



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”

***MATRICE POLIMERICE COMPLEXE CU
INCLUZIUNI ANTIBACTERIENE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
CS I DR. HABIL. LOREDANA ELENA NIȚĂ

DOCTORAND:
BIANCA-ELENA-BEATRICE CREȚU

2026

CUPRINS TEZĂ/REZUMAT

| | |
|--|-------------|
| INTRODUCERE | 1/1 |
| PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ..... | 6 |
| CAPITOLUL I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ÎN DOMENIUL HIDROGELURILOR ANTIBACTERIENE..... | 6 |
| I.1. Definirea și clasificarea hidrogelurilor..... | 6 |
| I.2. Hidrogeluri antibacteriene..... | 10 |
| I.2.1. Hidrogeluri antibacteriene pe bază de PVA..... | 11 |
| I.2.2. Hidrogeluri antibacteriene pe bază de poliesteri biodegradabili..... | 12 |
| I.2.3. Hidrogeluri antibacteriene pe bază de dextran..... | 15 |
| I.2.4. Hidrogeluri antibacteriene pe bază de gumă xantan | 16 |
| I.3. Metode de obținere a hidrogelurilor antibacteriene | 17 |
| I.3.1. Hidrogeluri încărcate cu agenți antibacterieni | 18 |
| I.3.1.1. Hidrogeluri încărcate cu antibiotice | 18 |
| I.3.1.2. Hidrogeluri încărcate cu compuși bioactivi extrași din uleiuri esențiale | 21 |
| I.3.1.3. Hidrogeluri încărcate cu nanoparticule anorganice..... | 26 |
| I.4. Proprietățile hidrogelurilor antibacteriene utilizate în ingineria tisulară și medicina regenerativă | 31 |
| I.4.1. Proprietăți fizico–chimice | 31 |
| I.4.1.1. Umectabilitatea suprafeței..... | 31 |
| I.4.1.2. Comportamentul la umflare | 32 |
| I.4.1.3. Comportamentul la degradare | 32 |
| I.4.1.4. Proprietăți reologice și mecanice | 33 |
| I.4.2. Proprietăți biologice | 34 |
| I.4.2.1. Adeziunea celulară | 34 |
| I.4.2.2. Citocompatibilitatea | 35 |
| I.4.2.3. Stimularea angiogenezei | 35 |
| I.5. Metode de caracterizare a hidrogelurilor | 35 |
| I.6. Concluzii | 37 |
| PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE | 39/6 |
| CAPITOLUL II. MATERIALE UTILIZATE ȘI METODE DE ANALIZĂ..... | 39 |
| II.1. Materiale utilizate | 39 |
| II.1.1. Materiale utilizate în formularea sistemelor | 39 |

| | |
|--|-------------|
| II.1.2. Materiale utilizate pentru caracterizarea sistemelor | 40 |
| II.2. Metode de analiză | 41 |
| II.2.1. Analiza structurală | 41 |
| II.2.1.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) | 41 |
| II.2.1.2. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (¹ H RMN)..... | 42 |
| II.2.1.3. Difrakția de raze X (XRD)..... | 42 |
| II.2.2. Cromatografia pe gel permeabil (GPC)..... | 42 |
| II.2.3. Analiza termogravimetrică..... | 43 |
| II.2.4. Difuzia dinamică a luminii laser (DLS)..... | 43 |
| II.2.5. Analiza morfologică | 43 |
| II.2.5.1. Microscopia electronică cu transmisie prin scanare (STEM)..... | 43 |
| II.2.5.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)..... | 44 |
| II.2.5.3. Microscopia de forță atomică (AFM) | 44 |
| II.2.6. Determinarea unghiului de contact | 44 |
| II.2.7. Determinarea gradului de retenție al fluidelor biologice simulate..... | 44 |
| II.2.8. Studii de degradare enzimatică <i>in vitro</i> | 45 |
| II.2.9. Studii de eliberare <i>in vitro</i> | 45 |
| II.2.9.1. Profilul de eliberare al norfloxacinei | 45 |
| II.2.9.2. Profilul de eliberare al timolului..... | 45 |
| II.2.9.3. Profilul de eliberare al timol_α-tocoferolului | 46 |
| II.2.9.4. Profilul de eliberare al amoxicilinei..... | 46 |
| II.2.10. Evaluarea activității antibacteriene | 47 |
| II.2.11. Evaluarea activității antioxidante..... | 48 |
| II.2.12. Studii de citotoxicitate <i>in vitro</i> | 49 |
| II.2.12.1. Testul MTT | 50 |
| II.2.12.2. Testul de viabilitate celulară cu Calceină-AM..... | 50 |
| II.2.13. Testul <i>in vitro</i> de migrare celulară | 51 |
| II.2.14. Evaluarea biocompatibilității <i>in vivo</i> prin implantare subcutanată la șobolani | 52 |
| II.2.15. Evaluarea <i>in vivo</i> a capacității de vindecare a rănilor..... | 53 |
| II.2.16. Determinarea IL-8 prin testul imunosorbant legat de enzimă (ELISA)..... | 54 |
| CAPITOLUL III. HIDROGELURI PE BAZĂ DE POLI(ALCOOL VINILIC) ÎNCĂRCATE CU NANOPARTICULE PURTĂTOARE DE MEDICAMENT..... | 55/6 |
| III.1. Contextul cercetării | 55/6 |
| III.2. Obiective științifice specifice: | 55/6 |
| III.3. Sinteza și caracterizarea homopolimerului poli(brasilat de etilenă)..... | 56/7 |

| | |
|--|--------------|
| III.3.1. Procedeeul de sinteză | 56/7 |
| III.3.1.1. Influența tipului de catalizator organic asupra conversiei monomerului în homopolimer..... | 59 |
| III.3.1.2. Influența solventului asupra distribuției masei moleculare | 60 |
| III.3.1.3. Influența raportului monomer:catalizator asupra conversiei monomerului în homopolimer și a distribuției masei moleculare..... | 60 |
| III.3.2. Metode de caracterizare a homopolimerului PEB..... | 61 |
| III.3.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) | 61 |
| III.3.2.2. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (¹ H RMN) | 62 |
| III.3.2.3. Difracția de raze X (XRD)..... | 62 |
| III.3.2.4. Analiza termogravimetrică | 63 |
| III.3.3. Concluzii..... | 64 |
| III.4. Sisteme de nanoparticule homopolimer-medicament pe bază de PEB | 65/9 |
| III.4.1. Obținerea nanoparticulelor pe bază de PEB încărcate cu NRF | 65/10 |
| III.4.2. Metode de caracterizare a nanoparticulelor pe bază de PEB încărcate cu NRF..... | 66 |
| III.4.2.1. Analiza prin difuzia dinamică a luminii laser (DLS) | 66 |
| III.4.2.2. Determinarea eficienței de încapsulare (EE)..... | 68 |
| III.4.2.3. Microscopie electronică cu transmisie prin scanare (STEM)..... | 69 |
| III.4.3. Concluzii..... | 70 |
| III.5. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri pe bază de PVA încărcate cu nanoparticule purtătoare de medicament..... | 71/11 |
| III.5.1. Prepararea de hidrogeluri pe bază de PVA_PS50-NRF | 71/11 |
| III.5.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor pe bază de PVA_PS50-NRF..... | 73 |
| III.5.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) | 73 |
| III.5.2.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) | 74 |
| III.5.2.3. Determinarea gradului de retenție al fluidelor biologice simulate | 76 |
| III.5.2.4. Studii de eliberare <i>in vitro</i> | 77 |
| III.5.3. Concluzii..... | 78 |
| CAPITOLUL IV. HIDROGELURI MULTICOMPONENTE PE BAZĂ DE POLIMERI SINTETICI CU INCLUZIUNI ANTIBACTERIENE/ANTIOXIDANTE | 80/14 |
| IV.1. Contextul cercetării | 80/14 |
| IV.2. Obiective științifice specifice: | 80/14 |
| IV.3. Sinteza copolimerului poli(brasilat de etilenă-co-acid squaric)..... | 81/15 |
| IV.4. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente pe bază de polimeri sintetici | 82 |
| IV.4.1. Prepararea de hidrogeluri pe bază de PVA_PEBSA | 82 |

| | |
|--|--------|
| IV.4.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor pe bază de PVA_PEBSA | 84 |
| IV.4.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)..... | 85 |
| IV.4.2.2. Analiza termogravimetrică..... | 87 |
| IV.4.2.3. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)..... | 89 |
| IV.4.2.4. Microscopia de forță atomică (AFM)..... | 90 |
| IV.4.2.5. Determinarea gradului de retenție al fluidelor biologice simulate | 92 |
| IV.4.3. Concluzii | 94 |
| IV.5. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente pe bază de polimeri sintetici cu incluziuni antibacteriene | 95/16 |
| IV.5.1. Prepararea de hidrogeluri antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy | 95/16 |
| IV.5.1.1. Încorporarea de Thy <i>in situ</i> | 96 |
| IV.5.1.2. Încorporarea de Thy prin absorbție în hidrogelurile preformate | 96 |
| IV.5.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy | 97 |
| IV.5.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)..... | 97 |
| IV.5.2.2. Analiza termogravimetrică..... | 98 |
| IV.5.2.3. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)..... | 101 |
| IV.5.2.4. Studii de eliberare <i>in vitro</i> | 102 |
| IV.5.2.5. Evaluarea activității antibacteriene | 104 |
| IV.5.3. Concluzii | 107 |
| IV.6. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente pe bază de polimeri sintetici cu incluziuni antibacteriene/antioxidante | 108/17 |
| IV.6.1. Prepararea de hidrogeluri antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy_α-Tcp .. | 108/17 |
| IV.6.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy_α-Tcp..... | 109 |
| IV.6.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)..... | 109 |
| IV.6.2.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)..... | 111 |
| IV.6.2.3. Microscopia de forță atomică (AFM)..... | 112 |
| IV.6.2.4. Determinarea unghiului de contact..... | 114 |
| IV.6.2.5. Determinarea gradului de retenție al fluidului biologic simulat..... | 116 |
| IV.6.2.6. Studii de eliberare <i>in vitro</i> | 117 |
| IV.6.2.7. Evaluarea activității antibacteriene | 119 |
| IV.6.2.8. Evaluarea activității antioxidante | 121 |
| IV.6.2.9. Studii de citotoxicitate <i>in vitro</i> | 122 |
| IV.6.2.10. Evaluarea biocompatibilității <i>in vivo</i> prin implantare subcutanată la șobolani..... | 125 |

| | |
|---|---------------|
| IV.6.2.11. Evaluarea <i>in vivo</i> a capacității de vindecare a rănilor | 127 |
| IV.6.2.12. Determinarea IL–8 prin testul imunosorbant legat de enzimă (ELISA) | 128 |
| IV.6.3. Concluzii | 129 |
| CAPITOLUL V. HIDROGELURI HIBRIDE ANTIBACTERIENE | 131/23 |
| V.1. Contextul cercetării..... | 131/23 |
| V.2. Obiective științifice specifice: | 132/24 |
| V.3. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente hibride..... | 132 |
| V.3.1. Prepararea de hidrogeluri hibride pe bază de PVA_PEBSA_Dextran | 133 |
| V.3.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor hibride pe bază de PVA_PEBSA_Dextran . | 133 |
| V.3.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) | 133 |
| V.3.2.2. Analiza termogravimetrică | 135 |
| V.3.2.3. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) | 136 |
| V.3.2.4. Determinarea gradului de retenție al fluidelor biologice simulate | 137 |
| V.3.2.5. Studii de degradare enzimatică <i>in vitro</i> | 138 |
| V.3.3. Concluzii..... | 140 |
| V.3.4. Prepararea de hidrogeluri hibride pe bază de PVA_PEBSA_Gumă xantan..... | 140 |
| V.3.5. Metode de caracterizare a hidrogelurilor hibride pe bază de PVA_PEBSA_Gumă xantan | 141 |
| V.3.5.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) | 141 |
| V.3.5.2. Analiza termogravimetrică | 142 |
| V.3.5.3. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) | 143 |
| V.3.5.4. Determinarea gradului de retenție al fluidelor biologice simulate | 144 |
| V.3.5.5. Studii de degradare enzimatică <i>in vitro</i> | 145 |
| V.3.6. Concluzii..... | 147 |
| V.4. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente hibride cu incluziuni antibacteriene..... | 147/24 |
| V.4.1. Prepararea de hidrogeluri hibride antibacterine pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx | 147/25 |
| V.4.2. Metode de caracterizare a hidrogelurilor hibride antibacterine pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx..... | 148 |
| V.4.2.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) | 148 |
| V.4.2.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) | 150 |
| V.4.2.3. Studii de eliberare <i>in vitro</i> | 151 |
| V.4.2.4. Evaluarea activității antibacteriene..... | 153 |
| V.4.2.5. Studii de citotoxicitate <i>in vitro</i> | 155 |

| | |
|---|---------------|
| V.4.2.6. Testul <i>in vitro</i> de migrare celulară..... | 157 |
| V.4.3. Concluzii..... | 158 |
| V.4.4. Prepararea de hidrogeluri hibride antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Gumă xantan_Amx | 159/28 |
| V.4.5. Metode de caracterizare a hidrogelurilor hibride antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Gumă xantan_Amx | 161 |
| V.4.5.1. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) | 161 |
| V.4.5.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) | 162 |
| V.4.5.3. Studii de eliberare <i>in vitro</i> | 163 |
| V.4.5.4. Evaluarea activității antibacteriene..... | 165 |
| V.4.5.5. Studii de citotoxicitate <i>in vitro</i> | 167 |
| V.4.5.6. Testul <i>in vitro</i> de migrare celulară..... | 169 |
| V.4.6. Concluzii..... | 170 |
| CAPITOLUL VI. CONCLUZII..... | 172/31 |
| PERSPECTIVE | 179/37 |
| BIBLIOGRAFIE | 180/38 |
| ANEXA 1. DISEMINAREA REZULTATELOR ȘI ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ | 200/40 |
| ANEXA 2. ARTICOLE ȘTIINȚIFICE | 205 |

LISTĂ CU ABREVIERI

ADN – Acid dezoxiribonucleic

AFM – Microscopia de forță atomică

Amx – Amoxicilină

ARN – Acid ribonucleic

ATP – Adenozin trifosfat

α -Tc ρ – α -Tocoferol

B. cereus – *Bacillus cereus*

C. albicans – *Candida albicans*

CMB – Concentrația minimă bactericidă

CMC – Carboximetil chitosan

CMI – Concentrația minimă inhibitorie

DLS – Difuzia dinamică a luminii laser

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTG – Termogravimetria derivată

EB – Brasilat de etilenă

EE – Eficiența de încapsulare

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – Testul imunisorbant legat de enzimă

FTIR – Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier

GPC – Cromatografia pe gel permeabil

H. influenzae – *Haemophilus influenzae*

IL-8 – Interleukina-8

K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*

MRSA – *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensibil la meticilină

MTT – Bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu

NRF – Norfloxacină

PAA – Poli(acid acrilic)

PAM – Poli(acrilamidă)

PEG – Poli(etilenglicol)

PHA – Polihidroxiacanoați

PHB – Poli(3-hidroxi-butirat)

PHEMA – Poli(2-hidroxi-etil metacrilat)

PEB – Poli(brasilat de etilenă)

PEBSA – Poli(brasilat de etilenă-co-acid squaric)

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

PTSA – Acid *p*-toluensulfonic

PVA – Poli(alcool vinilic)

PVP – Poli(N-vinil-2-pirolidonă)

RMN – Rezonanță magnetică nucleară

ROS – Specii reactive de oxigen

SA – Acid squaric

SEM – Microscopia electronică de baleiaj

S_{ent} – Entropia de suprafață

S_q – Rădăcina pătrată medie a abaterilor profilului de rugozitate

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S_{tdi} – Indicele de direcție a texturii suprafeței

STEM – Microscopia electronică cu transmisie prin scanare

S. pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*

T₁₀, T₂₀ – Temperatură corespunzătoare unei pierderi de masă de 10%, respectiv 20%

T_{onset} – Temperatura la care începe degradarea termică

T_{peak} – Temperatura la care degradarea termică este maximă

TBD – 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-enă

TG – Termogravimetria

Thy – Timol

TSP – Sarea de sodiu a acidului 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-tetradeuteropropionic

W – Pierderea de masă la sfârșitul etapei de descompunere

XRD – Difracția de raze X

INTRODUCERE

Infecțiile bacteriene sunt o problemă frecventă asociată cu rănilor cutanate [1], contribuind la întârzierea suplimentară a procesului de vindecare și chiar la necroza țesuturilor locale [2]. În gestionarea rănilor se vizează eliminarea tuturor factorilor care pot împiedica vindecarea, respectiv crearea și menținerea condițiilor optime pentru susținerea acestui proces [3]. Materiale precum bumbacul și tifonul sunt utilizate pe scară largă ca pansamente datorită capacității lor de a izola rana de mediul extern, dar nu prezintă proprietăți antibacteriene și nu sunt adecvate pentru toate tipurile de leziuni. Mai mult, studiile au demonstrat că vindecarea rănilor are loc de aproximativ două ori mai rapid în medii umede comparativ cu cele uscate, ceea ce a condus la o tranziție progresivă de la pansamentele tradiționale din bumbac și tifon către pansamente hidroactive [4]. Utilizarea cu succes a pansamentelor cu hidrogel în îngrijirea și tratarea rănilor cutanate se datorează similarității structurale și compoziționale cu țesuturile moi ale corpului [5]. Hidrogelele prezintă capacitatea de a absorbi și de a menține un nivel optim de exsudat la suprafața plăgii, asigurând schimbul de gaze necesar proliferării celulare [6].

Poli(alcoolul vinilic) (PVA) este unul dintre cei mai utilizați polimeri sintetici hidrosolubili pentru obținerea hidrogelelor prin cicluri succesive de îngheț–dezgheț, datorită capacității sale de reticulare fizică. Această abordare elimină necesitatea utilizării agenților chimici de reticulare, reducând astfel potențialul toxicologic și conferind hidrogelelor un grad ridicat de puritate [7]. Hidrogelele obținute prezintă proprietăți remarcabile, precum biocompatibilitate excelentă, elasticitate adecvată, capacitate de absorbție și retenție a apei [8]. Cu toate acestea, în literatură au fost identificate două provocări majore care limitează utilizarea hidrogelelor pe bază de PVA ca biomaterial: absența bioactivității acestora și dificultatea încorporării eficiente a agenților antibacterieni cu caracter predominant hidrofob în matricea polimerică.

Încapsularea agenților terapeutici într-o matrice polimerică oferă multiple avantaje, precum protecția împotriva umidității sau acțiunii radicalilor liberi și a oxigenului, prevenirea reacțiilor chimice nedorite între specii active, modificarea densității, culorii sau fotosensibilității și creșterea stabilității sistemelor [9]. Din punct de vedere aplicativ, această tehnologie permite o conservare mai eficientă și o manipulare mai facilă a principiilor active, promovând în același timp și o eliberare prelungită a acestora. Astfel, se conturează o strategie promițătoare pentru controlul procesului de regenerare a pielii și reducerea contaminării microbiene, factori esențiali

în facilitarea vindecării rănilor.

Pe baza acestor considerente, **obiectul general** al tezei de doctorat intitulată „**Matrice polimerice complexe cu incluziuni antibacteriene**” a constat în:

Proiectarea, obținerea și caracterizarea unor noi structuri polimerice cu raport hidrofîl/hidrofob reglabîl, pe bază de polimeri sintetici și/sau naturali, capabile să îmbunătățească solubilitatea, stabilitatea și biodisponibilitatea agenților antibacterieni hidrofobi pentru aplicații cutanate.

Motivația direcției de cercetare abordate în prezenta teză de doctorat are la bază înțelegerea mecanismelor de formare a structurilor tridimensionale și optimizarea caracteristicilor hidrogelurilor multicomponente în vederea utilizării acestora ca matrice-suport pentru agenți antibacterieni cu solubilitate redusă în solvenți uzuali, dar cu valoare terapeutică semnificativă.

Ca posibilități de realizare se au în vedere următoarele **obiective specifice**: **(O1)** sinteza de noi homo- și copolimeri pe bază de poliesteri biodegradabili din resurse regenerabile, cu aplicații în eliberarea controlată a agenților antibacterieni hidrofobi; **(O2)** obținerea de nanoparticule polimerice încărcate cu un antibiotic cu spectru larg antibacterian; **(O3)** prepararea de hidrogeluri multicomponente cu (nano)incluziuni antibacteriene și antioxidante utilizând tehnica îngheț–dezgheț; **(O4)** caracterizarea fizico–chimică și selectarea variantelor optime în vederea **(O5)** evaluării activității antibacteriene și antioxidante, a citotoxicității *in vitro* și studii *in vivo* privind aplicabilitatea acestora în obținerea de pansamente pentru tratarea rănilor cutanate.

Teza de doctorat conține șase capitole, structurate în două părți distincte, prezentate în cele ce urmează.

Partea I – include **Capitolul I** dedicat prezentării datelor de literatură relevante pentru tema studiată: noțiuni teoretice referitoare la definirea și clasificarea hidrogelurilor, stadiul actual al cercetărilor în domeniul hidrogelurilor antibacteriene pe bază de polimeri sintetici și/sau naturali, proprietățile acestora, precum și o sinteză a principalelor metode de caracterizare fizico–chimică, alături de studiile *in vitro* și *in vivo* utilizate pentru evaluarea potențialului aplicativ în ingineria tisulară și medicina regenerativă.

Partea a II-a – este structurată în cinci capitole (Capitolele II–VI) și prezintă contribuțiile originale privind obținerea, caracterizarea fizico–chimică și evaluarea *in vitro/in vivo* a hidrogelurilor multicomponente antibacteriene obținute.

Capitolul II descrie partea experimentală, care include materialele, echipamentele și metodele de analiză utilizate în cadrul studiului doctoral.

Capitolul III prezintă o serie de matrice polimerice de hidrogel pe bază de PVA și poli(brasilat de etilenă) (PEB), evaluând potențialul acestora de a încorpora nanoparticule purtătoare de medicament și de a fi utilizate ca sisteme de eliberare controlată a substanței active. Hidrogelurile au fost preparate în trei etape: (1) sinteza homopolimerului PEB prin reacția de polimerizare cu deschidere de ciclu a brasilatului de etilenă (EB) în masă și în soluție (utilizând ca solvent 1,4-dioxan), în prezența 1-hexanolului ca inițiator și a 2 catalizatori organici, acidul *p*-toluensulfonic (PTSA) și 1,5,7-triazabiciclo[4.4.0]dec-5-enă (TBD); (2) obținerea de nanoparticule pe bază de PEB prin metoda precipitării, norfloxacină (NRF) fiind încorporată *in situ* în matricea homopolimerică; (3) prepararea de hidrogeluri pe bază de PVA încărcate cu sisteme de nanoparticule homopolimer-medicament utilizând tehnica îngheț–dezgheț. Formarea homopolimerului a fost confirmată de analizele structurale efectuate (FTIR, ¹H RMN, XRD). Nanoparticulele obținute au prezentat o morfologie predominant sferică și o structură de tip miez–coajă. Rezultatele au demonstrat potențialul hidrogelurilor de a asigura un profil de eliberare susținută a NRF în condiții *in vitro*, pe parcursul a 48 h.

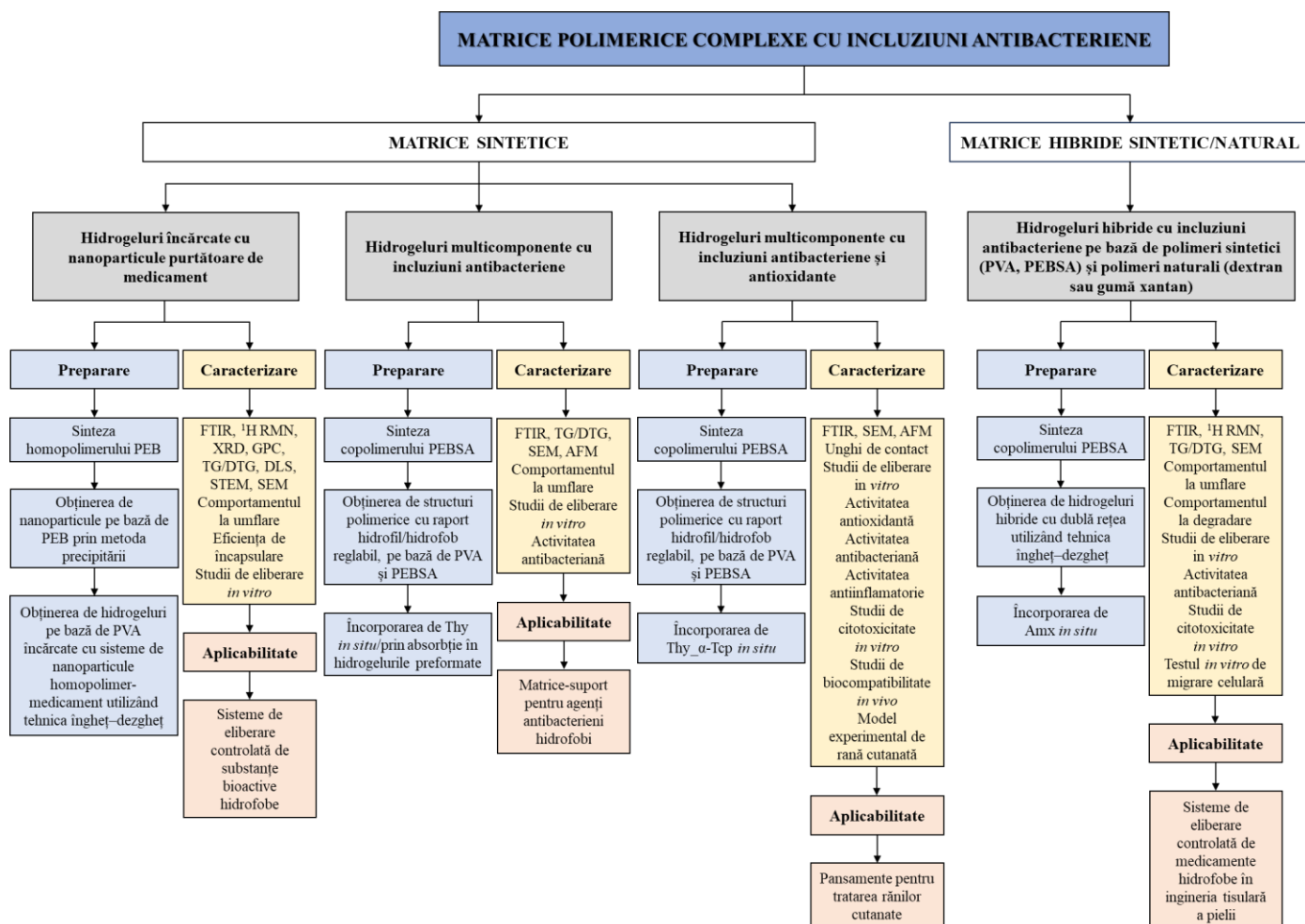
Capitolul IV prezintă rezultate originale privind obținerea și caracterizarea unor hidrogeluri multicomponente cu incluziuni antibacteriene și antioxidante pe bază de PVA, poli(brasilat de etilenă-co-acid squaric) (PEBSA), timol (Thy) și α -tocoferol (α -Tcp), precum și investigarea potențialului sinergic dintre cei doi compuși bioactivi. S-a urmărit evaluarea modului în care prezența copolimerului amfifil PEBSA – utilizat pentru a facilita încapsularea de compuși bioactivi hidrofobi în rețea, influențează proprietățile matricelor polimerice. Rezultatele obținute au arătat că sistemele PVA_PEBSA permit controlul proprietăților de suprafață și porozitate prin ajustarea raportului molar dintre comonomerii EB:acid squaric (SA) din compoziția PEBSA. Profilurile de eliberare cumulativă a Thy_ α -Tcp au confirmat capacitatea sistemului PVA_PEBSA de a încorpora și elibera controlat și susținut compușii bioactivi în condiții fiziologice simulate. Sistemele au prezentat efect bacteriostatic împotriva dezvoltării *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) și *Candida albicans*

(*C. albicans*). Activitatea antioxidantă cumulativă a Thy și α -Tcp în asociere cu PEBSA a produs un efect sinergetic notabil. Testele de citotoxicitate *in vitro* pe linia celulară BALB/3T3 clona A31 au indicat absența citotoxicității materialelor antibacteriene, valorile viabilității celulare fiind mai mari de 90% după 72 h de contact. Studiul privind evaluarea biocompatibilității *in vivo* prin implantare subcutanată la șobolanii Wistar a confirmat biocompatibilitatea materialelor testate, integrarea cu țesutul gazdă și absența unei reacții inflamatorii. Hidrogelurile antibacteriene au contribuit semnificativ la reducerea dimensiunilor rănilor create la șobolanii Wistar. La 20 de zile de la debutul experimentului, s-a constatat o regenerare aproape completă a țesutului.

În **Capitolul V** sunt descrise prepararea și caracterizarea unor hidrogeluri hibride antibacteriene cu dublă rețea, ce au fost obținute prin integrarea unor polimeri naturali (dextran și gumă xantan) în matricele polimerice PVA_PEBSA. Prin introducerea celor două polizaharide s-a urmărit dezvoltarea unor materiale hibride cu proprietăți avansate pentru aplicații în medicina regenerativă, precum: bioadezivitate crescută, morfologie controlată, capacitate ridicată de umflare și conformare eficientă la geometria plăgii. Totodată, s-a avut în vedere obținerea unei degradabilități controlate în mediul biologic, precum și menținerea caracterului biocompatibil. Acest capitol prezintă obținerea și caracterizarea a două variante de hidrogeluri multicomponente hibride cu incluziuni antibacteriene: (1) hidrogeluri hibride antibacteriene pe bază de PVA, PEBSA, dextran și amoxicilină (Amx) și (2) hidrogeluri hibride antibacteriene pe bază de PVA, PEBSA, gumă xantan și Amx. Sistemele au fost caracterizate structural, morfologic și din punct de vedere al capacității de retenție al fluidelor biologice simulate. De asemenea, s-au efectuat studii de degradare enzimatică *in vitro*, analiza cantitativă a principiului activ eliberat prin ^1H RMN, evaluarea activității antibacteriene asupra *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) și studii *in vitro* pe fibroblaste dermice umane normale. Coroborarea rezultatelor obținute susțin utilizarea hidrogelurilor hibride antibacteriene ca sisteme eficiente de eliberare controlată a medicamentelor în aplicații de inginerie tisulară, prin asigurarea unei disponibilități prelungite a substanței bioactive pe termen lung.

Ultimul capitol al tezei de doctorat, **Capitolul VI**, prezintă concluziile care fac referire la cele mai importante rezultate obținute experimental, precum și direcțiile viitoare de cercetare.

Structura tezei de doctorat:



Teza de doctorat se extinde pe 179 pagini împărțite în șase capitole care includ 34 tabele, 89 figuri, 14 ecuații și 248 indicații bibliografice. La finalul tezei sunt incluse următoarele anexe:

Anexa 1 – Diseminarea rezultatelor și activitatea științifică

Anexa 2 – Articole științifice

Rezultatele originale obținute în cadrul tezei de doctorat constituie subiectul a **cinci articole științifice** publicate în jurnale indexate ISI (factor de impact cumulat = 20,3), a **trei comunicări** și a **trei postere** prezentate la manifestări științifice internaționale. *Activitatea științifică conexă* cu subiectul tezei de doctorat s-a concretizat prin **trei articole științifice** publicate în jurnale indexate ISI (factor de impact cumulat = 15), **o carte** aflată în curs de publicare, **o cerere de brevet**, **două comunicări** și **cinci postere** prezentate la manifestări științifice internaționale.

PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL III. HIDROGELURI PE BAZĂ DE POLI(ALCOOL VINILIC) ÎNCĂRCATE CU NANOPARTICULE PURTĂTOARE DE MEDICAMENT

III.1. Contextul cercetării

Preocupările tot mai accentuate la nivel global privind impactul asupra mediului al materialelor poliolefinice convenționale derivate din surse petroliere, au condus la intensificarea eforturilor pentru dezvoltarea unor alternative sustenabile, precum polimerii obținuți din resurse regenerabile. Comparativ cu polimerii tradiționali, principalul avantaj al acestora constă în posibilitatea de reînnoire a materiilor prime [151].

Dintre toți polimerii proveniți din resurse regenerabile, poliesterii alifatici au atras un interes deosebit, fiind studiați pe scară largă ca materiale biodegradabile și biocompatibile pentru aplicații în domeniul medical și al materialelor de ambalare [152]. Un exemplu relevant este PEB, un homopolimer alifatic biodegradabil, fapt ce îl recomandă pentru utilizări în care sustenabilitatea este o prioritate sau în aplicații biomedicale. Structura unității sale repetitive, cu un lanț lung și apolar între legăturile esterice, conferă homopolimerului o hidrofobicitate pronunțată, o absorbție redusă a apei și o rezistență mai mare la degradare hidrolitică, în comparație cu poliesteri precum acid poli(lactic), ce au o structură mai polară. Totodată, biocompatibilitatea PEB îl recomandă ca un material promițător pentru aplicații biomedicale, precum dezvoltarea de transportori pentru compuși bioactivi hidrofobi [38–41].

PEB este sintetizat prin reacția de polimerizare cu deschidere de ciclu a EB, o lactonă ciclică cu două grupări esterice. EB este produs comercial prin reacția de condensare a etilenglicolului cu acidul 1,13-tridecandioic [37], acesta fiind derivat din uleiul de ricin – o sursă regenerabilă și accesibilă din punct de vedere economic [153]. Polimerizarea EB a fost realizată la scară de laborator utilizând catalizatori enzimatici [154], organometalici [37] sau organici [155]. Spre deosebire de catalizatorii metalici, cei organici oferă avantaje semnificative, incluzând o toxicitate redusă, un impact ecologic mai mic, costuri mai scăzute decât cei enzimatici și o biocompatibilitate bună [156].

III.2. Obiective științifice specifice:

↳ Sinteza și caracterizarea fizico–chimică a homopolimerului PEB;

- ↳ Obținerea de nanoparticule pe bază de PEB încărcate cu NRF, un antibiotic cu spectru larg antibacterian și caracterizarea acestora din perspectiva dimensiunii, stabilității fizice, eficienței încapsulării și morfologiei;
- ↳ Prepararea de hidrogeluri pe bază de PVA încărcate cu nanoparticule purtătoare de medicament utilizând tehnica îngheț–dezgheț și caracterizarea sistemelor pentru a obține informații cu privire la compoziția chimică, morfologie, determinarea gradului de retenție al fluidelor biologice simulate și analiza cantitativă a principiului activ eliberat.

III.3. Sinteza și caracterizarea homopolimerului poli(brasilat de etilenă)

Studiul s-a concentrat pe dezvoltarea unor metode sustenabile de sinteză a homopolimerului PEB, punând accent pe eficiența reacției și minimizarea impactului asupra mediului. Din perspectiva chimiei ecologice, una dintre provocările actuale în sinteza poliesterilor alifatici PEB este utilizarea unor solvenți mai prietenoși cu mediul. În vederea înlocuirii solvenților tradiționali precum toluenul, cloroformul sau dietil eterul, acest studiu explorează o strategie alternativă. Noutatea cercetării constă în procedeul de obținere în soluție a EB, într-un sistem omogen utilizând ca solvent 1,4-dioxan.

1,4-Dioxanul este un solvent organic cu o constantă dielectrică scăzută, care reduce îndepărtarea apreciabilă a sarcinilor sau disocierea semnificativă a complexului catalitic format. În această sinteză, alcoolii cu masă moleculară mică sunt utilizați în mod obișnuit pentru a controla masa moleculară a poliesterilor [37,157]. În acest caz, în amestecul de reacție s-a adăugat 1-hexanol. Spre deosebire de Pascual și colab. [155,158], considerați pionieri în utilizarea catalizatorilor organici pentru polimerizarea EB, care au purificat homopolimerul brut prin dizolvarea acestuia în soluție de diclormetan 10% și precipitarea cu dietil eter rece (1:5), prezentul studiu propune o metodă alternativă de purificare, bazată pe cicluri repetate de spălare-sedimentare în apă distilată rece (2–8 °C).

III.3.1. Procedeul de sinteză

Homopolimerul PEB a fost sintetizat prin reacția de polimerizare cu deschidere de ciclu a EB în masă și în soluție (utilizând ca solvent 1,4-dioxan), în prezența 1-hexanolului ca inițiator și a 2 catalizatori organici, PTSA și TBD (**Figura 3.1**). Reacțiile au fost efectuate în atmosferă de azot, la o temperatură constantă de 105 °C, cu o viteză de agitare magnetică de 250 rotații/min., timp de 24 h. Un experiment tipic pentru varianta **PEB₁₀₀_TBD** (**Tabelul 3.1**) a

presupus utilizarea a 11,52 mL EB (44,38 mmol, 100 echiv.), 0,0617 g TBD (0,4438 mmol, 1 echiv.), 0,6 mL 1-hexanol și 48 mL 1,4-dioxan. Pentru a evalua conversia monomerului, au fost colectate alicote la intervale de timp diferite și precipitate într-un amestec de apă distilată și acetonă (2:1), cu temperatura cuprinsă între 2 și 8 °C. Precipitatul a fost filtrat și uscat la temperatura camerei, iar conversia a fost determinată folosind metoda gravimetrică. Purificarea amestecului final de reacție s-a realizat prin cicluri repetate de spălare-sedimentare în apă distilată. Produsul rezultat a fost congelat cu azot lichid și liofilizat timp de 24 h la -55 °C (Alpha 1-2LD Plus, Martin Christ, Germania).

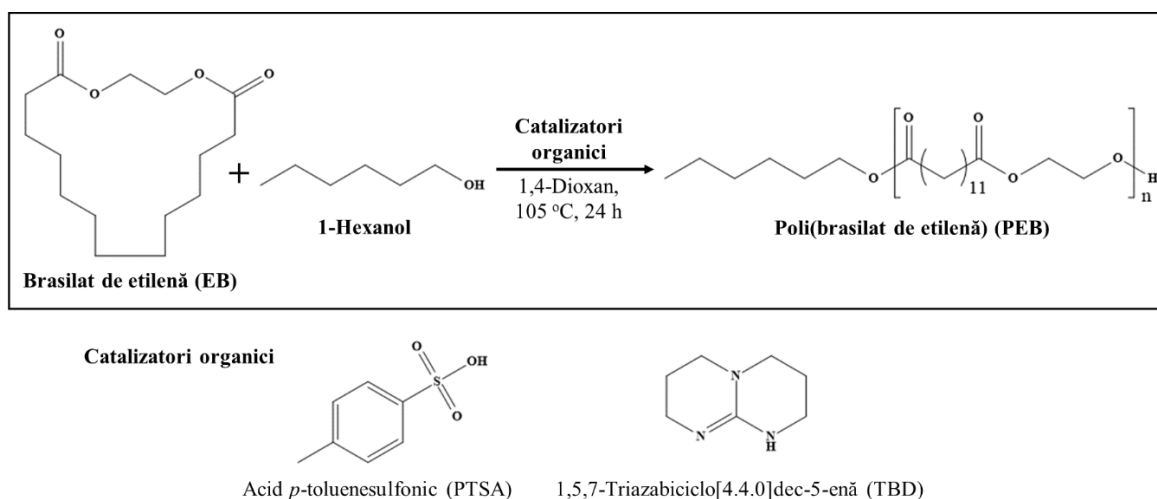


Figura 3.1. Reprezentarea schematizată a sintezei homopolimerului PEB.

Planul experimental include:

- (1) studiul influenței *tipului de catalizator organic* asupra *conversiei monomerului în homopolimer*;
- (2) studiul influenței *solventului* asupra *distribuției masei moleculare*;
- (3) studiul influenței *raportului monomer:catalizator* asupra *conversiei monomerului în homopolimer și a distribuției masei moleculare*.

Datele experimentale obținute sunt prezentate în **Tabelul 3.1**.

Tabel 3.1. Influența parametrilor de reacție asupra conversiei monomerului în homopolimer.

| Cod probă | Catalizator | EB:Catalizator (echiv.) | Conversia (%) | Monomer (mol L ⁻¹) |
|--|-------------|----------------------------|------------------|-----------------------------------|
| PEB ₅₀ _PTSA | PTSA | 50:1 | 70,83 | 0,26 |
| PEB ₅₀ _TBD | TBD | 50:1 | 82,75 | 0,15 |
| PEB ₁₀₀ _TBD | TBD | 100:1 | 78,5 | 0,22 |
| PEB ₁₀₀ _TBD fără 1-Hexanol | TBD | 100:1 | 77,83 | 0,20 |
| PEB ₁₅₀ _TBD | TBD | 150:1 | 76,66 | 0,22 |

În **Figura 3.3.** sunt redată diagramele de conversie în cazul polimerizării în soluție a EB, pentru diferite concentrații ale monomerului. Experimental, s-a observat că viteza de polimerizare a monomerului este accelerată în prezența TBD, în timp ce, în prezența PTSA, procesul devine mult mai complex.

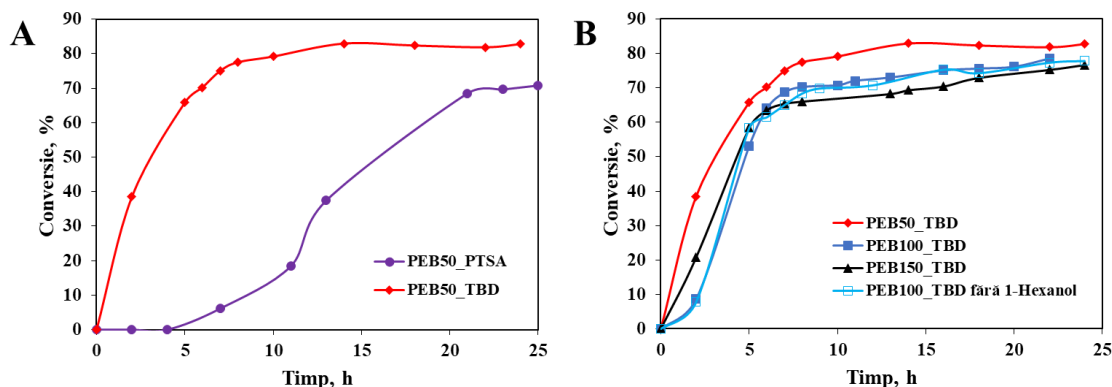


Figura 3.3. Diagrammele de conversie ale polimerizării EB la 105 °C inițiată cu 1-hexanol și catalizată de (A) PTSA sau (B) TBD în soluție pentru diferite concentrații ale monomerului.

În mod surprinzător, a rezultat o conversie de 77% chiar și în absența 1-hexanolului, fenomen însoțit de creșterea masei moleculare. Mai exact, s-a obținut o masă moleculară medie gravimetrică de 2031 g/mol fără utilizarea inițiatorului, comparativ cu 1463 g/mol atunci când acesta a fost prezent. Aceste rezultate confirmă faptul că TBD nu doar participă la procesul de polimerizare ca și catalizator, ci poate acționa și ca inițiator, influențând atât cinetica reacției, cât și distribuția maselor moleculare [158]. Acest comportament subliniază rolul dual al catalizatorului TBD, evidențiind importanța sa în optimizarea reacției de polimerizare.

Analizele spectroscopice efectuate, FTIR și ¹H RMN, au confirmat structura chimică a homopolimerilor sintetizați. Frația cristalină a homopolimerului a fost determinată prin integrarea ariei sub vârfurile cristaline și a ariei corespunzătoare fazei amorfe din difractogramă, utilizând software-ul Origin Pro 8.5, rezultând un grad de cristalinitate de aproximativ 57,2%. Dimensiunea medie a cristalelor **PEB₅₀_TBD** calculată cu ecuația Scherrer a fost estimată la 25,3 nm. Conform datelor termogravimetrice, procesul de descompunere a avut loc într-o singură etapă, cu maximul temperaturii de degradare termică (T_{peak}) la aproximativ 454 °C și masă reziduală de 1,16%. Acest rezultat este în acord cu datele din literatura de specialitate [37,155].

III.4. Sisteme de nanoparticule homopolimer-medicament pe bază de PEB

Scopul studiului a fost obținerea de nanopurtători pentru medicamente hidrofobe, pe

bază de homopolimerul PEB, desemnați pentru încapsularea NRF, în vederea îmbunătățirii solubilității, stabilității și biodisponibilității acestora în medii biologice.

III.4.1. Obținerea nanoparticulelor pe bază de PEB încărcate cu NRF

Nanoparticulele pe bază de PEB obținut prin tehnica polimerizării în masă (**PM₅₀-NRF**) și în soluție (**PS₅₀-NRF**, **PS₁₀₀-NRF**, **PS₁₅₀-NRF**) au fost preparate prin metoda precipitării, NRF fiind încorporată *in situ* în matricea homopolimerică (**Figura 3.7.**). Purificarea nanoparticulelor a fost realizată prin dializă cu apă bidistilată timp de 48 h, apa fiind schimbată la un interval de 12 h.

Nanoparticulele fără medicament (**PM₅₀**, **PS₅₀**, **PS₁₀₀**, **PS₁₅₀**) au fost preparate în condiții similare și utilizate ca referință în analizele ulterioare.

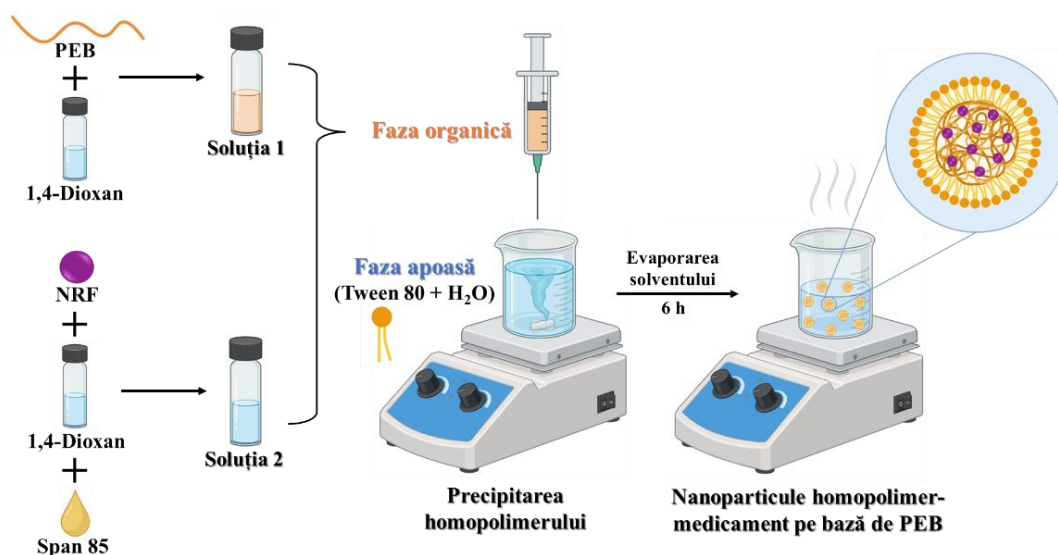


Figura 3.7. Reprezentarea schematizată a etapelor preparării nanoparticulelor homopolimer-medicaament pe bază de PEB.

Investigațiile DLS au arătat dependența diametrului hidrodinamic al nanoparticulelor de distribuția maselor moleculare corespunzătoare homopolimerilor PEB, înregistrând dimensiuni în intervalul 190,6–290,7 nm. De asemenea, toate valorile indicelui de polidispersitate sunt sub 0,5, ceea ce indică o bună omogenitate a nanoparticulelor. **Figura 3.9. A** prezintă imagini STEM ale nanoparticulelor pe bază de PEB₅₀_TBD (**PS₅₀**), evidențiind asocierea acestora în structuri aproape sferice de dimensiuni nanometrice. Nanoparticulele **PS₅₀-NRF** se prezintă sub forme sferice uniforme, cu structură de tip miez-coajă (**Figura 3.9.B**). Măsurătorile realizate cu software-ul ImageJ au arătat că încorporarea NRF reduce diametrul mediu al nanoparticulelor,

comparativ cu cele neîncărcate, ca urmare a interacțiunilor fizice intermoleculare dintre homopolimer și medicament, ipoteză susținută și de datele obținute prin analiza DLS.

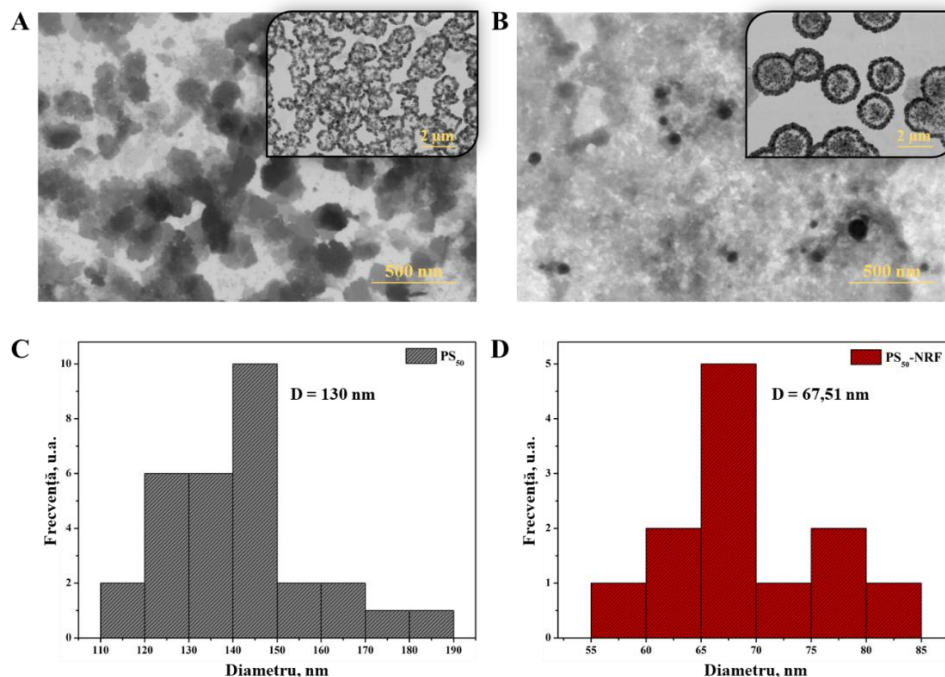


Figura 3.9. Imaginile STEM și histogramele distribuției mărimii particulelor ale sistemelor PS₅₀ (A și C), respectiv PS₅₀-NRF (B și D).

III.5. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri pe bază de PVA încărcate cu nanoparticule purtătoare de medicament




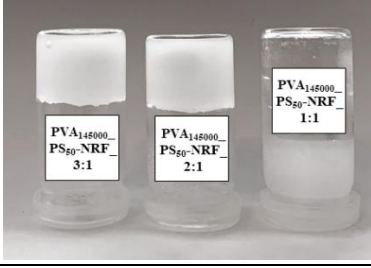
Scopul cercetării a fost obținerea și caracterizarea unor noi hidrogeluri pe bază de PVA încărcate cu nanoparticule purtătoare de medicament, având ca obiectiv facilitarea manipulării acestora și asigurarea unui profil de eliberare susținută a substanței active.

III.5.1. Prepararea de hidrogeluri pe bază de PVA_{PS50-NRF}

Obținerea hidrogelurilor pe bază de PVA cu mase moleculare diferite, 72000 și 145000 g/mol încărcate cu nanoparticule PS₅₀-NRF s-a realizat etapizat. Inițial, soluția de PVA 4% a fost preparată prin dizolvarea unei cantități corespunzătoare de PVA în apă distilată, la o temperatură constantă de 90 °C, cu o viteză de agitare magnetică de 700 rotații/min., timp de 2 h păstrând aceleași condiții. Nanoparticulele pe bază de PEB în soluție PS₅₀-NRF au fost preparate conform protocolului descris în subcapitolul III.4.1. *Obținerea nanoparticulelor pe bază de PEB încărcate cu NRF.* Ulterior, soluțiile preparate individual au fost amestecate în raport volumetric PVA:PS₅₀-NRF de 3:1, 2:1, respectiv 1:1 și expuse la 3 cicluri de îngheț-

dezgheț, 18 h la o temperatură de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, urmată de decongelare timp de 8 h la temperatura camerei. Au rezultat 12 variante de hidrogeluri cu compoziții diferite, conform **Tabelului 3.6**. Hidrogelurile obținute au fost congelate cu azot lichid, liofilizate timp de 24 h la $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Alpha 1-2LD Plus, Martin Christ, Germania) și depozitate în exicator la temperatura camerei pentru studii suplimentare.

Tabel 3.6. Codificarea sistemelor pe bază de PVA_PS₅₀-NRF.

| Cod probă* | Raport volumetric PVA:PS ₅₀ | Observații | Imagini |
|--|--|---|---|
| PVA ₇₂₀₀₀ _PS ₅₀ _3:1 | 3:1 | Hidrogel structurat și omogen |  |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PS ₅₀ _2:1 | 2:1 | Hidrogel structurat și omogen | |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PS ₅₀ _1:1 | 1:1 | Hidrogel cu structură neomogenă, caracterizat prin separare de faze | |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PS ₅₀ -NRF_3:1 | 3:1 | Hidrogel structurat și omogen |  |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PS ₅₀ -NRF_2:1 | 2:1 | Hidrogel cu structură neomogenă, caracterizat prin separare de faze | |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PS ₅₀ -NRF_1:1 | 1:1 | Hidrogel cu structură neomogenă, caracterizat prin separare de faze | |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PS ₅₀ _3:1 | 3:1 | Hidrogel compact și omogen |  |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PS ₅₀ _2:1 | 2:1 | Hidrogel compact și omogen | |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PS ₅₀ _1:1 | 1:1 | Hidrogel compact și omogen | |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PS ₅₀ -NRF_3:1 | 3:1 | Hidrogel compact și omogen |  |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PS ₅₀ -NRF_2:1 | 2:1 | Hidrogel compact și omogen | |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PS ₅₀ -NRF_1:1 | 1:1 | Hidrogel compact și omogen | |

* concentrație de 4% pentru ambele soluții de PVA

Observațiile realizate au evidențiat că hidrogelurile pe bază de PVA cu masa moleculară de 145000 g/mol prezintă o structură compactă și omogenă. Datorită acestor caracteristici,

aceste variante de hidrogeluri au fost selectate pentru a fi caracterizate în subcapitolul III.5.2. *Metode de caracterizare a hidrogelurilor pe bază de PVA_PS50-NRF*. Imaginile SEM evidențiază faptul că toate probele dispun de o structură internă poroasă, caracterizată prin pori interconectați cu dimensiuni variabile (**Figura 3.11**).

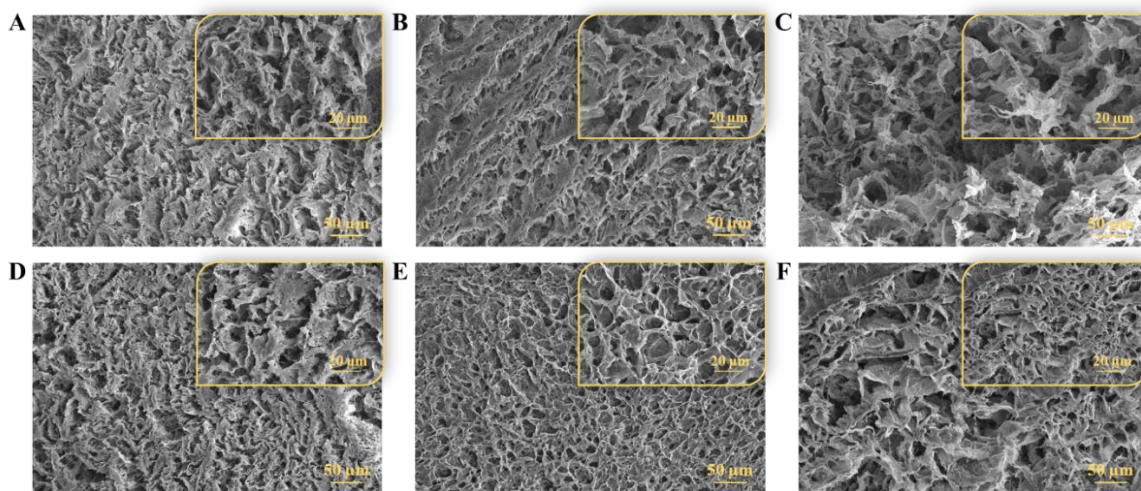


Figura 3.11. Imagini SEM ale probelor: (A) PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀_3:1, (B) PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀_2:1, (C) PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀_1:1, (D) PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_3:1, (E) PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_2:1 și (F) PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_1:1.

Cantitatea maximă de antibiotic eliberat pe parcursul a 48 h a fost de 37,83% (PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_3:1), 54,4% (PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_2:1) și 61,15% (PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_1:1), aceasta înregistrând o creștere pe măsură ce raportul polimer/nanoparticule încărcate cu NRF scade. În același interval de timp, probele martor PVA₁₄₅₀₀₀-NRF au prezentat o viteză de eliberare semnificativ mai rapidă (**Figura 3.14**). Acest rezultat confirmă capacitatea sistemului PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀ de a încorpora nanoparticule purtătoare de medicament și de a îl elibera prin difuzie într-o manieră controlată, îmbunătățind biodisponibilitatea și reducând toxicitatea sistemică.

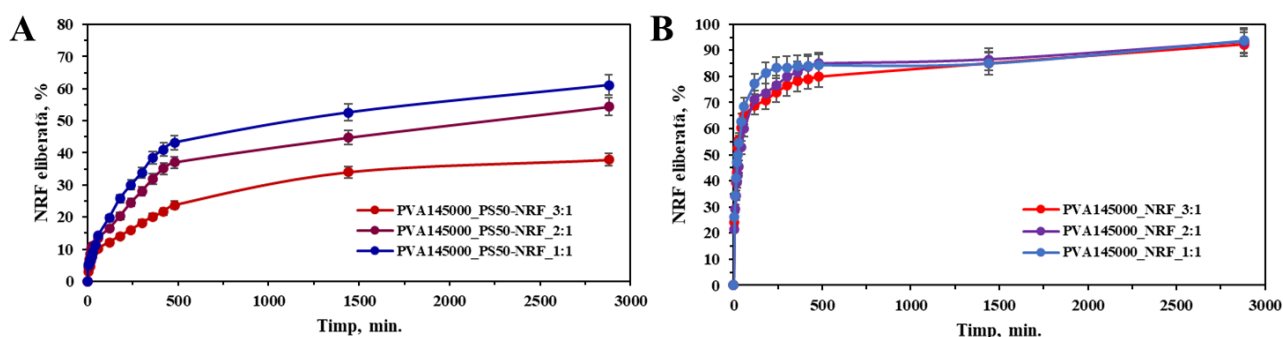


Figura 3.14. Profilurile de eliberare a NRF din hidrogelurile pe bază de (A) PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF și (B) PVA₁₄₅₀₀₀.

CAPITOLUL IV. HIDROGELURI MULTICOMPONENTE PE BAZĂ DE POLIMERI SINTETICI CU INCLUZIUNI ANTIBACTERIENE/ ANTIOXIDANTE

IV.1. Contextul cercetării

Impactul gradului de contaminare bacteriană asupra procesului de vindecare a rănilor cronice nu este pe deplin înțeles și, cel mai probabil, este subestimat. Prezența biofilmului bacterian a fost identificat drept un factor critic, iar studiile au evidențiat o corelație între adâncimea și durata leziunii și prezența tulpinilor din genul *Staphylococcus*. Mai mult, colonizarea bacteriană a rănilor (frecvent cauzată de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* și anumite tulpini de *Clostridium*) s-a dovedit a contribui la întârzierea suplimentară a procesului de vindecare [170,171].

În acest context, au fost dezvoltate diverse strategii pentru extinderea materialelor cu activitate antibacteriană. O astfel de abordare presupune încărcarea hidrogelurilor cu agenți antibacterieni, cum ar fi extracte naturale (compuși fenolici și uleiuri esențiale din plante), care pot susține inhibarea creșterii microorganismelor pe suprafața materialului. Încapsularea compușilor bioactivi antibacterieni într-o matrice polimerică oferă multiple avantaje, printre care: protecția împotriva umidității sau acțiunii radicalilor liberi și a oxigenului, prevenirea reacțiilor chimice nedorite între specii active, modificarea densității, culorii sau fotosensibilității și creșterea stabilității sistemelor [9]. În plus, din perspectivă aplicativă, această abordare permite o conservare mai eficientă și o manipulare mai facilă a principiilor active, promovând în același timp și o eliberare prelungită a acestora. Astfel, se poate asigura controlul regenerării cutanate și reducerea contaminării microbiene, care ar putea împiedica procesul de vindecare.

IV.2. Obiective științifice specifice:

- ↳ Obținerea de structuri polimerice cu raport hidrofil/hidrofob reglabil capabile să înglobeze compuși bioactivi hidrofobi;
- ↳ Prepararea de hidrogeluri multicomponente cu incluziuni antibacteriene și antioxidante pe bază de PVA, PEBSA, Thy și α -Tcp;
- ↳ Caracterizarea sistemelor pentru a obține informații cu privire la compoziția chimică, stabilitatea termică, morfologie, determinarea unghiului de contact și a gradului de retenție al fluidelor biologice simulate, analiza cantitativă a principiului activ eliberat,

evaluarea activității antibacteriene și antioxidante, studii de citotoxicitate *in vitro* pe linia celulară BALB/3T3 clona A31 și studii *in vivo* privind aplicabilitatea acestora în vindecarea rănilor cutanate.

Thy este un fenol monoterpenoid natural și este unul dintre principalii compuși activi găsiți în uleiurile esențiale extrase din *Thymus vulgaris* (cimbru) și din alte plante precum *Ocimum gratissimum* L. (busuioc) sau *Origanum* L. (oregano) [172]. Au fost raportate diferite proprietăți farmacologice ale acestor compuși, inclusiv activități antibacteriene, antifungice, antioxidante și antiinflamatorii, analgezice și de vindecare [173–176]. Thy s-a dovedit a fi eficient împotriva tulpinilor bacteriene reprezentate de *S. aureus* și *E. coli*, precum și împotriva tulpinilor fungice reprezentate de *C. albicans*. Datele de literatură menționează că fenolii interacționează cu polizaharidele, acizii grași și fosfolipidele din structura membranei celulare bacteriene, determinând pierderea de constituenți celulari și implicit, moartea celulei [177–179].

α -Tcp, forma cea mai activă și eficace biologic de vitamina E, este un puternic antioxidant liposolubil responsabil pentru protejarea celulelor împotriva stresului oxidativ și contribuie la stabilizarea mecanică a membranelor prin interacțiuni fizice de tip van der Waals [105]. Suplimentarea sistemului PVA_PEBSA_Thy cu α -Tcp a vizat un efect sinergic între cei 2 compuși bioactivi.

IV.3. Sinteza copolimerului poli(brasilat de etilenă-co-acid squaric)

Copolimerul PEBSA a fost sintetizat printr-o reacție de polimerizare cu deschidere de ciclu între brasilat de etilenă – EB și acid squaric – SA, în rapoarte molare EB:SA, de 25:75, 50:50, respectiv 75:25, în prezența 1-hexanolului ca inițiator și 1,4-dioxan ca solvent utilizând metoda prezentată în literatură de către Chiriac și colab. [42] (**Figura 4.1.**). Reacțiile au fost efectuate în atmosferă de azot, la o temperatură constantă de 100 °C, cu o viteză de agitare magnetică de 250 rotații/min., timp de 24 h. Purificarea amestecului final de reacție s-a realizat prin cicluri repetate de spălare-sedimentare în dietil eter și apă distilată. Produsul rezultat a fost congelat cu azot lichid și liofilizat timp de 24 h la –55 °C (Alpha 1-2LD Plus, Martin Christ, Germania).

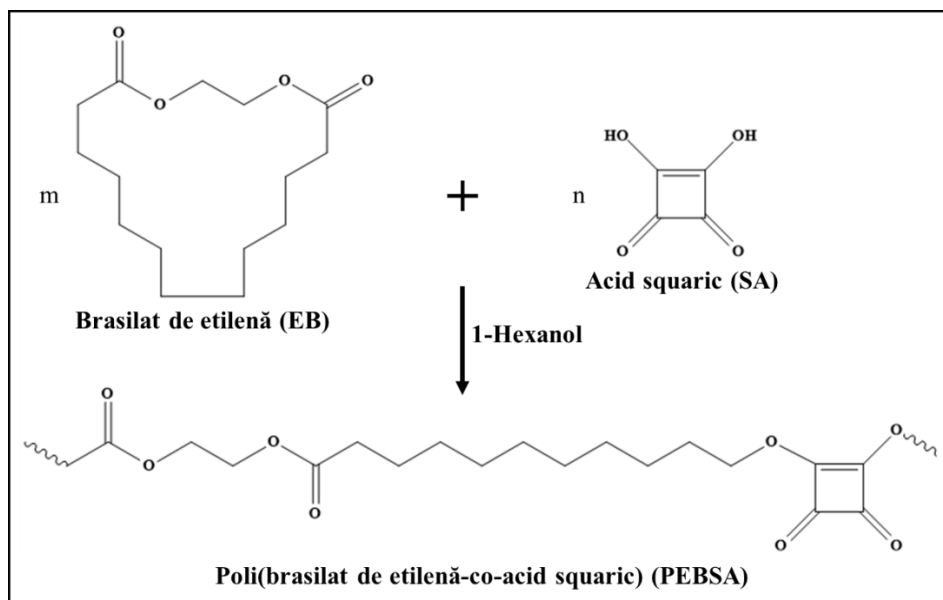


Figura 4.1. Reprezentarea schematizată a sintezei copolimerului PEBSA [42].

IV.5. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente pe bază de polimeri sintetici cu incluziuni antibacteriene

Scopul studiului a fost obținerea și caracterizarea unor hidrogeluri multicomponente pe bază de PVA, PEBSA și Thy, utilizând tehnica îngheț-dezgeț, în vederea conferirii de proprietăți antibacteriene matricelor polimerice obținute în subcapitolul IV.4.

IV.5.1. Prepararea de hidrogeluri antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy

Obținerea hidrogelurilor antibacteriene pe bază de PVA cu mase moleculare diferite, 72000 și 145000 g/mol, PEBSA cu rapoarte molare diferite între comonomerii EB:SA, 25:75, 50:50, respectiv 75:25 și Thy a implicat două abordări: **(1) încorporarea de Thy *in situ*** și **(2) încorporarea de Thy prin absorbție în hidrogelurile preformate (Figura 4.10.)** [187].

Spectroscopia FTIR a confirmat structura hidrogelurilor multicomponente antibacteriene. Apariția unor noi semnale înregistrate în regiunea $1620\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ (C=C întindere), respectiv $1290\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$ (C–O întindere) a indicat prezența compusului bioactiv Thy. Eliberarea Thy din hidrogeluri a prezentat o viteză rapidă în primele minute, urmată de un proces de eliberare gradual ce s-a extins până la 11–12 h în cazul sistemelor care conțin PEBSA_{25/75}. Valoarea exponentului de eliberare n mai mică de 0,5 pentru toate probele a sugerat un mecanism de difuzie quasi-Fickian, datorat relaxării polimerului, care este semnificativ mai mare decât viteza de difuzie a compusului bioactiv. Valorile coeficienților de corelație R^2 corespunzători curbei

obținute pentru determinarea lui n și K au variat între 0,9813 și 0,9997, apropiindu-se de 1, ceea ce a indicat o bună potrivire a tuturor sistemelor cu modelul Korsmeyer–Peppas.

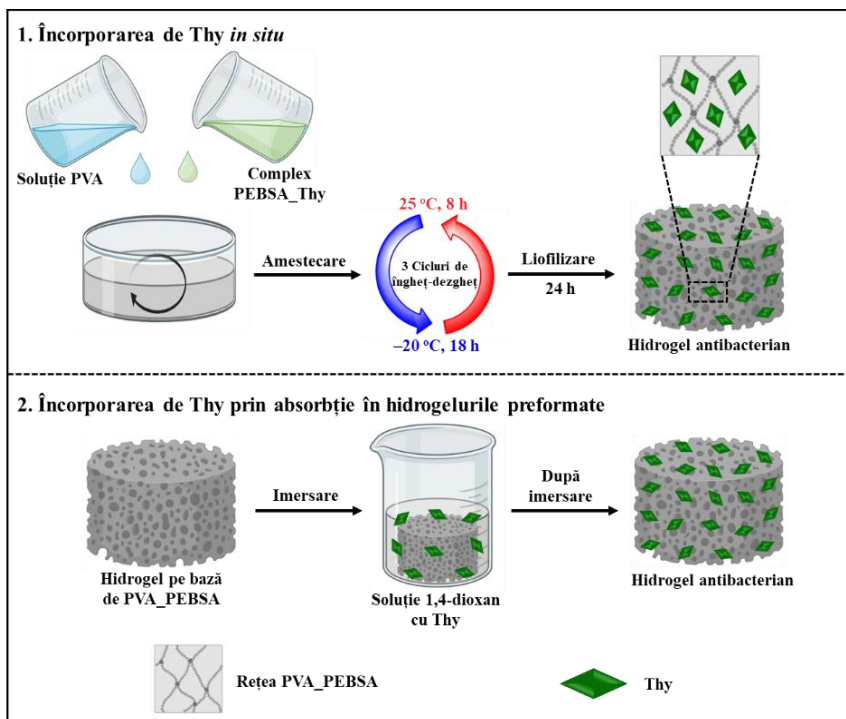


Figura 4.10. Reprezentarea schematizată a etapelor preparării hidrogelurilor multicomponente pe bază de PVA_PEBSA_Thy [187].

IV.6. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente pe bază de polimeri sintetici cu incluziuni antibacteriene/antioxidante

Studiul a avut în vedere obținerea și caracterizarea unor hidrogeluri multicomponente cu proprietăți antibacteriene și antioxidante, pe bază de PVA, PEBSA, Thy și α -Tcp, precum și investigarea potențialului sinergic dintre cei 2 compuși bioactivi, în vederea aplicării acestora în domeniul îngrijirii și tratării rănilor cutanate.

IV.6.1. Prepararea de hidrogeluri antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy_ α -Tcp

Complexul PEBSA_Thy_ α -Tcp a fost obținut prin amestecarea soluției de PEBSA (0,066 g/mL în 1,4-dioxan) cu Thy și α -Tcp în rapoarte gravimetrice PEBSA:Thy: α -Tcp de 1:1:1, 1:2:1, respectiv 1:1:2 conform **Tabelului 4.9**. În cea de-a doua etapă, complexul PEBSA_Thy_ α -Tcp a fost amestecat cu o soluție de PVA 4%, în raport volumetric de 2:1 și expus ciclurilor de îngheț–dezghet (3 cicluri de îngheț–dezghet 18 h la o temperatură de -20 °C, respectiv decongelare timp de 8 h la temperatura camerei). Hidrogelurile antibacteriene obținute au fost liofilizate (24 h la -55 °C, Alpha 1-2LD Plus, Martin Christ, Germania) și depozitate în exicator la temperatura camerei pentru studii suplimentare.

Tabel 4.9. Compoziția sistemelor pe bază de PVA_PEBSA_Thy_α-Tcp.

| Cod probă* | Raport volumetric PVA:PEBSA | Compoziție sistem pentru un volum de 5 mL | | | |
|---|-----------------------------|---|-----------|---------|-----------|
| | | PVA (g) | PEBSA (g) | Thy (g) | α-Tcp (g) |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _Thy_α-Tcp | | | | 0,066 | 0,066 |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _Thy_α-Tcp | | | | 0,066 | 0,066 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _Thy_α-Tcp | | | | 0,066 | 0,066 |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _Thy_α-Tcp | | | | 0,066 | 0,066 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _Thy_α-Tcp | 2:1 | 0,132 | 0,066 | 0,066 | 0,066 |
| PVA ₁₄₅₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _Thy_α-Tcp | | | | 0,066 | 0,066 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _2xThy_α-Tcp | | | | 0,132 | 0,066 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _Thy_2xα-Tcp | | | | 0,066 | 0,132 |

* concentrație de 4% pentru ambele soluții de polimer

Deplasarea spectrelor de benzi înregistrate în regiunea 1290–1280 cm⁻¹ (C–O întindere), respectiv 852–809 cm⁻¹ (C=C deformare) a indicat prezența compusului bioactiv Thy (**Figura 4.18. B**). În același timp, deplasarea benzilor de absorbție a atestat implicarea grupărilor –OH, –C=O și –CH₃ în formarea legăturilor de hidrogen intermoleculare, respectiv interacțiunilor van der Waals.

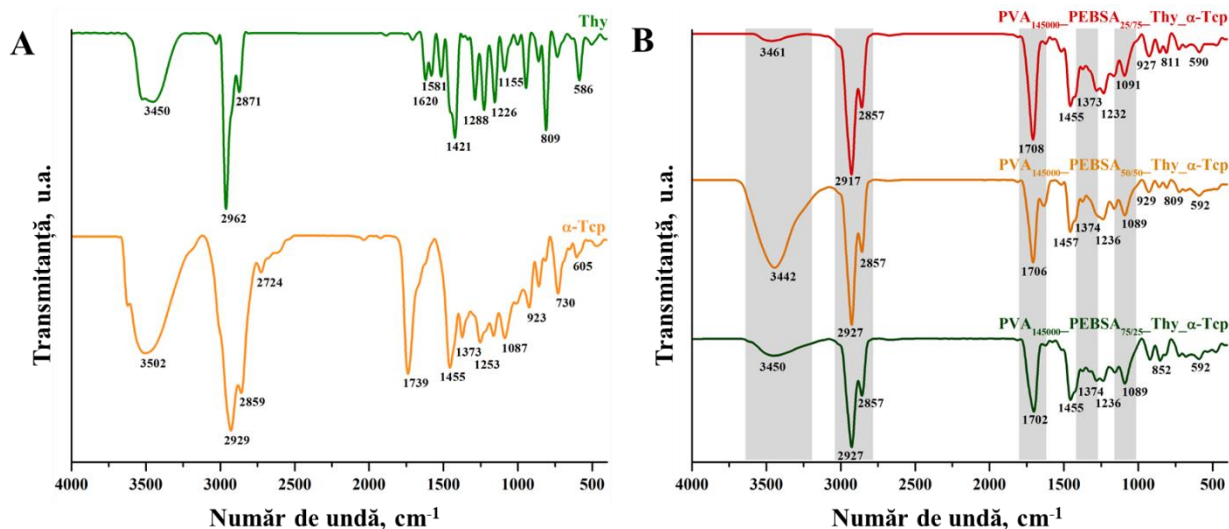


Figura 4.18. Spectrele FTIR ale probelor: (A) Thy și α-Tcp, respectiv

(B) PVA₁₄₅₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp, PVA₁₄₅₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Thy_α-Tcp și PVA₁₄₅₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Thy_α-Tcp.

Pentru a avea o capacitate adecvată de absorbție a exsudatului produs de rană, valoarea unghiului de contact al suprafeței unui pansament se impune a fi mai mic de 90° [196]. Valorile unghiului de contact cu apa sunt în intervalul 44° (PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Thy_α-Tcp) – 64° (PVA₁₄₅₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Thy_α-Tcp), prezentând un caracter hidrofil moderat (Figura 4.22.). Rezultatele experimentale au indicat că segmentele hidrofobe sunt orientate spre interior (miez hidrofob), iar cele hidrofile înconjoară miezul, stabilizând interiorul (înveliș hidrofil).

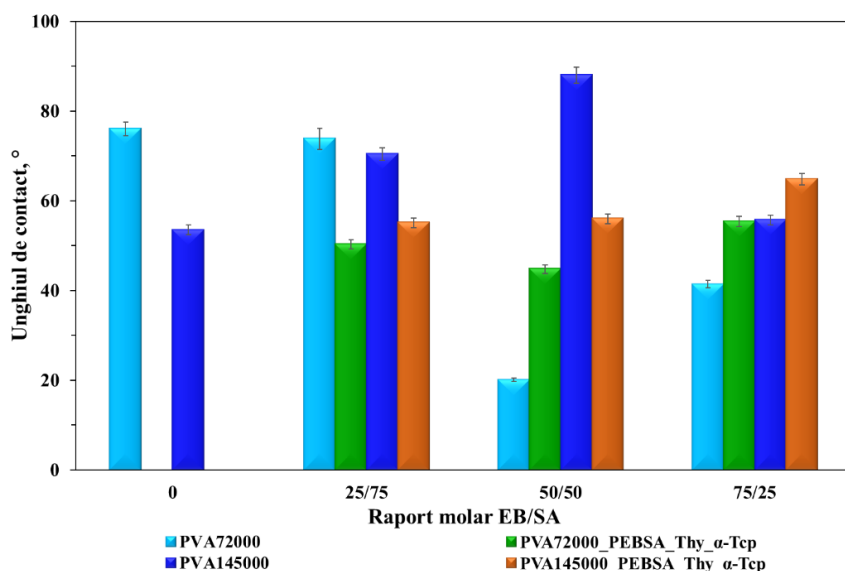


Figura 4.22. Valorile unghiului de contact cu apa la suprafața filmelor pe bază de PVA și PEBSA cu și fără Thy_α-Tcp. Rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică ± abaterea standard a mediei.

Profilurile de eliberare cumulativă a Thy și α-Tcp au confirmat capacitatea sistemului PVA_PEB SA de a încorpora și elibera controlat compușii bioactivi la pH 5,4 și 7,4. Activitatea antibacteriană față de *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans* a fost evaluată prin metoda Kirby–Bauer. Rezultatele testării activității antibacteriene a hidrogelurilor multicomponente pe bază de PVA_PEB SA_Thy_α-Tcp sunt prezentate în Tabelul 4.12.

Tabel 4.12. Diametrul zonelor de inhibiție (mm) a sistemelor testate.

| Cod probă | Zona de inhibiție (mm)* | | |
|---|-------------------------|----------------|--------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>C. albicans</i> |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _Thy_α-Tcp | 22,30 ± 0,14 | 21,90 ± 0,99 | 38,55 ± 1,48 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _Thy_α-Tcp | 21,10 ± 0,00 | 19,15 ± 1,06 | 32,25 ± 3,18 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _Thy_α-Tcp | 25,90 ± 0,70 | 25,45 ± 3,46 | 34,65 ± 0,91 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _2xThy_α-Tcp | 27,05 ± 0,63 | 28,40 ± 0,14 | 37,80 ± 0,28 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _Thy_2α-Tcp | 21,80 ± 3,25 | 19,20 ± 0,00 | 28,25 ± 0,77 |

* Rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică ± abaterea standard a mediei.

Sistemele au prezentat activitate antibacteriană împotriva dezvoltării tulpinilor de referință. Tulpina fungică reprezentată de *C. albicans* a manifestat o sensibilitate ridicată la toate sistemele testate, diametrul zonelor de inhibiție variind între $28,25 \pm 0,77$ mm (PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Thy_2 α -Tcp) și $38,55 \pm 1,48$ mm (PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_ α -Tcp). Conform rezultatelor obținute privind reacția cu radicalul DPPH, toate probele au prezentat activitate antioxidantă (Figura 4.28). Grupările funcționale carbonil din SA sunt dispuse pentru transfer de electroni și implicit cantitatea mai mare de monomer SA (75%), va conduce la o activitate crescută de reducere a radicalului liber DPPH.

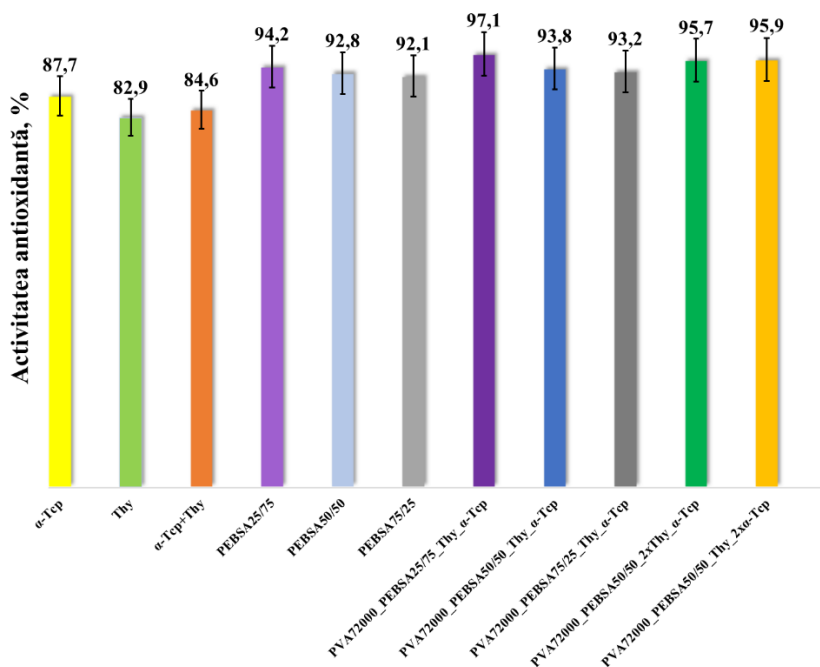


Figura 4.28. Activitatea antioxidantă a sistemelor PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Thy_ α -Tcp comparativ cu probele martor. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm eroarea standard a mediei.

Testul cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT) a indicat absența citotoxicității materialelor antibacteriene asupra fibroblastelor din linia celulară BALB/3T3 clona A31, valorile viabilității celulare fiind mai mari de 90% pentru toți cei 3 timpi de contact (24, 48 și 72 h). Morfologia celulelor în contrast de fază și fluorescență a confirmat citocompatibilitatea probelor, acestea neafectând negativ atașarea și proliferarea celulară.

Proprietatea sistemelor polimerice de a nu produce nici o reacție inflamatorie țesutului viu cu care vine în contact [215] a fost evaluată prin implantare subcutanată la șobolani femele din rasa Wistar a hidrogelurilor antibacteriene. Procedurile experimentale au fost efectuate cu respectarea principiilor celor 3R, având ca scop reducerea numărului de teste pe animale; astfel, datorită numărului limitat de animale disponibile, conform subcapitolului II.2. Metode de

analiză, a fost realizată o selecție a probelor analizate. Activitatea antibacteriană superioară împotriva *C. albicans* (diametrul zonelor de inhibiție de până la 38 mm), proprietățile antioxidante ridicate (97,1%) și caracterul hidrofîl moderat (~55°) au favorizat selecția hidrogelurilor antibacteriene **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp** ca grup experimental. Matricea **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}** a fost considerată martor.

Studiul s-a desfășurat pe o durată de 21 de zile, timp în care bunăstarea animalelor, consumul de hrană și apă, aspectul blănii și a membranelor mucoase au fost monitorizate cu atenție pentru a observa posibile reacții secundare [211]. Materialele testate nu au determinat decesul animalelor și nu au existat cazuri care să prezinte inflamație vizibilă la nivelul regiunii dorsale sau vreun comportament asociat cu durerea acestora, conform scării Grimace și monitorizării greutății corporale a animalelor (**Figura 4.31. N**). Mai mult, materialele implantate subcutanat au evidențiat caracteristici de umflare în timp cu menținerea formei dreptunghiulare (**Figura 4.31. M**).

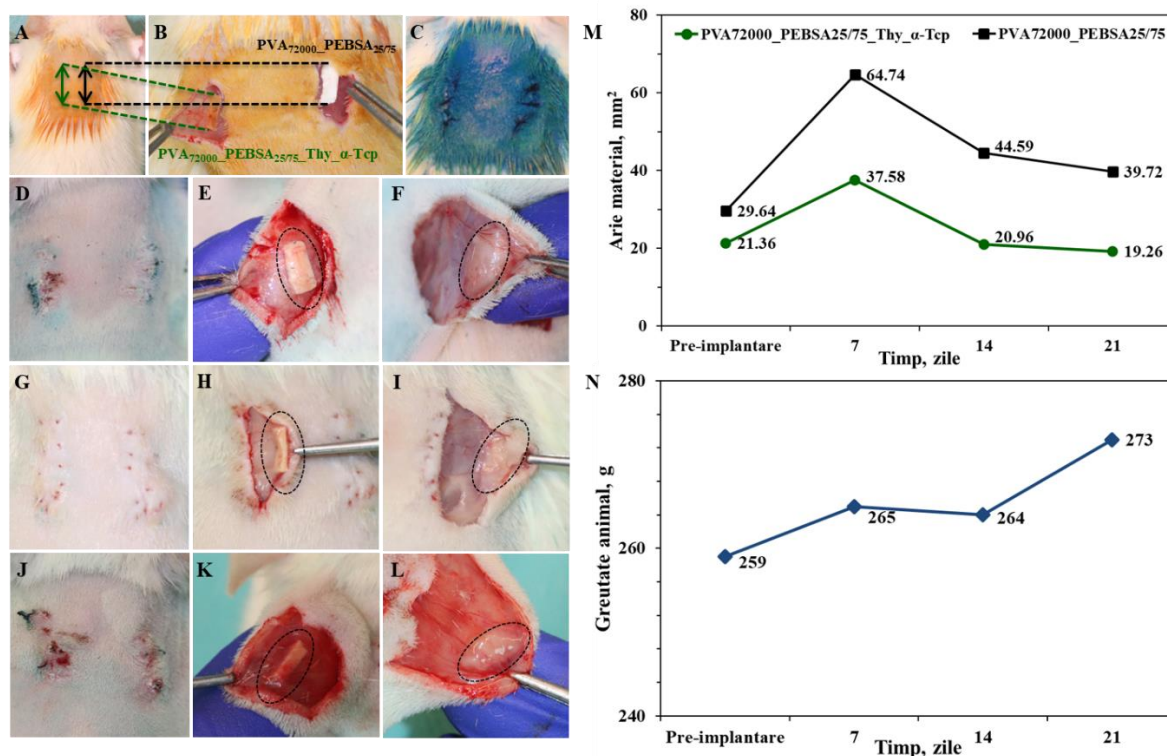


Figura 4.31. Procedura experimentală de implantare subcutanată a hidrogelurilor multicomponente: (A) Pregătirea pielii din regiunea dorsală; (B) plasarea subcutanată a eșantioanelor de testat; (C) suturarea și aseptizarea inciziilor; materialele implantate subcutanat la (D–F) 7 zile, (G–I) 14 zile și (J–L) 21 de zile; (M) variația în timp a ariei probelor PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp și PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75} și (N) monitorizarea greutății corporale a animalelor pe parcursul a 21 de zile.

Aplicabilitatea hidrogelurilor antibacteriene **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp** în vindecarea rănilor cutanate a fost evaluată pe șobolani din aceeași rasă. Procesul de vindecare a rănilor create a fost analizat prin măsurarea ariei leziunii în zilele prestabilite de monitorizare (**Figura 4.32.**) [211]. La 20 de zile de la momentul realizării rănilor cutanate, s-a constatat vindecarea aproape completă a rănilor (99,36 și 94,91%) în loturile tratate cu hidrogelurile multicomponente.

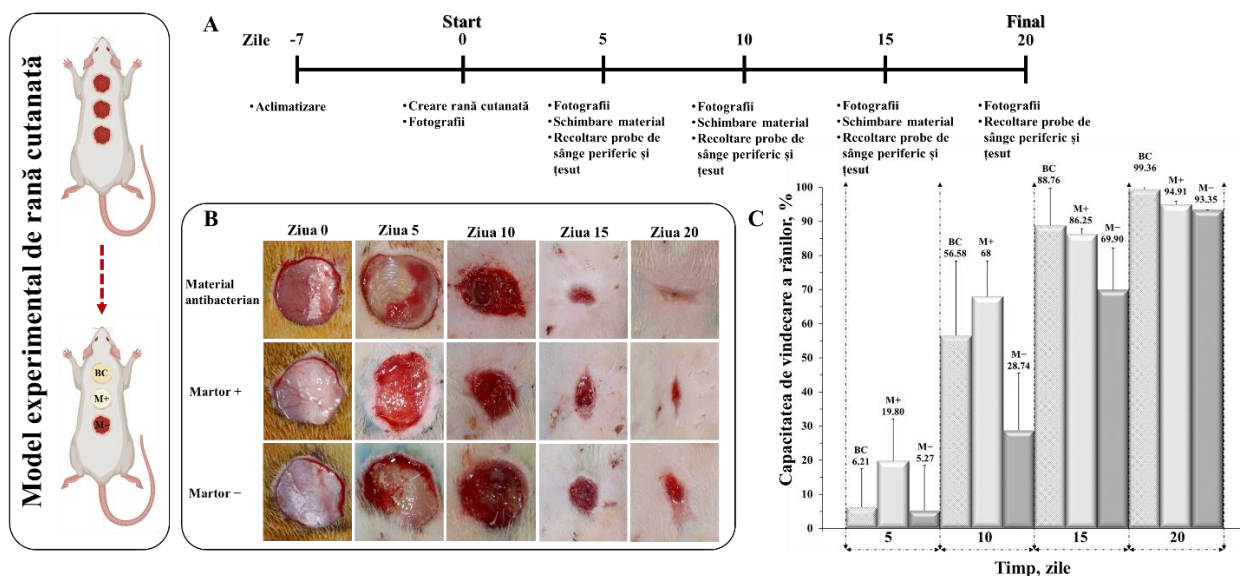


Figura 4.32. (A) Procedura experimentală privind aplicabilitatea hidrogelurilor antibacteriene în vindecarea rănilor cutanate; (B) imagini cu procesul de vindecare a rănilor la aplicarea materialului antibacterian (BC) și martorului pozitiv (M+) în comparație cu martorul negativ (M-); (C) capacitatea de vindecare a rănilor în zilele 5, 10, 15, respectiv 20 de la debutul studiului. Rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică ± abaterea standard a mediei.

Interleukina-8 (IL-8) are rolul de a atrage neutrofilele în zona inflamației și este adesea evaluată pentru detectarea timpurie a leziunilor inflamatorii în regiunile care vin în contact cu eșantioanele de testare [216]. Implantarea subcutanată a materialelor (**PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp** și **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}**) nu a produs variații semnificative ale nivelurilor serice ale IL-8 ($32,34 \pm 0,33$, $27,96 \pm 4,23$ și $31,12 \pm 1,58$ pg/mL) în comparație cu grupul martor ($28,45 \pm 2,55$ pg/mL) la 7, 14, respectiv 21 de zile de la debutul experimentului, atestând posibilitatea utilizării lor în vindecarea rănilor. Aceeași tendință a fost observată și în cazul grupului experimental cu evaluarea capacității de vindecare a rănilor, unde concentrațiile IL-8 au fost de $26,51 \pm 4,32$, $25,79 \pm 2,31$, $24,59 \pm 2,75$, respectiv $27 \pm 04,77$ pg/mL la 5, 10, 15 și 20 de zile de la momentul realizării rănilor cutanate.

CAPITOLUL V. HIDROGELURI HIBRIDE ANTIBACTERIENE

V.1. Contextul cercetării

Polimerii sintetici sunt relativ ușor de sintetizat, chiar și la scară largă, prin procese specifice de obținere, permițând reacții de modificare care le asigură diversitate ulterioară în utilizare. Structura lor chimică, masa moleculară, proprietățile fizice și chimice (rezistența mecanică, biodegradabilitatea), reproductibilitatea, sunt aspecte de importanță majoră pentru aplicațiile biomedicale. Utilizarea polimerilor sintetici ca biomateriale este limitată de absența bioactivității acestora. Pe lângă avantajele deosebite pe care le prezintă polimerii naturali (bioactivitate, biodegradabilitate, biocompatibilitate), aceștia prezintă și dezavantaje (proprietăți mecanice slabe, nereproductibilitate). Aceste neajunsuri pot fi compensate prin utilizarea polimerilor sintetici. Prin combinarea proprietăților polimerilor sintetici și a celor naturali în *structuri hibride*, se pot genera sisteme cu proprietăți superioare celor două clase de polimeri utilizați [18,19].

Dintre numeroșii polimeri naturali disponibili, **dextranul** și **guma xantan** fac obiectul studiilor experimentale privind prepararea de hidrogeluri multicomponente hibride pe bază de polimeri naturali/sintetici utilizând tehnica îngheț–dezgheț, datorită caracteristicilor lor fizico-chimice și biofuncționale favorabile aplicațiilor în ingineria tisulară și medicina regenerativă.

Dextranul este o polizaharidă cu solubilitate ridicată în apă, produsă prin sinteza enzimatică a bacteriilor din genurile *Leuconostoc* și *Streptococcus*. Din punct de vedere chimic este compusă din unități repetitive de glucoză legate prin legături glicozidice α -(1→6). Structura sa polimerică, biocompatibilitatea, biodegradabilitatea și proprietățile sale hidrofile îl fac o alegere excelentă în aplicații ce vizează obținerea de pansamente cu hidrogel pentru răni [217,218].

Guma xantan este o heteropolizaharidă anionică obținută în procesul de fermentare al carbohidraților cu utilizarea bacteriilor *Xanthomonas campestris*. Din punct de vedere chimic este compusă din unitățile repetitive D-glucoză, D-manoză și acid D-acid glucuronic în raport molar de 3:3:2 [219]. Datorită caracterului hidrofil, bunei stabilități într-o gamă largă de pH-uri și temperaturi, prezenței grupărilor funcționale reactive (–OH, –COOH, –CH₂OH, –CH₃), guma xantan este utilizată în obținerea de hidrogeluri cu aplicații în ingineria tisulară a pielii [220].

Datele disponibile în literatură afirmă că dextranul prezintă o bioactivitate semnificativă prin stimularea răspunsurilor angiogene și facilitarea regenerării țesuturilor în procesul de

vindecare a rănilor [49,50]. Grupările funcționale carboxil încărcate negativ, prezente în guma xantan, pot provoca reduceri semnificative ale răspunsurilor inflamatorii și sunt eficiente în promovarea aderenței fibroblastelor [221,222]. Unele formulări pot deține proprietăți antibacteriene, care pot ajuta la prevenirea sau reducerea riscului de infecții [223].

V.2. Obiective științifice specifice:

- ↳ Prepararea de hidrogeluri multicomponente hibride cu incluziuni antibacteriene pe bază de PVA, PEBSA, dextran sau gumă xantan și Amx;
- ↳ Caracterizarea sistemelor pentru a obține informații cu privire la compoziția chimică, stabilitatea termică, morfologie, determinarea gradului de retenție al fluidelor biologice simulate, studii de degradare enzimatică *in vitro*, analiza cantitativă a principiului activ eliberat, evaluarea activității antibacteriene și studii *in vitro* pe culturi de fibroblaste dermice umane normale.

Amx este un antibiotic din clasa β -lactamelor, derivat al penicilinei cu o biodisponibilitate superioară și un spectru antibacterian extins. Prezintă eficacitate împotriva unei game variate de tulpini bacteriene Gram-pozitive și Gram-negative [224], incluzând *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*). Mecanismul antibacterian al Amx, menționat în literatura de specialitate, implică inhibarea sintezei peretelui celular bacterian [60].

V.4. Obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente hibride cu incluziuni antibacteriene

Scopul studiului a fost obținerea și caracterizarea unor hidrogeluri multicomponente hibride pe bază de PVA, PEBSA, dextran sau gumă xantan și Amx, utilizând tehnica îngheț-dezgheț, în vederea conferirii de proprietăți antibacteriene matricelor polimerice. Prin introducerea celor două polizaharide în sistemele polimerice pe bază de PVA₇₂₀₀₀_PEBSA, s-a urmărit dezvoltarea unor materiale hibride cu proprietăți avansate pentru aplicații în medicina regenerativă, precum: bioadezivitate crescută, morfologie controlată, capacitate ridicată de umflare și conformare eficientă la geometria plăgii. Totodată, s-a avut în vedere obținerea unei degradabilități controlate în mediul biologic, precum și asigurarea unei biocompatibilități optime în condiții *in vivo*.

V.4.1. Prepararea de hidrogeluri hibride antibacterine pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx

Obținerea hidrogelurilor hibride antibacterine pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx s-a realizat etapizat, prima etapă vizând obținerea rețelei PEBSA_Dextran_Amx (**Figura 5.11.**). Aceasta a fost obținută prin prepararea individuală a soluției de PEBSA (0,016 g/mL în 1,4-dioxan) cu Amx (0,03 g) și a soluției de dextran 10%, urmată de amestecarea celor două în raport volumetric PEBSA:polizaharidă de 1:3. Sistemele hibride s-au obținut prin adăugarea PVA₇₂₀₀₀ 4% și expunerea la 3 cicluri de îngheț-dezgheț, în vederea formării celei de-a doua rețele. Au rezultat 3 variante de hidrogeluri cu compoziții diferite, conform **Tabelului 5.5.** Probele au fost liofilizate (48 h la -55 °C, Alpha 1-2LD Plus, Martin Christ, Germania) și depozitate în exicator la temperatura camerei pentru studii suplimentare.

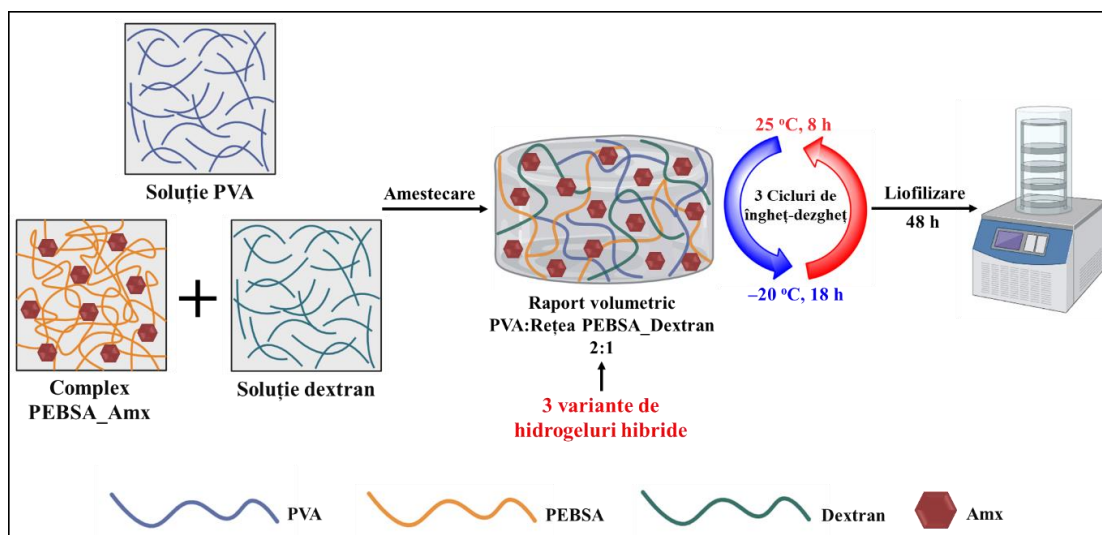


Figura 5.11. Reprezentarea schematizată a etapelor preparării hidrogelurilor hibride pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx.

Tabel 5.5. Compoziția sistemelor hibride pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx.

| Cod probă* | Raport volumetric PVA:Rețea PEBSA_Dextran | Compoziție sistem pentru un volum de 5 mL | | | |
|---|---|--|--------------|----------------|------------|
| | | PVA (g) | PEBSA (g) | Dextran (g) | Amx (g) |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _ Dextran_Amx | 2:1 | 0,132 | 0,016 | 0,1249 | 0,03 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _ Dextran_Amx | | | | | |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _ Dextran_Amx | | | | | |

* concentrație de 4% pentru soluția de PVA₇₂₀₀₀ și PEBSA, respectiv 10% pentru soluția de dextran

Datele de spectroscopie FTIR au confirmat prezența incluziunilor antibacteriene în structura hidrogelurilor hibride, precum și interacțiunile dintre componentele rețelelor polimerice. Analiza cantitativă a Amx eliberate a fost studiată pe spectrele ^1H RMN ale soluțiilor extrase la intervale de timp prestabilite (30 min., 1, 2, 4, 22, 46 și 94 h). Cuantificarea medicamentului eliberat a fost realizată prin comparație proporțională între semnalul de referință (TSP la $\delta = 0$ ppm) și un semnal selectat atribuit Amx (de exemplu, semnalul aril la $\delta = 7,35$ ppm), plecând de la premiza că într-un spectru de protoni, aria semnalelor este direct proporțională cu numărul de protoni prezenți în volumul probei [140] (**Figura 5.14. B**). Se poate observa că toate probele prezintă un profil de eliberare bifazic, caracterizat printr-o etapă inițială de eliberare rapidă în primele 120–240 de minute, urmată de un proces de eliberare gradual ce s-a extins până la 94 h.

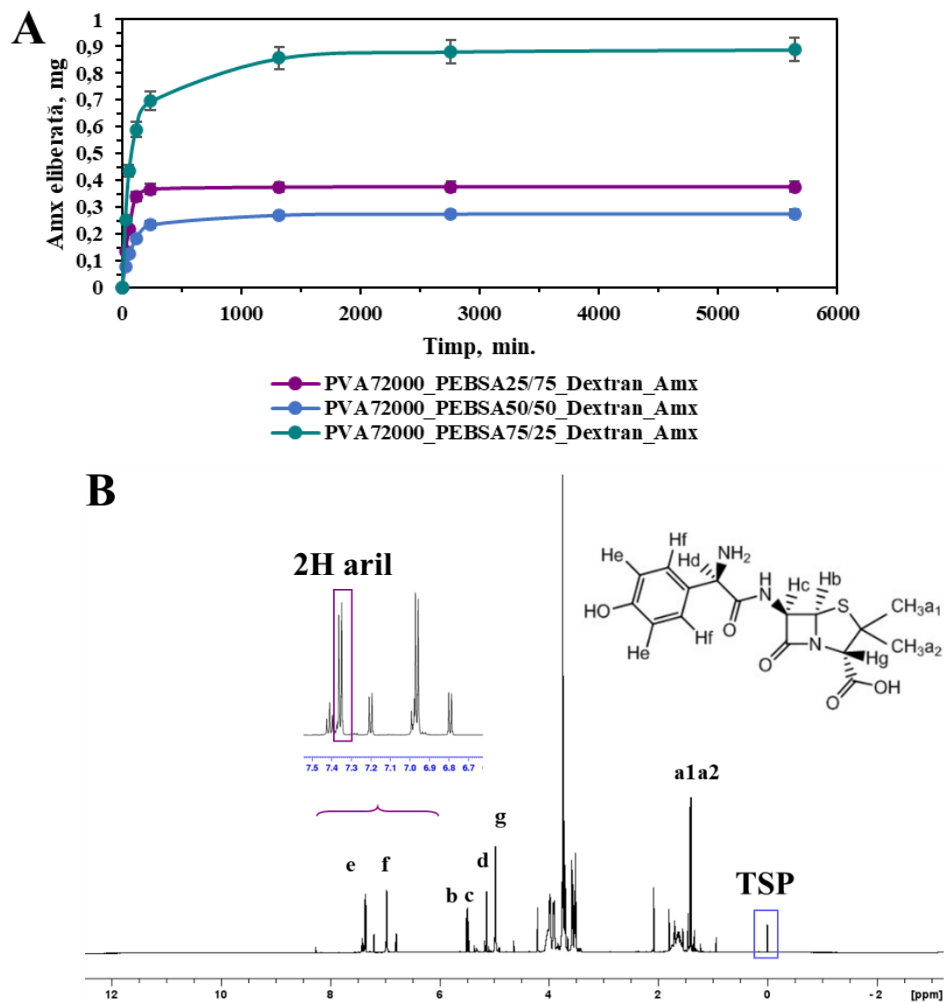


Figura 5.14. (A) Profilurile de eliberare ale Amx (mg) din hidrogelurile hibride pe bază de PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Dextran_Amx în soluții tampon fosfat salin pH = 7,4, de concentrație 0,01 M și (B) spectrul ^1H RMN @ 600 MHz sistemului PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Dextran_Amx.

Rezultatele testelor de activitate antibacteriană a hidrogelurilor hibride PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Dextran_Amx, evidențiate prin zonele de inhibiție asupra *S. aureus* (tulpină bacteriană Gram-pozitivă), *E. coli* (tulpină bacteriană Gram-negativă), *K. pneumoniae* (tulpină bacteriană Gram-negativă) și *E. faecalis* (tulpină bacteriană Gram-pozitivă) sunt prezentate în **Tabelul 5.7**. *E. coli* a indicat o sensibilitate ridicată la toate hidrogelurile hibride încărcate cu Amx, diametrul zonelor de inhibiție variind între $32,53 \pm 2,71$ mm (PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Dextran_Amx) și $34,86 \pm 2,65$ mm (PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx).

Tabel 5.7. Diametrul zonelor de inhibiție (mm) a sistemelor testate.

| Cod probă | Zona de inhibiție (mm)* | | | |
|---|-------------------------|------------------|----------------------|--------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>E. faecalis</i> |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _Dextran | – | – | – | – |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _Dextran | – | – | – | – |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _Dextran | – | – | – | – |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _Dextran_Amx | $24,03 \pm 1,36$ | $32,53 \pm 2,71$ | $17,90 \pm 2,60$ | – |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _Dextran_Amx | $23,23 \pm 1,01$ | $33,30 \pm 1,38$ | $20,13 \pm 1,09$ | – |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _Dextran_Amx | $23,66 \pm 0,81$ | $34,86 \pm 2,65$ | $19,80 \pm 1,83$ | – |

* Rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică ± abaterea standard a mediei; (–) probe care nu au prezentat activitate antibacteriană.

Figura 5.17. prezintă viabilitatea celulară, exprimată în raport cu absorbanta înregistrată în cultura martor. Prezența polizaharidei a contribuit la creșterea viabilității celulare comparativ cu matricele PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}, a căror viabilitate celulară a fost evaluată anterior și a fost de aproximativ 92%. De asemenea, viabilitatea celulară a fibroblastelor dermice umane normale în urma contactului cu sistemele PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx a depășit 100%, demonstrând că aceste materiale antibacteriene pot susține proliferarea celulară. Ulterior, celulele au fost analizate prin colorarea cu reactivul Calceină-AM, pentru a evalua influența materialelor asupra morfologiei celulare. Imaginile de microscopie, obținute cu obiectiv de 10×, evidențiază prezența celulelor viabile și confirmă rezultatele testului MTT (**Figura 5.18**). Celulele și-au menținut integritatea morfologică și au format un monostrat uniform. Mai mult, cultura celulară a prezentat o proliferare activă evidențiată prin fibroblaste cu morfologie fusiformă, caracteristică fibroblastelor dermice umane normale [241]. Aceste rezultate

demonstrează că hidrogelurile hibride antibacteriene **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx** sunt materiale citocompatibile și favorizează proliferarea celulară.

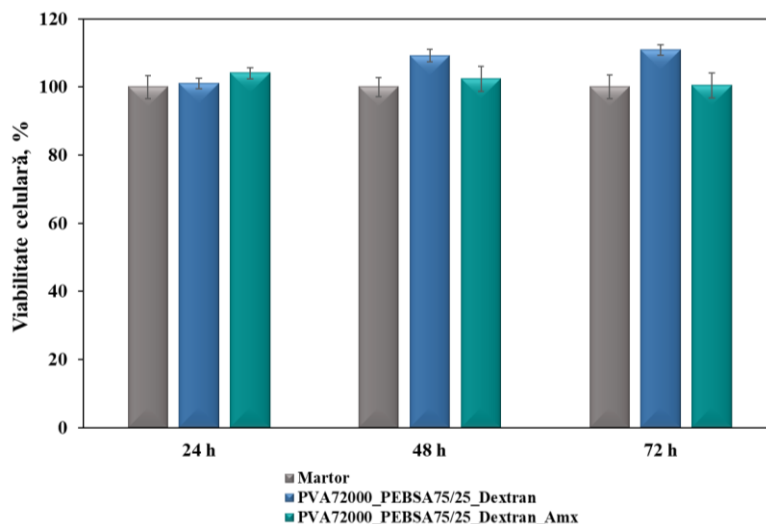


Figura 5.17. Viabilitatea celulară a fibroblastelor dermice umane normale în urma contactului cu probele PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran și PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx la 24, 48 și 72 h. Rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică ± abaterea standard a mediei.

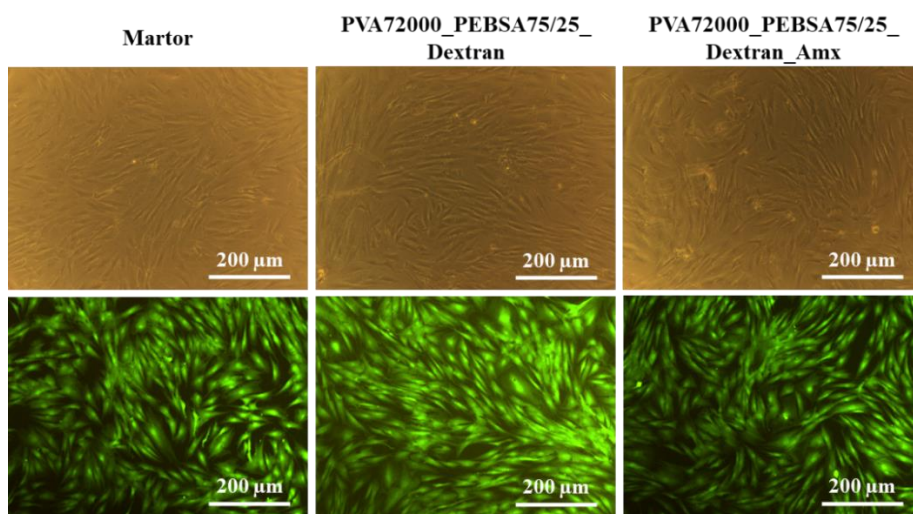


Figura 5.18. Morfologia fibroblastelor în contrast de fază și fluorescență la 72 h de contact cu probele PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran, respectiv PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx (10×).

V.4.4. Prepararea de hidrogeluri hibride antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Gumă xantan_Amx

S-a utilizat același protocol de obținere prezentat în subcapitolul *V.4.1. Prepararea de hidrogeluri hibride antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx.*

Tabel 5.8. Compoziția sistemelor hibride pe bază de PVA_PEBSA_Gumă xantan_Amx.

| Cod probă* | Raport volumetric PVA:Rețea PEBSA_Gumă xantan | Compoziție sistem pentru un volum de 5 mL | | | |
|---|--|--|--------------|-----------------------|------------|
| | | PVA (g) | PEBSA (g) | Gumă xantan (g) | Amx (g) |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _ Gumă xantan_Amx | | | | | |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _ Gumă xantan_Amx | 2:1 | 0,132 | 0,016 | 0,0124 | 0,03 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _ Gumă xantan_Amx | | | | | |

* concentrație de 4% pentru soluția de PVA₇₂₀₀₀ și PEBSA, respectiv 1% pentru soluția de gumă xantan

Pentru a descrie mecanismul de eliberare a Amx din hidrogelurile hibride PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Gumă xantan_Amx, datele experimentale au fost simulate după 4 modele matematice, modelul de ordin zero (8), modelul de ordin întâi (9), modelul Higuchi (10) și modelul Korsmeier–Peppas (6). Datorită unei mai bune potriviri ($R^2 > 0,9$), sunt prezentate doar rezultatele corespunzătoare modelelor Higuchi și Korsmeier–Peppas (**Figura 5.25.** și **Tabelul 5.9.**).

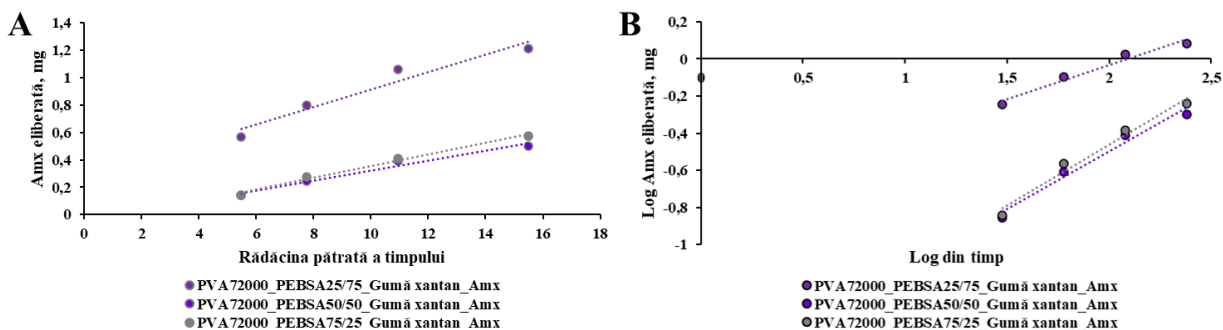


Figura 5.25. Cinetica de eliberare a Amx conform modelului (A) Higuchi și (B) Korsmeier–Peppas.

Tabel 5.9. Parametrii cinetici de eliberare a Amx.

| Cod probă | Higuchi | | Korsmeier–Peppas | | |
|---|---------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| | k | R ² | n | k _H | R ² |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{25/75} _ Gumă xantan_Amx | 0,0635 | 0,9408 | 0,3689 | 0,7705 | 0,9668 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{50/50} _ Gumă xantan_Amx | 0,0362 | 0,9767 | 0,6195 | 1,7373 | 0,9737 |
| PVA ₇₂₀₀₀ _PEBSA _{75/25} _ Gumă xantan_Amx | 0,0423 | 0,9898 | 0,3689 | 0,7705 | 0,9664 |

Sistemul PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Gumă xantan_Amx s-a corelat cu modelul cinetic Korsmeyer–Peppas. Valoarea exponentului de eliberare n , $< 0,5$ pentru această probă, a sugerat un mecanism quasi-Fickian influențat de procesele de relaxare ale polimerului. În cazul sistemelor PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Gumă xantan_Amx și PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan_Amx, cinetica de eliberare a Amx este descrisă de modelul Higuchi ($R^2 = 0,9767-0,9898$). Imaginile de microscopie în contrast de fază și fluorescență (Figura 5.29.) au evidențiat dinamica procesului de migrare celulară. În prezența probelor PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan_Amx, o închidere vizibilă a defectului celular a fost observată la 24 h de la debutul experimentului, fenomen constatat încă de la 6 h și menținut până la închiderea completă a ariei de zgâriere. Rezultatele obținute confirmă că hidrogelurile hibride antibacteriene nu doar că sunt citocompatibile, dar și favorizează procese esențiale pentru regenerarea tisulară, precum migrarea și proliferarea fibroblastelor.

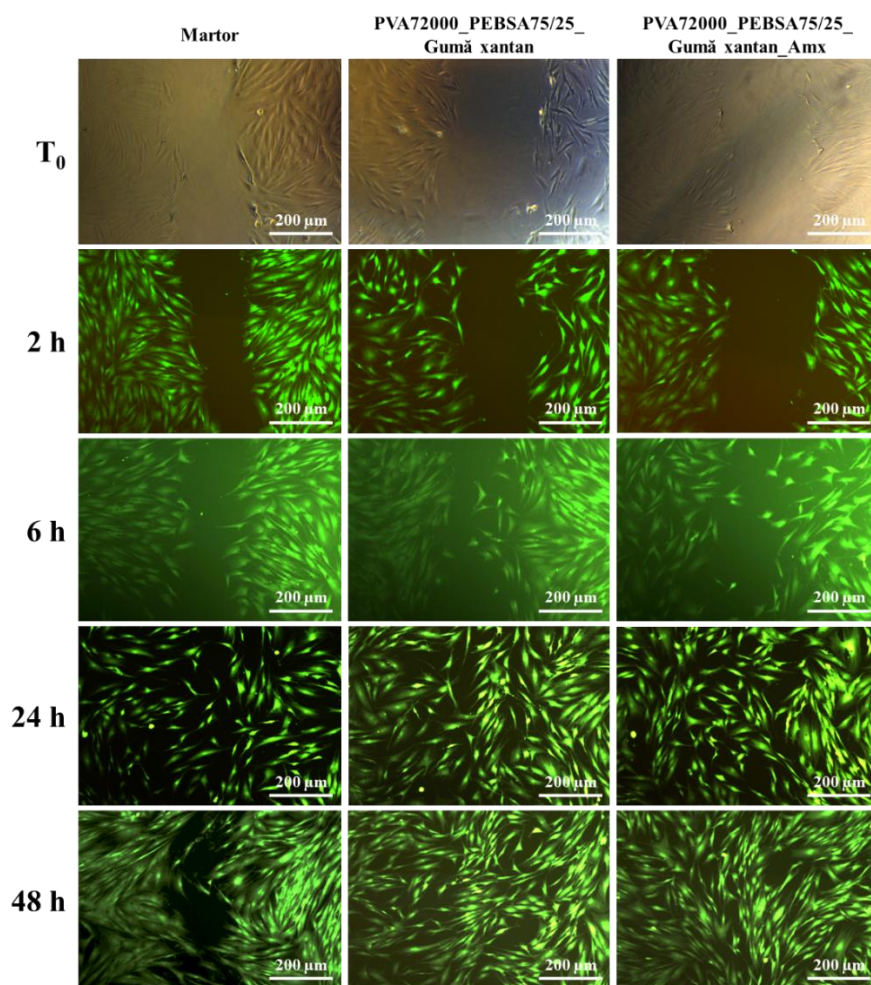


Figura 5.29. Evaluarea *in vitro* a influenței probelor PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan și PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan_Amx asupra capacității de migrare celulară (10×).

CAPITOLUL VI. CONCLUZII

Teza de doctorat intitulată „**Matrice polimerice complexe cu incluziuni antibacteriene**” și-a propus să aducă *contribuții originale în dezvoltarea unor noi structuri polimerice cu raport hidrofîl/hidrofob reglabîl, pe bază de polimeri sintetici și/sau naturali, capabile să îmbunătățească solubilitatea, stabilitatea și biodisponibilitatea agenților antibacterieni hidrofobi pentru aplicații cutanate.*

Obiectivele tezei de doctorat au fost orientate către trei direcții principale de cercetare:

- (i) obținerea și caracterizarea de hidrogeluri încărcate cu nanoparticule purtătoare de medicament pe bază de **PVA, PEB și NRF**;
- (ii) obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente cu incluziuni antibacteriene și antioxidante pe bază de **PVA, PEBSA, Thy și α -Tc**p;
- (iii) obținerea și caracterizarea de hidrogeluri multicomponente hibride cu incluziuni antibacteriene pe bază de **PVA, PEBSA, dextran sau gumă xantan și Amx**.

Studiile realizate au permis sistematizarea următoarelor concluzii:

Sinteza și caracterizarea fizico–chimică a homopolimerului PEB

- ↪ Au fost realizate 6 sinteze de homopolimeri utilizând procedeele de obținere în masă și în soluție (1,4-dioxan), în prezența 1-hexanolului ca inițiator și a 2 catalizatori organici, PTSA și TBD. În vederea caracterizării reacției de polimerizare a EB, s-au studiat 2 parametri importanți: conversia monomerului în homopolimer și distribuția masei moleculare.
- ↪ Sistemul 1-hexanol/TBD s-a evidențiat ca fiind cel mai eficient promotor al reacției de polimerizare cu deschidere de ciclu a EB, la un raport molar EB:TBD de 50:1.
- ↪ Analizele spectroscopice efectuate, FTIR și ¹H RMN, au confirmat structura chimică a homopolimerilor sintetizați.
- ↪ Investigațiile XRD au indicat un grad de cristalinitate de aproximativ 57,2%, iar dimensiunea medie a cristalitelor a fost estimată la 25,3 nm.
- ↪ Datele termogravimetrice au evidențiat o descompunere într-o singură etapă, cu maximul temperaturii de degradare termică (T_{peak}) la aproximativ 454 °C și o masă reziduală de 1,16%.

Studiul a demonstrat posibilitatea sintezei homopolimerului PEB prin metode sustenabile, obținându-se conversii de peste 70% în condiții blânde de reacție, procesul fiind adaptat cerințelor aplicațiilor biomedicale.

Sisteme de nanoparticule homopolimer-medicament pe bază de PEB

- ↳ Au fost obținute 4 tipuri de sisteme nanoparticulate pe baza de PEB prin metoda precipitării, NRF fiind încorporată *in situ* în matricea homopolimerică.
- ↳ Investigațiile DLS au evidențiat că diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor este influențat de distribuția maselor moleculare corespunzătoare homopolimerilor PEB, înregistrând dimensiuni în intervalul 190,6–290,7 nm.
- ↳ Eficiența încapsulării a fost determinată ca fiind de 35,98% pentru **PS₁₀₀-NRF**, 39,87% pentru **PS₁₅₀-NRF** și 44,84% pentru **PS₅₀-NRF**. Acest rezultat se explică prin afinitatea hidrofobă mai mare a homopolimerului **PEB₅₀_TBD** pentru încapsularea moleculelor de NRF.
- ↳ Microscopia STEM a evidențiat că nanoparticulele pe bază de PEB₅₀_TBD (**PS₅₀**) prezintă o morfologie favorabilă pentru utilizarea ca sisteme de eliberare a medicamentelor. Nanoparticulele **PS₅₀-NRF** au prezentat o structură de tip miez–coajă și un contrast semnificativ crescut datorită încărcării cu molecule de medicament.

Coroborarea rezultatelor obținute a permis selectarea variantei PEB₅₀_TBD, sintetizată prin polimerizare în soluție, pentru obținerea de nanopurtători capabili să încorporeze compuși bioactivi hidrofobi. Această alegere a fost susținută și de rezultatele studiilor de conversie, care au relevat un grad de transformare a monomerului în homopolimer de aproximativ 83% pentru această probă.

Hidrogeluri pe bază de PVA încărcate cu nanoparticule purtătoare de medicament

- ↳ Au fost obținute 3 hidrogeluri pe bază de PVA încărcate cu nanoparticule purtătoare de medicament, utilizând tehnica îngheț–dezgheț.
- ↳ Caracterizarea structurală prin spectroscopia FTIR a confirmat structura hidrogelurilor **PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF**. Deplasarea benzilor de absorbție confirmă implicarea grupărilor –OH, –NH– și –C=O în formarea de legături fizice intermoleculare.
- ↳ Imaginile SEM au pus în evidență formarea unor rețele poroase, bine definite cu pori interconectați, care se deosebesc prin densitatea, distribuția și dimensiunea acestora.

- ↳ Comportamentul la umflare al matricelor polimerice a fost dependent de raportul volumetric PVA:PS₅₀-NRF și de caracteristicile morfologice, atingând un maxim de 1160% pentru PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀_2:1.
- ↳ Cantitatea maximă de antibiotic eliberat pe parcursul a 48 h a fost de 37,83% (PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_3:1), 54,4% (PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_2:1) și 61,15% (PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀-NRF_1:1).

Studiul a confirmat potențialul sistemului PVA₁₄₅₀₀₀_PS₅₀ de a încorpora nanoparticule purtătoare de medicament și de a asigura eliberarea controlată a acestuia prin mecanism de difuzie în condiții *in vitro*.

Hidrogeluri antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy

- ↳ Au fost obținute 8 hidrogeluri cu raport hidrofil/hidrofob reglabil pe bază de PVA cu mase moleculare diferite, 72000 și 145000 g/mol, PEBSA cu rapoarte molare diferite dintre comonomerii EB:SA, 25:75, 50:50, respectiv 75:25 și Thy prin două abordări: (1) încorporarea de Thy *in situ* și (2) încorporarea de Thy prin absorbție în hidrogelurile preformate.
- ↳ Datele de spectroscopie FTIR au relevat că cea mai eficientă interacțiune cu Thy este observată în cazul sistemelor care conțin PEBSA_{25/75}, ca rezultat al legăturilor fizice intermoleculare care se formează între compusul bioactiv și grupările funcționale carbonil din SA.
- ↳ Prin analiza termogravimetrică s-a constatat că încorporarea de Thy *in situ* conduce la o creștere a stabilității termice.
- ↳ Caracterizarea morfologică prin microscopia SEM a evidențiat o distribuție relativ uniformă a compusului bioactiv atât în interiorul matricei polimerice, cât și în spațiile porilor, în cazul hidrogelurilor încărcate prin absorbție. Procesul de umflare în soluția de 1,4-dioxan cu Thy a determinat relaxarea rețelei și extinderea porilor, facilitând astfel absorbția completă a moleculelor de Thy.
- ↳ Eliberarea Thy din hidrogeluri a fost descrisă de o viteză rapidă în primele minute, urmată de un proces de eliberare gradual ce s-a extins până la 11–12 h în cazul sistemelor pe bază de PVA_PEBSA_{25/75}. Datele au sugerat un mecanism de difuzie quasi-Fickian și o bună potrivire cu modelul Korsmeyer–Peppas.

- ↳ Toate sistemele PVA_PEBSA_Thy, indiferent de modul de încorporare a compusului bioactiv au prezentat activitate antibacteriană împotriva dezvoltării *S. aureus* (tulpină bacteriană Gram-pozitivă), *E. coli* (tulpină bacteriană Gram-negativă) și *C. albicans* (tulpină fungică).

Rezultatele obținute sugerează că hidrogelurile PVA_PEBSA_{25/75}_Thy prezintă caracteristici favorabile pentru a fi utilizate ca materiale destinate tratării rănilor.

Hidrogeluri antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Thy_α-Tcp

- ↳ Au fost obținute 8 hidrogeluri cu raport hidrofil/hidrofob reglabil pe bază de PVA, PEBSA, Thy și α-Tcp prin tehnica îngheț-dezghet. Suplimentarea sistemului PVA_PEBSA_Thy cu α-Tcp a vizat un efect sinergic între cei 2 compuși bioactivi.
- ↳ Spectroscopia FTIR a confirmat structura hidrogelurilor multicomponente antibacteriene PVA_PEBSA_Thy_α-Tcp.
- ↳ Morfologia sistemelor PVA_PEBSA_Thy_α-Tcp a evidențiat o distribuție relativ uniformă a compușilor bioactivi Thy_α-Tcp pe suprafața rețelei polimerice. Acest aspect s-a datorat compatibilității dintre copolimerul amfifil PEBSA și compușii bioactivi hidrofobi.
- ↳ Investigațiile AFM au demonstrat că sistemele PVA_PEBSA prezintă valori ai parametrilor de rugozitate adecvate pentru utilizarea hidrogelurilor polimerice în aplicații ce vizează eliberarea controlată de principii active.
- ↳ Conform determinărilor unghiului de contact este posibilă modificarea caracterului hidrofil/hidrofob prin ajustarea rapoartelor dintre partenerii de amestec, mai ales a raportului molar dintre comonomeri EB:SA.
- ↳ Profilurile de eliberare cumulativă a Thy_α-Tcp au confirmat capacitatea sistemului PVA_PEBSA de a încorpora și elibera controlat și susținut compușii bioactivi în condiții fiziologice simulate.
- ↳ Toate sistemele PVA_PEBSA_Thy_α-Tcp au prezentat efect bacteriostatic împotriva dezvoltării *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*.
- ↳ Activitatea antioxidantă cumulativă a Thy și α-Tcp în asociere cu PEBSA produce un efect sinergetic notabil, între 93,2% (PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Thy_α-Tcp) și 97,1% (PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp).

- ↳ Testele de citotoxicitate *in vitro* pe linia celulară BALB/3T3 clona A31 indică absența citotoxicității materialelor antibacteriene, valorile viabilității celulare fiind mai mari de 90% după 72 h de contact.
- ↳ Studiul privind evaluarea biocompatibilității *in vivo* prin implantare subcutanată la șobolanii Wistar a confirmat biocompatibilitatea materialelor testate, integrarea cu țesutul gazdă și absența unei reacții inflamatorii.
- ↳ Hidrogelurile antibacteriene **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp** au contribuit în mod semnificativ la reducerea dimensiunilor rănilor create la șobolanii Wistar. La 20 de zile de tratament, s-a constatat vindecarea aproape completă a rănilor (99,36%).

Rezultatele obținute susțin potențialul sistemelor PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp pentru utilizarea în dezvoltarea de pansamente și aplicații în ingineria tisulară.

Hidrogeluri hibride antibacterine pe bază de PVA_PEBSA_Dextran_Amx

- ↳ Au fost obținute 3 hidrogeluri hibride antibacteriene cu dublă rețea pe bază de PVA, PEBSA, dextran și Amx prin tehnica îngheț–dezgheț.
- ↳ Spectrele FTIR ale sistemelor **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Dextran_Amx** au evidențiat interacțiunea dintre partenerii de amestec și formarea legăturilor fizice intermoleculare.
- ↳ Imaginile SEM au confirmat încapsularea Amx în matricea polimerică. Acest aspect s-a datorat afinității hidrofobe dintre copolimerul amfifil PEBSA și antibiotic.
- ↳ Testele de degradare enzimatică *in vitro* au dovedit rezistența hidrogelurilor martor la acțiunea lipazei, acestea fiind capabile de a-și păstra integritatea rețelei polimerice până la 28 de zile. S-a înregistrat o pierdere maximă de masă cuprinsă între 65% (**PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Dextran**) și 70% (**PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Dextran**).
- ↳ Eliberarea Amx din hidrogelurile hibride **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Dextran_Amx** a prezentat o etapă inițială de eliberare rapidă în primele 120–240 de minute, urmată de un proces de eliberare gradual ce s-a extins până la 94 h.
- ↳ Parametrii cinetici de eliberare a Amx au indicat o bună potrivire a tuturor sistemelor cu modelul Korsmeyer–Peppas. Valorile exponentului de eliberare pentru sistemele **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Dextran_Amx** și **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx** au sugerat un mecanism de eliberare predominant Fickian, în care contribuția proceselor precum eroziunea sau relaxarea polimerului este neglijabilă. Pentru proba **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Dextran_Amx**, datele au indicat un mecanism de eliberare mai

complex, în care procesul de difuzie este însoțit de modificări structurale ale rețelei polimerice, specifice relaxării lanțurilor macromoleculare.

- ↳ Sistemele hibride **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Dextran_Amx** au manifestat o activitate antibacteriană notabilă împotriva dezvoltării tulpinilor *E. coli*, diametrul zonelor de inhibiție variind între $32,53 \pm 2,71$ mm (**PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Dextran_Amx**) și $34,86 \pm 2,65$ mm (**PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx**).
- ↳ Evaluările de citotoxicitate au confirmat citocompatibilitatea materialelor testate în contact cu fibroblastele dermice umane normale, fără a înregistra efecte negative asupra atașării sau proliferării celulare.
- ↳ Testul *in vitro* de migrare celulară a demonstrat capacitatea hidrogelurilor hibride antibacteriene **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx** de a stimula proliferarea și migrarea celulară, reducând semnificativ timpul necesar pentru închiderea defectului celular.

Rezultatele obținute confirmă potențialul hidrogelurilor hibride PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx ca sisteme eficiente pentru eliberarea controlată de substanțe bioactive, evidențiind totodată perspectiva aplicativă în regenerarea tisulară.

Hidrogeluri hibride antibacteriene pe bază de PVA_PEBSA_Gumă xantan_Amx

- ↳ Au fost obținute 3 hidrogeluri hibride cu dublă rețea pe bază de PVA₇₂₀₀₀ și PEBSA_Gumă xantan_Amx, utilizând tehnica îngheț-dezgheț.
- ↳ Datele de spectroscopie FTIR au confirmat prezența incluziunilor antibacteriene în structura hidrogelurilor hibride, precum și interacțiunile dintre componentele rețelelor polimerice.
- ↳ Microstructura hidrogelurilor **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Gumă xantan_Amx** a confirmat prezența antibioticului în matricea polimerică. Au fost observate diferite forme de microcristale ale pudrei de Amx ce se identifică sub formă de aglomerări.
- ↳ Testele de degradare enzimatică *in vitro* au evidențiat o bună stabilitate a hidrogelurilor martor la acțiunea lipazei, acestea menținându-și integritatea structurală până la 28 de zile. Pierderea de masă a variat între 43% (**PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Gumă xantan**) și 62% (**PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Gumă xantan**).
- ↳ A fost demonstrat potențialul matricelor **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Gumă xantan** de a îngloba și elibera Amx prin difuzie în condiții *in vitro*, pe parcursul a 94 h. Profilurile de eliberare

se conformează cel mai bine cu modelul cinetic descris de Korsmeyer–Peppas în cazul sistemului **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Gumă xantan_Amx** și de Higuchi în cazul sistemelor **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{50/50}_Gumă xantan_Amx** și **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan_Amx**.

- ↳ Sistemele hibride **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_Gumă xantan_Amx** au prezentat efect bacteriostatic împotriva dezvoltării tulpinilor *S. aureus*, *E. coli* și *K. pneumoniae*.
- ↳ Testele de citotoxicitate *in vitro* au demonstrat citocompatibilitatea materialelor testate asupra fibroblastelor dermice umane normale, iar studiul *in vitro* de migrare celulară a evidențiat potențialul hidrogelurilor hibride antibacteriene **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan_Amx** de a favoriza procesul de reepitelizare prin promovarea simultană a proliferării și migrării celulare.

Coroborarea rezultatelor obținute susțin utilizarea hidrogelurilor hibride antibacteriene PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan_Amx ca sisteme eficiente de eliberare controlată a medicamentelor în aplicații de inginerie tisulară, prin asigurarea unei disponibilități prelungite a substanței bioactive pe termen lung.

PERSPECTIVE

Ca perspective, direcțiile de cercetare-dezvoltare din cadrul tezei de doctorat vor fi extinse și vor viza:

- simularea transferului transdermal al substanțelor bioactive utilizând un sistem de difuzie verticală cu celule Franz, în vederea caracterizării profilului de eliberare și a permeabilității prin bariera cutanată;
- studii *in vivo* pentru evaluarea biocompatibilității hidrogelurilor hibride antibacteriene **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Dextran_Amx** și **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{75/25}_Gumă xantan_Amx**, prin analiza toxicității locale și sistemice, a răspunsului inflamator și imunologic, a integrării tisulare, precum și a degradării și resorbției materialului, utilizând modele experimentale animale, analize histopatologice ale țesuturilor adiacente și teste de biocompatibilitate, în vederea validării siguranței și eficacității acestora pentru vindecarea rănilor cutanate;
- studii aprofundate privind testarea activității antibacteriene a hidrogelurilor **PVA₇₂₀₀₀_PEBSA_{25/75}_Thy_α-Tcp** pe modele experimentale de plăgi infectate, cu

monitorizarea evoluției procesului de vindecare, inclusiv remisiunea inflamației și reducerea timpului necesar regenerării tisulare.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] Zhao C, Zhou L, Chiao M, et al. Antibacterial hydrogel coating: Strategies in surface chemistry. *Advances in Colloid and Interface Science* 2020;285:102280. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102280>.
- [2] Chen F-M, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* 2016;53:86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>.
- [3] Kurakula M, Rao GK, Kiran V, et al. Alginate-based hydrogel systems for drug releasing in wound healing. *Alginates in Drug Delivery*, Elsevier; 2020, p. 323–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817640-5.00013-3>.
- [4] Xiong S, Li R, Ye S, et al. Vanillin enhances the antibacterial and antioxidant properties of polyvinyl alcohol-chitosan hydrogel dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* 2022;220:109–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.052>.
- [5] Qi L, Zhang C, Wang B, et al. Progress in Hydrogels for Skin Wound Repair. *Macromolecular Bioscience* 2022;22:2100475. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100475>.
- [6] Adelnia H, Ensandoost R, Shebbrin Moonshi S, et al. Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future. *European Polymer Journal* 2022;164:110974. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110974>.
- [7] Plugariu I-A, Bercea M, Gradinaru LM, et al. Poly(vinyl alcohol)/Pullulan Composite Hydrogels as a Potential Platform for Wound Dressing Applications. *Gels* 2023;9:580. <https://doi.org/10.3390/gels9070580>.
- [8] Bercea M. Recent Advances in Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels. *Polymers* 2024;16:2021. <https://doi.org/10.3390/polym16142021>.
- [9] Gonnet M, Lethuaut L, Boury F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release* 2010;146:276–90. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.037>.
- [19] González-Henríquez C, Sarabia-Vallejos M, Rodríguez-Hernández J. Advances in the Fabrication of Antimicrobial Hydrogels for Biomedical Applications. *Materials* 2017;10:232. <https://doi.org/10.3390/ma10030232>.
- [37] Fernández J, Amestoy H, Sardon H, et al. Effect of molecular weight on the physical properties of poly(ethylene brassylate) homopolymers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2016;64:209–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.07.031>.
- [41] Slomkowski S, Basinska T, Gadzinowski M, et al. Polyesters and Polyester Nano- and Microcarriers for Drug Delivery. *Polymers* 2024;16:2503. <https://doi.org/10.3390/polym16172503>.

- [42] Chiriac AP, Rusu AG, Nita LE, et al. Synthesis of Poly(Ethylene Brassylate-Co-squaric Acid) as Potential Essential Oil Carrier. *Pharmaceutics* 2021;13:477. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040477>.
- [105] Ehterami A, Salehi M, Farzamfar S, et al. Chitosan/alginate hydrogels containing Alpha-tocopherol for wound healing in rat model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2019;51:204–13. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.032>.
- [155] Pascual A, Sardon H, Veloso A, et al. Organocatalyzed Synthesis of Aliphatic Polyesters from Ethylene Brassylate: A Cheap and Renewable Macrolactone. *ACS Macro Lett* 2014;3:849–53. <https://doi.org/10.1021/mz500401u>.
- [158] Pascual A, Sardón H, Ruipérez F, et al. Experimental and computational studies of ring-opening polymerization of ethylene brassylate macrolactone and copolymerization with ϵ -caprolactone and TBD-guanidine organic catalyst. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2015;53:552–61. <https://doi.org/10.1002/pola.27473>.
- [171] Stoica AE, Chircov C, Grumezescu AM. Hydrogel Dressings for the Treatment of Burn Wounds: An Up-To-Date Overview. *Materials* 2020;13:2853. <https://doi.org/10.3390/ma13122853>.
- [186] **Crețu B-E-B**, Nita LE, Șerban A-M, et al. New Cryogels Based on Poly(vinyl alcohol) and a Copolymacrolactone System: I-Synthesis and Characterization. *Nanomaterials* 2022;12:2420. <https://doi.org/10.3390/nano12142420>.
- [187] Nita LE, **Crețu B-E-B**, Șerban A-M, et al. New cryogels based on poly (vinyl alcohol) and a copolymacrolactone system. II. Antibacterial properties of the network embedded with thymol bioactive agent. *Reactive and Functional Polymers* 2023;182:105461. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105461>.
- [195] **Crețu B-E-B**, Rusu AG, Ghilan A, et al. Cryogel System Based on Poly(vinyl Alcohol)/Poly(ethylene Brassylate-co-Squaric Acid) Platform with Dual Bioactive Activity. *Gels* 2023;9:174. <https://doi.org/10.3390/gels9030174>.
- [220] Alves A, Miguel SP, Araujo ARTS, et al. Xanthan Gum–Konjac Glucomannan Blend Hydrogel for Wound Healing. *Polymers* 2020;12:99. <https://doi.org/10.3390/polym12010099>.
- [211] **Crețu B-E-B**, Dodi G, Gardikiotis I, et al. Bioactive Composite Cryogels Based on Poly (Vinyl Alcohol) and a Polymacrolactone as Tissue Engineering Scaffolds: In Vitro and In Vivo Studies. *Pharmaceutics* 2023;15:2730. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122730>.
- [223] Bernal-Chávez SA, Alcalá-Alcalá S, Tapia-Guerrero YS, et al. Cross-linked polyvinyl alcohol-xanthan gum hydrogel fabricated by freeze/thaw technique for potential application in soft tissue engineering. *RSC Adv* 2022;12:21713–24. <https://doi.org/10.1039/D2RA02295H>.
- [224] Wang S, Wang Z, Xu C, et al. PEG- α -CD/AM/liposome @amoxicillin double network hydrogel wound dressing—Multiple barriers for long-term drug release. *J Biomater Appl* 2021;35:1085–95. <https://doi.org/10.1177/0885328221991948>.

ANEXA 1. DISEMINAREA REZULTATELOR ȘI ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

Rezultatele originale obținute în cadrul tezei de doctorat constituie subiectul a cinci articole științifice publicate, a trei comunicări și a trei postere:

Articole științifice publicate în jurnale indexate ISI

1. **B.-E.-B. Cretu**, A.G. Rusu, D. Timpu, L.E. Nita. Sustainable pathways for poly(ethylene brassylate) synthesis. *Revue Roumaine de Chimie* **2025**, 70(7–8), 483–492, [DOI: 10.33224/rrch.2025.70.7-8.12](https://doi.org/10.33224/rrch.2025.70.7-8.12) (FI 0,6; Q4).
2. **B.-E.-B. Cretu**, G. Dodi, I. Gardikiotis, V. Balan, I. Nacu, I. Stoica, E. Stoleru, A.G. Rusu, A. Ghilan, L.E. Nita, A.P. Chiriac. Bioactive Composite Cryogels Based on Poly (Vinyl Alcohol) and a Polymacrolactone as Tissue Engineering Scaffolds: In Vitro and In Vivo Studies. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2730, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122730> (FI 4,9; Q1).
3. **B.-E.-B. Cretu**, A.G. Rusu, A. Ghilan, I. Rosca, L.E. Nita, A.P. Chiriac. Cryogel System Based on Poly(vinyl alcohol)/Poly(ethylene brassylate-co-squaric acid) Platform with Dual Bioactive Activity. *Gels* **2023**, 9, 174, <https://doi.org/10.3390/gels9030174> (FI 5,0; Q1).
4. L.E. Nita, **B.-E.-B. Cretu**, A.-M. Șerban, A.G. Rusu, I. Rosca, D. Pamfil, A.P. Chiriac. New Cryogels Based on Poly (Vinyl Alcohol) and a Copolymacrolactone System. II. Antibacterial Properties of the Network Embedded with Thymol Bioactive Agent. *Reactive and Functional Polymers* **2023**, 182, 105461, <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105461> (FI 4,5; Q1).
5. **B.-E.-B. Cretu**, L.E. Nita, A.-M. Serban, A.G. Rusu, F. Doroftei, A.P. Chiriac. New Cryogels Based on Poly(vinyl alcohol) and a Copolymacrolactone System: I-Synthesis and Characterization. *Nanomaterials* **2022**, 12, 2420, <https://doi.org/10.3390/nano12142420> (FI 5,3; Q2).

Comunicări la manifestări științifice

1. Andrei-Alexandru IVU, **Bianca-Elena-Beatrice CRETU**, Alina Gabriela RUSU, Loredana E. NITA, „Ring-opening polymerization of renewable macrolactones for

- biodegradable polyester nanoparticles*”, International Workshop on Multifunctional Polymer Composites for Advanced Applications, **26 Martie 2026**, Zabrze, Polonia.
2. **Bianca-Elena-Beatrice Cretu**, Gianina Dodi, Ioannis Gardikiotis, Vera Balan, Alina Gabriela Rusu, Alina Ghilan, Loredana Elena Nita, Aurica P. Chiriac, „*Complex polymeric matrices with antibacterial and antioxidant inclusions*”, Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering NanoBioMat 2024 – Summer Edition, **19-21 Iunie 2024**.
 3. **Bianca-Elena-Beatrice Cretu**, Alina G. Rusu, Mariana Cristea, Alina Ghilan, Loredana E. Nita, Aurica P. Chiriac, „*Cryogels based on poly(vinyl alcohol) and a copolymacrolactone system*”, Spring School for Young Researchers „NEW TRENDS in EXPERIMENTAL MECHANICS – NTEM 1”, **13-17 Mai 2024**, Zakopane, Polonia.

Prezentări poster

1. **Bianca-Elena-Beatrice Cretu**, Alina Gabriela Rusu, Loredana Elena Nita, „*Eco-friendly synthesis of poly(ethylene brassylate) as potential hydrophobic drug carrier*”, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași „Pregătim viitorul promovând excelența”, Ediția a XXXV-a, **27 Februarie-01 Martie 2025**, Iași, România.
2. **Bianca-Elena-Beatrice Cretu**, Vera Balan, Irina Rosca, Alexandru M. Serban, Alina Gabriela Rusu, Loredana Elena Nita, „*Hybrid cryogels as dermal drug delivery systems*”, 5th Edition OPEN DOOR TO THE FUTURE – Scientific Communications of Young Researchers, MacroYouth 2024, **15 Noiembrie 2024**, Iași, România.
3. **Bianca-Elena-Beatrice Cretu**, Alina Gabriela Rusu, Alina Ghilan, Isabella Nacu, Irina Rosca, Daniela Pamfil, Loredana Elena Nita, „*Poly(vinyl alcohol) and copolymacrolactone bioactive complex-based cryogels as promising wound dressings*”, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași „Pregătim viitorul promovând excelența”, Ediția a XXXIV-a, **29 Februarie-03 Martie 2024**, Iași, România.

Activitatea științifică conexă cu subiectul tezei de doctorat s-a concretizat prin trei articole științifice publicate, o carte aflată în curs de publicare, o cerere de brevet, două comunicări și cinci postere:

Articole științifice publicate în jurnale indexate ISI

1. S. Sandu, G. Dodi, I. Gardikiotis, **B.-E.-B. Cretu**, A. Luca, F. D. Cojocaru, L. Verestiuc, S.-A. Pasca, V. Balan. Co-encapsulated fluorescent magnetic nanoparticles for potential applications in breast cancer therapy: Exploratory in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics* **2026**, 695, 126808, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2026.126808> (FI 5,2; Q1).
2. A.G. Rusu, L.E. Niță, I. Roșca, A. Croitoriu, A. Ghilan, L. Mititelu-Tarțau, A.V. Grigoraș, **B.-E.-B. Cretu**, A.P. Chiriac. Alginate-Based Hydrogels Enriched with Lavender Essential Oil: Evaluation of Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and In Vivo Biocompatibility. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2608, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112608> (FI 4,9; Q1).
3. G. Dodi, R.E. Sabau, **B.-E.-B. Cretu**, I. Gardikiotis. Exploring the Antioxidant Potential of Gellan and Guar Gums in Wound Healing. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2152, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082152> (FI 4,9; Q1).

Carte

1. Gianina Dodi, **Bianca-Elena-Beatrice Cretu**, Alexandra E. Avanu, „*Biocompatibilitatea dispozitivelor medicale: abordare multidisciplinară*”, Editura „Gr. T. Popa”, **2026** (în curs de publicare).

Cerere de brevet

1. A.P. Chiriac, I. Neamțu, L.E. Niță, A.G. Rusu, A. Croitoriu, A.M. Șerban, **B.E.B. Cretu**, A. Ghilan, „*Procedeu de fabricare a unui hidrogel hibrid pe bază de polimer sintetic/agaroză*”, A/00419/2023.

Comunicări la manifestări științifice

1. **B.-E.-B. Cretu**, K. Tadevosyan, A. Raya, G. Dodi, „*Magnetic nanosystems interactions*

with human induced pluripotent stem cells”, COST Action CA17140 (NANO2CLINIC), 2nd CA17140 STSM Virtual Conference, **23 Februarie 2023**.

2. V. Balan, S. Sandu, F.D. Cojocaru, A. Luca, G. Dodi, **B.E. Cretu**, L. Verestiuc, „*Co-encapsulated magnetic nanostructures based on functionalized chitosan for theranostic applications*”, 9th International Conference „Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BIOMMEDD’2022, **20-22 Iulie 2022**, București, România.

Prezentări poster

1. Alexandru-Mihail Serban, **Bianca-Elena-Beatrice Cretu**, Alina Gabriela Rusu, Alina Ghilan, Irina Rosca, Loredana Elena Nita, „*Development and characterization of levofloxacin-loaded vitamin A-polymacrolactone nanoemulsions as potential ophthalmic drug delivery systems*”, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași „Pregătim viitorul promovând excelența”, Ediția a XXXV-a, **27 Februarie-01 Martie 2025**, Iași, România.
2. Vera Bălan, Ștefan Sandu, Vlad-Constantin Ursachi, **Bianca Elena Beatrice Cretu**, Florina Daniela Cojocaru, Gianina Dodi, Ioannis Gardikiotis, Andreea Luca, Liliana Vereștiuc, „*Biofunctionalized magnetic nanostructures based on biotinylated N-palmitoyl chitosan and magnetite for breast cancer applications: in vitro and in vivo studies*”, 14th Romanian-Jordanian Congress of Medicine and Pharmacy (CORIMF 2024), **27 Septembrie-04 Octombrie 2024**, Iași, România.
3. Alina Gabriela Rusu, Aurica P. Chiriac, Loredana Elena Nita, Alina Ghilan, Alexandra Croitoriu, **Bianca Elena Beatrice Cretu**, Alexandru Mihail Serban, Alexandra Bargan, Florica Doroftei, „*Design of agarose-based aerogels with potential application as wound dressings*”, COST Action CA18125 (AERoGELS), 3rd International Conference Aerogels for Biomedical and Environmental Applications, **5-7 Iulie 2023**, Maribor, Slovenia.
4. G. Dodi, **B.E.B. Cretu**, F. Cojocaru, A.E. Avanu, I. Gardikiotis, „*Fabrication and evaluation of carboxymethyl guar gum based composites as wound healing dressings*”, 30th Young Research Fellows Meeting (YRFM), **1-3 Februarie 2023**, Paris, Franța.
5. V. Balan, V.C. Ursachi, F.D. Cojocaru, G. Dodi, C.T. Mihai, **B.E. Cretu**, L. Verestiuc, „*Design and preliminary in vitro evaluation of magnetic nanoparticles based on*

biotinylated N-palmitoyl chitosan for breast cancer applications”, 19th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN22), **5-8 Iulie 2022**, Salonic, Grecia.

Stagiu de cercetare

1. Short Term Scientific Mission (STSM) a Acțiunii COST CA18125 „Advanced Engineering and Research of aeroGels for Environment and Life Sciences (AERoGELS)”, Institutul de Științe și Tehnologii Chimice „Giulio Natta” al Consiliului Național de Cercetare (SCITEC-CNR), **09-14 Octombrie 2023**, Milano, Italia.

Participări la școli tematice

1. Școală de primăvară pentru tineri cercetători „NEW TRENDS in EXPERIMENTAL MECHANICS – NTEM 1”, organizată de Societatea Europeană de Mecanică Experimentală (EuraSEM) și Institutul de Cercetare Tehnologică Fundamentală (IPPT PAN), **13-17 Mai 2024**, Zakopane, Polonia.

Proiecte de cercetare

1. „Advanced and scalable multicomponent thermosensitive hydrogels for diabetic wound healing” – PN-IV-P7-7.1-PED-2024-1788.
2. „Hybrid bio-systems enriched with biotechnological extracted oils and applicability in skin tissue engineering” – PN-III-P2-2.1-PED-2021-2229.
3. „Co-encapsulated magnetic nanocarriers for theranostic applications in breast cancer: *in vivo* and *in vitro* studies” – PN-III-P1-1.1.-TE-2019-1671.