât în cazul bacteriilor Gram-pozitive cât și al celor Gram-negative, pentru a determina potențialul fibrelor în profilaxia infecțiilor.

Tabelul II.3. Diametrele zonelor de inhibiție (mm) ale probelor testate față de tulpinile de referință

Tulpina	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>
C1	13,00±0,99	-	-	-
C1v	13,65±0,49	-	-	-
C1E	32,25±1,34	18,85±0,63	27,25±1,76	34,35±1,13
C1EV	28,55±0,07	12,90±0,56	19,65±3,60	28,85±1,06
C2	-	-	-	-
C2v	14,95±1,34	-	-	15,45±1,20
C2E	30,75±0,77	16,95±6,29	24,65±0,49	31,75±1,48
C2EV	28,95±1,20	14,10±2,82	22,55±1,34	26,60±0,00
C3	-	-	-	-
C3v	16,70±5,37	-	-	16,65±2,89
C3E	33,60±0,28	19,85±1,48	25,90±0,42	31,60±0,14
C3EV	29,05±0,63	-	21,70±2,82	30,45±0,07

Iminarea cu cantități mici de 2H5MB a conferit fibrelor activitate antibacteriană față de *K. pneumoniae*, iar încapsularea ERY în nanofibre le-a înzestrat cu o activitate împotriva tuturor tulpinilor bacteriene testate. Relevant este faptul că fibrele care conțin atât ERY cât și 2H5MB (C1EV) au prezentat o activitate antibacteriană semnificativă, aproape similară cu cea a probelor C1E (cu excepția *E. coli*), în ciuda cantității considerabil reduse de ERY (Figura II.24, Tabelul

II.3.). Un comportament interesant a fost observat în cazul *E. faecalis*, unde pe lângă zona clară de inhibiție a fost evidentă și o zonă suplimentară, în care bacteriile au prezentat sensibilitate intermediară.

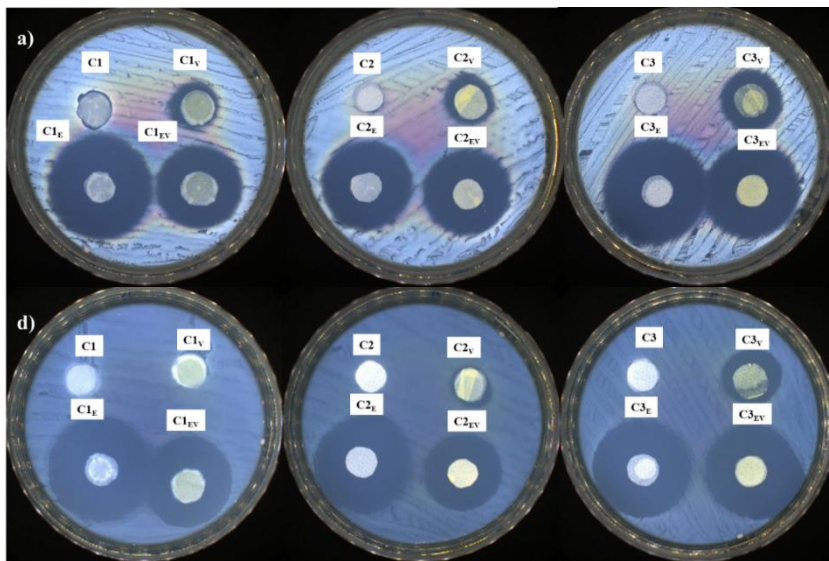


Figura II.24. Activitatea antibacteriană a probelor testate pe: **a)** *S. aureus*, **d)** *K. pneumoniae*

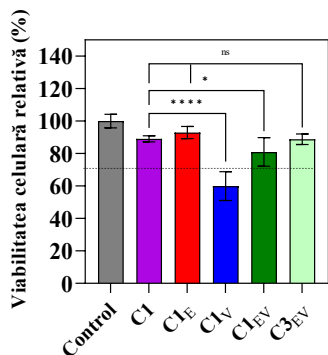


Figura II.25. Viabilitatea celulară a fibroblastelor dermice umane normale după 24 de ore de expunere la nanofibre, comparativ cu celulele netratate

II.1.2.9. Evaluarea citotoxicității *in vitro*

Citotoxicitatea biomaterialelor a fost studiată folosind fibroblaste dermice umane normale (NHDF). Cu excepția probei C1v, toate materialele testate au îndeplinit criteriile ISO pentru biomateriale, confirmând potențialul lor ridicat pentru aplicații clinice (Figura II.25.). O analiză comparativă a compoziției fibrelor și a citotoxicității acestora a arătat că 2H5MB este componenta principală asociată cu o viabilitate celulară redusă. Cu toate acestea, în cazul probelor în care a fost incorporat atât izovanilină, cât și ERY, nu a fost observată nicio scădere semnificativă statistic a viabilității celulare în comparație cu probele de referință sau cele fără vanilină. Aceste descoperiri sugerează că asocierea dintre 2H5MB și ERY este una avantajoasă pentru susținerea citocompatibilității.

II.1.2.10. Evaluarea toxicității acute *in vivo*

Impactul fibrelor asupra organismelor complexe a fost evaluat prin monitorizarea formulei leucocitare și a unei serii de parametri biochimici, după implantarea subcutanată a fibrelor într-un model de rozător, comparativ cu un grup de control pozitiv implantat cu bumbac

(Cp) și un grup martor (C). Parametrii au fost evaluați în două momente: momentul inițial, înainte de implantare, pentru a crea o linie de bază și 7 zile post-implantare. Implantarea fibrelor studiate nu a indus nicio modificare a nivelurilor de ALT sau AST, indicând lipsa hepatotoxicității componentelor fibrelor și produșilor lor de biodegradare (Figura II.33.a,b).

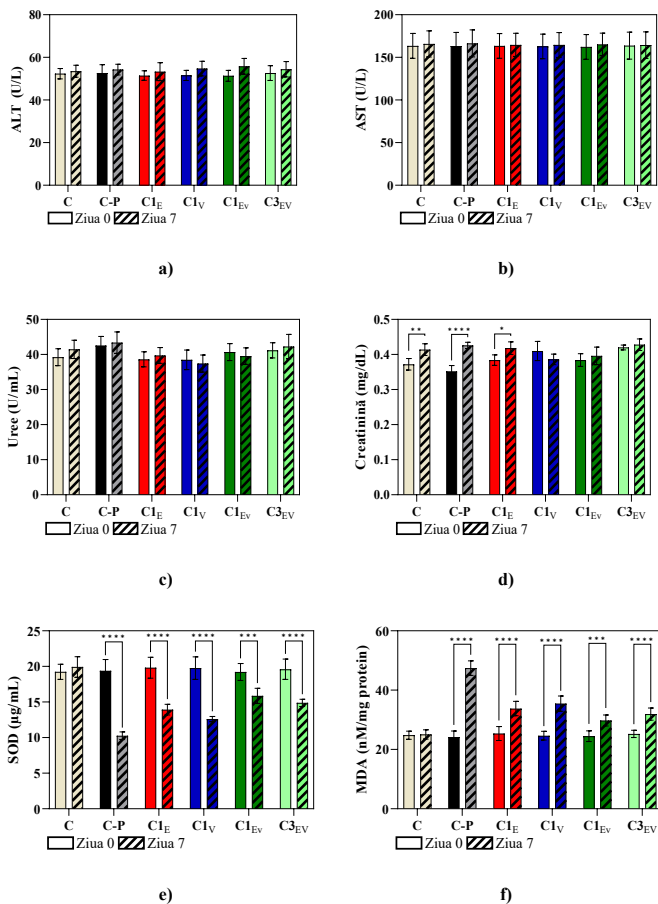


Figura II.33. Reprezentare grafică comparativă a parametrilor sanguini și biochimici investigați, înainte și după 7 zile de la implantare: **a)** alanin-aminotransferază (ALT); **b)** aspartat-aminotransferază (AST); **c)** uree; **d)** creatinină; **e)** superoxid-dismutază (SOD); **f)** malondialdehidă (MDA)

Totuși, în timp ce bumbacul a determinat o ușoară creștere a valorilor medii ale ureei, fibrele au produs o ușoară scădere, cu o diferență semnificativă observată pentru proba C1V comparativ cu grupul pozitiv (Figura II.33.c). Acest lucru sugerează că izomerul vanilinei ar fi putut favoriza regenerarea tisulară în detrimentul degradării proteinelor, ducând la o reducere ușoară a producerii de uree. Implantarea bumbacului a determinat o creștere accentuată a nivelurilor de MDA, în timp ce implantarea fibrelor a indus doar o ușoară creștere, considerabil redusă față de bumbac (Figura II.33.f).

II.2. Lipozomi acoperiți cu oligomeri de chitosan ce încapsulează eritromicină

II.2.1. Introducere

Lipozomii sunt vezicule sferice formate dintr-un dublu strat fosfolipidic, capabile să încapsuleze atât medicamente hidrofobe, cât și hidrofile. În plus, formularea lipozomală poate să reducă toxicitatea sistemică, să îmbunătățească biodisponibilitatea și să sporească absorbția celulară, având potențialul de a depăși mecanismele de rezistență microbiană [10]. Analizele *in silico* și datele preclinice sugerează că lipozomii încărcăți cu eritromicină reprezintă una dintre cele mai promițătoare formulări de macrolide pentru aplicațiile viitoare [11]. Modificarea suprafeței lipozomilor cu polimeri biocompatibili reprezintă o strategie promițătoare pentru îmbunătățirea performanței lor terapeutice. Natura cationică a chitosanului îi permite să interacționeze electrostatic cu suprafața încărcată negativ a lipozomilor, îmbunătățind stabilitatea coloidală. În plus, oligomerii de chitosan (OCS), care au solubilitate crescută în apă, activitate biologică îmbunătățită și permeabilitate mucozală superioară comparativ cu chitosanul, prezintă potențialul de a reduce riscul de agregare al lipozomilor [12]. Acoperirea cu chitosan nu doar că îmbunătățește mucoadezivitatea, dar poate modula de asemenea joncțiunile celulare strânse, promovând transportul paracelular al medicamentului.

Prin urmare, prezentul studiu își propune să dezvolte o metodologie fiabilă și reproductibilă pentru formularea de lipozomi încărcăți cu eritromicină acoperiți cu oligomeri de chitosan, optimizată printr-o investigare sistematică a parametrilor de formulare.

II.2.2. Rezultate și discuții

II.2.2.2. Obținerea și caracterizarea structurală a nanoparticulelor

Lipozomii încărcăți cu ERY și acoperiți cu oligomeri de chitosan (ECL) au fost preparați utilizând o metodă optimizată de hidratare a filmului subțire urmată de extrudare, pentru a obține o eficiență de încapsulare ridicată și dimensiuni nanometrice cu distribuție îngustă. Formarea optimă a filmului subțire a fost realizată prin dizolvarea fosfatidilcolinei (FC) și ERY în cloroform, într-un raport masic FC:ERY = 6:1. Filmul subțire a fost hidratat utilizând soluție tampon fosfat salin (PBS, pH=7,4) la 37 °C, facilitând reorganizarea și auto-asamblarea lipozomilor sub agitare magnetică.

În urma hidratării, suspensia lipozomală a fost supusă extrudării printr-o membrană polycarbonat cu pori de 100 nm la 37 °C, pentru a asigura o trecere eficientă prin membrană.

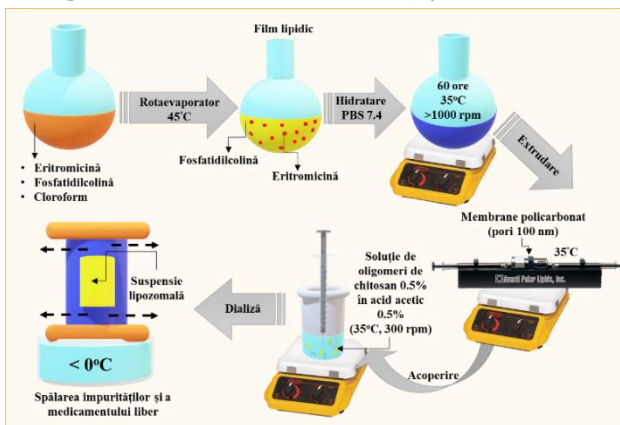
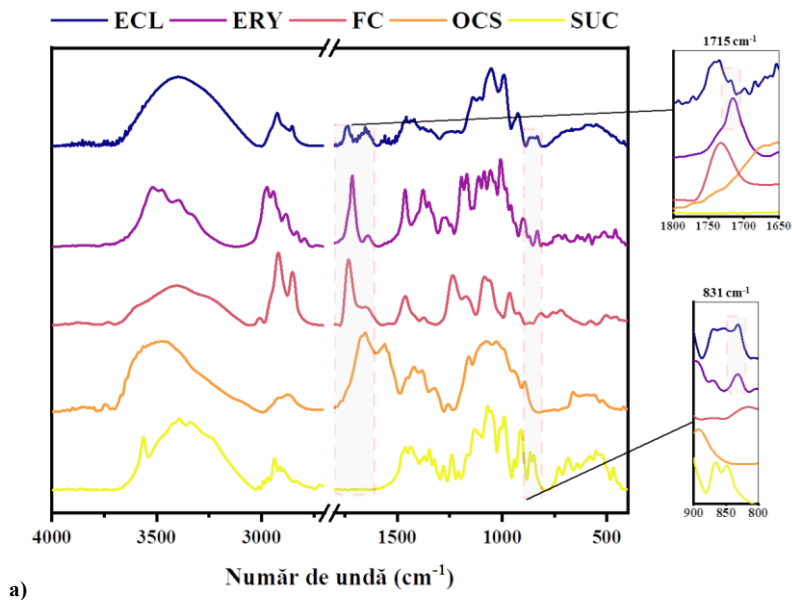


Figura II.39. Reprezentare schematică a procesului de preparare a lipozomilor cu ERY acoperiți cu OCS

Stabilitatea lipozomilor a fost îmbunătățită prin acoperire cu OCS prin procedul adăugării în picătură într-o soluție de 0,5% oligomeri de chitosan. Pentru a facilita conversia acestora într-o pulbere uscată pentru depozitare prelungită sau formulări inhalatorii, aceștia au fost stabiliți cu sucroză, cu rol crioprotector. Înainte de liofilizare, lipozomii au fost supuși dializei la 0 °C (sub temperatura de tranziție a lipidului) pentru a elimina ERY neîncapsulată, menținând în același timp integritatea lipozomală [13]. Mediul de dializă a fost format din sucroză în PBS, într-o compoziție similară cu cea a probelor, în vederea asigurării echilibrului osmotic și prevenirea agregării. O reprezentare schematică a obținerii lipozomilor cu ERY acoperiți cu OCS este redată mai sus (Figura II.39.).

Spectrele **FTIR** ale probelor ECL au confirmat prezența tuturor componentelor individuale, în ciuda unui anumit grad de suprapunere spectrală. Analiza comparativă a spectrelor a evidențiat benzile vibraționale caracteristice ERY, FC și OCS, confirmând reușita formulării sistemului lipozomal (Figura II.40.).

Spectroscopia **¹H-RMN** a fost utilizată ca metodă complementară pentru confirmarea prezenței componentelor individuale în formularea ECL, cu un accent deosebit pe verificarea încapsulării ERY (Figura II.40.). Semnalele distincte din intervalul 1,0–1,3 ppm au fost atribuite grupărilor metil atașate restului dimetilamină ($N(CH_3)_2$), confirmând astfel prezența ERY în sistemul lipozomal [6]. Mai mult, semnalul de la ~3,1 ppm, caracteristic protonului H2 din oligomerii de chitosan, a fost de asemenea evidențiat în spectrele ECL, validând acoperirea reușită a lipozomilor [14]. Astfel, rezultatele RMN, coroborate cu analiza FTIR, oferă dovezi calitative pentru încapsularea reușită a ERY în formularea lipozomală și acoperirea acestora cu oligomeri de chitosan, sugerând integritatea structurală și de compoziție a sistemului.



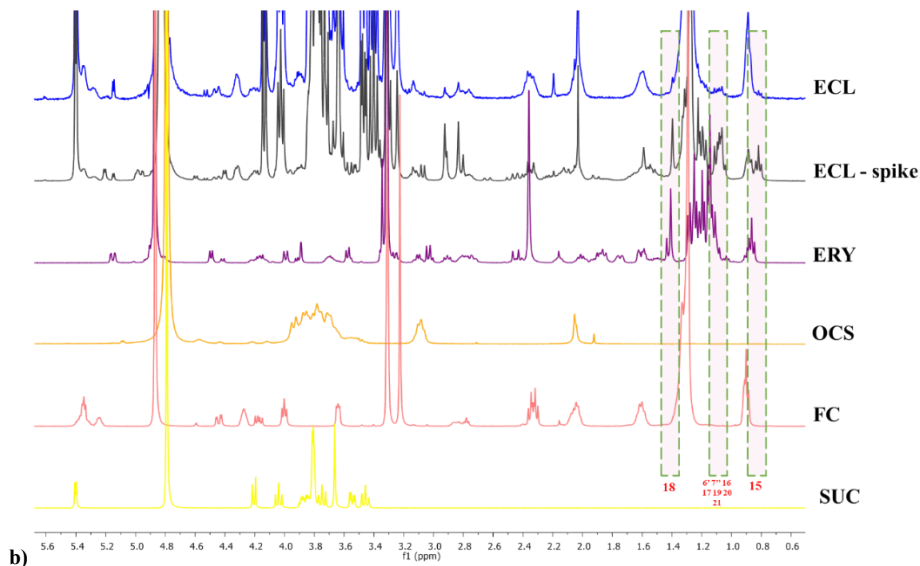


Figura II.40. a) Spectre FTIR reprezentative ale lipozomilor studiați comparativ cu componentele individuale; b) Spectre ^1H -NMR ale lipozomilor studiați și ale componentelor individuale

II.2.2.3. Caracterizare supramoleculară și morfologică

Profilul **XRD** al formulării ECL a evidențiat o bandă largă cu un maxim situat la aproximativ $20,7^\circ 2\theta$ și un umăr pronunțat în jurul $13,1^\circ 2\theta$, asemănătoare difractogramelor sucrozei amorfe [15]. Această observație se aliniază cu conținutul ridicat de sucroză din compoziția lipozomală, care poate trece în stare amorfă în timpul liofilizării. Absența reflexiilor caracteristice ERY în difractograma ECL sugerează că medicamentul este dispersat la nivel molecular în dublul strat lipidic, asemănător unei soluții solide [16].

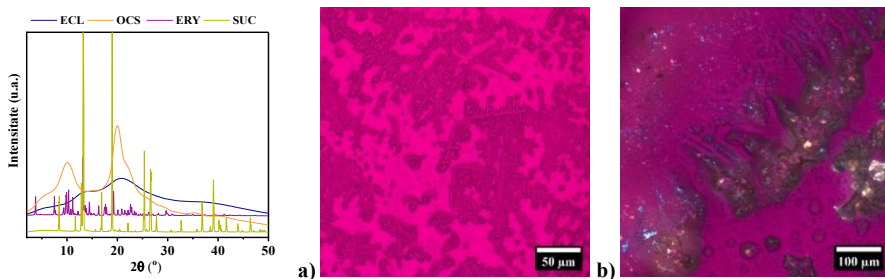


Figura II.42. Difractograme XRD ale ECL și a componentelor; **Figura II.44.** Imagini POM ale probei EL a) la temperatura camerei, înainte de încălzire și b) la temperatura camerei după primul ciclu de încălzire/răcire

O perspectivă valoroasă asupra stării lipozomilor a fost obținută prin observațiile **POM** în timpul unui ciclu de încălzire/răcire. Lipozomii acoperiți cu chitosan nu au prezentat modificări vizibile la încălzire până la 200°C , indicând o stabilitate termică ridicată. În mod contrar,

lipozomii neacoperiți au început să se topească în jurul temperaturii de 70 °C, temperatura de topire a FC, formând un film amorf care a rămas neschimbat la încălzirea suplimentară până la 200 °C și la răcirea la temperatura camerei. Cu toate acestea, după 24 de ore, în acest film amorf au apărut domenii birefringente, atribuite cristalizării lente a eritromicinei care a migrat din lipozomi în timpul procesului de topire a FC (Figura II.44.). Acest comportament termic evidențiază, pe de o parte, stabilitatea termică îmbunătățită conferită de acoperirea cu chitosan, în concordanță cu stabilitatea termică ridicată cunoscută a chitosanului, iar pe de altă parte, susține rezultatele XRD care indică faptul că eritromicina se află într-o stare amorfă în interiorul lipozomilor.

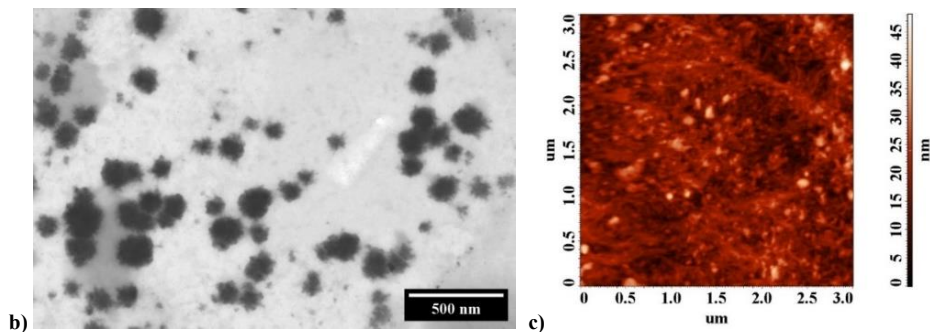


Figura II.45. b) Imagini STEM și c) imagini AFM ale lipozomilor liofilizați ECL.

Imaginile **STEM** și **AFM** au confirmat prezența de vezicule sferice caracteristice lipozomilor (Figura II.45.b). Diametrul mediu măsurat de $97,72 \pm 21,09$ nm se corelează bine cu rezultatele DLS, consolidând ipoteza unei organizări structurale compacte, facilitată de interacțiunile intermoleculare dintre ERY și FC. Un strat exterior a fost observat la lipozomii acoperiți, dar a fost absent în probele EL, susținând identificarea acestuia ca fiind acoperirea cu OCS. În plus, lipozomii EL neacoperiți au prezentat semne clare de coalescență, confirmând astfel efectul stabilizator al acoperirii cu OCS.

II.2.2.4. Dimensiune, potențial zeta, eficiență de încapsulare și stabilitate

Măsurătorile **DLS** au fost efectuate pentru a evalua formarea, distribuția diametrului și stabilitatea lipozomilor încărcăți cu ERY și acoperiți cu OCS, prin măsurarea diametrului hidrodinamic, indicelui de polidispersitate (PDI) și potențialului zeta (potențial ζ) (Figura II.46.a,b,c). Înainte de acoperire, lipozomii prezentau o **dimensiune** de $95,14 \pm 1,64$ nm și un **potențial- ζ** de $-4,72 \pm 0,83$ mV. După acoperirea cu OCS, a fost observată o creștere ușoară a dimensiunii la $97,38 \pm 0,75$ nm, precum și o schimbare semnificativă a potențialului- ζ la $9,09 \pm 1,09$ mV. Această sarcină pozitivă de suprafață confirmă adsorbția chitosanului pe suprafața lipozomilor, fapt ce ar trebui să îmbunătățească stabilitatea coloidală prin prevenirea agregării. Valorile mai scăzute ale **PDI** ($<0,1$) evidențiază omogenitatea lor îmbunătățită, crucială pentru asigurarea reproductibilității în aplicațiile farmaceutice. Lipozomii încărcăți cu ERY (EL, ECL) au prezentat o reducere statistic semnificativă a dimensiunii comparativ cu lipozomii simpli (CL), sugerând o morfologie mai compactă (Figura II.46.a), atribuită creșterii curburii suprafeței induse de interacțiunile intermoleculare dintre lipid și ERY [17].

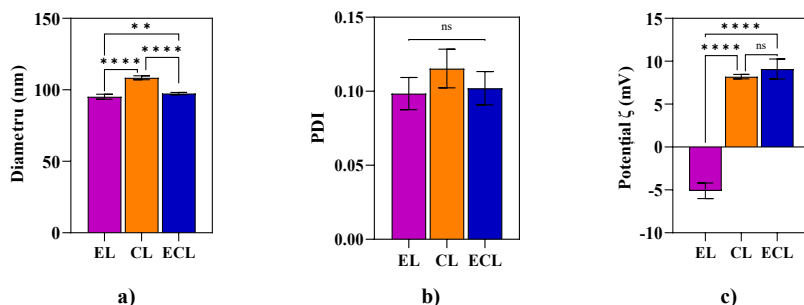


Figura II.46. Reprezentare comparativă a: **a)** dimensiunii particulelor, **b)** PDI și **c)** potențialului- ζ al lipozomilor ECL față de referințele EL și CL.

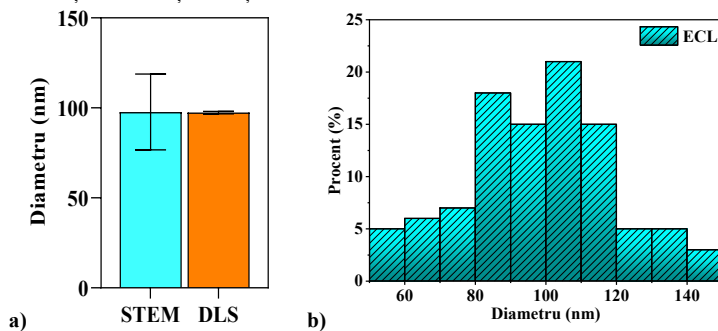


Figura II.47. **a)** Reprezentare comparativă a diametrului probei ECL determinat prin STEM și DLS; **b)** Distribuția diametrelor particulelor ECL conform STEM

Stabilitatea lipozomilor încărcăți cu ERY și acoperiți cu OCS a fost evaluată pe o perioadă de două luni, prin monitorizarea modificărilor dimensiunii particulelor și a PDI, la trei temperaturi diferite: 5 °C, 25 °C și 50 °C. S-a observat că diametrul lipozomilor a crescut în timp, ajungând aproape să se tripleze pentru cei depozitați la 50 °C. Interesant este că temperatura optimă pentru păstrarea formulărilor lipozomale pare să fie 25 °C, prezentând cea mai mică creștere a dimensiunii pe parcursul a 6 săptămâni (Figura II.48.c).

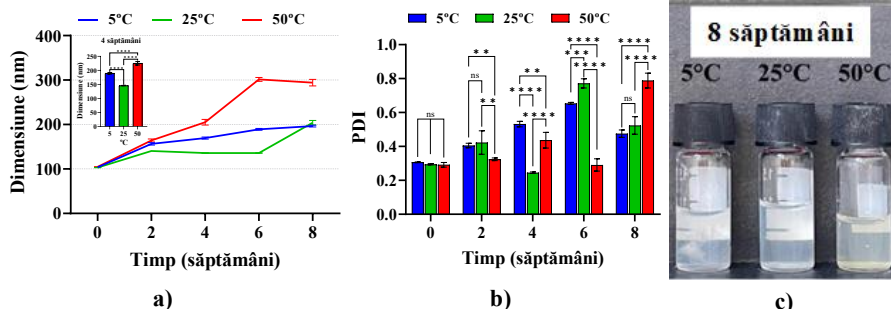


Figura II.48. Dimensiunea, indicele de polidispersitate și imagini ale formulării lipozomale ECL depozitate la diferite temperaturi pe o perioadă de 8 săptămâni

În ciuda modificărilor observate, lipozomii încărcăți cu ERY și-au menținut dimensiunea în domeniul nanometric, spre deosebire de alte formulări raportate [4]. Acest lucru indică o stabilitate relativ bună a formulării optimizate, permițând stocarea suspensiei timp de cel puțin șase săptămâni fără compromiterea caracteristicilor esențiale.

Eficiența de încapsulare a eritromicinei (%EE) a fost determinată cantitativ prin spectroscopie UV-Vis, obținându-se o valoare de $62,88 \pm 2,19\%$. Această valoare se încadrează în intervalul raportat în literatură (23–87%), variațiile depinzând de compoziția lipidică, metoda de preparare și prezența altor ingrediente [4]. Deși în literatură au fost raportate și valori ale %EE mai mari, acestea sunt de obicei asociate cu dimensiuni ale lipozomilor care depășesc 200nm, spre deosebire de cei dezvoltăți în acest studiu, care au dimensiuni de 100nm.

În ceea ce privește **eliberarea** substanței medicamentoase, pulberea de ERY a fost eliberată în mai puțin de trei ore în mediu PBS, în timp ce eliberarea din lipozomi a fost progresivă, ajungând la aproximativ 75% în primele zece ore. Prezența lizozimei și a lipazei a accelerat ușor eliberarea (77% vs. 70%) (Figura II.49.).

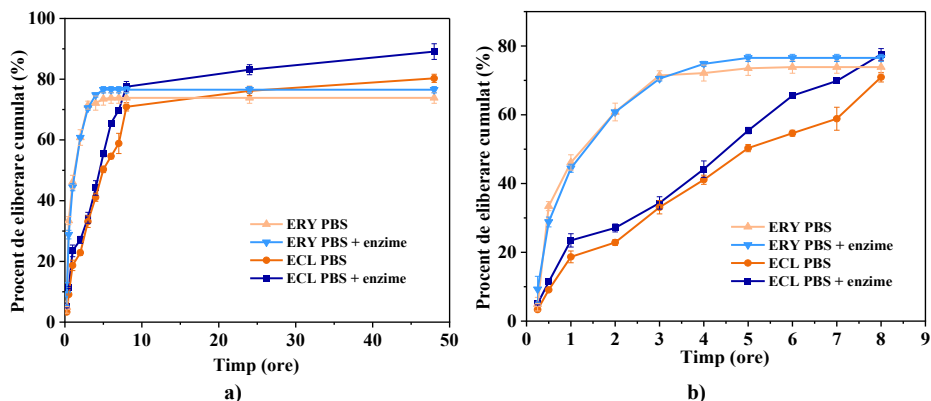


Figura II.49. Cinetica de eliberare a ERY din ECL comparativ cu ERY liber, atât în PBS, cât și în PBS cu enzimele lizozimă și lipază, pe o perioadă de a) 48 și b) 8 ore.

Cinetica de eliberare a ERY din lipozomi și a ERY sub formă pulbere a fost analizată prin fitarea pe cinci modele cinetice cunoscute, cel mai adecvat fiind ales pe baza coeficientului de corelație. Pentru lipozomi, cele mai bune potriviri au fost cu modelul Hixson–Crowell, sugerând un mecanism influențat de **eroziunea matricei**, și modelul Higuchi, indicând o eliberare controlată prin **difuzie**. Astfel, eliberarea ERY din lipozomi este guvernată de o combinație între difuzie și eroziune, indicând o eliberare susținută și controlată, mai ales în prezența enzimelor care degradează matricea. În cazul ERY pulbere, valorile R^2 au fost semnificativ mai mici în toate modelele, cea mai bună potrivire fiind cu modelul Higuchi, sugerând că difuzia este mecanismul principal de eliberare, aceasta fiind mai puțin controlată și mai rapidă (*“burst release”*) comparativ cu formulările lipozomale.

II.2.2.5. Proprietăți biologice: mucoadezivitate, activitate antioxidantă, activitate antibacteriană, biocompatibilitate *in vitro*

Evaluarea **mucoadezivității** prin monitorizarea modificărilor de transparență la contactul cu mucina a arătat că suspensiile lipozomale erau inițial transparente ($T\%=40\text{--}65\%$), în timp ce suspensia de mucină era opacă ($T\%\sim 18\%$) din cauza auto-asocierii macromoleculor de mucină, formând arhitecturi de tip gel (Figura II.50.).

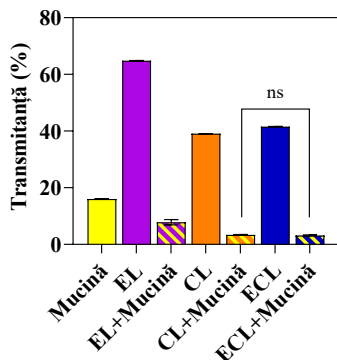


Figura II.50. Transmittanța suspensiilor de mucină și lipozomi

La amestecarea suspensiilor lipozomale cu cea de mucină, transparența a scăzut semnificativ; formulările acoperite cu OCS au devenit extrem de opace (până la 3% transmittanță), confirmând contribuția chitosanului la creșterea turbidității. Scăderea bruscă a transparenței este atribuită agregării cu mucina, mediata de interacțiuni fizice (legături de hidrogen cu lipozomii) sau, în cazul lipozomilor neacoperiți (EL), de interacțiunile dintre fosfatidilcolina zwitterionică și mucină. Turbiditatea mult mai pronunțată în cazul lipozomilor acoperiți cu chitosan se datorează capacității ridicate a chitosanului de a forma legături de hidrogen cu macromoleculele de mucină.

Aceste rezultate demonstrează proprietățile mucoadezive excelente ale lipozomilor acoperiți, sugerând un timp lung de contact cu mucoasele și o eliberare prelungită a eritromicinei.

Activitatea antioxidantă a fost evaluată prin testul DPPH (Figura II.51.), testându-se și activitatea componentelor individuale. OCS au demonstrat cea mai puternică activitate, cu o rată de captură a radicalilor de 80%, urmată de FC cu aprox. 30%, datorită restului de colină. ERY simplă a avut o activitate moderată (aprox. 20%), explicată prin grupările sale hidroxi donatoare de electroni.

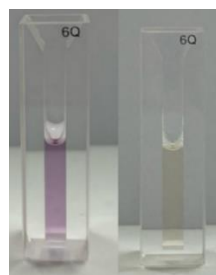
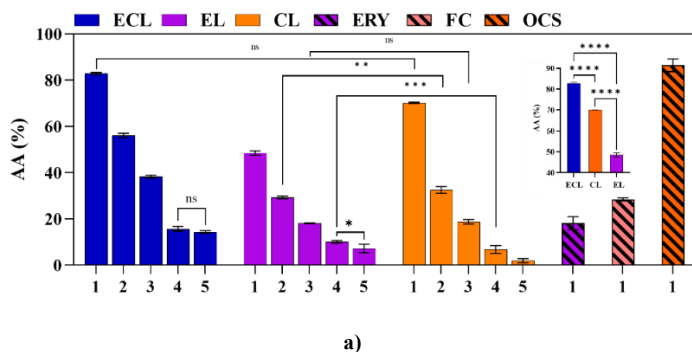


Figura II.51. a) Reprezentare grafică a activității antioxidante a probelor testate comparativ cu ERY, FC și OCS; **b)** Imagine a probei ECL înainte (stânga) și după (dreapta) incubarea cu DPPH (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$) (pe axa OX, numerele în creștere indică diluția: 1=1/0; 2=1/2; 3=1/4; 4=1/7; 5=1/15).

Formularea ECL a prezentat un răspuns antioxidant dependent de concentrație, atingând o valoare de aprox. 80% de captură a radicalilor (suspensia nediluată). Activitatea a scăzut progresiv la diluții succesive (până la aprox. 15% la diluția 1:15), dar nu proporțional. Acest lucru este atribuit interacțiunilor intermoleculare slabe (legături de hidrogen și forțe electrostatice) în soluțiile diluate, care cresc disponibilitatea grupărilor funcționale active.

Analiza comparativă a demonstrat rolul dominant al chitosanului în proprietățile antioxidante. Lipozomii acoperiți simpli (CL) au avut o activitate de captură semnificativ mai mare față de cei neacoperiți încărcăți (EL). Cu toate acestea, formulările bicomponente (CL și EL) au prezentat o activitate mult redusă față de formularea tricomponentă ECL, subliniind un efect de cumulare prin integrarea celor trei componente. Astfel, se poate spune că lipozomii ECL posedă o capacitate semnificativă de legare a radicalilor liberi, caracteristică avantajoasă în aplicațiile terapeutice pentru reducerea stresului oxidativ și a inflamației, combaterea infecțiilor și protejarea celulelor, în special în țesuturile sensibile sau inflamate [18].

Activitatea antibacteriană a fost evaluată prin testul Kirby-Bauer și prin metoda numărării celulelor viabile, folosind tulpini Gram-pozitive (*E. faecalis*) și Gram-negative (*K. pneumoniae*). În testul Kirby-Bauer (Figura II.52.), atât eritromicina pură, cât și lipozomii au arătat o eficiență asemănătoare împotriva ambelor tulpini. Tulpina Gram-pozitivă, *E. faecalis*, a fost mai sensibilă (zona de inhibiție aprox. 22 mm) decât *K. pneumoniae* (aprox 15 mm).

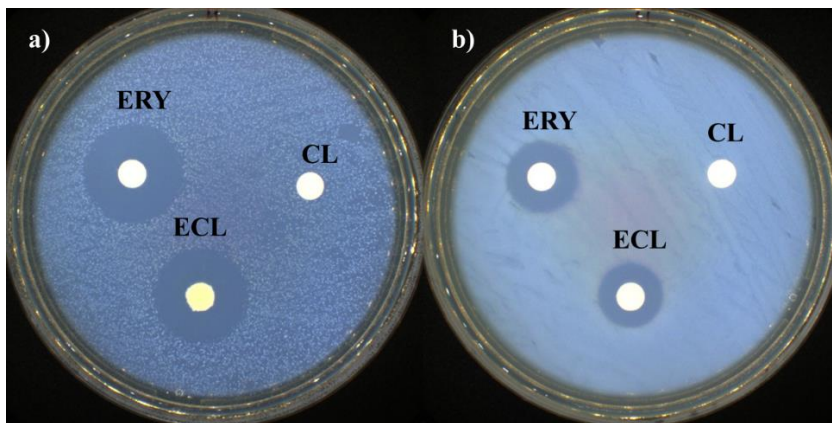


Figura II.52. Activitatea antibacteriană (test de difuzie pe disc) a probelor testate împotriva: a) *E. faecalis* și b) *K. pneumoniae*

Testele cinetice au oferit o perspectivă mai detaliată asupra eficienței antibacteriene, evidențiind diferențe clare în funcție de tulpina bacteriană, spre deosebire de testul de difuzie. Pentru tulpina Gram-pozitivă, *E. faecalis* (Figura II.53.a,c), formularea lipozomală (ECL) a arătat un răspuns antibacterian semnificativ mai rapid și mai puternic: viabilitatea a fost redusă la 2% în 4 ore și la 0,6% în 6 ore. Prin comparație, eritromicina maror a redus viabilitatea la doar 42% după 6 ore. În cazul tulpinii Gram-negative, *K. pneumoniae* (Figurile II.55.b,d), atât ERY maror, cât și ECL au demonstrat o activitate similară în primele 6 ore, reducând viabilitatea bacteriană la aproximativ 45%. Performanța superioară a ECL împotriva *E. faecalis* sugerează că lipozomii facilitează o interacțiune mai eficientă cu membrana bacteriană (sau translocarea

acesteia), posibil datorită absenței membranei externe la bacteriile Gram-pozitive. Acest lucru permite o distribuție intracelulară îmbunătățită a ERY, atingând concentrații locale mai mari de antibiotic [19].

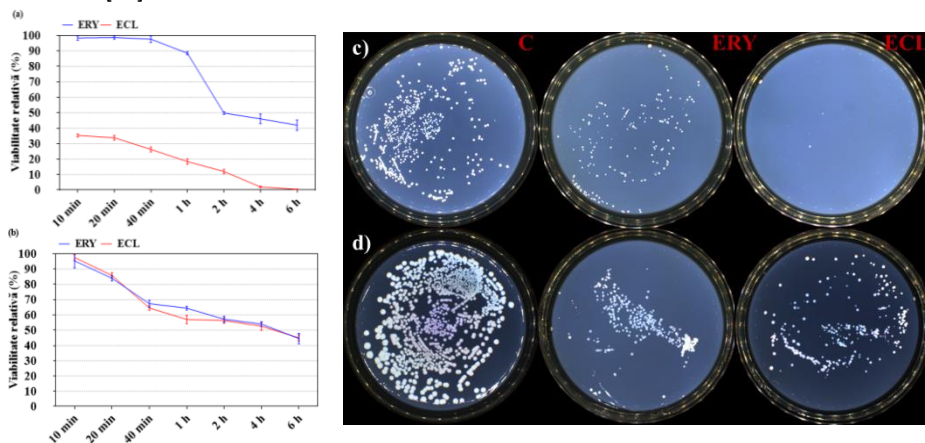


Figura II.53. Inhibirea creșterii microbiene: (a), (c) *E. faecalis*; (b), (d) *K. pneumoniae*, exprimată ca procent din coloniile bacteriene viabile în funcție de timpul de incubare (6 ore) (C: control).

Citotoxicitatea lipozomilor a fost evaluată pe fibroblaste gingivale umane normale (NHGF) pentru a asigura biocompatibilitatea necesară aplicațiilor *in vivo* (Figura II.54.). În intervalul de concentrații testat (10–60 $\mu\text{g/mL}$), eritromicina martor și formulările lipozomale nu au prezentat efecte citotoxice, îndeplinind criteriile de biocompatibilitate ISO 10993-5:2009. ERY martor a menținut o viabilitate celulară de 100%, în concordanță cu studiile anterioare.

Lipozomii acoperiți, dar fără eritromicină (CL), au demonstrat un efect dependent de doză, cu o scădere a viabilității celulare până la 85% la cea mai mare concentrație. Acest comportament se aliniază cu datele din literatură, unde chitosanul (cu grupările sale amino protonate) poate avea efecte citotoxice dependente de gradul de deacetilare și de metodă. Este interesant faptul că lipozomii ECL au arătat o viabilitate celulară semnificativ crescută față de formularea CL, sugerând că prezența ERY poate contribui la citocompatibilitatea generală a sistemului lipozomal.

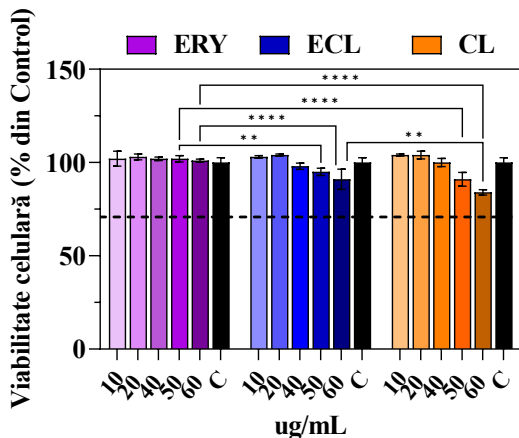


Figura II.54. Viabilitatea celulară după 24 de ore de expunere la formularea lipozomală, comparativ cu celulele netratate.

III.1. Nanofibre binare de chitosan/chitosan cuaternizat funcționalizate cu acid 2-formilfenilboronic ce încapsulează norfloxacină

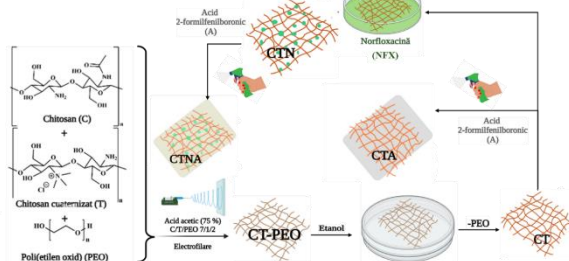
III.1.1. Introducere

Pielea este un organ frecvent expus la afecțiuni, arsurile fiind unele dintre leziunile care necesită tratament special din cauza vindecării lente, riscului de infecție și a stresului oxidativ indus de speciile reactive de oxigen (ROS). Pansamentele ideale trebuie să asigure controlul umidității, activitate antimicrobiană, biocompatibilitate și ușurință în manipulare. Nanofibrele s-au dovedit a fi astfel soluții excelente. Chitosanul (CS) este preferat pentru vindecarea rănilor datorită proprietăților sale non-toxice, mucoadezive, antioxidante și antimicrobiene; mecanismul său implică stimularea coagulării, accelerarea inflamației și refacerea matricei extracelulare (ECM). Trimetilchitosanul (TMC), un derivat cuaternizat hidrosolubil, oferă performanțe superioare, deși electrofilarea sa necesită agenți de co-filare precum PEO, a cărui eliminare creează o morfologie mezoporoasă. Nanofibrele sunt ideale pentru încapsularea de substanțe active, cum ar fi antibioticele cu spectru larg, precum norfloxacină (NFX). Acidul 2-formilfenilboronic (A), care prezintă activitate antifungică, favorizează totodată proliferarea celulară și vindecarea. Pe baza datelor de literatură care validează combinarea chitosanului cu chitosanul cuaternizat și încapsularea norfloxacinii urmată de iminarea cu acid 2-formilfenilboronic, s-a emis ipoteza că prin aceste strategii se pot obține pansamente cu proprietăți mecanice și terapeutice adecvate, capabile să rețină umiditatea. Biomaterialele obținute au fost complet caracterizate pentru a valida această ipoteză, inclusiv prin evaluarea *in vivo* a biocompatibilității.

III.1.2. Rezultate și discuții

III.1.2.1. Preparare, caracterizare structurală și termică

Studiile anterioare au confirmat posibilitatea obținerii de nanofibre pure de CS/TMC, folosind PEO ca agent de co-filare [2]. Raportul optim CS/TMC de 7/1 a fost selectat pentru acest studiu în baza biocompatibilității, pentru a obține formulări care încorporează norfloxacină și acid 2-formilfenilboronic, o aldehydă cu activitate antifungică, destinate pansamentelor pentru arsuri severe. Protocolul de obținere a implicat trei etape (Schema III.1.): (i) electrofilarea amestecului ternar CS/TMC/PEO (în raport 7/1/2) și spălarea ulterioară a agentului de



Schema III.1. Reprezentare schematică a etapelor de preparare utilizate pentru obținerea nanofibrelor compozite cu NFX

co-filare, (ii) încapsularea NFX și (iii) iminarea suprafeței nanofibrelor cu A. Au fost preparate și formulări de control (doar cu NFX sau doar iminate) pentru a evalua influența fiecărui component.

Spectrele RMN (Figura III.1.a) și FTIR au confirmat prezența tuturor componentelor în nanofibre. RMN-ul a evidențiat semnalele caracteristice pentru chitosan și chitosan cuaternizat (3-5,4 ppm). Încapsularea NFX a fost confirmată prin prezența semnalului de la 8,8 ppm, corespunzător unui proton din ciclul chinolonei [20], deplasarea ușoară a semnalului NFX sugerând formarea unei rețele de legături de hidrogen cu polimerii. Deși semnalul iminei a fost absent din cauza mediului acid [21], protonul aldehidei a fost observat ca un singlet intens la 9,85 ppm.

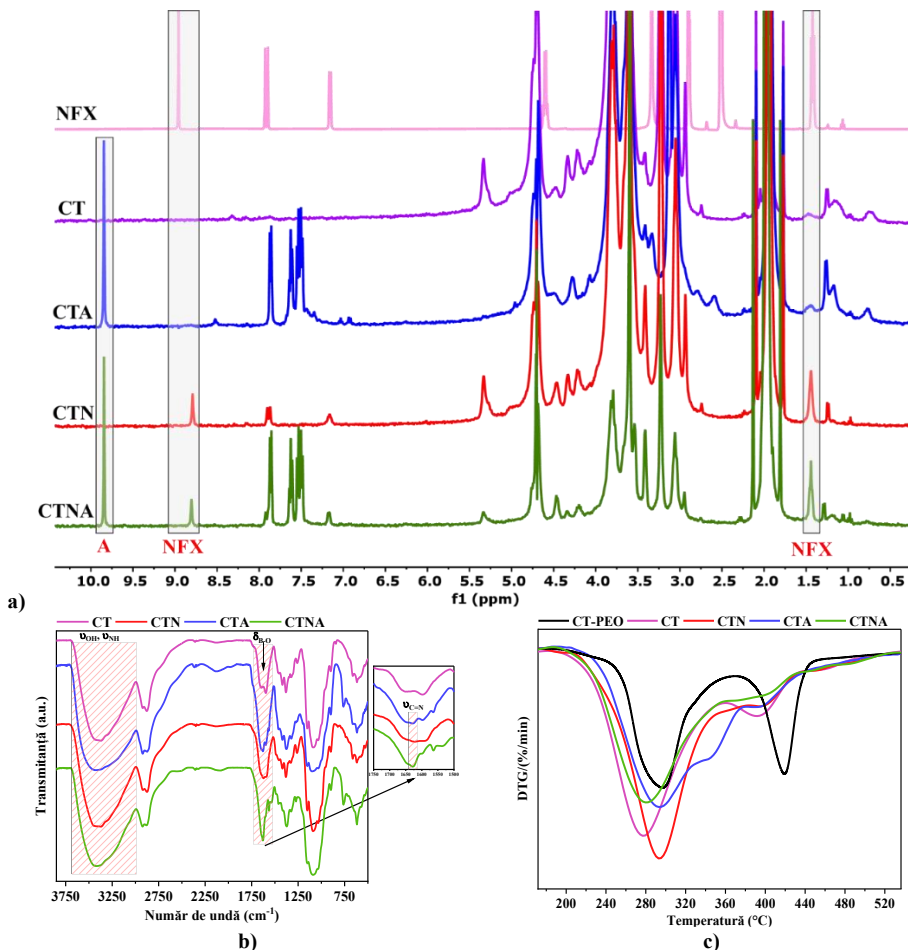


Figura III.1. Caracterizarea structurală a nanofibrelor utilizând a) spectroscopia ¹H-RMN și b) FTIR, care a confirmat prezența tuturor componentelor și formarea legăturilor de tip imină; Caracterizarea termică prin c) DTG, care au confirmat eliminarea completă a PEO din fibre.

Spectroscopia **FTIR** a confirmat încapsularea NFX, prin banda de la 1608 cm^{-1} (vibrația unității amino piperazinice) [22], și prezența monoaldehidei, prin vibrația de îndoire Bor-Oxigen de la 842 cm^{-1} . Reacția de iminare a fost confirmată prin apariția benzii de vibrație la 1627 cm^{-1} și prin scăderea intensității benzii N-H a grupărilor amino (Figura III.1.b, insertie) [2]. Absența vibrației grupării carbonil la 1730 cm^{-1} implică un consum total al aldehidei și o reacție completă. Deplasarea benzilor în domeniul $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ indică o rearanjare a rețelei de legături de hidrogen în fibrele compozite.

III.1.2.3. Proprietăți mecanice, de umflare, antioxidante și adezivitate

Proprietățile mecanice ale nanofibrelor sunt un factor esențial pentru pansamente. Modulul elastic al fibrelor compozite a crescut semnificativ statistic ($p < 0,05$) față de fibrele martor CT (Figura III.3.a), atingând până la 1250 MPa, indicând o rezistență bună la deformare, benefică pentru manipulare și aplicare. Toate biomaterialele au prezentat proprietăți mecanice superioare pansamentelor tradiționale și altor biomateriale pe bază de chitosan raportate în literatură [23,24]. Modificarea fibrelor binare CT a îmbunătățit suplimentar rezistența la stres (Figura IV.24.), probabil datorită tratamentului cu etanol, care a dus la o morfologie mai compactă.

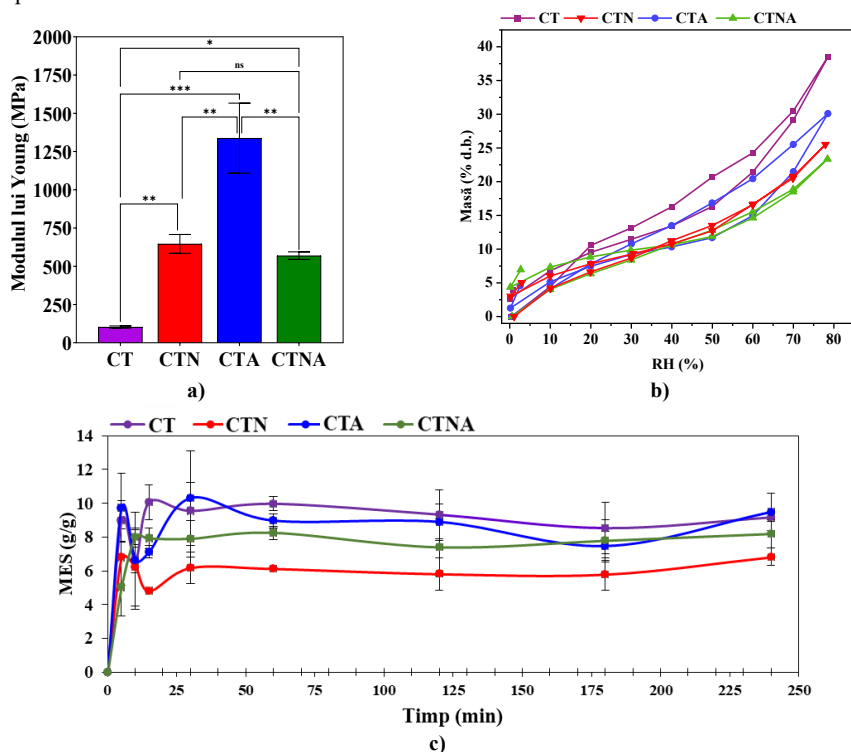


Figura III.3. a) Valorile modulului lui Young (MPa) ale nanofibrelor investigate (ns - $p > 0,05$, * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$, *** - $p \leq 0,001$), **b)** Izotermele de sorbție a vaporilor de apă și **c)** Gradul masic de umflare la echilibru (g/g) a fibrelor investigate în PBS pH 7,4 pe parcursul a 240 de minute.

Analiza **DVS** a indicat prezența porilor intrafibrilari prin izotermele de sorbție – desorbție, caracteristice materialelor mezoporoase (pseudo-tip II cu buclă de histerezis de tip H3) [25]. Bucla de histerezis H3, specifică porilor de tip "sticlă cu gât", explică de ce cantitatea de apă adsorbită este mare și eliberarea este lentă. Creșterea treptată inițială a adsorbției vaporilor de apă indică fizisorbție, în timp ce creșterea abruptă ulterioară sugerează condensarea în pori. Dimensiunea porilor intrafibrilari a fost de aprox. 3 nm pentru toate probele. Cantitatea maximă de apă adsorbită a scăzut de la aprox. 38% pentru CT la 23% pentru CTNA, din cauza reducerii grupărilor hidroxil libere ale chitosanului, care sunt implicate în legături intermoleculare cu antibioticul și aldehida [25].

Deoarece rănila, în special arsurile, produc exsudat abundent, **capacitatea de umflare** a fost investigată în PBS 7,4. Fibrele au demonstrat o capacitate mare de retenție a lichidelor în primele 5 minute, atingând un grad masiv de umflare la echilibru (MES) de până la 10 g/g (Figura III.3.c). Capacitatea de umflare a nanofibrelor a fost bine păstrată în timp, chiar și în pH alcalin, prezentând doar variații ușoare, ceea ce este în concordanță cu natura solubilă a chitosanului cuaternizat. După o oră, toate probele au atins un platou, cu valori ale gradului masiv de umflare la echilibru mai mari de 6, confirmând capacitatea lor ridicată de retenție a umidității pe termen lung. Per ansamblu, capacitatea de umflare a fost similară pentru toate formulările, indiferent de compoziția lor, cu valori MES comparabile cu cele ale bandajelor comerciale pentru răni [8].

Activitatea antioxidantă a formulărilor (Figura III.4.a) a variat în funcție de compoziție. Fibrele martor CT au avut o eficiență de captare a radicalilor de aprox. 63%. Activitatea a scăzut la 56% pentru fibrele care conțineau fie doar NFX, fie doar aldehidă, din cauza implicării grupărilor hidroxil și amino ale chitosanului în interacțiuni intermoleculare cu NFX sau A, reducând disponibilitatea lor pentru captarea radicalilor.

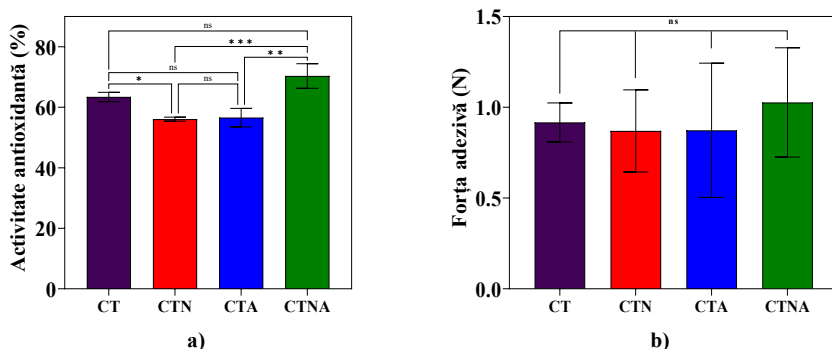


Figura III.4. a) Activitatea antioxidantă (%) a nanofibrelor evaluată prin metoda de captare DPPH (ns - $p > 0,05$, * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$, *** - $p \leq 0,001$) și **b)** Forța adezivă (N) necesară pentru a detașa nanofibrele de pe pielea de pui utilizată ca țesut model (ns - $p > 0,05$).

În mod surprinzător, fibrele compozite ce conțin ambele substanțe (CTNA) au prezentat rezultate superioare, atingând aproape 70% activitate antioxidantă, sugerând un efect sinergic al componentelor, inclusiv activitatea antioxidantă intrinsecă a derivaților de chinolonă. Această îmbunătățire se poate datora unor interacțiuni intermoleculare puternice (posibile legături dative

între NFX și atomul de bor al A) care expun grupările active din chitosan, NFX și A, permițându-le să acționeze ca inhibitori de radicali.

În ceea ce privește **bioadezivitatea**, forța necesară pentru a îndepărta nanofibrele de pe un țesut model, aceasta a fost similară pentru toate probele, având o valoare în jur de 0,9 N (Figura III.4.b). Această forță asigură o bună aderență la rană, minimizând mișcarea și menținând integritatea țesutului, fiind comparabilă cu cea raportată pentru alte biomateriale pe bază de chitosan [26].

III.1.2.4. Biodegradarea și cinetica de eliberare

Biodegradarea nanofibrelor a fost studiată timp de 21 de zile în medii cu lizozimă (enzimă prezentă în exsudatul plăgilor) la diferite pH-uri, în conformitate cu evoluția pH-ului în timpul vindecării (7,4 pentru procesul normal, până la 10 în cazul infecției) [27].

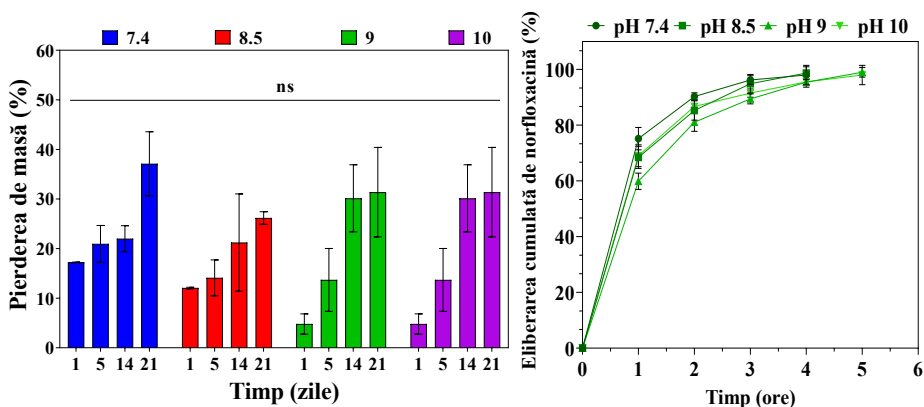


Figura III.5. (stânga) Reprezentare grafică a pierderii de masă (%) a nanofibrelor la 1, 5, 14 și 21 de zile, în 4 medii de lizozimă preparate în diferite soluții tampon de pH (7,4, 8,5, 9 și 10) pentru proba: **d)** CTNA. **Figura III.6.** (dreapta) Evaluarea cineticii de eliberare *in vitro* a NFX din probele de nanofibre **b)** CTNA, pe parcursul a 5 ore.

Indiferent de compoziție, **biodegradarea** a evoluat progresiv pe parcursul celor 21 de zile. Pentru fibrele martor CT, degradarea a atins ~40%, cu cea mai mare pierdere de masă la pH=10, deoarece activitatea enzimei este superioară în mediul bazic [28]. Rata biodegradării a crescut prin încapsularea NFX, în concordanță cu solubilitatea crescută a antibioticului în medii alcaline [29]. Prezența aldehidei a determinat o pierdere de masă mai mare la pH=9 și 10. Fibrele compozite CTNA s-au degradat până la 40%, fiind influențate de pH doar în prima zi (Figura III.5.d). S-a observat că probele s-au dezintegrat complet în medii cu pH acid (pH=5,5), specific dermului normal, confirmând faptul că fibrele sunt bioresorbabile pe parcursul etapelor de vindecare.

Viteza de eliberare a NFX a fost evaluată *in vitro* în medii care mimează exsudatul plăgilor (Figura III.6.). S-a constatat că antibioticul a fost eliberat progresiv în decursul a 5 ore, fără diferențe semnificative între probele iminate și cele neimate. Mai mult, pH-ul nu a influențat semnificativ modelul de eliberare, asigurând eliberarea medicamentului la locul plăgii, indiferent de evoluția vindecării. Deși eliberarea este relativ rapidă, prezența NFX în primele ore este esențială în profilaxia infecțiilor.

III.1.2.5. Evaluarea citotoxicității *in vitro* și a activității antimicrobiene

Biocompatibilitatea nanofibrelor a fost evaluată *in vitro* pe celule NHGF, conform standardului ISO 10999, care a o viabilitate relativă a celulelor de peste 70% pentru ca un material să fie considerat citocompatibil. Toate nanofibrele investigate au îndeplinit acest standard (Figura III.7.).

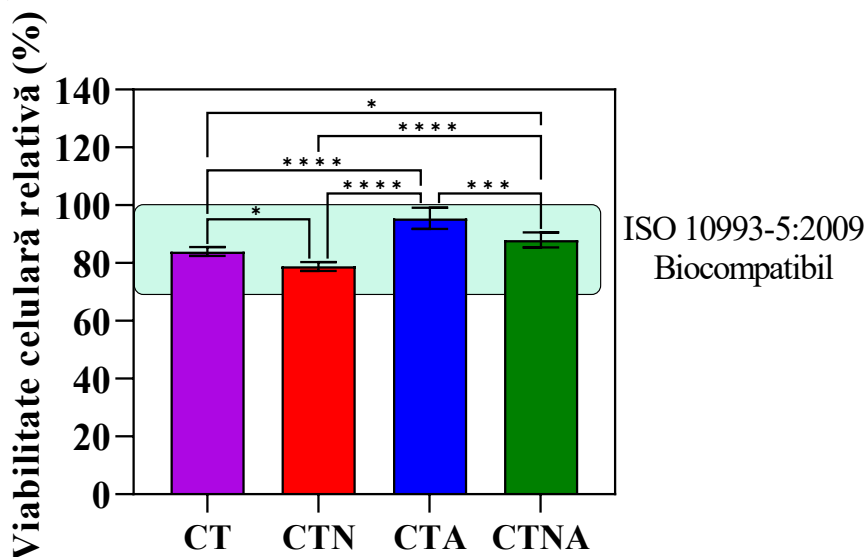


Figura III.7. Evaluarea biocompatibilității *in vitro* pe linia celulară NHGF, în conformitate cu ISO10993

Viabilitatea relativă a fost de 84% pentru fibrele binare CT și a scăzut ușor la 79% după încapsularea NFX, indicând un efect negativ minor al antibioticului. În contrast, iminarea cu monoaldehidă a crescut viabilitatea la 95%. Fibrele compozite CTNA au atins o valoare intermediară de 88%. Astfel, datele confirmă faptul că toate biomaterialele studiate sunt citocompatibile și pot fi utilizate în siguranță în contact cu fibroblastele.

Riscul de infecție microbiană este o provocare majoră în vindecarea rănilor, motiv pentru care **activitatea antimicrobiană** a pansamentelor este importantă. Nanofibrele studiate au demonstrat o activitate antibacteriană puternică împotriva bacteriilor Gram-negative și Gram- pozitive, precum și activitate antifungică împotriva *C. glabrata* (Figura III.8.). Fibrele CT au fost eficiente, în special împotriva *E. coli* (zonă de inhibiție de 36 mm) și *S. aureus* (28 mm), datorită capacității chitosanului cuaternizat de a perturba membrana celulară bacteriană. Așa cum era de așteptat, prezența antibioticului în fibrele CTN și CTNA a crescut semnificativ activitatea antibacteriană, atingând zone de inhibiție de 40 mm împotriva *E. coli*.

Deși prezența acidului 2-formilfenilboronic a condus la o ușoară scădere a activității antibacteriene, aceasta a conferit fibrelor activitate antifungică. Mecanismul antifungic al acestei aldehide este atribuit inhibării enzimei leucil-ARNt sintetază (LeuRS), esențială pentru sinteza proteinelor fungice [30].

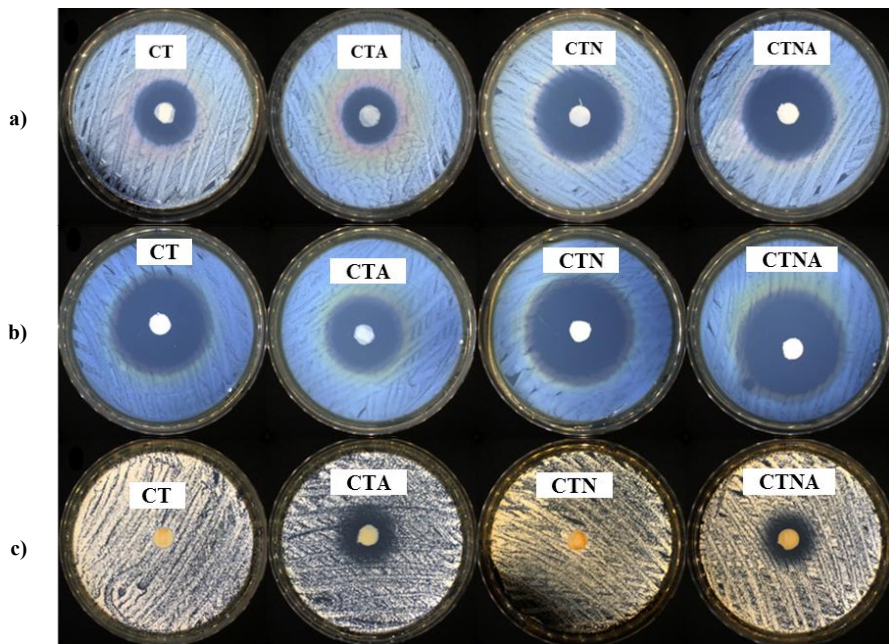


Figura III.8. Imagini reprezentative ale zonelor de inhibiție generate de nanofibrele investigate împotriva a) *S. aureus*, b) *E. coli* și c) *C. glabrata*.

Un aspect important de menționat este că activitatea antimicrobiană a fibrelor s-a conservat în timp, rezultatele testului de difuzie pe disc fiind comparabile între probele proaspăt preparate și cele vechi de 1,5 ani, indicând o durată de valabilitate extinsă.

III.1.2.6. Evaluarea toxicității acute *in vivo*

Evaluarea biocompatibilității *in vivo* a nanofibrelor implantate subcutanat la șobolani nu a arătat modificări semnificative ale parametrilor hematologici, biochimici sau imunologici față de grupul de control, indicând un răspuns inflamator minim sau inexistent și o interacțiune pozitivă cu țesuturile gazdă. Profilul biochimic stabil, confirmat de activitatea nemodificată a GPT, GOT, LDH (Figura III.9.c), ureei și creatininei (Figura III.9.d), susține compatibilitatea sistemică, demonstrând că funcțiile hepatică și renală nu au fost afectate. Parametrii imunologici consecvenți, inclusiv activitatea complementului seric și capacitatea de fagocitoză a PMN (Figura III.9.e), sugerează că nanofibrele nu induc răspunsuri imune semnificative.

Pe parcursul celor 7 zile de studiu, nu au existat modificări semnificative statistic ale greutății corporale și nici semne de suferință sau comportament anormal, indicând absența toxicității sistemice. Aportul de alimente și apă a rămas constant. La disecția locului implantului după 7 zile, nu a fost observat material rezidual sau țesut de granulație, sugerând degradarea sau integrarea fără a declanșa fibroză sau încapsulare fibrotică. Datele hematologice, inclusiv numărul de hematii, Hb și Ht (Figura III.9.a, Figura IV.28.a), precum și valorile formulei leucocitare (Figura III.9.b, Figura IV.28.b), nu au prezentat diferențe notabile. Faptul că nu au existat modificări semnificative în nivelul PMN, care sunt cruciale în profilaxia infecțiilor, sugerează un

control eficient al infecției, în concordanță cu proprietățile antimicrobiene ale fibrelor, indicând totodată potențialul fibrelor pe bază de chitosan cuaternizat de a modula răspunsul imun.

În concluzie, nanofibrele studiate au demonstrat o bună biocompatibilitate *in vivo*, fără a provoca modificări semnificative ale parametrilor hematologici, biochimici sau imunologici, confirmând absența reacțiilor inflamatorii sau toxice și un potențial promițător pentru aplicații terapeutice în vindecarea rănilor sau administrarea controlată a medicamentelor.

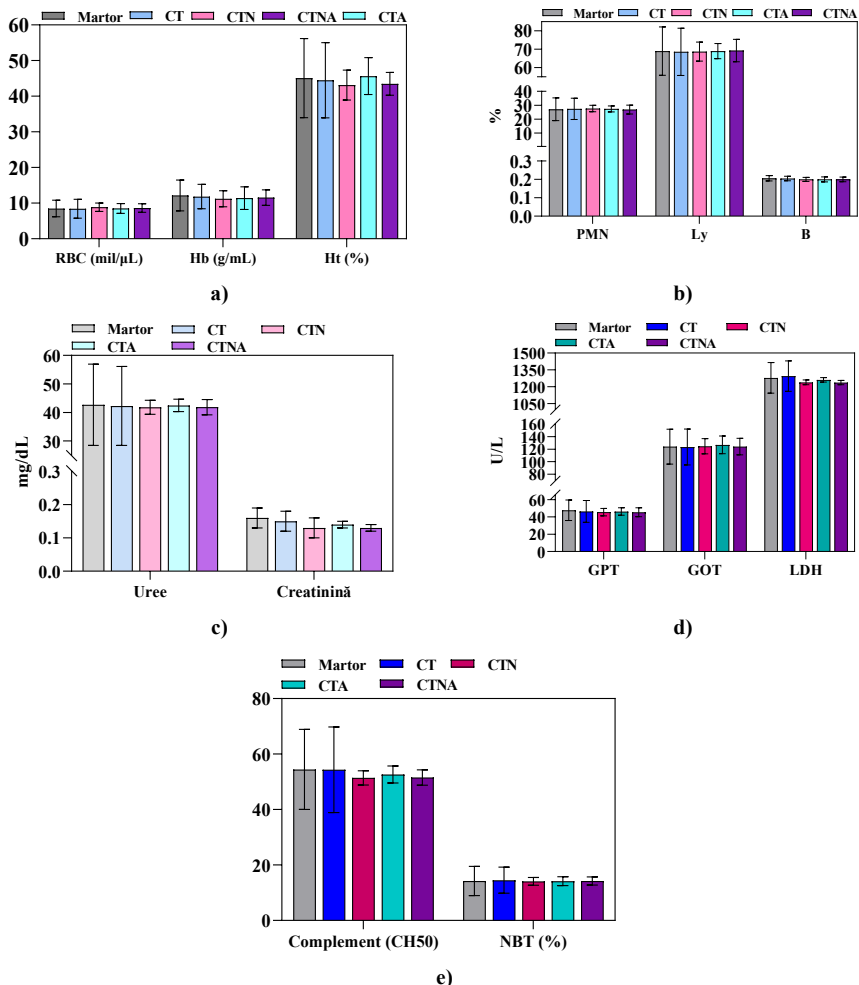


Figura III.9. Investigarea parametrilor hematologici la 24 de ore după implantare: **a)** hemoglobină (Hb), hematocrit (Ht) și hematii (RBC), **b)** procent de neutrofile polimorfonucleare (PMN), limfocite (Ly) și bazofile (B), **c)** uree și creatinină, **d)** transaminaza glutam-piruvică (GPT) transaminaza glutam-oxaloacetică (GOT), lactat dehidrogenază (LDH) și **e)** activitatea complementului (CH50) și activitatea fagocitară a PMN-urilor (NBT%).

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată „**Formulări pe bază de chitosan pentru eliberare controlată de antibiotice**” conține 206 pagini împărțite în patru capitole, fiind incluse 5 scheme, 100 de figuri, 36 de tabele și 406 referințe bibliografice. Teza este alcătuită din două părți: Partea I (*Capitolul I*) care conține un studiu de literatură și Partea a-II-a (*Capitolele II-IV*) care este format din contribuțiile proprii și se încheie cu concluziile generale.

Partea I a lucrării reunește o sinteză a datelor din literatura de specialitate care subliniază relevanța temei investigate. Sunt prezentate cele mai semnificative informații privind formulările moderne pe bază de chitosan și derivații săi, utilizate pentru eliberarea controlată a antibioticelor, cu un accent deosebit pe eritromicină și norfloxacină. De asemenea, sunt evidențiate limitările actuale și dezavantajele asociate terapiei convenționale cu aceste două substanțe active, precum și profilul lor farmaceutic din prisma relației structură chimică-activitate, mecanismului de acțiune, indicațiilor terapeutice, posologiei și proprietăților farmacocinetice.

Partea a-II-a descrie rezultatele originale obținute în cadrul stagiului doctoral, acestea fiind în deplină concordanță cu obiectivele propuse, după cum urmează:

- ❧ Obținerea, caracterizarea și investigarea proprietăților nanofibrelor binare pe bază de chitosan/HTCC ce încapsulează eritromicină și sunt iminate cu o aldehidă izomer de vanilină cu activitate antioxidantă;
- ❧ Obținerea și caracterizarea de nanoparticule lipozomale ce încapsulează eritromicină și sunt acoperite cu oligomeri de chitosan;
- ❧ Obținerea și caracterizarea de nanofibre binare pe bază de chitosan/TMC ce conțin norfloxacină și sunt iminate la suprafață cu o monoaldehidă antifungică.

În urma realizării acestor studii, pot fi enunțate următoarele concluzii generale:

1. A fost obținută și caracterizată o serie de 6 nanofibre binare pe bază de chitosan/HTCC în diferite rapoarte de masă, simple sau sigilate cu 2H5MB, urmărindu-se validarea tehnicii de iminare. În acest sens, s-au realizat următoarele:
 - ❖ Au fost obținute neșesute prin electrofilarea unui amestec ternar de CS/HTCC/PEO, utilizând diverse rapoarte de masă între CS/HTCC și păstrând constantă cantitatea de PEO, acesta din urmă având rol de agent de co-filare și matrice de sacrificiu, fiind îndepărtat integral din material.
 - ❖ Funcționalizarea (iminarea) fibrelor a fost realizată cu o aldehidă, izomer de vanilină (2-hidroxi-5-metoxi-benzaldehidă: 2H5MB), prin pulverizarea unei soluții ale acestora pe ambele fețe ale nanofibrelor, urmată de uscarea într-un spațiu închis pentru a permite reacția completă.
 - ❖ Reacția de iminare a fost confirmată prin spectroscopie FTIR și RMN, aceste metode demonstrând legarea covalentă a 2H5MB de chitosan și de chitosanul cuaternizat, prin formarea legăturii reversibile imină.
 - ❖ Microscopia SEM a dezvăluit formarea de fibre netede, lipsite de defecte, cu un diametru mediu de aproximativ 118 nm înainte de iminare și 136 nm după iminare.
 - ❖ Microscopia POM a arătat o ușoară birefrință a fibrelor, sugerând o ordonare cristalină a macromoleculelor în cadrul procesului de electrofilare.
 - ❖ Cuantificarea 2H5MB din fibre prin spectroscopie UV-Vis a relevat grade variabile de reținere a aldehidei, de la 2,72% la 7,36 %, în funcție de probă.

- ❖ Cinetica de eliberare a aldehidei a indicat o eliberare de la 4,14% la 12,09% în primele 15 minute, urmată de o eliberare progresivă în primele 8 ore de până la 81,58%, atingându-se un platou după 48 de ore.
2. A fost obținută și caracterizată o serie de 12 nanofibre binare pe bază de chitosan/HTCC în diferite rapoarte de masă, (i) simple, (ii) funcționalizate la suprafață cu 2H5MB, (iii) ce încapsulează eritromicină și (iv) ce conțin atât 2H5MB cât și ERY.
- ❖ Prepararea și sigilarea neșesutelor a fost realizată în mod similar cu metodele descrise la punctul anterior, cu diferența că fibrele au fost obținute prin tehnica electrofilării fără ac. În plus, ERY a fost încorporată prin imersarea într-o soluție etanolică saturată a acestora.
 - ❖ Utilizând spectroscopia FTIR și RMN, și analiza termogravimetrică ATG, s-a demonstrat prezența tuturor componentelor în fibre, succesul conversiei grupărilor amino în grupări imină și îndepărtarea completă a PEO.
 - ❖ Cuantificarea procentului de 2H5MB legată chimic de CS a fost aproximativ 3% din masa totală a fibrelor, indicând totodată o omogenitate a reacției la suprafață. În schimb, determinarea cantitativă a ERY prin metoda UV-Vis a indicat un procent mare de ERY în probele încărcate simple, în jur de 7%, și o cantitate redusă în probele încărcate și sigilate, în jur de 1%.
 - ❖ Difractogramele XRD împreună cu microscopia SEM și POM au indicat că s-a obținut o rețea tridimensională de fibre, formând o neșesută cu pori interfibrilari neregulați de aproximativ 1 μm și diametrul mediu sub 150 nm, în care componentele au fost integrate cu succes și cu o textură birefringentă ce denotă starea semicristalină a formulărilor obținute.
 - ❖ Experimentele de sorbție dinamică a vaporilor de apă (DVS) au arătat că toate probele de fibre dețin o capacitate semnificativă de a reține apa, variind de la 37% la 130%, probele funcționalizate prezentând o sorbție crescută față de probele simple cu ERY. Metoda a permis calculul diametrului porilor intra-fibrilari rezultați prin îndepărtarea PEO-ului, încadrându-se în intervalul 2,7 – 4,2 nm. Capacitatea ridicată de absorbție a apei determinată din metoda DVS a fost confirmată de valorile maxime ale MES de 34,91 g/g în apă și 16,89 g/g în PBS, valori reprezentative pentru pansamentele destinate tratării rănilor cu grad ridicat de exsudare.
 - ❖ Degradarea enzimatică a urmat o tendință comparabilă cu cea a procesului de umflare, înregistrându-se o pierdere de masă de până la 40% în cazul fibrelor cu cel mai ridicat conținut de HTCC.
 - ❖ Investigarea proprietăților adezive a condus la confirmarea caracterului mucoadeziv, influențat în principal de conținutul de HTCC, determinându-se totodată forța adezivă a probelor, care a fost moderată (de la 0,5 la 2 N), concluzionând că acestea prezintă o aderență potrivită aplicării pe mucoase.
 - ❖ Eliberarea controlată a agenților bioactivi din nanofibre a evidențiat o influență reciprocă între ERY și 2H5MB, conducând la o stabilizare îmbunătățită și o eliberare progresivă, prezentând o eliberare în prima oră a 2H5MB cuprinsă între ~13 – 16% și a ERY de ~18 – 30%, față de ~18 – 21% și respectiv ~58 – 96% în fibrele simple funcționalizate sau care încorporează medicament.

- ❖ Încorporarea ERY, 2H5MB, sau a combinației lor, a determinat o creștere progresivă și semnificativă statistic a activității antioxidante, atingând valori cu până la 40% peste cea a fibrelor martor (AA= 90%).
 - ❖ Nanofibrele formulate au prezentat activitate antimicrobiană eficientă împotriva mai multor tulpini, chiar și la concentrații reduse de antibiotic (diametrul zonei de inhibiție al C_{IEV} față de *S. aureus* = 29,05 mm), evidențiind potențialul lor în prevenirea infecțiilor.
 - ❖ Biomaterialele testate au demonstrat o citocompatibilitate *in vitro* în conformitate cu standardele ISO, cu excepția cazurilor în care fibrele au fost funcționalizate cu cantități mari de 2H5MB. Asocierea 2H5MB–ERY s-a dovedit benefică, reducând citotoxicitatea izovanilinei și susținând proliferarea celulară, fapt ce indică un potențial promițător pentru aplicații biomedicale sigure.
 - ❖ Testele de biocompatibilitate *in vivo* au confirmat siguranța formulărilor testate, demonstrând capacitate de modulară imună, toxicitate sistemică redusă, absența semnelor de tromboză sau reacțiilor de hipersensibilizare și capacitate de reducere a stresului oxidativ, comparativ cu grupul de control.
3. A fost realizat un studiu de optimizare a obținerii de lipozomi încărcăți cu ERY și acoperiți cu oligomeri de chitosan (OCS), prin metoda hidratării filmului subțire. A fost investigat:
- ❖ Efectul raportului dintre fosfatidilcolină (FC):ERY, concluzionându-se că raportul de 6:1 a oferit cele mai bune caracteristici, fiind selectat pentru analize ulterioare datorită dimensiunii reduse, stabilității și uniformității crescute a particulelor.
 - ❖ Efectul mediului de hidratare, observându-se că hidratarea în PBS 7,4 și prelungirea timpului de hidratare la 72 de ore au îmbunătățit uniformitatea și calitatea suspensiei lipozomale, fără a afecta semnificativ dimensiunea particulelor.
 - ❖ Efectul extrudării vs. cel al sonicării cu sondă pentru reducerea și omogenizarea dimensiunii particulelor, precum și efectul concentrației de chitosan în soluția de acoperire. Extrudarea s-a dovedit a fi cea mai eficientă și controlabilă metodă pentru obținerea lipozomilor cu dimensiuni nanometrice, iar concentrația de 0,5% OCS a oferit cea mai bună stabilitate coloidală.
 - ❖ Efectul dimensiunii porilor membranei utilizate în procesul de extrudare, observându-se că la extrudarea consecutivă prin membrane cu dimensiuni ale porilor din ce în ce mai reduse nu există diferențe semnificative față de extrudarea directă.
 - ❖ Efectul masei moleculare a CS, observându-se că scăderea masei moleculare a acestuia a dus la obținerea unor lipozomi cu dimensiuni scăzute, uniformitate crescută și eficiență mai mare de încapsulare a ERY.
 - ❖ Efectul adăugării sucrozei asupra dimensiunii particulelor și morfologiei, constatând faptul că liofilizarea lipozomilor folosind sucroza ca agent crioprotector a contribuit semnificativ la menținerea caracteristicilor fizico-chimice ale formulărilor după redispersare. Probele cu concentrația cea mai ridicată de sucroză au prezentat cel mai bun echilibru între protecția dimensiunii particulelor și claritatea suspensiei. Probele fără sucroză au evidențiat aglomerări semnificative după liofilizare.
4. Au fost obținute și caracterizate nanoparticule lipozomale acoperite cu oligomeri de chitosan ce încapsulează eritromicină, ținând cont de rezultatele studiului de optimizare:
- ❖ Prepararea lipozomilor încărcăți cu ERY și acoperiți cu OCS s-a realizat prin hidratarea unui film lipidic subțire obținut prin evaporare rotativă, urmat de extrudare și dispersare

într-o soluție de OCS. Formularea lipozomală a fost stabilizată suplimentar într-o soluție de sucroză și dializată pentru îndepărtarea medicamentului liber și a urmelor de acid acetic.

- ❖ Caracterizarea structurală prin spectroscopie FTIR și RMN a demonstrat prezența tuturor componentelor formulării lipozomale și interacțiunile fizice dintre acestea, confirmând încapsularea eficientă a ERY și acoperirea cu oligomeri de chitosan.
- ❖ Analiza XRD și POM a formulării a evidențiat că ERY este distribuită amorf, la nivel molecular, în stratul lipidic, și că proba prezintă domenii ușor birefringente. Prin utilizarea ciclurilor încălzire/răcire cuplate cu microscopia POM s-a constatat că acoperirea cu OCS a îmbunătățit semnificativ stabilitatea termică a lipozomilor.
- ❖ Imaginile STEM și AFM au confirmat morfologia sferică, dimensiunile uniforme (diametru mediu măsurat ~97 nm) și stabilitatea structurală a lipozomilor acoperiți, evidențiind eficiența acoperirii cu OCS în prevenirea agregării.
- ❖ Măsurătorile DLS au permis confirmarea dimensiunii nanometrice a lipozomilor (97,37 nm), precum și dispersia uniformă ($PDI=0,1$), sarcina de suprafață pozitivă (~9 mV) și o stabilitate coloidală bună, validând rezulatele STEM. Formularea optimizată s-a menținut stabilă timp de cel puțin 6 săptămâni, în special la 25 °C, fapt ce o recomandă pentru aplicații farmaceutice sigure și reproductibile.
- ❖ Determinarea cantitativă prin UV-Vis a ERY a arătat că formularea lipozomală optimizată are o eficiență de încapsulare satisfăcătoare (62,88%).
- ❖ Studiul cineticii de eliberare a relevat o eliberare susținută de până la 75% în 10 ore, evidențiind rolul acoperirii cu chitosan în protejarea și controlul eliberării medicamentului în condiții similare celor fiziologice.
- ❖ Investigarea proprietăților mucoadezive prin măsurarea modificării de turbiditate la contactul cu mucina, a demonstrat adezivitate foarte bună, confirmată prin scăderea semnificativă a transparenței în prezența mucinei de la 41,57% la 3,19%, susținând potențialul lor pentru eliberarea prelungită a eritromicinei la nivelul mucoaselor.
- ❖ Evaluarea activității antioxidante a confirmat un efect sinergic al componentelor, cu valori de ~80% pentru formularea completă. Aceste rezultate au fost atribuite în principal prezenței OCS, deși atât FC cât și ERY au demonstrat capacitate de captare a radicalilor, susținând aplicabilitatea formulării în tratamente ce implică combaterea stresului oxidativ.
- ❖ Formulările lipozomale au demonstrat o activitate antibacteriană rapidă și eficientă, în special împotriva *E. faecalis*, depășind performanța antibioticului liber și subliniind potențialul lor în profilaxia infecțiilor și dezvoltării rezistenței bacteriene.
- ❖ În urma testelor de citotoxicitate pe fibroblaste gingivale s-a concluzionat că lipozomii au prezentat o citocompatibilitate bună, respectând standardele ISO și indicând un profil de siguranță adecvat pentru aplicații biomedicale, cu un posibil rol protector al ERY asupra celulelor.

5. Au fost obținute și caracterizate nanofibre binare pe bază de chitosan/TMC încărcate cu norfloxacină și funcționalizate la suprafață cu acid 2-formilfenilboronic.

- ❖ Prepararea nanofibrelor a fost realizată prin electrofilarea unui amestec ternar de CS/TMC/PEO, acesta din urmă fiind îndepărtat ulterior.

- ❖ Funcționalizarea fibrelor cu monoaldehidă a fost realizată prin pulverizarea unei soluții a acesteia pe ambele fețe ale nanofibrelor, urmată de o etapă de uscare într-un mediu închis, favorabil desfășurării complete a reacției.
- ❖ Încorporarea NFX în fibre s-a realizat prin metoda adsorbției, prin imersarea bucăților de nanofibre în soluție etanolică și incubarea acestora timp de 24 de ore, după care au fost uscate în condiții atmosferice.
- ❖ Spectroscopia FTIR și RMN a confirmat prezența tuturor componentelor și formarea legăturilor de tip imină, iar termogramele ATG au arătat eliminarea eficientă a PEO din fibre.
- ❖ Eficiența de încapsulare a NFX în nanofibre a fost adecvată și relativ uniformă (~3,5%), sugerând că medicamentul este distribuit preponderent în interiorul fibrelor.
- ❖ Analiza morfologică prin POM, SEM și XRD a evidențiat că nanofibrele păstrează o morfologie stabilă în timp, cu un diametru mediu constant (~150 nm).
- ❖ Nanofibrele compozite au prezentat proprietăți mecanice îmbunătățite, cu valori ale modulului elastic de până la 1250 Mpa.
- ❖ Capacitatea de reținere a umidității determinată prin DVS a prezentat rezultate satisfăcătoare (23,3% – 38,5%), demonstrând o creștere treptată a absorbției vaporilor de apă odată cu creșterea umidității relative și desorbția acestora odată cu descreșterea acesteia, sugerând capacitate de a transfera umiditatea din răni către mediul exterior. Dimensiunea porilor determinată din aria BET a fost de aproximativ 3 nm pentru toate probele.
- ❖ Fibrele au prezentat capacitate de umflare ridicată, cu o retenție a umidității de 10 g/g în primele 5 minute.
- ❖ Fibrele compozite au demonstrat o activitate antioxidantă superioară (~70%), sugerând capacitatea acestora de a contribui la sprijinirea procesului de vindecare a rănilor prin controlul stresului oxidativ.
- ❖ Nanofibrele testate au prezentat o biodezivitate adecvată (0,9 N), comparabilă cu cea a altor materiale pe bază de chitosan.
- ❖ Investigarea biodegradării enzimatică a nanofibrelor a relevat un comportament de degradare adaptabil mediului local al plăgii, degradându-se progresiv în funcție de pH și menținându-și integritatea structurală în timpul vindecării. Degradarea completă în medii acide a confirmat bioresorbabilitatea acestora, oferind un avantaj esențial în evitarea debridării traumatiche și susținerea regenerării tisulare.
- ❖ Studiul cineticii de eliberare *in vitro* a arătat o eliberare rapidă și constantă a NFX din nanofibre, indiferent de pH.
- ❖ Testele de citocompatibilitate au confirmat că toate nanofibrele investigate sunt sigure pentru contactul cu celulele umane.
- ❖ Nanofibrele au demonstrat o activitate antimicrobiană și antifungică puternică și de durată, potențată de prezența NFX și a aldehydei, evidențiind eficiența acestor materiale ca pansamente active cu stabilitate îndelungată pentru prevenirea infecțiilor.
- ❖ Evaluarea toxicității *in vivo* a nanofibrelor implantate subcutanat a evidențiat o biocompatibilitate excelentă, fără semne de toxicitate sistemică sau reacții inflamatorii.

O parte dintre rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat au fost diseminate prin publicarea în articole științifice apărute în reviste internaționale indexate ISI.

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. **Vera-Maria Platon**, Brindusa Dragoi, Luminita Marin, Erythromycin formulations—a journey to advanced drug delivery, *Pharmaceutics*, (2022), 14(10), 2180. (FI ISI: 5,5; AIS: 0,901)
2. **Vera-Maria Platon**, Bianca-Iustina Andreica, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Isabela Andreea Sandu, Liliana Mititelu Tartau, Luminita Marin, Antioxidant-sealed chitosan nanofibers loaded with erythromycin: tissue regeneration biomaterials with immune-modulating effects in a rat model, *Carbohydrate Polymers*, (2025), 368(2), 124247. (FI ISI: 12,5; AIS: 1,433)
3. **Vera-Maria Platon**, Anda M. Craciun, Irina Rosca, Natalia Simionescu, Luminita Marin, Multifunctional erythromycin liposomes: A methodological optimization for enhanced mucoadhesion, antioxidant activity, and biocompatibility, *Biomaterials Science*, (2025). (FI ISI: 5,7; AIS: 1,433)
4. Sandu Cibotaru, Alexandru Anisie, **Vera-Maria Platon**, Irina Rosca, Isabela-Andreea Sandu, Corneliu-George Coman, Liliana Mititelu-Tartau, Bianca-Iustina Andreica, Luminita Marin, Imino-quaternized chitosan/chitosan nanofibers loaded with norfloxacin as potential bandages for wound healing, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2025), 144304. (FI ISI: 8,5; AIS: 1,013)

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

1. Dragos-Ioan Olariu, **Vera-Maria Platon**, Alina Ibanescu, Maria Daniela Vlad, Camelia Maria Zara-Danceanu, Doina Lutic, Luminita Marin, Brindusa Dragoi, LDH-chitosan bionanocomposites for oncologic applications: a refreshing perspective on the mutual influence through intermolecular forces towards controlled morphology and dispersion, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2025), 147495. (FI ISI: 8,5; AIS: 1,013)

Mobilități desfășurate pe parcursul stagiului de doctorat:

1. *Scientific Services Company Otava Ltd și Institutul de Biologie Moleculară și Genetică*, Kiev, Ucraina, sub îndrumarea Dr. Svitlana Chernii, 19.09.2021-18.10.2021

Participări la sesiuni științifice naționale și internaționale:

a) Comunicări orale

1. **Vera-Maria Platon**, Anda M. Craciun, Irina Rosca, Natalia Simionescu, Luminita Marin, *Nanometric em-vesicles with enhanced biopharmaceutical attributes*, Progress in Organic and Macromolecular Compounds 30th Edition, MACRO Iași 2025, Iași, România, 23 – 26 Septembrie 2025. – *Premiat cu Best Young Scientist Oral Presentation*
2. **Vera-Maria Platon**, Liliana Mititelu Tarțau, Bianca-Iustina Andreica, Luminița Marin, *Biodegradable chitosan/quaternized chitosan nanofibers linked with an antioxidant compound for the delivery of erythromycin*, Symposium of Chemical Engineering and Materials, SICHEM 2024, București, România, 11 – 12 aprilie 2024.
3. **Vera-Maria Platon**, Liliana Mititelu Tarțau, Bianca-Iustina Andreica, Luminița Marin, *Erythromycin loading into biodegradable chitosan/quaternized chitosan nanofibers imino-linked with 2-hydroxy-5-methoxy-benzaldehyde for a combined antioxidant and antibacterial activity*, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași, Pregătind viitorul promovând excelența, Ediția a XXXIV-a, Iași, România, 29 februarie – 3 martie 2024.

b) Prezentare de postere

1. **Vera-Maria Platon**, Sandu Cibotaru, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Isabela-Andreea Sandu, Corneliu-George Coman, Liliana Mititelu-Tartau, Bianca-Iustina Andreica, Luminita Marin, *Norfloxacin loaded biodegradable chitosan/quaternized chitosan nanofibers functionalized with an antifungal aldehyde as wound dressings*, Progress in Organic and Macromolecular Compounds 30th Edition, MACRO Iași 2025, Iași, România, 23 – 26 Septembrie 2025.
2. **Vera-Maria Platon**, Anda-Mihaela Crăciun, Luminița Marin, *Optimization of Chitosan-based Liposomal Formulation for Erythromycin*, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași, Pregătim viitorul promovând excelența, Ediția a XXXII-a, Iași, România, 28 februarie – 2 martie 2022.

Membru în echipa de implementare a proiectului: INTELLIGENT SYSTEMS FOR CANCER DIAGNOSIS AND TREATMENT (IntelDots), PNRR-III-C9-2022 – 18.

Bibliografie selectivă

1. Ta, Q.; Ting, J.; Harwood, S.; Browning, N.; Simm, A.; Ross, K.; Olier, I.; Al-Kassas, R. Chitosan Nanoparticles for Enhancing Drugs and Cosmetic Components Penetration through the Skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *160*, 105765, doi:10.1016/j.ejps.2021.105765.
2. Andreica, B.-I.; Anisie, A.; Rosca, I.; Sandu, A.-I.; Pasca, A.S.; Tartau, L.M.; Marin, L. Quaternized Chitosan/Chitosan Nanofibrous Mats: An Approach toward Bioactive Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Carbohydr Polym* **2023**, *302*, 120431, doi:10.1016/j.carbpol.2022.120431.
3. Kundu, A.; Mitra, A. Methoxybenzaldehydes in Plants: Insight to the Natural Resources, Isolation, Application and Biosynthesis. *Curr Sci* **2016**, *111*, 1325, doi:10.18520/cs/v111/i8/1325-1334.
4. Platon, V.-M.; Dragoi, B.; Marin, L. Erythromycin Formulations—A Journey to Advanced Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2180, doi:10.3390/pharmaceutics14102180.
5. Thavamani, A.; Sankararaman, S.; Al-Shakhshir, H.; Retuerto, M.; Velayuthan, S.; Sferri, T.J.; Ghannoum, M. Impact of Erythromycin as a Prokinetic on the Gut Microbiome in Children with Feeding Intolerance—A Pilot Study. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1606, doi:10.3390/antibiotics12111606.
6. Everett, J.R.; Tyler, J.W. An Analysis of the ¹H and ¹³C n.m.r. Spectra of Erythromycin a Using Two-Dimensional Methods. *J Chem Soc Perkin I* **1985**, 2599, doi:10.1039/p19850002599.
7. Omosola, O.; Chipara, D.M.; Uddin, M.; Lozano, K.; Alcoutlabi, M.; Padilla, V.; Chipara, M. On the Thermogravimetric Analysis of Polymers: Polyethylene Oxide Powder and Nanofibers. *J Appl Polym Sci* **2022**, *139*, doi:10.1002/app.52055.
8. Minsart, M.; Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Mignon, A. Commercial Wound Dressings for the Treatment of Exuding Wounds: An in-Depth Physico-Chemical Comparative Study. *Burns Trauma* **2022**, *10*, doi:10.1093/burnst/tkac024.
9. Bojorquez-Cuevas, S.M.; Armenta-Rojas, E.; Serrano-Medina, A.; Olivas-Sarabia, A.; Villarreal-Gómez, L.J.; Hurtado-Ayala, L.A.; Cornejo-Bravo, J.M. Improved Mucoadhesivity of Polyelectrolyte Complexes Films by Electrospinning for the Release of Nystatin in the Oral Cavity. *J Drug Deliv Sci Technol* **2024**, *92*, 105385, doi:10.1016/j.jddst.2024.105385.
10. Guimarães, D.; Cavaco-Paulo, A.; Nogueira, E. Design of Liposomes as Drug Delivery System for Therapeutic Applications. *Int J Pharm* **2021**, *601*, 120571, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120571.
11. Montenez, J.-P.; Van Bambeke, F.; Piret, J.; Brasseur, R.; Tulkens, P.M.; Mingeot-Leclercq, M.-P. Interactions of Macrolide Antibiotics (Erythromycin A, Roxithromycin, Erythromycylamine Dirithromycin, and Azithromycin) with Phospholipids: Computer-Aided Conformational Analysis and Studies on Acellular and Cell Culture Models. *Toxicol Appl Pharmacol* **1999**, *156*, 129–140, doi:10.1006/taap.1999.8632.
12. Yaroslavov, A.A.; Efimova, A.A.; Krasnikov, E.A.; Trosheva, K.S.; Popov, A.S.; Melik-Nubarov, N.S.; Krivtsov, G.G. Chitosan-Based Multi-Liposomal Complexes: Synthesis, Biodegradability and Cytotoxicity. *Int J Biol Macromol* **2021**, *177*, 455–462, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.169.

13. Djanashvili, K.; ten Hagen, T.L.M.; Blangé, R.; Schipper, D.; Peters, J.A.; Koning, G.A. Development of a Liposomal Delivery System for Temperature-Triggered Release of a Tumor Targeting Agent, Ln(III)-DOTA-Phenylboronate. *Bioorg Med Chem* **2011**, *19*, 1123–1130, doi:10.1016/j.bmc.2010.06.036.
14. Ailincăi, D.; Rosca, I.; Morariu, S.; Mititelu-Tartau, L.; Marin, L. Iminoboronate-Chitooligosaccharides Hydrogels with Strong Antimicrobial Activity for Biomedical Applications. *Carbohydr Polym* **2022**, *276*, 118727, doi:10.1016/j.carbpol.2021.118727.
15. Nunes, C.; Mahendrasingam, A.; Suryanarayanan, R. Quantification of Crystallinity in Substantially Amorphous Materials by Synchrotron X-Ray Powder Diffractometry. *Pharm Res* **2005**, *22*, 1942–1953, doi:10.1007/s11095-005-7626-9.
16. Pignatello, R.; Simerska, P.; Leonardi, A.; Abdelrahim, A.S.; Petronio, G.P.; Fuochi, V.; Furneri, P.M.; Ruozzi, B.; Toth, I. Synthesis, Characterization and in Vitro Evaluation of Amphiphilic Ion Pairs of Erythromycin and Kanamycin Antibiotics with Liposaccharides. *Eur J Med Chem* **2016**, *120*, 329–337, doi:10.1016/j.ejmech.2016.04.074.
17. Najaf Najafi, M.; Arianmehr, A.; Sani, A.M. Preparation of Barije (Ferula Gummosa) Essential Oil-Loaded Liposomes and Evaluation of Physical and Antibacterial Effect on Escherichia Coli O157:H7. *J Food Prot* **2020**, *83*, 511–517, doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-285.
18. Maliar, T.; Blažková, M.; Polák, J.; Maliarová, M.; Ůrgeová, E.; Viskupičová, J. Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of Selected Clinically Applied Antibiotics: Therapeutic Insights. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 1257, doi:10.3390/ph17101257.
19. Ramadan, S.; Tammam, S.N.; Shetab Boushehri, M.A.; Breitingner, H.-G.; Breitingner, U.; Mansour, S.; Lamprecht, A. Liposomal Delivery of Functional Transmembrane Ion Channels into the Cell Membranes of Target Cells; a Potential Approach for the Treatment of Channelopathies. *Int J Biol Macromol* **2020**, *153*, 1080–1089, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.238.
20. Sobczak, M.; Witkowska, E.; Olędzka, E.; Kolodziejski, W. Synthesis and Structural Analysis of Polyester Prodrugs of Norfloxacin. *Molecules* **2008**, *13*, 96–106, doi:10.3390/molecules13010096.
21. Belowich, M.E.; Stoddart, J.F. Dynamic Imine Chemistry. *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 2003, doi:10.1039/c2cs15305j.
22. Sahoo, S.; Chakraborti, C.K.; Behera, P.K.; Mishra, S.C. FTIR and Raman Spectroscopic Investigations of a Norfloxacin/Carbopol934 Polymeric Suspension. *Journal of Young Pharmacists* **2012**, *4*, 138–145, doi:10.4103/0975-1483.100017.
23. Anisie, A.; Andreica, B.-I.; Mititelu-Tartau, L.; Coman, C.G.; Bilyy, R.; Bila, G.; Rosca, I.; Sandu, A.-I.; Amler, E.; Marin, L. Biodegradable Trimethyl Chitosan Nanofiber Mats by Electrospinning as Bioabsorbable Dressings for Wound Closure and Healing. *Int J Biol Macromol* **2023**, *249*, 126056, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126056.
24. Hosseini, S.A.; Javad Hoseini, S.; Askari, V.R.; Salarinia, R.; Ebrahimzadeh-Bideskan, A.; Tara, F.; Kermani, F.; Nazarnezhad, S.; Kargozar, S. Pectin-Reinforced Electrospun Nanofibers: Fabrication and Characterization of Highly Biocompatible Mats for Wound Healing Applications. *J Drug Deliv Sci Technol* **2022**, *77*, 103916, doi:10.1016/j.jddst.2022.103916.
25. Sing, K.S.W.; Williams, R.T. Physisorption Hysteresis Loops and the Characterization of Nanoporous Materials. *Adsorption Science & Technology* **2004**, *22*, 773–782, doi:10.1260/0263617053499032.
26. Duan, W.; Bian, X.; Bu, Y. Applications of Bioadhesives: A Mini Review. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, *9*, doi:10.3389/fbioe.2021.716035.
27. Ono, S.; Imai, R.; Ida, Y.; Shibata, D.; Komiya, T.; Matsumura, H. Increased Wound PH as an Indicator of Local Wound Infection in Second Degree Burns. *Burns* **2015**, *41*, 820–824, doi:10.1016/j.burns.2014.10.023.
28. Davies, R.C.; Neuberger, A.; Wilson, B.M. The Dependence of Lysozyme Activity on PH and Ionic Strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **1969**, *178*, 294–305, doi:10.1016/0005-2744(69)90397-0.
29. Yu, X.; Zipp, G.L.; Davidson III, G.W.R. The Effect of Temperature and PH on the Solubility of Quinolone Compounds: Estimation of Heat of Fusion. *Pharm Res* **1994**, *11*, 522–527, doi:10.1023/A:1018910431216.
30. Borys, K.M.; Wiecezorek, D.; Pecura, K.; Lipok, J.; Adamczyk-Woźniak, A. Antifungal Activity and Tautomeric Cyclization Equilibria of Formylphenylboronic Acids. *Bioorg Chem* **2019**, *91*, 103081, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103081.