

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

***BIOMATERIALE MICRO ȘI NANOSTRUCTURATE PE
BAZĂ DE POLIZAHARIDE: OBȚINERE, STRUCTURĂ ȘI
PROPRIETĂȚI***
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:
Dr. Habil. MARCELA MIHAI

Student-doctorand:
ELENA-DANIELA LOTOS

2025

ACADEMIA ROMÂNĂ

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **15.12.2025**, ora **11⁰⁰**, în Sala de Conferințe a Pavilionului „Acad. Bogdan C. Simionescu” de la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat **„Biomateriale micro și nanostructurate pe bază de polizaharide: obținere, structură și proprietăți”**, autor **bioing. Elena-Daniela LOTOS**, în vederea acordării titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE: CS I Dr. Maria CAZACU

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC: CS I Dr. habil. Marcela MIHAI

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

REFERENȚI: CS I Dr. Habil. Luminița MARIN

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

Conf. Dr. Robert-Vasile GRADINARU

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași

Conf. Dr. Ing. Florin CIOLACU

Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași

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

Director ICMPP,

CS I Dr. Valeria HARABAGIU

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI.....	I
LISTA FIGURILOR ȘI SCHEMELOR.....	III
LISTA TABELELOR.....	XII
INTRODUCERE.....	1/1
PARTEA I-A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	6
CAPITOLUL 1. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide.....	6
1.1. Clasificarea și aplicațiile biomaterialelor.....	6
1.1.1. Clasificarea biomaterialelor.....	6
1.1.2. Aplicații ale biomaterialelor.....	8
1.2. Polizaharide.....	12
1.2.1. Clasificarea polizaharidelor.....	12
1.2.2. Alginat.....	15
1.2.3. Chitosan.....	17
1.2.4. Condroitin sulfat.....	18
1.2.5. Gumă de xantan.....	20
1.2.6. Modificarea polizaharidelor.....	22
1.3. Materiale pe bază de polizaharide.....	24
1.3.1. Complecși polielectrolitici pe bază de polizaharide.....	24
1.3.2. Hidrogeluri pe bază de polizaharide.....	30
1.3.3. Emulsii pe bază de polizaharide.....	38
1.4. Concluzii, provocări și perspective.....	47
CAPITOLUL 2. Partea Experimentală.....	50
2.1. Materiale utilizate.....	50
2.2. Sinteza copolimerului hibrid chitosan-g-poli(<i>N</i> -izopropilacrilamidă).....	52
2.3. Metode de obținere a materialelor micro- și nanostructurate.....	53
2.3.1. Obținerea de complecși interpolimerici pe bază de polizaharide și zeină.....	53
2.3.2. Obținerea de complecși interpolimerici pe bază de chitosan și PNIPAM.....	54
2.3.3. Obținerea de complecși interpolimerici pe bază de Chit-g-PNIPAM și ADN.....	55
2.3.4. Obținerea de hidrogeluri compozite pe bază de polizaharide și CaCO ₃	56

2.3.4.1. Prepararea hidrogelurilor cu alginat de calciu și CaCO_3	56
2.3.4.2. Prepararea hidrogelurilor alginat de calciu, complecși polielectrolitici și CaCO_3	56
2.3.5. Prepararea de emulsii ulei-în-apă pe bază gumă de xantan.....	56
2.3.6. Aplicarea emulsiilor ulei-în apă pe suport textil.....	57
2.4. Metode de caracterizare.....	57
2.4.1. Dispersia dinamică a luminii și electroforeză cu dispersia luminii.....	57
2.4.2. Determinarea densității de sarcini ionice.....	58
2.4.3. Titrări conductometrice inverse.....	59
2.4.4. Microscopie electronică cu scanare.....	59
2.4.5. Microscopie electronică cu transmisie-scanare.....	60
2.4.6. Microscopie de forță atomică.....	60
2.4.7. Analiza dimensiunii și formei picăturilor de emulsie.....	60
2.4.8. Dicroism circular.....	60
2.4.9. Analiza termogravimetrică.....	60
2.4.10. Spectroscopie RAMAN.....	61
2.4.11. Difrakție de raze X.....	61
2.4.12. Spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.....	61
2.4.13. Spectroscopie în infraroșu.....	62
2.4.14. Spectroscopie de fluorescență.....	63
2.4.15. Tensiunea interfacială.....	64
2.4.16. Conductivitate, pH și turbiditate.....	64
2.5. Interacțiunea nanoparticulelor de complecși cu molecule bioactive.....	65
2.5.1. Interacțiunea nanoparticulelor de complecși cu ciprofloxacina.....	65
2.5.2. Interacțiunea nanoparticulelor de complecși Chit/PNIPAM cu curcumină.....	65
2.6. Modificarea suprafețelor cu nanoparticule de complecși polizaharide/zeină.....	66
2.7. Teste de biocompatibilitate.....	66
2.7.1. Teste de biocompatibilitate a hidrogelurilor.....	66
2.7.2. Teste de biocompatibilitate a emulsiilor.....	67
2.8. Evaluarea hidratării pielii și a indicilor de confort la aplicarea emulsiilor.....	68
2.8.1. Evaluarea hidratării pielii prin aplicarea emulsiilor.....	68
2.8.2. Analiza indicilor de confort.....	68

2.9. Teste de activitate antibacteriană.....	69
2.9.1. Testarea suprafețelor modificate cu nanoparticule de complecși polimerici.....	69
2.9.2. Testarea emulsiilor ulei-în-apă.....	69
PARTEA A II-A. REZULTATE ORIGINALE.....	71/5
CAPITOLUL 3. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide, sub formă de complecși interpolimerici.....	71/5
3.1. Obținerea și caracterizarea complecșilor interpolimerici nestoichiometrici pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali.....	72/5
3.1.1. Caracterizarea soluțiilor/dispersiilor de zeină.....	73/5
3.1.2. Nanoparticule de complecși polizaharide/zeină.....	77
3.1.3. Nanoparticule de complecși zeină/polizaharide.....	79/6
3.1.4. Nanoparticule de complecși zeină, polizaharide și ciprofloxacina.....	85/8
3.1.5. Modificarea suprafeței unui material nețesut cu nanoparticule de complecși.....	86
3.1.6. Studiul activității antibacteriene a suprafețelor modificate.....	89/10
3.1.7. Concluzii parțiale.....	90
3.2. Obținerea și caracterizarea complecșilor interpolimerici pe bază de polizaharide și polimeri sintetici.....	91/11
3.2.1. Studiul proprietăților fizico-chimice ale complecșilor Chit/PNIPAM.....	92/11
3.2.2. Comportamentul complecșilor Chit/PNIPAM la variația temperaturii.....	108/12
3.2.3. Efectul tăriei ionice asupra caracteristicilor complecșilor Chit/PNIPAM.....	113
3.2.4. Capacitatea de încărcare cu molecule bioactive a complecșilor Chit/PNIPAM.....	117/14
3.2.5. Concluzii parțiale.....	120
CAPITOLUL 4. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de chitosan grefat, sub formă de poliplecși.....	122/17
4.1. Obținerea și caracterizarea copolimerului chitosan-g-poli(N-izopropilacrilamidă).....	123/17
4.1.1. Caracterizarea copolimerului Chit-g-PNIPAM.....	124/17
4.1.1.1. Spectroscopie FTIR-ATR.....	125/17
4.1.1.2. Spectroscopie ¹ H-RMN.....	126
4.1.1.3. Analiza termogravimetrică.....	127/18
4.1.1.4. Titrare conductometrică inversă.....	129
4.1.2. Influența temperaturii asupra proprietăților soluțiilor de Chit-g-PNIPAM.....	131/20
4.1.3. Concluzii parțiale.....	133

4.2. Obținerea și caracterizarea poliplecșilor pe bază de Chit-g-PNIPAM și ADN.....	133/21
4.2.1. Proprietăți fizico-chimice ale poliplecșilor Chit-g-PNIPAM/ADN.....	134/21
4.2.2. Studiul răspunsului termic al poliplecșilor Chit-g-PNIPAM/ADN.....	139/24
4.2.3. Stabilitatea poliplecșilor Chit-g-PNIPAM/ADN la variația tăriei ionice.....	143
4.2.4. Stabilitatea poliplecșilor Chit-g-PNIPAM/ADN în fluide biologice.....	146/25
4.2.5. Afinitatea copolimerului Chit-g-PNIPAM de legare a ADN-ului.....	149
4.2.6. Evaluarea structurii ADN-ului în cadrul poliplecșilor cu Chit-g-PNIPAM.....	150
4.2.7. Concluzii.....	153
CAPITOLUL 5. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de alginat de calciu, sub formă de hidrogeluri compozite.....	155/26
5.1. Caracterizarea preliminară a alginatului de calciu.....	156
5.2. Obținerea <i>in situ</i> și caracterizarea hidrogelurilor compozite ACa-CaCO ₃	158/26
5.3. Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor de CPN.....	164
5.4. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente ACa-CPN-CaCO ₃ ...	166/28
5.5. Concluzii.....	170
CAPITOLUL 6. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de xantan, sub formă de emulsii ulei-în-apă.....	172/30
6.1. Caracterizarea preliminară a uleiului macerat de <i>Daucus Carota</i>	174
6.2. Optimizarea formulărilor pentru prepararea emulsiilor ulei-în-apă.....	174/30
6.2.1. Influența conținutului de ulei macerat de morcov asupra caracteristicilor emulsiilor ulei-în-apă.....	175/30
6.2.2. Influența conținutului de surfactant asupra caracteristicilor emulsiilor.....	178
6.2.3. Influența conținutului de polizaharidă asupra caracteristicilor emulsiilor.....	180
6.3. Studiul proprietăților biologice a emulsiilor ulei-în-apă.....	183/31
6.3.1. Comportamentul citotoxic al emulsiilor ulei-în-apă.....	183/31
6.3.2. Activitatea antimicrobiană a emulsiilor ulei-în-apă.....	184/32
6.4. Evaluarea hidratării pielii prin aplicarea emulsiilor ulei-în-apă.....	185
6.5. Obținerea unor suporturi textile tratate cu emulsii ulei-în-apă și evaluarea acestora ca textile cosmetice.....	187/33
6.5.1. Analiza indicilor de confort.....	187/33
6.5.2. Evaluarea hidratării pielii prin aplicarea de textile funcționalizate cu emulsii ulei-în-apă.....	188/34
6.6. Concluzii.....	189

CONCLUZII GENERALE.....	191/35
BIBLIOGRAFIE.....	197/41
ANEXA 1. DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE DOCTORALĂ.....	225/43
ANEXA 2. LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE A DOCTORATULUI.....	230

INTRODUCERE

Repere conceptuale generale. Importanța, actualitatea și motivația tezei de doctorat

Biomaterialele pe bază de polizaharide reprezintă o categorie importantă de materiale în domeniul ingineriei biomedicale și al științei materialelor durabile. Acești polimeri naturali, derivați din surse regenerabile, prezintă o biocompatibilitate, biodegradabilitate și versatilitate chimică remarcabile, ceea ce îi face extrem de atractivi pentru o gamă variată de aplicații în domeniul medical, farmaceutic, alimentar și al protecției mediului.

Polizaharidele precum chitosanul, alginatul, condroitin sulfatul și acidul hialuronic sunt intrinsec biocompatibile, ceea ce înseamnă că pot interacționa cu sistemele biologice fără a provoca reacții toxice sau imunogene. Proprietățile de biodegradare a acestora asigură descompunerea lor în produși secundari lipsiți de toxicitate prin căi metabolice naturale, eliminând necesitatea îndepărtării chirurgicale în multe aplicații biomedicale și reducând impactul asupra mediului.

Derivate din surse naturale precum plante, alge și microorganisme, polizaharidele reprezintă o clasă de materiale ecologice durabile. Disponibilitatea lor pe scară largă și caracterul regenerabil susțin economia circulară, reducând astfel dependența de polimeri sintetici pe bază de petrol. Polizaharidele conțin grupări funcționale reactive (hidroxil, amino și carboxil) care permit o gamă largă de modificări chimice și care permite dezvoltarea de materiale cu proprietăți specifice, precum bioactivitate, solubilitate și rezistență mecanică, care pot fi prelucrate într-o varietate de forme, inclusiv hidrogeluri, filme, fibre și nanoparticule.

Prin urmare, pentru obținerea de biomateriale micro- și nanostructurate, polizaharidele pot fi utilizate în combinație cu alte macromolecule naturale sau sintetice, cu diferite grupări funcționale sau capacitate de a răspunde la diverși stimuli externi sau interni. Proprietățile biomaterialelor ce urmează a fi obținute pot fi ajustate prin alegerea polimerilor potriviți în funcție de aplicațiile vizate.

Motivația pentru dezvoltarea **biomaterialelor micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide** este susținută în acest context atât din punct de vedere teoretic, cât și din punct de vedere practic. Micro- și nanostructurarea polizaharidelor prezintă diverse avantaje care pot fi favorabile unor posibile aplicații ale acestora: suprafață specifică

sporită pentru încărcarea medicamentelor și eliberarea controlată și țintită a agenților bioactivi, capacitate de sorbție pentru diferiți poluați organici și anorganici, proprietăți mecanice adecvate pentru ingineria tisulară sau pentru formarea de filme și membrane. Motivația pentru dezvoltarea biomaterialelor pe bază de polizaharide micro- și nanostructurate se bazează proprietățile intrinseci ale acestora, precum lipsa toxicității, versatilitatea funcțională și sustenabilitatea mediului. Aceste materiale răspund provocărilor actuale de cercetare, aliniindu-se în același timp la obiectivele globale de inovare ecologică și bioeconomie circulară.

Încadrarea temei în preocupările internaționale, naționale și ale colectivului de cercetare

Ca urmare a interesului crescut pentru crearea de materiale biocompatibile, biodegradabile și sustenabile, domeniul biomaterialelor pe bază de polizaharide a cunoscut în ultimii ani o creștere semnificativă la nivel mondial. Capitolul 1 oferă o analiză a tendințelor actuale de cercetare, subliniind importanța acestui domeniu printr-un studiu detaliat al literaturii de specialitate. Studiul de literatură evidențiază progresele recente în proiectarea, caracterizarea și utilizarea polizaharidelor în diverse domenii, cum ar fi ingineria tisulară, administrarea controlată a medicamentelor și regenerarea țesuturilor. De asemenea, la nivel național, studiul polizaharidelor și al materialelor pe bază de polizaharide a început din ce în ce mai mult să prezinte o atenție sporită din partea comunității științifice din diferite domenii de cercetare. Având în vedere aceste considerente, alegerea acestui domeniu pentru dezvoltarea tezei de doctorat vizează îmbogățirea clasei de biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide, prin obținerea, caracterizarea și evaluarea unor noi structuri funcționale cu proprietăți fizico-chimice și biologice optimizate.

Tema tezei de doctorat este corelată cu preocupările colectivului de cercetare al *Laboratorului Polimeri Funcționali* din cadrul *Institutului de Chimie Macromoleculară Petru Poni din Iași*, obiectivul laboratorului fiind dezvoltarea științifică în domeniul materialelor multifuncționale, prin sinteza și utilizarea unei game largi de polimeri ionici sintetici și naturali, cu grupări funcționale și arhitecturi prestabilite, obținând sisteme complexe multicomponente cu aplicații în diferite domenii.

În cadrul colectivului de cercetare din *Laboratorul Polimeri Funcționali* s-au studiat anterior complexii polielectrolitici pe bază de chitosan și alți polielectroliti sintetici (Mihai, 2009; 2011), în general pentru utilizarea ca floculanți în aplicații pentru curățarea apelor poluate. Inovarea cercetărilor propuse în cadrul acestei teze de doctorat presupune

obținerea de biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide, sub diverse forme de prezentare, cu scopul de a fi utilizate în aplicații medicale sau cosmetice.

Obiectivele tezei și metodologia experimentală

Prin urmare, obiectivul principal al prezentei tezei de doctorat a constat în ***obținerea de noi biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali sau sintetici și caracterizarea acestora privind structura și proprietățile lor.***

Din acest obiectiv principal au fost derivate cinci obiective secundare:

- Obținerea și caracterizarea complexilor interpolimerici nestoichiometrici pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali;
- Obținerea și caracterizarea complexilor interpolimerici pe bază de polizaharide și polimeri sintetici;
- Obținerea și caracterizarea poliplecșilor pe bază de Chit-g-PNIPAM și ADN;
- Obținerea și caracterizarea biomaterialelor micro- și nanostructurate pe bază de alginat de calciu, sub formă de hidrogeluri compozite;
- Obținerea și caracterizarea biomaterialelor micro- și nanostructurate pe bază de xantan, sub formă de emulsii ulei-în-apă.

Conținutul tezei de doctorat

Teza de doctorat cu titlul „***Biomateriale micro și nanostructurate pe bază de polizaharide: obținere, structură și proprietăți***” se întinde pe 196 pagini și cuprinde șase capitole ce includ 128 de figuri, 17 tabele, 11 ecuații, o schemă și 307 referințe bibliografice. Teza de doctorat este structurată în două secțiuni principale: Partea I, intitulată „Stadiul actual al cunoașterii” este formată dintr-un capitol și prezintă o sinteză a contextului științific care motivează alegerea materialelor și a metodelor experimentale utilizate iar Partea a II-a, intitulată „Rezultate originale” este structurată în cinci capitole și prezintă rezultatele proprii obținute în cadrul studiilor efectuate în prezenta teză de doctorat.

Stadiul actual al cunoașterii, prezentat în **Capitolul 1**, evidențiază importanța biomaterialelor în domeniul științific, în special a biomaterialelor pe bază de polizaharide, și totodată, unele proprietăți importante ale polizaharidelor care vor fi utilizate în studiile experimentale. De asemenea, sunt analizate și detaliate principalele metode de obținere a biomaterialelor micro- și nanostructurate sub formă de complecși polielectrolitici, hidrogeluri sau emulsii raportate în literatura de specialitate, respectiv principalele direcții de utilizare ale acestora.

Capitolul 2 prezintă materialele utilizate în cadrul tezei de doctorat, incluzând și o descriere detaliată a metodelor experimentale utilizate pentru obținerea biomaterialelor micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide. Capitolul prezintă metodele de caracterizare a materialelor privind structura și proprietățile acestora, precum cele de evaluare a potențialelor aplicații ale biomaterialelor obținute.

Capitolul 3 conține obținerea a două tipuri diferite de complecși polielectrolitici nestoichiometrici: polizaharide/alți polimeri naturali și polizaharide/polimeri sintetici. În acest capitol sunt prezentate informații detaliate privind obținerea complecșilor polielectrolitici nestoichiometrici, precum și caracterizarea acestora folosind o varietate de metode experimentale. De asemenea, sunt identificate elementele principale care influențează proprietățile complecșilor, iar cei mai stabili sunt selectați pentru obținerea de complecși tricomponenți utilizând diferite molecule bioactive.

Capitolul 4 prezintă sinteza și caracterizarea unui copolimer obținut prin grefarea la chitosan a polimerului poli(*N*-izopropilacrilamidă), urmată de investigarea interacțiunii electrostatice dintre copolimer și două macromolecule de ADN de diferite lungimi. Materialele obținute sunt caracterizate prin metode corespunzătoare pentru a confirma structura chimică a acestora și pentru a determina proprietățile de interes pentru utilizarea în aplicații specifice, precum livrarea genelor.

În **Capitolul 5** se propune o nouă metodă de obținere a unor hidrogeluri omogene, foarte bine organizate, folosind o dispersie de alginat de calciu și soluție de CaCl_2 , aceasta din urmă având un rol dublu: sursă de ioni divalenți pentru reticularea lanțurilor de alginat, și centre de nucleație pentru cristalizarea CaCO_3 . În plus, testul MTS a arătat că hidrogelurile reticulate au o viabilitate celulară importantă chiar și după 48 de ore. De asemenea, studiul arată fezabilitatea metodei în sisteme mai complexe, prin adăugarea în mediul de cristalizare, pe lângă alginat de calciu și CaCl_2 , a unor dispersii de complecși polielectrolitici nestoichiometrici cu grupări anionice în exces, obținuți prin interacțiuni electrostatice între zeină și alginat de sodiu sau condroitin sulfat.

Capitolul 6 prezintă o abordare originală care a condus la obținerea de textile funcționale cu proprietăți de hidratare, prin utilizarea emulsiilor bioactive ulei-în-apă pe bază de ulei macerat de *Daucus Carota* și polizaharida gumă de xantan. Acest studiu urmărește optimizarea formulării emulsiilor prin variația conținutului uneia dintre componente și menținerea constantă a celorlalte, pentru a găsi condițiile adecvate pentru a obține emulsii stabile și compatibile cu aplicarea pe piele. Emulsiile stabile sunt testate pentru biocompatibilitatea și efectele lor antimicrobiene, iar cele care demonstrează

biocompatibilitate sunt testate - ca atare sau pe textile - ca produse de îngrijire a pielii, urmărindu-se proprietățile de hidratare a pielii și indicii de confort.

Teza de doctorat se încheie cu o serie de concluzii generale și perspective de dezvoltare a studiilor propuse, fiind însoțită de două Anexe organizate după cum urmează: Anexa 1 – Diseminarea rezultatelor științifice și Anexa 2 – Copii ale articolelor publicate.

PARTEA A II-A. REZULTATE ORIGINALE

3. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide, sub formă de complecși interpolimerici

3.1. Obținerea și caracterizarea complecșilor interpolimerici nestoichiometrici pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali

3.1.1. Caracterizarea soluțiilor/dispersiilor de zeină

Pentru a studia capacitatea de solubilizare a zeinei utilizată în acest studiu, au fost pregătite soluții cu concentrații de alcool în apă variind de la 60 la 90% (notate Zx, x = concentrația în etanol). Diametrul mediu hidrodinamic, D_h , și intensitatea luminii dispersate, I, au fost măsurate la un pH cuprins între 2 și 9 (Figura 3.1).

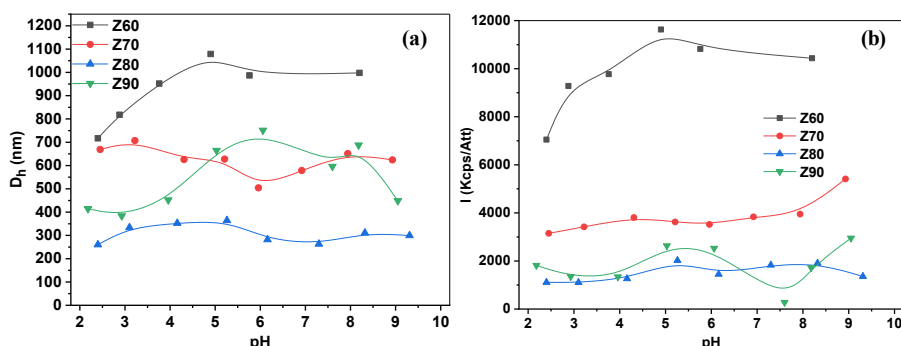


Figura 3.1. Variația diametrului mediu hidrodinamic (D_h) (a) și a intensității luminii dispersate (I) (b) pentru soluții de zeină cu concentrații de alcool între 60 și 90%, în funcție de pH-ul soluției (Lotos, 2024a).

După cum se poate observa în Figura 3.1 atât raportul alcool/apă cât și pH-ul au influențat caracteristicile soluțiilor/dispersiilor de zeină, D_h scăzând cu creșterea conținutului de alcool în apă. Creșterea concentrației de alcool la 80% și, respectiv, 90% a condus la scăderea D_h (Figura 3.1a), însă în distribuția dimensională sunt observate două sau chiar trei populații de particule. O observație generală este aceea că, pentru aceleași raport alcool/apă, variația pH-ului nu influențează semnificativ distribuția dimensională și valoarea D_h , pentru cele patru rapoarte alcool/apă studiate. În același timp, valorile

intensității luminii dispersate (Figura 3.1b), care sunt proporționale cu masa agregatelor, sunt mai puțin influențate de valoarea pH-ului, conținutul de alcool fiind parametrul principal pentru ierarhizarea intensității, cele mai mari valori fiind găsite pentru un conținut mai mic de alcool, în timp ce valori mai mici și aproape similare au fost evidențiate pentru Z80 și, respectiv, Z90.

Variația potențialului zeta aparent (ζ_{app}) în funcție de pH pentru soluțiile de zeină cu diferite concentrații de alcool și pentru cele două polizaharide (ANa și CSA) este prezentată în Figura 3.5.

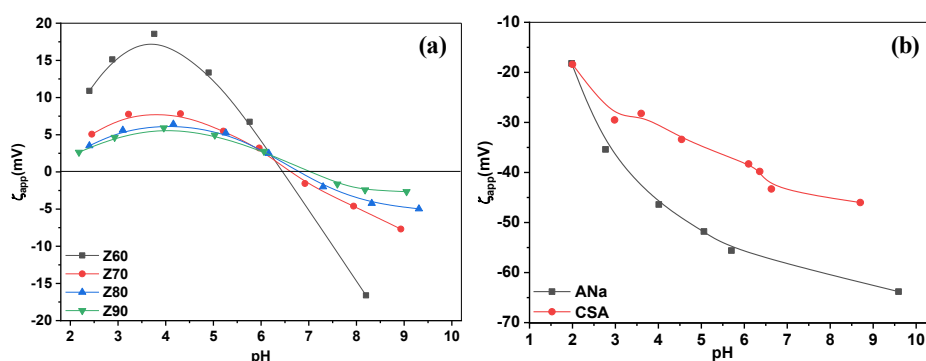


Figura 3.5. Variația potențialului zeta aparent (ζ_{app}) pentru soluții de zeină cu diferite concentrații de alcool (a) și două soluții de polizaharide (b), în funcție de valoarea pH-ului soluției (Lotos, 2024a).

Pentru același conținut de alcool, zeina își modifică încărcarea ionică (ζ_{app}) pozitivă sau negativă în funcție de pH-ul soluției, așa cum se observă în Figura 3.5a. Astfel, zeina utilizată în acest studiu, formată predominant din α -zeină, în funcție de concentrația alcoolului în soluție, are un punct izoelectric la valori ale pH-ului de aproximativ 6,4 – 7,0, la un pH mai mic decât acesta zeina fiind încărcată ionic pozitiv. În cazul polizaharidelor ANa și CSA, acestea sunt încărcate negativ pe tot domeniul de pH testat (Figura 3.5b).

Deoarece scopul acestui studiu a fost de a obține complecși interpolimerici și ținând cont de caracteristicile complementare ale polimerilor în soluție, a fost ales pH-ul = 4 la care zeina în soluțiile de alcool 60% (Z60) și 70% (Z70) este încărcată ionic pozitiv, complementar cu sarcinile ionice negative ale ambelor polizaharide.

3.1.3. Nanoparticule de complecși zeină/polizaharide

În încercarea de a reduce dimensiunea particulelor, s-a testat ordinea inversă de adăugare, de această dată titratul fiind polizaharida și zeina titrantul (Figura 3.9). Astfel, atunci când zeina a fost titrantul, dimensiunea particulelor a fost de aproximativ 100 nm până la raportul molar de 1,2, cu obținerea de particule aproape monodisperse (Figura 3.9d, indice de polidispersitate sub 0,2). Cel mai probabil, polizaharida titrată a putut îngloba cu

ușurință zeina mai concentrată în condițiile experimentale aplicate. Figura 3.9c ilustrează o creștere mare a intensității luminii dispersate atunci când raportul molar al sarcinilor a crescut peste 0,8, simultan cu creșterea dimensiunilor particulelor. Se poate presupune că lanțurile polizaharidice înglobează rapid dispersia de zeină și, chiar dacă valorile potențialului zeta sunt în continuare negative și sugerează nu se atinge stoechiometria, trebuie ținut cont de faptul că aceste valori sunt date doar de grupările anionice disponibile pe suprafața CPN (Figura 3.9a).

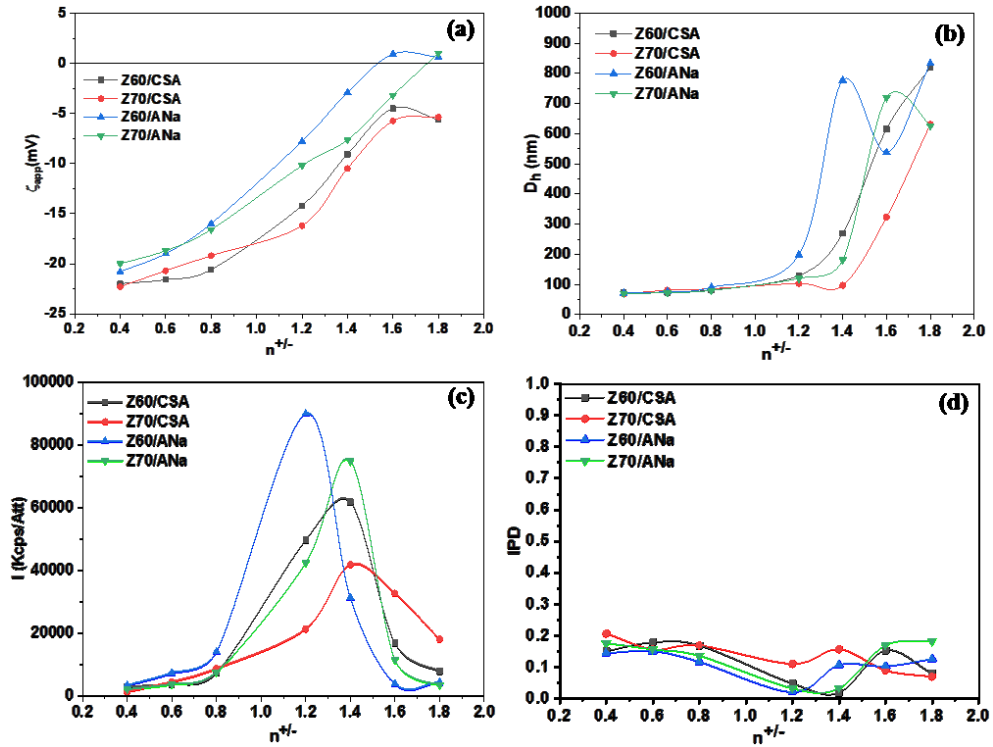


Figura 3.9. (a) Potențialul zeta aparent (ζ_{app}), (b) dimensiunea medie hidrodinamică (D_h), (c) intensitatea luminii dispersate și (d) indicele de polidispersitate (IPD) a CPN zeină/polizaharidă (viteza de adăugare = 0,08 mL/min) (Lotos, 2024a).

Dimensiunea și forma nanoparticulelor obținute atunci când zeina a fost titrantul au fost urmărite și prin SEM (Figurile 3.13 și 3.14). Astfel, nanoparticulele analizate au, în principal, formă sferică (în special pentru probele pe bază de CSA), alături de unele structuri de formă neregulată sau aglomerate, cu dimensiuni ușor mai mici decât cele rezultate din măsurătorile DLS, probabil din cauza eliminării apei în timpul uscării. De asemenea, contrastul de culoare de la marginile particulelor sugerează formarea de structuri de tip miez/înveliș, susținând ipoteza că polizaharida a înglobat zeina, bazată pe valorile ζ_{app} .

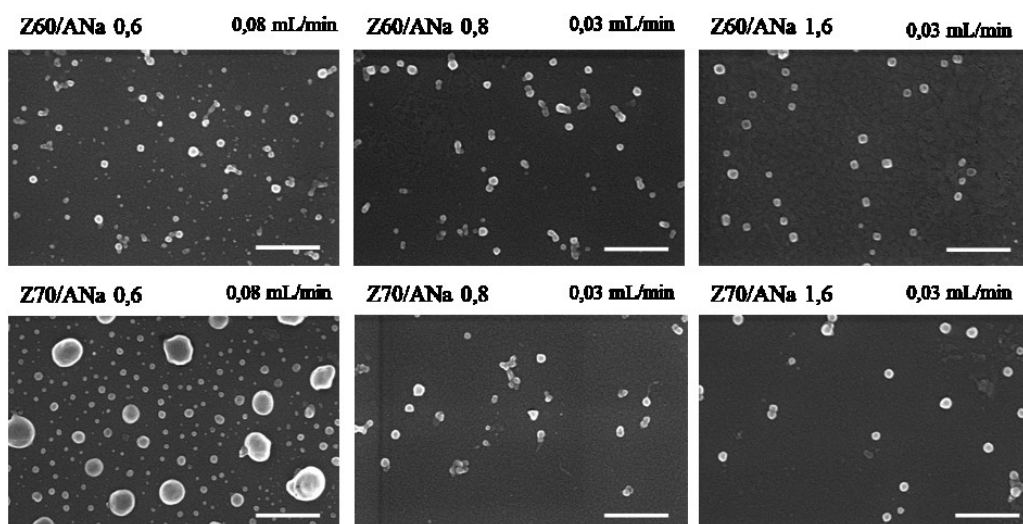


Figura 3.13. Micrograțiile SEM ale nanoparticulelor zeină/ANa cu diferite rapoarte între polimeri, viteze diferite de adăugare și conținut diferit de alcool/apă în soluțiile de zeină (scala 500 nm) (Lotos, 2024a).

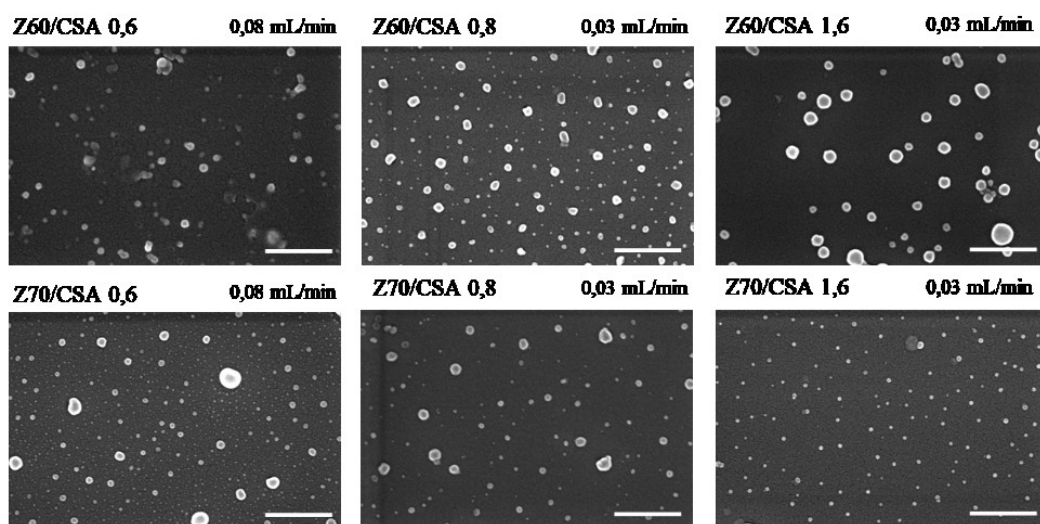


Figura 3.14. Micrograțiile SEM ale nanoparticulelor zeină/CSA cu diferite rapoarte între polimeri, viteze diferite de adăugare și conținut diferit de alcool/apă în soluțiile de zeină (scala 500 nm) (Lotos, 2024a).

3.1.4. Nanoparticule de complecși zeină, polizaharide și ciprofloxacina

Ținând cont de rezultatele prezentate în subcapitolele anterioare, au fost selectate două probe de CPN care au valori similare ale potențialului zeta (aproximativ -20 mV, Figura 3.11a), și anume cele cu $n^{+/-} = 0,8$, viteza de adăugare de 0,03 mL/min, Z70 și ambele polizaharide pentru a fi testate la obținerea de complecși tricompenți, prin interacțiunea CPN preformați cu CF. Caracteristicile particulelor CF/CPN, în funcție de conținutul de CF, sunt incluse în Figura 3.18, în timp ce morfologia acestora este prezentată în Figura 3.19.

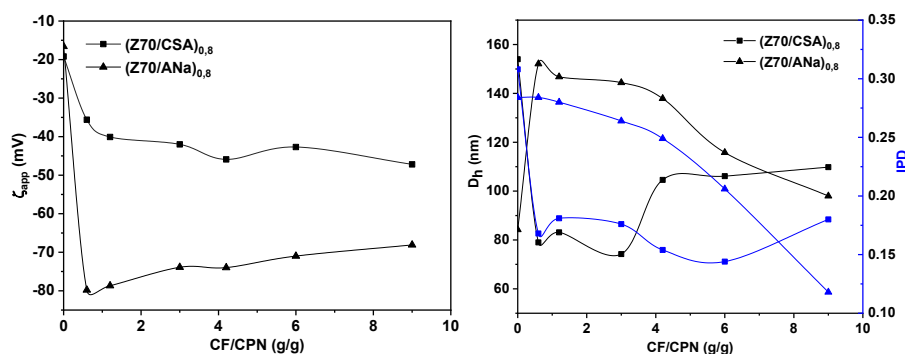


Figura 3.18. Variația potențialului zeta, diametrului hidrodynamic (D_h) și indicelui de polidispersitate (IPD) al nanoparticulelor CF/CPN în funcție de conținutul de CF (Lotos, 2024a).

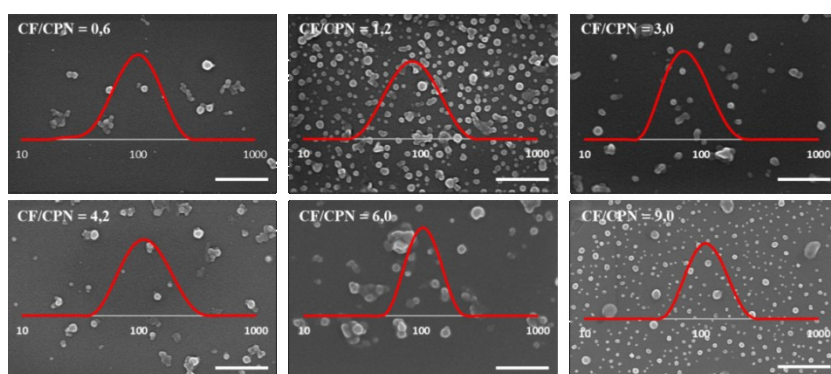


Figura 3.19. Imagini SEM ale complexelor tricomponente formați din CPN pe bază de CSA cu $n^{+/-} = 0,8$ și conținut diferit de CF (scala 500 nm). În fiecare imagine este inserată distribuția diametrului hidrodynamic a particulelor determinat prin DLS (Lotos, 2024a).

Potențialul zeta pentru CF/CPN pe bază de CSA are valori negative mai mari (aproximativ -40 mV) în comparație cu cel obținut pentru nanoparticulele corespunzătoare fără CF (aproximativ -20 mV), indiferent de conținutul de CF. Pe de altă parte, pentru CPN pe bază de ANa, prezența CF conduce la valori ale potențialului zeta până la -70 mV, valorile absolute scăzând ușor odată cu creșterea CF. Pentru CPN cu ANa, creșterea conținutului de CF conduce la o scădere a dimensiunii nanoparticulelor, împreună cu scăderea polidispersității, sugerând că CF îmbunătățește proprietățile fizice ale nanoparticulelor prin reducerea tendinței acestora de agregare. Prin comparație, în cazul CPN cu CSA, dimensiunea nanoparticulelor crește ușor odată cu creșterea conținutului de CF, rezultând particule de CF/CPN de maximum 60 nm. Mai mult, valorile indicelui de polidispersitate pentru CPN cu CSA sunt sub 0,2 pentru toate probele, indiferent de conținutul de CF, indicând formarea de particule aproape monodisperse. Micrografiile SEM din Figura 3.19 arată faptul că morfologia nanoparticulelor nu s-a schimbat după interacțiunea cu CF, sugerând o bună incorporare a antibioticului în complexii tricomponente.

3.1.6. Studiul activității antibacteriene a suprafețelor modificate

Pentru a evalua comparativ activitatea antibacteriană, nanoparticulele de CPN și CF/CPN au fost depuse pe suprafața MFCN, aderarea acestora fiind rezultatul interacțiunilor electrostatice și hidrofobe. Pentru comparație, a fost pregătită o probă în care materialul MFCN a fost acoperit doar cu zeină. Rezultatele obținute la testele privind proprietățile antibacteriene pentru materialul nețesut inițial și cel cu Z70, CPN sau CF/CPN sunt prezentate în Figura 3.23 și în Tabelul 3.2.

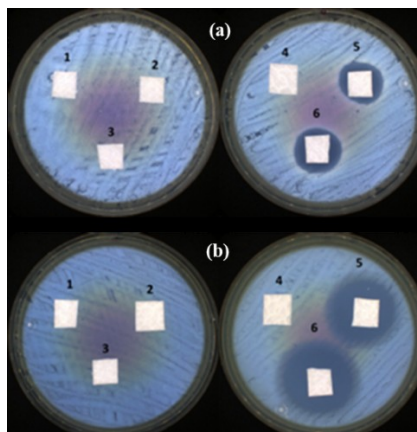


Figura 3.23. Activitatea antibacteriană împotriva (a) *S. aureus* și (b) *E. Coli* a materialului tratat cu Z70, CPN sau CF/CPN (a se vedea corespondența numărului probei în Tabelul 3.2) (Lotos, 2024a).

Tabel 3.2. Activitatea antibacteriană a probelor testate împotriva tulpinilor de referință *S. aureus* și *E. Coli* (mm) (Lotos, 2024a).

Nr. Probei	Codul probei	Zona de inhibiție (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	MFCN	-	-
2	MFCN + Z70 10^{-4} M	-	-
3	MFCN + (Z70/ANa) _{0,8}	-	-
4	MFCN + (Z70/CSA) _{0,8}	-	-
5	MFCN + (Z70/ANa) _{0,8} + CF 15 ml	21,35 ± 2,33	25,15 ± 1,20
6	MFCN + (Z70/CSA) _{0,8} + CF 15 ml	20,10 ± 0,57	27,75 ± 1,20

După cum se poate observa în Figura 3.23, materialul celulozic inițial, precum și probele care conțin Z70 sau CPN, nu au activitate antibacteriană datorită proprietăților lor excelente de biocompatibilitate (Vasiliu, 2022). În schimb, probele cu antibiotic au prezentat activitate antibacteriană (până la 27 mm de zonă de inhibiție împotriva *E. coli* în cazul CPN cu CSA și ciprofloxacină). Este cunoscut faptul că ciprofloxacina este foarte eficientă împotriva bacteriilor Gram-negative și cu eficiență moderată împotriva bacteriilor Gram-pozitive (Campoli-Richards, 1988). Acest lucru este în concordanță cu testul

antibacterian efectuat în acest studiu, CF/CPN având o arie de inhibiție mai mare pentru *E. coli* decât pentru *S. aureus*, indiferent de polizaharidele implicate (CSA sau ANa).

3.2. Obținerea și caracterizarea complexelor interpolimerice pe bază de polizaharide și polimeri sintetici

3.2.1. Studiul proprietăților fizico-chimice ale complexelor Chit/PNIPAM

După cum se poate observa în Figura 3.24a, intensitatea luminii dispersate pentru seria $\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L$ crește treptat odată cu creșterea concentrației de PNIPAM_L . Deoarece intensitatea luminii dispersate este proporțională cu masa complexelor în soluție, creșterea observată confirmă faptul că a avut loc complexarea între cele două componente, iar masa complexelor crește efectiv pe măsură ce se adaugă mai mult PNIPAM_L . În paralel, intensitatea luminii dispersate pentru seria $\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L$ prezintă, de asemenea, o tendință de creștere similară, dar cu valori generale mai mari, ceea ce sugerează că particulele formate în acest caz au o masă mai mare sau o conformație mai densă.

În ceea ce privește sarcina efectivă a complexelor, valorile potențialului zeta măsurat sunt prezentate în Figura 3.24b pentru ambele serii $\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L$ și $\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L$. Evident, deși nu se observă modificări semnificative la creșterea concentrației de PNIPAM_L pentru ambele serii, valorile potențialului zeta ale complexelor sunt considerabil mai mici decât cele ale probelor de chitosan corespunzătoare, confirmând astfel complexarea dintre cele două componente macromoleculare. Această scădere este net mai pronunțată în cazul probelor din seria $\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L$, valorile potențialului zeta ale complexelor fiind aproape de zero, indicând neutralizarea majoritară a sarcinilor opuse. În ceea ce privește dimensiunea complexelor, din Figurile 3.24c și 3.24e se poate observa că, pentru seria $\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L$, se disting două populații principale, dimensiunea lor (aproximativ 30 și, respectiv, 220 nm) fiind mai mult sau mai puțin aceeași, indiferent de cantitatea de PNIPAM în complexi. Aceste picuri denotă prezența a două populații diferite în dispersiile de complexi, care corespund cel mai probabil unor particule care au un număr diferit de catene incluse în complexi. Un mic pic la aproximativ 10 nm (Pic 1) este, de asemenea, detectat pentru probele $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/2}$ și $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/4}$ și poate indica prezența catenelor polimerice sintetice necomplexate, deoarece coincide cu picul corespunzător al probei de PNIPAM_L .

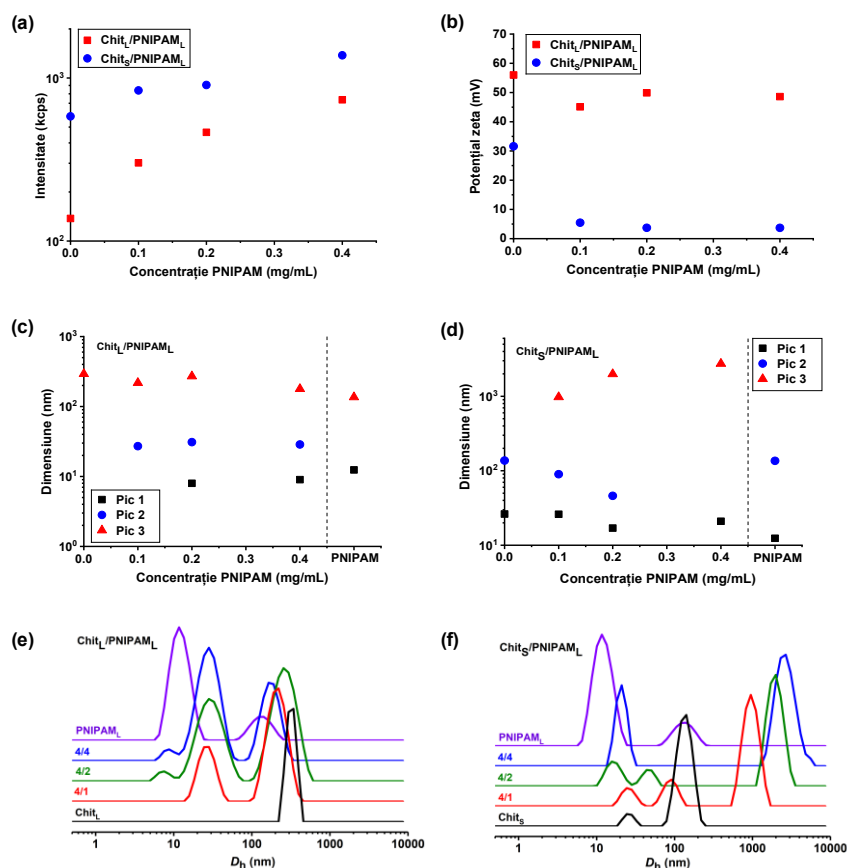


Figura 3.24. (a) Intensitatea luminii dispersate, (b) potențialul zeta și (c, d) dimensiunea picurilor, derivată din distribuțiile dimensiunilor (e, f), pentru seriile $\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L$ și $\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L$. De asemenea, pentru comparație, sunt incluse distribuțiile dimensiunilor pentru probele Chit_L , Chit_S și PNIPAM_L (Lotos, 2025).

Pentru seria de complecși $\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L$, chitosanul cu catenă mai scurtă prezintă, de asemenea, autoasamblare în soluție, în Figura 3.24f observându-se două picuri cu dimensiuni de aproximativ 25 și 150 nm, care corespund atât catenelor individuale cât și agregatelor cu mai multe lanțuri. În același timp, distribuția dimensiunilor probelor $(\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L)_{4/1}$ și $(\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L)_{4/2}$ prezintă trei picuri, dimensiunea primelor două fiind puțin mai mică decât cea a picurilor corespunzătoare probei Chit_S . Rezultatele sugerează că, atât lanțurile individuale cât și agregatele cu mai multe lanțuri ale chitosanului cu catenă scurtă interacționează electrostatic cu lanțurile PNIPAM, formând complecși care sunt ușor mai mici decât chitosanul inițial, ca urmare a reducerii repulsiilor electrostatice datorate neutralizării sarcinii și a creșterii interacțiunilor hidrofobe cauzate de încorporarea PNIPAM.

3.2.2. Comportamentul complecșilor $\text{Chit}/\text{PNIPAM}$ la variația temperaturii

Deoarece PNIPAM este un polimer termosensibil, este de așteptat să confere aceleași caracteristici și complecșilor $\text{Chit}/\text{PNIPAM}$ și, din acest motiv, a fost investigată influența

temperaturii asupra caracteristicilor complexelor formați. În mod concret, răspunsul lor la temperatură a fost examinat prin efectuarea de măsurători DLS la diferite temperaturi cuprinse între 25 și 45 °C (cu un pas de creștere de 5 °C), iar rezultatele obținute cu privire la intensitatea luminii dispersate, dimensiunile picurilor și distribuțiile dimensiunilor corespunzătoare sunt prezentate în Figurile 3.36 și 3.37. Pentru toate probele investigate, după încălzirea până la 45 °C, temperatura a fost redusă la 25 °C, iar proba a fost măsurată din nou pentru a examina reversibilitatea structurilor formate prin procesul de încălzire.

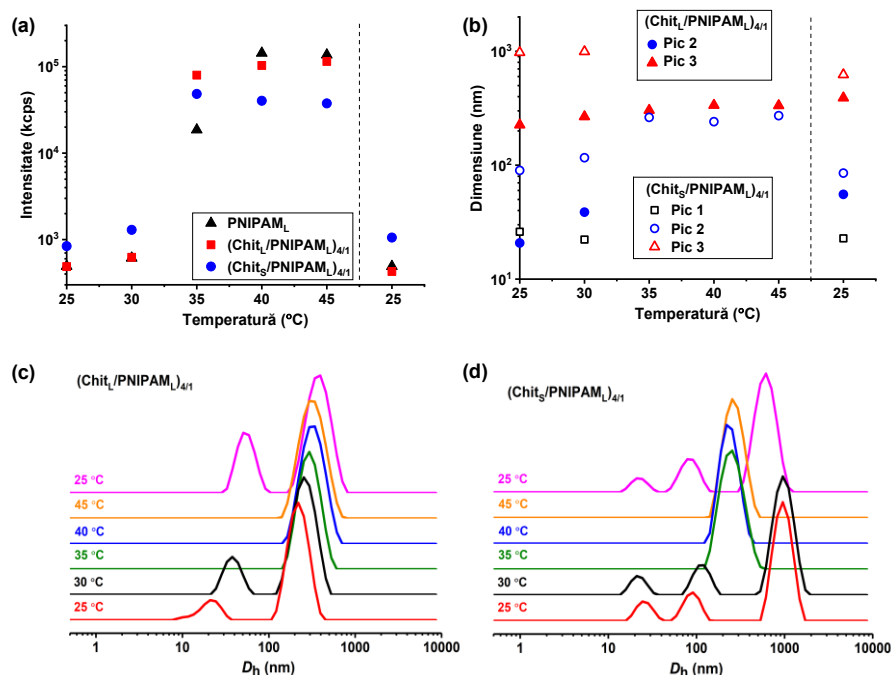


Figura 3.36. Efectul temperaturii asupra (a) intensității luminii dispersate și (b) dimensiunii picurilor, derivate din distribuțiile dimensiunilor (c, d), pentru probele $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/1}$ și $(\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_L)_{4/1}$ (Lotos, 2025).

Figurile 3.36a și 3.37a arată influența temperaturii asupra intensității luminii dispersate pentru complexii obținuți cu ambele probe de chitosan la un raport volumic de 4/1 în comparație cu probele corespunzătoare de PNIPAM. La 35 °C (adică peste LCST al PNIPAM), se observă o creștere bruscă a intensității, însoțită și de o creștere semnificativă a turbidității, pentru toate probele. Acest comportament este caracteristic tranziției de fază a PNIPAM, atribuit creșterii interacțiunilor hidrofobe care induc agregarea între lanțuri și este comun pentru toate probele investigate de complexi Chit/PNIPAM. Creșterea ulterioară a temperaturii până la 45 °C nu pare să aibă un efect semnificativ asupra intensității luminii dispersate, în timp ce valorile inițiale sunt complet restabilite după răcirea la 25 °C, demonstrând reversibilitatea tranziției. În același timp, distribuțiile dimensiunilor pentru complexii 4/1 din toate cele patru sisteme (Figurile 3.36 c,d și 3.37

c,d) prezintă peste temperatura de 35 °C aceeași tranziție de la două sau trei picuri la unul singur, care este, de asemenea, o trăsătură caracteristică ambelor probe de PNIPAM.

Acest comportament sugerează agregarea populațiilor inițiale de complecși în structuri compacte, datorită creșterii hidrofobității lanțurilor PNIPAM complexate, care la rândul lor favorizează interacțiunile dintre lanțuri.

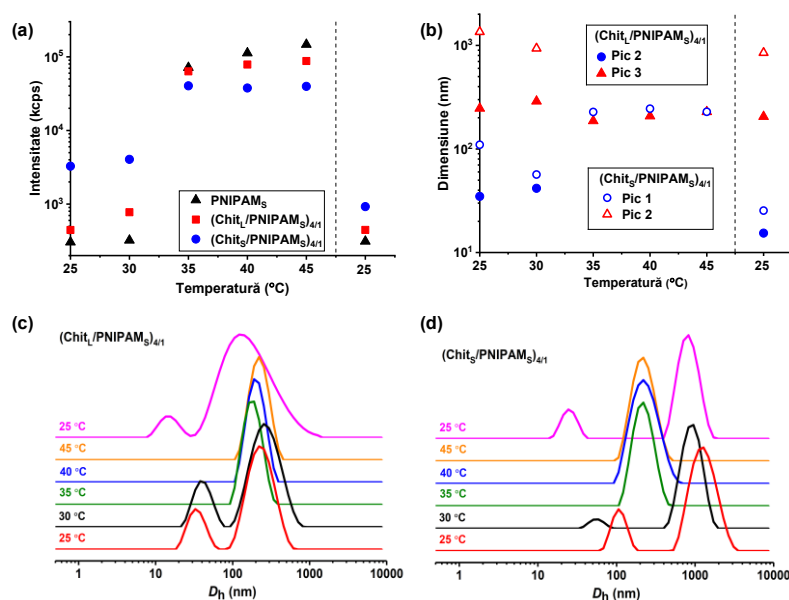


Figura 3.37. Efectul temperaturii asupra (a) intensității luminii dispersate și (b) dimensiunii picurilor, derivate din distribuțiile dimensiunilor (c, d), pentru probele $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_S)_{4/1}$ / $\text{Chit}_S/\text{PNIPAM}_S)_{4/1}$ (Lotos, 2025).

3.2.4. Capacitatea de încărcare cu molecule bioactive a complecșilor Chit/PNIPAM

Capacitatea nanostructurilor hibride Chit/PNIPAM de a fi utilizate ca potențiale sisteme de administrare a moleculelor bioactive a fost explorată prin examinarea abilității lor de a încapsula un compus natural hidrofof, și anume curcumina (CRC). Dintre complecșii Chit/PNIPAM, $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/4}$ a fost ales pentru încapsularea CRC, deoarece combinația dintre Chit_L și PNIPAM_L este considerată a fi cea mai stabilă, în timp ce cantitatea mai mare de PNIPAM ar trebui să îmbunătățească interacțiunea cu molecula bioactivă hidrofofă. Au fost investigate trei rapoarte diferite de încărcare prin adăugarea a 2,5, 5 și 10% g/g de CRC în raport cu masa totală a complexului, la 40 °C pentru a beneficia de tranziția de fază a lanțurilor PNIPAM.

Proprietățile fizico-chimice ale probelor $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/4}$ încărcate cu CRC au fost investigate prin efectuarea de măsurători DLS pe soluții diluate 1:10, iar Figura 3.49 prezintă valorile intensității luminii dispersate și dimensiunile picurilor rezultate din distribuțiile dimensiunilor.

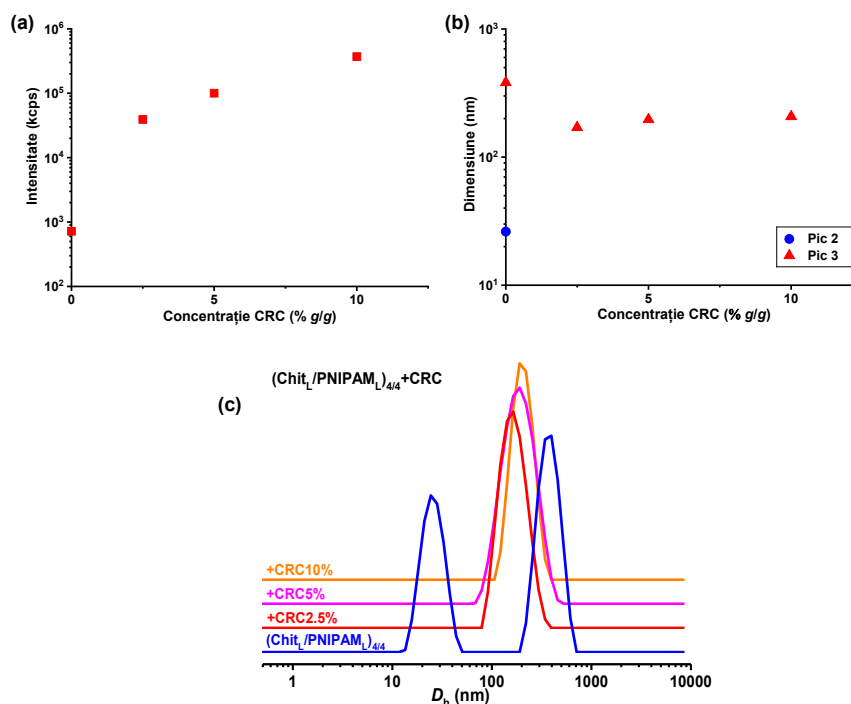


Figura 3.49. Rezultatele DLS în ceea ce privește (a) intensitatea luminii dispersate și (b) dimensiunea picurilor, derivate din (c) distribuțiile dimensiunilor, pentru probele de $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/4}$ încărcate cu CRC (Lotos, 2025).

Rezultatele DLS arată că proba de $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/4}$ încărcat cu CRC prezintă o creștere accentuată a intensității luminii dispersate, ceea ce indică o masă mai mare a structurilor (Figura 3.49a). În ceea ce privește dimensiunea complexelor încărcate cu molecule bioactive, se detectează o tranziție de la cele două picuri identificate pentru complexul inițial la un singur pic cu o dimensiune intermediară, care este însoțită în consecință de o scădere semnificativă a indicelui de polidispersitate (și anume, de la aproximativ 0,6 la 0,1). Modificările observate confirmă încorporarea cu succes a CRC și sugerează în continuare reducerea dimensiunilor complexelor inițiali și formarea de structuri mai compacte/dense ca urmare a creșterii interacțiunilor hidrofobe datorate prezenței moleculelor de CRC. Cu toate acestea, sarcina efectivă pozitivă a complexelor primari Chit/PNIPAM este menținută, proba cu cea mai mare concentrație de CRC ($(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/4}+10\%\text{CRC}$) prezentând o valoare a potențialului zeta de aproximativ +30 mV.

Pentru a determina concentrația de CRC încapsulată, s-au efectuat măsurători spectroscopice UV-Vis, iar spectrele obținute sunt prezentate în Figura 3.50a, împreună cu spectrul corespunzător al $(\text{Chit}_L/\text{PNIPAM}_L)_{4/4}$, pentru comparație. Din valorile absorbanței obținute la 427 nm și utilizând curba de calibrare a CRC realizată în etanol (Figura 3.50), s-a calculat concentrația de CRC încapsulată în soluțiile/dispersiile de complexe. Valorile

corespunzătoare pentru fiecare raport de încărcare sunt prezentate în Tabelul 3.5, împreună cu concentrația de CRC adăugată și eficiența de încapsulare calculată cu ecuația (2.8) (Capitolul 2).

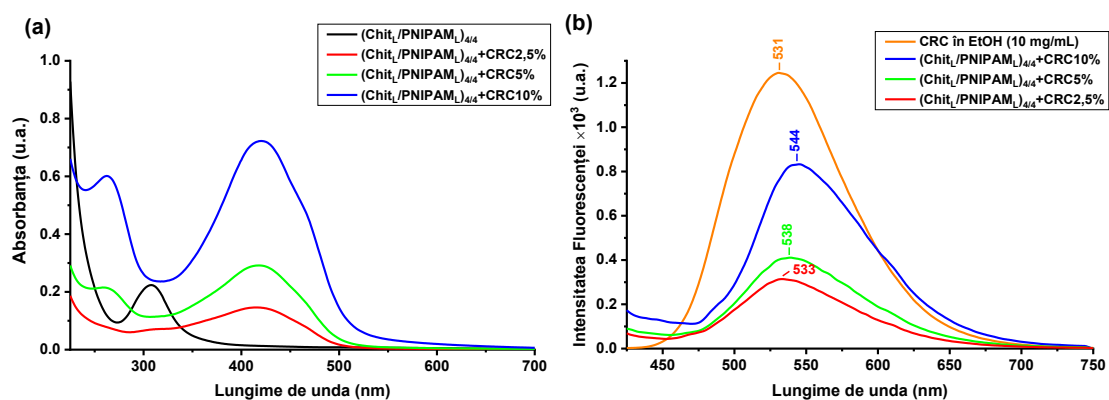


Figura 3.50. (a) Spectre UV-Vzs și (b) spectre de fluorescență pentru probele de (Chit_L/PNIPAM_L)_{4/4} încărcate cu CRC (Lotos, 2025).

Tabelul 3.5. Concentrația de CRC adăugată și încapsulată, împreună cu eficiența de încapsulare EE%, pentru probele de (Chit_L/PNIPAM_L)_{4/4} încărcate cu CRC (Lotos, 2025).

Codul probei	C _{CRC} adăugată (μg/mL)	C _{CRC} încapsulată (μg/mL)	EE%
(Chit _L /PNIPAM _L) _{4/4} +2,5%CRC	19,6	8,5	43,4
(Chit _L /PNIPAM _L) _{4/4} +5% CRC	38,5	17,9	46,5
(Chit _L /PNIPAM _L) _{4/4} +10% CRC	74,1	45,4	61,3

Valorile EE% estimate sunt cuprinse între 43 și 61% pentru cele trei concentrații de CRC investigate (2,5; 5 și 10 % g/g), indicând o capacitate suficientă de încărcare a moleculei bioactive pentru complexul format între Chit_L și PNIPAM_L, care este, fără îndoială, corelată cu hidrofobia generală a sistemului. Spectroscopia de fluorescență a fost utilizată pentru a verifica proprietățile fluorescente ale complexelor încărcate cu CRC și, astfel, potențiala lor utilizare în aplicații relevante pentru bioimagică. Figura 3.50b prezintă spectrele obținute pentru cele trei concentrații diferite de CRC investigate, împreună cu spectrul corespunzător al CRC în etanol (cu o concentrație de 10 μg/mL). În comparație cu spectrul CRC, se poate observa o deplasare treptată aparentă spre roșu a picului caracteristic CRC de la 531 la 544 nm pentru complexii încărcate cu molecule bioactive. Această deplasare este atribuită interacțiunilor hidrofobe ale CRC cu lanțurile de PNIPAM (în special deoarece procedura de încărcare a fost efectuată peste valoarea LCST) (Selianitis, 2022; Skandalis, 2022), deși este posibil ca regiunile hidrofobe ale catenei principale a chitosanului să faciliteze, de asemenea, încapsularea CRC.

4. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de chitosan grefat, sub formă de poliplecși

4.1. Obținerea și caracterizarea copolimerului chitosan-g-poli(*N*-izopropilacrilamidă)

4.1.1. Caracterizarea copolimerului Chit-g-PNIPAM

Mecanismul de reacție propus la grefarea chitosanului cu PNIPAM, este descris în Figura 4.1. În prima etapă, inițiatorul KPS, descompus sub influența temperaturii, poate extrage un atom de H din gruparea aminică a chitosanului, generând în sistem o sare stabilă (bisulfat de potasiu) și doi radicali, radicalul amino din chitosan și radicalul bisulfat din KPS. Cel din urmă, mai reactiv decât radicalul polimeric, poate ataca lanțul de PNIPAM la gruparea terminală activă tritiocarbonat, formând un macroradical PNIPAM (etapa 2). Acest macroradical poate reacționa în continuare cu radicalul de chitosan formând copolimerul grefat Chit-g-PNIPAM (etapa 3).

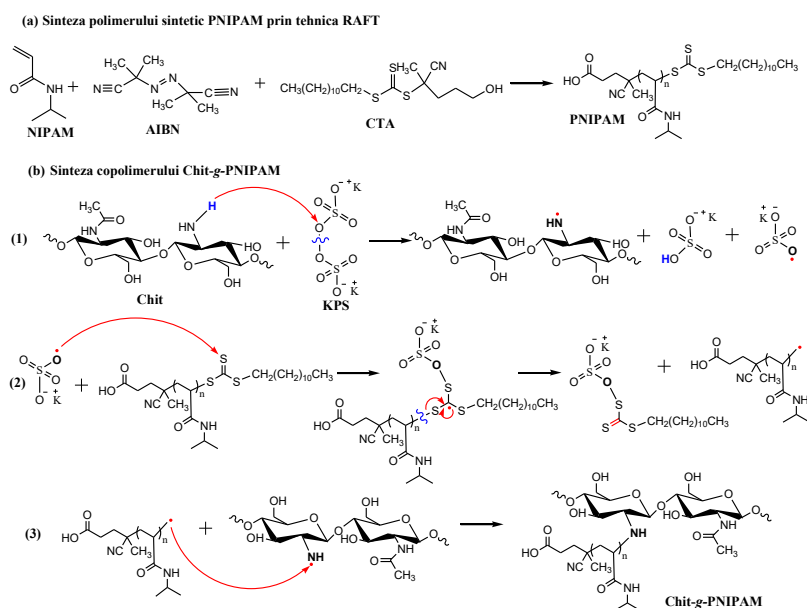


Figura 4.1. Reprezentare schematică a (a) sintezei de PNIPAM prin polimerizare RAFT și (b) mecanismului propus de grefare a PNIPAM-ului la chitosan: (1) KPS extrage un atom H din gruparea amino a chitosanului, generând radicalii chitosan și bisulfat; (2) radicalul bisulfat atacă PNIPAM la gruparea terminală activă de tritiocarbonat, generând un macroradical; (3) macroradicalul PNIPAM reacționează cu radicalul NH-de pe chitosan (Zaharia, 2024).

4.1.1.1. Spectroscopie FTIR-ATR

Obținerea copolimerului Chit-g-PNIPAM a fost validată prin spectroscopie FTIR-ATR (Figura 4.2). Astfel, vibrația de întindere a grupării N-H din PNIPAM a fost identificată la 3292 cm^{-1} (Rwei, 2016). În plus, vibrația de întindere a carbonilului (amidă I) s-a observat la 1641 cm^{-1} și vibrația de încovoiere a N-H (amidă II) la 1537 cm^{-1} (Ziminska, 2020). Gruparea izopropil din PNIPAM în spectrul FTIR-ATR prezintă benzi

caracteristice la 2971 cm^{-1} și 2933 cm^{-1} corespunzătoare grupărilor -CH (simetrice și asimetrice), precum și două benzi la numerele de undă 1371 cm^{-1} și 1461 cm^{-1} , atribuite grupării -CH₃.

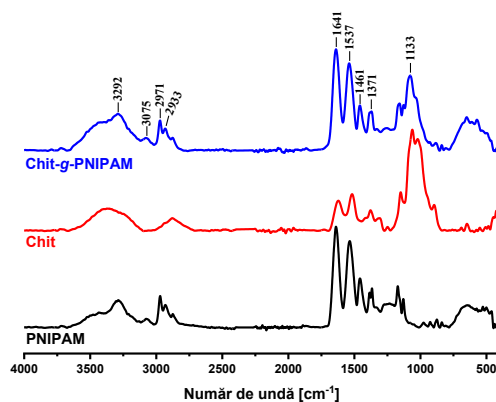


Figura 4.2. Spectrele FTIR-ATR ale PNIPAM-ului, chitosanului și Chit-g-PNIPAM (Zaharia, 2024).

Banda de la 1133 cm^{-1} a fost corelată cu vibrația de întindere C-O în chitosan, indicând prezența sa în structura copolimerului. Benzile caracteristice grupărilor N-acetil din structura chitosanului sunt prezente la aproximativ 1618 cm^{-1} (C=O, amidă I) și 1325 cm^{-1} (C-N, amidă III), și se suprapun cu cele ale PNIPAM-ului. În spectrul FTIR-ATR al copolimerului grefat au fost identificate semnale caracteristice atât pentru PNIPAM cât și pentru chitosan. De asemenea, copolimerul nu conține atomi de sulf în structură, fapt dovedit de spectrul FTIR-ATR prin dispariția benzilor la numerele de undă 860 și 610 cm^{-1} din spectrul Chit-g-PNIPAM, care au fost atribuite în spectrul PNIPAM grupării tritiocarbonat.

4.1.1.3. Analiza termogravimetrică

Analiza termogravimetrică a chitosanului, PNIPAM-ului și Chit-g-PNIPAM a fost realizată în intervalul de temperatură $37 - 700\text{ }^{\circ}\text{C}$, iar comportamentul termic (pierdere masică) a fost evaluat prin comparație (Figura 4.4). Chitosanul și PNIPAM-ul au prezentat o evoluție diferită a degradării termice, PNIPAM prezentând o stabilitate termică mai mare până la descompunerea sa completă la $450\text{ }^{\circ}\text{C}$. Curba TG a chitosanului a evidențiat două etape de descompunere (Figura 4.4, linie întreruptă). Prima etapă a avut loc în intervalul de temperatură $38 - 96\text{ }^{\circ}\text{C}$, și este datorată pierderii de apă (Kumar, 2012), cu o pierdere masică de aproximativ 9,58%. Descompunerea majoră a început la $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ cu o pierdere masică de aproximativ 44% și a fost cauzată de deshidratarea ciclurilor piranozice, apoi depolimerizare, urmată de degradarea termică a catenei polizaharidice (Sosnik, 2015).

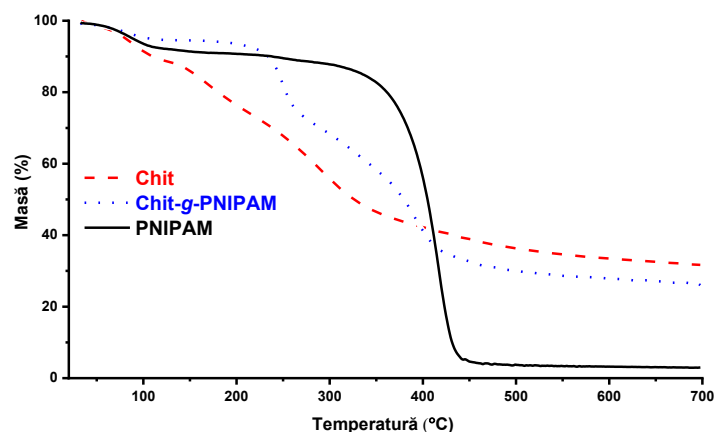


Figura 4.4. Curbele termogravimetrice pentru chitosan, PNIPAM și Chit-g-PNIPAM (Zaharia, 2024).

Degradarea PNIPAM a fost limitată, de asemenea, la două etape (Figura 4.4, linie dreaptă): prima etapă, care a fost detectată la aproximativ 93 °C, a inclus o pierdere de masă de 8% și se poate datora evaporării apei, iar a doua etapă între 350 - 450 °C, poate fi atribuită degradării termice complete a polimerului sintetic. În același timp, pentru copolimerul Chit-g-PNIPAM procesul de degradare s-a desfășurat în trei etape (Figura 4.4, linie punctată). Prima etapă, la aproximativ 95 °C și însoțită de o pierdere de masă de 4%, a fost atribuită evaporării apei prezente în copolimer, care a fost reținută prin formarea de legături de hidrogen cu acesta. Descompunerea catenei polizaharidice de chitosan este responsabilă de a doua pierdere masică (26%), în intervalul de temperaturi 200 - 300 °C. A treia etapă, care începe la 310 °C, cu o pierdere de masă de 35%, a fost atribuită descompunerii termice a catenei sintetice de PNIPAM. Stabilitatea termică a chitosanului în copolimerul grefat a scăzut de la 250 la 210 °C din cauza impactului PNIPAM-ului asupra fazei cristaline a chitosanului (Queiroz, 2014). Aceste modificări termice au loc la temperaturi care nu sunt relevante pentru posibilele aplicații medicale și care nu vor putea fi niciodată întâlnite *in vivo*.

4.1.2. Influența temperaturii asupra proprietăților soluțiilor de Chit-g-PNIPAM

Influența procesului de încălzire/răcire (în intervalul de temperatură 25 - 45 °C) asupra tuturor parametrilor indicați este prezentată în Figura 4.6. Intervalul de temperatură utilizat la măsurători a fost stabilit în funcție de proprietățile PNIPAM-ului, care are LCST la aproximativ 32 °C.

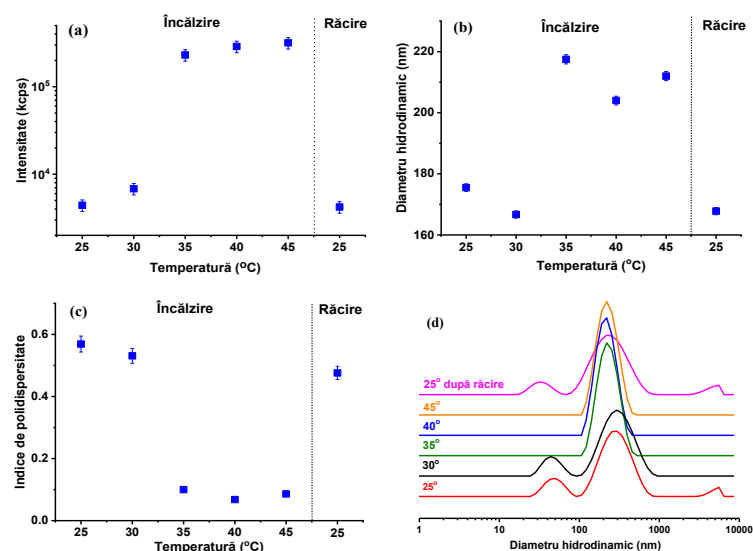


Figura 4.6. Influența temperaturii asupra (a) intensității luminii dispersate, (b) diametrul hidrodinamic, (c) indicelui de polidispersitate și (d) distribuției dimensionale a Chit-g-PNIPAM (concentrația polimerului: 1,2 mg/mL; pH = 6,5) (Zaharia, 2024).

Din Figura 4.6a, se poate observa că creșterea temperaturii are impact asupra masei agregatelor Chit-g-PNIPAM, fapt dovedit de creșterea intensității luminii dispersate după LCST-ul PNIPAM-ului. De asemenea, diametrul hidrodinamic al particulelor de Chit-g-PNIPAM a variat în funcție de temperatură, ceea ce sugerează că particulele deja formate la temperatură scăzută se combină între ele pe măsură ce temperatura crește peste valoarea LCST, schimbându-și densitatea și dimensiunea la creșterea temperaturii (Figura 4.6b). Acest lucru are loc în paralel cu o creștere a masei agregatelor, după cum indică creșterea intensității. Acest proces poate fi atribuit generării de structuri mai compacte prin deshidratarea lanțurilor de PNIPAM, pe baza interacțiunilor hidrofobe dintre părțile hidrofobe ale Chit-g-PNIPAM și a legăturilor de H dintre grupările amidice din PNIPAM și grupările hidroxilice din chitosan. Figura 4.6c ilustrează că valorile indicelui de polidispersitate sunt mai mari de 0,2 la temperaturi sub LCST și scad sub 0,2 la temperaturi peste LCST, sugerând o trecere de la structura dezordonată la agregate mai ordonate/dense de Chit-g-PNIPAM (Bao, 2010). Distribuția dimensiunilor pentru copolimerul Chit-g-PNIPAM (Figura 4.6d) demonstrează că la temperaturi peste 35 °C, unde lanțurile grefate de PNIPAM posedă o hidrofobie sporită, prezintă o singură populație. După răcirea soluțiilor de Chit-g-PNIPAM, a fost demonstrată reversibilitatea procesului de agregare/solubilizare, după cum se poate observa în Figura 4.6 (ultimul punct din diagrame, după răcire la 25 °C) dimensiunea particulelor de Chit-g-PNIPAM, indicele de polidispersitate și intensitatea luminii dispersate revenind aproximativ la valorile inițiale de la 25 °C. Prin urmare, proprietățile termosensibile ale copolimerului Chit-g-PNIPAM

nou sintetizat îl recomandă drept potențial candidat pentru construcția de nanocontainere inteligente, pentru eliberarea ulterioară a compușilor bioactivi (de exemplu, ca sistem „inteligent” de eliberare a genelor).

4.2. Obținerea și caracterizarea poliplecșilor pe bază de Chit-g-PNIPAM și ADN

4.2.1. Proprietăți fizico-chimice ale poliplecșilor Chit-g-PNIPAM/ADN

Rezultatele obținute în ceea ce privește intensitatea luminii dispersate, valorile razei hidrodinamice (R_h) a diferitelor populații identificate, evidențiate prin diferite picuri ale funcțiilor de distribuție a dimensiunilor, împreună cu potențialul zeta al poliplecșilor sunt prezentate în Figura 4.7, în funcție de raportul N/P.

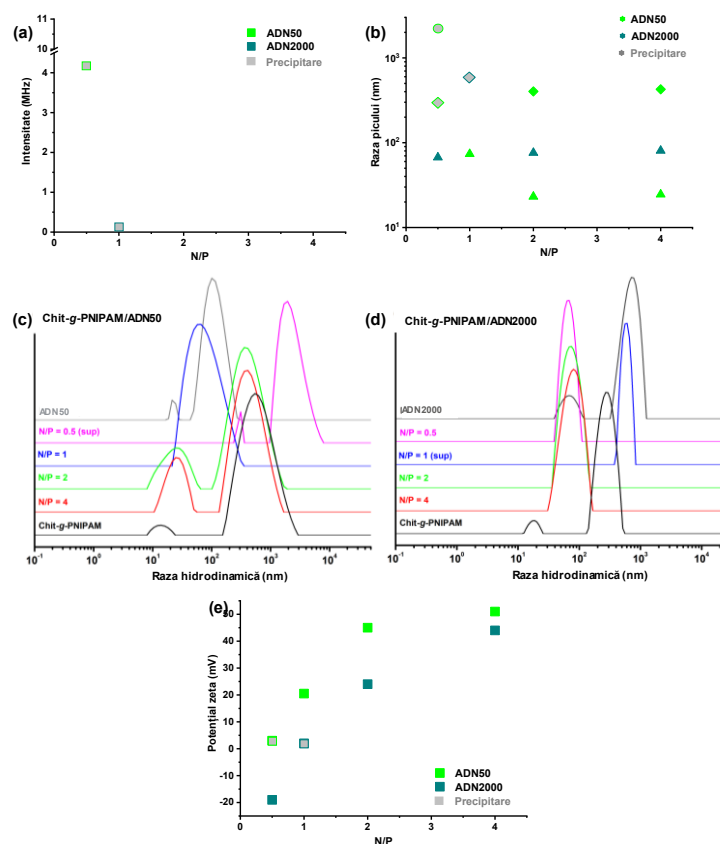


Figura 4.7. Rezultatele DLS și ELS cu privire la (a) intensitatea luminii dispersate, (b) raza hidrodinamică (c, d) distribuția dimensională și (e) valorile potențialului zeta pentru poliplecșii Chit-g-PNIPAM/ADN50/2000 (Karayianni, 2024).

După cum se observă în Figura 4.7a, masa (care este direct proporțională cu intensitatea luminii dispersate) poliplecșilor formați între copolimerul grefat Chit-g-PNIPAM și ADN, prezintă cele mai mari valori pentru rapoartele N/P sub 1 (adică punctul estimat de neutralizare a sarcinilor). Prin urmare, se poate deduce cu o certitudine relevantă că, pentru $N/P \leq 1$, interacțiunea dintre cele două componente este extrem de puternică sau, cu alte cuvinte, excesul de ADN raportat la grupele amino disponibile ale

Chit-g-PNIPAM conduce la formarea de poliplecși sau agregate mari. Atunci când copolimerul Chit-g-PNIPAM este în exces și, prin urmare, există un surplus de sarcini pozitive, adică pentru $N/P > 1$, poliplecșii rezultați sunt mai puțin denși și sunt stabili coloidal. În cele din urmă, merită menționat faptul că, pentru aceleași valori N/P , poliplecșii formați cu ADN2000 au o masă mai mare sau sunt mai denși decât cei cu ADN50, ceea ce poate indica un grad mai ridicat de interacțiune cu copolimerul grefat.

În ceea ce privește dimensiunea poliplecșilor formați, funcțiile de distribuție a dimensiunii (Figura 4.7, c și d), oferă informații valoroase. În primul rând, soluția de Chit-g-PNIPAM prezintă două picuri care indică două populații în soluție, cu valori R_h corespunzătoare în intervalul 10-20 nm și aproximativ 300-600 nm. Prezența celui de-al doilea pic indică un anumit grad de autoasamblare al copolimerului grefat, formând agregate cu mai multe lanțuri, cel mai probabil datorită interacțiunilor hidrofobe provenite din catena de chitosan sau interacțiunile intra-polielectrolitice ale copolimerului. Prin urmare, în soluție coexistă atât lanțuri de copolimer Chit-g-PNIPAM, cât și agregate.

În ceea ce privește poliplecșii Chit-g-PNIPAM/ADN50, la valori N/P mari (2 și 4) funcțiile de distribuție a dimensiunii (Figura 4.7b) sunt similare cu cele ale copolimerului pur sau, cu alte cuvinte, dimensiunile celor două populații de poliplecși sunt dictate de populațiile corespunzătoare ale copolimerului grefat care este în exces. Un aspect destul de interesant este faptul că pentru sistemul Chit-g-PNIPAM/ADN2000, distribuțiile dimensiunilor prezintă un singur pic (o populație), cu o dimensiune destul de similară de aproximativ 75 nm pentru toate cele trei dispersii stabile. Acest lucru arată formarea de poliplecși denși indiferent de cantitatea de copolimer grefat, care este în mod evident o consecință directă a lungimii probei de ADN.

Informațiile privind sarcina efectivă a poliplecșilor formați, derivate din valorile potențialului zeta (Figura 4.7e), sunt în conformitate cu ipotezele formulate până în prezent. Pornind de la cea mai mare valoare N/P , ambele sisteme Chit-g-PNIPAM/ADN50/2000 prezintă valori pozitive relativ mari, apropiate de cea măsurată pentru copolimerul pur, care este de aproximativ +50 mV. Această observație confirmă faptul că, atunci când copolimerul Chit-g-PNIPAM este în exces, proprietățile generale și conformația poliplecșilor sunt dictate în principal de starea și caracteristicile intrinseci de conformație/agregare ale acestuia. Pe măsură ce raportul N/P scade (crește conținutul de ADN), se poate observa o scădere treptată a potențialului zeta al poliplecșilor, ajungând la valori apropiate de zero în cazul probei de ADN50 sau chiar la valori negative (adică inversare de sarcină) în cazul ADN2000. Se confirmă astfel că

poliplecşii formaţi la rapoarte N/P apropiate de 1 se caracterizează printr-o sarcină globală redusă, ca urmare a neutralizării sarcinii care are loc la interacţiunea electrostatică a celor două componente.

Pentru a obţine informaţii suplimentare cu privire la morfologia poliplecşilor, s-a efectuat imagistică STEM pentru cei formaţi la $N/P = 4$ şi ambele sisteme Chit-g-PNIPAM/ADN50/2000, după cum se poate observa în Figura 4.8.

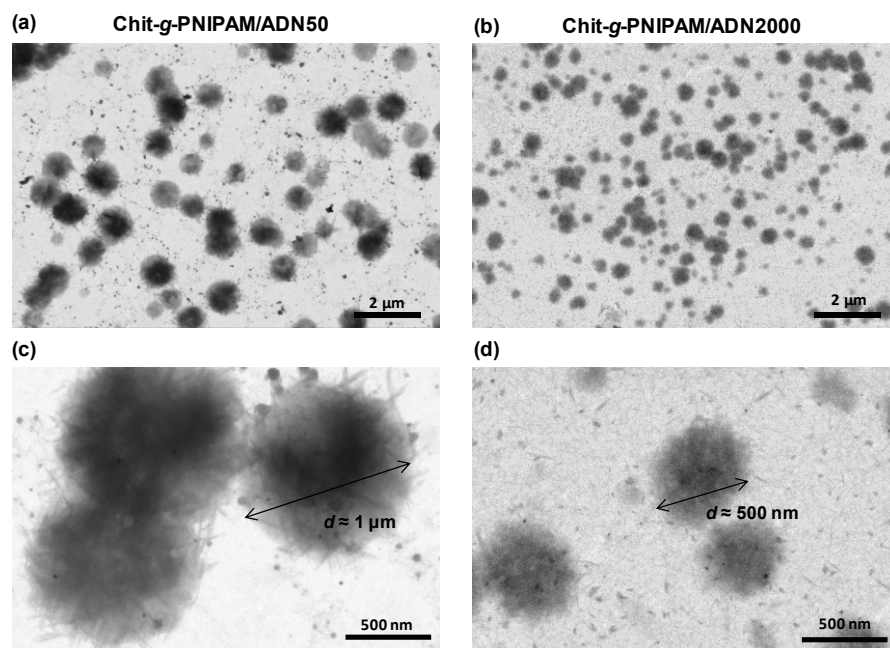


Figura 4.8. Imagini STEM pentru poliplecşii stabili formaţi la $N/P = 4$ pentru ambele sisteme (a, c) Chit-g-PNIPAM/ADN50 şi (b, d) Chit-g-PNIPAM/ADN2000 (Karayianni, 2024).

În ambele cazuri se observă nanostructuri sferice omogene, de diferite dimensiuni, cu o structură de tip arici. În mod evident, densitatea poliplecşilor scade în apropierea periferiei acestora, iar în părţile exterioare ale nanostructurilor formate (în special pentru ADN50) sunt vizibile structuri drepte sau ușor curbate de lanțuri de copolimer/ADN complexate. Această din urmă caracteristică poate fi un rezultat al caracterului semirigid atât al ADN-ului cât și al catenei de chitosan și poate conduce la o coasamblare în formă de scară a complecșilor primari ADN/copolimer grefat.

4.2.2. Studiul răspunsului termic al poliplecşilor Chit-g-PNIPAM/ADN

După cum s-a anticipat, prezența catenelor laterale PNIPAM conferă copolimerului grefat un caracter termosensibil (Zaharia, 2024), care poate fi exploatat în potențiale bioaplicații. Prin urmare, investigarea răspunsului termic al poliplecşilor Chit-g-PNIPAM/ADN50/2000 este de un interes deosebit. Figura 4.9 prezintă rezultatele obținute în ceea ce privește creșterea intensității luminii dispersate și valorile R_h ale

diferitelor picuri identificate în funcțiile de distribuție a dimensiunilor corespunzătoare, în funcție de temperatură, pentru ambele sisteme Chit-g-PNIPAM/ADN50/2000. De reținut că, în toate cazurile, după creșterea treptată a temperaturii până la 45 °C, proba a fost răcită până la temperatura de 25 °C și măsurată din nou pentru a examina reversibilitatea oricăror modificări apărute.

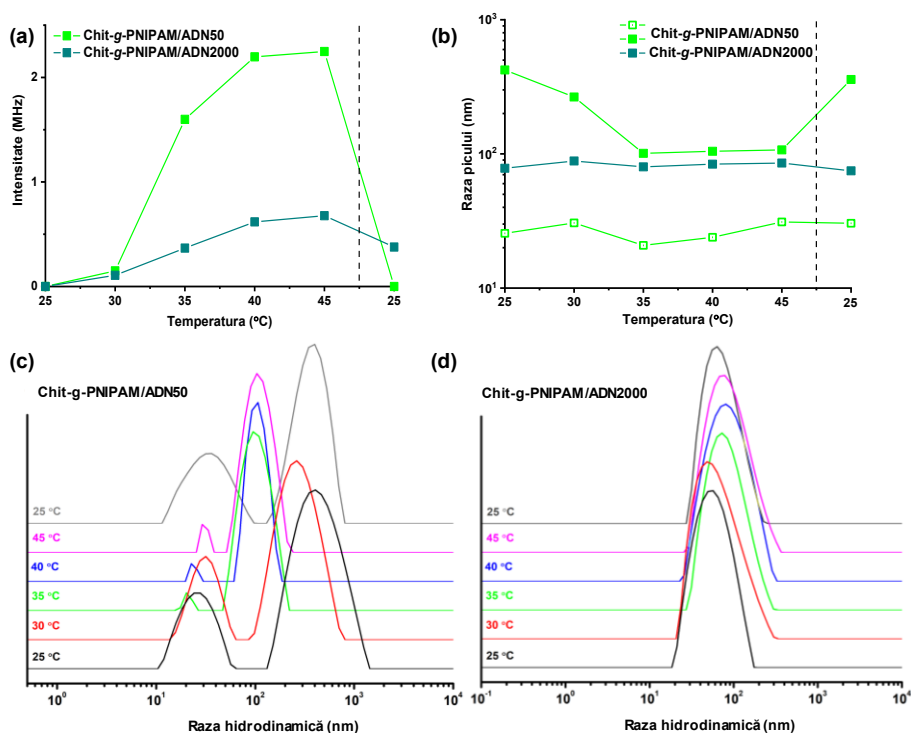


Figura 4.9. Influența temperaturii asupra (a) intensității luminii dispersate, (b) razei hidrodinamice (c, d) funcțiile de distribuție a dimensiunii pentru poliplecșii formați la $N/P = 4$ pentru sistemele Chit-g-PNIPAM/ADN50 și Chit-g-PNIPAM/ADN2000 (Karayianni, 2024).

Pentru poliplecșii formați la $N/P = 4$ se observă o creștere semnificativă a intensității luminii dispersate peste 35 °C pentru ambele sisteme, după cum se vede în Figura 4.9a, schimbarea fiind și mai pronunțată în cazul poliplecșilor formați cu proba de ADN scurt. În același timp, dimensiunea poliplecșilor pe bază de ADN2000 pare să nu fie afectată de creșterea temperaturii, fiind observată doar o ușoară lărgire a picului R_h în funcțiile de distribuție a dimensiunilor corespunzătoare (Figura 4.9d). Dimpotrivă, pentru sistemul cu ADN50 se observă o scădere considerabilă a dimensiunii populației mai mari (Figura 4.9c), în timp ce pentru dimensiunea populației mai mici există o scădere mult mai mică, observată mai ales la temperatura de 35 °C.

4.2.4. Stabilitatea poliplecșilor Chit-g-PNIPAM/ADN în fluide biologice

În afară de stabilitatea față de tăria ionică, este la fel de important să se testeze comportamentul poliplecșilor atunci când interacționează cu fluidele biologice, ca

modalitate de simulare a răspunsului lor la introducerea în corpul uman. În acest scop, dispersiile stabile de poliplecși ale ambelor sisteme au fost amestecate (în volume egale) cu soluții de SFB de concentrații diferite, 10 și 50% v/v în TFS, iar amestecurile finale echilibrate au fost măsurate prin DLS mai întâi la temperatura camerei (25 °C) și ulterior la temperatura corpului (37 °C) după incubare timp de 30 min. Figura 4.14 prezintă rezultatele obținute în ceea ce privește creșterea intensității luminii dispersate și valorile R_h rezultate din funcțiile de distribuție a dimensiunii corespunzătoare, pentru poliplecșii la $N/P = 4$ ale ambelor sisteme Chit-g-PNIPAM/ADN50/2000, după amestecarea cu soluții de SFB de concentrații diferite (10 și 50% v/v).

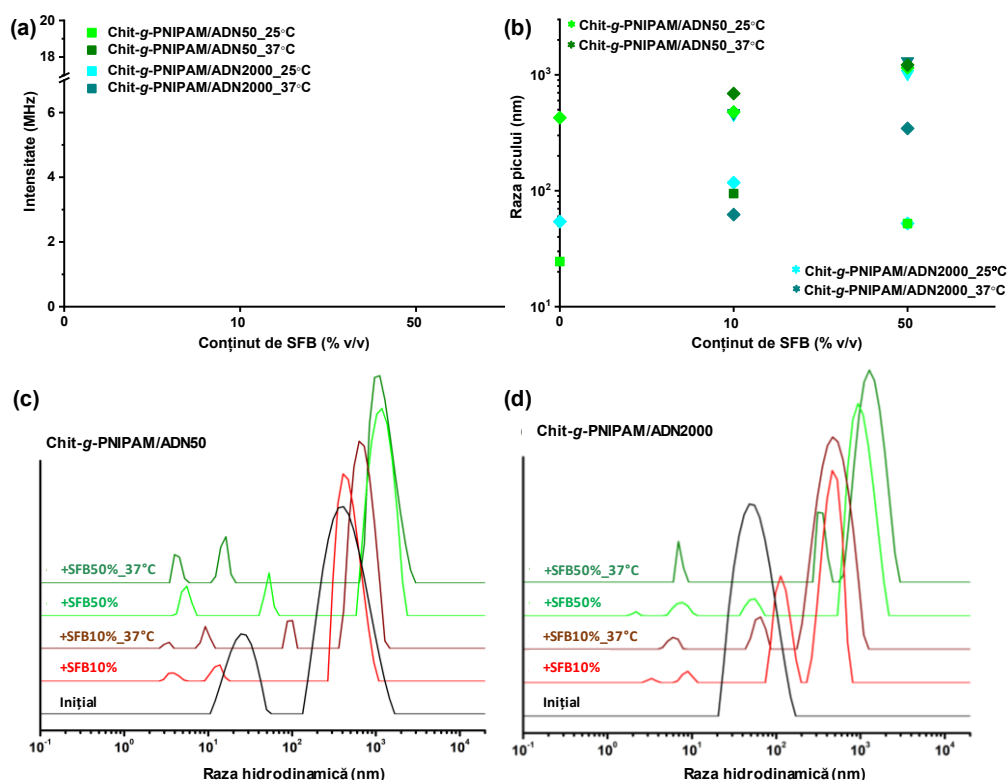


Figura 4.14. Influența interacțiunii cu SFB asupra (a) intensității luminii dispersate, (b) razei hidrodinamice, (c,d) funcțiilor de distribuție a dimensiunilor pentru poliplecșii formați la $N/P = 4$ din ambele sisteme Chit-g-PNIPAM/ADN50/2000 (Karayianni, 2024).

Rezultatele DLS evidențiază o creștere în principal a intensității luminii dispersate și, într-o mai mică măsură, a dimensiunii poliplecșilor formați cu ADN50, după amestecarea cu soluțiile de SFB, diferențele fiind mai pronunțate pentru concentrația mai mare de SFB. Chiar și după incubarea la 37 °C se observă mici modificări. Prin urmare, se poate presupune că, deși poliplecșii interacționează cu componentele soluției de SFB (în principal proteine și enzime), deoarece există o creștere considerabilă a intensității, deși dimensiunea lor nu se modifică foarte mult, cel mai probabil datorită structurii lor inițiale

care permite reorganizări conformaționale adecvate. Desigur, la un conținut mai ridicat de SFB, poliplecșii leagă mai multe proteine/enzime, ceea ce duce la o creștere vizibilă atât a masei, cât și a dimensiunii acestora. Aproximativ aceeași explicație este valabilă și pentru poliplecșii din sistemul Chit-g-PNIPAM/ADN2000, principala diferență în acest caz fiind că aceștia sunt deja caracterizați de o conformație inițială compactă, astfel încât la legarea componentelor din SFB are loc o creștere semnificativă a masei și dimensiunii lor, în special la o concentrație mare de SFB, unde posibilitatea agregării secundare este destul de probabilă.

5. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de alginat de calciu, sub formă de hidrogeluri compozite

5.2. Obținerea *in situ* și caracterizarea hidrogelurilor compozite ACa-CaCO₃

Deși procesul de liofilizare a condus la obținerea unor hidrogeluri bine definite, acestea se dizolvă rapid în mediu apos. Prin urmare, s-a pus problema stabilizării hidrogelurilor pentru aplicații ulterioare. Întrucât hidrogelurile sunt instabile în soluții apoase, agentul de reticulare ales a fost soluția BTCDA 1% în acetonă, iar morfologia hidrogelurilor ACa-CaCO₃ reticulate este prezentată în Figura 5.5. După cum se poate observa din imaginile SEM incluse în Figura 5.5, morfologia poroasă a hidrogelurilor a fost menținută după procesul de reticulare, pereții porilor păstrându-și integritatea și orientarea. Totuși, dimensiunea porilor a scăzut ușor după procesul de spălare (cu ~ 2 μm în ambele cazuri), cel mai probabil datorită reticulării cu BTCDA a lanțurilor polizaharidice.

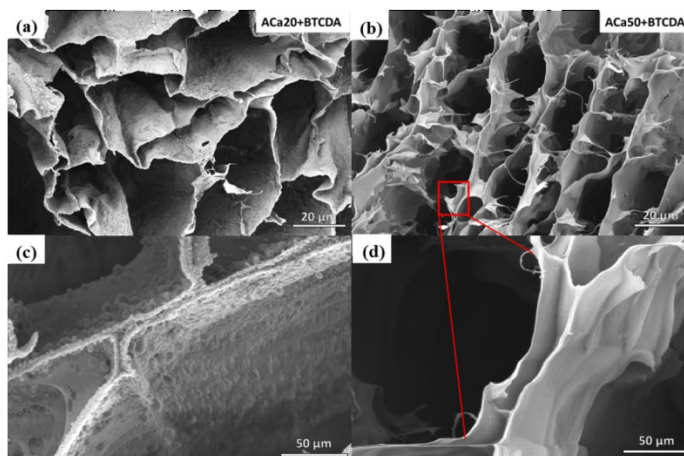


Figura 5.5. Imagini SEM ale (a) ACa20-CaCO₃ și (b) ACa50-CaCO₃ după reticulare cu BTCDA; detalii ale peretelui porilor din ACa50-CaCO₃ (c) înainte de reticulare și (d) după reticulare (Mihai, 2024).

În timpul etapei de reticulare, cele două grupări anhidridice ale BTCDA pot reacționa intra- sau intermolecular cu grupările OH aparținând aceleiași lanț polimeric sau, respectiv, a două lanțuri polimerice. Formarea de noi tipuri de legături (de tip ester) conduc la îmbunătățirea proprietăților mecanice ale materialului, densificând rețeaua organică. Mai mult, prin spălarea intensivă a probelor, cristalele de CaCO_3 în exces au fost eliminate din pereții hidrogelurilor (se observă prin compararea imaginilor din Figura 5.4, c și d).

Prezența CaCO_3 în matricea hidrogelului după reticulare și spălare intensivă a fost confirmată de difractogramele XRD (Figura 5.6).

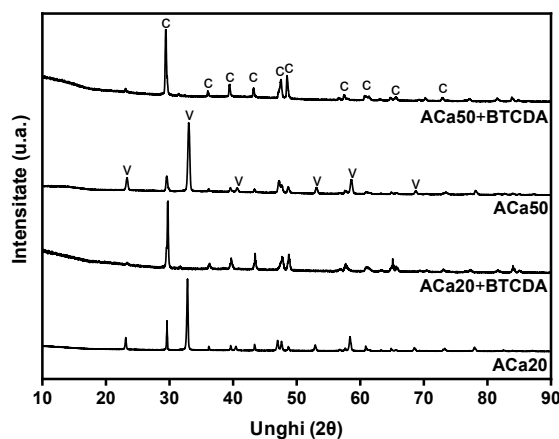


Figura 5.6. Difractograme XRD ale ACa20 și ACa50, înainte și după reticulare cu BTCDA (Mihai, 2024).

După cum se poate observa în Figura 5.6, probele neretificate (ACa20 și ACa50) au difractograme similare care evidențiază ca faze cristaline vaterita și calcitul. Astfel, prezența vateritei este confirmată de picul caracteristic intens la $2\theta = 33,1$ (114) și de picurile largi de la 23,41 (110), 40,68 (211), 53,14 (300), 58,65 (224) și 68,76 (202). Planurile cristalografice ale calcitului, cu indicii Miller (104), (110), (113), (202), (018), (122), (310), (444) și (431) sunt reprezentate de picurile de difracție la unghiurile 2θ de 29,41; 35,97; 39,38; 43,26; 47,61; 48,51; 57,40; 61,01; 65,55 și 72,99.

După reticulare cu BTCDA, semnalele caracteristice vateritei dispar, în timp ce intensitatea tuturor semnalelor caracteristice calcitului cresc, difractogramele prezentând cel mai intens vârf la $2\theta = 29,4$. Acest fenomen poate fi atribuit transformării vateritei în calcit, în timpul procesului de reticulare, prin procese consecutive de dizolvare-recristalizare (Cheng, 2014). Astfel, difractogramele XRD demonstrează faptul că, deși nu există cristale de CaCO_3 vizibile din punct de vedere imagistic după reticulare cu BTCDA, toate hidrogelurile conțin calcit, cel mai stabil polimorf de CaCO_3 , ceea ce confirmă

formarea *in situ* cu succes a compozitelor ACa-CaCO₃, care constau dintr-o matrice de alginat ranforsată cu nanocristale de carbonat de calciu.

Testul MTS (Figura 5.8) a demonstrat că hidrogelurile ACa-CaCO₃ au o viabilitate celulară foarte scăzută din cauza dizolvării matricei de alginat, dovedind astfel necesitatea unui reticulant pentru a stabili hidrogelurile. După reticularea cu BTCDA și spălarea intensivă a hidrogelurilor, materialele au prezentat o creștere ridicată a viabilității celulare relative după 48 de ore în mediul de cultură, până la 80%. Acest lucru sugerează că hidrogelurile reticulate ACa-CaCO₃ pot avea aplicații în domeniul biomedical, având o biocompatibilitate bună.

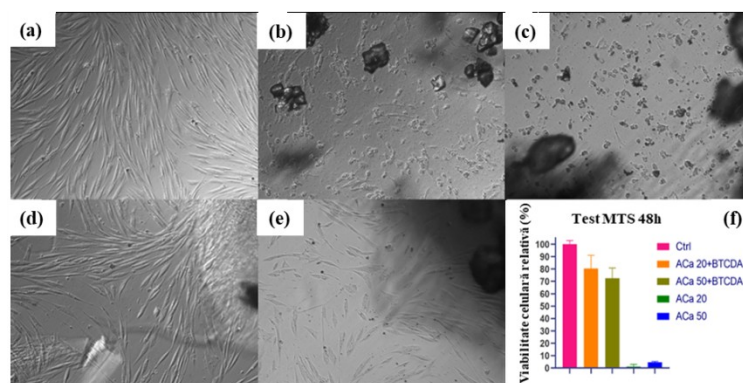


Figura 5.8. Morfologia celulelor după 48h de incubare cu: (a) control, (b) ACa20, (c) ACa50, (d) ACa20+BTCDA, (e) ACa50+BTCDA; și (f) rezultatul testului MTS al hidrogelurilor ACa20 și ACa50, înainte și după reticulare (Mihai, 2024).

5.4. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente ACa-CPN-CaCO₃

După cum se poate observa din Figura 5.10, toate probele au o structură de hidrogel, cu pori bine definiți, atât înainte, cât și după reticulare. Atunci când au fost utilizați CPN cu un raport molar de 0,6, hidrogelurile rezultate au pori cu dimensiuni diferite, cuprinse între 3,2 - 15,7 μm și 2,6 - 12,8 μm pentru CPN Z60/ANa și, respectiv, Z60/CSA. În cazul CPN cu raport molar de 1,2, ambele probe au condus la formarea unei rețele mai stabile, menținând pereții porilor și orientarea acestora după reticulare. În plus, dimensiunea porilor hidrogelurilor este mai uniformă, cu o medie de $11,2 \pm 2,2 \mu\text{m}$ și $8,9 \pm 3,2 \mu\text{m}$ atunci când se utilizează Z60/ANa 1,2 și, respectiv, Z60/CSA 1,2. În plus, spălarea intensivă a probelor după procesul de reticulare nu a modificat morfologia inițială a hidrogelurilor.

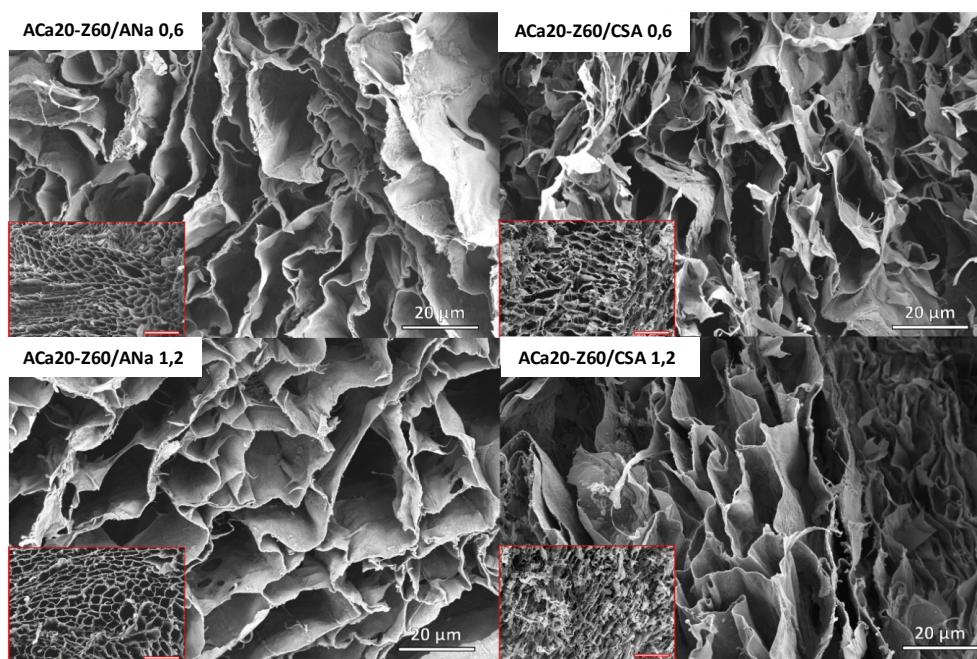


Figura 5.10. Imagini SEM ale hidrogelurilor ACa-CPN-CaCO₃ după reticulare cu BTCDA; inserate imagini SEM ale hidrogelurilor corespunzătoare înainte de reticulare cu scara de 100 μm (Mihai, 2024).

Chiar dacă toate cele patru dispersii de CPN au făcut posibilă formarea de rețele tridimensionale, o organizare mai bună s-a obținut atunci când au fost utilizate nanoparticule Z60/ANa, comparativ cu Z60/CSA (Figura 5.10, imaginile hidrogelurilor înainte de reticulare); această tendință poate fi corelată cu prezența alginatului atât în matrice, cât și pe nanoparticule. Ca atare, ionii de calciu prezenți în mediul de reacție pot interacționa cu lanțurile de alginat din dispersia inițială de alginat de calciu, precum și cu unele lanțuri disponibile de alginat de sodiu prezente pe suprafața nanoparticulelor, creând structuri de tip "egg-box" între aceste două componente (Figura 5.2.b), crescând astfel stabilitatea hidrogelurilor. După cum demonstrează imaginile SEM, toate hidrogelurile obținute cu CPN nu prezintă cristale mari de CaCO₃ vizibile. Prezența carbonatului de calciu a fost evidențiată prin XRD, difractogramele obținute pentru hidrogeluri fiind prezentate în Figura 5.11, prin comparație cu difractogramele materialelor de plecare.

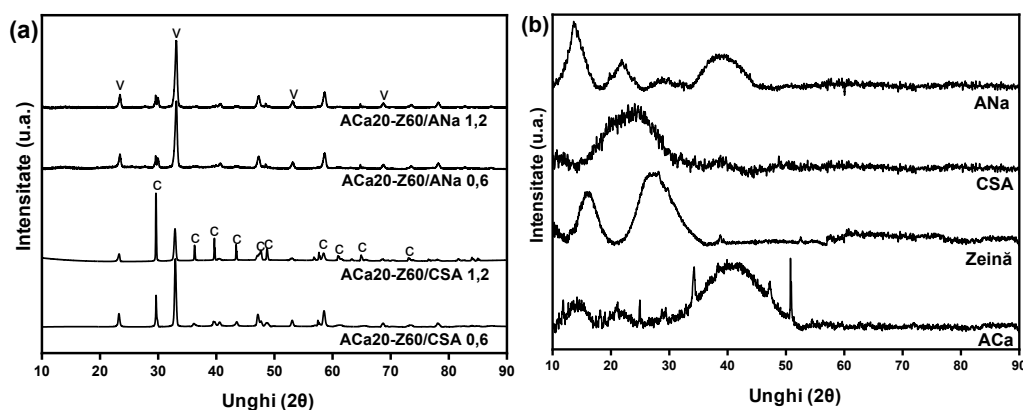


Figura 5.11. Difractograme XRD ale (a) hidrogelurilor ACa-CPN- CaCO_3 după reticulare cu BTCDA și (b) ACa utilizat ca matrice pentru hidrogel și componentele individuale ale CPN: zeină, CSA și ANa (Mihai, 2024).

Difractogramele XRD demonstrează prezența CaCO_3 în toate probele investigate (Figura 5.11a), prezentând picuri caracteristice pentru vaterită la $2\theta = 23,30; 33,1; 56,62; 73,08$ și pentru calcit la $2\theta = 29,61; 36,25; 39,67$ și, respectiv, picuri de intensitate scăzută la $43,41; 47,64; 48,70; 58,43; 61,15; 65,67$ și $73,85$. Difractogramele pulberilor de ACa, zeină, CSA și ANa utilizate în aceste experimente pentru prepararea hidrogelurilor sunt reprezentate în Figura 5.10b. Polizaharidele și zeina au, în general, o bandă de difracție largă caracteristică structurii lor amorfă.

Hidrogelurile obținute cu CPN pe bază de ANa (cu ambele rapoarte molare) au prezentat picuri mai puține și mai slabe ca intensitate pentru calcit, cu un procent de 8,83% în ACa20-Z60/ANa 0,6 și 7,74% în ACa20-Z60/ANa 1,2 (comparativ cu CPN pe bază de CSA (42,9% în ACa20-Z60/CSA 0,6 și 61% în ACa20-Z60/CSA 1,2)). Aceste variații pot fi atribuite în principal modificărilor condițiilor de suprasaturare în cadrul experimentului din cauza structurii polizaharidelor utilizate (CSA sau ANa).

6. Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de xantan, sub formă de emulsii ulei-în-apă

6.2. Optimizarea formulărilor pentru prepararea emulsiilor ulei-în-apă

6.2.1. Influența conținutului de ulei macerat de morcov asupra caracteristicilor emulsiilor ulei-în-apă

Uleiul macerat de morcov a fost selectat deoarece acționează ca un ingredient hidratant eficient pentru toate tipurile de piele, inclusiv pentru pielea uscată. Prin urmare, au fost preparate și caracterizate formulări cu un conținut diferit de OC (0,5 până la 3 mL), iar rezultatele analizei acestora sunt incluse în Figura 6.3.

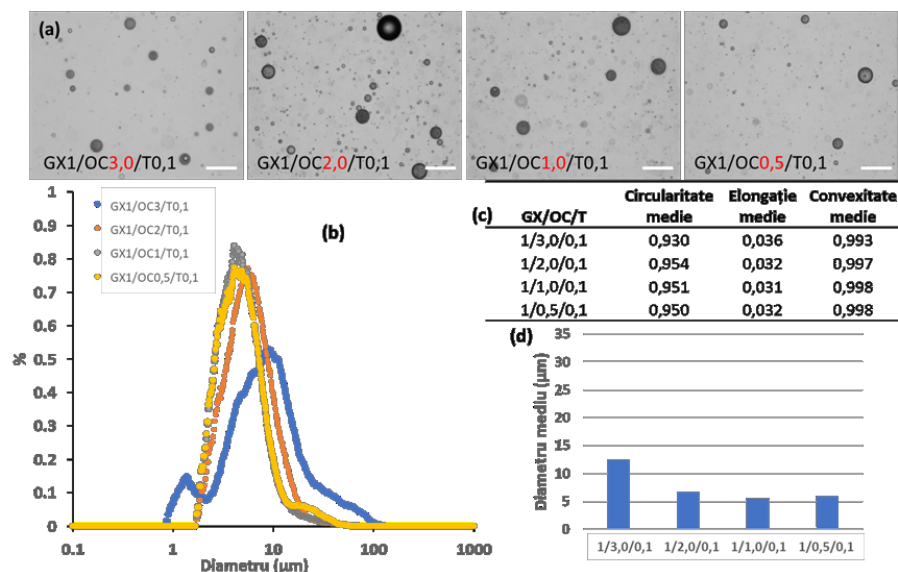


Figura 6.3. Influența conținutului de ulei macerat de *Daucus Carota* asupra caracteristicilor emulsiilor U/A: (a) imagini ale picăturilor din emulsii (scară = 100 μm), (b) distribuția diametrului, (c) parametrii de formă și (d) diametrul mediu (Lotos, 2024b).

După cum se observă în Figura 6.3 (a, b și d), indiferent de conținutul de OC, s-a constatat o distribuție relativ largă a dimensiunilor picăturilor, diametrul mediu variind ușor odată cu scăderea conținutului de OC. Cu toate acestea, scăderea conținutului de OC în formulări a diminuat polidispersitatea dimensională, singura probă cu populații clare de două dimensiuni fiind găsită atunci când s-a utilizat cel mai mare conținut de OC pentru formularea emulsiei U/A (GX1/OC3/T0,1). De asemenea, parametrii de circularitate (care este o măsură a apropierei de un cerc perfect) și convexitate (o măsură a rugozității suprafeței unei particule), foarte apropiați de valoarea unu, împreună cu alungirea (o măsură a relației lungime/lățime) apropiată de zero confirmă forma sferică a picăturilor, indiferent de conținutul de OC, după cum se poate vedea în Figura 6.3c.

6.3. Studiul proprietăților biologice a emulsiilor ulei-în-apă

6.3.1. Comportamentul citotoxic al emulsiilor ulei-în-apă

Citotoxicitatea celulelor de fibroblaste umane normale (NHDF) după 24 de ore de contact cu probele testate a fost comparată cu cea a celulelor netratate, rezultatele fiind incluse în Figura 6.10. În conformitate cu ISO 10993-5:2009, reducerea viabilității celulelor cu peste 30% este considerată un efect citotoxic. Astfel, după cum se observă în Figura 6.10, după 24 de ore de tratament rezultă că emulsiile cu un conținut mai mic de surfactant (GX1/OC3/T0,1, GX1/OC1/T0,1 și GX1/OC2/T0,1) nu sunt citotoxice, indiferent de conținutul de OC. Pe de altă parte, proba cu cel mai mare conținut de surfactant (GX1/OC3/T3) s-a dovedit a fi citotoxică pentru celulele NHDF, cel mai

probabil din cauza cantității mari de agent tensioactiv, Tween 80 fiind cunoscut ca având un efect citotoxic asupra fibroblastelor umane normale (Arechabala, 1999).

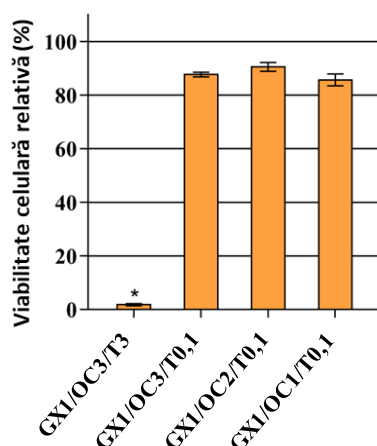


Figura 6.10. Citotoxicitatea celulelor NHDF tratate timp de 24 de ore cu emulsii U/A, în comparație cu celulele netratate. Rezultatele sunt prezentate ca valoare medie $\pm$ eroarea standard a mediei, $n = 3$; * $p < 0,05$ (Lotos, 2024b).

6.3.2. Activitatea antimicrobiană a emulsiilor ulei-în-apă

Activitatea antimicrobiană a fost evaluată împotriva a patru microorganisme diferite (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* și *C. glabrata*), utilizând testul Kirby-Bauer, cunoscut sub numele de metoda de difuzie pe disc, diametrele zonelor de inhibiție fiind prezentate în Tabelul 6.1, împreună cu concentrațiile minime inhibitorii (CMI) determinate prin metoda diluției în mediul de cultură.

Tabelul 6.1. Activitatea antimicrobiană a emulsiilor U/A față de tulpinile de referință: rezultatele metodei de difuzie pe disc și concentrația minimă inhibitoare, CMI (Lotos, 2024b).

Emulsie	GX1/OC3/T3	GX1/OC3/T0,1	GX1/OC2/T0,1	GX1/OC1/T0,1
Tulpini	Zonă de inhibiție (mm)			
<i>E. coli</i>	10,30 $\pm$ 0,28	11,85 $\pm$ 0,21	11,55 $\pm$ 0,77	12,00 $\pm$ 0,28
<i>K. pneumoniae</i>	8,20 $\pm$ 0,14	9,20 $\pm$ 0,14	9,25 $\pm$ 0,21	8,65 $\pm$ 0,49
<i>E. faecalis</i>	10,30 $\pm$ 0,56	12,10 $\pm$ 0,14	11,80 $\pm$ 0,42	12,55 $\pm$ 0,35
<i>C. glabrata</i>	13,30 $\pm$ 0,99	13,25 $\pm$ 0,77	13,15 $\pm$ 0,48	14,15 $\pm$ 0,48
	CMI (mg/mL)			
<i>E. coli</i>	49,69	52,46	35,65	18,18
<i>K. pneumoniae</i>	49,69	52,46	35,65	18,18
<i>E. faecalis</i>	49,69	52,46	35,65	18,18
<i>C. glabrata</i>	49,69	52,46	35,65	18,18

Toate probele au fost eficiente împotriva tulpinilor bacteriene *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, iar cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul drojdiilor reprezentate de *C. glabrata* (aproximativ 14 mm de zonă de inhibiție pentru fiecare probă testată). Proba GX1/OC1/T0,1 a avut cea mai bună activitate antimicrobiană, având cea mai mică concentrație inhibitoare (18,18 mg/mL), cu cele mai bune rezultate

antimicrobiene. Cu toate acestea, estimarea activității antimicrobiene arată că nu au existat diferențe notabile între probele testate, iar prezența surfactantului nu influențează activitatea antimicrobiană a probelor, indiferent de concentrația acestora. Explicația este că activitatea antimicrobiană a probelor se datorează uleiului de *Daucus carota*, utilizat deja pentru unele afecțiuni ale pielii, cum ar fi arsurile și furunculii (Glišić, 2007). Proprietăți antifungice similare au fost raportate anterior de literatura de specialitate împotriva *C. albicans* (Alves-Silva, 2016; Marzouki, 2010), dar și împotriva *E. coli* (Soković, 2009).

6.5. Obținerea unor suporturi textile tratate cu emulsii ulei-în-apă și evaluarea acestora ca textile cosmetice

6.5.1. Analiza indicilor de confort

Indicii de confort sunt esențiali pentru textilele cosmetice, deoarece joacă un rol esențial în determinarea confortului și a performanței acestor produse. Valorile obținute pentru permeabilitatea la aer, higroscopia și permeabilitatea la vapori de apă sunt prezentate în Tabelul 6.2.

Tabelul 6.2. Indicii de confort pentru textilele tratate cu emulsii (Lotos, 2024b).

Probă	Permeabilitatea la aer	Higroscopicitate	Coefficientul de vaporizare
Proba martor	19,2388±0,06	1,9420±0,009	18,6836±0,04
GX1/OC3/T0,1	16,0944±0,06	9,7627±0,02	17,6928±0,02
GX1/OC2/T0,1	17,0833±0,08	6,9306±0,01	17,8343±0,02
GX1/OC1/T0,1	17,4166±0,08	7,4468±0,01	18,0467±0,04

Conform rezultatelor prezentate în Tabelul 6.2, permeabilitatea la aer a scăzut în comparație cu proba martor. O posibilă explicație este dată de faptul că emulsiile au umplut spațiile dintre fibre, făcând suprafața textilă mai densă (după cum se observă în inserțiile din Figura 6.12). Astfel, suportul textil tratat cu emulsia care conține cea mai mică cantitate de ulei macerat de *Daucus Carota* are cea mai mare valoare a permeabilității (proba tratată cu emulsia GX1/OC1/T0,1), iar proba care conține cea mai mare cantitate de ulei are cea mai mică valoare (probele tratate cu emulsia GX1/OC3/T0,1). Pe de altă parte, scăderea permeabilității la aer nu este atât de mare încât să afecteze respirabilitatea și confortul suporturilor textile.

Rezultatele obținute arată că valorile higroscopiei pentru suporturile textile tratate cu emulsii sunt mai mari decât higroscopia probei martor, ceea ce sugerează că textilele tratate sunt capabile să absoarbă mai multă umiditate din piele. O posibilă explicație poate fi dată de faptul că acizii grași din compoziția uleiului macerat de *Daucus Carota* dar și polizaharida pot acționa ca potențiali agenți higroscopici (Sumathi, 2007). Pe de altă parte,

creșterea higroscopiei duce la o scădere a permeabilității aerului și a apei datorită umflării și închiderii porilor din suporturile textile (Kapoor, 2021).

Materialele textile tratate cu emulsii au o permeabilitate mai mică la vapori de apă decât proba martor. O posibilă explicație este dată de faptul că, prin aplicarea emulsiei, unii pori ai suportului textil pot fi blocați. Cu toate acestea, scăderea permeabilității la vapori de apă a eșantioanelor tratate cu emulsii nu este atât de semnificativă încât să influențeze reglarea temperaturii și transpirația.

6.5.2. Evaluarea hidratării pielii prin aplicarea de textile funcționalizate cu emulsii ulei-în-apă

Textilele tratate cu emulsii au fost studiate în continuare pentru a determina gradul de hidratare a pielii, fiind aplicate pe diferite zone de pe partea interioară a antebrațelor. Gradul de hidratare a pielii a fost citit imediat după îndepărtarea textilelor tratate cu emulsii de pe piele (după 1 h) și după 24 de ore de la aplicarea textilelor funcționale pe piele, rezultatele fiind prezentate pe categorii de vârstă în Figura 6.13.

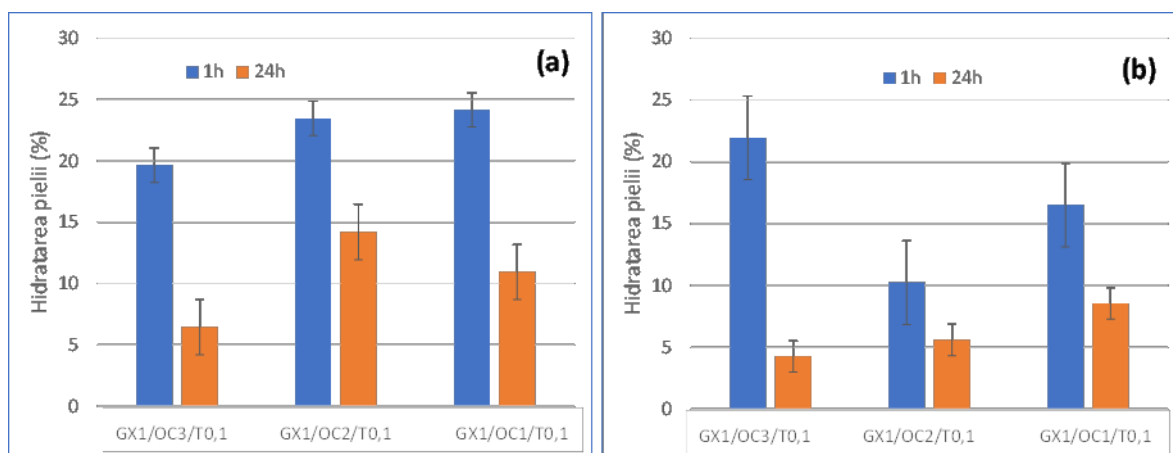


Figura 6.13. Variația gradului de hidratare a pielii pentru grupa de vârstă (a) 31-40 de ani și (b) >65 de ani (Lotos, 2024b).

Conform rezultatelor obținute, valorile de hidratare a pielii în cazul aplicării suporturilor textile tratate cu emulsii sunt mai mari decât cele obținute doar prin aplicarea emulsiilor pe piele (Figura 6.13a și b). O posibilă explicație este dată de faptul că, prin aplicarea suportului textil tratat cu emulsie pe piele, se creează o barieră ocluzivă care ajută la reținerea umidității și previne pierderea de apă de la suprafața pielii (Harwood, 2024) și, astfel, textilele tratate cu emulsii conduc la o hidratare mai mare a pielii. În schimb, chiar dacă emulsiile aplicate direct pe piele sunt absorbite foarte ușor, din cauza lipsei unei bariere care să rețină umiditatea, acestea se evaporă mai repede și, astfel, reduc hidratarea pielii în timp.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat cu titlul „*Biomateriale micro și nanostructurate pe bază de polizaharide: obținere, structură și proprietăți*” a avut ca obiectiv general obținerea de noi biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali sau sintetici și caracterizarea privind structura și proprietățile acestora. Lucrarea se întinde pe 191 pagini și cuprinde șase capitole care includ 128 de figuri, 17 tabele, 11 ecuații, o schemă și 303 referințe bibliografice. Teza de doctorat este structurată în două părți: stadiul actual al cunoașterii, și rezultate originale structurate în cinci capitole.

Pentru atingerea scopului principal al tezei au fost urmate 3 direcții de studiu:

1. *Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de polizaharide, sub formă de complecși interpolimerici și poliplecși*

- obținerea și caracterizarea complecșilor interpolimerici nestoichiometrici pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali
- obținerea și caracterizarea complecșilor interpolimerici pe bază de polizaharide și polimeri sintetici
- obținerea și caracterizarea poliplecșilor pe bază de Chit-g-PNIPAM și ADN

2. *Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de alginat de calciu, sub formă de hidrogeluri compozite*

- obținerea *in situ* și caracterizarea hidrogelurilor compozite alginat de calciu- CaCO_3
- obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente alginat de calciu-CPN- CaCO_3

3. *Biomateriale micro- și nanostructurate pe bază de xantan, sub formă de emulsii ulei-în-apă*

- prepararea unor emulsiilor ulei-în-apă, folosind gumă de xantan și ulei macerat de *Daucus Carota* și studiul proprietăților biologice
- obținerea unor suporturi textile tratate cu emulsii ulei-în-apă și evaluarea acestora ca textile cosmetice

În urma studiilor originale efectuate în cadrul tezei de doctorat se pot concluziona următoarele:

1. *Obținerea și caracterizarea complecșilor interpolimerici nestoichiometrici pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali:*

- prima parte a Capitolului 3 al tezei cuprinde rezultate originale cu privire la prepararea și caracterizarea unor CPN care conțin zeină și două tipuri de polizaharide (CSA și ANa);
- comportamentul zeinei la diferite concentrații alcool-apă și diferite pH-uri a fost evaluat pentru a stabili condițiile optime de formare a complexelor;
- CPN au fost sintetizați prin două *metode de adăugare complementare (titrantul a fost fie zeina, fie polizaharida)* și la două viteze diferite de adăugare (0,3 și 0,8 ml/min), cu un *raport molar* între sarcinile complementare variind între 0,4 la 1,8;
- atunci când zeina a fost titratul, s-au obținut particule cu dimensiuni și cu polidispersitate mari;
- în cazul în care zeina a fost titrantul și la rapoarte molare sub 1,2, s-au obținut *particule cu o dimensiune medie de aproximativ 100 nm, aproape monodisperse*; când polizaharidele au fost macromoleculele titrate, acestea au putut încorpora cu ușurință zeina, formând structuri de tip miez/înveliș;
- a fost observată *modificarea conținutului de α -helix al zeinei* în funcție de conținutul acesteia în CPN, legarea polizaharidelor distrugând cel mai probabil legătura de hidrogen dintre lanțurile polipeptidice ale zeinei, ceea ce duce la scăderea fracției de structură elicoidală;
- dispersiile de CPN cu cele mai bune caracteristici (raport molar între polimeri de 0,8, dimensiuni de 100 nm, potențial zeta de -20 mV) au fost utilizate cu succes pentru înglobarea ciprofloxacinii cu *formarea de complexe tricomponente*;
- *activitatea antibacteriană a CF/CPN* a fost evaluată împotriva *S. aureus* și *E. coli* prin tratarea unui material nețesut din celuloză cu dispersia de complex tricomponent și s-a demonstrat că medicamentul își păstrează activitatea antibacteriană, aceasta fiind mai pronunțată în cazul *E. coli*.

2. Obținerea și caracterizarea complexelor interpolimerici pe bază de polizaharide și polimeri sintetici:

- în a doua parte a Capitolului 3 este prezentată obținerea de nanostructuri macromoleculare hibride natural-sintetice formate prin interacțiunea electrostatică a unor molecule polizaharidice de chitosan și a unor probe de PNIPAM funcționalizate la una din extremități cu câte o grupare carboxilat, ca metodă alternativă de grefare a polizaharidelor cu catene de polimeri sintetici;

- au fost studiate diferite combinații de catene lungi sau scurte a ambelor componente macromoleculare, la diferite rapoarte de amestecare, și s-au obținut complecși stabili;
- proprietățile lor fizico-chimice în ceea ce privește masa, dimensiunea, sarcina, structura și morfologia au fost examinate prin DLS, potențiometrie, spectroscopie de fluorescență, precum și prin imagistică STEM și AFM;
- s-a constatat că particularitățile individuale ale complecșilor formați sunt direct corelate cu lungimea moleculelor de chitosan și a celor de PNIPAM (lungi/scurte) și cu raportul de amestecare al acestora;
- influența lungimii moleculei de chitosan s-a dovedit a fi deosebit de semnificativă, deoarece a condus la obținerea unor complecși cu un aranjament diferit al componentelor și cu o structură diferită, fie relaxată, fie densă;
- complecșii Chit/PNIPAM au un comportament similar dependent de temperatură, datorită naturii termosensibile a lanțurilor de PNIPAM, evidențiind schimbări conformaționale la creșterea temperaturii peste 35 °C, complet reversibile la scăderea la temperatura camerei;
- complecșii Chit/PNIPAM sunt sensibili la variația tăriei ionice a soluției, prezentând o micșorare sau o dezasamblare parțială (în funcție de conformația lor inițială), ca urmare a ecranării sarcinilor;
- utilizarea potențială a acestor nanostructuri ca vectori de livrare a moleculelor bioactive a fost verificată prin încapsularea cu succes a curcuminei, ca urmare a interacțiunilor hidrofobe care au loc între molecula bioactivă și complecși, iar rezultatele obținute evidențiază importanța echilibrului dintre interacțiunile electrostatice și hidrofobe atunci când este vorba de sisteme atât de complexe din punct de vedere structural.

3. Obținerea și caracterizarea copolimerului chitosan-g-poli(*N*-izopropilacrilamidă):

- În prima parte a Capitolului 4, a fost obținut cu succes copolimerul termosensibil Chit-g-PNIPAM prin metoda „grefare la” chitosan prin legarea covalentă a unor catene de PNIPAM, polimer sintetic obținut prin polimerizare RAFT;
- formarea copolimerului Chit-g-PNIPAM a fost demonstrată prin spectroscopie FTIR-ATR și ¹H-RMN, TGA, și titrări conductometrice inverse;

- eficiența grefării a fost cuantificată ca fiind de 19,9% prin ^1H -RMN și de 21,62% prin titrare conductometrică;
- copolimerul Chit-g-PNIPAM a prezentat o autoasamblare termosensibilă, în soluții apoase, după cum reiese din măsurătorile de dispersie a luminii în funcție de temperatură (interval de temperatură 25 - 45 °C);
- copolimerul Chit-g-PNIPAM, cu proprietățile sale termosensibile, poate fi utilizat în dezvoltarea de noi nanocontainere inteligente pentru transportul și livrarea de acizi nucleici.

4. Obținerea și caracterizarea poliplecșilor pe bază de Chit-g-PNIPAM și ADN:

- Partea a doua a Capitolului 4 prezintă un studiu experimental concentrat pe interacțiunea dintre copolimerul Chit-g-PNIPAM și două molecule de ADN, de diferite lungimi, precum și pe proprietățile fizico-chimice ale poliplecșilor formați;
- caracteristicile fizico-chimice generale ale poliplecșilor în ceea ce privește masa, dimensiunea, sarcina, structura și stabilitatea lor s-au dovedit a fi o combinație complexă a raportului dintre cele două componente macromoleculare, lungimea moleculei de ADN și conformația intrinsecă a copolimerului Chit-g-PNIPAM;
- prezența catenelor laterale de PNIPAM conferă poliplecșilor un comportament termosensibil, permițând astfel o funcționalitate suplimentară, cu schimbări conformaționale complet reversibile ale poliplecșilor deja formați, care au loc la un LCST situat la 35 °C;
- s-a examinat, de asemenea, stabilitatea poliplecșilor la creșterea tăriei ionice sau la interacțiunea cu fluide biologice precum SFB și s-a constatat că acestea sunt extrem de rezistente la ambii factori destabilizatori;
- afinitatea de legare dintre copolimer și lanțurile de ADN a fost monitorizată prin stingerea fluorescenței probelor marcate cu bromură de etidiu și s-a demonstrat că aceasta este influențată în mare măsură de lungimea moleculei de ADN, în sensul că lanțurile mai scurte sunt mai ușor de complexat datorită conformației lor și, prin urmare, mai ușor de încorporat în poliplecșii formați;
- spectrele FTIR au arătat că Chit-g-PNIPAM protejează conformația nativă atât a moleculelor scurte, cât și a celor lungi de ADN;

- studiul a pus în evidență complexitatea unor astfel de sisteme și modalitățile de caracterizare a acestora din punct de vedere fizico-chimic, evidențiind în același timp numărul de parametri care trebuie luați în considerare la proiectarea unor potențiale sisteme de transport de gene destinate aplicațiilor biologice.

5. Obținerea și caracterizarea biomaterialelor micro- și nanostructurate pe bază de alginat de calciu, sub formă de hidrogeluri compozite:

- Capitolul al 5-lea demonstrează prepararea cu succes a unor hidrogeluri compozite cu carbonat de calciu, pornind de la ACa, prin metoda difuziei carbonatului de amoniu și cristalizarea *in situ* a CaCO_3 ;
- concentrația de ACa a fost variată de la 2 la 50 g/L, obținându-se cea mai bună structură poroasă atunci când a fost utilizată o concentrație mai mare;
- stabilizarea hidrogelurilor formate a fost realizată cu reticulantul BTCDA, testele MTS arătând că hidrogelurile reticulate au o viabilitate celulară relativă de până la 80% după 48 de ore;
- a doua etapă a studiului în formulările de hidrogel compozit a utilizat, pe lângă materialele utilizate în prima etapă, CPN pe bază de zeină și polizaharidele ANa și CSA (a caror sinteză și caracterizare sunt descrise pe larg în Capitolul 3, prima parte);
- hidrogelurile rezultate au prezentat o bună organizare tridimensională, fără exces de cristale mari de CaCO_3 , demonstrând o bună stabilitate în timpul procesului de reticulare.

6. Obținerea și caracterizarea biomaterialelor micro- și nanostructurate pe bază de xantan, sub formă de emulsii ulei-în-apă:

- În Capitolul 6 s-au obținut zece emulsii U/A care au fost caracterizate printr-o serie de analize specifice (proprietăți organoleptice, analiză dimensională, turbiditate, tensiune superficială a picăturilor și unghi de contact, pH și conductivitate electrică);
- atât OC cât și GX au un rol important în proprietățile emulsiei U/A, cele mai bune condiții de formulare (din punct de vedere al stabilității și al aplicării ulterioare pe cale topică) fiind: GX 1 % wt. în soluția inițială, surfactant (T) 0,1 mL, indiferent de cantitatea de OC utilizată;

- testele *in vivo* au arătat că emulsiile U/A cu ulei macerat de *Daucus Carota* pot îmbunătăți în mod eficient nivelul general de hidratare a pielii, lăsând-o moale și netedă;
- emulsiile biocompatibile au fost aplicate pe țesături celulozice tricotate, iar textilele de îngrijire a pielii obținute prezintă proprietăți bune de confort și un grad mai bun de hidratare a pielii în comparație cu emulsiile aplicate direct pe piele;
- aplicarea emulsiilor pe suportul textil, pentru a crea textile cu proprietăți hidratante, reprezintă o abordare originală și neconvențională; aplicarea unor astfel de tehnologii poate avea un impact pozitiv asupra sustenabilității, reducând nevoia de materiale sintetice sau de tratamente chimice.

Din studiile întreprinse au fost identificate unele **perspective** de cercetare care ar putea fi dezvoltate în viitor, cum ar fi:

- utilizarea complexilor polielectrolitici pe bază de polizaharide și alți polimeri naturali sau sintetici pentru încapsularea și eliberarea de medicamente cu efect antibacterian, precum doxiciclina sau minociclina;
- optimizarea procesului de grefare a PNIPAM pe chitosan pentru a obține o eficiență controlată a grefării și, prin urmare, proprietăți îmbunătățite;
- încorporarea de medicamente sau antibiotice în matricea hidrogelurilor compozite ACa-CPN-CaCO₃ și testarea proprietăților acestora;
- utilizarea altor ingrediente active pentru a produce textile funcționale cu proprietăți îmbunătățite de îngrijire a pielii;
- testarea materialelor obținute cu scopul de a fi utilizate ulterior în aplicații de mediu, ca sorbenți pentru diferiți poluanți.

Diseminarea rezultatelor originale prezentate în această teză de doctorat s-a realizat prin publicarea a 6 articole științifice în reviste cotate ISI (*cu factor de impact cumulat egal cu 27,2*), dintre care 3 ca prim-autor. De asemenea, rezultatele prezentate sunt susținute de 7 comunicări orale și 3 comunicări de tip poster la conferințe naționale și internaționale, completate cu 1 articol științific, 3 comunicări orale și 1 poster ale căror rezultate nu sunt prezentate în teză. Rezultatele obținute au fost posibile datorită sprijinului financiar a trei proiecte naționale de cercetare și prin efectuarea a două stagii de cercetare și participarea la o școală de vară.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Alves, N.M., Mano, J.F., 2008. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, pp.401–414.

Alves-Silva, J.M., Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Cardoso, S.M., Salgueiro, L., 2016. New claims for wild carrot (*Daucus carota* subsp. *carota*) essential oil. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2016(1), p.9045196.

Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L.J.M., Roeck-Holtzhauer, Y.D., 1999. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J. Appl Toxicol.* 19(3), pp.163-165.

Bao, H., Li, L., Leong, W.C., Gan, L.H., 2010. Thermo-responsive association of chitosan-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide) in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B* 114, pp.10666–10673.

Campoli-Richards, D.M., Monk, J.P., Price, A., Benfield, P., Todd, P.A., Ward, A., 1988. Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 35(4), pp.373-447.

Chalanqui, M., Pentlavalli, S., McCrudden, C., Chambers, P., Ziminska, M., Dunne, N., McCarthy, H., 2019. Influence of alginate backbone on efficacy of thermo-responsive alginate-g-P(NIPAAm) hydrogel as a vehicle for sustained and controlled gene delivery. *Mater. Sci. Eng. C* 95, pp.409–421.

Cheaburu-Ylmaz, C.N., 2020. On the Development of chitosan-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide) by raft polymerization technique. *Cellul. Chem. Technol.* 54, pp.1–10.

Fathi, M., Alami-Milani, M., Geranmayeh, M.H., Barar, J., Erfan-Niya, H., Omid, Y., 2019. Dual thermo- and pH-sensitive injectable hydrogels of chitosan/(poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-itaconic acid)) for doxorubicin delivery in breast cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* 128, pp.957–964.

Glišić, S.B., Mišić, D.R., Stamenić, M.D., Zizovic, I.T., Ašanin, R.M., Skala, D.U., 2007. Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Food chem.* 105(1), pp.346-352.

Harwood, A., Nassereddin, A., Krishnamurthy, K., 2024. Moisturizers. În: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Kapoor, A., Baronia, A.K., Azim, A., Agarwal, G., Prasad, N., Mishra, R., Saraswat, V.A., 2021. Breathability and safety testing of personal protective equipment: “Human-comfort” factor remains undefined. *Indian J. Crit. Care Med.* 25(1), p.12.

Karayianni, M., **Lotos, E.D.**, Mihai, M., Pispas, S., 2024. Coassembly of a Hybrid Synthetic–Biological Chitosan-g-Poly(*N*-isopropylacrylamide) Copolymer with DNAs of Different Lengths. *Polymers* 16(21), p.3101.

Kumar, S., Koh, J., 2012. Physiochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *Int. J. Mol. Sci.* 13, pp.6102–6116.

Li, G., Zhuang, Y., Mu, Q., Wang, M., Fang, Y., 2008. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly(L-lactic acid) side chains. *Carbohydr. Polym.* 72, pp.60–66.

Lotos, E.D., Danila, A., Vasiliu, A.L., Rosca, I., Stroian, D.V., Simionescu, B.C., Mihai, M., 2024b. The potential emulsions of xanthan gum and *Daucus carota* macerated oil in functional textiles for skincare applications: Formulation, characterization, and performance evaluation. *Colloids Surf., A* 682, p.132960.

Lotos, E.D., Karayianni, M., Vasiliu, A.L., Mihai, M., Pispas, S., 2025. Natural–Synthetic Hybrid Nanostructures Formed Through the Interaction of Chitosan with Carboxylate-Ended PNIPAM: Structure and Curcumin Encapsulation. *Nanomaterials* 15(5), p.350.

Lotos, E.D., Mihai, M., Vasiliu, A.L., Rosca, I., Mija, A., Simionescu, B.C., Pispas, S., 2024a. Zein/polysaccharide nanoscale electrostatic complexes: preparation, drug encapsulation and antibacterial properties. *Nanomaterials* 14(2), p.197.

Marzouki, H., Khaldi, A., Falconieri, D., Piras, A., Marongiu, B., Mollicotti, P., Zanetti, S., 2010. Essential oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction. *Nat. Prod. Commun.* 5(12), p.1934578X1000501226.

Mihai, M., **Lotos, E.D.**, Zaharia, M.M., Bucatariu, F., Vasiliu, A.L., 2024. Alginate-based Composite Hydrogels Formed by *In Situ* CaCO₃ Crystallization. *Cryst. Growth Des.* 24(6), pp.2514-2525.

Queiroz, M., Melo, K.R.T., Sabry, D.A., Sassaki, G.L., Rocha, H.A.O., 2014. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Mar. Drugs* 13, pp.141-158.

Soković, M., Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Ristić, M., Grubišić, D., 2009. Susceptibility of pathogenic bacteria and fungi to essential oils of wild *Daucus carota*. *Pharm Biol.* 47(1), pp.38-43.

Sosnik, A., Imperiale, J.C., Vázquez-González, B., Raskin, M.M., Muñoz-Muñoz, F., Burillo, G., Cedillo, G., Bucio, E., 2015. Mucoadhesive thermo-responsive chitosan-g-poly(*N*-isopropylacrylamide) polymeric micelles *via* a one-pot gamma-radiation-assisted pathway. *Colloids Surf., B* 136, pp.900–907.

Sumathi, A., Ushakumari, S.R., Malleshi, N.G., 2007. Physico-chemical characteristics, nutritional quality and shelf-life of pearl millet based extrusion cooked supplementary foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 58(5), pp.350-362.

Vasiliu, A.-L., Zaharia, M.-M., Bazarghideanu, M.-M., Rosca, I., Peptanariu, D., Mihai, M., 2022. Hydrophobic composites designed by a nonwoven cellulose-based material and polymer/CaCO₃ patterns with biomedical application. *Biomacromolecules* 23(1), pp.89–99.

Wang, W., Yu, W., 2015. Preparation and characterization of CS-g-PNIPAAm microgels and application in water vapor-permeable fabric. *Carbohydr. Polym.* 127, pp.11–18.

Zaharia, M.-M., Bucatariu, F., Karayianni, M., **Lotos, E.-D.**, Mihai, M., Pispas, S., 2024. Synthesis of Thermoresponsive Chitosan-Graft-Poly(*N*-Isopropylacrylamide) Hybrid Copolymer and Its Complexation with DNA. *Polymers* 16, p.1315.

DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE DOCTORALĂ

1. Lucrări științifice publicate în reviste științifice cotate ISI

Rezultate incluse în teză:

1. **E.-D. Lotos**, M. Mihai, A.-L. Vasiliu, I. Rosca, A. Mija, B. C. Simionescu, S. Pispas; Zein/polysaccharides nanoscale electrostatic complexes: preparation, drug encapsulation and antibacterial properties; *Nanomaterials* 14(2), 197, **2024** (FI₂₀₂₄ = 4,3). DOI: 10.3390/nano14020197
2. **E.-D. Lotos**, A. Danila, A.-L. Vasiliu, I. Rosca, D.-V. Stroian, B. C. Simionescu, M. Mihai; The potential emulsions of xanthan gum and *Daucus carota* macerated oil in functional textiles for skincare applications: Formulation, characterization, and performance evaluation; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 682, 132960, **2024** (FI₂₀₂₄ = 5,4). DOI: 10.1016/j.colsurfa.2023.132960
3. M. Mihai, **E.-D. Lotos**, M.-M. Zaharia, F. Bucatariu, A.-L. Vasiliu; Alginate-based composite hydrogels formed by *in-situ* CaCO₃ crystallization; *Crystal Growth & Design* 24(6), 2514-2525, **2024** (FI₂₀₂₄ = 3,4). DOI: 10.1021/acs.cgd.3c01518
4. M.-M. Zaharia, F. Bucatariu, M. Karayianni, **E.-D. Lotos**, M. Mihai, S. Pispas; Synthesis of thermoresponsive chitosan-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide) hybrid copolymer and its complexation with DNA; *Polymers* 16(10), 1315, **2024** (FI₂₀₂₄ = 4,9). DOI: 10.3390/polym16101315
5. M. Karayianni, **E.-D. Lotos**, M. Mihai, S. Pispas; Coassembly of a hybrid synthetic-biological chitosan-g-poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymer with DNAs of different lengths; *Polymers* 16(21), 3101, **2024** (FI₂₀₂₄ = 4,9). DOI: 10.3390/polym16213101
6. **E.-D. Lotos**, M. Karayianni, A.-L. Vasiliu, M. Mihai, S. Pispas; Natural-synthetic hybrid nanostructures formed through the interaction of chitosan with carboxylate-ended PNIPAM: Structure and curcumin encapsulation; *Nanomaterials* 15(5), 350, **2025** (FI₂₀₂₄ = 4,3). DOI: 10.3390/nano15050350

Rezultate care nu sunt incluse în teză:

7. **E.-D. Lotos**, R. Dinu, M. Mihai, B. C. Simionescu, A. Mija; Development of Eco-Friendly Thermosetting Resins From Zein and Diglycidyl Ether of Vanillyl Alcohol. A Step Toward Sustainable Materials; *Chemistry - A European Journal* 31(27), e202500624, **2025** (FI₂₀₂₄ = 3,7). DOI: 10.1002/chem.202500624

2. Lucrări științifice publicate *in extenso* în volumele unor manifestări științifice:

1. M. Karayianni, **E.-D. Lotos**, A.-L. Vasiliu, M. Mihai, S. Pispas; Hybrid nanostructures of chitosan and poly(*N*-isopropylacrylamide) with carboxylate end group; Proceedings of International Conference Progress in Organic

- Macromolecular Compounds, ISSN 2810–2347 ISSN–L 2810–2126, 47-50, **2023**.
2. **E.-D. Lotos**, A.-L. Vasiliu, M. Mihai, B.C. Simionescu; Nonstoichiometric polyelectrolyte complex nanoparticles based on zein and polysaccharides; Proceedings of International Conference Progress in Organic Macromolecular Compounds, ISSN 2810–2347 ISSN–L 2810–2126, 92-95, **2023**.
 3. A.-L. Vasiliu, **E.-D. Lotos**, M.-M. Zaharia, M. Mihai; Composite hydrogels based on alginates and calcium carbonate; Proceedings of International Conference Progress in Organic Macromolecular Compounds, ISSN 2810–2347 ISSN–L 2810–2126, 77-80, **2023**.
 4. **E.-D. Lotos**, M. Karayianni, M. Mihai, S. Pispas; New polysaccharide grafting method pairing Chitosan with PNIPAM bearing carboxyl end group; Proceedings of International Conference Progress in Organic Macromolecular Compounds, ISSN 2810–2126 ISSN–L 2810–2126, 148-150, **2025**.
 5. M. Karayianni, **E.-D. Lotos**, M. Mihai, S. Pispas; Chitosan-g-Poly(*N*-isopropylacrylamide) polyplexes with DNA molecules of different lengths; Proceedings of International Conference Progress in Organic Macromolecular Compounds, ISSN 2810–2126 ISSN–L 2810–2126, 136-138, **2025**.

3. Comunicări orale la manifestări științifice naționale și internaționale

Rezultate incluse în teză:

1. **E.-D. Lotos**, A.-L. Vasiliu, B. C. Simionescu, M. Mihai; Composite particles based on zein and polysaccharides; *20th National Symposium Polymers 2022 open to International Participation (POLYMERS 2022)*, 5–8 Iulie **2022**, Velingrad, Bulgaria.
2. **E.-D. Lotos**, A.-L. Vasiliu, M. Mihai, B. C. Simionescu; Composite nanoparticles based on zein and polysaccharides; *NeXT-Chem V: Exploratory Workshop "Innovative cross-sectoral technologies"*, 22–23 Mai **2023**, București, România.
3. **E.-D. Lotos**, M. Mihai, A.-L. Vasiliu, B. C. Simionescu; Zein/polysaccharide nanoparticles as drug delivery systems; *29th PolyChar World forum on Advanced Materials*, 25–29 Septembrie **2023**, Nisa, Franța.
4. **E.-D. Lotos**, M. Karayianni, A.-L. Vasiliu, L.-M. Petrila, M. Mihai, S. Pispas, B. C. Simionescu; Interaction between water-soluble chitosan and thermo-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide); *ICMPP - Open door to the future scientific communications of young researchers 4th edition (MacroYouth 2023)*, 17 Noiembrie **2023**, Iași, România.
5. **E.-D. Lotos**, M. Karayianni, A.-L. Vasiliu, B. C. Simionescu, S. Pispas, M. Mihai; Thermo-responsive hybrid nanostructures of chitosan and poly(*N*-isopropylacrylamide); *6th Edition, Innovation trans-sectoral technology (NeXT-Chem 2024)*, 21–22 Martie **2024**, București, România.

6. **E.-D. Lotos**, A. Danila, M. Mihai, B. C. Simionescu; Xanthan gum-based emulsions in functional textiles for skincare applications; *7th International Conference of the Doctoral School*, 15–17 Mai **2024**, Iași, România.
7. M. Karayianni, **E.-D. Lotos**, M. Mihai, S. Pispas; Effect of DNA length on the formation of novel chitosan-graft-poly(*N*-isopropylacrylamide) based polyplexes; *EPF European Polymer Congress (EPF 2025)*, 22-27 Iunie 2025, Groningen, Olanda.

Rezultate care nu sunt incluse în teză:

8. F. Bucatariu, M.-M. Zaharia, **E.-D. Lotos**, M.-M. Bazarghideanu, M. Mihai, S. Pispas; Interpolyelectrolyte complexes based on Chit-g-PNIPAM and HSA with pH/temperature responsiveness; *30th edition of PolyChar World Forum on Advanced Materials (PolyChar '30)*, 11–13 Septembrie 2024, Iași, România.
9. M.-M. Zaharia, **E.-D. Lotos**, F. Bucatariu, M.-M. Bazarghideanu, S. Pispas, M. Mihai; *In-situ* synthesis of gold nanoparticles mediated by chitosan-g-poly(*N*-isopropylacrylamide); *National Conference of Chemistry XXXVII Edition (CNCHIM 2024)*, 25–27 Septembrie 2024, Târgoviște, România.
10. M.-M. Zaharia, **E.-D. Lotos**, F. Bucatariu, M.-M. Bazarghideanu, D. Rusu, S. Pispas, M. Mihai; Hybrid nanostructures designed by *in-situ* gold nanoparticles synthesis using Chitosan-g-Poly(*N*-isopropylacrylamide); *7th International Conference on Emerging Technologies in Materials Engineering (EmergeMAT)*, 30–31 Octombrie 2024, București, România.

4. Comunicări poster la manifestări științifice naționale și internaționale

Rezultate incluse în teză:

1. **E.-D. Lotos**, M. Karayianni, A.-L. Vasiliu, B. C. Simionescu, S. Pispas, M. Mihai; Hybrid polysaccharides-based nanostructures with thermo-responsive behaviour; *NATO ASI Summer School*, 28 Iunie–5 Iulie **2024**, Smolenice, Republica Slovacă.
2. **E.-D. Lotos**, M. Karayianni, M. Mihai, S. Pispas; Co-assembly of Chitosan-g-Poly(*N*-isopropylacrylamide) copolymer with DNAs; *5th Edition OPEN DOOR TO THE FUTURE Scientific Communications of Young Researchers with international participation (MacroYouth 2024)*, 15 Noiembrie 2024, Iași, România.
3. C.-G. Marandiș, M.-M. Zaharia, L.-M. Petrila, **E.-D. Lotos**, F. Bucatariu, I. Mangalagiu, M. Mihai, S. Pispas; Chit-g-PNIPAM: A versatile pH/temperature multi-responsive copolymer in aqueous environment; *30th edition of PolyChar World Forum on Advanced Materials (PolyChar '30)*, 11–13 Septembrie 2024, Iași, România.
4. **E.-D. Lotos**, M. Karayianni, M. Mihai, S. Pispas; Natural–synthetic hybrid nanostructures by interaction of chitosan with carboxylate ended PNIPAM; *30th edition of the International Conference Progress in Organic and Macromolecular Compounds Conference (MACROIasi 2025)*, 23-26 Septembrie 2025, Iași, România.

5. M. Karayianni, **E.-D. Lotos**, M. Mihai, S. Pispas; Chitosan-g-Poly(*N*-isopropylacrylamide) based polyplexes: Effect of DNA length; *30th edition of the International Conference Progress in Organic and Macromolecular Compounds Conference (MACROIASI 2025)*, 23-26 Septembrie 2025, Iași, România.

Rezultate care nu sunt incluse în teză:

6. C.-G. Marandiș, M.-M. Zaharia, **E.-D. Lotos**, S. Pispas, I. Mangalagiu, M. Mihai; Composite materials based on thermoresponsive Chitosan-*graft*-Poly(*N*-isopropylacrylamide) hybrid copolymer; *NATO ASI Summer School*, 28 Iunie–5 Iulie **2024**, Smolenice, Republica Slovacă.

5. Membru în echipe de implementare pentru proiecte de cercetare naționale:

1. Membru doctorand (perioada 01.07.2023 – prezent) în cadrul proiectului *Polysaccharide based (bio)hybrid nanostructures*, cod proiect PNRR-III-C9-2022-I8, acronim HYBSAC.
2. Membru doctorand (perioada 01.03.2022 – 31.12.2023) în cadrul proiectului *Microparticule poroase zwitterionice care conțin zeină și unități betainice, cu activitate antimicrobiană și capacitate de administrare de medicamente*, cod proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-1541, acronim ZwitterZein.
3. Membru doctorand (perioada 16.07.2025 – prezent) în cadrul proiectului *Nanostructuri hibride multifuncționale formate din macromolecule naturale și metale*, cod proiect PN-IV-P1-PCE-2023-0738, acronim MacroMet.

6. Stagii de cercetare și formare profesională:

1. Stagiul scurt de cercetare „*Materiale polimerice poroase pentru aplicații medicale și de mediu*”, 9 mai – 8 iunie 2022, Sofia, Bulgaria, participare finanțată din proiectul *Microparticule poroase zwitterionice care conțin zeină și unități betainice, cu activitate antimicrobiană și capacitate de administrare de medicamente (ZwitterZein)*, cod proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-1541.
2. Proiect IdEx „*Dezvoltarea de biorășini pe bază de zeină*”, 1 noiembrie 2023 – 31 ianuarie 2024, Nisa, Franța, participare finanțată de Universitatea Côte d’Azur, cod proiect ANR-15-IDEX-01.
3. Școala de vară NATO ASI Summer School Nanomaterials and Nanoarchitectures II. Composite Materials & Their Applications, 28 iunie – 5 iulie 2024, Smolenice, Slovacia, participare finanțată din proiectul *Polysaccharide based (bio)hybrid nanostructures (HYBSAC)*, cod proiect PNRR-III-C9-2022 – I8.