

**ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ “PETRU PONI” IAȘI**

Materiale compozite bio-inspirate cu aplicații biomedicale și în protecția mediului

Rezumatul tezei de doctorat

**Conducător Științific
Dr. Habil. Marcela MIHAI**

**Doctorand
BioIng. Ana-Lavinia MATRICALA (căs. VASILIU)**

2021

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI"
Aleea Gr. Ghica Vodă, 41A, 700487, Iași, România

Nr. 4248 / 16.08.2021

Doamnei/Domnului _____

Vă facem cunoscut că la data de **17.09.2021**, la ora **12:00**, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat cu titlul „*Materiale compozite bio-inspirate cu aplicații biomedicale și în protecția mediului*” autor **Ana-Lavinia MATRICALA (căs. VASILIU)**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

PREȘEDINTE:

Dr. Valeria HARABAGIU, Cercetător Științific I
Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni”, Iași

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Dr. Habil. Marcela MIHAI, Cercetător Științific II
Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni”, Iași

REFERENȚI:

Acad. Bogdan C. SIMIONESCU, Cercetător Științific I
Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni”, Iași

Prof. univ. Dr. Carmen TEODOSIU
Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Prof. univ. Dr. Anca DUȚĂ
Universitatea Transilvania din Brașov

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica în scris aprecierile și observațiile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

DIRECTOR,

Dr. Valeria Harabagiu



MULȚUMIRI

Această teză de doctorat nu s-ar fi putut realiza fără contribuția și îndrumarea unor oameni de excepție cărora doresc să le mulțumesc pe această cale.

*În primul rând vreau să îi mulțumesc doamnei **Dr. Habil. Marcela Mihai** pentru onoarea de a deveni primul doctorand al dumneaei și pentru încredere. Îi mulțumesc în mod deosebit pentru tot efortul depus pe parcursul acestor ani de a îmi călăuzi pașii în domeniul cercetării, pentru răbdarea și atenția oferite, dar și pentru ocazia de a lucra în cadrul unei echipe de cercetare competente.*

*Doresc să le mulțumesc **colegilor** din cadrul **Laboratorului de Polimeri Funcționali „Mihai Dima”** pentru bunăvoința de a împărtăși din cunoștințe, pentru sfaturi și explicații.*

*Mulțumesc **comisiei de îndrumare a tezei**, alcătuită din **Dr. Ștefania Racoviță, Dr. Florica Doroftei și Dr. Florin Bucatariu**, pentru valoroasele sugestii și discuții.*

*Mulțumesc **colegilor din Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** care m-au încurajat și mi-au permis să prioritizez finalizarea tezei de doctorat.*

*Mulțumesc doamnei **Dr. Florica Doroftei** pentru introducerea în lumea cercetării, prin pasiunea și cunoștințele de microscopie electronică pe care mi le-a împărtășit cu toată inima.*

*Mulțumesc **comisiei de doctorat**, reprezentată de **Acad. Bogdan C. Simionescu, Prof. univ. Dr. Carmen Teodosiu și Prof. univ. Dr. Anca Duță** pentru amabilitatea de a evalua conținutul științific al tezei de doctorat și pentru sugestiile oferite.*

*Mulțumesc **Academiei Române** și următoarelor **proiecte** pentru sprijinul financiar acordat în această perioadă: **MicroCapHs, POLYSAND, ZwitterZein**.*

***Familiei mele**, de la mic la mare, îi mulțumesc pentru sprijinul moral, încurajarea și înțelegerea oferite pe parcursul acestor ani.*

*Dedic această teză **fetiței mele, Emma-Irina**, care a hotărât să apară în viața mea în primul an de doctorat și alături de care am parcurs cea mai mare parte din acest drum.*

CUPRINS

Teza/Rezumat

LISTĂ DE ABREVIERI.....	3/5
INTRODUCERE	5/5
PARTEA A I-a. STUDIU DE LITERATURĂ	
CAPITOLUL 1. MATERIALE COMPOZITE. CLASIFICARE, APLICAȚII.....	9
1.1. Clasificarea materialelor compozite.....	9
1.2. Aplicații ale materialelor compozite în domeniul biomedical	11
1.2.1. Eliberarea controlată a principiilor active	11
1.2.2. Regenerare tisulară.....	12
1.2.3. Suprafețe bio-inspirate	13
1.3. Aplicații ale materialelor compozite în protecția mediului.....	15
CAPITOLUL 2. MATERIALE COMPOZITE PE BAZĂ DE CARBONAT DE CALCIU	17
2.1. Carbonatul de calciu.....	17
2.1.1. Polimorfii carbonatului de calciu	17
2.1.2. Mecanisme de cristalizare a carbonatului de calciu	20
2.2. Compozite pe bază de carbonat de calciu și aditivi	23
2.2.1. Compozite pe bază de carbonat de calciu și aditivi anorganici	23
2.2.2. Compozite pe bază de carbonat de calciu și aditivi organici	27
2.2.3. Compozite pe bază de carbonat de calciu și combinații de aditivi organici și anorganici..	29
Concluzii	33
PARTEA A II-a. CONTRIBUȚII PERSONALE	
CAPITOLUL 3. PARTEA EXPERIMENTALĂ	35
3.1. Materiale utilizate	35
3.2. Metode de obținere a materialelor compozite.....	39
3.2.1. Sinteza microparticulelor pe bază de carbonat de calciu și polielectroliți.....	39
3.2.2. Sinteza microparticulelor compozite pe bază de carbonat de calciu acoperite cu film multistrat	40
3.2.3. Sinteza microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu și polimeri solubili.....	40
3.2.4. Sinteza microcapsulelor compozite pe bază de carbonat de calciu și complecși polielectrolitici nestoechiometrici	41
3.2.5. Sinteza materialelor compozite criogeluri/carbonat de calciu	42
3.2.6. Sinteza materialelor compozite pe bază de schimbători de ioni/carbonat de calciu.....	42
3.2.7. Sinteza materialelor compozite hidrofobe pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici sau complecși polielectrolitici nestoechiometrici.....	43
3.3. Metode de caracterizare a materialelor compozite	43
3.4. Metode de testare a aplicațiilor materialelor compozite	46
3.4.1. Teste de încărcare/eliberare de principii biologice active pe diferite materiale compozite ..	46
3.4.2. Teste de sorbție a ionilor metalici	49
3.4.3. Teste de sorbție a coloranților	50
3.4.4. Teste de evaluare a activității antimicrobiene.....	50
3.4.5. Teste de biocompatibilitate	51

CAPITOLUL 4. MICROPARTICULE/MICROCAPSULE COMPOZITE PE BAZĂ DE CARBONAT DE CALCIU PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE ȘI ÎN PROTECȚIA MEDIULUI.....	53/8
4.1. Sinteza și caracterizarea unor microparticule și microcapsule pe bază de carbonat de calciu	53
4.1.1. Microparticule pe bază de carbonat de calciu și polimeri solubili.....	53/8
4.1.2. Microcapsule pe bază de carbonat de calciu și polimeri solubili.....	65
4.1.3. Microcapsule pe bază de carbonat de calciu și complecși polielectrolitici.....	70/11
4.1.4. Mecanismul de formare a microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu.....	83/12
4.2. Aplicații biomedicale și în protecția mediului ale microparticulelor și microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu.....	84
4.2.1. Aplicații biomedicale ale microparticulelor și microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu.....	84/12
4.2.2. Aplicații în protecția mediului ale microparticulelor și microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu.....	97/16
4.3. Concluzii.....	103
CAPITOLUL 5. MATERIALE COMPOZITE RETICULATE PE BAZĂ DE CARBONAT DE CALCIU PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE ȘI ÎN PROTECȚIA MEDIULUI.....	105/17
5.1. Sinteza și caracterizarea unor materiale compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu	105
5.1.1. Materiale compozite sub formă de criogeluri/carbonat de calciu.....	105/17
5.1.2. Materiale compozite sub formă de schimbători de ioni/carbonat de calciu.....	117/19
5.2. Aplicații biomedicale și în protecția mediului ale materialelor compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu.....	122
5.2.1. Aplicații în protecția mediului ale materialelor compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu.....	122/20
5.2.2. Aplicații biomedicale ale materialelor compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu.....	131/23
5.3. Concluzii.....	134
CAPITOLUL 6. MATERIALE COMPOZITE HIDROFOBE PE BAZĂ DE CARBONAT DE CALCIU ȘI POLIMERI IONICI CU APLICAȚII BIOMEDICALE.....	135/24
6.1. Sinteza și caracterizarea unor materiale hidrofobe.....	135
6.1.1. Sinteza și caracterizarea unor complecși polielectrolitici nestoechiometrici.....	135/24
6.1.2. Materiale compozite hidrofobe pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici sau complecși polielectrolitici nestoechiometrici.....	136/25
6.2. Aplicații biomedicale ale materialelor hidrofobizate cu carbonat de calciu.....	142/27
6.2.1. Teste de încărcare/eliberare a tetraciclinei în/din materiale hidrofobizate cu carbonat de calciu.....	142/27
6.2.2. Activitatea antibacteriană a materialelor hidrofobizate cu carbonat de calciu.....	144/28
6.2.3. Teste de biocompatibilitate a materialelor hidrofobizate cu carbonat de calciu.....	146/29
6.3. Concluzii.....	147
CONCLUZII GENERALE.....	148/30
BIBLIOGRAFIE.....	157/34
ANEXA 1. DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE A DOCTORATULUI.....	175/35
ANEXA 2. LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE A DOCTORATULUI.....	178

Teza de doctorat intitulată „Materiale compozite bio-inspirate cu aplicații biomedicale și în protecția mediului” are **174** pagini împărțite în **6** capitole care includ **24** tabele, **89** figuri, **8** scheme și **196** indicații bibliografice.

În cele ce urmează se prezintă aspecte semnificative abordate în cadrul tezei de doctorat, urmărind îndeaproape cuprinsul lucrării. Rezumatul respectă numerotarea capitolelor, figurilor, schemelor, tabelelor și a bibliografiei cuprinse în teză.

LISTĂ DE ABREVIERI

BCG – verde de bromcrezol; **CPN** – complex polielectrolitic nestoechiometric; **CS** – chitosan; **CSA** – condroitin sulfat A; **C_{so}** – capacitatea de sorbție; **DEC** – dietilcarbonat; **D_h** – diametrul hidrodinamic; **DMABA** – 4-dimetilaminobenzaldehidă; **DMC** – dimetilcarbonat; **DVB** – divinil benzen; **EDA** – etilendiamină; **EDX** – spectroscopie de energie cu dispersie de raze X; **GA** – glutaraldehidă; **IExDEA₃** – schimbători de ioni cu 3% divinilbenzen; **KAN** – kanamicină; n^-/n^+ – raport molar între sarcini; **NR** – roșu neutru; **NWM** – material neșut; **PAMPS** – poli(acid 2-acrilamido-2-metilpropansulfonic); **P(AMPS-co-MM)** – poli(acid 2-acrilamido-2-metilpropansulfonic-co-metacrilat de metil); **P(AMPS-co-TBA)** – poli(acid 2-acrilamido-2-metilpropansulfonic-co-*t*-butilacrilamidă); **PAA** – poli(acid acrilic); **PAH** – poli(alilamină hidroclorurată); **PCT** – pectină; **PEIB** – polietilenimină ramificată; **PEIL** – polietilenimină liniară; **PMMA** – poli(metacrilat de metil); **PSA** – poli(acid 2-acrilamido-2-metilpropansulfonic-co-acid acrilic); **SEM** – microscopie electronică de scanare; **STR** – streptomicină; **TCH** – tetraciclină hidroclorurată; **TETA** – trietilentetraamină; **XRD** – difracție de raze X; **Zw** – zwitterion.

INTRODUCERE

Materialele compozite combină proprietățile materialelor organice și anorganice și au fost amplu studiate în ultimii ani, în încercarea de a obține materiale bio-inspirate cu capacitatea de a răspunde la stimuli interni sau externi. Aplicațiile materialelor compozite sunt variate, iar domeniul biomedical și cel al protecției mediului au fost intens studiate, fiind în continuă schimbare și adaptare la necesitățile omului. Astfel, în ultimii zeci de ani s-a acutizat nevoia obținerii unor materiale cu rol în epurarea apelor reziduale, prin eliminarea metalelor grele sau a coloranților toxici. Totodată, domeniul biomedical a căpătat amploare datorită necesității de a îmbunătăți viața pacienților, prin eficientizarea dozelor medicamentoase administrate sau prin crearea unor noi biomateriale cu rol de a accelera vindecarea. Având în vedere proprietățile comune esențiale necesare ale materialelor utilizate în aceste domenii, și anume biocompatibilitatea, biodegradabilitatea și costul mic de fabricare, am utilizat carbonatul de calciu ca și componentă comună a materialelor compozite sintetizate în cadrul tezei de doctorat.

Carbonatul de calciu este un material anorganic, natural, ce poate fi obținut în laborator în condiții blânde de reacție, cu costuri minime și utilizând diferite metode de sinteză, precum și diferiți precursori. Având în vedere capacitatea carbonatului de calciu de a forma compozite cu diferiți aditivi, organici sau anorganici, posibilitatea controlului proprietăților și morfologiei materialelor compozite obținute, precum și proprietățile de biocompatibilitate și biodegradabilitate, literatura de specialitate conține numeroase studii privind sinteza unor materiale compozite pe bază de carbonat de calciu, cu proprietăți și caracteristici specifice aplicațiilor vizate.

În acest context, obiectivul general al acestei teze l-a constituit *prepararea și caracterizarea unor noi materiale compozite pe bază de carbonat de calciu și diferiți polimeri naturali sau sintetici, cu aplicații în domeniul biomedical și protecția mediului*, prin acțiunea concertată a unei

game largi de parametri (concentrația reactanților, timpul de reacție, natura și structura polimerilor, utilizarea complecșilor polielectrolitici), aplicând metode variate de cristalizare a carbonatului de calciu. Lucrarea, indiferent de tipul de materiale obținute (microparticule, microcapsule autoasamblate, precum și cristalizarea pe diferite materiale suport), a avut în vedere parcurgerea a trei etape distincte: **sinteza** (cu elaborarea unor metode noi, facile de sinteza și înțelegerea mecanismului de formare a acestora), **caracterizarea** materialelor compozite prin metode moderne și adecvate și **testarea aplicabilității** acestora în domeniul medical (ca transportori de medicamente, sensibili la variațiile parametrilor mediului) sau în cel al protecției mediului (ca sorbenți specializați pentru poluanți emergenți, ioni ai metalelor grele sau coloranți).

Cercetările din cadrul tezei de doctorat au urmat o serie de **obiective specifice**, astfel:

1. **Studiul comparativ al diferitelor surse de carbonat** (Na_2CO_3 , DEC, DMC sau NH_4HCO_3) și **a mai multor protocoale experimentale** (adiție rapidă a precursorilor, cu ordine și de concentrații diferite, adiții repetate, difuzie lentă) pentru obținerea carbonatului de calciu;
2. **Investigarea influenței naturii polimerilor** (naturali sau sintetici) asupra structurii și proprietăților materialelor compozite pe bază de carbonat de calciu;
3. **Utilizarea complecșilor polielectrolitici în cristalizarea carbonatului de calciu** sub formă de microcapsule sau pe diferite materiale suport (*nestudiate până în prezent*);
4. **Prepararea unor noi materiale compozite conținând carbonat de calciu, cu diverse morfologii și compoziții** (microcapsule, microparticule cu film multistrat, creștere cristale pe hidrogeluri biocompatibile, schimbători de ioni, materiale hidrofobe);
5. **Caracterizarea structurilor rezultate** printr-o serie de metode de analiză specifice acestora: microscopie (electronică și optică), spectrometrie FTIR, analiză elementală, difracție de raze X, titrare polielectrolitică, sorbția vaporilor de apă, măsurători electrocinetice, unghi de contact, și altele;
6. **Investigarea posibilităților aplicații ale materialelor compozite** (capacitate de reținere și eliberare a medicamentelor, sorbția coloranților sau ionilor metalelor grele, biocompatibilitate, activitate antibacteriană), ca rezultat al proprietăților materialelor compozite reglate prin condițiile de sinteză;
7. **Texturarea unor suprafețe** determinată de creșterea controlată de microcristale de carbonat de calciu, transformând astfel caracterul superhidrofil al unor suprafețe în caracter hidrofob, prin abordarea cunoscută în literatura de specialitate sub denumirea „bottom-up” („de jos în sus”).

Astfel, în cadrul tezei de doctorat intitulată „**Materiale compozite bio-inspirate cu aplicații biomedicale și în protecția mediului**” au fost obținute diferite materiale compozite pe bază de carbonat de calciu, care au fost testate din punct de vedere al capacității de eliberare a unor medicamente, dar și al capacității de retenție a unor coloranți sau ioni ai metalelor grele, și anume:

- ✓ ***Microparticule/microcapsule compozite pe bază de carbonat de calciu pentru aplicații biomedicale și în protecția mediului***
 - Sinteza și caracterizarea unor **microparticule** pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici și acoperirea cu film multistrat pentru obținerea unor materiale de tip miez-manta, utilizate în purificarea apelor poluate cu ioni metalici;
 - Sinteza și caracterizarea unor **microcapsule autoasamblate** pe bază de carbonat de calciu și **polimeri solubili tari sau slabi, naturali sau sintetici și complecși polielectrolitici nestrochiometrici**, testate ca sisteme complexe pentru încărcarea/eliberarea unor medicamente.

- ✓ ***Materiale compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu pentru aplicații biomedicale și în protecția mediului***
 - Sinteza și caracterizarea unor materiale compozite ***criogeluri/carbonat de calciu***, cu biocompatibilitate demonstrate;
 - Sinteza și caracterizarea unor materiale compozite ***schimbători de ioni/carbonat de calciu***, cu ***aplicații biomedicale*** (încărcare/eliberare a tetraciclinei) și ***în protecția mediului*** (depoluarea apelor impurificate cu coloranți):
- ✓ ***Materiale compozite hidrofobe pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici cu aplicații biomedicale***
 - Obținerea de ***materiale compozite hidrofobe*** pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici sau complecși polielectrolitici nestoechiometrici folosind ca substrat un material superhidrofil
 - ***Încărcarea/eliberarea tetraciclinei*** în/din materialele hidrofobizate cu carbonat de calciu și testarea ***biocompatibilității*** și a ***activității antibacteriene***.

Teza de doctorat „**Materiale compozite bio-inspirate cu aplicații biomedicale și în protecția mediului**” este organizată în două părți, descrise astfel:

Partea I-a cuprinde un studiu de literatură amplu organizat în două capitole, care rezumă informații generale despre materialele compozite, clasificarea acestora și aplicațiile uzuale în domeniile biomedical și protecția mediului (**Capitolul 1**) și informații despre carbonatul de calciu, plecând de la polimorfii acestuia și mecanismele de cristalizare și continuând cu studii în care carbonatul de calciu a fost utilizat împreună cu aditivi organici, anorganici sau combinații organic-anorganice în vederea obținerii unor materiale compozite (**Capitolul 2**).

Partea a II-a cuprinde rezultatele proprii obținute pe parcursul stagiului doctoral și este organizată în 4 capitole distincte. Astfel, **Capitolul 3** conține informații despre materialele și metodele de caracterizare utilizate la obținerea materialelor compozite prezentate în cadrul tezei, precum și metodele de testare a aplicabilității acestora.

Capitolul 4 prezintă obținerea și caracterizarea unor microparticule și microcapsule pe bază de CaCO_3 și polimeri solubili sau dispersii de complecși polielectrolitici nestoechiometrici, împreună cu aplicații ale acestora ca materiale compozite pentru încărcarea și eliberarea unor principii biologice active, dar și pentru sorbția ionilor metalici din apele reziduale de suprafață.

Capitolul 5 conține sinteza și caracterizarea a două categorii de materiale compozite pe bază de carbonat de calciu și polimeri reticulați (compozite sub formă de criogeluri și sub formă de schimbători de ioni), precum și aplicațiile acestora ca sorbenți ai coloranților și ca matrici tridimensionale de încărcare/eliberare a medicamentelor.

În **Capitolul 6** s-a realizat transformarea unei suprafețe superhidrofile în hidrofobă, prin modificări de tip „de jos în sus”, prin creșterea controlată a carbonatului de calciu în prezența unor polianioni sau complecși polielectrolitici nestoechiometrici. Materialele obținute în acest capitol au fost supuse unor teste antibacteriene și de biocompatibilitate și s-a evaluat posibilitatea utilizării lor ca pansamente, prin studiile de încărcare și eliberare *in vitro* a unui medicament model.

Fiecare capitol se încheie cu concluzii parțiale, **concluziile generale și perspectivele** regăsimuse la finalul tezei, urmate de lista **bibliografiei** consultate și citate în text, precum și două anexe: **Anexa 1**, care prezintă modul de diseminare a rezultatelor obținute pe parcursul studiilor doctorale, și **Anexa 2**, lucrările științifice publicate în perioada de pregătire a doctoratului.

PARTEA A II-A

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL 4. MICROPARTICULE/MICROCAPSULE COMPOZITE PE BAZĂ DE CARBONAT DE CALCIU PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE ȘI ÎN PROTECȚIA MEDIULUI

4.1.1. Microparticule pe bază de carbonat de calciu și polimeri solubili

În acest studiu s-au obținut microparticule de carbonat de calciu în prezența poli(acidului acrilic) (PAA) sau a poli(etileniminei) liniare sau ramificate (PEIL, PEIB), prin metoda descrisă în Capitolul 3, subcapitolul 3.2.1, care au fost utilizate ca templat pentru sorbții alternante de polielectroliti complementari, policationii PEIB, PEIL sau complecși PEICu și polianionul PAA, prin metoda prezentată în Capitolul 3, subcapitolul 3.2.2.

Sorbția poliionilor pe microparticulele compozite CaCO_3 /polimer a fost influențată mai puțin de structura chimică a policationului și mai mult de prezența PEICu în etapa de adsorbție a policationului. De asemenea, în absența cuprului se formează straturi regulate și uniforme, în timp ce pentru compozitele obținute prin sorbția PEICu se observă o structură granulară, demonstrată prin SEM.

Cantitatea de poliioni adsorbită depinde de compoziția miezului microparticulelor și de cea a straturilor adsorbite. Astfel, pentru adsorbția polication/polianion (MS_{1n} și MS_{2n}), cea mai mare cantitate adsorbită s-a întâlnit la microparticulele de CaCO_3 pe bază de PAA și la cele fără polimer, în timp ce microparticulele cu PEI au adsorbit o cantitate mai mică de polimer. Acest lucru poate fi atribuit sarcinii anionice a particulelor, determinată prin titrare potențiometrică (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Potențialul de curgere (SP) și densitatea de sarcini (CD) a microparticulelor, înainte și după protocolul de adsorbție alternantă a polimerilor [Zaharia, 2021b].

Codul probei	SP, mV	CD, $\mu\text{eq L}^{-1}$	Codul probei	SP, mV	CD, $\mu\text{eq L}^{-1}$
a	-434	8,3	b	-503	36,3
MS_{1a}	-530	15,8	MS_{1b}	-415	16,0
MS_{2a}	-570	15,2	MS_{2b}	-446	16,5
MS_{3aCu}	-380	15,3	MS_{3bCu}	-370	16,7
MS_{4aCu}	-430	14,1	MS_{4bCu}	-446	17,4
MS_{3a}	-113	8,0	MS_{3b}	-102	10,7
MS_{4a}	-176	10,1	MS_{4b}	-145	8,1
c	-127	5,5	d	-45	4,0
MS_{1c}	-543	16,5	MS_{1d}	-507	16,3
MS_{2c}	-600	16,4	MS_{2d}	-401	15,6
MS_{3cCu}	-357	13,8	MS_{3dCu}	-449	14,4
MS_{4cCu}	-455	16,1	MS_{4dCu}	-399	15,9
MS_{3c}	-105	10,8	MS_{3d}	-110	10,2
MS_{4c}	-155	8,7	MS_{4d}	-150	10,3

4.1.2.1. Microcapsule pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici tari

S-au sintetizat microcapsule de carbonat de calciu în prezența PAMPS și a unor copolimeri statistici cu monomeri neionici, și anume cu metacrilat de metil, P(AMPS_{52-co}-MM₄₈), și t-butil acrilamidă, P(AMPS_{54-co}-TBA₄₆) și P(AMPS_{37-co}-TBA₆₃), în Figura 4.10 fiind prezentate micrografii SEM ale acestor compozite.

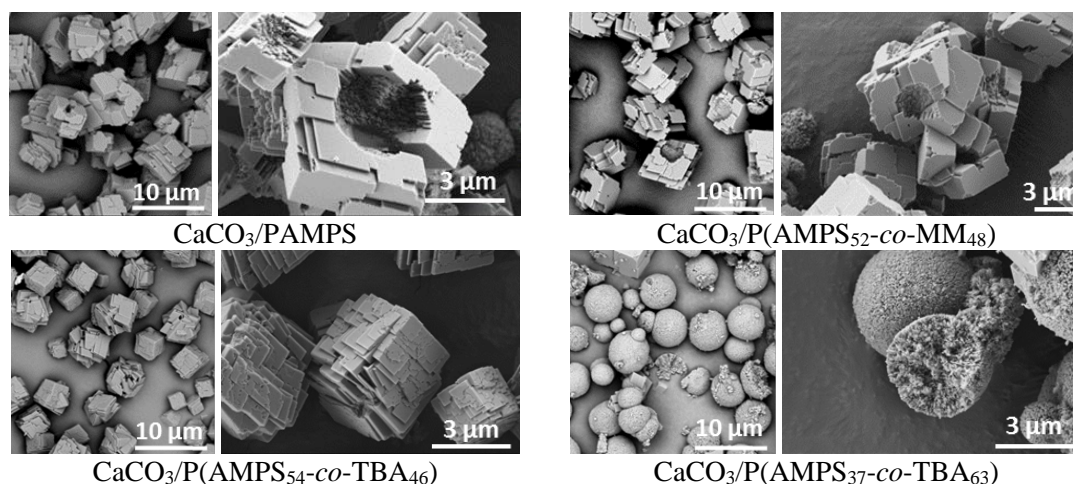


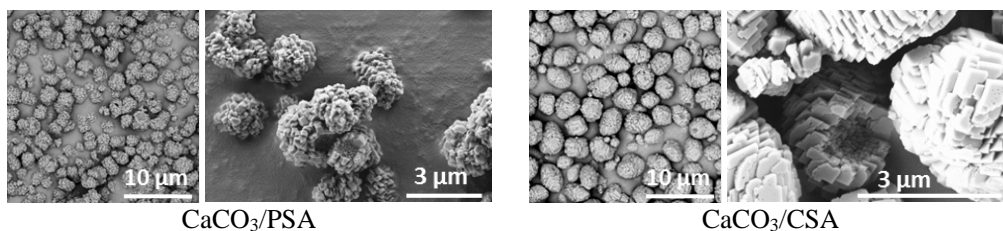
Figura 4.10. Micrografii SEM ale particulelor de carbonat de calciu obținute cu PAMPS și copolimeri statistici cu monomeri neionici [Vasiliu, 2017].

Utilizarea copolimerilor P(AMPS_{54-co}-TBA₄₆) și P(AMPS_{52-co}-MM₄₈), care au conținut asemănător în grupe anionice, nu a dus la modificări semnificative comparativ cu microcapsulele obținute cu PAMPS, deși structura chimică a comonomerului este diferită. Cu toate acestea, scăderea conținutului ionic duce la o scădere a dimensiunii microcapsulelor la $6,14 \pm 1,44 \mu\text{m}$ pentru P(AMPS_{52-co}-MM₄₈), și respectiv $4,55 \pm 2,01 \mu\text{m}$ pentru P(AMPS_{54-co}-TBA₄₆).

Scăderea conținutului de grupe anionice prin creșterea conținutului de TBA din copolimerul P(AMPS_{37-co}-TBA₆₃) determină formarea particulelor compozite aproape sferice cu suprafață mai netedă și un diametru mediu de $4,43 \pm 1,61 \mu\text{m}$, apropiat de cel obținut în prezența P(AMPS_{54-co}-TBA₄₆). Acest lucru poate fi explicat prin formarea cristalelor mai mici de carbonat de calciu în matricea polimerică, dar și, cel mai probabil, prin formarea polimorfului vaterit. Particulele de vaterit sunt în general policristaline, de formă sferică, formate din cristalite de 25 – 35 nm [Brecevic, 1996]. În acest caz, matricea anionică formată între grupele ionice ale polimerului și ionii de calciu nu acționează ca o matricea templat de gel, dar permite creșterea cristalelor în interiorul matricei, stabilizată sub formă de microsferice compozite.

4.1.2.2. Microcapsule pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici slabi

Pentru obținerea de microcapsule s-au utilizat doi polianioni cu grupe ionice carboxilice și diferite lanțuri macromoleculare, și anume copolimerul AMPS cu acid acrilic, PSA, care este un polimer sintetic flexibil, și condroitin sulfatul A (CSA), care este un glicozaminoglican sulfat cu un lanț macromolecular semirigid. Studiile anterioare au demonstrat că 0,05 % PSA, în concentrație echimolară de ioni de calciu și carbonat, după 1 minut de reacție, a condus la obținerea unor particule sferice cu diametru de aproximativ 8 – 10 μm , polimorful majoritar fiind vateritul [Mihai, 2012]. În condiții de reacție similare, particulele compozite pe bază de CSA au avut atât forme cubice cât și sferice, sugerând formarea polimorfilor calcit și vaterit, indiferent de concentrațiile anorganice [Mihai, 2013b]. În Figura 4.11 sunt prezentate micrografii SEM ale microcapsulelor compozite obținute cu acești polimeri.

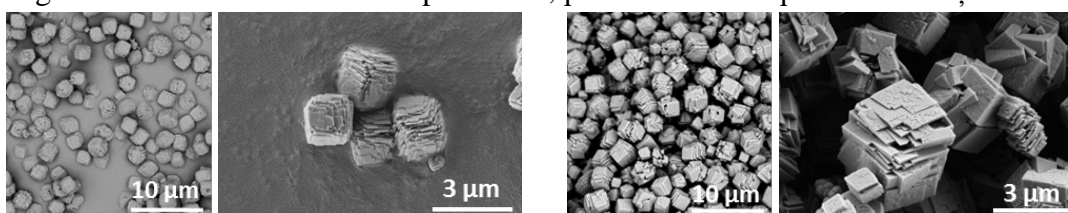


CaCO₃/PSA

CaCO₃/CSA

Figura 4.11. Micrografii SEM ale microcapsulelor de carbonat de calciu formate în prezența PSA și CSA [Vasiliu, 2017].

Microcapsule compozite au fost obținute și în prezența a doi polimeri naturali, dextran și acid hialuronic (Figura 4.12). Micrografiile arată faptul că în prezența polimerilor naturali se obțin particule romboidale, cu o dimensiune medie de $1,95 \pm 0,91 \mu\text{m}$ când s-a utilizat dextran, respectiv $4,33 \pm 1,47 \mu\text{m}$ când s-a utilizat acid hialuronic. Micrografiile de înaltă rezoluție arată prezența unor cavități în interiorul particulelor formate, ceea ce sugerează că materialele compozite romboidale au un miez gol. Pe baza formei observate prin SEM, putem afirma că polimorul obținut este calcitul.



CaCO₃/dextran

CaCO₃/acid hialuronic

Figura 4.12. Micrografii SEM ale particulelor de carbonat de calciu formate în prezența unor polimeri naturali [Vasiliu, 2017].

4.1.2.3. Microcapsule pe bază de carbonat de calciu și pectine

Utilizând aceeași metodă de cristalizare a carbonatului de calciu, s-au obținut microcapsule compozite pe bază de carbonat de calciu și pectinele prezentate în Schema 3.2, Capitolul 3, Figura 4.13 prezentând imaginile SEM ale acestora.

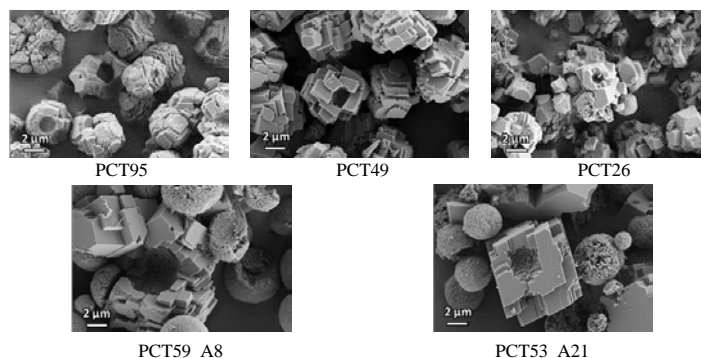


Figura 4.13. Micrografii SEM ale microcapsulelor compozite de pectine/CaCO₃ [Mihai, 2017a].

După cum se poate observa din micrografiile din Figura 4.13, microcapsulele obținute în prezența pectinelor au forme și dimensiuni diferite, în funcție de structura chimică a pectinei. După cum au arătat studiile precedente [Barhoum, 2014; Mihai, 2012; Mihai, 2013d; Schenk, 2014], prezența grupelor carboxilat și de amină primară în structura polimerului asigură mineralizarea CaCO₃ rezultând în principal formațiuni de vaterit sferice, cu cristalite de 25-35 nm [Brecevic, 1996]. Matricea de gel formată între numărul mare de grupe carboxilice (95%) din PCT95 și ionii de calciu divalenți favorizează creșterea polimorfului vaterit în interiorul matricii, stabilizând compozitele sub formă de microsferă cu un diametru mediu de $4,5 \mu\text{m}$, și mai puțin sub formă de capsule. Pe de altă parte, conținutul scăzut de grupe carboxilice de 26% (PCT26) a fost insuficient pentru formarea microcapsulelor cu formă uniformă, obținându-se un diametru mediu de $4,9 \mu\text{m}$. Cele mai bune

rezultate s-au obținut atunci când 49% din grupele funcționale au fost carboxilat, similar cu conținutul de grupe carboxilice din polimerul sintetic PSA folosit în studii anterioare [Mihai, 2013b]. Astfel, PCT49 formează microcapsule cu un diametru mediu de $\sim 6,6 \mu\text{m}$, iar polimorful cel mai probabil format este calcitul, care cristalizează în general sub formă de particule romboedrice bine definite, mono-cristaline [Brecevic, 1996].

Cu toate acestea, chiar și la un conținut similar de grupe carboxilice, dar conținut diferit de grupe aminice, pectinele PCT59_A8 și PCT53_A21 au format amestecuri de capsule de calcit și sfere de vaterit, cu diametrul mediu de $\sim 7,9 \mu\text{m}$, respectiv $\sim 6,2 \mu\text{m}$. Luând în considerare că grupele aminice favorizează formarea și stabilizarea vateritului, și prin urmare procentul total de grupe care acționează ca centre de cristalizare este de aproximativ 67, respectiv 74 %, putem presupune că are loc un mecanism similar ca în cazul PCT95. Astfel, stabilizarea polimorfului vaterit scade abilitatea de a forma microcapsule uniforme datorită dizolvării acestuia și nucleației secundare a calcitului pe suprafața externă a microparticulelor.

4.1.3. Microcapsule pe bază de carbonat de calciu și complecși polielectrolitici

Complecșii polielectrolitici au fost obținuți prin metoda prezentată în Capitolul 3, subcapitolul 3.2.4, și anume folosirea PAH ca policon de concentrație 10^{-2} M și pectinele din Schema 3.2, Capitolul 3, de concentrații 10^{-3} M , cu rapoarte molare de 0,5, 0,9 și 1,2.

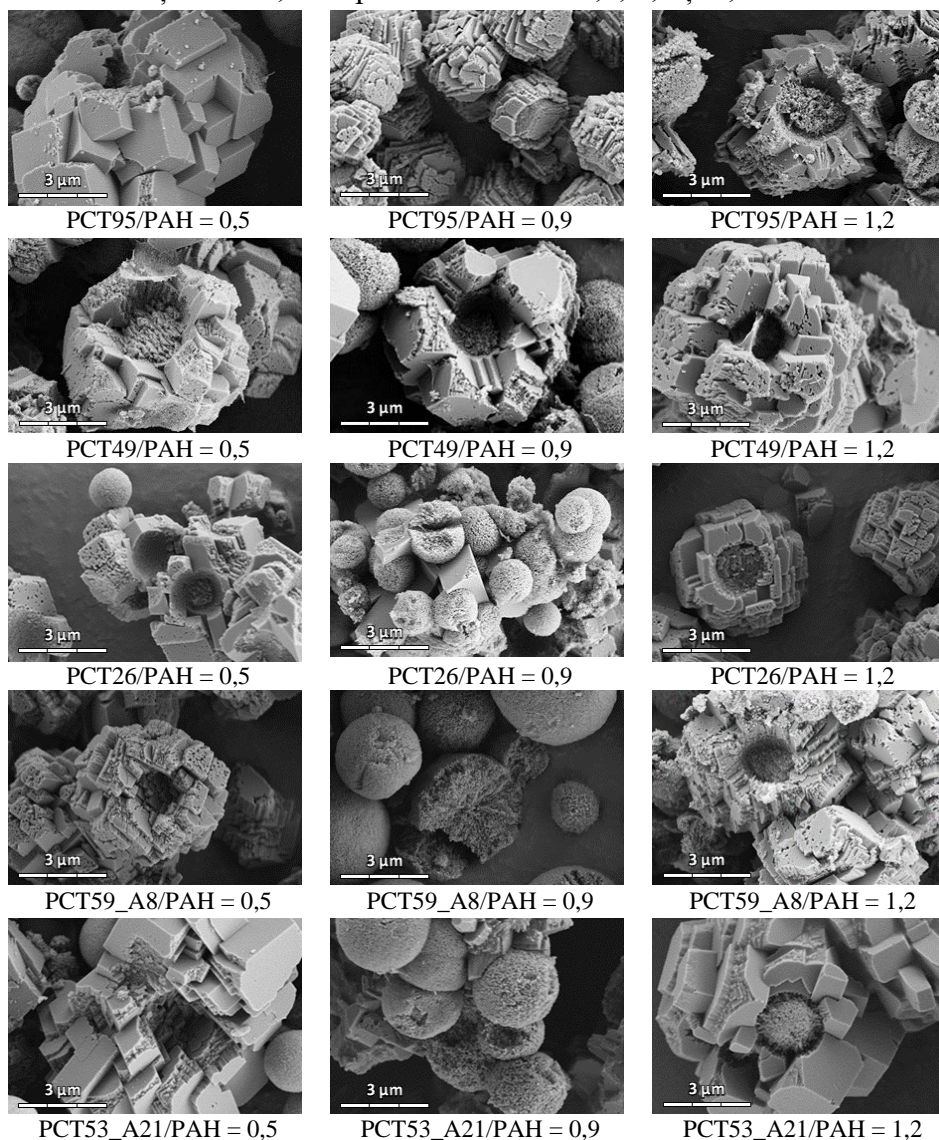
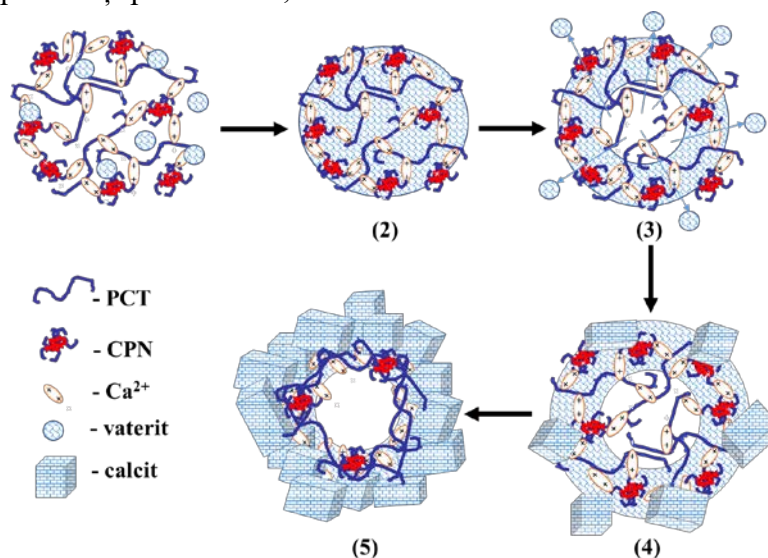


Figura 4.16. Micrografii SEM ale microcapsulelor compozite de CPN/CaCO₃ [Mihai, 2017a].

După cum se observă în Figura 4.16, morfologia compozitelor obținute cu CPN depinde atât de structura chimică a pectinelor, cât și de raportul molar dintre sarcini. Astfel, luând în considerare forma sferică policristalină observată din imaginile SEM, polimorful dominant este vateritul în probele preparate cu CPN având $n^+/n^- = 0,9$, mai puțin în probele preparate cu CPN pe bază de PCT95 și PCT49, unde se obține un amestec de microcapsule și microsferice. S-a observat o bună capacitate de obținere a capsulelor pentru CPN cu $n^+/n^- = 0,5$ și $1,2$, indiferent de structura pectinei. Cu toate acestea, deși grupele aminice primare stabilizează polimorful vaterit, compozitele preparate cu un conținut crescut de PAH ($n^+/n^- = 1,2$) și cele cu pectine amidate (PCT59_A8/PAH și PCT53_A21/PAH) conțin atât microcapsule aproape sferice acoperite cu un strat de calcit, cât și microsferice de vaterit.

4.1.4. Mecanismul de formare a microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu

Luând în considerare rezultatele prezentate anterior, procesul de formare a microcapsulelor de CaCO_3 în prezența pectinelor și CPN este reprezentat schematic în Schema 4.1. Deoarece mecanismul pare similar pentru pectine și pentru CPN, schema combină cele două structuri.



Schema 4.1. Reprezentarea schematică a procesului de formare a capsulelor goale de CaCO_3 în prezența pectinelor și/sau CPN [Mihai, 2017a].

Procesul de formare a capsulelor de CaCO_3 în prezența pectinelor și CPN este de așteptat să aibă loc prin următoarele etape: (1) interacțiunea ionilor de calciu cu grupele ionice sau ionizabile de pe lanțurile polimerice sau de pe catenele în exces ale nanoparticulelor de CPN, cu formarea microparticulelor de gel, și cristalizarea carbonatului de calciu indusă de zonele bogate în calciu; (2) creșterea cristalelor de carbonat de calciu cu formarea microparticulelor (în primul minut de cristalizare); (3) dizolvarea fracțiilor de CaCO_3 mai puțin stabile (amorf și vaterit) în principal prin dizolvarea miezului; (4) nucleația secundară a polimorfului cristalin (în principal calcit) pe suprafața externă; (5) creșterea progresivă a grosimii peretelui cristalin pe măsură ce miezul se golește, producând microsferice goale în interior de tip capsule.

4.2.1. Aplicații biomedicale ale microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu

4.2.1.1. Încărcarea microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu cu medicamente

Microcapsulele compozite de CaCO_3 preparate cu PCT49 și PCT53_A21, pectine cu conținut similar de grupe carboxilice (49 și 53%) și grade de amidare diferite (0 și 21%), și CPN corespunzători cu rapoarte molare diferite între sarcini au fost investigate ca transportori pentru medicamente,

folosind tetraciclină (TCH), streptomycină (STR) și kanamicină (KAN) ca medicamente model. Capacitatea maximă de încărcare cu medicamente a fost determinată luând în considerare concentrația inițială de medicament din soluția apoasă și concentrația reziduală a supernatantului după sorbție (Tabelul 4.11).

Tabelul 4.11. Capacitatea de încărcare maximă cu TCH, STR și KAN a microcapsulelor compozite pectină/CaCO₃ și CPN/CaCO₃, și valorile potențialului Zeta (ζ_{app}) la pH = 5,5 ale microcapsulelor inițiale [Mihai, 2017a; Racovita, 2018]

Tipul pectinei	n ⁺ /n ⁻	Capacitatea de încărcare			ζ_{app} (pH = 5,5), mV
		TCH, (mg/g)	STR, mg/g	KAN, mg/g	
PCT49	0	254,72	106,79	142,86	-22,9
	0,5	152,78	157,89	295,23	-24,5
	0,9	188,68	35,40	44,25	+2,6
	1,2	171,43	107,44	163,46	+9,7
PCT53_A21	0	222,77	128,21	203,70	-18,5
	0,5	187,50	91,74	178,57	-16,1
	0,9	200,00	70,42	124,70	+7,7
	1,2	399,04	153,84	233,98	+22,8

După cum se poate observa din Tabelul 4.11, capacitatea de încărcare a probelor testate cu TCH, KAN și STR depinde atât de structura chimică a pectinei, cât și de raportul molar dintre sarcini al CPN. Astfel, microcapsulele de CaCO₃ preparate cu PCT49 și PCT53_A21 au o bună capacitate de încărcare a TCH, mai mare de 220 mg/g, respectiv 100 mg/g pentru STR și 140 mg/g pentru KAN. Capacitatea de încărcare cu medicamente a compozitelor pe bază de CPN depinde de raportul dintre sarcini, de forma microcapsulelor și de conținutul de polimorfi.

La un pH de sorbție de 5,5, STR și KAN sunt încărcate cationic și interacțiunea lor cu particulele compozite este determinată cel mai probabil de porozitatea microcapsulelor și mai puțin de sarcina lor ionică globală (Tabelul 4.11). De asemenea, atât sarcinile negative de pe lanțul principal carboxilat al pectinei, cât și sarcinile pozitive ale grupelor aminice din PAH și pectinele amidate pot interacționa cu TCH și pot contribui la încărcarea medicamentului, ceea ce ar putea explica cea mai mare capacitate de încărcare a probelor obținute cu CPN pe bază de PCT53_A21 cu cel mai mare conținut de PAH (n⁺/n⁻ = 1,2). Pentru compozitele pe bază de PCT49, cea mai mare capacitate de încărcare s-a obținut atunci când s-au utilizat CPN cu conținutul cel mai mic de polication (n⁺/n⁻ = 0,5). Această probă a prezentat și cea mai mare dimensiune medie a porilor și potențialul Zeta negativ cel mai mare din seria compozitelor cu PCT49. Când s-a utilizat PCT53_A21, pectina cu 21% grupe amide, cea mai mare capacitate de încărcare a fost obținută pentru microcapsulele cu porozitatea cea mai mare din seriile corespunzătoare (n⁺/n⁻ = 1,2). De asemenea, polimorfii CaCO₃ influențează capacitatea de încărcare, fiecare polimorf fiind caracterizat de o porozitate diferită (calcitul are porozitate mai mică decât vateritul) și sarcini de suprafață diferite (în condițiile experimentale – concentrația Ca²⁺ de 0,1 M – suprafața calcitului este încărcată negativ, iar vateritul este ușor pozitiv [Sawada, 1997]). Totodată, creșterea conținutului de calcit duce la creșterea ariei suprafeței și implicit la creșterea disponibilității zonelor de adsorbție. În consecință, reținerea TCH în microcapsule poate fi explicată prin contribuția sinergică a componentelor organice/anorganice în timpul interacțiunii cu TCH: (1) capacitatea matricii polimerice de sorbție a TCH prin interacțiuni electrostatice sau legături de hidrogen, (2) disponibilitatea grupelor funcționale după creșterea CaCO₃, (3) distribuția cristalelor de CaCO₃ pe microcapsule, (4) capacitatea cristalelor de a interacționa cu TCH ca funcție a aranjării lor pe microcapsule.

4.2.1.2. Eliberarea *in vitro* a medicamentelor din microcapsule pe bază de carbonat de calciu

Studiile de eliberare *in vitro* au fost realizate la pH 7,4 (în tampon fosfat) și rezultatele sunt rezumate în Figura 4.24.

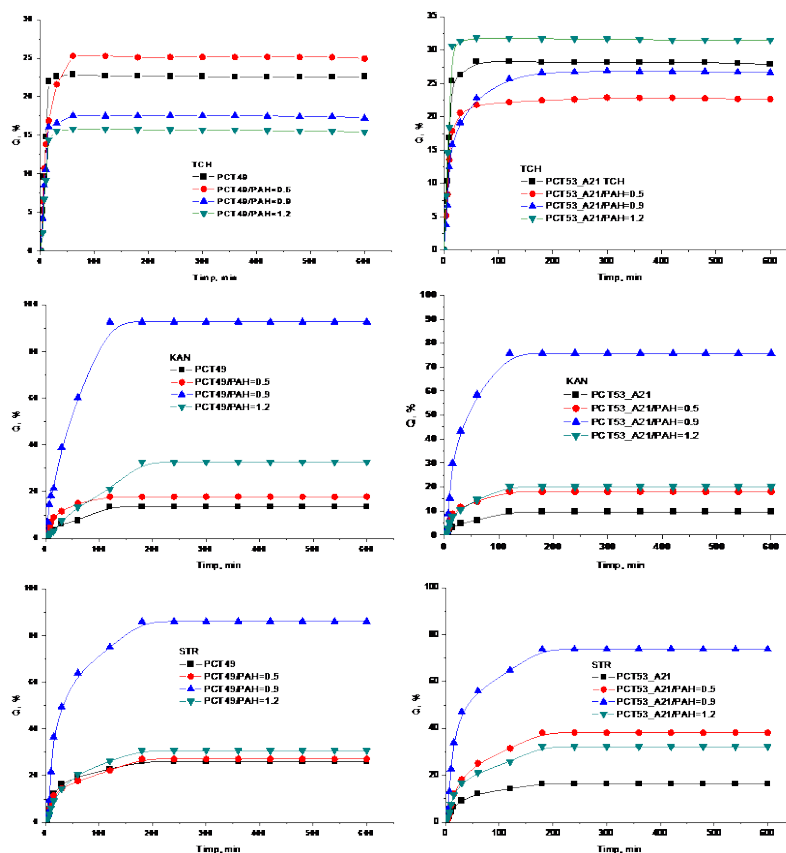


Figura 4.24. Cantitatea cumulată de medicament eliberată ($Q\%$) *in vitro* [Mihai, 2017a; Racovita, 2018].

După cum se poate observa în Figura 4.24, profilele de eliberare indică faptul că aproximativ 22% și 27% din TCH a fost eliberat după 10 ore din microcapsulele de PCT49/ CaCO_3 , respectiv PCT53_A21/ CaCO_3 . Eliberarea de TCH din microcapsulele pe bază de CPN poate fi corelată cu polimorfii CaCO_3 . Astfel, polimorful vaterit observat în probele preparate cu CPN având $n^+/n^- = 0,9$ a dus la un procentaj cumulativ de eliberare după 10 ore similar celor corespunzătoare compozitelor pe bază de pectine. Procentul cumulativ de TCH eliberat din microcapsulele de calcit obținute cu CPN având $n^+/n^- = 0,5$ și 1,2 a variat în funcție de diferiți factori. Astfel, comparativ cu compozitele bazate pe pectinele corespunzătoare, microcapsulele de CPN-PCT49/ CaCO_3 încărcate cu TCH prezintă o creștere a cantității eliberate după 10 ore, când $n^+/n^- = 0,5$, adică atunci când grupele carboxilice sunt în exces, în timp ce microcapsulele de PCT53_A21/ CaCO_3 cu $n^+/n^- = 1,2$ au eliberat o cantitate mai mare în aceleași condiții. În primul caz, catenelor anionice libere ale pectinelor a dus, cel mai probabil, la creșterea eliberării TCH, în timp ce, în al doilea caz, polimorful vaterit, stabilizat de grupele aminice primare (din PAH și pectina amidată PCT53_A21/PAH), cresc permeabilitatea peretelui capsulelor. Cu toate acestea, eliberarea medicamentului dintr-o matrice (particule goale sau pline) implică, în general, atât difuzia prin pori, cât și eroziunea matricei.

Curbele de eliberare pentru ambele medicamente, STR și KAN, în soluție tampon fosfat la pH 7,4 (Figura 4.24) prezintă o eliberare continuă a medicamentelor în primele 100 – 150 minute până la atingerea unui platou. Eliberarea cea mai mare a fost obținută pentru probele pregătite cu CPN cu $n^+/n^- = 0,9$ și ambele pectine, mai exact probele cu densitatea de sarcină cea mai mică (Tabelul 4.11).

Astfel, lipsa interacțiunilor electrostatice dintre microcapsulele compozite și medicament sugerează că eliberarea medicamentului se realizează aproape complet datorită porozității microcapsulelor. Cu toate acestea, eliberarea medicamentelor pentru probele cu $n^+/n^- = 0,5$ și $1,2$ a fost susținută de interacțiunile electrostatice, obținându-se un maxim de aproximativ 30% medicament eliberat cumulativ, indiferent de tipul medicamentului. De asemenea, cea mai mare eliberare a medicamentului pentru probele preparate cu CPN cu $n^+/n^- = 1,2$, care au prezentat un exces de grupe cationice a fost observată pentru probele cu interacțiunea electrostatică cea mai mică față de medicamentul utilizat.

4.2.1.3. Cinetica de eliberare a medicamentelor

Cinetica procesului de eliberare din microparticulele încărcate cu TCH, KAN și STR a fost evaluată folosind două modele matematice, Higuchi și Korsmeyer-Peppas. Constantele de eliberare au fost calculate din panta graficelor adecvate, iar coeficientul de regresie (R^2) a fost calculat din analiza regresiei liniare (Tabelul 4.12).

Tabelul 4.12. Procentajul maximum eliberat după 10 ore și constantele de eliberare (k_H – constanta Higuchi, k_r – constanta vitezei de eliberare), coeficientul de difuzie (n) și coeficienții de regresie (R^2) calculate folosind modelele matematice Higuchi și Korsmeyer-Peppas [Mihai, 2017a; Racovita, 2018]

Proba	n^+/n^-	Cantitatea maximă eliberată, %	Modelul Higuchi		Modelul Korsmeyer-Peppas		
			$k_H, \text{min}^{1/2}$	R^2	n_r	k_r, min^{-n}	R^2
TCH							
PCT49	0	22,89	9,066	0,995	1,072	0,052	0,999
PCT49/PAH	0,5	25,32	4,268	0,980	0,850	0,078	0,998
PCT49/PAH	0,9	17,57	6,168	0,984	1,023	0,060	0,985
PCT49/PAH	1,2	15,8	6,351	0,997	1,536	0,018	0,983
PCT_A21	0	28,31	9,652	0,980	0,892	0,072	0,986
PCT_A21/PAH	0,5	22,89	4,548	0,946	1,029	0,053	0,992
PCT_A21/PAH	0,9	26,88	4,503	0,948	1,133	0,030	0,987
PCT_A21/PAH	1,2	31,84	11,678	0,983	0,905	0,075	0,993
STR							
PCT49	0	26	2,061	0,941	1,763	0,0042	0,996
PCT49/PAH	0,5	27,17	1,911	0,981	0,877	0,0508	0,965
PCT49/PAH	0,9	86,02	6,969	0,956	1,326	0,0087	0,960
PCT49/PAH	1,2	30,73	2,578	0,987	1,182	0,0103	0,976
PCT_A21	0	16,41	1,305	0,966	1,123	0,0158	0,965
PCT_A21/PAH	0,5	38,23	3,178	0,982	1,363	0,0062	0,969
PCT_A21/PAH	0,9	73,79	5,627	0,947	1,405	0,0111	0,995
PCT_A21/PAH	1,2	32,24	2,510	0,979	1,045	0,0177	0,978
KAN							
PCT49	0	13,71	1,389	0,991	0,882	0,0197	0,964
PCT49/PAH	0,5	17,84	1,661	0,966	1,016	0,0348	0,985
PCT49/PAH	0,9	92,74	9,507	0,979	0,858	0,0271	0,979
PCT49/PAH	1,2	32,62	2,710	0,989	0,968	0,0064	0,996
PCT_A21	0	9,68	0,979	0,993	1,101	0,0145	0,967
PCT_A21/PAH	0,5	18,20	1,837	0,958	1,700	0,0055	0,988
PCT_A21/PAH	0,9	75,66	8,268	0,978	1,553	0,0043	0,951
PCT_A21/PAH	1,2	20,23	2,123	0,987	1,406	0,0066	0,930

După cum se poate observa în Tabelul 4.12, valorile lui n sunt mai mari de 0,85 pentru toate probele investigate cu TCH, indicând un mecanism de transport de cazul II. De asemenea, au putut fi observate valori ale lui $n > 1$, acestea fiind considerate pentru cinetica de super cazul II (super case II kinetics). Transportul de cazul II este descris de o constantă de relaxare caracteristică și reflectă influența relaxării polimerului asupra mișcării moleculelor în matrice. Acest comportament poate fi atribuit și recristalizării/reorganizării polimorfilor CaCO_3 pe compozite. De asemenea, comportamentul de relaxare/umflare dinamică al microgelurilor formate de pectine sau CPN și ionii de Ca^{2+} depinde de contribuția relativă a difuziei și relaxării polimerului. În compozitele studiate, relaxarea polimerului este afectată de ionizarea grupelor funcționale ale polimerilor, dar și de densitatea sarcinilor catenei principale a polimerului sau a sarcinii nete a nanoparticulelor de CPN. O creștere a conținutului de grupe ionice rezultă în repulsie electrostatică între grupele funcționale ionizate, ceea ce duce la expansiunea lanțurilor, care afectează relaxarea lanțurilor macromoleculare. Astfel, mecanismul de eliberare a TCH devine controlat de relaxare atunci când crește ionizarea microparticulelor complexe. Pentru compozitele studiate, eliberarea la pH de 7,4 favorizează o scădere a protonării grupelor amină din PAH și pectinele amidate, deprotonând simultan grupele acide carboxilice din pectine. Ca urmare, mecanismul de recristalizare/reorganizare devine mai controlat de relaxare odată cu ionizarea polimerilor, determinând o creștere a valorilor lui n .

4.2.2. Aplicații în protecția mediului ale microparticulelor și microcapsulelor pe bază de carbonat de calciu

4.2.2.1. Sorbții de ioni metalici în microparticule pe bază de carbonat de calciu

Microparticulele compozite obținute și caracterizate în subcapitolul 4.1.1 au fost testate ca sorbenți pentru trei ioni ai metalelor grele (Cu^{2+} , Ni^{2+} și Co^{2+}) în rapoarte echimolare. Cantitatea adsorbită pentru fiecare ion metalic a fost cuantificată prin AAS, rezultatele fiind prezentate în Figura 4.30 atât pentru probele cu sorbția ionilor metalici individuali cât și amestecuri ale acestora.

Rezultatele prezentate în Figura 4.30 prezintă diferite afinități pentru ionii testați în funcție de compoziția chimică a materialelor compozite și condițiile de competitivitate/noncompetitivitate. De asemenea, capacitatea de sorbție pentru diferiți ioni poate fi corelată cu compoziția în polimorfi a materialelor compozite, procesul de sorbție total fiind atribuit diferiților parametri de sorbție. Un parametru important este legat de capacitatea matricii polimerice de a adsorbi molecule ionice și de prezența PEI în compozite, polimer cunoscut pentru capacitatea sa de complexare a ionilor, favorizând sorbția ionilor metalelor grele. Disponibilitatea grupelor funcționale după creșterea CaCO_3 și depunerea alternantă a straturilor de polimeri cresc și mai mult capacitatea de sorbție a compozitelor. De obicei, microparticulele preparate cu polimeri ce conțin grupe funcționale carboxilice au o mare afinitate pentru ionii de Cu^{2+} (seria afinității: $\text{H}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$), adsorbind ionii de cupru printr-o reacție de echilibru de schimb ionic. Grupele amină din probele *c* și *d* nu interacționează cu cationi metalici, reducând astfel eficiența sorbției.

PEIB, cu lanțuri ramificate, s-a depus pe suprafața solidă în cantitate mai mare decât PEIL, la același număr de straturi adsorbite. Catenele de PEIL sunt adsorbite la fiecare etapă de depunere într-o conformație mai plată datorită structurilor liniare. Astfel, probabilitatea interacțiunii ionilor metalici și ulterior sorbția acestora pe substratul compozit este mai mică în cazul compozitelor cu PEIL decât cu PEIB. În plus, PEIB conține grupe aminice primare care au reactivitate mai mare pentru ionii metalici comparativ cu grupele aminice secundare sau iminice. În toate cazurile, PAA a rămas constant, prin urmare diferența de sorbție dintre diferitele tipuri de compozite poate fi atribuită în principal lanțurilor policationice. În concluzie, compozitele cu PEIB au prezentat o capacitate de sorbție mai mare, la un număr constant de straturi depuse (7 straturi).

Microparticulele compozite pe bază de CaCO_3 și acoperite cu multistraturi de polielectroliți conțin lanțuri flexibile cu densitate mare de grupe aminice/carboxilice pe suprafață, grupe care sunt ușor accesibile pentru ionii metalelor grele, chiar și în concentrație mică. Testele de sorbție sugerează o capacitate maximă de sorbție de până la 800 mg de ioni per gram de multistrat, raportată doar la partea organică, parametrul de difuzie în acest caz fiind foarte mic datorită filmului polimeric depus pe materialul compozit.

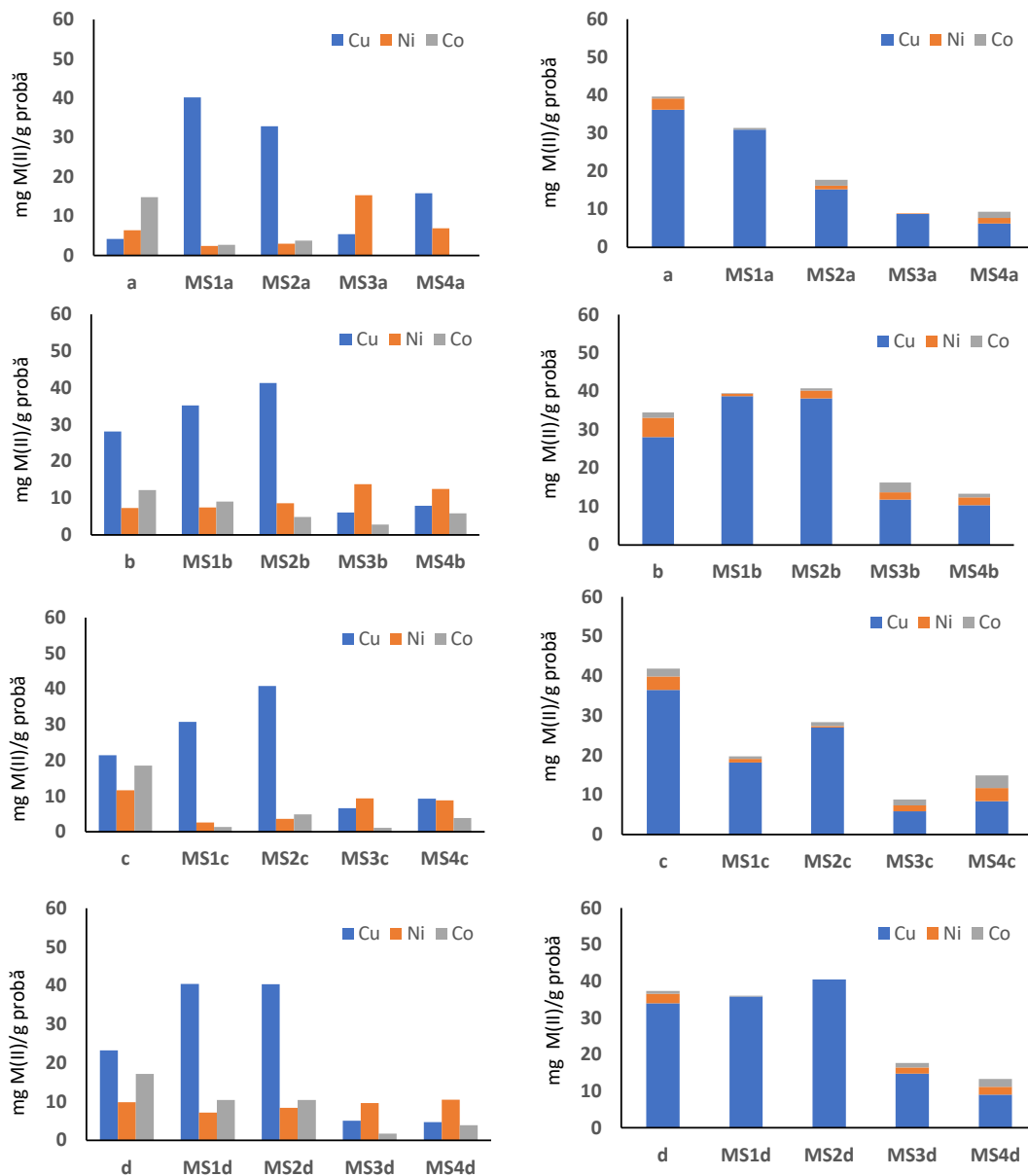


Figura 4.30. Rezultate AAS pentru sorbția ($\text{mg M}^{2+}/\text{g probă}$) soluțiilor de ioni individuali (coloana din stânga) și amestecuri de ioni de Cu^{2+} , Ni^{2+} și Co^{2+} (coloana din dreapta) [Zaharia, 2021b].

CAPITOLUL 5. MATERIALE COMPOZITE RETICULATE PE BAZĂ DE CARBONAT DE CALCIU PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE ȘI ÎN PROTECȚIA MEDIULUI

5.1.1. Materiale compozite sub formă de criogeluri/carbonat de calciu

O serie de criogeluri pe bază de chitosan, sintetizate utilizând chitosanul și poli(metacrilatul de metil) ca porogen (Tabelul 3.1, Capitolul 3), au fost utilizate ca substrat pentru creșterea CaCO_3 ,

aplicând diferite metode (alternantă, amestec sau în exicator) și diferite surse de carbonat (Na_2CO_3 , DMC, DEC, NH_4HCO_3), detaliate în Capitolul 3, subcapitolul 3.2.5.

Tipurile de polimorfi ai carbonatului de calciu obținuți prin cele patru metode aplicate au fost investigate prin FTIR-ATR și XRD. Tabelul 5.1 conține rezultatele fitării prin metoda de decompoziție și dimensiunile cristalitelor. Analiza cantitativă bazată pe înălțimea relativă a picurilor corespunzătoare din difractogramele XRD a demonstrat că în cazul experimentelor cu DEC, DMC și controlate prin difuzie până la 14 zile, calcitul este în proporție de 100%, indiferent de proprietățile criogelului templat. Când s-a aplicat metoda de creștere alternantă, conținutul de calcit a scăzut până la 40% după 4 pași alternanți, crescând odată cu creșterea numărului de pași alternanți la 8. Aceste diferențe pot apărea datorită variației suprasaturației din experimente – amestecare directă vs difuzie, având în vedere că în cazul experimentelor cu amestecare directă, indiferent de sursa de carbonat (DEC sau DMC), procedura de preparare crează imediat suprasaturație.

Dimensiunea cristalitelor de calcit a variat în funcție de metoda de cristalizare aplicată și de dimensiunea porilor criogelurilor, și a depins de saturația locală favorizată de condițiile mediului din compartimentele criogelurilor. Astfel, constantele structurale pentru fiecare polimorf al CaCO_3 au fost mai puțin influențate de raportul dintre fracțiile polimorfilor, valorile medii fiind $a = b = 4,9559 \pm 0,0188 \text{ \AA}$ și $c = 16,9450 \pm 0,1689 \text{ \AA}$ pentru calcit și $a = 4,1377 \pm 0,0638 \text{ \AA}$, $b = 7,0649 \pm 0,1049 \text{ \AA}$ și $c = 8,4467 \pm 0,1046 \text{ \AA}$ pentru vaterit. Conținutul de NH_4Cl a crescut odată cu creșterea timpului de difuzie. De obicei, în cazul metodei de cristalizare prin difuzie, are loc descompunerea carbonatului de amoniu în NH_3 și CO_2 care împreună cu apa conduc la formarea ionilor de amoniu (NH_4^+) și carbonat (CO_3^{2-}). Rolul amoniului dizolvat este de a crește pH-ul soluției, favorizând precipitarea CaCO_3 . La concentrații ridicate o parte din amoniac se combină cu ionii de clorură, nuclează și favorizează creșterea cristalelor cubice de NH_4Cl [Zhou, 2020].

5.1.1.4. Teste de biocompatibilitate

Rezultatele prezentate mai sus arată că probele cele mai uniforme au fost obținute după 14 zile de creștere a CaCO_3 prin metoda difuziei lente în exicator (E14), indiferent de morfologia criogelului. Prin urmare, aceste probe au fost selectate pentru efectuarea unor teste de biocompatibilitate.

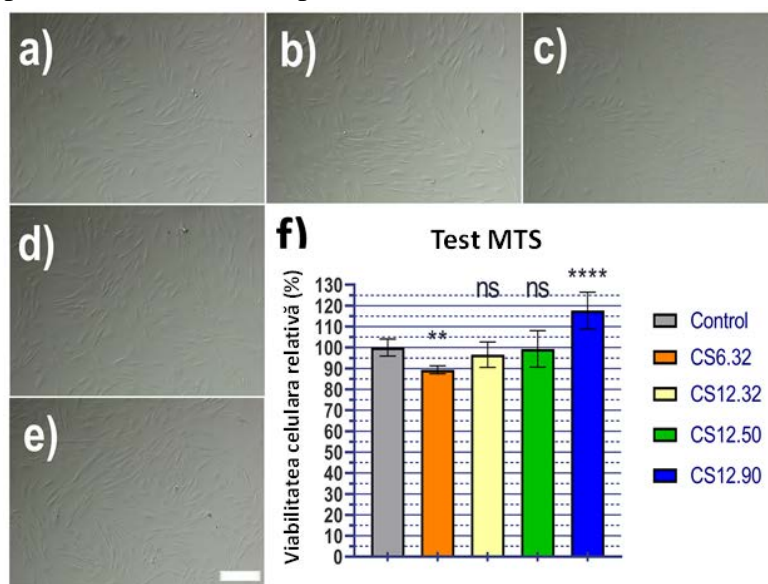


Figura 5.9. Imagini de microscopie optică ale celulelor NHDF după o incubare de 48 de ore prezența probelor: a) CS6.32[E14], b) CS12.32[E14], c) CS12.50[E14], d) CS12.90[E14], e) control: celule cultivate fără prezența materialelor; f) viabilitatea celulară relativă determinată prin testul MTS asupra probelor E14; $n = 12$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$, $ns = ne-semnificativ$ [Vasiliu, 2021a].

Celulele NHDF tratate cu CS12,90 au avut o viabilitate relativă față de control de 117%, în timp ce celulele tratate cu CS12,32 și CS12,50 nu au prezentat o viabilitate statistic diferită față de control. Singurul material care a indus o scădere a viabilității a fost CS6,32, celule tratate cu acest material având o viabilitate relativă de 89%. La analiza optică sub microscop, celulele NHDF prezintă o morfologie normală pentru toate probele. De asemenea, nu există diferențe semnificative în ceea ce privește proliferarea și gradul de confluență (Figura 5.9, f).

5.1.2. Materiale compozite sub formă de schimbători de ioni/carbonat de calciu

Formarea materialelor compozite cu CaCO₃ (Subcapitolul 3.2.6) a fost realizată folosind perlele de schimbători de ioni IExDEA₃ funcționalizate cu grupe anionice (-COOH), aminice (EDA, TETA, DMABA) și amfotere (Capitolul 3, Schema 3.5), gradul de reticulare de 3% DVB permițând rețelei tridimensionale să fie flexibile și să se umfle, ceea ce permite și creșterea cristalelor în interiorul sferelor poroase.

Prezența carbonatului de calciu în materialele compozite, precum și tipul de polimorf obținut, au fost evidențiate prin difracție de raze X (Tabelul 5.2).

Tabelul 5.2. Analiza cantitativă XRD a compozitelor IExDEA₃/CaCO₃ [Zaharia, 2021a]

IEx	Timp (zile)	Faza	Wf, wt%	Parametrii structurii cristaline, Å		V _L , Å	S	C _s , Å
				a=b	c			
IExDEA ₃ -COOH	5	Calcit	100	4,966	17,035	363,820	0,9798	51,8
IExDEA ₃ -COOH	11	Calcit	100	4,990	17,010	366,768	0,9605	176
IExDEA ₃ -TETA	5	Calcit	100	4,998	17,660	382,046	0,9551	253
IExDEA ₃ -TETA	11	Calcit	100	5,006	17,016	369,329	1,0218	323
IExDEA ₃ -EDA	5	Calcit	100	4,969	17,099	365,625	1,0623	360
IExDEA ₃ -EDA	11	Calcit	100	4,988	17,060	367,550	1,1111	857
IExDEA ₃ -EDA-DMABA	5	Calcit	100	4,895	16,810	348,815	0,9808	74
IExDEA ₃ -EDA-DMABA	11	Calcit	100	4,092	18,252	264,610	0,9349	572
IExDEA ₃ -EDA-Zw	5	Calcit	53,3	4,994	17,071	368,740	1,0990	463
		Vaterit	46,7	4,130	8,471	250,463		538
	11	Calcit	93,5	4,994	17,079	368,912	1,0041	523
		Vaterit	6,5	4,135	8,478	251,381		297

Wf – fracția masică de polimorf, V_L – volumul structurii cristaline, S – factor de încredere (“goodness-of-fit”), care ar trebui să fie cât mai aproape de 1,0 la finalul rafinamentului, C_s – dimensiunea cristalitelor

Analiza de raze X a arătat că polimorf format este calcitul pentru toate probele investigate, cu excepția IExDEA₃-EDA-Zw, care conține o combinație de calcit și vaterit. Intensitatea picurilor caracteristice pentru vaterit din proba IExDEA₃-EDA-Zw a scăzut după 11 zile, comparativ cu probele obținute după 5 zile, ceea ce susține faptul că vateritul se transformă treptat în calcit, cel mai stabil polimorf al CaCO₃. A fost demonstrat anterior [Wang, 2013] că după 4 zile în excicator, cristalele de vaterit formate inițial încep să se dizolve simultan cu creșterea cristalelor de calcit deja existente. În studiul prezent a avut loc un fenomen similar în cazul probei IExDEA₃-EDA-Zw, însă

mai lent, în sensul că după 5 zile în exicator conținutul de polimorfi era de 53,3% calcit și 46,7% vaterit, conform datelor XRD. După 11 zile în exicator, conținutul de vaterit a scăzut până la 6,5%, scăzând totodată și dimensiunea cristalitelor de vaterit de la 538 Å la 297 Å (Tabelul 5.2), sugerând că un timp de reacție mai lung ar putea duce la transformarea completă a vateritului în calcit, prin mecanismul de maturare Ostwald.

Datele XRD arată că dimensiunea cristalitelor de calcit crește în timp pentru toate probele investigate, de la $227,040 \pm 195,563$ Å până la $490,200 \pm 259,320$ Å. În plus, parametrii unității structurale pentru calcit după 5 zile de reacție sunt $a = b = 4,964 \pm 0,041$ Å, $c = 17,135 \pm 0,315$ Å, în timp ce după 11 zile de reacție parametrii sunt $a = b = 4,814 \pm 0,404$ Å și $c = 17,283 \pm 0,542$ Å, sugerând că unitatea structurală nu se modifică în timp.

5.2.1. Aplicații în protecția mediului ale materialelor compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu

5.2.1.1. Sorbții de coloranți pe compozite carbonat de calciu/schimbători de ioni obținute prin amestecare rapidă

În acest studiu, materialele compozite investigate pentru sorbția de coloranți (BCG și NR) au fost obținute prin amestecarea rapidă a precursorilor carbonatului de calciu, din concentrații inițiale de 0,1 – 0,4 M prin ambele protocoale de adiție, conform Metodei 1 a subcapitolului 3.2.6, din Capitolul 3. Capacitatea de sorbție (C_{SO}) a fost determinată luând în considerare concentrațiile soluțiilor inițiale și concentrația reziduală a supernatantului. Figurile 5.13 și 5.14 prezintă rezultatele obținute prin măsurarea absorbției supernatantului la o lungime de undă specifică, și anume la 615 nm pentru BCG, A_{615} , și 450 nm pentru NR, A_{450} , pentru toate probele investigate și ambii coloranți.

Așa cum se observă în Figura 5.13, cea mai mare capacitate de sorbție a BCG a fost obținută când s-au folosit perle de tip cationic, $\sim 0,45$ mg/g, atribuită interacțiunilor electrostatice dintre sorbent și colorant, luând în considerare faptul că moleculele de colorant BCG sunt anionice (Schema 3.7). După creșterea microparticulelor de CaCO_3 pe perlele schimbătoare de ioni, capacitatea de sorbție este influențată de ordinea adăugării reactanților și mai puțin de concentrația anorganică, capacitatea de sorbție scăzând la $\sim 0,06$ mg/g când primul reactant adăugat în prepararea CaCO_3 a fost Na_2CO_3 , și crescând până la $\sim 0,58$ mg/g atunci când s-a utilizat CaCl_2 . Luând în considerare natura cationică a perlelor, atunci când Na_2CO_3 a fost primul reactant, interacțiunile electrostatice dintre grupele NH_3^+ de pe schimbătorul de ioni și CO_3^{2-} au blocat grupele cationice ale sorbentului pentru interacțiunile electrostatice cu colorantul anionic. Însă, când s-a utilizat CaCl_2 grupele aminice au fost libere să interacționeze cu grupele anionice din BCG și au prezentat cea mai mare capacitate de sorbție.

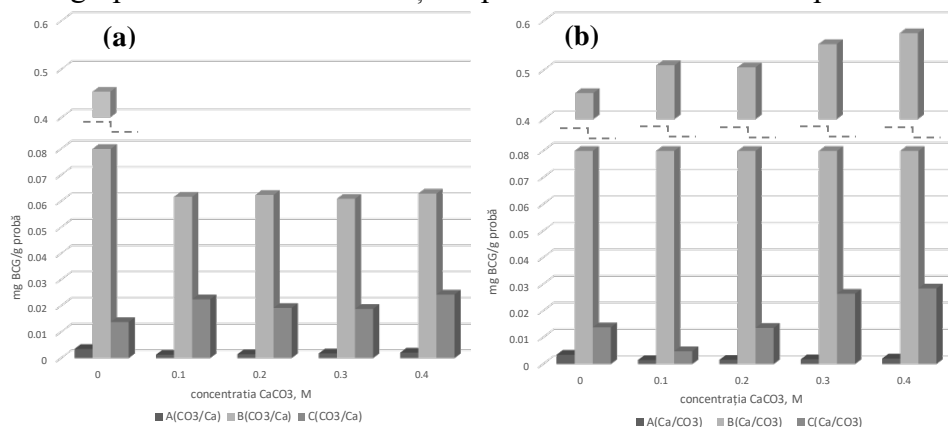


Figura 5.13. Sorbția verdelui bromocresol (BCG) pe perle anionice (A), cationice (B) și amfotere (C), înainte și după creșterea CaCO_3 din soluții cu concentrații inițiale de 0,1 – 0,4 M și ambele protocoale de adiție: (a) $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{CaCl}_2$, (b) $\text{CaCl}_2 / \text{Na}_2\text{CO}_3$ [Mihai, 2017c].

Când au fost utilizate perlele de tip anionic și amfoter, grupele anionice ale ambelor tipuri de perle au condus la o repulsie electrostatică a moleculelor de colorant. Astfel, C_{SO} pentru compozitele pe bază de perle anionice (tip A) este mai mică de 0,0035 mg/g (practic nu adsorb BCG), indiferent de concentrația anorganică și ordinea de adăugare. Perlele amfotere (tip C) au grupele anionice ionizate la pH mai mic de 6,5 și au prezentat o capacitate de sorbție ușor crescută (0,014 mg/g) comparativ cu perlele anionice (tip A). Capacitatea de sorbție crescută poate fi atribuită legăturilor de hidrogen care se pot forma între grupele aminice secundare de pe lanțurile secundare ale perlelor și grupările OH ale BCG. După creșterea $CaCO_3$ pe perlele amfotere de tip C, capacitatea de sorbție a compozitelor crește comparativ cu perlele corespunzătoare inițiale, valoarea cea mai mare, de ~0,03 mg/g, fiind obținută atunci când $CaCO_3$ a crescut din soluții anorganice de concentrație 0,4 M și $CaCl_2$ a fost primul reactant adăugat.

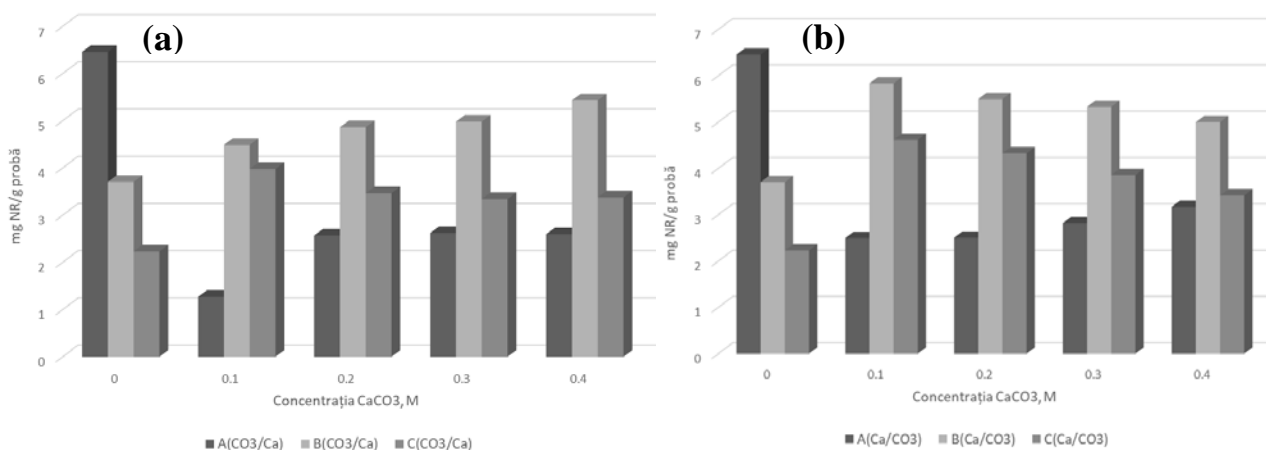


Figura 5.14. Sorbția roșului neutru (NR) pe perlele copolimerice anionice (A), cationice (B) și amfotere (C), înainte și după creșterea $CaCO_3$ din soluții cu concentrație inițială de 0,1 – 0,4 M prin ambele procedee de adiție: (a) $Na_2CO_3 / CaCl_2$, (b) $CaCl_2 / Na_2CO_3$ [Mihai, 2017c].

Sorbția colorantului NR pe probele compozite are un comportament diferit comparativ cu sorbția BCG. Toate probele au prezentat o bună capacitate de sorbție pentru NR, cea mai mare valoare fiind obținută atunci când s-au utilizat perlele cationice, indiferent de ordinea de adăugare a reactanților. Capacitatea de sorbție a perlelor de tip B nu poate fi explicată prin interacțiunile electrostatice, în acest caz fiind relevante proprietățile $CaCO_3$. După cum arată un studiu anterior [Mihai, 2015a], perlele cationice de tip B sunt acoperite cu un strat subțire de cristale de $CaCO_3$ cu dimensiuni mai mici decât cele formate pe suprafața perlelor anionice de tip A, dimensiunea cristalelor crescând odată cu creșterea concentrației fazei anorganice. De asemenea, porii sferelor rămân deschiși în timpul fazei de umflare și astfel creșterea cristalelor de $CaCO_3$ are loc în interiorul porilor, după cum s-a dovedit prin microscopie de forță atomică [Mihai, 2015a]. Prin urmare, stratul uniform obținut pe suprafața perlelor cationice de tip B și prezența cristalelor de $CaCO_3$ în interiorul porilor determină o capacitate de sorbție mai mare.

Rezultatele sorbției coloranților pot fi explicate prin contribuția sinergetică a componentelor organic/anorganice în timpul interacțiunii cu coloranții: (1) capacitatea matricei polimerice de sorbție a coloranților prin interacțiuni electrostatice sau legături de hidrogen, (2) disponibilitatea grupelor funcționale după creșterea $CaCO_3$, (3) distribuția cristalelor de $CaCO_3$ pe perle, (4) capacitatea cristalelor de a interacționa cu coloranții ca funcție a aranjării acestora pe perle.

5.2.1.2. Sorbții de coloranți pe compozite carbonat de calciu/schimători de ioni obținute prin difuzie lentă

Pentru testele de sorbție a coloranților, în acest caz s-au utilizat perle schimbătoare de ioni precum și compozitele corespunzătoare după 5 zile de creștere a CaCO₃ în exicator, conform Metodei 2 din subcapitolul 3.2.6, Capitolul 3. Figura 5.18 prezintă spectrele UV-Vis ale soluțiilor de supernatant după protocolul de sorbție, pentru ambii coloranți. Banda de absorbție caracteristică pentru BCG, la 615 nm, este clar vizibilă pentru probele anionice și amfotere, ceea ce înseamnă că BCG nu a fost adsorbit de probele investigate. De asemenea, banda de adsorbție pentru NR de la 276 nm este vizibilă în toate spectrele, sugerând că acest colorant nu a fost adsorbit în totalitate de probele investigate.

Capacitatea de sorbție (C_{SO}) a perlelor și compozitelor corespunzătoare pentru coloranții BCG și NR este rezumată în Tabelul 5.4. După cum se poate observa, capacitatea de sorbție este în corelație directă cu CRE. Astfel, perlele IExDEA₃-COOH și compozitele corepunzătoare nu adsorb colorantul BCG (C_{SO} ~ 0,005 mg/g), datorită prezenței grupelor funcționale anionice atât în colorant, cât și în probe, ceea ce duce la o repulsie electrostatică. Perlele și compozitele amfotere au prezentat o creștere a C_{SO} datorită prezenței atât a grupelor funcționale anionice, cât și cationice, cu un maxim de 0,566 mg/g. Toate probele cationice au prezentat valori foarte bune ale C_{SO}, până la 2,247 mg/g (proba IExDEA₃-EDA-DMABA), datorită prezenței grupelor funcționale de semn opus din colorant și din probele investigate. Cristalizarea CaCO₃ pe perle nu a influențat semnificativ capacitatea de sorbție a colorantului BCG.

Probele cationice au prezentat valori ale C_{SO} mai mici pentru colorantul NR, comparativ cu probele anionice și amfotere. Cristalizarea CaCO₃ pe perle a crescut capacitatea de sorbție a acestora, ceea ce ar putea însemna că mecanismul de sorbție este influențat atât de interacțiunile electrostatice dintre grupele funcționale ale colorantului și cele ale matricii polimerice, cât și de capacitatea cristalelor de CaCO₃ de a interacționa cu colorantul, după cum a demonstrat un studiu anterior [Mihai, 2017c]. Prin urmare, capacitatea de sorbție cea mai mare pentru NR (2,288 mg/g) s-a întâlnit în cazul compozitului anionic IExDEA₃-COOH/CaCO₃.

Tabelul 5.4. Capacitatea de sorbție a coloranților pentru perlele și compozitele corespunzătoare [Zaharia, 2021a]

IEx	BCG C _{so} , mg/g		NR C _{so} , mg/g	
	IExDEA ₃	IExDEA ₃ /CaCO ₃	IExDEA ₃	IExDEA ₃ /CaCO ₃
IExDEA ₃ -COOH	0,004	0,005	2,207	2,288
IExDEA ₃ -TETA	2,211	2,229	0,387	0,733
IExDEA ₃ -EDA	2,176	2,198	0,268	0,210
IExDEA ₃ -EDA-DMABA	2,247	2,137	0,716	1,237
IExDEA ₃ -EDA-Zw	0,566	0,465	1,688	2,234

Capacitatea de sorbție pentru BCG și NR a fost investigată anterior (subcapitolul 5.2.1.1) pentru compozite similare (IExDEA₃-COOH/CaCO₃, IExDEA₃-EDA/CaCO₃ și IExDEA₃-EDA-Zw/CaCO₃), dar care au fost obținute prin precipitarea rapidă a CaCl₂ și Na₂CO₃ [Mihai, 2017c]. Compozitele anionice obținute prin metoda de precipitare rapidă au prezentat valori mai mari ale C_{SO} pentru colorantul BCG (0,3513 mg/g) comparativ cu metoda de difuzie lentă (0,005 mg/g), dar valori mai mici ale C_{SO} pentru colorantul NR (1,4579 mg/g pentru precipitarea rapidă și 2,288 mg/g pentru difuzie). Compozitele cationice au avut o capacitate de sorbție mai mică pentru BCG când au fost obținute prin precipitare rapidă, dar valori mai mari pentru colorantul NR. În cazul compozitelor amfotere, ambele capacități de sorbție au crescut atunci când s-a folosit metoda de difuzie lentă, de la 0,0138 mg/g la 0,465 mg/g pentru BCG, și de la 0,4229 mg/g la 2,234 mg/g pentru NR. Aceasta

este o dovadă suplimentară că C_{SO} pentru coloranții BCG și NR este influențată de metoda de creștere a carbonatului de calciu, care la rândul ei dictează tipul și conținutul de polimorfi ai carbonatului de calciu și dimensiunea cristalitelor.

5.2.2. Aplicații biomedicale ale materialelor compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu

5.2.2.1. Teste de încărcare/eliberare a tetraciclinei în/din materiale compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu

Perlele schimbătoare de ioni și materialele compozite IEx/ $CaCO_3$ au fost investigate ca posibile materiale pentru eliberarea controlată a TCH. Deși capacitatea maximă de sorbție pentru coloranții BCG și NR este similară (2,247 mg/g, respectiv 2,288 mg/g), dar depinde de grupele funcționale ale sorbentului, toate probele investigate au prezentat o capacitate de sorbție semnificativ mai mare pentru TCH, până la 50,247 mg/g (Figura 5.20).

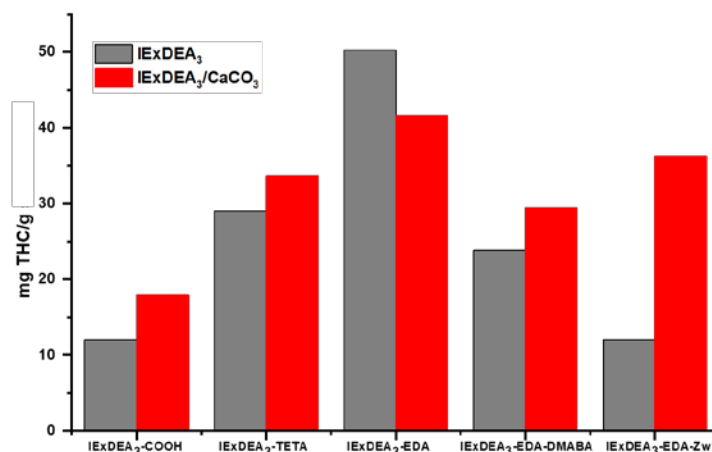


Figura 5.20. Capacitatea de sorbție a TCH de către toate probele investigate [Zaharia, 2021a].

Valorile capacității de sorbție a TCH au fost mai mari în cazul probelor cu matrice polimerică cationică, comparativ cu probele anionice și amfotere. Compozitele IExDEA₃/CaCO₃ au prezentat o creștere a capacității de sorbție a TCH, datorită contribuției sinergetice a mai multor factori (capacitatea matricei polimerice de a adsorbi TCH prin legături electrostatice, disponibilitatea grupelor funcționale după creșterea CaCO₃, distribuția cristalelor de CaCO₃ pe probe și capacitatea cristalelor de a interacționa cu TCH), după cum a fost demonstrat anterior [Mihai, 2017a]. Cu toate acestea, cea mai mică valoare a capacității de sorbție pentru TCH (11,958 mg/g), întâlnită în cazul probei IExDEA₃-COOH, este considerabil mai mare decât cea mai mare valoare a capacității de sorbție pentru coloranți, sugerând că indiferent de natura matricei polimerice, probele investigate au o capacitate de sorbție foarte bună pentru medicamentul model.

În Tabelul 5.5 sunt rezumate datele obținute din graficele eliberării TCH din microsferile polimerice, în soluție tampon fosfat la pH 7,4, timp de 72 de ore, la o temperatură constantă de 37°C. S-a observat o eliberare foarte rapidă a medicamentului la doar 2 minute după imersie, înregistrând un grad de eliberare de până la 37,7% în cazul probei IExDEA₃-COOH. Conform profilului de eliberare al probelor investigate, eliberarea inițială bruscă a TCH poate fi atribuită difuziei rapide a medicamentului localizat la suprafața probelor. Ulterior se poate observa un comportament de eliberare graduală care s-a extins până la 15 ore, când s-a atins echilibrul. Deși probele au fost ținute în mediul de simulare timp de 72 de ore, 50% din cantitatea de medicament încărcată (sau chiar mai mult) a rămas blocată în miezul microsferelor (datele nu sunt prezentate), sugerând stabilitatea probelor la pH-ul testat și necesitatea de a evalua mecanismul de eliberare la un pH diferit (într-un studiu viitor).

Tabelul 5.5. Caracteristicile eliberării in vitro a TCH pentru perlele schimbătoare de ioni și compozitele corespunzătoare [Zaharia, 2021a]

IEx	t_{max}, minute	DR₂, %	DR_{max}, %
IExDEA ₃ -COOH	140	37,75	50,99
IExDEA ₃ -TETA	285	33,63	43,61
IExDEA ₃ -EDA	220	23,23	28,63
IExDEA ₃ -EDA-DMABA	870	16,23	27,92
IExDEA ₃ -EDA-Zw	210	32,79	36,73
IExDEA ₃ -COOH/CaCO ₃	240	26,20	90,20
IExDEA ₃ -TETA/CaCO ₃	360	34,79	85,37
IExDEA ₃ -EDA/CaCO ₃	480	25,73	71,42
IExDEA ₃ -EDA-DMABA/CaCO ₃	540	17,21	32,18
IExDEA ₃ -EDA-Zw/CaCO ₃	540	25,14	91,92

t_{max} = timpul pentru a ajunge la cantitatea maximă eliberată; DR₂ = gradul de eliberare a medicamentului după 2 minute; DR_{max} = gradul maxim de medicament eliberat

Se poate observa din Tabelul 5.5 că prezența carbonatului de calciu în compoziția microsferelor a dus la o eliberare mai lentă a medicamentului. Proba IExDEA₃-COOH a prezentat cea mai rapidă eliberare a medicamentului, timpul pentru a atinge cantitatea maximă de TCH eliberată (t_{max}) fiind de doar 140 minute. În plus, gradul maxim de eliberare a TCH pentru această probă a fost cel mai mare, de 50,99%. Din contra, proba IExDEA₃-EDA-DMABA a înregistrat cel mai mic procent de medicament eliberat la echilibru (16,23%), dar cu cel mai lung timp de eliberare a medicamentului (870 minute). Această tendință s-a menținut și în cazul materialelor compozite corespunzătoare.

CAPITOLUL 6. MATERIALE COMPOZITE HIDROFOBE PE BAZĂ DE CARBONAT DE CALCIU ȘI POLIMERI IONICI CU APLICAȚII BIOMEDICALE

6.1.1. Sinteza și caracterizarea unor complecși polielectrolitici nestoechiometrici

În acest studiu raportul polianion/polication a fost de 0,5, polianionul în exces determinând încărcarea negativă a nanoparticulelor de CPN. În Tabelul 6.1 sunt rezumate caracteristicile CPN formați cu toate perechile polimerice investigate.

Tabelul 6.1. Caracteristicile CPN [Vasilii, 2021b].

Codul probei	Dh	PDI	ZP	Mb	Cd
	nm		mV	μmcm/Vs	mS/cm
CS/PAA	198,633	0,234	-40,900	3,204	0,213
CS/PAMPS	194,333	0,230	-46,033	3,607	0,192
CS/PSA	269,067	0,280	-32,267	2,529	0,204
PAH/PAA	129,567	0,122	-36,933	2,895	0,093
PAH/PAMPS	119,700	0,141	-42,700	3,347	0,085
PAH/PSA	150,467	0,114	-29,933	2,348	0,252

Dh – diametru hidrodinamic, PDI – indice de polidispersitate, ZP – potențial zeta, Mb- mobilitate electroforetică și Cd – conductivitate

Diametrul hidrodinamic (Dh) al particulelor de CPN a depins de perechea de polianion/polication utilizată, variind în domeniul 120-270 nm. Astfel, pentru același polication (CS

sau PAH) cea mai mică dimensiune a fost obținută cu PAMPS, iar cea mai mare cu PSA. De asemenea, CPN cu dimensiuni mai mici au fost obținuți când s-a utilizat PAH comparativ cu nanoparticulele cu CS. Rezultatele pot fi explicate prin conformația catenelor macromoleculare și capacitatea acestora de a compensa intrinsec sarcinile ionice complementare. Astfel, când s-a utilizat PAH, macromolecula cu cea mai mare flexibilitate, s-au obținut nanoparticule cu dimensiune mai mică. În caz contrar, când s-a utilizat CS, care are catenă semi-rigidă și, prin urmare, capacitate mai mică de compensare intrinsecă a sarcinilor și o mobilitate mai scăzută a lanțurilor, s-au obținut particule mai mari.

Valorile potențialului Zeta susțin aceste observații, nanoparticule încărcate mai negativ obținându-se atunci când are loc cea mai facilă compensare de sarcini, când se detectează o cantitate mai mare de sarcini a polianionului în exces. Indicele de polidispersitate (PDI) descrie heterogeneitatea dimensională a probelor, valori mai mari de 0,2 indicând o distribuție a dimensiunilor relativ extinsă. În acest studiu, valorile PDI sunt apropiate de 0,2 pentru CPN pe bază de CS, în timp ce la utilizarea PAH s-au obținut nanoparticule monodisperse, indiferent de polianionul folosit.

6.1.2. Materiale compozite hidrofobe pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici sau complecși polielectrolitici nestoechiometrici

Dispersiile de CPN și polianionii au fost folosiți pentru a controla creșterea cristalelor de CaCO_3 pe suprafața materialului neșesut initial (NWM) sau tratat cu policationi (NWM_{CS} și NWM_{PAH}). Materialul inițial prezintă o structură tip rețea legată prin fibre întrepătrunse cu un diametru mediu de $152 \pm 31 \mu\text{m}$ (determinat prin măsurarea a 20 de fibre cu programul ImageJ), morfologia suprafeței fibrelor fiind netedă (Figura 6.1A, a). După tratarea cu policationii CS și PAH, imaginile corespunzătoare ale NWM_{CS} și NWM_{PAH} nu prezintă modificări considerabile în imaginile de ansamblu, însă la o mărire mai mare se poate observa formarea unui strat subțire de polication la suprafața fibrelor (Figurile 6.2A, a).

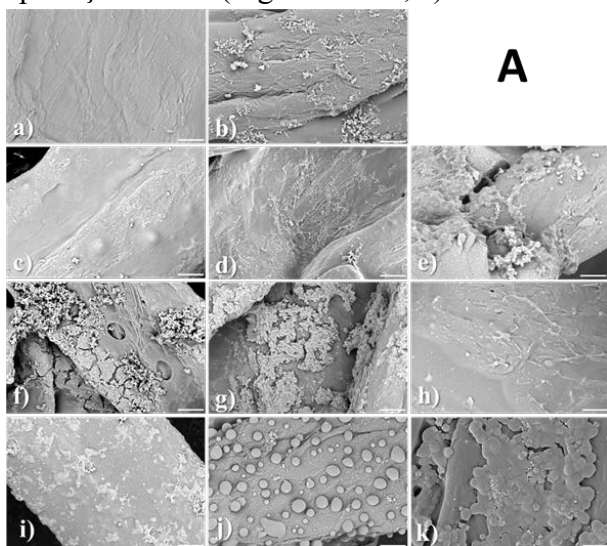


Figura 6.1. Imaginile SEM ale NWM și compozitelor corespunzătoare

(A - scală $10 \mu\text{m}$) a) NWM/ NWM_{CS} , b) $+\text{CaCO}_3$, c) $+\text{CaCO}_3/\text{PAA}$, d) $+\text{CaCO}_3/\text{PAMPS}$, e) $+\text{CaCO}_3/\text{PSA}$, f) $+\text{CaCO}_3/(\text{CS}/\text{PAA})$, g) $+\text{CaCO}_3/(\text{CS}/\text{PAMPS})$, h) $+\text{CaCO}_3/(\text{CS}/\text{PSA})$, i) $+\text{CaCO}_3/(\text{PAH}/\text{PAA})$, j) $+\text{CaCO}_3/(\text{PAH}/\text{PAMPS})$, k) $+\text{CaCO}_3/(\text{PAH}/\text{PSA})$ [Vasiliu, 2021b].

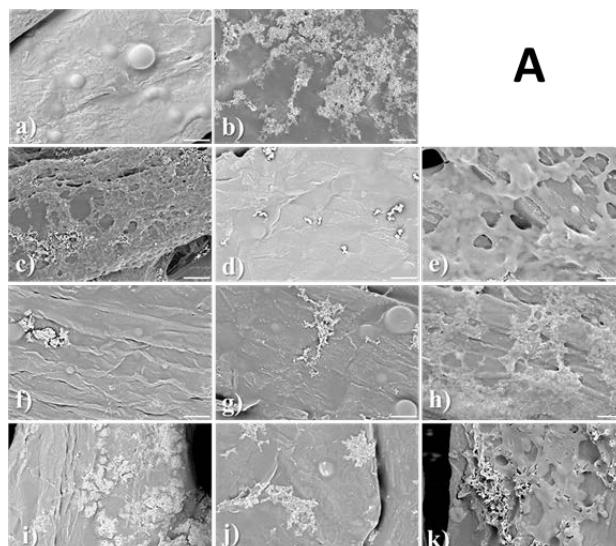


Figura 6.2. Imaginile SEM ale NWM_{CS} și compozitelor corespunzătoare

Metoda utilizată pentru creșterea cristalelor se bazează pe difuzia carbonatului de amoniu, precipitarea CaCO_3 fiind indusă prin expunerea soluției care conține ioni de calciu la vaporii eliberați

prin descompunerea carbonatului de amoniu, în recipient închis ermetic (exicator). Când materialul initial (NWM) și probele tratate cu policationi, NWM_{CS} și NWM_{PAH} , s-au introdus în mediul de cristalizare (Figurile 6.1A b, 6.2A b și 6.3A b) suprafața fibrelor a fost acoperită cu un strat subțire de $CaCO_3$ în cazul probelor NWM și NWM_{CS} , pe când proba NWM_{PAH} a permis formarea unui strat mai gros de microcristale. Aceste diferențe sunt corelate cu grupele funcționale de pe suprafața fibrelor, care acționează ca centre de nucleere. Astfel, pentru proba de NWM, fibrele conțin celuloză. Chitosanul, din proba NWM_{CS} , are o structură moleculară asemănătoare celulozei, cu excepția unei grupe $-OH$ de pe fiecare unitate repetitivă (la poziția C2) care este înlocuită de o grupare aminică. Atât grupele aminice din CS, cât și grupele hidroxil din celuloză au rol de centre de nucleere pentru creșterea $CaCO_3$. PAH, însă, este un polimer sintetic cu catenă liniară, oferind acces ușor la grupele ionizate aminice, permițând astfel cristalizarea $CaCO_3$ în cantitate mai mare.

Când s-au introdus în mediul de reacție polianionii PAA (Figurile 6.1-6.3 c), PAMPS (Figura 6.1-6.3 d) și PSA (Figura 6.1-6.3 e), se poate observa formarea unui strat compozit pe suprafața fibrelor, rezultat prin interacțiuni electrostatice între polielectroliții complementari (policationul de pe suprafața NWM și polianionul din soluție), iar creșterea $CaCO_3$ este controlată, cel mai probabil, de polianionul deja adsorbit pe suprafața fibrelor.

Într-un studiu anterior [Mihai, 2013 b], CPN au fost utilizați pentru a controla creșterea cristalelor de $CaCO_3$ într-un proces de precipitare rapidă în soluții suprasaturate. În acest studiu, este prima dată când CPN sunt folosiți în metoda de difuzie a carbonatului de amoniu pentru creșterea $CaCO_3$ pe materiale NWM. Nanoparticulele de CPN sunt încărcate negativ datorită polianionilor în exces (Tabelul 6.1) și este de așteptat ca aceștia să fie reținuți electrostatic la suprafața fibrelor, în special în cazul celor tratate cu polication. Această presupunere este susținută de imaginile SEM din Figurile 6.1-6.3 (f-k). Cu toate acestea, imaginile SEM evidențiază prezența CPN și la suprafața materialului NWM, împreună cu mici cristale de $CaCO_3$, indiferent de perechea de polication/polianion (Figura 6.1A f-k). Micile diferențe de morfologie a suprafeței materialelor pot fi atribuite caracteristicilor CPN (dimensiune, potențial Zeta) și capacității polianionului în exces de a controla nucleația și mecanismul de cristalizare.

Astfel, materialul initial (NWM) și probele tratate cu policationii CS sau PAH sunt acoperite cu diferite straturi subțiri, structurate, în funcție de grupele funcționale de pe suprafața materialului și de polianionii sau CPN folosiți în mediul de cristalizare. Cu toate acestea, atât analiza calitativă XRD a compozitelor pe bază de NWM_{CS} , cât și măsurătorile cantitative arată doar formarea polimorfului calcit, cu un volum mediu al structurii cristaline de $363,2 \pm 6,4 \text{ \AA}$, cu diferite valori ale dimensiunilor cristalelor, în funcție de polimerul sau CPN utilizați.

Structurile observate pe suprafața fibrelor, determinate de prezența unui strat subțire de $CaCO_3$ sau $CaCO_3$ /polimer, este de așteptat să scadă energia de suprafață a materialelor, obținându-se astfel suprafețe hidrofobe. Materialul inițial (NWM) este super-hidrofil, măsurarea unghiului de contact cu apa fiind imposibilă. După modificarea suprafeței cu policationi (NWM_{CS} și NWM_{PAH}) unghiul de contact măsurat clasifică materialele compozite obținute ca fiind hidrofobe, unghiul de contact al picăturii de apă depășind la majoritatea 125° (Tabelul 6.3).

Valorile unghiului de contact s-au menținut în domeniul $110^\circ - 135^\circ$ pentru aproape toate suprafețele cu $CaCO_3$, indiferent dacă au fost utilizați polianioni sau CPN în procesul de cristalizare și depind foarte mult de abilitatea structurii complexe formate între $CaCO_3$ și polianioni sau CPN de a acoperi suprafața, precum și de morfologia structurilor formate pe suprafața materialului. Cu toate acestea, probele pe bază de NWM_{CS} acoperite cu $CaCO_3$ /PSA și $CaCO_3$ /PAMPS prezintă cristale mai mari pe suprafața materialului (Figura 6.2B), dar și un strat gros de polimer pe suprafața fibrelor

(Figura 6.2A d și e), ambele formațiuni contribuind la diferența mare dintre valorile unghiului de contact.

Tabelul 6.3. Valorile unghiului de contact pentru toate probele investigate [Vasiliu, 2021b].

Proba	Unghiul de contact θ , °		
	NWM	NWMC _s	NWMPAH
inițial	*	125,26(1,28)	126,06(1,51)
CaCO ₃	119,49(2,18)	122,75(1,46)	120,12(2,07)
CaCO ₃ -PAA	120,36(0,83)	134,98(0,66)	129,76(2,32)
CaCO ₃ -PAMPS	126,64(0,63)	**	129,36(2,11)
CaCO ₃ -PSA	116,40(2,01)	119,42(0,66)	119,01(2,04)
CaCO ₃ -CS-PAA	126,64(0,63)	126,01(0,64)	116,57(2,04)
CaCO ₃ -CS-PAMPS	117,38(2,13)	116,55(1,72)	120,68(1,89)
CaCO ₃ -CS-PSA	114,59(2,01)	117,54(1,99)	125,08(1,64)
CaCO ₃ -PAH-PAA	123,15(1,96)	125,21(2,56)	131,46(1,95)
CaCO ₃ -PAH-PAMPS	134,65(2,06)	125,07(2,05)	134,80(2,22)
CaCO ₃ -PAH-PSA	124,68(1,21)	126,56(1,36)	122,62(0,81)

*nu a putut fi măsurat; **neuniform, valori cuprinse între 70° - 120°

6.2. Aplicații biomedicale ale materialelor hidrofobizate cu carbonat de calciu

6.2.1. Teste de încărcare/eliberare a tetraciclinei în/din materiale hidrofobizate cu carbonat de calciu

În acest studiu, o serie de probe (NWM, NWMC_s, NWMC_s-CaCO₃ și NWMC_s-CaCO₃/PSA) au fost testate din punct de vedere al capacității de încărcare și de eliberare a TCH. Capacitatea maximă de sorbție a fost determinată luând în considerare concentrația inițială a TCH în soluțiile apoase și concentrația reziduală a supernatantului după procesul de sorbție. În Figura 6.5 sunt rezumate rezultatele obținute prin măsurarea absorbânței supernatantului la 276 nm.

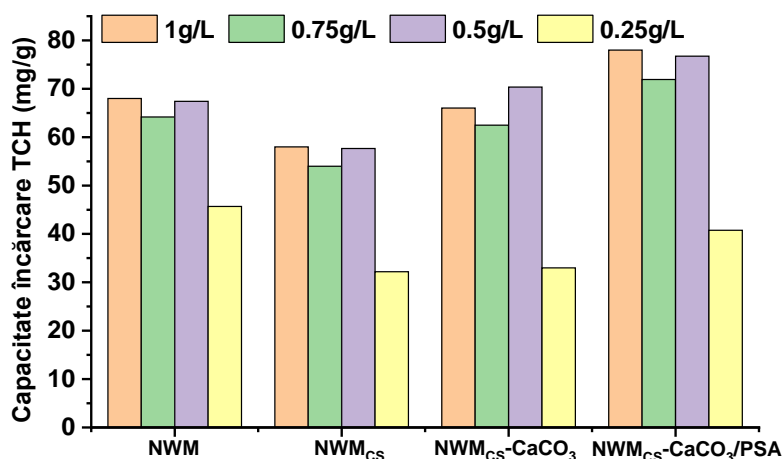


Figura 6.5. Capacitatea de încărcare a probelor investigate în funcție de concentrația de TCH [Vasiliu, 2021b].

Principala proprietate relevantă în capacitatea de încărcare/sorbție a unui material este aria suprafeței expuse, grupele reactive de pe suprafață afectând specificitatea materialului: separarea înalt selectivă este obținută prin adsorbția de molecule specifice pe aceste grupe. Printre grupele funcționale eficiente în procesul de sorbție se numără grupele carboxilice, care acționează ca

schimbători de ioni și grupări chelatizante. După cum se poate observa în Figura 6.5, NWM și NWM_{CS} au o bună capacitate de sorbție a TCH, în timp ce materialele cu CaCO₃ prezintă o creștere a capacității de sorbție, în special când s-a utilizat PSA. De asemenea, pentru fiecare probă testată, capacitatea de sorbție a fost aproape constantă în domeniul concentrațiilor inițiale de TCH de 0,5 – 1,0 g/L, scăzând până la aproape 50% când concentrația soluției inițiale a scăzut la 0,25 g/L. Prin urmare, probele rezultate după încărcarea cu TCH din soluții de 0,5 g/L au fost utilizate pentru evidențierea comportamentului de eliberare a medicamentului (Figura 6.6).

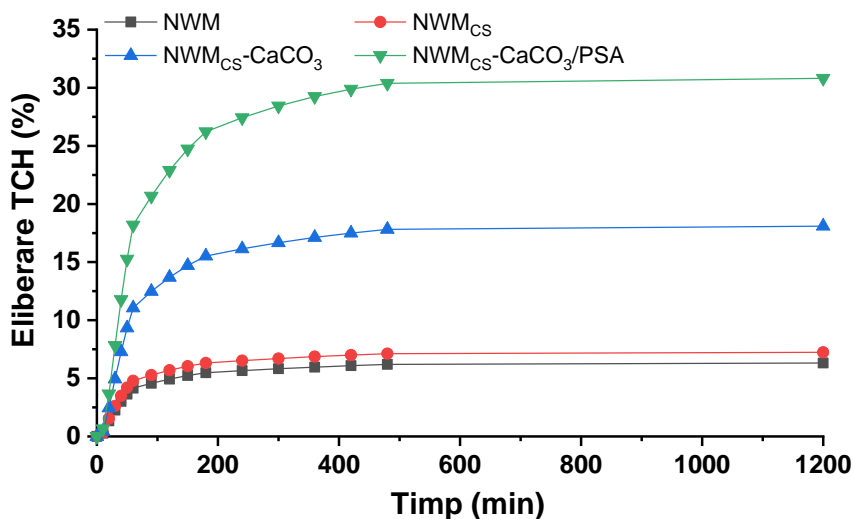


Figura 6.6. Eliberarea in-vitro a TCH din probele investigate [Vasiliu, 2021b].

Curbele de eliberare a TCH în soluție tampon fosfat, la pH 7,4 (Figura 6.6) arată o eliberare continuă a medicamentului în primele 480 de minute, până la atingerea unui platou. Cel mai mare procent cumulativ de eliberare, de aproximativ 30%, a fost obținut pentru probele preparate cu NWM_{CS} acoperite cu CaCO₃/PSA, în timp ce materialul inițial, NWM, sau cel acoperit cu CS, NWM_{CS}, au permis eliberarea a doar 6-7% TCH, iar proba cu CaCO₃ a eliberat aproximativ 18% în 480 de minute. Cel mai probabil acest comportament se datorează influenței atât a CaCO₃ cât și a PSA din proba NWM_{CS}CaCO₃/PSA, după cum urmează: CaCO₃ format în această probă a avut cele mai mici dimensiuni ale cristalitelor (163 Å comparativ cu 965 Å pentru proba NWM_{CS}-CaCO₃); prezența PSA, prin grupele slab ionice COO⁻, permite rețelei formate să se umfle în mediul de eliberare, și astfel să elibereze medicamentul încărcat negativ la pH-ul mediului de eliberare. Dimpotrivă, grupele aminice din CS interacționează electrostatic cu grupele carboxilice ale TCH și o rețin pe suprafața acesteia (în proba NWM_{CS}). Comportamentul probei NWM_{CS}-CaCO₃ confirmă influența carbonatului de calciu, cel mai probabil o parte din TCH fiind sorbită în calcitul format ca strat subțire la suprafața fibrelor.

6.2.2. Activitatea antibacteriană a materialelor hidrofobizate cu carbonat de calciu

Probele fără TCH nu au prezentat activitate antibacteriană însă, *E. coli* nu a aderat la suprafața materialelor, în timp ce *S. aureus* a format un biofilm pe suprafața probelor NWM_{CS} și NWM_{CS}-CaCO₃. Cu toate acestea, prezența PSA nu a permis aderența microorganismelor în ambele cazuri.

Activitatea antibacteriană a fost testată și pe probele încărcate cu TCH, datele legate de diametrul zonelor de inhibare (mm) fiind prezentate în Tabelul 6.4. Toate probele testate după încărcarea cu TCH au prezentat activitate antibacteriană pentru ambele tulpini testate. Proba NWM încărcată cu TCH a prezentat cea mai bună activitate antibacteriană, în special împotriva *S. aureus*. Adăugarea

chitosanului (NWM_{CS}) a scăzut activitatea antibacteriană în cazul *S. aureus*. Probele NWM_{CS}-CaCO₃ și NWM_{CS}-CaCO₃/PSA sunt la fel de eficiente împotriva *S. aureus*, dar mai puțin eficiente decât NWM. Pe de altă parte, activitatea antibacteriană împotriva *E. coli* are un trend descendent evident, de la NWM la NWM_{CS}-CaCO₃/PSA. Deși chitosanul [Goy, 2009] și carbonatul de calciu [Ali Said, 2020] sunt recunoscute în literatură ca având activitate antibacteriană; în acest caz prezența lor în stuctura materialului a scăzut activitatea tetraciclinei împotriva tulpinilor bacteriene testate.

Tabelul 6.4. Activitatea antibacteriană a materialelor testate [Vasiliu, 2021b].

Codul probelor	Activitatea antibacteriană (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
NWM + TCH	44,88 ± 0,05	41,85 ± 0,04
NWM _{CS} + TCH	22,41 ± 0,12	36,23 ± 0,20
(NWM _{CS} -CaCO ₃) + TCH	39,65 ± 0,08	28,39 ± 0,03
NWM _{CS} -CaCO ₃ /PSA) + TCH	38,88 ± 0,17	26,62 ± 0,25

6.2.3. Teste de biocompatibilitate a materialelor hidrofobizate cu carbonat de calciu

Pentru testele de biocompatibilitate au fost selectate probele NWM, NWM_{CS}, NWM_{CS}-CaCO₃ și NWM_{CS}-CaCO₃/PSA. După 48 de ore în care probele au stat în contact cu mediul de cultură, celulele au fost investigate calitativ cu ajutorul microscopului optic și cantitativ prin testele MTS (Figura 6.10).

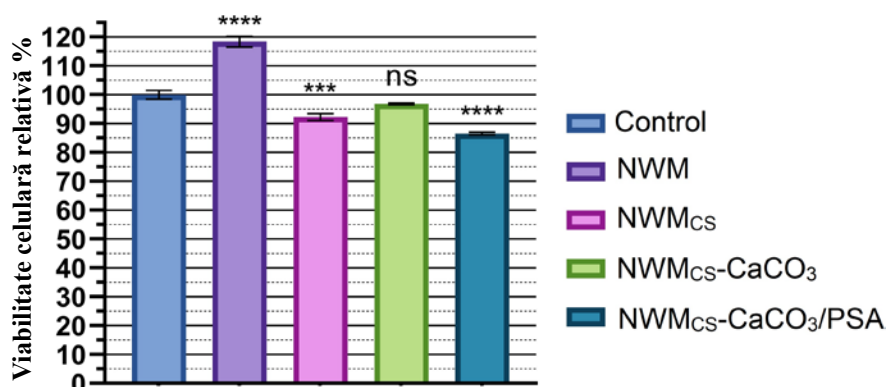


Figura 6.10. Viabilitatea celulară relativă determinată prin testul MTS. Celulele NHDF au fost cultivate în prezența materialelor testate timp de 48 de ore. Valorile reprezintă media ± deviația standard, n = 6. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = ne-semnificativ prin testul Anova [Vasiliu, 2021b].

La analiza microscopică, celulele aflate în prezența materialelor testate nu prezintă o morfologie diferită comparativ cu celulele din probele de control, dar se observă o confluență ușor scăzută în cazul celulelor care au fost în contact cu NWM_{CS} și NWM_{CS}-CaCO₃/PSA. Această observație este susținută și de testul MTS, care se bazează pe transformările mitocondriale ale reactivului MTS în formazan colorat care absoarbe lumina la lungimea de undă 490 nm. Cu cât celulele sunt mai vii și au mai multă activitate metabolică, cu atât valoarea absorbanței este mai mare. Practic, acest test este o metodă indirectă de a măsura viabilitatea celulară și proliferarea.

Astfel, conform acestui test, celulele tratate cu NWM_{CS} și NWM_{CS}-CaCO₃/PSA au o viabilitate relativă față de control de 92%, respectiv 86%. Celulele tratate cu NWM prezintă o proliferare cu o viabilitate relativă cu 18% mai mare decât celulele de control. Pe de altă parte, celulele tratate cu NWM_{CS}-CaCO₃ nu prezintă diferențe semnificative a viabilității comparativ cu celulele de control.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată „*Materiale compozite bio-inspirate cu aplicații biomedicale și în protecția mediului*” are **174** pagini împărțite în **6** capitole care includ **24** tabele, **89** figuri, **8** scheme și **196** indicații bibliografice. Teza este alcătuită din două părți: un studiu de literatură (Capitolele 1 și 2) și contribuțiile personale (Capitolele 3-6), urmate de concluziile generale și bibliografie.

Studiile originale efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit **direcțiile de studiu:**

✓ *Microparticule/microcapsule compozite pe bază de carbonat de calciu pentru aplicații biomedicale și în protecția mediului*

- Sinteza și caracterizarea unor *microparticule* pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici și acoperirea cu film multistrat pentru obținerea unor materiale de tip miez-manta

- Sinteza și caracterizarea unor *microcapsule autoasamblate* pe bază de carbonat de calciu și *polimeri solubili tari sau slabi, naturali sau sintetici*

- Sinteza și caracterizarea unor *microcapsule autoasamblate* pe bază de carbonat de calciu și *complexi polielectrolitici nestoechiometrici*

- Propunerea unui *mecanism de formare a microcapsulelor autoasamblate* în prezența *polimerilor ionici solubili sau a dispersiilor de complexi polielectrolitici*

- *Aplicații biomedicale ale microparticulelor și microcapsulelor* pe bază de carbonat de calciu: teste de încărcare/eliberare a unor medicamente, cinetică de eliberare

- *Aplicații în protecția mediului ale microparticulelor și microcapsulelor* pe bază de carbonat de calciu în purificarea apelor poluate cu ioni metalici

✓ *Materiale compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu pentru aplicații biomedicale și în protecția mediului*

- Sinteza și caracterizarea unor materiale compozite *criogeluri/carbonat de calciu*

- Sinteza și caracterizarea unor materiale compozite *schimbători de ioni/carbonat de calciu*

- *Aplicații biomedicale* (teste de încărcare/eliberare a tetraciclinei) și *în protecția mediului* (depoluarea apelor impurificate cu coloranți) ale materialelor compozite reticulate pe bază de carbonat de calciu

✓ *Materiale compozite hidrofobe pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici cu aplicații biomedicale*

- Obținerea de *materiale compozite hidrofobe* pe bază de carbonat de calciu și polimeri ionici sau complexi polielectrolitici nestoechiometrici folosind ca substrat un material superhidrofil

- Teste de *încărcare/eliberare a tetraciclinei* în/din materiale hidrofobizate cu carbonat de calciu

- Teste de *biocompatibilitate* și *activitate antimicrobiană* a materialelor hidrofobizate

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

- S-au obținut *microparticule compozite pe bază de carbonat de calciu, în prezența poli(acidului acrilic) sau a poli(etileniminei) liniare sau ramificate*, care au fost utilizate ca templat pentru adsorbții consecutive de polielectroliți complementari (polianionul PAA și policationii PEIL, PEIB sau complexi PEI/Cu²⁺) cu formarea unor structuri compozite complexe de tip miez-manta.
- În toate cazurile s-au format microparticule sferice cu dimensiuni regulate și suprafață poroasă, indiferent de prezența polimerilor sau de structura lor chimică. Investigațiile SEM au arătat diferențe de morfologie ale probelor preparate cu diferiți polimeri și adsorbția alternantă

a polimerilor sau eliminarea cuprului care depind de tipul de polimorfi ai CaCO_3 precum și de raportul între aceștia.

- A fost investigată **capacitatea de sorbție** a microparticulelor **pentru ioni metalici** Cu^{2+} , Ni^{2+} și Co^{2+} care prezintă diferite afinități pentru ioni testați în funcție de compoziția chimică a materialelor compozite și condițiile de competitivitate/noncompetitivitate. Morfologia de suprafață a microparticulelor compozite se modifică în timpul sorbției ionilor metalelor grele și depinde mai mult de structura nucleului microparticulei și de polimerii adsorbiți pe suprafața lor, și mai puțin de ioni adsorbiți.
- S-a observat o creștere a capacității de sorbție pentru probele cu multistraturi, comparativ cu microparticulele corespunzătoare inițiale. De asemenea, în condiții de competitivitate, s-a observat o afinitate crescută pentru ioni de Cu^{2+} pentru toate probele investigate.
- Rezultatele obținute la sorbția ionilor metalici susțin ideea unei **suprafețe dinamice a carbonatului de calciu**, prin formarea continuă și dizolvarea polimorfilor de CaCO_3 în funcție de schimbările din mediu de reacție, până la atingerea echilibrului (atunci când viteza de formare și dizolvare sunt egale).
- S-au obținut **microcapsule autoasamblate** pe bază de carbonat de calciu, în prezența unor **polimeri sintetici** (PAMPS, P(AMPS-co-TBA), P(AMPS-co-MM) și P(AMPS-co-AA)), **naturali** (condroitin sulfat A, dextran și acid hialuronic) sau a unor **pectine** cu diferite grade de carboxilare și grade de amidare.
- S-a evidențiat, **pentru prima dată** în literatură, **influența densității de sarcini a poliionilor** asupra capacității acestora de a forma microcapsule, cele mai bune rezultate obținându-se când aproximativ 50% dintre grupele funcționale sunt ionizate, indiferent de structura chimică a polimerilor.
- S-a investigat, **pentru prima dată** în literatură, posibilitatea **obținerii microcapsulelor în prezența complexilor polielectrolitici nestoechiometrici**; în acest sens s-au utilizat CPN cu PAH și pectine, observându-se că prezența CPN cu un exces de sarcini (negative sau pozitive) determină o bună capacitate de obținere a microcapsulelor, indiferent de structura pectinei.
- Conținutul de polimorfi este influențat de structura pectinei și de raportul molar al CPN. Astfel, în timpul formării microparticulelor cu pectine polimorful majoritar a fost calcitul (~95%), în timp ce pentru compozitele pe bază de pectină amidată conținutul de vaterit a crescut până la ~36%. Utilizarea CPN în formarea compozitelor a crescut conținutul de vaterit în compozite (până la 48%), cel mai mare conținut de vaterit aflându-se în compozitele cu CPN cu $n^+/n^- = 0,9$.
- Pentru a estima **structura poroasă** a microcapsulelor compozite preparate, s-au înregistrat izotermele de sorbție a vaporilor de apă, caracteristice pentru adsorbția apei pe adsorbânți hidrofobi microporoși și mezoporoși, care susțin structura formată din nanocristale agregate a microcapsulelor compozite. Capacitatea de sorbție a vaporilor de apă a crescut atunci când s-au folosit microcapsule pe bază de CPN, comparativ cu probele pe bază de pectine, indiferent de structura chimică a pectinelor.
- Pe baza rezultatelor obținute, a fost propus un **mecanism de formare a microcapsulelor** pe bază de carbonat de calciu și pectine sau CPN: (1) interacțiunea ionilor de calciu cu grupele ionice sau ionizabile ale polimerilor sau nanoparticulelor de CPN, cu formarea microparticulelor de gel; (2) creșterea cristalelor de CaCO_3 cu formarea microparticulelor; (3) dizolvarea fracțiilor de CaCO_3 mai puțin stabile; (4) nucleația secundară a calcitului pe

- suprafața externă; (5) creșterea progresivă a grosimii peretelui cristalin pe măsură ce miezul se golește, producând microsferă goale în interior de tip capsule.
- Obținând cu succes microcapsule de carbonat de calciu și pectine și complecși polielectrolitici nestoechiometrici, următorul pas a presupus investigarea aplicabilității acestora în domeniul medical, prin realizarea unor **teste *in vitro* de încărcare/eliberare** cu trei medicamente (tetraciclină, kanamicină și streptomycină).
 - Microcapsulele au prezentat o capacitate bună de încărcare a medicamentelor (aproximativ 220 mg TCH /g, 100 mg STR /g și 140 mg KAN /g), fiind stabile în timpul protocolului de sorbție.
 - Polimorfii CaCO₃ influențează capacitatea de încărcare a microcapsulelor, fiecare polimorf fiind caracterizat de o porozitate specifică și sarcini de suprafață diferite (în condițiile experimentale suprafața calcitului este încărcată negativ, iar vateritul este ușor pozitiv).
 - Profilele de eliberare pentru medicamentele studiate în soluție tampon fosfat la pH 7,4 prezintă o desorbție continuă a medicamentelor în primele 100 – 150 minute până la atingerea unui platou. Cantitatea cea mai mare eliberată a fost obținută pentru probele pregătite cu CPN cu $n^+/n^- = 0,9$, mai exact probele cu densitatea de sarcină cea mai mică.
 - S-a observat o eliberare incompletă a medicamentelor, guvernată de difuzie de ordinul II, concomitent cu modificarea totală a morfologiei microcapsulelor prin transformarea carbonatului de calciu în fosfat de calciu, evidențiat în spectrele FTIR prin creșterea benzilor fosfat (în domeniul 1000-1100 cm⁻¹), în timp ce benzile pentru carbonat au scăzut.
 - A fost investigată ***influența surselor de carbonat*** (carbonat de sodiu, dimetilcarbonat, dietilcarbonat și bicarbonat de amoniu) ***și a protocolului de cristalizare*** (imersare alternantă în soluțiile de precursori, adiția rapidă a precursorilor și difuzia lentă în exicator) asupra formării materialelor compozite pe bază de carbonat de calciu și o ***serie de criogeluri pe bază de chitosan***.
 - Toate metodele de obținere investigate au determinat formarea unor materiale compozite care conțin CaCO₃ cristalizat pe suprafața porilor criogelurilor, porii rămânând deschiși pentru aplicații ulterioare. *Criogelurile compozite cu cea mai mare uniformitate, atât la suprafață, cât și în interior, s-au obținut prin metoda difuziei lente în exicator.*
 - Prezența carbonatului de calciu și tipul de polimorfi obținuți au fost evidențiate prin XRD, analiză care a arătat prezența vateritului doar pentru protocolul alternant, indiferent de numărul de etape de cristalizare aplicate.
 - S-a demonstrat că un timp îndelungat de difuzie în exicator (35 de zile) determină formarea clorurii de amoniu și cristalizarea acesteia pe criogeluri. Analiza EDX susține creșterea conținutului de azot odată cu creșterea timpului de reacție, sugerând că durata optimă de obținere a cristalelor pure și uniforme de CaCO₃ prin metoda difuziei este de maxim 14 zile.
 - Prin urmare, pentru ***testarea citotoxicității*** am ales criogelurile compozite obținute după 14 zile în exicator, acest interval fiind suficient de lung pentru a permite acoperirea uniformă a pereților porilor cu un strat de carbonat de calciu, dar suficient de scurt pentru a evita formarea clorurii de amoniu. Testul de citotoxicitate a demonstrat că toate criogelurile compozite investigate sunt biocompatibile, având o viabilitate relativă de minim 89%.
 - Observând că difuzia lentă în exicator este o metodă excelentă de creștere a carbonatului de calciu, am utilizat acest protocol în pentru obținerea **compozitelor pe bază de schimbători de ioni și carbonat de calciu**, scurtând timpul de reacție la 5 și respectiv 11 zile. Dacă inițial schimbătorii de ioni au prezentat o porozitate de suprafață, creșterea carbonatului de calciu a

- determinat obținerea unor suprafețe netede pentru toate probele, indiferent de natura grupelor funcționale (anionice, cationice sau amfotere).
- Datele XRD arată că dimensiunea cristalitelor de calcit crește în timp pentru toate probele investigate, de la ~227 Å până la ~490 Å, parametrii unității structurale pentru calcit după 5 și 11 zile de reacție rămânând aproape neschimbați, sugerând că unitatea structurală nu se modifică în timp.
 - S-a investigat **capacitatea de sorbție a doi coloranți** (verdele de bromcrezol și roșul neutru). Sorbția coloranților a fost în principal influențată de repulsiile și atracțiile electrostatice dintre grupările funcționale ale coloranților și cele ale schimbătorilor de ioni. Perlele cationice și compozitele corespunzătoare au avut o bună eficiență de reținere a colorantului BCG, până la 95%, CRE pentru NR ajungând doar la 65 – 67 %.
 - Deoarece s-a dovedit că timpul de reacție de 5 zile este suficient pentru obținerea unor compozite cu schimbători de ioni uniforme, s-a investigat **capacitatea de încărcare cu tetraciclină** a acestora, comparativ cu schimbătorii de ioni inițiali. Compozitele IExDEA₃/CaCO₃ au prezentat o creștere a capacității de sorbție a TCH, datorită contribuției sinergetice a mai multor factori: capacitatea matricei polimerice de a adsorbi TCH prin legături electrostatice, disponibilitatea grupelor funcționale după creșterea CaCO₃, distribuția cristalelor de CaCO₃ pe probe și capacitatea cristalelor de a interacționa cu TCH.
 - Conform profilului de eliberare al probelor investigate, eliberarea inițială bruscă a TCH poate fi atribuită difuziei rapide a medicamentului localizat la suprafața probelor, cu o eliberare graduală care s-a extins până la 15 ore, după care s-a atins echilibrul.
 - S-a realizat transformarea unei suprafețe de material pe bază de celuloză din superhidrofilă în **hidrofobă**, prin creșterea carbonatului de calciu prin metoda difuziei în exicator, cu un timp de reacție de 5 zile în prezența unor polimeri ionici sau CPN.
 - În prima etapă, suprafața materialului a fost modificată prin depunerea unui polielectrolit (chitosan sau PAH), apoi cristalizarea carbonatului de calciu a avut loc în prezența fie a polianionilor PAA, PAMPS sau PSA, fie a complecșilor polielectrolitici încărcăți negativ.
 - Atât analiza calitativă XRD cât și măsurătorile cantitative arată formarea doar a polimorfului calcit, cu un volum mediu al structurii cristaline de $363,2 \pm 6,4$ Å, cu diferite valori ale dimensiunilor cristalitelor, în funcție de polimerul sau CPN utilizați.
 - În urma creșterii carbonatului de calciu pe aceste suprafețe, **unghiul de contact** a avut valori cuprinse între 110° și 135°, valori care depind de abilitatea structurii complexe formate între CaCO₃ și polianioni sau CPN de a acoperi suprafața, precum și de morfologia structurilor formate pe suprafața materialului, demonstrând că este posibilă hidrofobizarea materialului de celuloză prin această metodă ieftină și rapidă.
 - Datorită naturii biocompatibile a chitosanului, am selectat seria de materiale tratate cu acest polielectrolit pentru a evalua **capacitatea de încărcare și eliberare a tetraciclinei**, din soluții cu concentrații diferite. S-a observat că prezența carbonatului de calciu a determinat o creștere a capacității de sorbție și o creștere a procentului de medicament eliberat, această tendință fiind accentuată când carbonatul de calciu a fost obținut în prezența polianionului PSA.
 - Vizând aplicabilitatea acestui nou material compozit în domeniul medical, ca posibil pansament, s-au realizat **teste de biocompatibilitate**, obținându-se o viabilitate celulară relativă față de control de minim 86%. Celulele tratate cu NWM prezintă o proliferare cu o viabilitate relativă cu 18% mai mare decât celulele de control iar celulele tratate cu NWM_{CS}-CaCO₃ nu prezintă diferențe semnificative a viabilității comparativ cu celulele de control.

- În plus, s-a investigat **activitatea antibacteriană** a acestor materiale, înainte și după încărcarea cu tetraciclină, în prezența bacteriilor *E. coli* și *S. aureus*. Dacă materialele inițiale nu au prezentat activitate antibacteriană, după încărcarea cu medicament toate probele au prezentat o zonă de inhibiție împotriva tulpinilor de referință. În plus, cu unele excepții, materialele hidrofobizate nu au permis aderarea bacteriilor la suprafața materialului, atât înainte, cât și după încărcarea cu tetraciclină.

Ca **perspective** de viitor,

- pentru aplicațiile din domeniul medical, având în vedere rezultatele foarte bune obținute pentru testele *in vitro*, se va evalua comportamentul materialelor compozite și *in vivo*, prin teste efectuate pe șoareci de laborator, atât pentru suprafețele hidrofobe (ca posibil pansament), cât și pentru criogelurile rezultate (ca potențiale matrici pentru regenerarea osoasă).
- pentru aplicațiile din domeniul protecției mediului, având în vedere capacitatea compozitelor sub formă de schimbători de ioni/carbonat de calciu de a adsorbi atât coloranți, cât și tetraciclina, se va investiga capacitatea de sorbție a acestor materiale pentru mai mulți compuși mic moleculari întâlniți în apele reziduale.

Rezultatele prezentate în această teză de doctorat au făcut obiectul a **7** articole indexate ISI, **1** articol ISI trimis spre publicare, **1** capitol de carte în curs de publicare, **1** articol publicat *in extenso* în volumul unei manifestări științifice internaționale și **7** comunicări prezentate în cadrul unor conferințe internaționale.

Pe perioada desfășurării tezei de doctorat, bagajul de cunoștințe a fost îmbogățit prin efectuarea a **2 stagii de cercetare** la Institutul de Cercetare a Polimerilor, Dresden, Germania, astfel: 18.09 – 01.10.2016, *Capsule pe bază de carbonat de calciu și polimeri – compoziție și morfologie (Capsules based on calcium carbonate and polymers – composition and morphology)* și 06.05 – 20.05.2017, *Studii de încărcare/eliberare de medicament efectuate pe capsule de CaCO₃/polimer (Loading/release studies involving CaCO₃/polymer hollow capsules)*.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Ali Said, F., Bousserrhine, N., Alphonse, V., Michely, L., Belbekhouche, S.; *Internat. J. Pharm.* 579, 119175, **2020**.
- Barhoum, A., Rahier, H., Abou-Zaied, R.E., Rehan, M., Dufour, T., Hill, G., Dufresne, A.; *ACS Appl. Mater. Interf.* 6, 2734–2744, **2014**.
- Brevecic, L., Nothig-Laslo, V., Kralj, D., Popovic, S.; *J. Chem. Soc.* 92, 1017–1022, **1996**
- Goy, R.C., Britto, D., Assis, O.B.G.; *Polímeros* 19, 241-247, **2009**
- Mihai, M., Bucatariu, F., Aflori, M., Schwarz, S.; *J. Cryst. Growth* 351, 23–31, **2012**.
- Mihai, M., Bucatariu, F., Doroftei, F.; *Rev. Chim.* 64, 338–342, **2013b**.
- Mihai, M., Mountrichas, G., Pispas, S., Stoica, I., Aflori, M., Auf der Landwehr, M., Neda, I., Schwarz, S.; *J. Appl. Cryst.* 46, 1455–1466, **2013d**.
- Mihai, M., Bunia, I., Doroftei, F., Varganici, C.D., Simionescu, B.C.; *Chem. Eur. J.* 21, 5220 – 5230, **2015a**.
- Mihai, M., Racovita, S., **Vasiliu, A.-L.**, Doroftei, F., Barbu-Mic, C., Schwarz, S., Steinbach, C., Simon, F.; *ACS Appl. Mater. Interf.* 9, 42, 37264–37278, **2017a**.
- Mihai, M., **Vasiliu, A.-L.**, Schwarz, S.; *Proc. 25th Internat. Conf. Composites Nano Eng.*, **2017b**.
- Mihai, M., Doroftei, F., **Vasiliu, A.-L.**, Bunia, I.; *Rev. Roum. Chim.* 62, 499-504, **2017c**.
- Racovita, S., **Vasiliu, A.L.**, Bele, A., Schwarz, D., Steinbach, C., Boldt, R., Schwarz, S., Mihai, M.; *RSC Adv.* 8, 23274-23283, **2018**.

Sawada, K.; *Pure Appl. Chem.* 69, 921-928, **1997**

Schenk, A.S., Cantaert, B., Kim, Y.-Y., Li, Y., Read, E.S., Semsarilar, M., Armes, S.P., Meldrum, F.C.; *Chem. Mater.* 26, 2703–2711, **2014**.

Vasiliu, A.-L., Mihai, M., Simionescu, B.C.; *Rev. Roum. Chim.* 62, 333-338, **2017**.

Vasiliu, A.-L., M. V. Dinu, M. M. Zaharia, D. Peptanariu, M. Mihai; *Mater. Chem. Phys.* 272, 125025, **2021a**.

Vasiliu, A.-L., Zaharia, M.M., Rosca, I., Peptanariu, D., Mihai, M.; *ACS*, **2021b** (*trimisă la publicare*).

Zaharia, M.-M., **Vasiliu, A.-L.**, Trofin, M.-A., Pamfil, D., Bucatariu, F., Racovita, S., Mihai, M.; *React. Funct. Polym.* 166, 104997, **2021a**.

Zaharia, M.-M., Bucatariu, F., Doroftei, F., Loghin, D.-F., **Vasiliu, A.-L.**, Mihai, M.; *Colloids Surf. A* 613, Article 126084/1-12, **2021b**.

Zhou, H., Chen, Z., Bai, Z.; *Environ. Progress Sustainable Energy* 39, e13367, **2020**.

ANEXA 1. DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE A DOCTORATULUI

Articole ISI

1. Microcapsules of calcium carbonate and pH-sensitive polymers; **A.L. Vasiliu**, M. Mihai, B.C. Simionescu; *Revue Roumaine de Chimie* 62(4-5), 333-338, **2017** (F.I. = 0,278)
2. CaCO₃/Ion exchanger composites as sorbents for dyes; M. Mihai, F. Doroftei, **A.-L. Vasiliu**, I. Bunia; *Revue Roumaine de Chimie* 62(6-7), 499-504, **2017** (F.I. = 0,278)
3. Auto-template microcapsules of CaCO₃/pectin and nonstoichiometric complexes as sustained tetracycline hydrochloride delivery carriers; M. Mihai, S. Racovita, **A.-L. Vasiliu**, F. Doroftei, C. Barbu-Mic, S. Schwarz, C. Steinbach, F. Simon; *ACS Applied Materials & Interfaces* 9 (42), 37264–37278, **2017** (F.I. = 9,229)
4. Complex calcium carbonate/polymer microparticles as carriers for aminoglycoside antibiotics; S. Racovita, **A. L. Vasiliu**, A. Bele, D. Schwarz, C. Steinbach, R. Boldt, S. Schwarz, M. Mihai; *RSC Advances* 8, 23274-23283, **2018** (F.I. = 3,361)
5. Multifunctional CaCO₃/polyelectrolyte sorbents for heavy metal ions decontamination of synthetic waters; M.-M. Zaharia, F. Bucatariu, F. Doroftei, D.-F. Loghin, **A.-L. Vasiliu**, M. Mihai; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 613, Article 126084/1-12, **2021** (F.I. = 4,539)
6. In situ CaCO₃ mineralization controlled by carbonate source within chitosan-based cryogels; **A.-L. Vasiliu**, M. V. Dinu, M. M. Zaharia, D. Peptanariu, M. Mihai; *Materials Chemistry and Physics*, 272 (1), 125025, 2021 (F.I. = 4,094)
7. Design of multifunctional composite materials based on acrylic ion exchangers and CaCO₃ as sorbents for small organic molecules; M.-M. Zaharia, **A.-L. Vasiliu**, M.-A. Trofin, D. Pamfil, F. Bucatariu, S. Racovita, M. Mihai; *Reactive and Functional Polymers* 166, 104997, **2021** (F.I. = 3,975)
8. Hydrophobic composites designed by a nonwoven material and polymer controlled CaCO₃ crystal growth for biomedical application; **A.-L. Vasiliu**, M.M. Zaharia, M.M. Bazarghideanu, I. Rosca, D. Peptanariu, M. Mihai; *ACS*, 2021 (*trimisă la publicat*)

Capitol de carte

1. G. Barjoveanu, C. Teodosiu, M. Mihai, I. Morosanu, D. Fighir, **A.-L. Vasiliu**, F. Bucatariu, Capitol 11. Life cycle assessment for eco-design in product development, în *Assessing the sustainability progress: frameworks, tools and case studies* (publicată sub contract Elsevier no. 846739), ISBN 606798 (data estimată a publicării: Aprilie **2022**)

Articole publicate în extenso în volumele unor manifestări științifice internaționale

1. Auto-templating composite microcapsules based on CaCO₃ and pectins; M. Mihai, **A.-L. Vasiliu**, S. Schwarz; ICCE-25, 25th Annual International Conference on Composites and Nano Engineering, 16 - 22 Iulie, 2017, Roma, Italia

Comunicări orale la manifestări științifice internaționale

1. Ion exchanger/CaCO₃ composites as sorbents for ionic molecules; M. Mihai, F. Doroftei, **L. Vasiliu**, I. Bunia; *The 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry*, 2-3 Martie, 2017, Chișinău, Republica Moldova
2. Auto-templating composite microcapsules based on CaCO₃ and pectins; M. Mihai, **A.-L. Vasiliu**, S. Schwarz; *25th Annual International Conference on Composites and Nano Engineering, ICCE-25*, 16 – 22 Iulie, 2017, Roma, Italia
3. Microcapsules based on calcium carbonate and pH-sensitive polymers as drug delivery systems; M. Mihai, **A.-L. Vasiliu**, F. Doroftei, C. Barbu-Mic, S. Racovita; *20th International Conference on Composite Structures*, 4-7 Septembrie, 2017, Paris, Franța
4. Composite materials designed by bioinspired crystal growth and polymeric additives; M. Mihai, **A.-L. Vasiliu**, F. Doroftei, S. Racovita; *20th International Conference on Composite Structures*, 4-7 Septembrie, 2017, Paris, Franța
5. Synthesis and characterization of ion exchange resins based on acrylic copolymers with high affinity to different heavy metal ions; M.-M. Zaharia, F. Bucatariu, L.-M. Petrila, **A.-L. Vasiliu**, M. Mihai; *Materials, Methods & Technologies International Conference*, 19-22 August, 2021, Burgas, Bulgaria
6. Hydrophobic biocompatible CaCO₃/cellulose material with potential application in wound dressing; **A.-L. Vasiliu**, M.-M. Zaharia, M.M. Bazarghideanu, I. Rosca, D. Peptanariu, M. Mihai; *MACRO Iasi*, 7-9 Octombrie, 2021, Iași, Romania
7. Ion exchangers/CaCO₃ composites as sorbents for small organic molecules; **A.-L. Vasiliu**, M.M. Zaharia, M.-A. Trofin, F. Bucatariu, S. Racovita, M. Mihai; *Macro Youth*, 19 Noiembrie, 2021, Iași, Romania

O parte din rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat au fost **susținute financiar de proiectele:**

1. Microcapsule pe bază de carbonat de calciu și polimeri sensibili la pH, materiale avansate de eliberare controlată a medicamentelor; PN-II-RU-TE- 2014-4-1433; Director de proiect Marcela Mihai; 2015-2017;
2. Microparticule compozite nisip/polielectrolit cu capacitate ridicată de încărcare/eliberare de compuși anorganici/organici din ape poluate; PN-III-P2-2.1-PED-2019-1996; Director de proiect Florin Bucatariu; 2020 – 2021;
3. Microparticule poroase zwitterionice care conțin zeină și unități betainice, cu activitate antimicrobiană și capacitate de administrare de medicamente; PN-III-P4-ID-PCE-2020-1541; Director de proiect Marcela Mihai; 2021-2023.