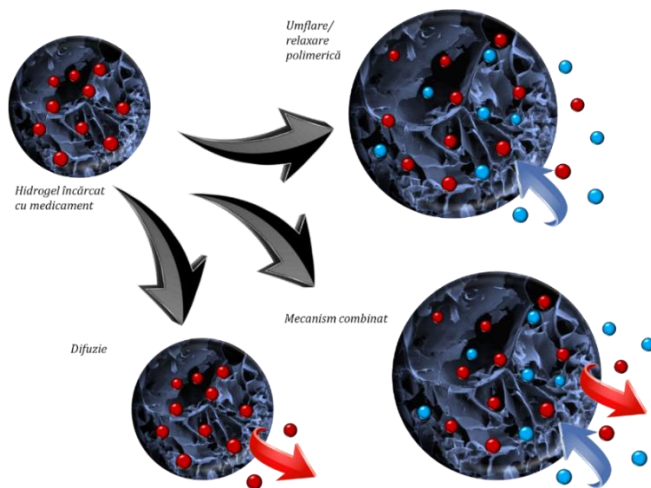


ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ „PETRU PONI”, IAȘI

NOI REȚELE POLIMERICE PE BAZĂ DE POLIZAHARIDE MODIFICATE CU POTENȚIALE APLICAȚII MEDICALE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT



**Conducător științific,
dr. Sergiu COȘERI**

**Doctorand,
bioing. Ioana A. TĂNASĂ (căs. DUCEAC)**

IAȘI, 2021

Academia Română
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Departamentul Filiala Iași
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

Nr. 4996/22 IX 2021

Doamnei, Domnului

Vă aducem la cunoștință faptul că pe data de 21 octombrie 2021, ora 12.00, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată *„Noi rețele polimerice pe bază de polizaharide modificate cu potențiale aplicații medicale”*, autor **Ioana A. Tănăsă** (c.ă.s. **Duceac**), în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

Președinte:

Dr. Valeria Harabagiu, Cercetător științific gradul I, Director al Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

Conducător de doctorat:

Dr. Sergiu Coșeri, Cercetător științific gradul I, Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași

Referenți:

1. **Prof. Dr. Liliana Vereștiuc**, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași
2. **Dr. Diana Ciolacu**, Cercetător științific gradul II, Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași
3. **Prof. Dr. Aurel Pui**, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași

Susținerea publică a tezei va avea loc în conformitate cu reglementările în vigoare la data susținerii, iar link-ul de acces pentru susținerea online va fi publicat pe site-ul SCOSAAR.

Textul integral al tezei de doctorat în format tipărit poate fi consultat la Biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași.

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

Mă simt onorată ca, la sfârșitul acestui demers științific, să dedic un gând de recunoștință tuturor celor care m-au susținut și au contribuit la elaborarea și finalizarea cu succes a acestei teze de doctorat.

*Cu deosebit respect, adresez mulțumiri conducătorului științific, Domnul **CS I dr. Sergiu Coșeri**, pentru încrederea, îndrumarea plină de tact, bunăvoința și sprijinul moral și științific acordate permanent pe parcursul stagiului doctoral.*

*Le sunt recunoscătoare stimaților referenți, **Prof. dr. Liliana Vereștiuc, CS II dr. Diana Ciolacu și Prof. Dr. Aurel Pui**, pentru evaluarea acestei lucrări și aprecierile formulate. De asemenea, doresc să le mulțumesc doamnelor **CS III dr. Violeta Melinte, CS II dr. Raluca Nicoleta Darie-Niță și CS II dr. Carmen Mihaela Popescu**, care au acceptat să-mi fie alături ca parte din comisia de îndrumare.*

*Gratitudinea mea se îndreaptă către colectivul de la Facultatea de Bioinginerie Medicală, și anume Doamnelor **Prof. dr. Liliana Vereștiuc, Conf. dr. Maria Butnaru și S.I. dr. Vera Balan**, căroră le sunt permanent recunoscătoare pentru contribuția adusă la formarea mea ca tânăr cercetător în acest domeniu al biomaterialelor cu aplicații medicale. Un gând de apreciere se îndreaptă și către doamna **CS dr. Alina Rusu**, care mi-a îndrumat primii pași în laborator.*

*Mulțumesc tuturor colegilor din cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” pentru contribuția adusă la dezvoltarea mea și la elaborarea acestei teze, Domnei **Sanziana Vlad și colegelor de laborator și de colectiv** – oameni minunați, care mi-au fost alături la fiecare etapă a stagiului doctoral. Sunt deosebit de recunoscătoare Doamnelor **CS dr. Gabriela Biliuță, AC dr. Raluca Baron și AC drd. Mădălina Culică** pentru sprijinul acordat și momentele minunate petrecute împreună.*

*În tot acest timp, am avut parte de sprijinul familiei mele. Mulțumesc **părinților mei** pentru iubirea, încrederea și ajutorul necondiționate, pentru educația oferită, dar mai ales pentru tăria de caracter și dorința de cunoaștere cultivate în mine. Mulțumesc **soțului meu**, prietenul meu la drum lung, pentru ajutorul, răbdarea și înțelepciunea cu care mi-a fost alături indiferent de circumstanțe.*

*Cu deosebită considerație,
Ioana A. Tănasă, căs. Duceac*

Cuprins

Repere conceptuale ale tezei de doctorat.....	1
Principii și concepte ale domeniului de cercetare al rețelelor polimerice cu aplicații medicale.....	1
Actualitatea și importanța domeniului abordat.....	3
Structura tezei.....	5
Partea I.....	5
Capitolul 1. POLIMERI NATURALI ȘI SINTETICI UTILIZAȚI ÎN OBTINEREA DE MATERIALE CU APLICAȚII MEDICALE.....	7
1.1. Polizaharide.....	7
1.2. Proteine.....	18
1.3. Reacții de modificare chimică a polimerilor naturali.....	27
1.4. Polimeri sintetici.....	33
Capitolul 2. REȚELE POLIMERICE CU APLICAȚII MEDICALE.....	41
2.1. Tipuri de biomateriale polimerice.....	41
2.2. Metode de reticulare și procedee de preparare.....	45
2.3. Aplicații biomedicale ale rețelelor polimerice.....	54
2.4. Proprietăți specifice hidrogelurilor cu aplicații medicale.....	58
Partea a II-a.....	71
Capitolul 3. MATERIALE, METODE DE SINTEZĂ ȘI TEHNICI DE CARACTERIZARE	71
3.1. Materiale și reactivi.....	71
3.2. Metode de sinteză a polimerilor naturali modificați.....	74
3.3. Metode de preparare a materialelor.....	75
3.4. Tehnici de caracterizare structurală, termică și morfologică.....	77
3.5. Metode de caracterizare specifice pentru aplicații biomedicale.....	78
Capitolul 4. MODIFICĂRI CHIMICE ALE POLIMERILOR NATURALI.....	81
4.1. Obiective.....	81
4.2. Oxidarea selectivă a polizaharidelor.....	82
4.2.1. Reacții de oxidare a pululanului.....	82
4.2.2. Reacții de oxidare a amidonului.....	90
4.3. Reacții de acilare a chitosanului.....	96
4.3.1. Funcționalizarea chitosanului LMW.....	96
4.3.2. Funcționalizarea chitosanului HMW.....	98
4.4. Reacții de modificare chimică a colagenului.....	102
4.4.1. Studiu de modificare a colagenului cu anhidridă citraconică.....	102
4.4.2. Studiu de modificare a colagenului cu diferite anhidride.....	105
4.5. Concluziile studiului.....	109
Capitolul 5. REȚELE POLIMERICE DE TIP HIDROGEL PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI PULULAN OXIDAT.....	111
5.1. Obiective.....	111
5.2. Prepararea hidrogelurilor.....	111
5.3. Caracterizarea structurală a sferelor de hidrogel pe bază de chitosan.....	113
5.3.1. Analiza spectrelor FTIR ale sferelor de hidrogel.....	113
5.3.2. Analiza spectrelor XPS ale sferelor de hidrogel.....	114
5.4. Analiza termogravimetrică.....	117
5.5. Caracterizarea morfologică.....	120
5.6. Studii de adsorbție dinamică a vaporilor.....	121

5.7. Studiul comportamentului la umflare.....	124
5.8. Stabilitatea în condiții fiziologice.....	126
5.9. Capacitatea de încorporare și eliberare de ibuprofen.....	127
5.9.1. Încărcarea hidrogelurilor cu medicament.....	127
5.9.2. Cinetica eliberării de ibuprofen.....	128
5.9.3. Analiza mecanismului de eliberare.....	129
5.10. Activitatea antibacteriană.....	131
5.11. Studii de hemocompatibilitate.....	133
5.12. Concluziile studiului.....	134
Capitolul 6. REȚELE POLIMERICE DE TIP HIDROGEL PE BAZĂ DE POLIMERI NATURALI FUNCȚIONALIZAȚI ȘI POLIMERI ACRILICI.....	137
6.1. Obiective.....	137
6.2. HIDROGELURI PE BAZĂ DE N-CITRACONIL CHITOSAN ȘI POLIMERI ACRILICI.....	138
6.2.1. Prepararea hidrogelurilor.....	138
6.2.2. Caracterizarea hidrogelurilor.....	140
6.2.3. Concluziile studiului.....	153
6.3. HIDROGELURI PE BAZĂ DE POLIMERI NATURALI MODIFICAȚI ȘI POLI(ACID ACRILIC).....	155
6.3.1. Prepararea hidrogelurilor.....	155
6.3.2. Caracterizarea hidrogelurilor.....	155
6.3.3. Concluziile studiului.....	161
Capitolul 7. HIDROGELURI PE BAZĂ DE CHITOSAN RANFORSATE CU HIDROXIAPATITĂ.....	163
7.1. Obiective.....	163
7.2. Prepararea hidrogelurilor.....	164
7.3. Caracterizarea structurală a materialelor.....	164
7.4. Studii de difracție de raze X (XRD).....	167
7.5. Studii de microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	168
7.6. Proprietăți mecanice.....	170
7.7. Studii de stabilitate <i>in vitro</i>	171
7.8. Concluziile studiului.....	171
Capitolul 8. CONCLUZII GENERALE ALE TEZEI.....	173

Repere conceptuale ale tezei de doctorat

Au trecut 28 de ani de la publicarea articolului inovator „Ingineria tisulară” (*Tissue engineering*), scris de Langer și Vacanti [1], o analiză complexă care a adus în prim plan atât o serie de probleme existente în domeniul medical cu privire la nevoia permanentă de organe pentru transplant, cât și apariția unui nou domeniu de cercetare care cuprinde cele mai noi tehnologii biomedicale. **Ingineria tisulară (TERM)** a fost definită ca fiind un domeniu interdisciplinar în care „se aplică principiile biologiei și ingineriei pentru dezvoltarea de substituenți funcționali pentru țesuturile lezate”.

Pe de altă parte, problemele legate de administrarea de medicamente (doze repetate, inactivarea principiului activ în tractul gastrointestinal sau în sânge etc.) au fost abordate din punct de vedere al eliberării controlate încă din anii 1960, când au apărut sisteme precum *Spansule* [2], Silastic®, Ocuser® și Oros® [3]. Cu toate acestea, **sistemele pentru eliberare controlată de medicamente (DDS)** sunt și astăzi cercetate cu mare interes deoarece prezintă o serie de provocări particulare: trebuie să fie ușor de preparat, prin metode de sinteză ecologice, cu un minim de operații, să manifeste proprietăți favorabile interacțiunii cu mediul biologic (biocompatibilitate, biodegradabilitate, mucoadezivitatie), toate acestea în plus față de scopul principal, cel de eliberare controlată, țintită de medicamente.

În acest context, **materialele polimerice** au devenit un element cheie, indispensabil pentru succesul noilor sisteme terapeutice, jucând rolul de matrice suport atât pentru celele (în mod particular pentru ingineria tisulară), cât și pentru substanțe biologice active, fie ele factori de creștere, antibiotice sau agenți antitumorali. [4] Din multitudinea de sisteme dezvoltate până în prezent, hidrogelurile pe bază de polimeri naturali și sintetici s-au remarcat datorită similarității structurale și de compoziționale cu matricea extracelulară. Aceste biomateriale sunt rețele polimerice care pot fi obținute printr-o atentă selecție de polimeri hidrofilii care să permită o reglare fină a proprietăților lor fizice și chimice și care astfel, să se apropie cât mai mult de sistemele concepute teoretic. Varietatea largă a tehnicilor de preparare a rețelilor polimerice are ca scop obținerea unor materiale cu proprietăți optime – adeziune celulară, răspuns molecular favorabil, integritate structurală, biodegradabilitate, biocompatibilitate și transport controlat de molecule bioactive.

Una dintre cele mai bune modalități prin care poate fi ilustrată importanța domeniului abordat o reprezintă analiza parametrilor financiari. Piața globală a medicinei regenerative a fost estimată la 8,5 mld. USD în 2020 și este prognozată o creștere de până la 17,9 mld. USD în 2025, calculată la o viteză de creștere anuală (compound annual growth rate - CAGR) de 15,9%. [6,7] Totuși, estimarea este una optimistă luând în considerare prețul de cost ridicat pentru terapiile TERM și problemele etice privind utilizarea clinică a metodelor specifice, aspecte ce reprezintă principalele impedimente în creșterea și dezvoltarea acestui domeniu, din punct de vedere financiar. [8,9] De menționat este și dificultatea cu care are loc translarea de la studiile de laborator și testele *in vitro* și *in vivo* către testarea clinică, asociată cu dificultățile birocratice și financiare specifice – proceduri laborioase și împovărătoare de certificare și avizare create cu scopul protejării pacientului și evitării problemelor de natură etică, dar care se răsfrâng asupra prețului de cost final suportat de pacient sau de sistemul de asigurări de sănătate.

Pornind de la aceste considerente, **obiectivul principal al tezei de doctorat** a fost:

Designul conceptual, obținerea și caracterizarea unor noi biomateriale prin integrarea de polimeri naturali, derivați funcționalizați ai acestora și polimeri sintetici sub formă de rețele polimerice reticulate, direcționate spre aplicații medicale: eliberarea controlată de agenți terapeutici și regenerarea tisulară.

Strategia de lucru a inclus următoarele patru direcții de cercetare:

- **Sinteza unor derivați de polimeri naturali prin reacții polimer-analoage**
 - Sinteza și caracterizarea unor derivați de pululan și amidon prin reacții de oxidare selectivă
 - Sinteza și caracterizarea unor derivați de chitosan și colagen prin reacții de acilare
- **Designul și optimizarea unei serii de hidrogeluri pe bază de chitosan și pululan oxidat**

- Obținerea de materiale reticulate fizic sau chimic
- Analiza potențialului aplicativ ca sisteme de eliberare controlată de medicamente și modularea manierei de eliberare prin variația compoziției
- **Designul și optimizarea unor hidrogeluri pe bază de *N*-acil-chitosan și polimeri acrilici**
- Obținerea de rețele reticulate chimic sau semi-interpenetrate
- Îmbunătățirea biocompatibilității și a funcționalității unor materiale acrilice care urmează să intre în contact direct cu țesuturile biologice
- Analiza potențialului aplicativ ca matrice pentru regenerare tisulară și eliberare controlată de medicamente
- **Designul și optimizarea unei serii de hidrogeluri pe bază de chitosan ranforsate cu hidroxiapatită**
- Obținerea unor materiale compozite
- Analiza potențialului aplicativ ca matrice pentru tratamentul țesuturilor dure

Structura tezei

Teza de doctorat intitulată „*Noi rețele polimerice pe bază de polizaharide modificate cu potențiale aplicații medicale*” este structurată în două părți distincte și conține opt capitole descrise în continuare.

Partea I – prezintă un studiu teoretic privind stadiul actual al cercetărilor asupra rețelelor polimerice pe bază de polimeri naturali și sintetici, aplicate în domeniul biomedical și cuprinde următoarele capitole:

- **Capitolul 1** este dedicat descrierii principalelor aspecte fizico-chimice ale polimerilor naturali – polizaharide și proteine - și sintetici, de interes pentru tema abordată. De asemenea, sunt analizate avantajele și mecanismele unor reacții de modificare a polimerilor naturali, în mod particular reacțiile de oxidare și cele de acilare.

- **Capitolul 2** cuprinde o analiză mai largă a tipurilor de rețele polimerice cu aplicații biomedicale. Sunt identificate principalele caracteristici ale materialelor de tip hidrogel, proprietățile specifice materialelor cu aplicații TERM și DDS, conform celor mai recente date de literatură, precum și principalele strategii de reticulare a rețelelor polimerice.

Partea a II-a – este structurată în 6 capitole și cuprinde contribuțiile originale privind sinteza și caracterizarea unor noi materiale pe bază de polimeri sintetici și naturali, astfel:

- **Capitolul 3** prezintă detaliat materialele și reactivii ce au fost utilizați în obținerea derivaților de polimeri naturali, precum și procedeele de preparare și metodele de caracterizare ale materialelor studiate.

- **Capitolul 4** cuprinde principalele rezultate privind obținerea și caracterizarea unor derivați de polimeri naturali (polizaharide și proteine). Sunt incluse reacțiile de oxidare selectivă a pululanului și amidonului și reacțiile de acilare a chitosanului și colagenului.

- **Capitolul 5** include metoda de preparare a unor hidrogeluri exclusiv pe bază de polizaharide cu scopul de a fi utilizate ca DDS. S-a urmărit influența tipului de derivat oxidat de pululan asupra morfologiei și proprietăților unor sfere de hidrogel pe bază de chitosan. Sistemele obținute au fost testate în vederea stabilirii potențialului lor aplicativ în domeniul DDS, respectiv utilizarea derivaților oxidați ca materiale de acoperire și optimizare a suprafeței biomaterialelor.

- **Capitolul 6** descrie o serie de hidrogeluri ale căror rețele reticulate chimic sunt constituite din polimeri naturali cu grupări citraconilice și metacrilice și polimeri sintetici de tip acrilic. Subcapitolul 6.2. cuprinde un studiu în cadrul căruia s-a urmărit influența a trei variabile de compoziție asupra proprietăților materialelor, și anume: tipul de acrilat, procentul de inițiator utilizat în procesul

de polimerizare radicalică și prezența argininei – compus mic-molecular cu activitate biologică de interes.

- **Capitolul 7** cuprinde un studiu preliminar de preparare și caracterizare a unor hidrogeluri pe bază de chitosan, ranforsate cu hidroxiapatită, cu scopul de a fi utilizate în regenerarea țesuturilor dure. A fost urmărită influența raportului dintre cele două faze – organică și anorganică – asupra proprietăților mecanice și a fost dovedită sinteza *in vitro* de noi formațiuni de fosfat de calciu, favorizată de prezența hidroxiapatitei în matricea de chitosan.

- **Capitolul 8** prezintă concluziile generale cu privire la cele mai importante rezultate experimentale obținute, precum și direcțiile viitoare de cercetare.

Manuscrisul se încheie cu 3 anexe:

Anexa 1. Diseminarea rezultatelor și activitatea științifică în cadrul proiectelor de cercetare,

Anexa 2. Bibliografie,

Anexa 3. Articole științifice.

Teza de doctorat se extinde pe 214 pagini și este împărțită în 8 capitole care includ 30 tabele, 117 figuri, 16 ecuații și 284 indicații bibliografice. Rezultatele originale prezentate în teza de doctorat au făcut obiectul a 10 publicații, dintre care 3 articole publicate în reviste cotate ISI, 2 articole publicate ISI proceedings și 5 articole publicate în volume ale conferințelor.

Capitolul 4. MODIFICĂRI CHIMICE ALE POLIMERILOR NATURALI

Polimerii naturali, în special polizaharidele și proteinele, prezintă avantaje reale față de polimerii sintetici. Ei au proprietăți care le recomandă pentru utilizări biomedicale, fiind o sursă importantă pentru obținerea de biomateriale, însă dificultățile de procesare, precum solubilitatea scăzută, sensibilitatea la temperatură sau rezistența mecanică scăzută impun utilizarea de reacții de funcționalizare. Limitările existente în privința anumitor proprietăți fizico-chimice este contrabalansată de oportunitățile de derivatizare a polimerilor naturali. Utilizarea polimerilor naturali funcționalizați, cu structură controlată, prezintă avantaje multiple și o procesabilitate crescută. Ei pot fi folosiți ulterior în sisteme polimerice diverse din punct de vedere al compoziției și al tipului de reticulare. În baza acestor constatări, s-a identificat o direcție de cercetare în cadrul căreia s-a urmărit **obținerea unor polimeri funcționalizați prin reacții de transformare polimer-analoage, și anume reacții de oxidare selectivă sau reacții de N-acilare, ducând la derivați care să poată forma rețele polimerice reticulate**. Realizarea acestui deziderat presupune rezolvarea mai multor obiective specifice:

Obiectivul 1: Funcționalizarea pululanului – introducerea de grupări aldehidice sau carboxilice prin reacții de oxidare selectivă cu periodat de sodiu sau cu sistemul TEMPO/NaBr/NaClO.

Obiectivul 2: Funcționalizarea amidonului – introducerea de grupări aldehidice sau carboxilice prin reacții de oxidare selectivă cu periodat de sodiu sau cu sistemul TEMPO/NaBr/NaClO; oxidarea amidonului din diferite surse: cartof, orez, porumb.

Obiectivul 3: Funcționalizarea chitosanului – obținerea unui derivat de chitosan solubil la pH fiziologic, neutru, cu grupări C=C, prin reacții de acilare cu anhidride.

Obiectivul 4: Funcționalizarea colagenului – obținerea unui derivat cu grupări C=C, prin reacții de acilare cu anhidride.

4.2.1. REACȚII DE OXIDARE A PULULANULUI

Pululanul a fost oxidat atât prin reacție cu TEMPO, cât și cu periodat, așa cum este ilustrat în **figura 1**, cu scopul de a introduce noi grupări care să permită reticulări fizice și/sau chimice ulterioare.

De Nooy et al. au descris o metodă de oxidare selectivă a polizaharidelor folosind hipoclorit de sodiu, bromură de sodiu și cantități catalitice de 2,2,6,6-tetrametilpiperidină-1-oxil, compus cunoscut sub prescurtarea de TEMPO. [10,11] Reacția are loc în mediu omogen, folosind apa ca solvent, la pH=10,5. Reacția cu TEMPO, radical nitroxilic stabil cu rol de mediator al reacției de oxidare, are loc

la grupările OH din poziția C-6, care sunt oxidate selectiv în două etape (reacția Anelli-Montanari) [12,13] cu oxidarea la COOH.

Oxidarea cu periodat este o altă metodă selectivă de oxidare a pululanului, care a fost raportată prima dată în literatură de Bruneel și Schacht. [14] și are loc la grupările hidroxilice secundare ale inelului glicozidic. Procesul decurge cu scindarea legăturii C-C a atomilor din pozițiile C-2 și C-3, concomitent cu formarea a două grupări aldehidice. Deoarece periodatul este un compus foto-și termosensibil, reacția are loc la întuneric și în condiții de temperatură ambiantă sau pe baie de gheață.

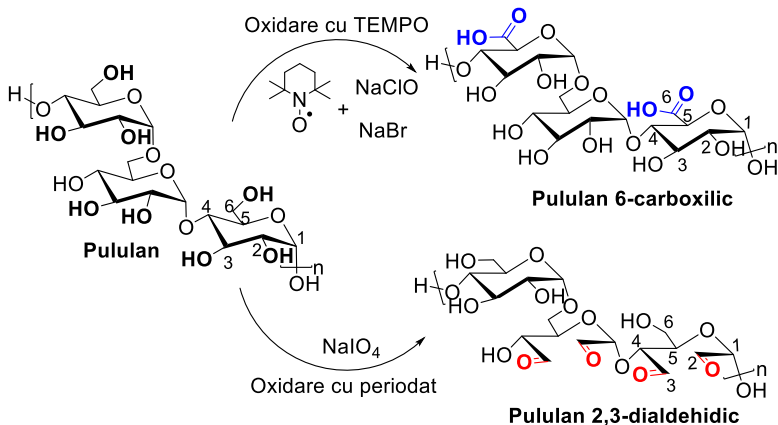


Figura 1 Schema de principiu a celor două metode de oxidare selectivă a pululanului

Confirmarea succesului reacției de oxidare se poate face facil, prin înregistrarea spectrelor ^{13}C -RMN în apă deuterată, prin FTIR sau prin XPS atât pentru pululanul de plecare, cât și pentru derivații săi oxidați cu periodat de sodiu (spectrul **PP**) sau TEMPO/NaBr/NaClO (spectrul **PT**).

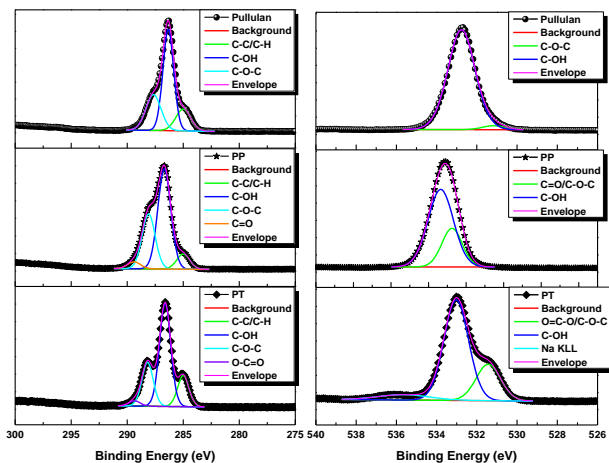


Figura 2 Deconvoluția spectrelor XPS de rezoluție înaltă ale C 1s (stânga) și O 1s (dreapta) pentru probele de pululan, PP și PT

Spectrele XPS de rezoluție înaltă ale C 1s și O 1s (figura 2) au oferit confirmarea absolută a acestor procese de oxidare, pe baza valorilor energiilor de legătură. Se poate observa apariția unor noi

energii de legătură în spectrele C 1s și O 1s ale probelor PP și PT, specifice pentru formarea grupărilor aldehidice și carboxilice, la 532.8 eV și respectiv 531.4 eV. Pentru derivații oxidați de pululan, aceste picuri se suprapun cu legătura C-O-C, dar se poate observa o creștere a concentrației relative atunci când este comparat cu spectrul O 1s al pululanului neoxidat.

4.2.2. REACTII DE OXIDARE A AMIDONULUI

Este binecunoscut faptul că amidonul, din punct de vedere structural, este alcătuit din amiloză și amilopectină în rapoarte diferite în dependență de natura sursei din care se extrage amidonul. Datorită structurii sale polizaharidice liniare, amiloză este mult mai susceptibilă de a suferi transformări chimice, spre deosebire de amilopectină, o polizaharidă cu structură ramificată, cu grupări reactive mai greu accesibile. În consecință, s-a avut în vedere oxidarea selectivă a amidonului din diferite surse și prin diferite strategii.

S-a studiat reacția de **modificare a amidonului din grâu cu periodat de sodiu**. Reacția are loc după același principiu descris la pululan. De asemenea, s-a avut în vedere **oxidarea mediată de TEMPO a amidonului din două surse: amidon de cartof și amidon de orez**. Reacția are loc selectiv la grupările hidroxilice primare din poziția C-6 a inelului de anhidroglucoză de pe catenele de amiloză și, mai puțin semnificativ, de amilopectină datorită grupărilor hidroxilice blocate în legăturile α -1 \rightarrow 6 glicozidice ale ramificărilor.

Pentru a confirma modificările chimice din structura amidonului, s-au înregistrat spectre FTIR și ^{13}C -RMN în apă deuterată (**figura 3**) pentru polizaharidele de plecare, mai exact amidon de cartof (**AC**) și respectiv de orez (**AO**), și pentru cei doi derivați sintetizați (**ACox** și **AOox**). De asemenea, s-a observat o îmbunătățire a solubilității AO.

În urma oxidării cu TEMPO, cea mai importantă modificare a spectrului ^{13}C -RMN care poate fi observată este apariția unui pic ascuțit la aprox. 178 ppm ca urmare a introducerii noilor grupări COOH.

4.3. REACTII DE ACILARE A CHITOSANULUI

Chitosanul în stare nativă este o polizaharidă insolubilă în apă, limitându-se astfel spectrul aplicabilității sale în domeniul preparării de rețele polimerice cu aplicații biomedicale. Pentru depășirea acestui inconvenient, una dintre cele mai utilizate căi este aceea a funcționalizării chitosanului. Obiectivul studiului a fost acela de a prepara un derivat al chitosanului care să prezinte o bună solubilitate în apă, la valori ale pH-ului apropiate de pH-ul fiziologic. Mai mult, în vederea asigurării unor beneficii ulterioare suplimentare cu privire la structura chimică propice unei eventuale reticulări cu alți polimeri, introducerea unor grupări de tipul C=C conferă beneficiile așteptate. Pentru realizarea acestui deziderat, am considerat că o **reacție de acilare clasică a chitosanului cu masă moleculară mică (LMW) cu anhidridă citraconică** ar putea furniza rezultatul preconizat.

Încurajați de succesul reacției de acilare a chitosanului cu masă moleculară mică, am dorit extrapolarea protocoloalelor de **acilare cu două anhidride diferite la chitosanul cu masă moleculară mare (HMW)**, cu scopul de a obține și în acest caz un produs solubil în apă, dar care să aibă o capacitate superioară de reticulare, prin reacție cu alți polimeri sintetici (**figura 4**).

Reacția grupărilor aminice primare ale chitosanului cu anhidrida este o reacție de adiție nucleofilă, cu transfer de protoni. [15]

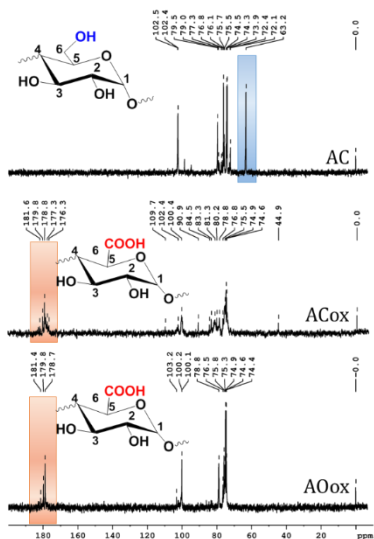


Figura 3 Spectrele ^{13}C -RMN înregistrate pentru amidonul de cartof (AC) și derivații oxidați ai amidonului de cartof (ACox), respectiv de orez (AOox), în D_2O

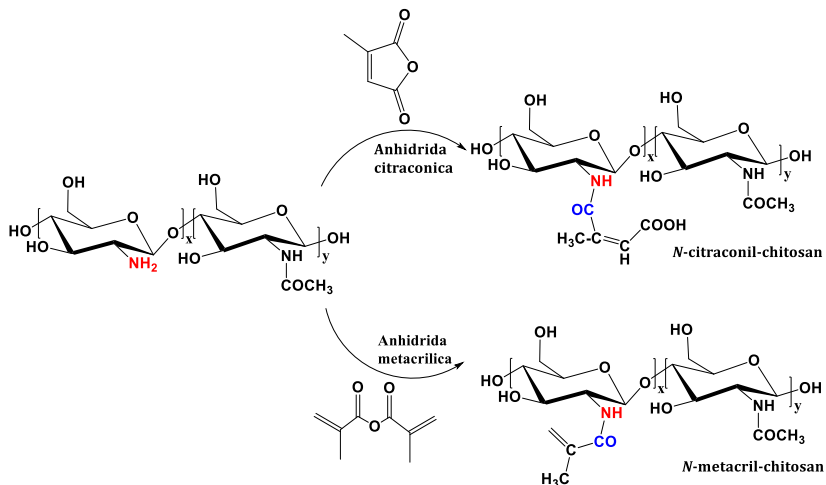


Figura 4 Schema de reacție pentru modificarea chitosanului cu anhidride

S-a observat faptul că reacția cu anhidrida metacrilică a determinat un randament mai bun de reacție, comparativ cu anhidrida citraconică. În plus, raportat la randamentul obținut în cazul chitosanului LMW, chitosanul HMW modificat cu aceeași anhidridă a dus la un randament mai mic de reacție. Acest comportament se poate explica prin faptul că anhidrida metacrilică are o structură *quasi* deschisă, fiind mai reactivă decât anhidrida citraconică, a cărei structură este ciclică, putând apărea împiedicări sterice. Pe de altă parte, LMW are o reactivitate mai mare datorită lanțurilor macromoleculare mai scurte, mai mobile, care sunt mai susceptibile de a participa în reacții chimice, decât în cazul HMW, când lanțurile macromoleculare sunt mult mai lungi, cu o rigiditate sporită, mobilitate redusă, deci o reactivitate scăzută.

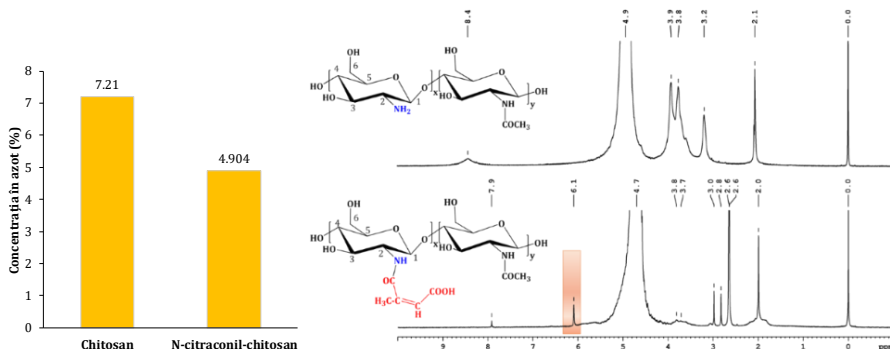


Figura 5 Concentrația în azot a probelor de chitosan LMW și a derivatului său acilat (stânga) și spectre $^1\text{H-RMN}$ înregistrate pentru chitosan HMW și CsCitra, în D_2O (dreapta)

Pentru confirmarea funcționalizării și caracterizarea polimerului modificat, s-a realizat o analiză elementală de determinare a conținutului de azot (figura 5, stânga) și o analiză structurală prin spectroscopie FTIR și RMN (figura 5, dreapta) pentru probele de chitosan și *N*-citraconil-chitosan (CsCitra). S-au obținut concentrații de azot de 7,21% și 4,9% pentru chitosan, respectiv CsCitra, fapt ce confirmă modificarea cu succes a polizaharidei. Concentrația de azot din proba de CsCitra, comparativ cu cea a chitosanului, indică un grad de modificare, de aproximativ 68%. Reacția cu anhidrida

citraconică duce la apariția unor picuri noi în spectrul $^1\text{H-RMN}$: protonul metilic ($\text{CH}_3\text{-C}=\text{CH}$) este identificat prin semnalul de la 1,9 ppm, iar picul de la 6,0 ppm este atribuit protonului vecin legăturii duble din structura grupării citraconil ($-\text{C}=\text{CH}-$). [16,17]

4.3. REACȚII DE MODIFICARE CHIMICĂ A COLAGENULUI

Studiul a avut ca scop obținerea unui derivat de colagen care să poată fi rețiculat cu polimeri sintetici prin intermediul unor legături $\text{C}=\text{C}$ preexistente în structura proteinei, în vederea obținerii de hidrogeluri cu rețele poroase. În consecință, s-a optat pentru **funcționalizarea colagenului cu anhidridă citraconică sau metacrilică**, prin reacția la grupările aminice ale proteinei, conform schemei de reacție din **figura 6**. Reacția a fost realizată pe colagen de origine bovină, de tip I+III.

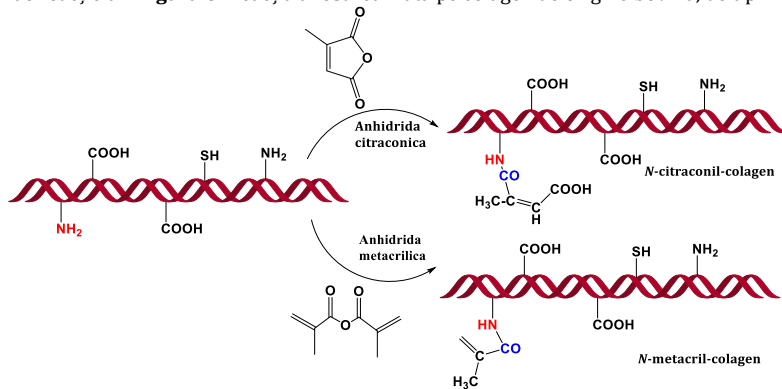


Figura 6 Schema de principiu a reacției de modificare a colagenului cu anhidride

Proteina și derivații acilați ai acesteia au fost supuși unei analize prin spectroscopie FTIR-ATR și RMN cu scopul confirmării modificării chimice. Reacția grupărilor aminice cu anhidrida este confirmată de apariția noilor picuri de la 5,2 și 5,9 ppm (**figura 7**) care sunt caracteristice protonilor acrilici, vecini legăturii duble $\text{C}=\text{C}$. Semnalul de la 2,6 ppm corespunde protonilor metilenici ai lizinei. Semnalul de la 1,2 ppm este atribuit protonilor metilici ai grupării citraconil. [18,19]

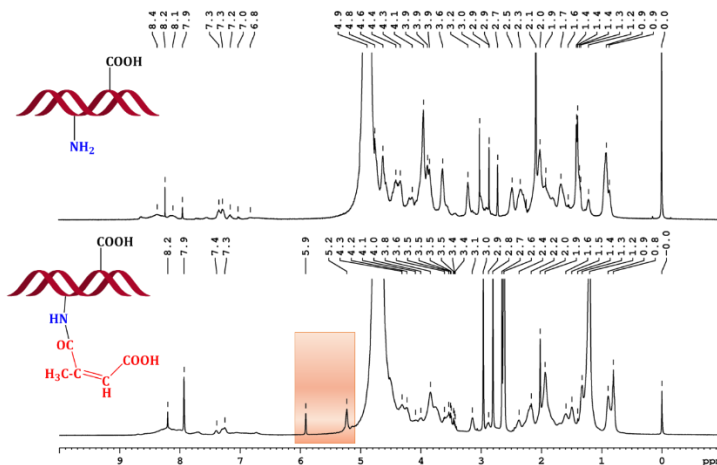


Figura 7 Spectrele $^1\text{H-RMN}$ înregistrate pentru colagen și derivatul ColCitra, în D_2O

Capitolul 5. REȚELE POLIMERICE DE TIP HIDROGEL PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI PULULAN OXIDAT

Hidrogelurile pe bază de polizaharide reprezintă o categorie aparte de biomateriale polimerice. Ele prezintă o serie de avantaje atât din punct de vedere al tipului de material, hidrogelurile fiind capabile să absoarbă volume mari de fluide (polizaharidele fiind polimeri hidrofilii), și în consecință sunt similare matricei extracelulare, cât și din punct de vedere al rețelei polimerice, deoarece polizaharidele sunt versatile și facil de asociat și de reticulat.

Specific, s-a urmărit **obținerea unei serii de hidrogeluri pe bază de chitosan și pululan oxidat ale căror rețele polimerice să fie reticulate prin mecanisme fizice și/sau chimice și influența variației tipului de oxidare asupra formării hidrogelului și asupra proprietăților, cu scopul de a obține sisteme de eliberare controlată de medicamente**. Realizarea acestui deziderat presupune rezolvarea mai multor obiective specifice:

Obiectivul 1: Obținerea biomaterialelor pe bază de chitosan, sub formă de sfere de hidrogel, și modificarea suprafeței acestora cu derivați oxidați de pululan.

Obiectivul 2: Caracterizarea fizico-chimică a biomaterialelor din punct de vedere structural, morfologic, termic și studii de sorbție-desorbție dinamică a vaporilor de apă.

Obiectivul 3: Analiza potențialului aplicativ al biomaterialelor ca sisteme de eliberare controlată de medicamente - studiul comportamentului de absorbție *in vitro* a fluidelor, studiul capacității de încărcare și eliberare de medicament, stabilitatea în condiții fiziologice, hemocompatibilitatea și activitatea antibacteriană.

Hidrogelurile au fost obținute prin precipitarea unei soluții de **chitosan** în mediu bazic, reacție urmată de acoperirea sferelor preparate cu unul dintre derivații oxidați de pululan (**figura 8**): formarea de legături covalente de tip bază Schiff între grupările aminice ale chitosanului și grupările aldehidice din structura **pululanului oxidat cu periodat (PP)** sau apariția unor interacțiuni electrostatice între grupările aminice pre-existente în hidrogel și cele carboxilice ale **pululanului oxidat cu TEMPO (PT)**.

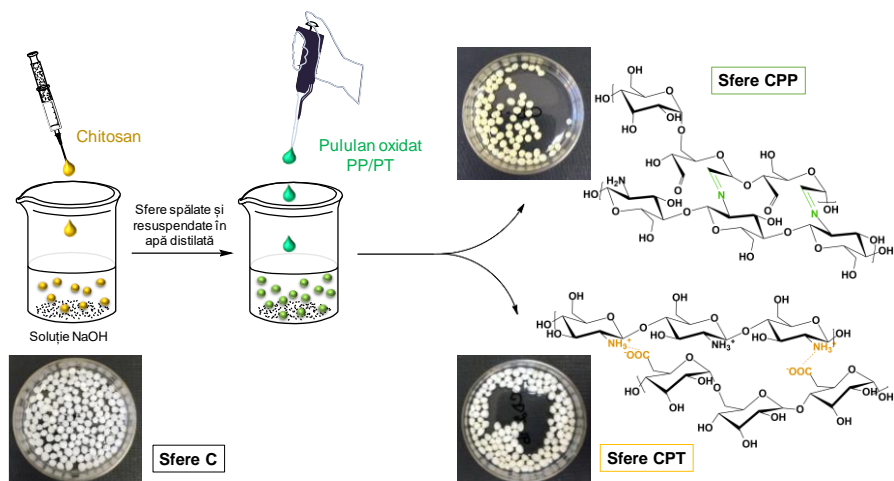


Figura 8 Reprezentare schematică a metodei de preparare a sferelor de hidrogel și modul teoretic de interacțiune între chitosan și pululanul oxidat

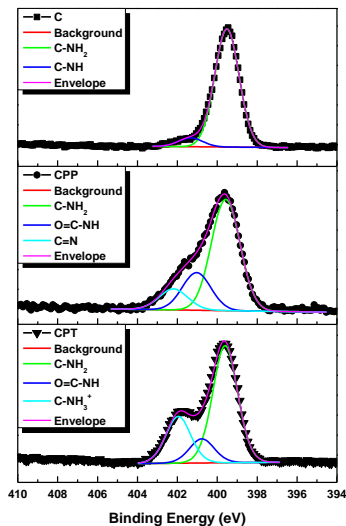


Figura 9 Deconvoluția spectrelor XPS de înaltă rezoluție pentru picurile corespunzătoare N 1s pentru probele C, CPP și CPT

interne și datele privind dimensiunea medie a porilor. Proba C are porii cu dimensiunea cea mai mare, de aproximativ 1,5 μm , în timp ce porii cei mai mici sunt observați la proba cu PP atașat (0,35 μm). Proba CPT manifestă, așa cum era de așteptat, porii mai mici decât proba C, de 0,65 μm , datorită depunerii la suprafață a pululanului oxidat cu TEMPO.

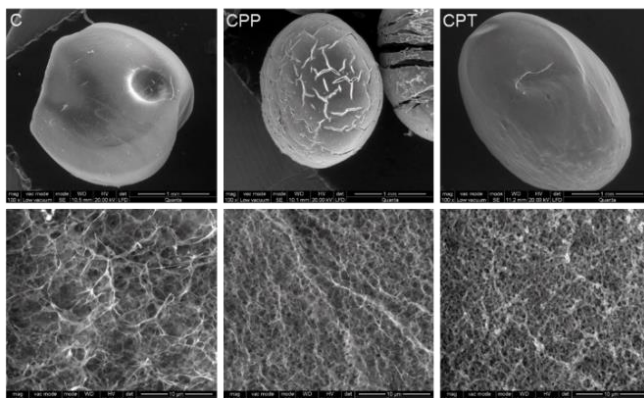


Figura 10 Imagini SEM ale celor trei tipuri de hidrogeluri și morfologia lor internă

Sorbția dinamică de vapori (DVS) este o metodă prin care se poate caracteriza afinitatea materialelor față de apă și mecanismul de adsorbție și difuzie prin pori, precum și forma internă a porilor. Forma curbei de histeresis este asociată microstructurii poroase a sferelor de hidrogel. Manifestarea unei curbe de tip H4 indică prezența microporilor, așa cum a fost confirmat și de datele

Pentru **caracterizarea structurală** a hidrogelurilor, au fost înregistrate spectre FTIR și XPS (figura 9) pentru sferile de chitosan (C) și cele acoperite cu pululan oxidat (CPP și CPT). Ca o consecință a reacțiilor de acoperire/reticulare, are loc o scădere a raportului C/O în seria C > CPT > CPP. Spectrele de rezoluție înaltă au oferit confirmarea faptului că procesul de modificare structurală a hidrogelurilor a avut loc cu succes. Pentru proba CPP, apariția noilor picuri de la 287.4 și 402.2 eV în spectrele C 1s și N 1s, specifice legăturii iminice C=N, dovedește faptul că a avut loc interacțiunea dintre grupările aldehidice ale pululanului oxidat cu periodat și grupările aminice ale chitosanului. În cazul probei CPT, a fost confirmată introducerea cu succes a pululanului 6-carboxilic la suprafața sferelor, datorită picului de la 402 eV din spectrul N 1s, pic atribuit legăturii C-NH₃⁺.

Imaginile SEM ale sferelor de chitosan și chitosan acoperit cu pululan oxidat (figura 10) indică faptul că hidrogelurile au o formă sferică spre ovală sau ovoidă. Diametrul mediu al sferelor C și CPP este similar, în timp ce CPT au un diametru mai mare. Se poate presupune faptul că interacțiunea prin formare de baze Schiff între chitosan și PP nu afectează dimensiunea materialelor, datorită reacției ce are loc la suprafața sferelor, dar și la interiorul porilor. În schimb, proba PT este atașată de chitosan prin forțe fizice și interacțiuni ionice, care au loc mai ales la exteriorul sferelor. Aceste presupuneri sunt confirmate de imaginile morfologiei

SEM, în timp ce curba de tip H3 este generată de structuri cu pori în formă de fantă (*slit-shaped pores*). [20]

Înglobarea apei în structura chitosanului este mediată de grupările aminice, hidroxicile, carbonilice și carboxilice și, în consecință, toate tipurile de hidrogeluri au eficiența de adsorbție similară (**tabelul 1**). Cu toate acestea, structura poroasă și morfologia au un rol important în procesul de sorbție. Interesant este faptul că, în cazul hidrogelurilor CPP, unde pululanul dialdehidic interacționează chimic cu chitosanul pentru a forma legături de tip bază Schiff, acestea manifestă o curbă de histerezis mai largă, comportament ce poate fi explicat prin prezența atât a microporilor, cât și a porilor de tip fantă, așa cum poate fi observat în imaginile SEM, fapt ce contrastează cu dimensiunea porilor, din moment ce aceste hidrogeluri au porii cu diametrul cel mai mic. Prin comparație, sferile CPT, unde interacțiunea dintre chitosan și pululan carboxilic este ionică, au un comportament similar cu cel al sferelor simple de chitosan.

Tabelul 1 Eficiența adsorbției și parametrii morfologici ai hidrogelurilor

Cod probă	Dimensiunea medie a sferelor (mm)	Diametrul mediu al porilor (μm)	Eficiența adsorbției (%)	S (m^2/g)	a_{wm}
C	2,3685 \pm 0,14	1,422 \pm 0,442	34,5	3,0627	0,3033
CPP	2,287 \pm 0,11	0,353 \pm 0,106	35,7	1,7837	0,317
CPT	2,9267 \pm 0,07	0,679 \pm 0,145	32,7	3,231	0,3443

Simulările modelelor cinetice BET și GAB, precum și determinarea suprafeței specifice (S) și e activității apei corespunzătoare monostratului (a_{wm}) au indicat faptul că sferile acoperite necesită o activitate a apei mai mare pentru a forma monostratul, respectiv există o rată de legare-eliberare mai mare (schimbul de molecule de apă la suprafață are loc mai intens).

Comportarea la umflare în condiții *in vitro* de temperatură și pH (37°C, pH=7.4) este similar în cazul tuturor hidrogelurilor (**figura 11**, stânga). Materialele ating echilibrul după 20-30 minute. Proba C a avut cea mai intensă umflare, dublă față de celelalte tipuri de hidrogeluri, cu suprafață modificată. Ca urmare a introducerii de pululan oxidat în structura sferelor pe bază de chitosan, porii s-au micșorat și este plauzibilă ipoteza că au avut loc noi fenomene de reticulare. Astfel, în ciuda faptului că a avut loc o creștere a numărului și densității de grupări hidrofile în materiale, rețeaua a devenit mai puțin flexibilă, lanțurile macromoleculare au o flexibilitate mai redusă și însumarea acestor aspecte a dus la un efect global de limitare a umflării. Modelul Korsmeyer-Peppas simulează cel mai bine curba probei C, cu valori mai mici ale coeficientului de corelație pentru celelalte două curbe. Pe baza semnificației atribuite exponentului n, cele 3 tipuri de sfere au avut o umflare determinată de mecanismul de tip II, adică relaxarea polimerului, fenomen dominant față de difuzia solventului în rețea.

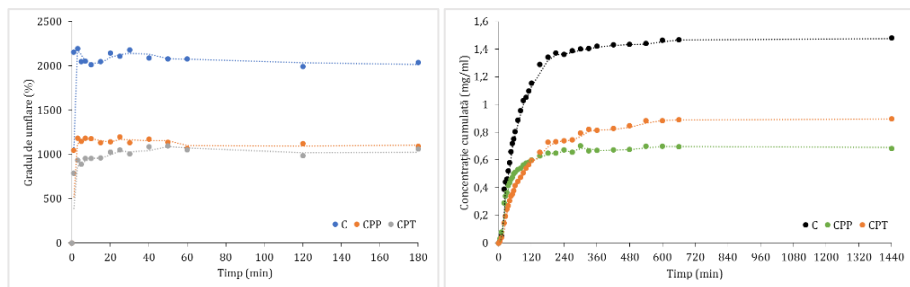


Figura 11 Datele cinetice de umflare a hidrogelurilor (stânga) și profilul de eliberare a ibuprofenului din sferile de hidrogel (dreapta)

Capacitatea de încărcare cu ibuprofen a fost maximă la proba C datorită unor pori de dimensiuni mai mari, dar și a unui număr mare de grupări aminice capabile să interacționeze

electrostatic cu gruparea carboxilică a ibuprofenului. Poriile nanometrice din structura sferelor CPP nu au permis încorporarea unei cantități la fel de mari de ibuprofen și de asemenea grupările aminice din rețea sunt preponderent implicate în legături de tip bază Schiff. Hidrogelul CPT prezintă o capacitate de încărcare intermediară față de celelalte două tipuri de sfere.

Testul de eliberare in vitro de ibuprofen a dus la obținerea unor profile similare pentru cele 3 materiale (figura 11, dreapta). Se poate remarca faptul că toate hidrogelurile au eliberat medicamentul în primele 240-360 min, după care se observă o zonă de platou. Sferile C eliberează cea mai mare cantitate de ibuprofen. Odată cu introducerea de puluan oxidat în structura hidrogelurilor, capacitatea de eliberare scade. Sferile cu PP au o eliberare mai rapidă și ating mai devreme la platou, în timp ce hidrogelurile cu PT eliberează medicamentul mai lent și ating mai târziu zona de echilibru.

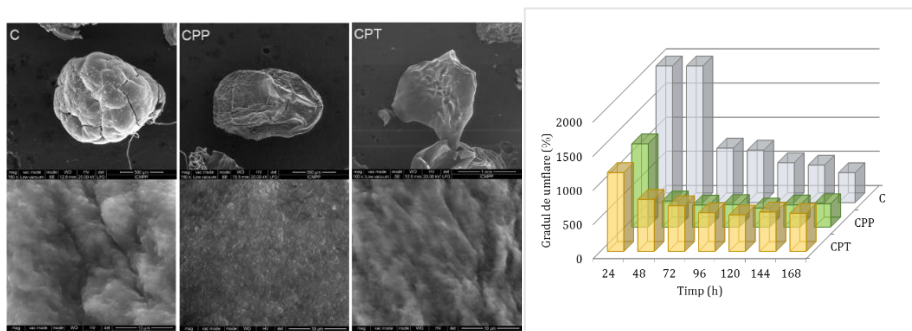


Figura 12 Imagini de microscopie electronică de baleiaj a celor 3 tipuri de sfere și morfologia lor internă și gradul de umflare după 7 cicluri uscare-rehidratare (168 ore)

Analiza mecanismului de eliberare (difuzie, umflare, eroziune etc. [21,22]) a fost realizată prin simularea a 6 ecuații matematice pe datele experimentale de eliberare de medicament: ecuația de ordinul întâi, modelul Higuchi, legea puterii (modelul Korsmeyer-Peppas și Ritger-Peppas), modelul Peppas-Sahlin, modelul Gompertz, modelul Weibull. Cinetica de eliberare este cel mai bine descrisă de ecuația de ordin întâi și de modelul Weibull. Acest fapt indică un comportament tipic pentru eliberarea unui medicament solubil dintr-o matrice poroasă. Exponentul de eliberare n determinat din ecuația legii exponențiale. **Sferele C și CPT au o comportare non-fickiană** (transport anormal), care combină

cele două fenomene majore asociate cu procesul de eliberare: difuzia și relaxarea polimerică. Cu toate acestea, **sferele CPP au demonstrat o comportare bazată pe difuzie fickiană** ca mecanism dominant de eliberare.

Hidrogelurile reticulate fizic sunt sisteme susceptibile la procese de dezintegrare sub acțiunea factorilor de mediu. Astfel, s-a impus necesitatea efectuării unui **test de stabilitate** care să ia în considerare condițiile specifice mediului fiziologic. După 168 de ore (7 cicluri de uscare - rehidratare), nu a fost înregistrată nici o pierdere de masă. Cu toate acestea, morfologia sferelor a fost alterată (pori colapsați, forma sferică modificată, figura 12), iar acest fapt a fost demonstrat și prin scăderea capacității de umflare a probelor în mediu biologic simulat. Cea mai intensă descreștere a fost înregistrată pentru proba C și este interesant de subliniat faptul că, indiferent de compoziția sferelor, capacitatea de umflare devine aproximativ aceeași.

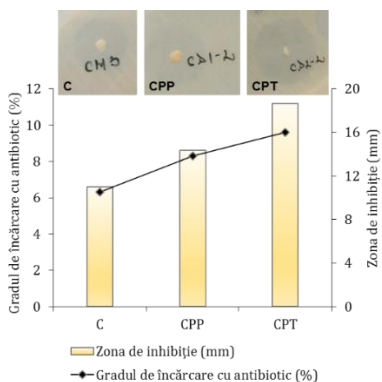


Figura 13 Efectul antibacterian al sferelor de hidrogel prin formarea zonelor de inhibiție împotriva culturii de *S. aureus*, corelat cu eficiența încorporării de antibiotic

Testele antibacteriene au subliniat capacitatea sferelor de a asimila în structură principii active cu molecule complexe, de mari dimensiuni (bacitracina și neomicina). Pentru toate materialele se poate observa formarea unei zone de inhibiție în jurul fiecărei probe (**figura 13**). Astfel, se confirmă eliberarea de medicament și activitatea bactericidă împotriva *S. aureus*. Se mai poate remarca faptul că, odată cu creșterea capacității de încorporare a antibioticului, există o creștere corespunzătoare a zonei de inhibiție.

Activitatea hemostatică. Hidrogelurile studiate au determinat fenomene minore de coagulare. Acest comportament este datorat numărului scăzut de grupări aminice ale chitosanului expuse la suprafața materialelor, sau blocarea lor în interacțiuni ionice sau chimice preexistente, în cazul probelor CPP și CPT.

Capitolul 6. REȚELE POLIMERICE DE TIP HIDROGEL PE BAZĂ DE POLIMERI NATURALI FUNCȚIONALIZAȚI ȘI POLIMERI ACRILICI

Materialele de origine naturală au o interacțiune favorabilă cu mediul biologic, dar prezintă în același timp o serie de dezavantaje legate de procesabilitatea limitată și de rezistența mecanică necorespunzătoare. Dacă la unele aspecte răspunsul poate fi găsit în direcția reacțiilor de funcționalizare a polimerilor naturali, altele impun necesitatea de asociere a polimerilor naturali cu cei de sinteză, cu scopul de a compensa neajunsurile celor două categorii de macromolecule și de a obține materiale cu proprietăți optime.

În acest sens, capitolul de față cuprinde rezultatele proprii obținute în urma preparării și caracterizării unor noi biomateriale. S-a dorit prepararea de hidrogeluri reticulate chimic și integrarea avantajelor utilizării polimerilor naturali și sintetici. Specific, s-a urmărit **obținerea unei serii de hidrogeluri superabsorbante pe bază de chitosan modificat cu anhidridă citraconică și acriilați ale căror rețele polimerice să fie reticulate chimic sau semi-interpenetrate și analiza potențialului aplicativ ca matrice pentru regenerare tisulară și eliberare controlată de medicamente**. Realizarea acestui deziderat presupune rezolvarea mai multor obiective specifice:

Obiectivul 1: Obținerea și optimizarea biomaterialelor pe bază de N-citraconil-chitosan și acriilați – studiul influenței concentrației de inițiator și a tipului de acrilat asupra proprietăților hidrogelurilor; îmbunătățirea biocompatibilității și a funcționalității materialelor acrilice prin conjugarea de L-arginină; studiul influenței raportului de N-citraconil-coloagen asupra proprietăților materialelor.

Obiectivul 2: Caracterizarea fizico-chimică a biomaterialelor – Caracterizare structurală, elementală și morfologică.

Obiectivul 3: Analiza potențialului aplicativ al biomaterialelor ca matrice pentru regenerare tisulară și eliberare controlată de medicamente – Studiul comportamentului de absorbție *in vitro* a fluidelor biologice, studiul capacității de încărcare și eliberare de medicament, studiul comportamentului la degradare enzimatică și caracterizarea proprietăților biologice: hemocompatibilitatea, activitatea antibacteriană și citocompatibilitatea.

6.2. HIDROGELURI PE BAZĂ DE N-CITRACONIL CHITOSAN ȘI POLIMERI ACRILICI

Hidrogelurile au fost obținute pe bază de citraconil-chitosan reticulat cu acid acrilic sau acid metacrilic. La conceperea acestor hidrogeluri s-au variat atât tipul de monomer sintetic, cât și raportul monomer/inițiator, iar mai apoi s-a studiat influența argininei conjugată pe hidrogeluri (**figura 14**). **Analiza structurală** prin spectroscopie FTIR pentru hidrogelurile CA10 (1% APS, reticulat cu AA), CM10 (1% APS, reticulat cu AM) și CA10A (conjugat cu Arg) a confirmat atât reticularea chimică a chitosanului cu acriilați, cât și cuplarea argininei.

Analiza morfologică indică faptul că toate probele prezintă o structură poroasă, cu pori interconectați de dimensiuni variabile (**figura 15**). La nivel microscopic, există zone care diferă ca aspect, fapt care poate fi explicat prin faptul că reacția de polimerizare nu a decurs uniform în tot volumul de reacție, determinând astfel regiuni în care s-a format mai mult polimer sintetic. În mod particular, pentru hidrogelurile cu AA s-au obținut structuri cu pori bine definiți, iar introducerea Arg

a determinat creșterea dimensiunii porilor și a dispersității acestora. Cu toate acestea, în cazul hidrogelurilor cu AM, dimensiunea porilor a crescut proporțional cu cantitatea de APS, iar prezența aminoacidului a favorizat formarea de pori cu dimensiuni mai mari (diametrul mediu al porilor a variat între 40 și 550 μm).

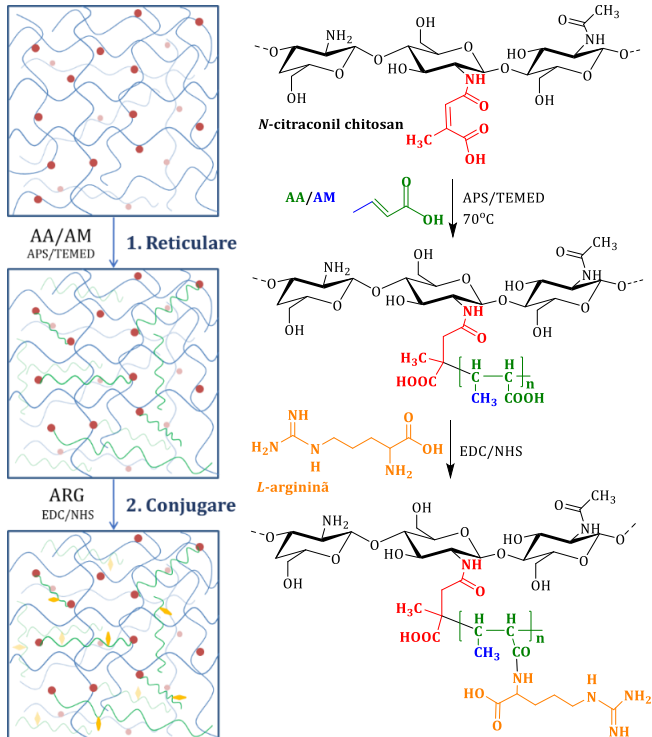


Figura 14 Reprezentare schematică a etapelor de obținere a hidrogelurilor

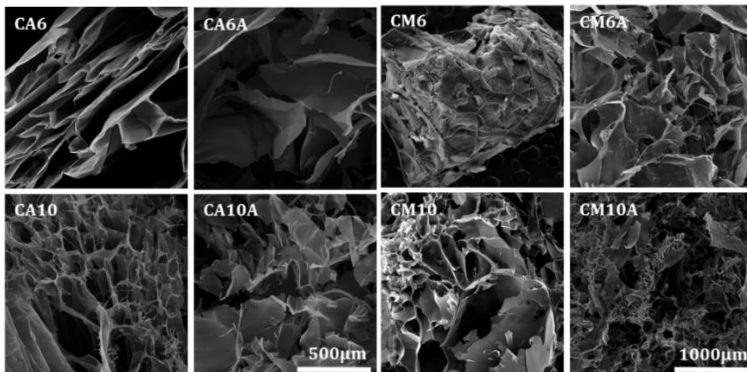


Figura 15 Imagini de microscopie electronică de baleiaj (SEM) ale hidrogelurilor cu PAA (scala de 500 μm) și PAM (scala de 1000 μm), obținute cu 0,6% sau 1% APS, înainte și după imobilizarea de Arg

Abilitatea hidrogelurilor de a absorbi fluide (PBS sau SWF), indică un comportament superabsorbant. Hidrogelurile cu PAA au manifestat **grade de umflare de până la 30.000%** datorită hidrofiliei ridicate a polimerului sintetic. Prin comparație, hidrogelurile cu PAM s-au umflat mai lent și au atins un grad maxim de umflare de doar 16.000%. O concentrație mai mare de inițiator este asociată cu o capacitate mai mare de absorbție și o rată de absorbție mai mică. Prezența Arg în materialele polimerice a determinat o absorbție rapidă a fluidului, dar s-au înregistrat la echilibru grade de umflare mai mici.

Eliberarea in vitro a ibuprofenului. Profilul de eliberare al hidrogelurilor cu PAA indică o eliberare controlată, prelungită, de maxim 4 mg ibuprofen timp de 10 ore și nu ating un platou după 600 minute. Hidrogelurile cu PAM determină o eliberare de ibuprofen în cantitate dublă, mult mai rapid. Odată cu creșterea procentului de APS, crește cantitatea de ibuprofen eliberat. Pe datele experimentale au fost aplicate 4 modele matematice. Rezultatele obținute sugerează faptul că pentru hidrogelul cu PAA, cinetica de eliberare este cel mai bine descrisă de modelul Korsmeier-Peppas, în timp ce pe datele înregistrate pentru hidrogelul cu PAM se fitează bine și modelul Korsmeier-Peppas, și modelul Higuchi. Exponentul de eliberare sugerează un mecanism non-fickian, fapt care indică un transport al medicamentului prin difuzie asociată cu relaxare polimerică.

Testele de biodegradare au dovedit susceptibilitatea materialelor la atacul lizozimului. Raportat la datele din literatură, concentrația de enzimă utilizată indică o bună stabilitate a hidrogelurilor într-un mediu simulat mai agresiv, ele fiind capabile de a menține integritatea rețelei reticulate până la 48 ore.

Testul MTT de evaluare in vitro a citocompatibilității a fost realizat prin metoda contactului direct. Toate materialele testate au fost conjugate cu arginină. Activitatea metabolică relativă indusă de hidrogeluri a fost de 76-100%, în funcție de compoziția fiecărui material. După 24 ore, cel mai bun rezultat a fost înregistrat pentru materialele cu 1,2% APS, urmate de o scădere a activității metabolice în timp. Prin comparație, hidrogelurile cu 1,4% APS au indus un răspuns celular mai bun după o perioadă de lag de 72 ore. Din imaginile de microscopie de fluorescență (**figura 16**) s-au putut face următoarele observații: hidrogelurile au indus un fenomen intens de proliferare celulară, comparativ cu controlul de creștere, cu formarea unui monostrat confluent după 48 ore și, pe baza morfologiei celulare, celulele stem par să se fi diferențiat.

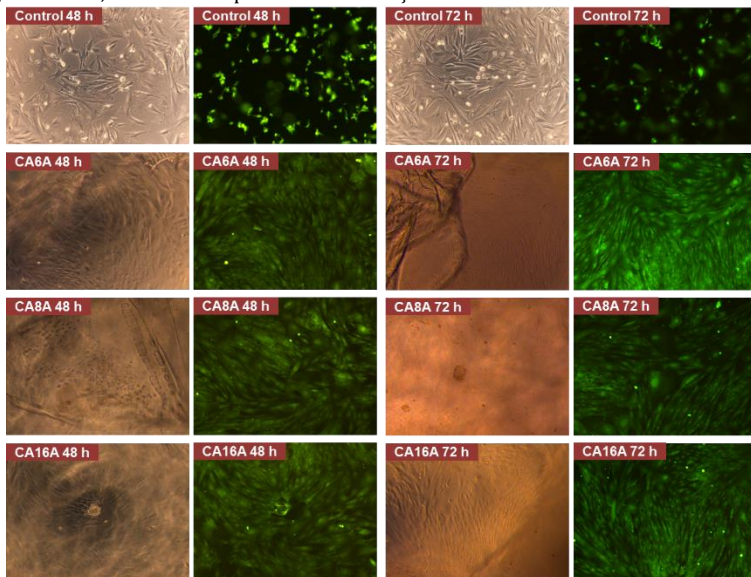


Figura 16 Imagini de microscopie optică și de fluorescență înregistrate pentru controlul de creștere și celulele incubate cu hidrogeluri, cu colorație de calceină (mărire 10x)

Excelentele **proprietăți hemostatice** demonstrate de hidrogeluri (**tabelul 2**) se datorează capacității mari de umflare și structurii poroase. Hidrogelurile pe bază de PAA au manifestat o activitate antibacteriană mai intensă comparativ cu probele cu PAM. Mai mult, la valori mici ale procentului de APS, efectul hemostatic este mai intens.

Tabelul 2 Valorile parametrilor PT, INR și fibrinogen

Probă	PT (s)	INR	Fibrinogen (mg/dl)
Control	13,1 ± 1,2	1,07 ± 0,12	390 ± 15
CA6A	10, 2 ± 0,5	0,70 ± 0,13	460 ± 21
CA10A	10, 2 ± 0,5	0,70 ± 0,16	421 ± 12
CM6A	11,3 ± 0,4	0,79 ± 0,18	447 ± 21
CM10A	11,0 ± 0,5	0,76 ± 0,21	410 ± 33

6.3. HIDROGELURI PE BAZĂ DE POLIMERI NATURALI MODIFICAȚI ȘI POLI(ACID ACRILIC)

Hidrogelurile au fost obținute în urma unei reacții de reticulare a *N-citraconil-colagen și N-citraconil-chitosan cu poli(acidul acrilic)*. În seria de materiale s-a urmărit influența pe care o are raportul colagen/chitosan asupra proprietăților materialului.

Au fost înregistrate **spectre FTIR-ATR** pentru hidrogelurile CCA50, CCA75 și CCA100, care au confirmat prezența polimerului sintetic în rețea.

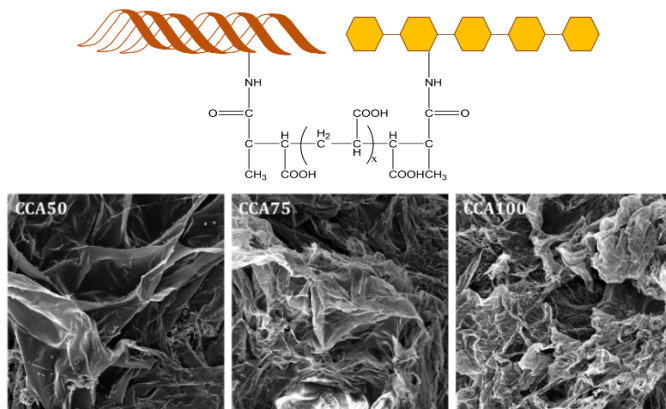


Figura 17 Model teoretic al formării hidrogelurilor. Imagini de microscopie SEM înregistrate pentru hidrogelurile CCA50, CCA75 și CCA100

Analiza morfologiei interne indică faptul că hidrogelurile prezintă o structură internă poroasă, cu pori interconectabili și că, odată cu creșterea ponderii de colagen din structură, aspectul devine mai compact, mai rugos și cu pori mai mici. (**figura 17, tabelul 3**)

Tabelul 3 Dimensiunea porilor, capacitatea de încărcare cu medicament și activitatea antibacteriană a hidrogelurilor, în funcție de compoziție

Probă	Compoziție		Dimetrul porilor (μm)	Ibuprofen încărcat (%)	Antibiotic încărcat (%)	Dimetrul zonei de inhibiție (mm)
	ColCitra (%)	CsCitra (%)				
CCA50	50	50	408 ± 62	43,15	27,22	22,5 ± 2,12
CCA75	75	25	226 ± 69	43,91	15,88	23,33 ± 1,527
CCA100	100	0	73 ± 38	26,56	4,45	23

Capacitatea de umflare indică faptul că absorbția are loc cu o rată ce depinde de compoziția hidrogelurilor. O absorbție mai rapidă este observată la hidrogelurile care conțin mai mult chitosan, comparativ cu cele care au un raport mai mare de collagen. Cu toate acestea, grade mai mari de umflare au fost înregistrate pentru matricele cu mai mult collagen.

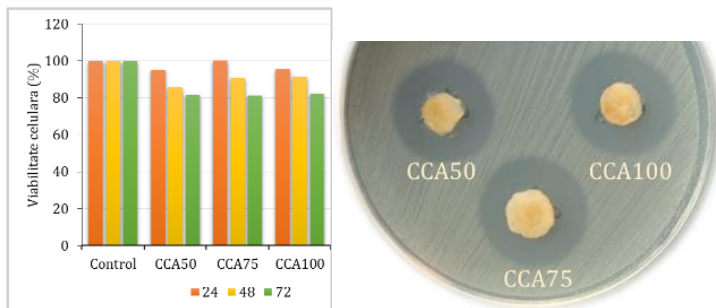


Figura 18 Activitatea metabolică relativă în urma testelor MTT (stânga). Formarea zonelor de inhibiție în jurul hidrogelurilor în cultura bacteriană de *S. aureus* (dreapta)

Activitatea metabolică relativă indică o bună interacțiune a hidrogelurilor puse în contact direct cu cultura de fibroblaste, cu valori ale viabilității celulare de peste 80% pentru toate materialele testate, chiar și după 72 de ore de incubare (figura 18, stânga).

Datele experimentale obținute pentru **capacitatea de încorporare de medicamente** (tabelul 3) indică faptul că procentul de principiu activ încorporat scade odată cu scăderea ponderii de chitosan din structura materialelor. Acest fenomen poate fi asociat atât cu schimbarea compoziției în grupări funcționale ale suprafeței, cât și cu creșterea rugozității și scăderea dimensiunii porilor în materialele cu mai mult collagen. Toate hidrogelurile au determinat apariția unor **zone de inhibiție** (figura 18, dreapta, tabelul 3). Interesant este faptul că, deși se poate observa o tendință de creștere a capacității de înglobare a antibioticelor odată cu creșterea ponderii de chitosan din compoziție, diametrul zonelor de inhibiție este foarte apropiat pentru cele trei probe analizate.

Capitolul 7. HIDROGELURI PE BAZĂ DE CHITOSAN RANFORSATE CU HIDROXIAPATITĂ

Compozitele sunt materiale ce au la bază o combinație de două materiale cu proprietăți fizico-chimice semnificativ diferite, iar combinarea lor duce la obținerea unui material cu proprietăți noi, diferite de cele ale materialelor de plecare. Practic, dezavantajele individuale sunt diminuate, fiind păstrate și puse în valoare doar proprietățile optime ale fiecărui component al compozitului. Compozitele polimeri-ceramice sunt intens studiate pentru aplicații biomedicale, atât în direcția dispozitivelor ortopedice, cât și a celor stomatologice, sub formă de implanturi, cimenturi sau alte tipuri de materiale. Acestea prezintă avantajul similarității cu matricea extracelulară cu compoziție specifică țesutului osos, respectiv o matrice pe bază de polimeri naturali ranforsată cu hidroxiapatită.

În lumina celor prezentate, acest capitol cuprinde rezultatele proprii obținute în urma preparării și caracterizării unor biomateriale noi pe bază de chitosan. S-a dorit îmbunătățirea proprietăților mecanice ale chitosanului prin ranforsarea unor hidrogeluri de polizaharidă cu hidroxiapatită. Specific, s-a urmărit **obținerea unor compozite biocompatibile, cu efect osteoinductiv, cu capacitate de încărcare de medicamente pentru aplicații în ingineria tisulară a osului**. Realizarea acestui deziderat presupune rezolvarea mai multor obiective specifice:

Obiectivul 1: Obținerea biomaterialelor pe bază de chitosan și hidroxiapatită; studiul influenței proporției de fosfat de calciu asupra structurii și proprietăților rețelelor de polizaharidă

Obiectivul 2: Caracterizarea fizico-chimică a biomaterialelor: caracterizare structurală și morfologică, analiza cristalinității, studii mecanice.

Obiectivul 3: Analiza potențialului aplicativ al biomaterialelor ca sisteme de eliberare controlată de medicamente – studiu *in vitro* de stabilitate și depunere minerală.

Hidroxiapatita a fost selectată ca fază anorganică cu rol de ranforsare a rețelei de chitosan, iar compozitele obținute au fost supuse unor **studii structurale** prin spectroscopia FTIR și difracție de raze X. **Analizele SEM (figura 19)** au confirmat morfologia internă poroasă determinată de prezența chitosanului. Se pot observa porii interconectați, cu pereți netezi, cu dimensiuni între 70-190 μm. Odată cu introducerea Hap în structura hidrogelurilor apar o serie de modificări morfologice. Imaginile indică un grad bun de dispersie a fosfatului de calciu, acesta fiind distribuit uniform în matricea polimerică. În cazul compozitelor cu grad mic de Hap (5% și 10%), modificările morfologice nu sunt foarte evidente, dar, odată cu creșterea ponderii de Hap, se poate observa creșterea rugozității pereților porilor și creșterea în dimensiune a porilor, asociată cu un aspect mai rotund al acestora.

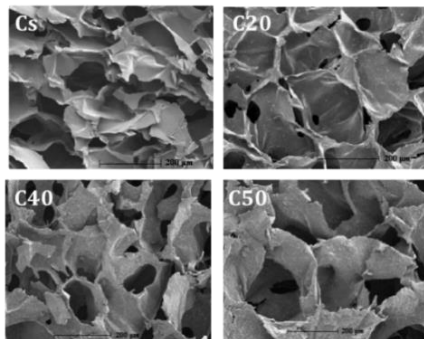


Figura 19 Morfologia internă a hidrogelurilor ranforsate, surprinsă în imagini de microscopie electronică de baleiaj

Toate materialele analizate au prezentat **porozități** de 93-95% (**figura 20, stânga**), calculate raportând masa probei la parametrii dimensionali (diametru și înălțime). Acest fenomen poate fi explicat prin faptul că incluziunea și distribuția graduală a particulelor de Hap în matricea de Cs a avut un efect de ranforsare, porii au devenit mai rigizi, iar accentuarea rugozității a determinat scăderea dimensiunii porilor. Spre deosebire de acest aspect, se observă o creștere a densității rețelei odată cu creșterea ponderii de Hap.

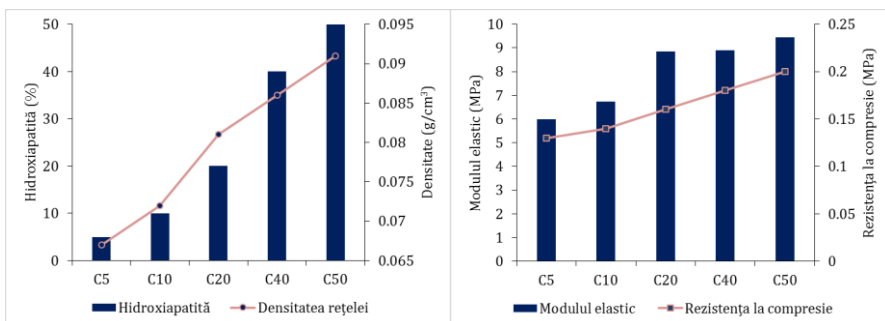


Figura 20 Relația dintre procentul de hidroxiapatită din compoziția materialelor și densitatea rețelelor obținute (stânga), respectiv proprietățile mecanice ale hidrogelurilor ranforsate (dreapta)

Caracteristicile mecanice (figura 20, dreapta) indică o creștere a modulului elastic și a rezistenței la solicitări de compresie odată cu creșterea ponderii de Hap din structura compozitelor. Se mai poate sublinia faptul că, odată cu trecerea pragului de 20% Hap, are loc un salt al rezistenței materialului la solicitări mecanice, care devine mai puțin evidentă la probele cu mai mult fosfat de calciu. În plus, un aspect similar poate fi sesizat și în ceea ce privește densitatea rețelei, care la proba C20 înregistrează un salt semnificativ, fiind explicată astfel și creșterea rezistenței mecanice.

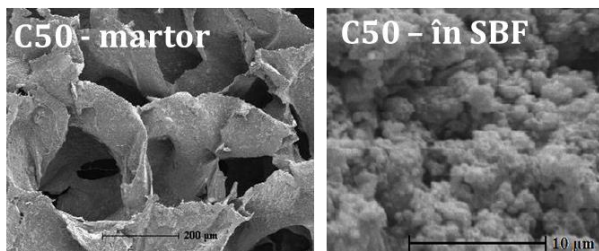


Figura 21 Aspectul probei C50 înainte și după testarea în condiții fiziologice simulate

Studiile în condiții fiziologice simulate au indicat faptul că proba analizată și-a menținut integritatea, fără apariția fragmentărilor, după 7 zile de incubare, dovedind astfel un grad foarte bun de stabilitate. Imaginile SEM (**figura 21**) au indicat colapsarea porilor și alterarea suprafeței. Acest rezultat este atribuit depunerii de albumină, dar mai ales fenomenelor de depunere suplimentară de fosfat de calciu amorf, cu aspect specific. Prin comparație, o probă simplă de chitosan nu a determinat fenomene de depunere minerală, confirmând rolul esențial al Hap în inducerea acestui comportament materialelor compozite.

Capitolul 8. CONCLUZII GENERALE ALE TEZEI

Studiile realizate au permis identificarea unei serii de parametri definitorii pentru proiectarea sistemelor propuse și au permis sistematizarea următoarelor concluzii generale:

Modificări chimice ale polimerilor naturali

1. Au fost realizate cu succes o serie de reacții de modificare a polimerilor naturali pululan, amidon, chitosan și colagen, prin reacții de oxidare selectivă sau *N*-acilare.
2. Pululanul a fost oxidat prin două metode: protocolul cu periodat de sodiu, respectiv protocolul cu sistemul TEMPO/NaBr/NaClO. Scopul a fost acela de a obține pululan 2,3-dialdehidic sau 6-carboxilic. Succesul sintezei a fost confirmat prin analiza comparativă a spectrelor FTIR, ¹³C-RMN și XPS înregistrate pentru pululanul de plecare și cei doi derivați ai săi.
3. A fost supus oxidării amidon din diferite surse. Amidonul de grâu a fost oxidat prin reacția cu periodat, iar funcționalizarea a fost confirmată prin spectroscopie FTIR. Sinteza de amidon 6-carboxilic a fost realizată pornind de la amidon de cartof și de orez. S-a observat o îmbunătățire semnificativă a solubilității amidonului de orez, iar modificarea chimică a fost pusă în evidență prin spectroscopie FTIR și ¹³C-RMN, cu apariția benzilor și picurilor caracteristice grupării carboxilice.
4. Chitosanul a fost funcționalizat prin reacții de *N*-acilare cu anhidride cu scopul îmbunătățirii solubilității la pH fiziologic și al introducerii de grupări C=C în structura sa. S-au realizat studii preliminare de modificare a chitosanului LMW cu anhidridă citraconică. Analiza elementală a indicat un grad de modificare de aproximativ 68%, iar spectrele FTIR indică formarea noilor legături amidice. Studiile pe chitosan HMW au inclus reacții cu anhidridă citraconică sau metacrilică, în diferite rapoarte. Rezultatele au indicat un randament mai mare la reacția cu anhidridă metacrilică, dar s-a observat o solubilitate mai bună a derivaților de citraconil-chitosan. Analiza comparativă a spectrelor FTIR și ¹H-RMN înregistrate pentru chitosanul nativ și derivații săi a indicat formarea noilor legături amidice și prezența restului citraconil, respectiv metacril în structura derivaților.
5. Similar cu studiile realizate pe chitosan, au fost realizate reacții de modificare a colagenului cu scopul introducerii de legături C=C. Studiile pe colagen tip I-III de origine bovină au urmărit influența tipului de anhidridă și a raportului colagen/anhidridă. Rezultatele au indicat un randament mai mare de reacție atunci când este folosit un raport mai mic, deși are loc cuplarea unei cantități mai mari de anhidridă în cazul unui raport mai mare. Totodată, tipul de anhidridă nu influențează semnificativ randamentul de reacție, iar spectrele FTIR și ¹H-RMN înregistrate pentru colagenul nativ și derivații săi aceluși au confirmat faptul că proteina a fost modificată cu succes.

Rețele polimerice de tip hidrogel pe bază de chitosan și pululan oxidat

1. Au fost preparate hidrogeluri de tip sfere pe bază de chitosan și s-au obținut noi biomateriale prin modificarea suprafeței sferelor prin depunerea derivaților oxidați de pululan, cu scopul de a observa modul în care tipul de derivat oxidat influențează proprietățile materialului. Pululanul 2,3-dialdehidic a dus la formarea unor rețele polimerice reticulate chimic prin legături iminice cu chitosanul. Prin comparație, pululanul 6-carboxilic a permis formarea de interacțiuni polielectrolitice cu grupările aminice ale chitosanului.
2. Analiza structurală a fost realizată prin spectroscopie FTIR și XPS. Spectrele FTIR au confirmat prezența celor doi polimeri în structura hidrogelurilor și formarea noilor legături. Analiza datelor XPS a confirmat mecanismele de reticulare urmărite, respectiv interacțiuni electrostatice între grupările carboxilice ale pululanului oxidat și grupările amino ale chitosanului sau legături iminice formate între pululanul dialdehidic și grupările aminice disponibile la suprafața sferelor de chitosan. Analiza TG/DTG a relevat un comportament specific polizaharidelor.
3. Investigațiile SEM au pus în evidență faptul că s-au obținut hidrogeluri cu structuri poroase, cu pori de dimensiuni variabile, de ordinul micrometrilor, interconectați, în directă dependență cu compoziția chimică a materialului. S-a observat o creștere a dimensiunii sferelor odată cu

acoperirea lor cu pululan oxidat și o micșorare semnificativă a porilor, atingând un minim la proba CPP (chitosan/pululan oxidat cu perioadă la 2,3-dialdehidă).

- Curbele DVS confirmă comportamentul de gel și obținerea de structuri cu pori sferici (C, CPT) sau de tip fantă (CPP), iar capacitatea de sorbție și suprafața specifică au variat cu compoziția. Datele obținute în urma simulărilor modelelor matematice indică o afinitate mai mare pentru apă a sferelor cu pululan oxidat, ceea ce reflectă o capacitate mai mare de sorbție, cu toate că acestea necesită o activitate a apei mai mare pentru a forma monostratul.
- Comportamentul la umflare a fost modificat odată cu reticularea cu pululan a sferelor de chitosan prin scăderea gradului de absorbție.
- Testele de stabilitate în condiții *in vitro* au confirmat faptul că aceste hidrogeluri preparate prin metode de reticulare fizică sau chimică sunt stabile la cicluri repetate de uscare-rehidratare, fără pierdere de masă, dar cu modificări structurale reprezentate de colapsarea structurii poroase.
- A fost evaluată capacitatea de încărcare și eliberare de ibuprofen prin diferite mecanisme de transport al principiului activ, în funcție de compoziția materialului. Sferelor au demonstrat capacități mari de înglobare a medicamentului, iar succesul eliberării a putut fi remarcat prin epuizarea cantității încărcate. Proba CPT a prezentat o cinetică de eliberare cu efect întârziat, posibil ca urmare a unor interacțiuni electrostatice. Cinetica este cel mai bine descrisă de ecuație de ordinul întâi și de modelul Weibull. Mecanismul de eliberare este bazat pe difuzie fickiană în cazul sferelor CPP, respectiv transport anormal (difuzie fickiană cuplată cu relaxare polimerică) în cazul probelor C și CPT.
- Testele antibacteriene au demonstrat faptul că sferelor obținute au capacitatea de a încorpora principii active cu molecule de mari dimensiuni, cum sunt antibioticele bacitracină și neomicină, că pot manifesta activitate antibacteriană, și că această activitate este corelată cu capacitatea de încărcare cu medicament, care poate fi optimizată prin varierea compoziției materialului. Ele cresc în seria C > CPP > CPT.
- Studiile de hemocompatibilitate au indicat o activitate ușor hemostatică a materialelor, ca urmare a faptului că grupările funcționale aminice ale chitosanului, care determină un comportament puternic hemostatic în mod normal, sunt implicate în alte interacțiuni fizico-chimice.
- Aceste rezultate sugerează o bună performanță în mediul biologic și confirmă potențialul acestor materiale ca sisteme de eliberare controlată de medicamente.*

Rețele polimerice de tip hidrogel pe bază de polimeri naturali funcționalizați și polimeri acrilici

- Au fost preparate cu succes mai multe tipuri de hidrogeluri pe bază de *N*-citraconil chitosan reticulat chimic cu acrilaiți, fiind urmărită optimizarea proprietăților acestor materiale.
- Într-un prim studiu, au fost comparate două serii de hidrogeluri pe bază de *N*-citraconil chitosan, reticulat chimic cu polimeri acrilici: poli(acid acrilic) sau poli(acid metacrilic). S-a urmărit influența concentrației sistemului inițiator APS/TEMED asupra proprietăților hidrogelurilor. Materialele au fost ulterior conjugate cu arginină, cu scopul de a îmbunătăți anumite caracteristici, precum biocompatibilitatea și capacitatea de absorbție a fluidelor.
- Din analiza elementală și datele de spectroscopie FTIR au fost confirmate modificarea chimică a chitosanului cu anhidridă citraconică și formarea de rețele polimerice reticulate chimic, cu structură variabilă în funcție de natura monomerului și raportul de inițiator folosit la sinteză.
- Prelucrarea imaginilor SEM a relevat o morfologie internă poroasă, cu pori interconectați, ale căror dimensiuni au variat pe un domeniu larg (40-550 μm) în funcție de compoziție și condițiile de preparare. Cele mai mari diametre ale porilor au fost înregistrate pentru materialele cu poli(acid metacrilic), reticulate cu 0,6-1% APS și conjugate cu arginină.
- În urma evaluării capacității de absorbție a fluidelor, s-a observat un comportament superabsorbant al hidrogelurilor la interacțiunea cu soluții de PBS sau SWF, în condiții fiziologice simulate. Gradele de umflare ajung până la 30.000% în cazul hidrogelurilor cu poli(acid acrilic). Conjugarea de arginină reduce drastic timpul de umflare, iar studiile în diferite medii de umflare indică un proces dependent de compoziția și viscozitatea mediului. Simularea modelului

Korsmeyer-Peppas a indicat un mecanism de umflare non-fickian, determinat de relaxarea rețelei polimerice.

6. A fost confirmată capacitatea hidrogelurilor de a elibera ibuprofen în condiții *in vitro*, iar profilele de eliberare corespund cel mai bine modelului descris de ecuația Korsmeyer-Peppas. Exponentul de eliberare determinat sugerează un mecanism non-fickian, similar fenomenului de la umflare.
7. Materialele sintetizate sunt biodegradabile în prezența lizozimului la valori ale concentrației de enzimă peste cele patologice. S-a remarcat o stabilitate a materialelor până la 48 de ore în mediu agresiv de biodegradare.
8. Testele de citocompatibilitate prin MTT și colorație cu calceină au indicat o capacitate a matricelor polimerice de a induce proliferare celulară intensă și diferențierea celulelor stem. A fost favorizată formarea monostratului celular la 48 ore de contact direct, iar accelerarea proliferării poate fi pusă pe seama prezenței argininei în structura materialelor.
9. A fost confirmat caracterul hemostatic al hidrogelurilor, variabil în funcție de natura monomerului utilizat la reticulare și de procentul de APS. Rezultatele sunt o consecință a prezenței chitosanului în structura hidrogelurilor, dar și a comportamentului superabsorbant.
10. *În final, se poate afirma faptul că hidrogelurile obținute răspund cu succes la nevoile impuse materialelor de tip pansament pentru regenerare tisulară și pot fi considerate potrivite pentru aplicații ca sisteme de eliberare controlată de principii active.*
11. A fost preparată o nouă serie de hidrogeluri pe bază de N-citraconil-chitosan, N-citraconil-colagen și poli(acid acrilic), urmărindu-se obținerea unor materiale cu proprietăți mecanice mai bune și cu o interacțiune biologică superioară. Succesul obținerii hidrogelurilor pe bază de polimeri naturali a căiați și poli(acid acrilic) a fost confirmat prin analiza spectrelor FTIR.
12. Imaginile SEM au indicat formarea unor rețele polimerice poroase, cu morfologie variabilă în funcție de compoziția în polimeri naturali: o pondere mai mare de colagen determină o morfologie internă mai rugoasă, cu pori semnificativ mai mici față de hidrogelurile cu mai mult chitosan.
13. Datele cinetice de umflare *in vitro* indică o viteză mare de absorbție a materialelor cu mai mult chitosan, dar grade mai mari de umflare la hidrogelurile cu o proporție mai mare de colagen.
14. Testele de citocompatibilitate *in vitro* prin contact direct indică o bună interacțiune între celule și materialele sintetizate, fiind înregistrate valori ale activității metabolice relative de peste 95% în primele 24 de ore și de peste 80% după 72 de ore de contact.
15. Studiile de încărcare cu medicament au fost realizate cu ibuprofen și respectiv amestec 1:1 de bacitracină și neomicină. A fost demonstrată capacitatea de încorporare a diverselor principii active cu molecule de mari dimensiuni și activitatea antibacteriană a materialelor cu antibiotic. Capacitatea de încărcare a crescut odată cu creșterea ponderii de chitosan din compoziția materialelor, cele mai bune rezultate fiind înregistrate pentru proba CCA50.
16. *În concluzie, hidrogelurile prezintă caracteristicile necesare pentru a fi considerate potrivite ca potențiale matrice pentru regenerare tisulară și eliberare de molecule biologice active.*

Hidrogeluri pe bază de chitosan ranforsate cu hidroxiapatită

1. Au fost obținute cu succes materiale compozite pe bază de chitosan ranforsat cu hidroxiapatită.
2. Succesul obținerii compozitelor a fost confirmat prin analiza comparativă a spectrelor FTIR înregistrate pentru chitosan, hidroxiapatită și materialele compozite. De asemenea, spectrele de difracție de raze X au indicat formarea structurilor dorite, prin prezența picurilor caracteristice celor două componente.
3. Din analiza imaginilor SEM se observă formarea unor rețele poroase, cu morfologie variabilă în funcție de raportul chitosan/hidroxiapatită. Odată cu creșterea ponderii fazei anorganice pereții porilor devin mai rugoși, iar diametrul porilor crește.
4. Densitatea rețelelor și rezistența la solicitări mecanice de compresie cresc odată cu creșterea proporției de hidroxiapatită din compoziția materialelor, confirmând efectul de ranforsare urmărit.

5. Materialele au demonstrat o bună stabilitate în condiții fiziologice simulate și au prezentat fenomene de depunere suplimentară de fosfat de calciu amorf, comportament indus de prezența hidroxiapatitei în structura rețelelor.

Diseminarea rezultatelor și activitatea științifică în cadrul proiectelor de cercetare

Activitatea de cercetare desfășurată pe parcursul stagiului de doctorat în intervalul 2018 – 2021 a dus la obținerea unor rezultate care au fost publicate sub formă de articole științifice în reviste internaționale sau naționale de profil, precum și o serie de participări la conferințe naționale și internaționale. Activitatea a fost de asemenea susținută de o serie de proiecte de cercetare, care sunt amintite mai jos.

Lucrări indexate ISI

1. *All-polysaccharide hydrogels for drug delivery applications: tunable chitosan beads surfaces via physical or chemical interactions, using oxidized pullulan*, **Ioana A. Duceac**, Liliana Vereștiuc, Adina Coroaba, Dragoș Arotăriței, Sergiu Coseri, International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 181, 1047-1062; doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.128.
2. *Novel chitosan-hydroxyapatite macroporous composites for biomedical applications*, **Ioana A. Duceac**, Fulga Tanasa, Revue Roumaine de Chimie, 2020, 65(12), 1111-1119; DOI: 10.33224/rch.2020.65.12.06.
3. *Design and Preparation of New Multifunctional Hydrogels Based on Chitosan/Acrylic Polymers for Drug Delivery and Wound Dressing Applications*, **Ioana A. Duceac**, L. Vereștiuc, C.D. Dimitriu, V. Maier, S. Coseri, Polymers 2020, 12, 1473; doi:10.3390/polym12071473, WOS:000557843400001.

Lucrări indexate ISI Proceeding

1. *Tunable hydrogels based on chitosan/collagen/poly(acrylic acid) for regenerative medicine*, **Ioana A. Duceac**, A. Lobiuc, S. Coseri, L. Vereștiuc, 7th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2019, pp. 1-4, doi: 10.1109/EHB47216.2019.8969886, WOS:000558648300018.
2. *Chitosan—a versatile platform for biomedical applications. I. Chitosan-based media for controlled delivery of bioactive compounds*, **Ioana A. Duceac**, Fulga Tanasa, International Conference Achievements and perspectives of modern chemistry 2019, p. 61-61, Tipografia Academiei de Științe a Moldovei, Chisinau, ISBN 978-9975-62-428-2

Lucrări comunicate la manifestări științifice

1. *Oxidized pullulan for fine-tuning a chitosan-based drug delivery system*, **Ioana A. Duceac**, Sergiu Coseri, 2nd Bucharest Polymer Conference Bucharest, 2021
2. *Chitosan/oxidized pullulan hydrogel beads for controlled drug delivery*, **Ioana A. Duceac**, Sergiu Coseri, Sesiunea de comunicări științifice a tinerilor cercetători MacroYouth, Iasi, 2020
3. *Hydrogels based on chitosan/collagen/acrylic acid for soft tissue engineering*, **Ioana A. Duceac**, A. Apopei, A. Lobiuc, S. Coseri, L. Vereștiuc, International seminar on Materials and Regenerative Medicine BIOREMEDI 2019
4. *Bioinspired multi-sensitive scaffolds for soft tissue engineering and regenerative medicine*, **Ioana A. Duceac**, R. Vulpe, A. Luca, L. Rascanu, O. Bredeteian, M. Butnaru, L. Vereștiuc, Romanian-Jordanian Congress of Medicine and Pharmacy Corimf 2019
5. *Arginine – functionalized hydrogels based on modified chitosan and acrylic polymers with applications in controlled drug delivery*, **Ioana A. Duceac**, A.E. Minuti, F.D. Cojocar, M. Butnaru, M. Zagnat, L. Vereștiuc, 8th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices BIOMMEDD 2018

Premii la manifestări științifice

- Premiul Young Researcher, 7th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2019
- Premiul pentru cea mai bună prezentare orală, 8th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices BIOMMEDD 2018

Lista proiectelor naționale - membru în echipă

Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte de cercetare științifică pentru suportul acordat:

- „Extinderea limitelor spre fabricarea de membrane conductoare de protoni superioare, pentru celule de combustibil”, PN-III-P4-ID-PCE-2020-0476
- „Noi hidrogeluri hibride polimer/peptide ca platforme inovatoare proiectate pentru aplicații în culturi celulare (HYPCELGEL)”, PN-III-P2-2.1-PED-2019-2743
- „Suporturi magnetice inteligente 3D avansate pentru ingineria și regenerarea tisulară a osului (3D SMARTMAGTISS)”, PN-III-P2-2.1-PED-2019-4524
- „Sensor de mare sensibilitate din resurse naturale” HISENSE, PN-III-P2-2.1-PED-2019-0169
- „Dezvoltarea unor noi aliaje dentare cu ruteniu”, din cadrul proiectului complex „Obținerea și expertizarea unor noi materiale biocompatibile pentru aplicații medicale”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0239
- „Aliaje biodegradabile pe bază de Mg pentru implanturi ortopedice”, din cadrul proiectului complex „Obținerea și expertizarea unor noi materiale biocompatibile pentru aplicații medicale”, PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0239

Cursuri de pregătire pe perioada stagiului de doctorat

- Cursul postuniversitar „Evaluări *in vitro* și *in vivo* pentru medicină regenerativă”, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași, mai-iunie 2019
- Cursuri intensive de antreprenoriat și de coaching în cadrul proiectului „Start-up-farm-med”, CNFIS-FDI-2019-0096, iulie-septembrie 2019

Bibliografie selectivă

- [1] R. Langer, J. Vacanti, Tissue engineering, Science (80-.). 260 (1993) 920-926. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8493529>.
- [2] D. Berkowitz, The effect of a long-acting preparation (spansule) of belladonna alkaloids on gastric secretion of patients with peptic ulcer, Gastroenterology. 30 (1956) 608-612. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(56\)80025-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(56)80025-5).
- [3] A.S. Hoffman, The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems, J. Control. Release. 132 (2008) 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.012>.
- [4] Y. Tabata, A New Concept of Biomaterials to Induce Tissue Regeneration, Mater. Sci. Forum. 561-565 (2007) 1467-1470. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/MSF.561-565.1467>.
- [5] R. V. Badhe, S.S. Nipate, Cellulosic materials as bioinks for 3D printing applications, in: Adv. 3D-Printed Syst. Nanosyst. Drug Deliv. Tissue Eng., Elsevier, 2020: pp. 109-137. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818471-4.00005-4>.
- [6] Global Regenerative Medicine Market Research Report 2020, (n.d.). <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-regenerative-medicine-market-research-report-2020-301186469.html> (accessed May 25, 2021).
- [7] The global regenerative medicine market is projected to, (n.d.). <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/10/08/2105385/0/en/The-global-regenerative-medicine-market-is-projected-to-reach-USD-17-9-billion-by-2025-from-USD-8-5-billion-in-2020-at-a-CAGR-of-15-9.html> (accessed May 25, 2021).
- [8] Global Regenerative Medicine Market Size, Industry Price, Growth, Trends, Report and Forecast 2020-2025 - MarketWatch, (n.d.). <https://www.marketwatch.com/press-release/global-regenerative-medicine-market-size-industry-price-growth-trends-report-and-forecast-2020-2025-2021-04-06?tesla=y> (accessed May 25, 2021).
- [9] Global Regenerative Medicine Market (2020 to 2025) - Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast - ResearchAndMarkets.com | Business Wire, (n.d.). <https://www.businesswire.com/news/home/20201104005415/en/Global-Regenerative-Medicine-Market-2020-to-2025---Industry-Trends-Share-Size-Growth-Opportunity-and-Forecast---ResearchAndMarkets.com> (accessed May 25, 2021).

- [10] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H. van Bekkum, Highly selective tempo mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides, *Recl. Des Trav. Chim. Des Pays-Bas.* 113 (1994) 165–166. <https://doi.org/10.1002/recl.19941130307>.
- [11] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H. van Bekkum, Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans, *Carbohydr. Res.* 269 (1995) 89–98. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00343-E](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00343-E).
- [12] P.L. Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, Fast and selective oxidation of primary alcohols to aldehydes or to carboxylic acids and of secondary alcohols to ketones mediated by oxoammonium salts under two-phase conditions, *J. Org. Chem.* 52 (2002) 2559–2562. <https://doi.org/10.1021/J000388A038>.
- [13] A. Porcheddu, E. Colacino, G. Cravotto, F. Delogu, L. De Luca, Mechanically induced oxidation of alcohols to aldehydes and ketones in ambient air: Revisiting TEMPO-assisted oxidations, *Beilstein J. Org. Chem.* 13202. 13 (2017) 2049–2055. <https://doi.org/10.3762/BJOC.13.202>.
- [14] D. Bruneel, E. Schacht, Chemical modification of pullulan: 1. Periodate oxidation, *Polymer (Guildf)*. 34 (1993) 2628–2632. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90600-F](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90600-F).
- [15] W.H. Brown, B.L. Iverson, E. Anslyn, C.S. Foote, *Organic Chemistry*, 7th ed., Cengage Learning, 2013.
- [16] H. Sashiwa, Y. Shigemasa, Chemical modification of chitin and chitosan. 2: Preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins, *Carbohydr. Polym.* 39 (1999) 127–138. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00167-2).
- [17] L. Zhu, K.M. Bratlie, pH sensitive methacrylated chitosan hydrogels with tunable physical and chemical properties, *Biochem. Eng. J.* 132 (2018) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.12.012>.
- [18] S. Potorac, M. Popa, L. Verestiuc, D. Le Cerf, New semi-IPN scaffolds based on HEMA and collagen modified with itaconic anhydride, *Mater. Lett.* 67 (2012) 95–98. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.09.039>.
- [19] R. Ravichandran, M.M. Islam, E.I. Alarcon, A. Samanta, S. Wang, P. Lundström, J. Hilborn, M. Griffith, J. Phopase, Functionalised type-I collagen as a hydrogel building block for bio-orthogonal tissue engineering applications, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2015) 318–326. <https://doi.org/10.1039/c5tb02035b>.
- [20] W. Wang, P. Liu, M. Zhang, J. Hu, F. Xing, The Pore Structure of Phosphoaluminate Cement, *Open J. Compos. Mater.* 02 (2012) 104–112. <https://doi.org/10.4236/ojcm.2012.23012>.
- [21] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.
- [22] M.L. Bruschi, *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Elsevier, Cambridge, 2015.