



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ: Chimie Aplicată și Știința Materialelor

Rezumat
Teză De Doctorat

**Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații
medicale**

**Biocomposites based on natural polymers for medical
applications**

Autor: Ing. Mihaela-Cristina DIACONU (BUNEA)

Conducător Științific: Prof. Dr. Ing. Horia IOVU

București
-2021-

Cuprins

CAPITOLUL 1. Raport critic al datelor de literatură	1
1.1.Biocompozite: definiție, clasificare, metode de obținere, aplicații.....	1
1.2.Biocompozite pe bază de celuloză bacteriană.....	8
1.3.Biocompozite pe bază de polihidroxiclcanoți.....	13
1.4.Biocompozite pe bază de mătase naturală.....	17
1.5.Biosenzori.....	22
CAPITOLUL 2. Tehnici de caracterizare utilizate pentru studiul biocompozitelor.....	26
2.1.Metode de caracterizare fizico-chimice.....	26
2.2.Metodele electrochimice.....	31
2.3.Metodele de caracterizare biologice.....	33
CAPITOLUL 3. Obiectivele tezei de doctorat și elementele de originalitate.....	35
3.1.Obiectivele tezei de doctorat.....	35
3.2.Studiu de caz.....	36
3.3.Elementele de originalitate prezentate în cadrul tezei de doctorat.....	38
CAPITOLUL 4. Biocompozite pe bază de celuloză bacteriană și poli(3-hidroxicbutirat-co-3-hidroxicvalerianat).....	40
4.1.Materiale.....	40
4.2.Prepararea biocompozitelor pe bază de celuloză bacteriană și poli(3-hidroxicbutirat-co-3-hidroxicvalerianat)....	41
4.3.Investigarea proprietăților structurale, morfologice, termice și de udare.....	41
4.4.Testele de biocompatibilitate și citotoxicitate.....	50
CAPITOLUL 5. Biocompozite pe bază de polihidroxiclcanoți și hidroxid dublu stratificat.....	52
5.1.Materiale	52
5.2.Prepararea biocompozitelor pe bază de PHBV și LDH-SDS.....	53
5.3.Investigarea proprietăților structurale, morfologice și termice.....	53
5.4.Teste de viabilitate celulară.....	60

CAPITOLUL 6. Biocompozite pe bază de fibroină din mătasea naturală și magnetită	61
6.1. Materiale	62
6.2. Prepararea biocompozitelor pe bază de fibroină și magnetită.....	62
6.3. Investigarea proprietăților structurale și morfologice.....	64
6.4. Teste de biocompatibilitate și citotoxicitate.....	68
Capitolul 7. Biocompozite pe bază de celuloză bacteriană și magnetită.....	71
7.1. Materiale.....	71
7.2. Prepararea biocompozitelor pe bază de BC și magnetită.....	72
7.3. Investigarea proprietăților structurale și morfologice.....	73
7.4. Teste de biocompatibilitate și citotoxicitate.....	78
CAPITOLUL 8. Hidrogeluri pe bază de fibroină, poliacrilamidă și oxid de grafenă cu potențiale aplicații medicale	81
8.1. Materiale	81
8.2. Prepararea hidrogelurilor compozite pe bază de fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă	82
8.3. Investigarea proprietăților structurale, morfologice, de gonflare și de mineralizare.....	84
8.4. Teste de biocompatibilitate și citotoxicitate	91
CAPITOLUL 9. Biosenzori pe bază de ADN și interacția acestora cu azatioprina.....	96
9.1. Materiale	96
9.2. Comportamentul redox al azatioprinei.....	97
9.3. Interacția azatioprinei cu ADN-ul.....	102
CAPITOLUL 10. Concluzii generale și perspective	116
Referințe bibliografice.....	120

Mulțumiri

*În primul rând doresc să îi mulțumesc d-lui **Prof. Dr. Ing. Horia Iovu**, în calitate de coordonator științific, pentru sprijinul științific, înțelegerea și îndrumarea acordate și pentru că mi-a oferit șansa de a-mi desfășura activitatea de cercetare în cadrul Grupului de Materiale Polimerice Avansate (APMG) pe perioada studiilor doctorale.*

*De asemenea, aș dori să le mulțumesc membrilor comisiei: **Prof. Dr. Ing. Ileana Rău**, **Prof. Dr. Ing. Cătălin Zaharia**, **CSI Dr. Ionuț Enculescu** și **Prof. Dr. Dan Cașcaval**, pentru faptul că au acceptat să facă parte din comisia de susținere și să refereze această teză de doctorat.*

*D-lui **Prof. Dr. Ing. Cătălin Zaharia** îi sunt recunoscătoare pentru încrederea acordată, pentru formarea mea ca cercetător, oferindu-mi șansa de a-mi desfășura activitatea sub îndrumarea sa atât pe parcursul studiilor de Master cât și pe parcursul studiilor doctorale. Astfel, am avut oportunitatea de a-mi însuși cunoștințe despre numeroase tehnici de preparare și caracterizare disponibile în cadrul infrastucturii Grupului APMG, acestea fiindu-mi utile în obținerea rezultatelor din cadrul acestei teze.*

*Aș dori să le mulțumesc pentru colaborarea în diferite etape ale acestei teze: d-lui **CSI Dr. Eugeniu Vasile** (măsurători Difracție de Raze X, Microscopie electronică de Baleiaj și Microscopie Electronică de Transmisie - capitolele 4-8), d-nei **As. Dr. Ing. Eugenia Tănasă (Vasile)** (pentru sinteza nanoparticulelor de magnetită și pentru măsurătorile RAMAN), d-lui **Prof. Dr. Ing. Cătălin Zaharia** (măsurători unghi de contact), d-lui **Conf. Dr. Ing. Paul-Octavian Stănescu** (măsurători Calorimetrie Diferențială de Baleiaj și Analiză Termogravimetrică), **Prof. Dr. Ing. Corina Andronescu** (sinteze chimice de hidroxizi dublu stratificați modificați cu dodecilsulfat de sodiu), **Ș.L. Dr. Ing. Mădălina Pandelescu** (pentru că mi-a oferit de oxidul de grafenă) și **Dr. Ing. Ionuț Radu** (măsurători de Microscopie de Forță Atomică). De asemenea, mulțumesc d-nei **CSI Dr. Monica Enculescu** (măsurători optice și Microscopie Electronică de Baleiaj - capitolul 9), d-lui **CSI Dr. Teodor-Adrian Enache** (măsurători electrochimice), și d-lui **CSI Dr. Victor Diculescu** (măsurători Spectrometrie de masă) de la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Materialelor, d-nei **Dr. Angela Cășărică** de la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Chimico-Farmaceutică pentru că mi-a oferit celuloza bacteriană, d-nei **Prof. Dr. Marieta Costache** și d-nei **Lector Dr. Bianca Gălățeanu** de la Universitatea din București, Facultatea de Biologie, pentru testele celulare realizate. De asemenea, le mulțumesc și pentru sfaturile acordate.*

De asemenea, aş dori să mulţumesc comisiei de îndrumare formată din **Prof. Dr. Ing Sorina Gârea, Prof. Dr. Ing. Izabela Stancu şi Prof. Dr. Ing. Cătălin Zaharia**, precum şi **membrilor grupului de Materiale Polimerice Avansate din cadrul Universităţii Politehnica din Bucureşti (Prof. Dr. Ing. Adriana Lungu, Prof. Dr. Ing. Mariana Ioniţă, Sl. Celina Damian, Sl. Adi Ghebaur, Sl. Diana Draguşin, Sl. Dr. Ing. Brânduşa Bălănuţă, Dr. Ing. Andrada Serafim, Dr. Ing. Iuliana Bîru, Drd. Ing. Anda-Ionelia Voicu)** pentru sugestiile oferite la susţinerea rapoartelor din cadrul stagiului doctoral şi pentru atmosfera prietenoasă creată.

Mulţumesc **CSI Dr. Ing. Nicoleta Preda, CSI Dr. Teodor-Adrian Enache şi CSIII Mihaela Beregoi** pentru sfaturile valoroase, corecturile sugerate şi încurajările oferite pe parcursul redactării tezei de doctorat.

D-lui **CSI Dr. Ionuţ Enculescu** îi mulţumesc pentru încredere şi îndrumarea ştiinţifică acordată, pentru că mi-a oferit şansa de a-mi continua activitatea în cadrul grupului de **Nanostructuri Funcţionale** din cadrul Institutului Naţional de Cercetare-Dezvoltare pentru **Fizica Materialelor**. Astfel, am avut oportunitatea de a-mi extinde aria de cunoştinţe, studiind şi utilizând tehnicile de preparare şi caracterizare disponibile în cadrul infrastructurii **INCDFM**, acestea fiindu-mi utile în obţinerea rezultatelor din ultimul capitol de contribuţii originale din cadrul acestei teze.

Mulţumesc membrilor grupului de cercetare în care îmi desfăşor activitatea în prezent: **CSI Elena Matei, CSI Dr. Mădălina Bârsan-Ignat, CSI Dr. Silviu Polosan, CSII Dr. Andreea Costaş, CSIII Dr. Ing. Corina Ciobotaru, CSIII Dr. Ing. Claudiu Ciobotaru, CSIII Dr. Camelia Florica, CSIII Alexandru Evanghelidis, CSIII Daniel Crişan, CS Dr. Caroline Gomes Sanz, ACS Anca Aldea, ACS Melania Onea, ACS Mariana Apostol, ACS Ricardo Leote-Branco, ACS Daciana Botta**. De asemenea, le mulţumesc şi pentru atmosfera amicală şi suportul moral oferit. Mulţumesc d-nei **Mirela Rădulescu** pentru încurajările permanente şi ajutorul acordat.

Nu în ultimul rând doresc să le mulţumesc **CSII Dr. Oana Raşoga, CSIII Dr. Ing. Liliana Bălescu (Trîncă), CSI Dr. Ing. Denis-Mihaela Panaitescu şi CSII Adriana Frone** pentru susţinerea acordată.

Mulţumesc **familiei mele, soţului meu, Adrian, şi fetiţei mele, Eva**, pentru sprijinul, înţelegerea, susţinerea şi iubirea acordate în toată această perioadă.

Introducere

Prezenta teză de doctorat denumită „Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale” este alcătuită din 10 capitole și un capitol dedicat bibliografiei utilizate. În cadrul acestei teze de doctorat s-a urmărit dezvoltarea de biocompozite și biosenzori pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale în domenii precum vindecarea rănilor, refacerea țesutului osos sau studierea interacției dintre ADN și medicamente imunosupresoare.

În primul capitol al tezei de doctorat intitulat „*Raport critic al datelor de literatură*” divizat în 5 subcapitole sunt redate noțiuni introductive despre importanța biocompozitelor, clasificarea acestora, principalele metode de sinteză, polimerii naturali utilizați în cadrul tezei (celuloză bacteriană, polihidroxialcanoati, fibroină din mătasea naturală) și de asemenea despre biosenzori, tipurile de biosenzori, biosenzorii pe bază de ADN și principalele aplicații ale acestora. În acest capitol se găsesc 2 tabele și 4 figuri.

În capitolul numărul doi al tezei de doctorat denumit „*Tehnici de caracterizare utilizate pentru studiul biocompozitelor*” format din trei subcapitole sunt descrise metodele de caracterizare utilizate pentru pentru investigarea noilor biocompozite și a biosenzorilor pe bază de ADN.

Capitolul trei intitulat „*Obiectivele tezei de doctorat și elementele de originalitate*” este divizat în trei subcapitole în care sunt redate obiectivele tezei de doctorat, un studiu de caz și elementele de originalitate care se regăsesc în cadrul acestei teze de doctorat.

În cadrul capitolului patru intitulat „*Biocompozite pe bază de celuloză bacteriană și poli(3-hidroxibutirat-co-3-hidroxivalerianat)*” împărțit în patru subcapitole este descrisă prepararea și caracterizarea biocompozitelor pe bază de celuloză bacteriană și polihidroxialcanoati, scopul acestui studiu fiind dezvoltarea unor biomateriale cu potențiale aplicații în domeniul vindecării rănilor, fiind realizate și teste de biocompatibilitate. Acest capitol este format din 11 figuri și un tabel.

În capitolul cinci intitulat „*Biocompozite pe bază de polihidroxialcanoati și hidroxizi dublu stratificați*” format din patru subcapitole și 8 figuri sunt descrise obținerea și caracterizarea biocompozitelor pe bază de poli(3-hidroxibutirat-co-3-hidroxivalerianat) și hidroxizi dublu stratificați modificați cu dodecilsulfat de sodiu, materiale ce pot fi considerate posibili candidați pentru domeniul vindecării rănilor ținând cont de biocompatibilitatea prezentată.

Capitolul numărul șase intitulat „*Biocompozite pe bază de fibroină din mătasea naturală și magnetită*”, format din 4 subcapitole și 9 figuri, se referă la prepararea și caracterizarea unor noi biocompozite pe bază de fibroină și magnetită cu potențiale aplicații în domeniul vindecării rănilor.

În capitolul șapte intitulat „*Biocompozite pe bază de celuloză bacteriană și magnetită*” divizat în 4 subcapitole este prezentată obținerea biocompozitelor pe bază de celuloză bacteriană prin metoda *in situ*, materialele rezultate fiind caracterizate din punct de vedere morfo-structural și al biocompatibilității, evidențiindu-se faptul că probele cu un conținut mai mare de magnetită posedă caracteristici adecvate pentru aplicații din domeniul vindecării rănilor. În acest capitol se regăsesc 9 figuri.

În capitolul opt denumit „*Hidrogeluri pe bază de fibroină, poliacrilamidă și oxid de grafenă cu potențiale aplicații medicale*”, au fost preparate și caracterizate din punct de vedere morfo-structural și biologic noi biomateriale de tip hidrogel cu scopul de a obține materiale cu răspuns mecanic superior proprietăților mecanice ale fibroinei, dar care să prezinte biocompatibilitatea excelentă a proteinei din mătasea naturală. Pentru realizarea testelor biologice au fost utilizate biostructuri alcătuite din celule osteoblaste și hidrogeluri de diferite compoziții, deoarece aceste biocompozite au fost proiectate pentru aplicații din domeniul țesuturilor dure. Capitolul este divizat în 4 subcapitole și conține 11 figuri.

Capitolul nouă intitulat „*Biosenzori pe bază de ADN și interacția acestora cu azatioprina*” a avut drept scop investigarea interacției dintre ADN și azatioprină folosind un biosenzor electrochimic pe bază de ADN, fiind utilizate și tehnici complementare precum spectrometria masă, spectroscopia UV-Vis și microscopia electronică de baleiaj. Acest capitol este alcătuit din 3 subcapitole în care se regăsesc 12 figuri și 2 scheme.

Capitolul zece intitulat „*Concluzii generale și perspective*” este capitolul final al tezei de doctorat în care sunt prezentate concluziile finale aferente fiecărui capitol și perspectivele.

Atât numeroatarea paginilor din cadrul cuprinsului cât și referințele din text sunt în concordanță cu cele din teză.

Cuvinte cheie: Biocompozite, celuloză bacteriană, polihidroxialcanoati, fibroină din mătasea naturală, hidrogeluri, biosenzori, azatioprină.

CAPITOLUL 1. Raport critic al datelor de literatură

Biocompozite: definiție, clasificare, metode de obținere, aplicații

Promotoare ale chimiei sustenabile, biocompozitele sunt considerate materialele viitorului deoarece provin din resurse regenerabile, sunt biodegradabile și prin intermediul lor pot fi atinse obiectivele legate de reducerea poluării mediului înconjurător și limitarea crizei energetice cauzate de epuizarea resurselor de petrol. Pe lângă aceste proprietăți, biocompozitele fabricate din polimeri naturali prezintă și biocompatibilitate excelentă, fiind astfel îndeplinite cerințele de bază necesare utilizării acestora în domeniul biomedical. Dezvoltarea biocompozitelor pe bază de polimeri naturali biodegradabili prezintă o importanță deosebită în domeniul ingineriei țesuturilor, abordările recente implicând utilizarea unor suporturi tridimensionale ca schelet-suport pentru activități celulare de vindecare, reconstrucție sau regenerare a țesuturilor vătămate.

Definiție

În funcție de sursa citată, **termenul de biocompozit** este definit astfel: i) un material compozit ce conține unul sau mai multe elemente de origine biologică; ii) un material compozit ce conține doar elemente de origine biologică sau iii) un material compozit biocompatibil și/sau prietenos cu mediul înconjurător destinat aplicațiilor din domeniul medical[1–3]. În literatura de specialitate, biocompozitele mai sunt cunoscute și sub denumirea de biohibride sau compozite verzi.

Biocompozitele combină proprietățile materialelor componente pentru a oferi o compatibilitate mecanică și fiziologică cât mai bună cu țesuturile gazdă. Avantajul major al biocompozitelor este reprezentat de posibilitatea obținerii unei game variate de materiale cu proprietăți controlate care își pot găsi aplicații în diverse domenii. Similar compozitelor clasice, biocompozitele prezintă proprietăți superioare față de cele specifice fiecărui component în parte.

Din punct de vedere compozițional, biocompozitele sunt alcătuite dintr-un material de bază, (matricea) și un material complementar (materialul de armare).

Matricea constituie faza continuă din biocompozite, putând fi de **natură organică** (polimeri naturali - polizaharide, proteine, lignină, etc. sau polimeri sintetici - alcool polivinilic, poliacrilamidă, acid polilactic, polipirol, etc.) sau de **natură anorganică** (hidroxiapatită (Hap))[3].

Materialul de armare este faza discontinuă din biocompozite, putând fi de **natură organică** (fibre naturale, polimeri, nanostructuri de carbon) sau de **natură anorganică**

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

(metale, hidroxizi dublu stratificați, nanoparticule magnetice, materiale ceramice, etc.) și având o influență importantă asupra proprietăților finale ale materialului sintetizat.

Clasificare

Biocompozitele și-au găsit aplicații în medicină, bioinginerie, automobile, construcții, etc. În cazul biocompozitelor utilizate în domeniul medical, o clasificare poate fi făcută în funcție de originea componentelor[3]:

- **organic/organic;**
- **organic/anorganic;**
- **anorganic/anorganic.**

Biocompozitele organic/organic sunt compozite de tip polimer natural/polimer natural, de exemplu alginat de sodiu/fibroină din mătase naturală, amidon/lignină, chitosan/celuloză sau polimer natural/polimer sintetic, de exemplu acid polilactic/fibre de celuloză, amidon/alcool polivinilic/celuloză. Acest tip de biocompozite au numeroase aplicații deoarece prezintă o biocompatibilitate ridicată și o flexibilitate excelentă[3,40]

Biocompozitele organic/anorganic sunt compozite esențiale în numeroase aplicații din domeniul medical deoarece prezintă avantaje precum flexibilitate, biocompatibilitate sau biodegradabilitate provenite de la matricea organică și proprietăți mecanice și/sau antimicrobiene îmbunătățite obținute prin prezența componentei anorganice. Unul dintre cele mai importante avantaje ale acestui tip de compozite este reprezentat de faptul că țesuturile dure sunt, în general, biocompozite naturale de tip organic/anorganic acest lucru facilitând obținerea unor biocompozite cu proprietăți asemănătoare celor caracteristice țesuturilor umane. Cele mai bune exemple din natură sunt osul sau dinții, acestea fiind alcătuite dintr-o matrice organică din fibre de colagen de tip I, ranforsată cu hidroxiapatită sub formă de cristale, la care se adaugă substanțe sau cimenturi naturale bioactive (proteine, polizaharide, mucopolizaharide) și apă[40,41].

Biocompozitele anorganic/anorganic includ materiale pe bază de hidroxiapatită/alumină/zirconiu, hidroxiapatită/nanotuburi de carbon/argint, hidroxiapatită/nanoparticule de argint, acestea având aplicații în ingineria țesuturilor dure[3,40].

O altă clasificare a biocompozitelor utilizate în aplicațiile medicale ține cont de gradul de degradare al acestora în organismul uman, din acest punct de vedere biocompozitele putând fi divizate astfel:

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

- **biocompozite neresorbabile** - atât matricea cât și agentul de armare nu pot fi resorbite în organismul uman. Materialele au aplicații în sfera medicinei ortopedice precum proteze de genunchi, plăci osoase, fixatoare externe[42];
- **biocompozite parțial biodegradabile** - matricea este dintr-un polimer biodegradabil, iar agentul de ranforsare dintr-un material neresorbabil. Materialele au aplicații în domenii precum reconstrucția cartilajului[43], biosenzori[44];
- **biocompozite resorbabile** - atât matricea cât și agentul de ranforsare provin din materiale biodegradabile în organismul uman[45]. Acest tip de materiale se utilizează în fixarea fracturilor și artrodeza diferitelor părți anatomice

Metode de preparare a biocompozitelor pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

Metodele de obținere pot fi sistematizate în trei categorii: metode convenționale, din soluție și din stare solidă, în **Figura 1.1.** fiind prezentate tehnici ce aparțin fiecărei clase[46]. În funcție de caracteristicile necesare pentru aplicația vizată, tipul de materiale utilizate și metoda de preparare folosită, biocompozitele pot fi obținute sub formă de fibre, filme, membrane, tuburi, acoperiri, spume, bureți și hidrogeluri.

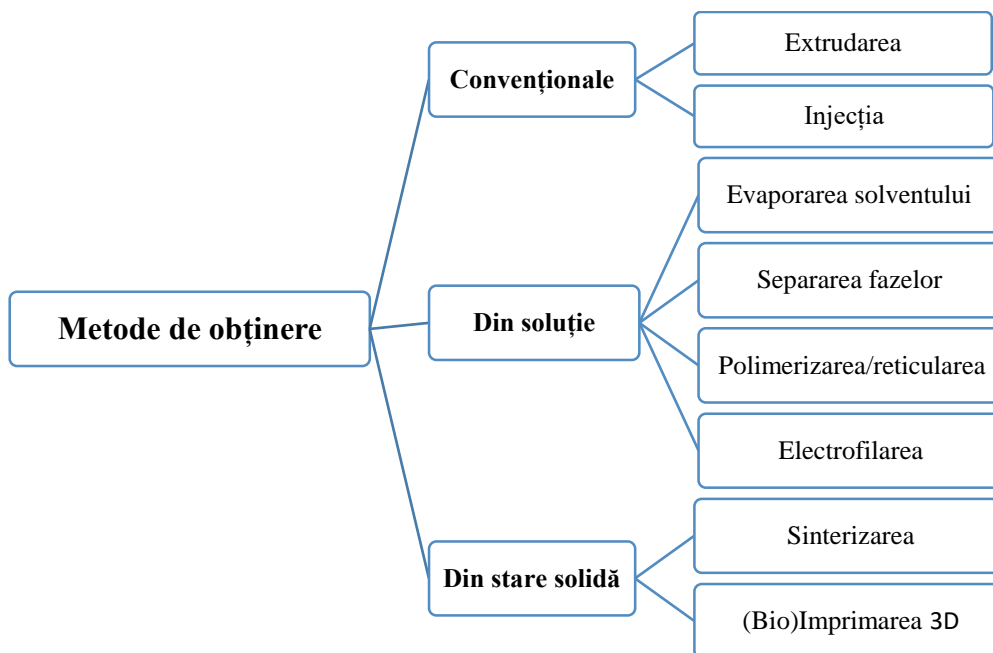


Figura 1.1. Metode reprezentative de obținere a materialelor biocompozitelor cu aplicabilitate în domeniul medical.

Biosenzori

Definiție

Un **biosenzor** este un dispozitiv alcătuit din două elemente: un bioreceptor reprezentat de un element biologic imobilizat care interacționează cu analitul și un traductor utilizat pentru a converti efectul (bio)chimic, rezultat din interacțiunea analitului cu bioreceptorul, într-unul electronic[217,218]. Bioreceptorul poate fi reprezentat de țesut[219], celule[220,221], enzime[222,223], anticorpi[223], acizi nucleici (precum acidul dezoxiribonucleic (ADN))[224], în timp ce traductorul are rolul de a transforma energia respectivă într-un semnal analitic util care poate fi de natură electrochimică[224–227], optică[228] sau piezoelectrică[229]. Utilizarea primului biosenzor a fost raportată în anul 1962 pentru monitorizarea nivelului gazelor din sânge în timpul unei operații[230]. În prezent unul dintre cei mai cunoscuți biosenzori este biosenzorul de glucoză[231], dar domeniul biosenzorilor este studiat intensiv urmărindu-se dezvoltarea de biosenzori cu aplicații în numeroase domenii precum medicină, agricultură, securitate, siguranță alimentară, etc.[218,232–234]. Mai mult, datorită descoperirilor din domeniul instrumentației electronice, biosenzorii pot fi miniaturizați conducând la obținerea unor dispozitive de tip “laborator într-un cip” (lab-on-chip) pentru monitorizare *in vivo* în timp real sau ca dispozitive portabile[218,222,235].

CAPITOLUL 2. Tehnici de caracterizare utilizate pentru studiul biocompozitelor

Biocompozitele destinate aplicațiilor din domeniul medical sunt materiale ce necesită o caracterizare interdisciplinară. Astfel, în cadrul acestei teze de doctorat, pentru investigarea proprietăților structurale, morfologice, termice, de udabilitate, a capacității de gonflare, a capacității de mineralizare, a biocompatibilitatii și a citotoxicității biocompozitelor preparate au fost utilizate următoarele tehnici: Spectroscopie în infraroșu cu transformantă Fourier (FTIR), Spectroscopie RAMAN, Spectrometrie de masă (MS), Spectrometrie UV-VIS, Difracție de raze X (XRD), Microscopie electronică de baleiaj (SEM), Microscopie electronică de transmisie (TEM), Microscopie de forță atomică (AFM), unghi de contact; Analiza termogravimetrică (TGA), calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC). Un alt tip de analize utilizate pentru caracterizarea biosenzorilor sunt cele electrochimice precum Voltametrie ciclică (CV) și în puls diferențial (DPV), iar testele *in vitro* au constatat în evaluarea biocompatibilității (Live/Dead prin Microscopie de fluorescență), evaluarea viabilității și proliferării celulare (MTT) și evaluarea citotoxicității biomaterialelor (LDH).

CAPITOLUL 3. Obiectivele tezei de doctorat și elementele de originalitate

3.1. Obiectivele tezei de doctorat

Scopul prezentei teze de doctorat constă în utilizarea biopolimerilor pentru dezvoltarea de noi materiale biocompozite ce pot fi utilizate în aplicații din domeniul medical drept pansamente pentru vindecarea rănilor sau suporturi pentru refacerea țesutului osos și pentru studierea interacției dintre ADN și azatioprină folosind biosenzorii electrochimici pe bază de ADN.

În acest sens au fost stabilite următoarele obiective:

O1. Identificarea biopolimerilor potriviți pentru aplicațiile vizate. Această etapă a constat în alegerea unor polimeri naturali biocompatibili și a unor agenți de ranforsare care să îmbunătățească proprietățile matricii polimerice în funcție de cerințele aplicațiilor alese.

O2. Obținerea unor biocompozite noi utilizând materialele identificate în vederea preparării obținerea unor sisteme biocompatibile cu caracteristici adecvate pentru aplicațiile menționate.

O3. Caracterizarea biocompozitelor fabricate din punct de vedere al proprietăților structurale, morfologice, termice, de udare, a capacității de gonflare, a capacității de mineralizare, a biocompatibilității și/sau citotoxicității. Astfel, modul de interacționare și rapoartele optime între cele două componente ale biocompozitelor au fost evaluate în materialele nou sintetizate prin tehnici FTIR, Raman, XRD, SEM, TEM, AFM, TGA, DSC, unghi de contact, biocompatibilitatea și/sau citotoxicitatea materialelor fiind evaluată pe linii de celule stem derivate din adipocite umane (hASCs) în cazul biocompozitelor cu posibile aplicații în domeniul vindecării rănilor și pe celule preosteoblaste MC3T3-E1 de la șoareci (ATCC® CRL-2593™) pentru hidrogelurile biocompozite cu posibile aplicații în domeniul ingineriei țesuturilor dure.

O4. Determinarea comportamentului electrochimic și al mecanismului de transfer electronic al azatioprinei cu ajutorul tehnicilor voltametrice precum voltametrie ciclică și voltametrie în puls diferențial utilizând un electrod de carbon sticlos. De asemenea, este importantă și studierea procesului de interacție dintre acest medicament imunosupresiv și acidul dezoxiribonucleic (ADN) folosind biosenzori electrochimici pe bază de ADN.

3.3. Elementele de originalitate prezentate în cadrul tezei de doctorat

În raport cu stadiul actual al cercetării prezentat mai sus, în continuare vor fi prezentate elementele de originalitate ale acestei teze de doctorat.

Elementele de noutate din cadrul studiului biocompozitelor pe bază de celuloză și poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat (BC/PHBHV) cu potențiale aplicații în domeniul vindecării rănilor sunt reprezentate atât de folosirea membranei uscate de celuloză bacteriană în cadrul procesului de obținere a materialelor cât și de utilizarea PHBHV.

În cazul biocompozitelor pe bază de poli (3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat) și hidroxizi dublu stratificați cu posibile aplicații în domeniul vindecării rănilor, elementul de noutate constă în faptul că acestea au fost proiectate pentru aplicații din domeniul medical, având în vedere că până la momentul realizării acestui studiu, acest tip de materiale erau studiate cu precădere pentru îmbunătățirea proprietăților termice ale matricei polimerice sau pentru aplicații din domeniul purificării apelor industriale.

În ceea ce privește dezvoltarea de biocompozite pe bază de celuloză bacteriană și magnetită, o abordare originală a constat în dispersarea nanoparticulelor magnetice în mediul de cultură al bacteriilor producătoare conducând la obținerea *in situ* a materialelor nanocompozite. Caracterizarea ulterioară a materialelor obținute a relevat faptul că aceste biocompozite prezintă proprietăți ce le recomandă ca potențiali candidați pentru domeniul vindecării rănilor. În cazul biocompozitelor pe bază de fibroină și nanoparticule magnetice, sinteza acestui tip de materiale a fost raportată pentru prima dată în literatura de specialitate, materialele obținute prezentând proprietăți potrivite pentru aplicațiile biomedicale.

Utilizarea hidrogelurilor pe bază de fibroină, acrilamidă și oxid de grafenă pentru aplicațiile din domeniul reconstrucției osoase, reprezintă un element de noutate în literatura de specialitate, caracterizările realizate evidențiind proprietăți morfo-structurale adecvate pentru domeniul medical și o capacitate bună de mineralizare obținută printr-un efect sinergic al proprietăților componentelor utilizați, calități care le fac eligibile pentru domeniul ingineriei țesuturilor dure.

În cazul studiului legat de mecanismul redox al azatioprinei și interacției acesteia cu ADN-ul, elementul de noutate constă în propunerea unui mecanism de interacție între azatioprină și ADN pe baza datelor electrochimice și de spectrometrie de masă obținute.

CAPITOLUL 4. Biocompozite pe bază de celuloză bacteriană și poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat)

În cadrul acestui capitol este prezentată dezvoltarea unor biocompozite de tip organic-organic pe bază de celuloză bacteriană și poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat) cu potențiale aplicații în domeniul vindecării rănilor. Domeniul vindecării rănilor este un domeniu în continuă expansiune datorită creșterii costurilor de îngrijire și a îmbătrânirii populației, dar și din cauza creșterii incidenței diabetului și a obezității. Unul dintre polimerii studiați intens pentru aplicații în domeniul vindecării rănilor este celuloza bacteriană deoarece posedă caracteristici precum grad înalt de puritate, capacitate bună de absorbție și retenție a fluidelor și stabilitate mecanică.

Totuși, pentru a obține biocompozite cu proprietăți adecvate vindecării rănilor este necesară îmbunătățirea biocompatibilității, aderenței pansamentului față de țesutul dermic, absorbției și eliberării de fluide, proprietăților de barieră și a celor antimicrobiene, folosirea polihidroxi-alcanoatului având drept scop îmbunătățirea anumitor proprietăți ale BC precum biocompatibilitate, biodegradabilitate și proprietăți de barieră.

În acest context, în cadrul acestui studiu, BC a fost modificată printr-o metodă *ex situ*, respectiv prin impregnarea cu soluții de PHBHV în cloroform folosind diferite rapoarte între cei doi biopolimeri, procesul de obținere al biocompozitelor fiind redat în **Figura 4.1.**

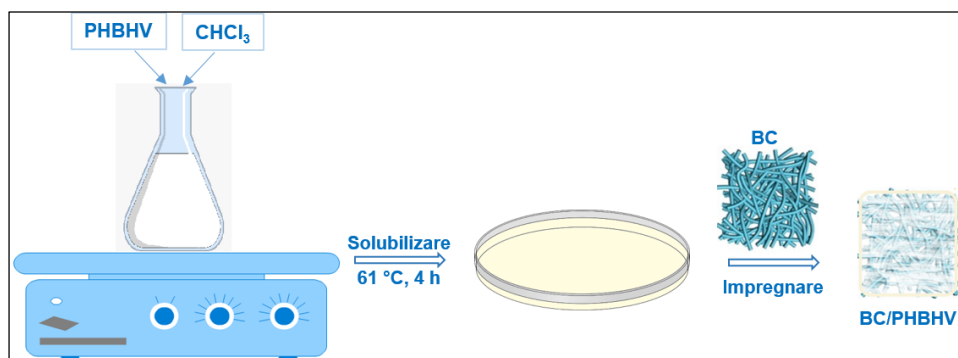


Figura 4.1. Reprezentarea schematică a etapelor implicate în obținerea biocompozitelor pe bază de BC și PHBHV (1/1, 1/2 și 1/5).

Prin analiza XRD a fost analizată evoluția modului de cristalizare al BC odată cu creșterea concentrației de polihidroxi-alcanoat observându-se creșterea dimensiunii cristalitelor odată cu creșterea concentrației de poliester natural.

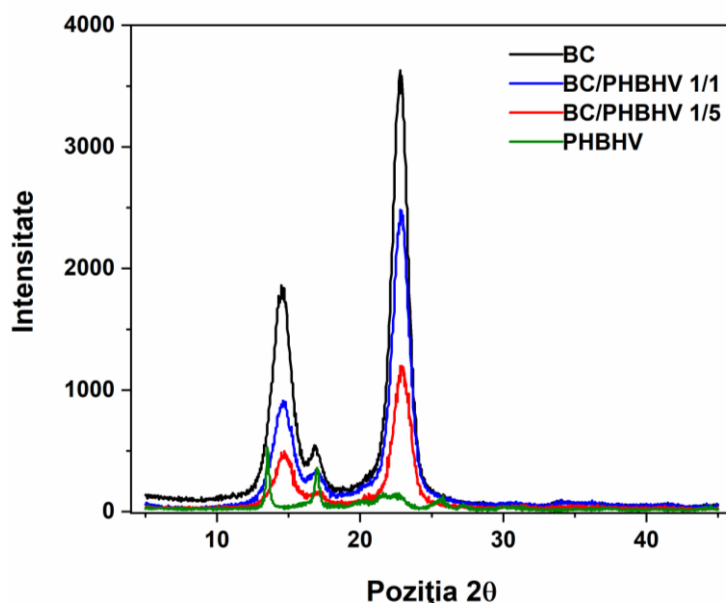


Figura 4.5. Difractogramele de raze X ale probelor martor de BC și PHBV și a biocompozitelor BC/PHBV 1/1 și 1/5.

În continuare, a fost analizată morfologia biocompozitelor BC/PHBV imaginile SEM fiind prezentate în **Figura 4.6** și relevând atât arhitectura membranei de celuloză bacteriană cât și modul aleatoriu de dispersare al filmului de poliester printre nanofibrele de celuloză bacteriană.

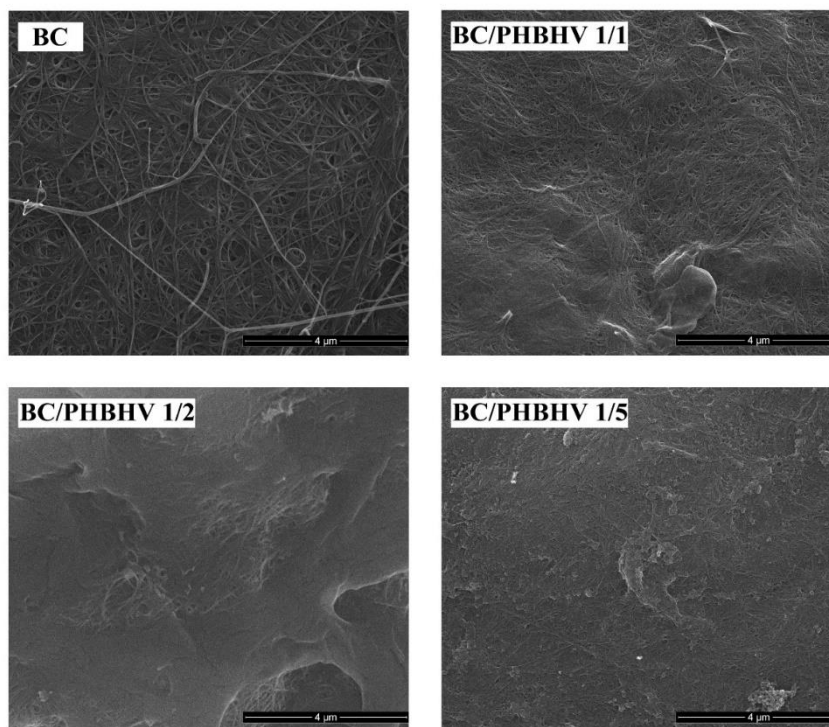


Figura 4.6. Imaginile SEM ale membranei de celuloză bacteriană și a biocompozitelor de tip BC/PHBV cu diferite rapoarte masice: 1/1, 1/2 și 1/5.

Următoarea etapă a constat în evaluarea prezenței/absenței urmelor de solvent (cloroform) în cadrul biocompozitelor preparate prin intermediul analizei TGA rezultatele obținute evidențiind prezența urmelor de solvent rezidual (**Figura 4.7.**).

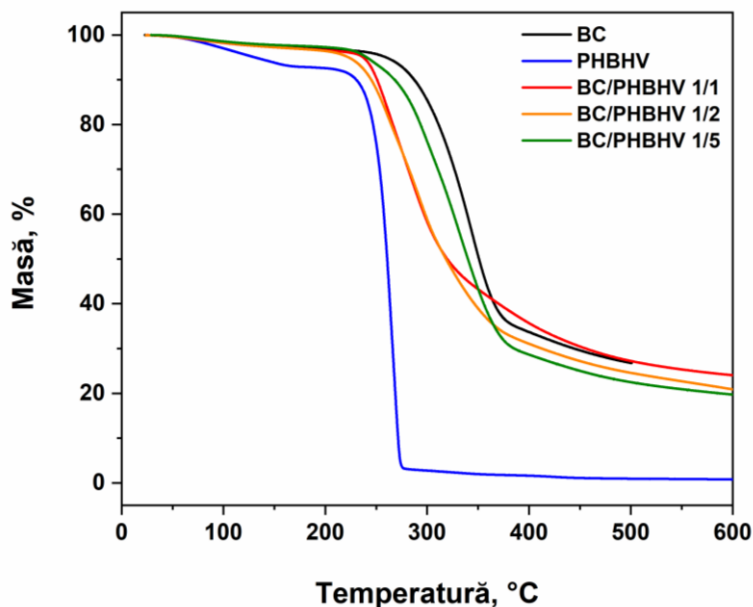


Figura 4.7. Curbele TGA ale celulozei bacteriene, PHBHV-film și biocompozitelor pe bază de BC/PHBHV (1/1, 1/2, 1/5).

Proprietățile de udare ale biocompozitelor obținute au fost testate prin măsurarea unghiului de contact prin care s-a evidențiat creșterea valorilor unghiului de contact a biocompozitelor în comparație cu valoarea obținută pentru BC, subliniindu-se tendința de hidrofobizare a suprafeței BC după impregnarea cu PHBHV. În **Figura 4.9.** fiind prezentate imaginile optice obținute.



Figura 4.9. Fotografiiile optice ale formei picăturii de apă plasată pe suprafața probelor BC, biocompozitul BC/PHBHV 1/5 și proba martor de PHBHV

Ultima etapă a acestui studiu a constat în realizarea testelor de biocompatibilitate pe bicompozitele obținute pe linii de celule stem derivate din adipocite umane (hASC) prin

care s-a evidențiat faptul că materialele sintetizate prezintă o biocompatibilitate relativ bună.

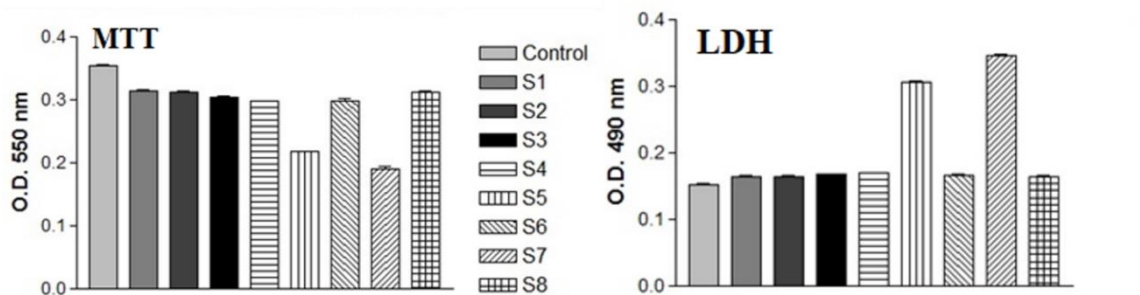


Figura 4.11. Analize privind viabilitatea și proliferarea celulară MTT și LDH pentru probele de biocompozite de tip BC/PHBHV cu diferite compoziții (S1-4), membrană de BC (S5), BC/PHBHV obținut direct din mediul de cultură (S6); PHBHV film (S7) și BC/PHBHV obținut direct din mediul de cultură, membrană liofilizată (S8).

Pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea acestor materiale ar fi necesară o purificare mai eficientă a materialelor sintetizate pentru a elimina cât mai eficient urmele de solvent sau utilizarea altor metode de obținere a biocompozitelor precum cele din topitură.

CAPITOLUL 5. Biocompozite pe bază de polihidroxiacanoați și hidroxizi dublu stratificați

Optimizarea materialelor destinate fabricării pansamentelor utilizate în domeniul vindecării rănilor deschise reprezintă o provocare pentru cercetătorii din medicină, biologie sau știința materialelor deoarece este necesară obținerea unor materiale care să asigure o vindecare rapidă a răni, să fie biocompatibile și să mențină un mediu antimicrobian pentru prevenirea eventualelor infecții. Biocompozitele sunt potrivite pentru acest tip de aplicații deoarece prezintă toxicitate scăzută, biodegradabilitate și biocompatibilitate ridicate.

În acest context, în cadrul acestui capitol al tezei de doctorat de contribuții originale este descrisă sinteza și caracterizarea unor biocompozite filmogene pe bază de polihidroxiacanoați și hidroxizi dublu stratificați organofilizați preparate prin dispersarea prin ultrasonare a argilei anionice în soluția de polimer. Filmele biocompozite au fost obținute prin tehnica de evaporare a solventului (**Figura 5.1**).

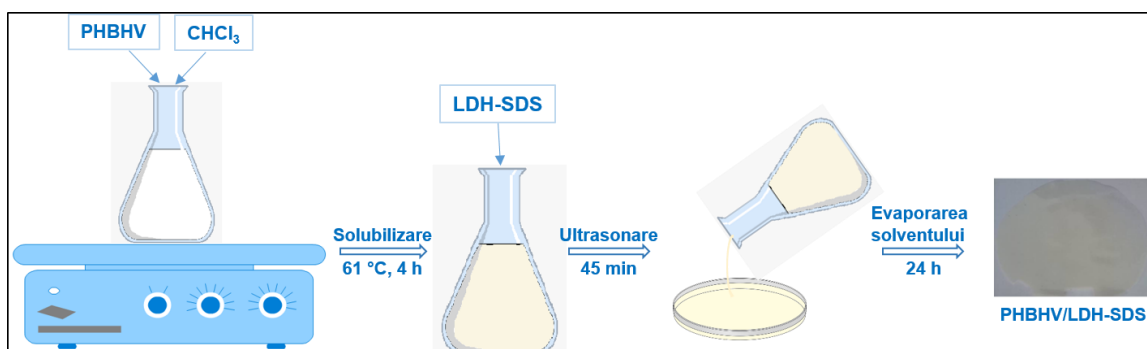


Figura 5.1. Reprezentarea schematică a procedurii de obținere a filmelor biocompozite PHBHV/LDH-SDS (1%, 2% și 3%)

Investigarea proprietăților morfo-structurale a reprezentat primul pas în caracterizarea biocompozitelor de tip organic-anorganic obținute și au fost realizate prin tehnicile FTIR, XRD și SEM.

Spectrele FTIR ale biocompozitelor pe bază de poli(3-hidroxiacanoat-co-3-hidroxiacanoat) și hidroxizi dublu stratificați modificați cu dodecilsulfat de sodiu prezentate în **Figura 5.2.** au evidențiat faptul că prezența argilei anionice nu produce modificări asupra structurii organice a matricii polimerice.

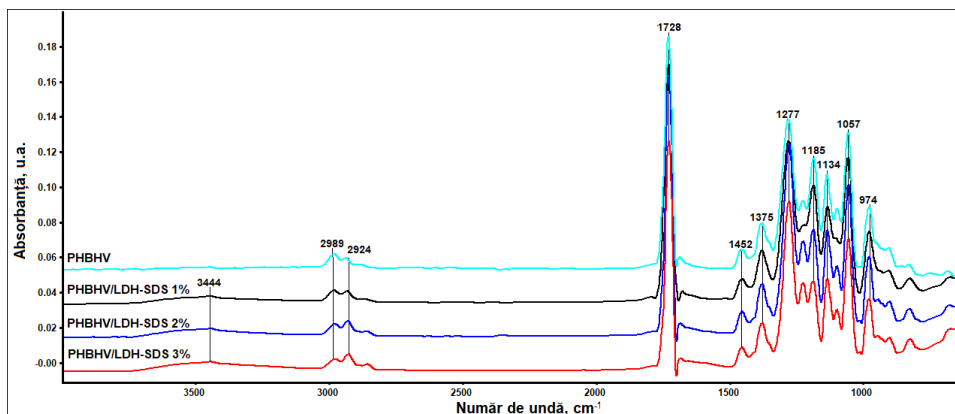


Figura 5.2. Spectrele FTIR ale filmului de PHBHV și biocompozitelor PHBHV/LDH-SDS cu 1%, 2% și 3% LDH-SDS

Prin analiza XRD s-a dovedit că hidroxizii dublu stratificați își păstrează structura structură ordonată în cadrul biocompozitelor biocompozitul obținut fiind de tip intercalat (**Figura 5.3.**).

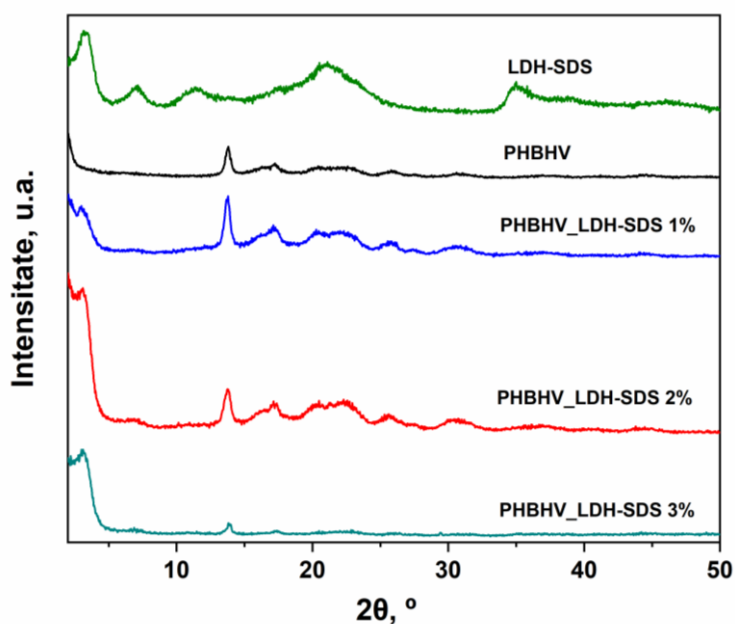


Figura 5.3. Difractogramele de raze X ale LDH-SDS, filmului de PHBHV și ale biocompozitelor PHBHV/LDH-SDS cu 1%, 2% și 3% LDH-SDS.

Imaginile SEM au relevat obținerea unor biocompozite cu suprafețe rugoase datorită dispersării particulelor de argilă anionică în matricea polimeră.

Prin analizele TGA s-a arătat că prezența hidroxidului dublu stratificat conduce la scăderea temperaturii de degradare a matricii polimerice, observându-se faptul că

odată cu creșterea concentrației de argilă crește și temperatura de degradare (**Figura 5.4.**).

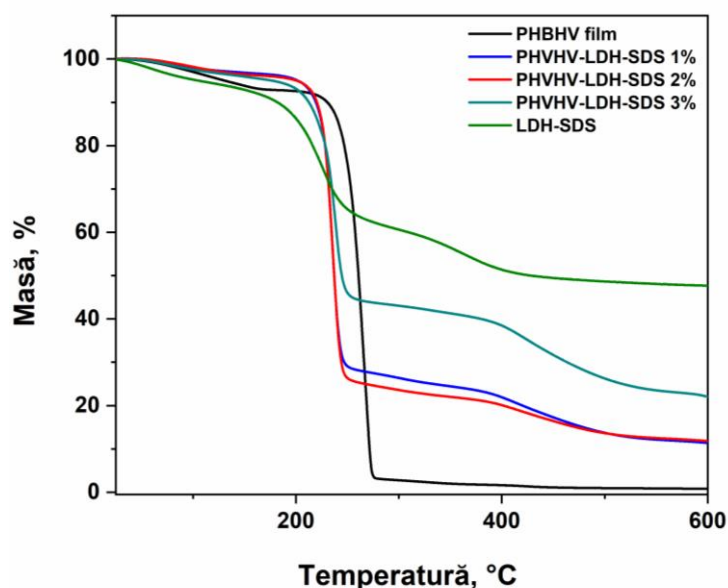


Figura 5.4. Curbele termogravimetrice pentru: PHBHV – martor și biocompozitele PHBHV_LDH-SDS cu 1%, 2%, respectiv 3% LDH-SDS și LDH-SDS

Prin intermediul analizei DSC s-a determinat faptul că temperatura de topire a probelor nu este influențată de prezența sau creșterea conținutului de argilă anionică.

Evaluarea biocompatibilității materialelor obținute a fost realizată prin intermediul testului LIVE/DEAD, observându-se o mai bună mimicitate cu mediu celular în comparație cu materialul de referință utilizat la 24 de ore de la însămânțarea celulelor.

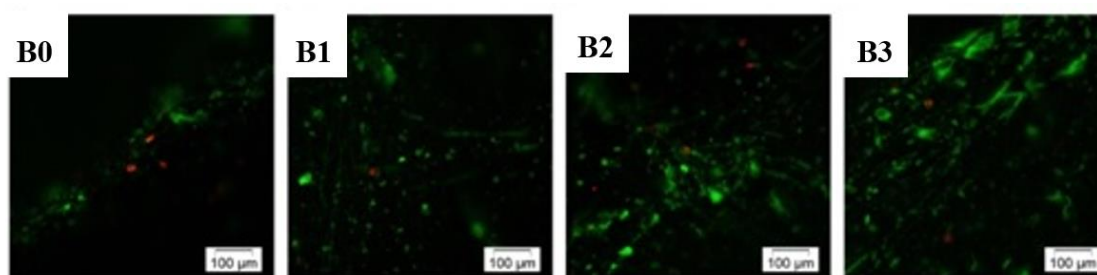


Figura.5.7: Imagini de microscopie confocală după marcarea fluorescentă a celulelor pentru a evidenția celulele vii/moarte pe proba martor din PHBHV (B0) și biocompozitele pe baza de PHBHV și LDH-SDS cu un conținut de 1% (B1), 2% (B2) și 3% (B3) de LDH-SDS.

Datorită biocompatibilității bune, aceste biocompozite sunt potențiali candidați pentru testele *in vivo* pentru aplicații din domeniul vindecării rănilor.

CAPITOLUL 6. Biocompozite pe bază de fibroină din mătasea naturală și magnetită

Aplicațiile medicale ale fibroinei din mătase naturală, proteină obținută prin regenerarea din soluție urmată de procesele de precipitare sau modificare chimică sunt obținerea de fire de sutură, materiale pentru vindecarea rănilor, obținerea de hidrogeluri pe bază de fibroină pentru imobilizarea sau eliberarea controlată de principii active, reconstrucția țesuturilor și culturilor celulare, etc.

Suporturile pe bază de mătase au fost intens studiate pentru eventuale aplicații în domeniul biomedical și biotehnologic. Pentru a obține suporturi cu proprietăți îmbunătățite, mătasea a fost amestecată cu polimeri sintetici (ex: alcoolul polivinilic sau poliacrilamida), polimeri naturali (ex: colagenul, elastina, gelatina, etc.) sau materiale anorganice (ex: nanoparticule magnetice, hidroxiapatită sau argile). În plus, în ultimii ani, nanoparticulele magnetice și în special magnetita, au fost folosite pentru dezvoltarea unei game variate de aplicații biomedicale și biotehnologice precum agenți de contrast, biosenzori, hipertermia cancerului și sisteme de eliberare controlată de medicamente.

În acest context, în acest capitol sunt prezentate datele sinteza și caracterizarea biocompozitelor pe bază de fibroină din mătasea naturală și nanoparticule de tip magnetită. Procedul de preparare al filmelor biocompozite a cuprins următoarele etape: obținerea soluției de fibroină din mătasea naturală, dispersarea nanoparticulelor magnetice în matricea polimeră și obținerea filmelor biocompozite prin metoda de evaporare a solventului fiind descris în **Figura 6.2**.

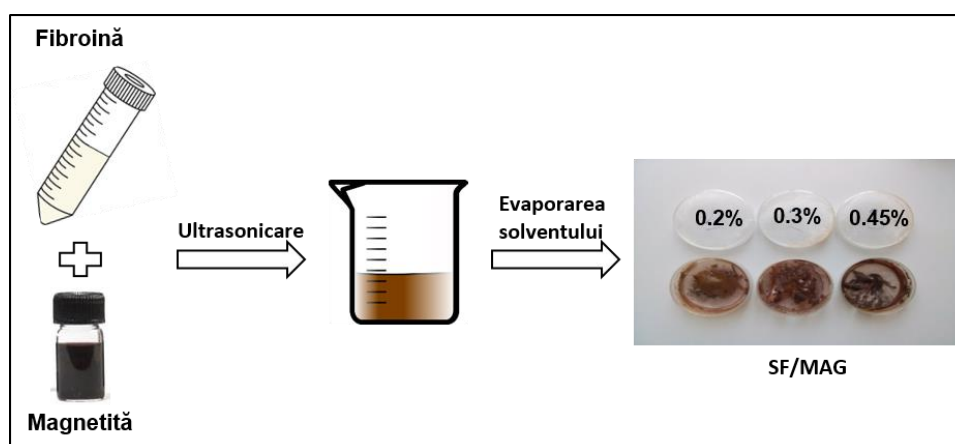


Figura 6.2. Reprezentarea schematică a etapelor implicate în obținerea filmelor biocompozite SF/MAG.

Biocompozitele obținute au fost analizate din punct de vedere al proprietatilor morfologice și structurale. Analiza FTIR relevând faptul că amidele I și II prezintă o deplasare ce poate fi atribuită obținerii structurii β a fibroinei din mătasea naturală (**Figura 6.3**).

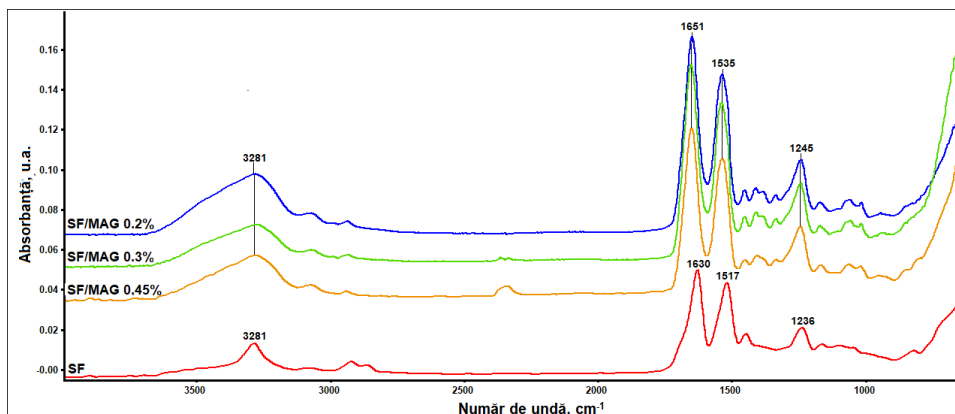


Figura 6.3. Spectrele FTIR ale filmelor biocompozite SF/MAG cu 0,2%, 0,3% și 0,45% magnetită și al filmului de fibroină.

Structura cristalină a probelor a fost evidențiată cu ajutorul analizei XRD, difractogramele biocompozitelor pe bază de fibroină și magnetită prezentate în **Figura 6.4**, având o formă similară cu cea a fibroinei, prezența magnetitei fiind confirmată prin maximul de la 35.7° .

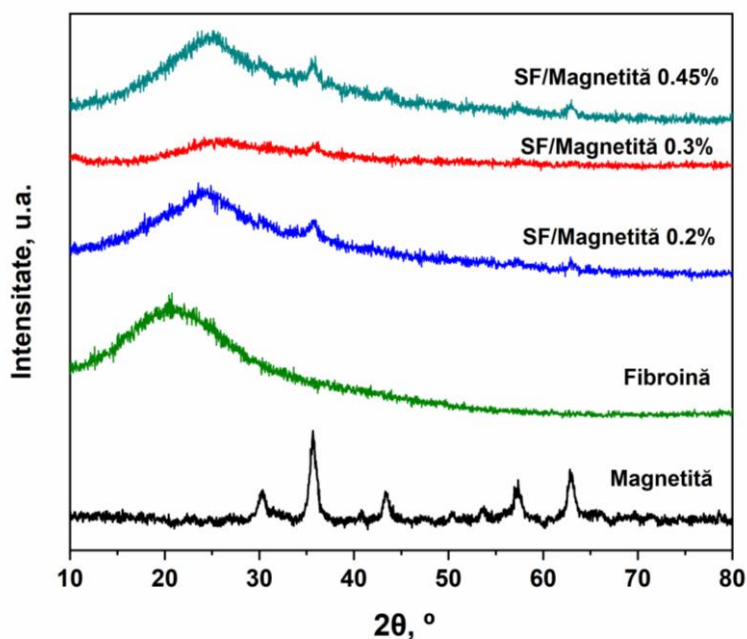


Figura 6.4. Difractograma de raze X pentru: magnetită-martor, film de fibroină – martor și filmele biocompozite SF/MAG cu 0.2%, 0.3% și 0.45% magnetită.

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

Analiza SEM a evidențiat modul de dispersare al nanoparticulelor magnetice în matricea polimeră și tendința acestora de a forma clusteri arătând că, odată cu creșterea concentrației de magnetită, biocompozitele prezintă o dispersie mai uniformă a nanoparticulelor magnetice, dar și o tendință mai mare de a forma aglomerări.

În continuare, în imaginile TEM ale biocompozitelor fibroină/magnetită se pot observa atât zone în care nanoparticulele magnetice sunt bine dispersate, cât și zone în care s-au format clusteri. Informațiile oferite de analiza TEM prezintă o importanță deosebită deoarece atât modul de dispersare cât și structura magnetitei pot influența proprietățile materialului obținut (**Figura 6.6.**).

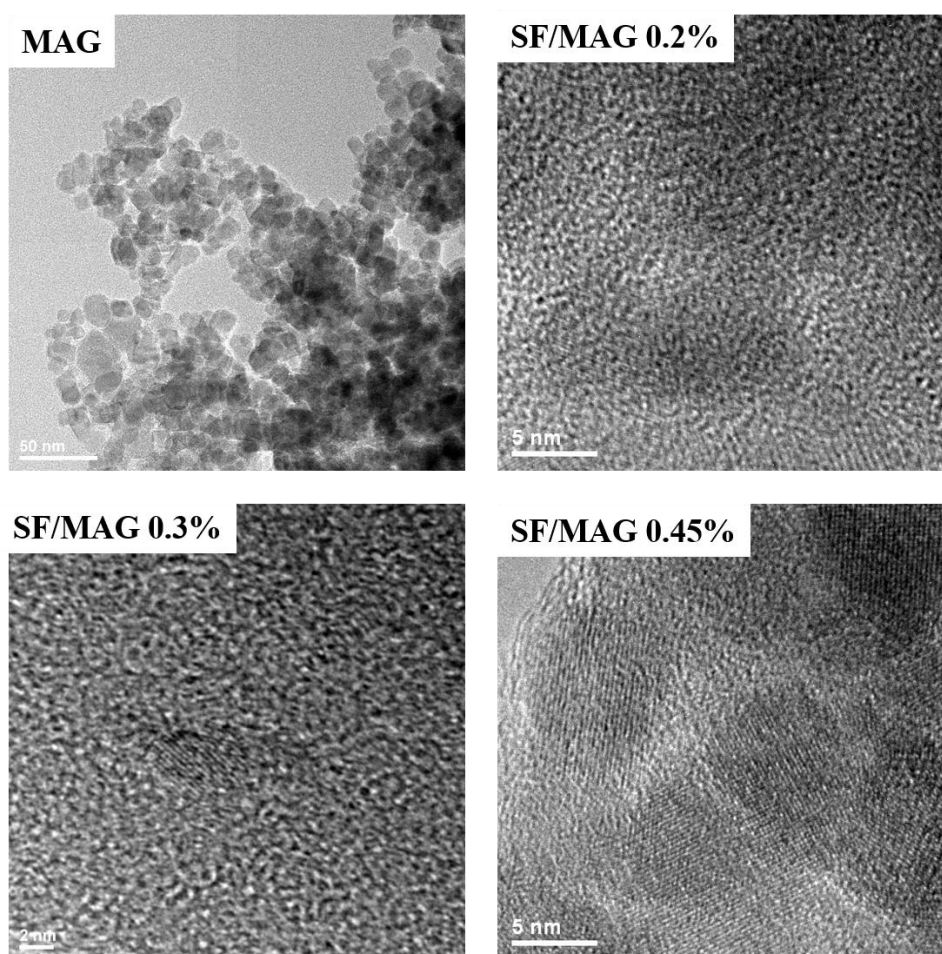


Figura 6.6. Imaginile TEM și HR-TEM ale pulberii de magnetită și filmelor de biocompozite SF/MAG cu 0.2%, 0.3% și 0.45% magnetită.

Analiza AFM a relevat faptul că biocompozitele obținute posedă o suprafață rugoasă în comparație cu suprafața netedă a filmului de mătase (**Figura 6.7.**). Această proprietate prezentând numeroase avantaje pentru aplicațiile din domeniul medical precum

sprijinirea aderenței și proliferării celulelor. Totodată, prin analiza AFM s-a evidențiat și distribuția relativ uniformă a nanoparticulelor de magnetită atât pe suprafața cât și în interiorul matricii polimere prin imagini 2D și 3D (deflecție și imagini 3D).

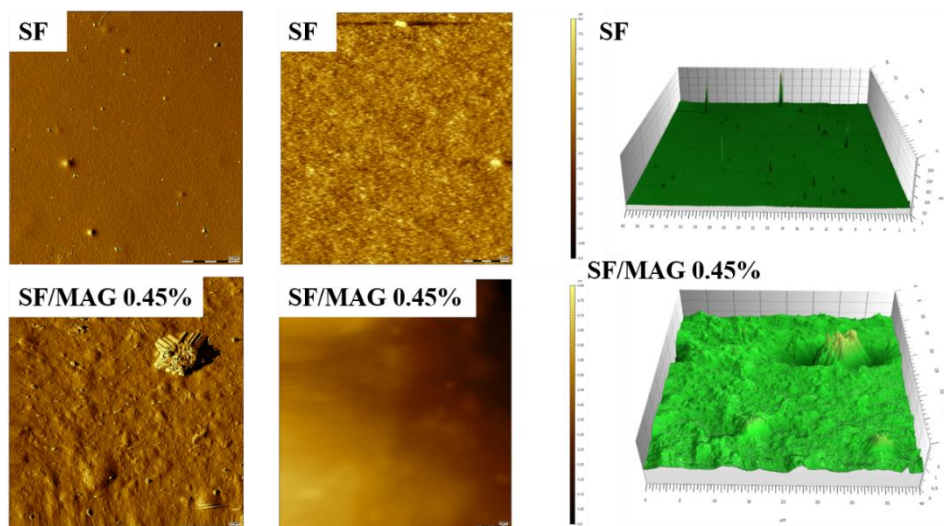


Figura 6.7. Imaginile AFM ale filmelor de SF și biocompozitului SF/MAG cu 0.45% magnetită.

Testele de viabilitate celulară folosind celule stem derivate din adipocite umane realizate pe materialele obținute au evidențiat faptul că toate biocompozitele prezintă o bună biocompatibilitate *in vitro* (**Figura 6.8.**).

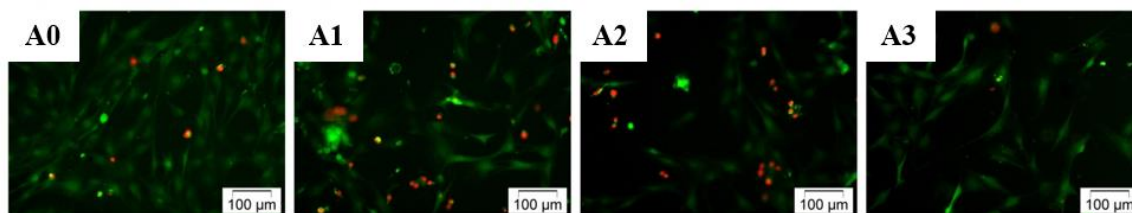


Figura 6.8.: Imaginile de microscopie confocală de fluorescență ale celulelor cultivate pe SF (A0), SF/MAG 0,2 % (A1); SF/MAG 0,3 % (A2) și SF/MAG 0,45% (A3).

Rezultatele obținute sugerând faptul că toate biomaterialele testate prezintă o bună biocompatibilitate *in vitro* pe hASC. Datorită bunei biocompatibilități prezentate, aceste materiale sunt candidați potențiali pentru testele *in vivo* pentru aplicații din domeniul vindecării rănilor.

Capitolul 7. Biocompozite pe bază de celuloză bacteriană și magnetită

Folosirea celulozei bacteriene în cadrul aplicațiilor din domeniul vindecării rănilor se datorează proprietăților sale remarcabile precum puritate, biocompatibilitate, grad ridicat de porozitate, control asupra morfologiei, structură asemănătoare cu matricea extracelulară a colagenului și capacitatea nanofibrelor de BC de a ghida celulele. Prin modificarea celulozei bacteriene cu magnetită se urmărește îmbunătățirea procesului de vindecare a rănilor.

În acest context, în cadrul acestui capitol este prezentată obținerea și caracterizarea unor biocompozite noi pe bază de celuloză bacteriană și nanoparticule de magnetită cu potențiale aplicații în domeniul vindecării rănilor. Biocompozitele fiind obținute prin metoda *in situ*, respectiv nanoparticulele magnetice au fost dispersate în mediul de cultura utilizat pentru fermentarea *Acetobacter xylinum* (**Figura 7.1.**).

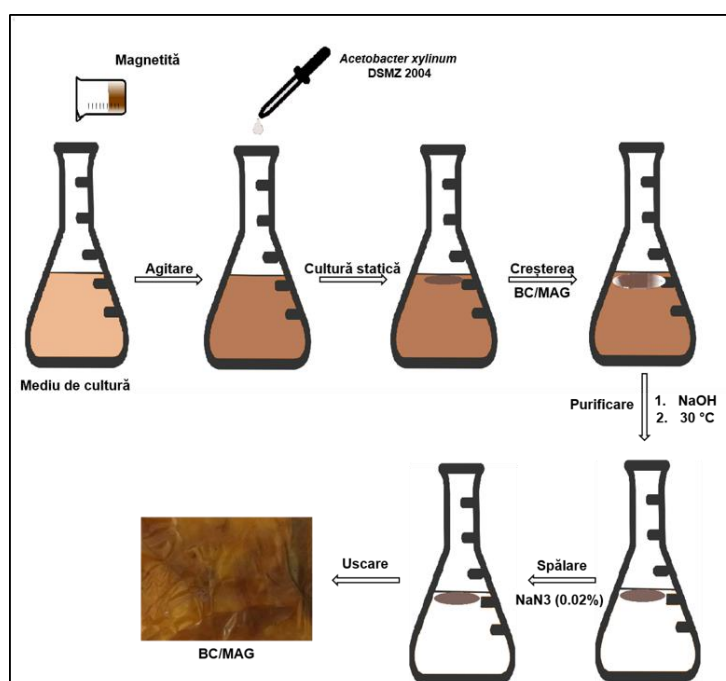


Figura 7.1. Reprezentarea schematică a etapelor implicate în obținerea a membranelor biocompozite BC/MAG prin metoda *in situ*.

Prin analiza XRD s-a evidențiat faptul că modificarea celulozei bacteriene cu magnetita nu influențează structura cristalină a biopolimerului (**Figura 7.2.**), difractogramele biocompozitelor pe bază de celuloză bacteriană și magnetită prezentând maximele asociate celor doi componenți.

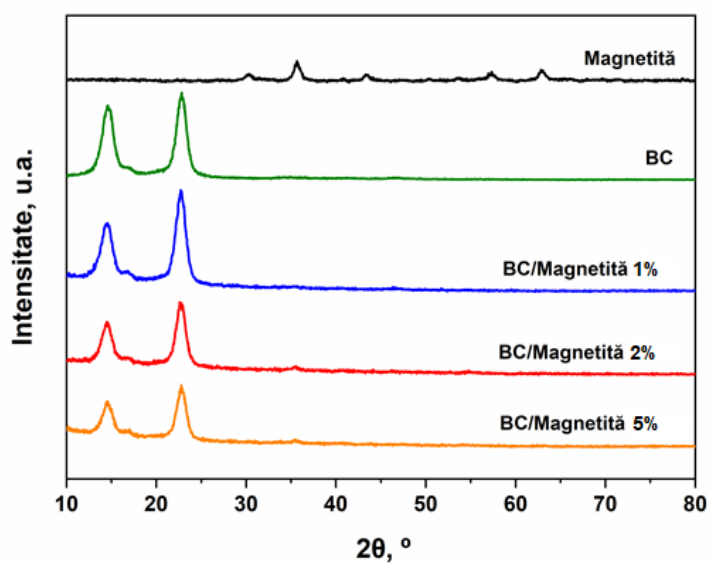


Figura 7.2. Difractogramele de raze X ale probelor martor de BC, MAG și ale biocompozitelor BC/MAG cu diferite concentrații (1%; 2% și 5%) de magnetită.

Prin analiza SEM a fost evidențiată rețeaua fibrilară specifică BC cât și distribuția relativ neuniformă a particulelor de magnetită atât pe cât și prinre fibrele biopolimerului.

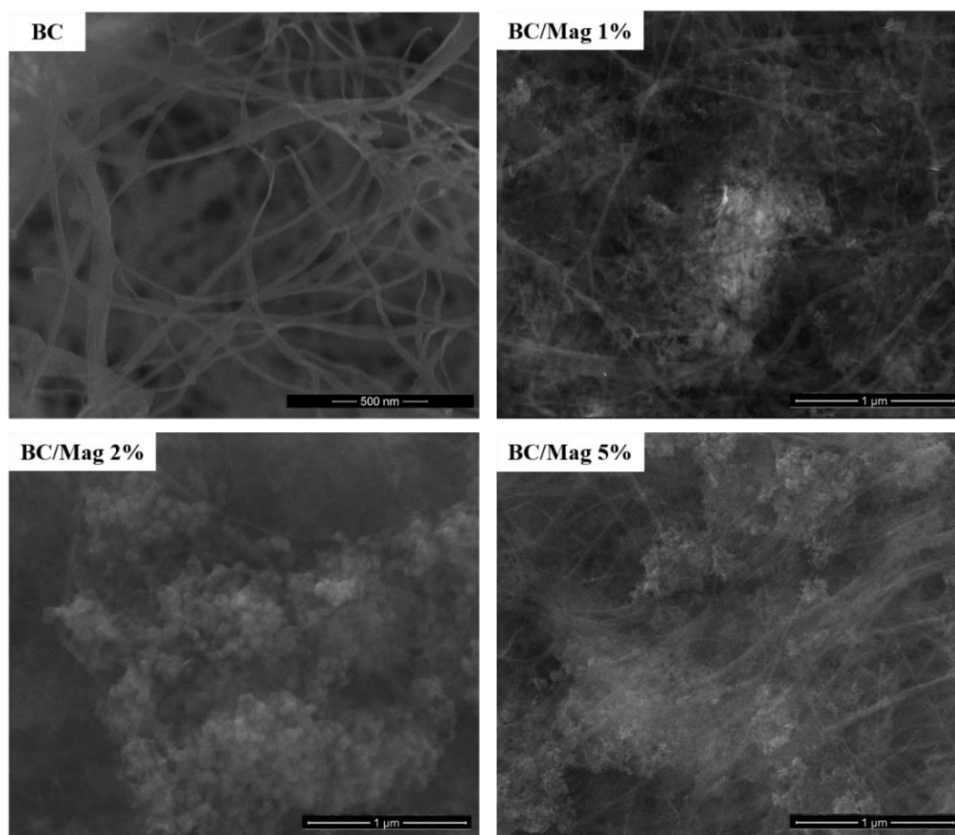


Figura 7.4. Imaginile SEM ale celulozei bacteriene și biocompozitelor BC/MAG cu 1%; 2% și 5% magnetită.

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

Pentru a pune mai bine în evidență dispersia magnetitei în membranele de celuloză a fost efectuată analiza TEM a biocompozitelor în comparație cu materiile prime, celuloză și magnetită evidențiindu-se astfel faptul că biocompozitele obținute prezintă atât zone în care nanoparticulele sunt bine dispersate cât și zone în care s-au format clusteri.

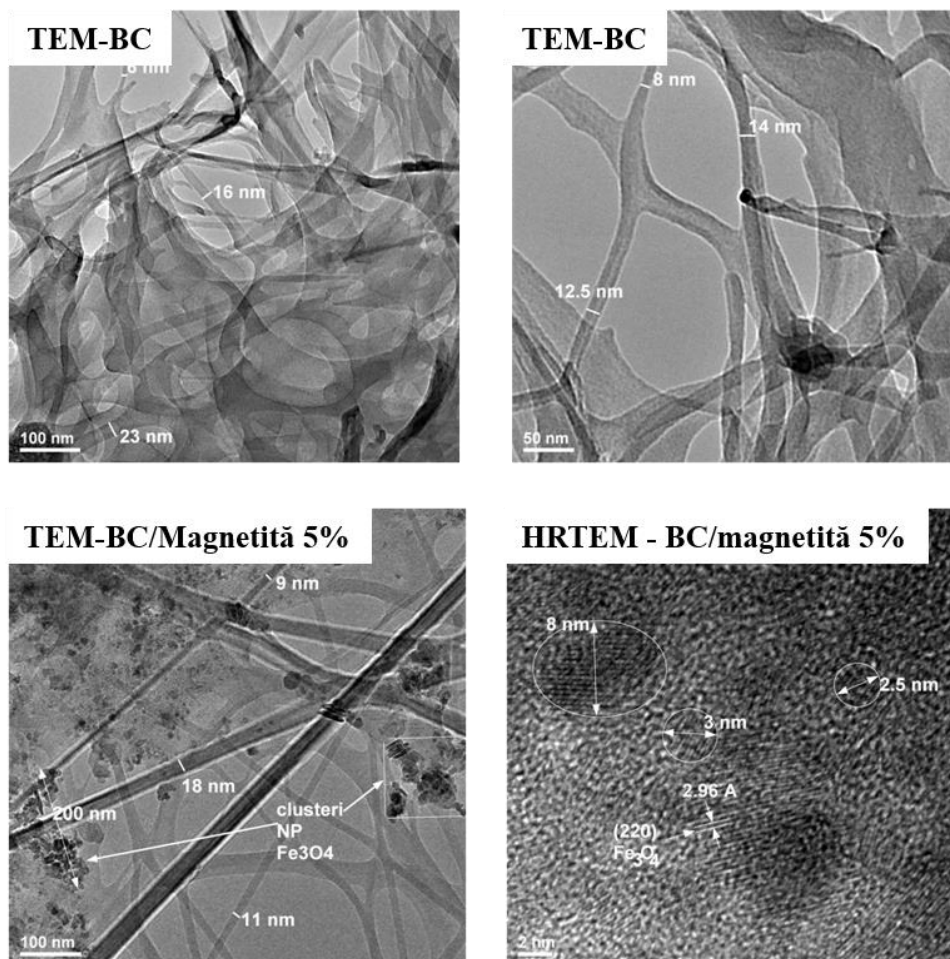


Figura 7.6. Imagini TEM ale celulozei bacteriene (50 nm și 100 nm), ale biocompozitului BC/MAG 5%; și imaginea HR-TEM a BC/MAG 5%.

La concentrații mici de magnetită (1%), în celuloza bacteriană se pot observa nanoparticule de magnetită cu diametrul de 3-5 nm încastate între nanofibrilele de celuloză, dar și clusteri de magnetită de 17-30 nm pe suprafața fibrelor de celuloză. La concentrații mai mari de magnetită (5%), tendința de formare a unor clusteri sau aglomerate se intensifică.

Testele de biocompatibilitate au relevat o bună biocompatibilitate a biocompozitelor preparate pe linii de adipocite umane. Morfologia hASCs și abilitatea acestora de a interacționa cu materialul de substrat, BC sau bionanocompozitele de tip

celuloză bacteriană/magnetită, din punct de vedere al adeziunii celulare și al dezvoltării citoscheletului au fost investigate, în **Figura 7.7**, se observă că celulele hASCs prezintă filamente lungi și distincte de actină, înconjurate toate particulele magnetice din compozite și determină morfologia de ansamblu a celulei. Formarea microfilamentelor de actină se poate asemăna cu un proces de modelare care apare ca răspuns la contactul dintre celulă și biocompozit.

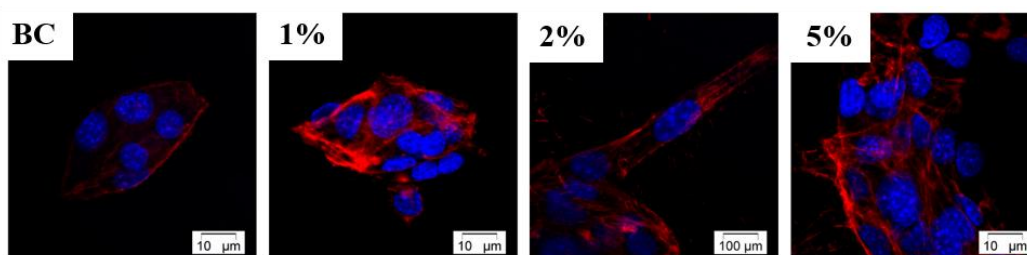


Figura 7.7. Imaginile de microscopie confocală ale filamentelor de actină (marcaj roșu) și a nucleilor (marcaj albastru) celulelor stem derivate din adipocite umane aflate în contact cu suporturile polimerice BC și biocompozitele BC/MAG cu diferite concentrații de MAG de tip 1%, 2% și 5%.

Pentru a studia rata de supraviețuire a celulelor pe materialele sintetizate, a fost evaluată viabilitatea hASC la 24 de ore după însămânțare prin testul LIVE/DEAD împreună cu microscopia confocală de fluorescență. După 24 de ore de la însămânțare, au fost observate celule vii (marcate cu verde) pe suprafața tuturor materialelor testate, însă cea mai mare densitate de celule vii a fost detectată pe suprafața compozitului celuloză bacteriană/magnetită cu 5% magnetită (**Figura 7.8.**).

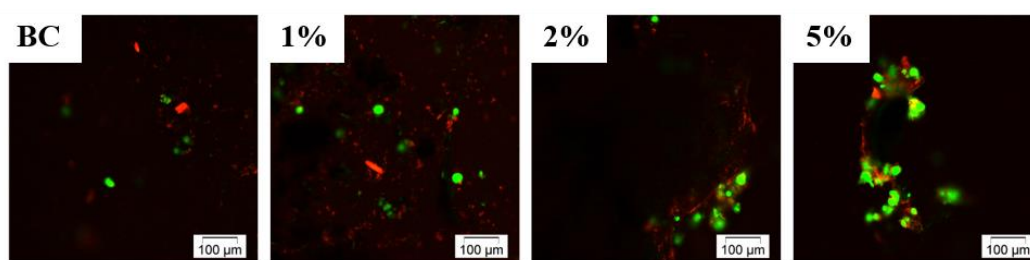


Figura 7.8. Imaginile de microscopie confocală după marcarea fluorescentă a celulelor pentru evidențierea celulelor vii/moarte pe suporturile BC, BC/MAG 1 %, BC/MAG 2 % și BC/MAG 5%.

Testele biologice au evidențiat o bună biocompatibilitate și o viabilitate celulară bună a compozitelor sintetizate pe linii de celule adipocite umane, cele mai bune rezultate

fiind prezentate de proba cu 5% magnetită. Această probă fiind considerată un candidat bun pentru realizarea de studii *in vivo* în domeniul vindecării rănilor.

CAPITOLUL 8. Hidrogeluri pe bază de fibroină, poliacrilamidă și oxid de grafenă cu potențiale aplicații medicale

Scopul principal al acestui studiu constă în crearea unor suporturi de implantare care să mimeze matricea extracelulară naturală (ECM) pentru a asigura atașarea celulară, proliferarea și diferențierea celulelor. Prin urmare, suporturile ar trebui să prezinte o biochimie, o topografie la scală micro/nano adecvate și proprietăți mecanice potrivite pentru a asigura poziții de legare care reglează activ și să controleze comportamentul celulelor gazdă în interacția lor cu materialul.

Pe baza acestor considerații, a fost propus și caracterizat un nou material de tip hidrogel pe bază de fibroină din mătasea naturală, poliacrilamidă și oxid de grafenă, cu scopul de a obține un biocompozit cu răspuns mecanic superior proprietăților mecanice ale fibroinei, dar care să prezinte biocompatibilitatea excelentă a proteinei din mătasea naturală. Datorită conținutului scăzut de informații despre comportamentul biologic al materialelor pe bază de fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă pe celule osteoblaste, a fost elaborat un studiu pentru a evidenția o potențială aplicație a acestor biocompozite în domeniul regenerării osoase.

Pentru prepararea hidrogelurilor biocompozite au fost necesare următoarele etape: i) dispersarea oxidului de grafenă (0,1%) într-o soluție de fibroină, prin ultrasonare; ii) prepararea unor soluții de acrilamidă (AA) de diferite concentrații în care a fost adăugat și agentul de reticulare N,N'-metilenbisacrilamidă (N,N'-MBA), iii) amestecarea celor două soluții și adăugarea sistemului redox de polimerizare format din persulfat de potasiu (KP) și trietanol amină (TEA). Reacția de polimerizare a durat 24 h și s-a desfășurat la temperatura camerei, ulterior hidrogelurile fiind purificate folosind metoda extracțiilor repetate în apă distilată (**Figura 8.1.**).

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

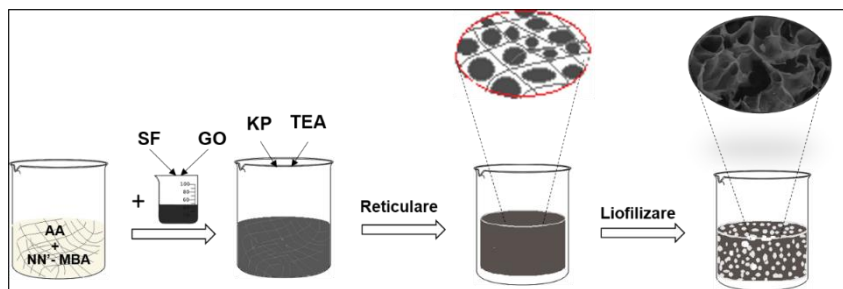


Figura 8.1. Reprezentarea schematică a procesului de obținere al hidrogelurilor pe bază de SF/PAA/GO.

Hidrogelurile biocompozite au fost caracterizate din punct de vedere structural prin măsurători FTIR și RAMAN, din punct de vedere morfologic, al evaluării gradului de gonflare și al capacității de mineralizare prin SEM, iar din punct de vedere al biocompatibilității cu celule de tip oseoblaste prin teste viabilitate și citotoxicitate (prin MTT, LDH, LIVE/DEAD).

Prin analiza FTIR s-a evidențiat formarea structurii β a SF din hidrogelurile biocompozite obținute deoarece spectrele FTIR au evidențiat atât deplasarea maximelor de absorbție caracteristice amidei I cât și lipsa benzilor de absorbție specifice amidelor II și III. Un rol important în obținerea structurii β prezintă componentele poli(acrilamidă și oxid de grafenă (**Figura 8.2.**).

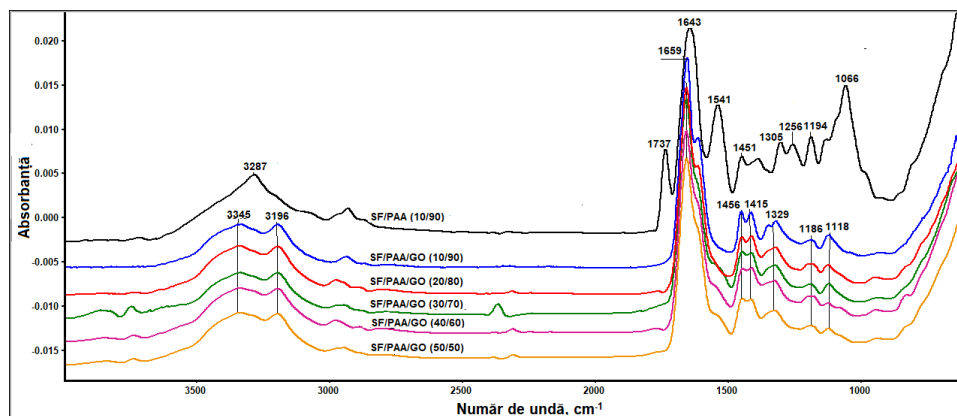


Figura 8.2. Spectrele FTIR ale probei martor pe bază de SF/PAA și ale hidrogelurilor biocompozite SF/PAA/GO cu diferite rapoarte între SF și PAA (10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50).

Analiza RAMAN a evidențiat o deplasare a benzilor G și D specifice GO în spectrele înregistrate pentru hidrogelurile biocompozite, deplasare ce se poate datora intercalării lanțurilor polimerice printre straturile oxidului de grafenă.

Studierea capacității de gonflare a hidrogelurilor obținute realizată cu ajutorul metodei gravimetrice a evidențiat că încorporarea oxidului de grafenă și creșterea concentrației de fibroină conduce la obținerea unor valori mai ridicate ale gradului de

gonflare datorită creșterii numărului de grupări hidrofile și a scăderii densității de reticulate. Această proprietate prezentând o importanță deosebită deoarece acestea pot avea structuri similare cu țesuturile ce pot fi integrate cu ușurință în țesuturile gazdă. Graficele de gonflare ale hidrogelurilor pe bază fibroină, poliacrilamidă și oxid de grafenă cu diferite rapoarte între fibroină și poliacrilamidă (10/90; 30/70; 50/50) conținând 0.1% oxid de grafenă sunt prezentate în **Figura 8.4**.

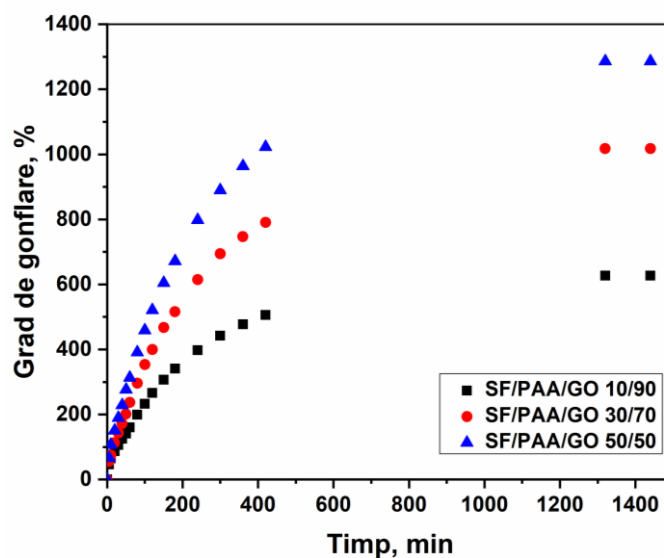


Figura 8.4. Gradul de gonflare al hidrogelurilor biocompozite SF/PAA/GO cu diferite rapoarte între SF și PAA (10/90, 30/70, 50/50).

Imaginile SEM realizate pe hidrogelurile complet gonflante au confirmat obținerea unor structuri tridimensionale poroase cu pori interconectați, odată cu creșterea concentrației de SF din hidrogeluri observându-se și o creștere a dimensiunii porilor datorită scăderii densității de reticulare.

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

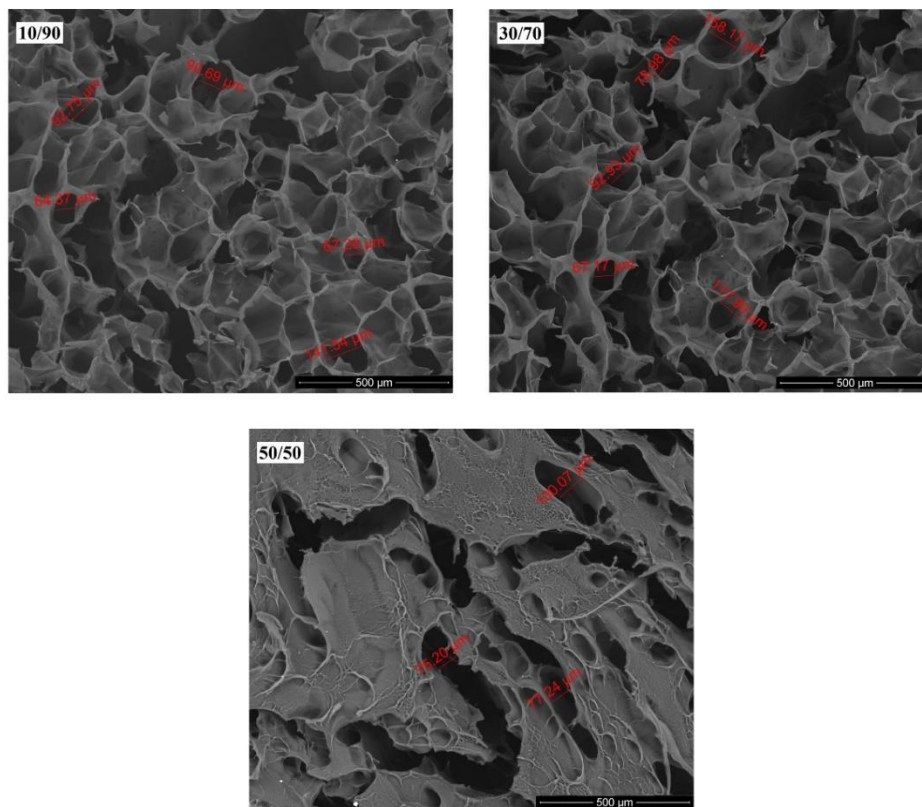


Figura 8.5. Imaginile SEM ale hidrogelurilor biocompozite SF/PAA/GO cu diferite compoziții de (10/90, 30/70, 50/50).

Evaluarea capacității de mineralizare a hidrogelurilor pe bază de SF/PAA/GO s-a realizat prin două metode: metoda ciclurilor alternante și metoda Kokubo T. Imaginile SEM ale hidrogelurilor mineralizate prin metoda ciclurilor alternante au evidențiat obținerea unei faze minerale de tip acicular apropiată de structura hidroxiapatitei, în acest caz compoziția hidrogelurilor nu a exercitat o influență semnificativă asupra capacității de mineralizare a materialului studiat (**Figura 8.7.**).

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

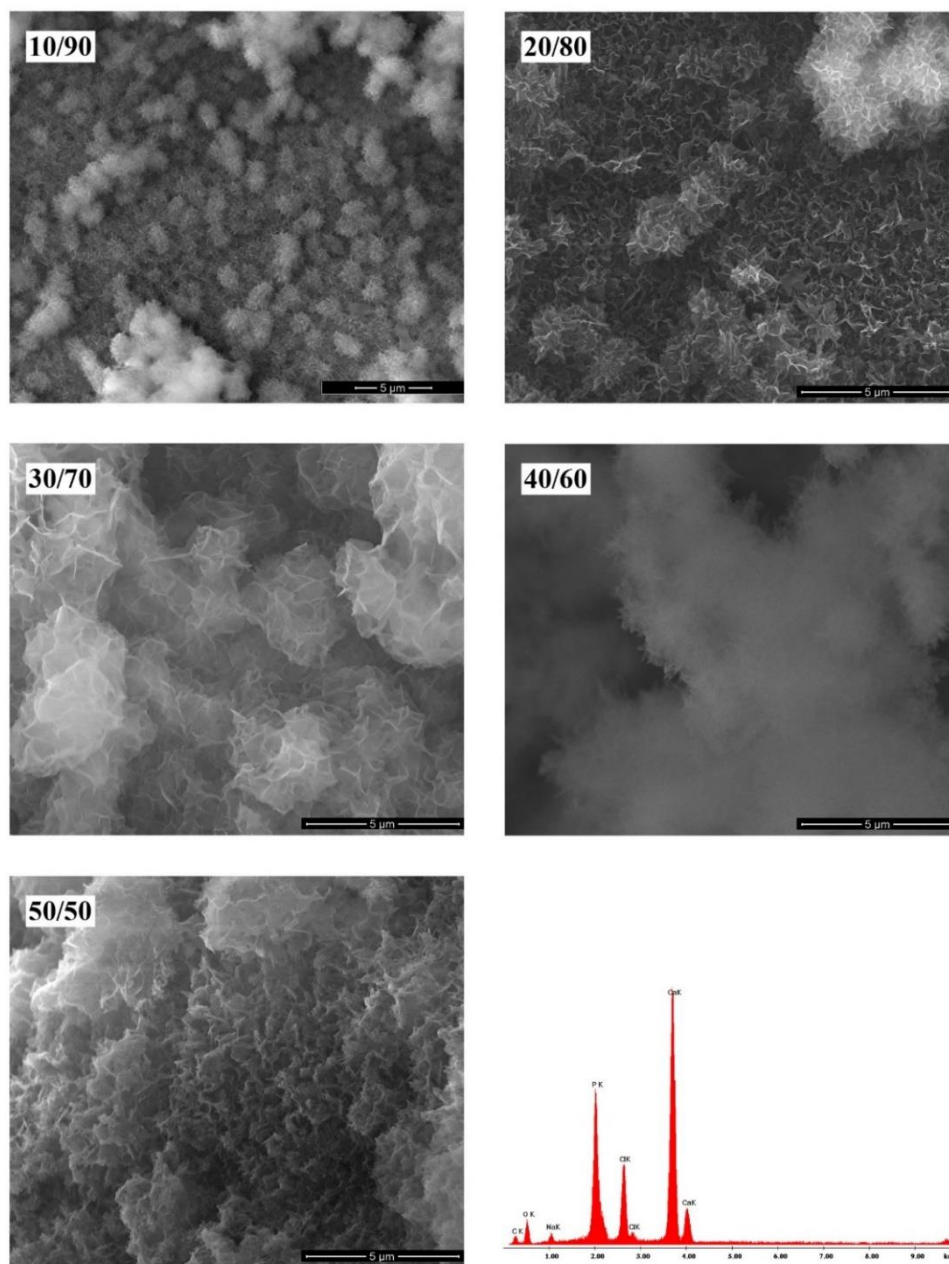


Figura 8.7. Imaginile SEM ale hidrogelurilor biocompozite SF/PAA/GO cu diferite rapoarte între SF/PAA (10/90, 20/80, /30/70, 40/60 și 50/50 și Spectrul EDX al hidrogelului 50/50) după biomineralizarea prin metoda ciclurilor alternante.

Imaginile SEM ale hidrogelurilor mineralizate prin metoda Kokubo T au evidențiat o acoperire uniformă a tuturor hidrogelurilor biocompozite cu un strat mineral de tip apatită, a cărui morfologie este puternic dependentă de compoziția hidrogelului, respectiv, odată cu creșterea conținutului de fibroină se observă obținerea unei acoperiri mai uniforme cu diferite forme de hidroxiapatită, creșterea numărului de microglobule și scăderea dimensiunii acestora.

Testele de biocompatibilitate și citotoxicitate au fost realizate pe biostructuri de tip celule osteoblaste MC3T3-E1/biocompozit de diferite compoziții și au subliniat faptul că proteina din mătasea naturală joacă un rol important în biosistemul construit având ca rezultat îmbunătățirea adeziunii și proliferării celulelor.

Morfologia osteoblastelor de tip MC3T3-E1 din interiorul hidrogelurilor biocompozite de tip fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă și abilitatea acestora de a interacționa cu materialul de substrat din punct de vedere al adeziunii și dezvoltării citoscheletului au fost studiate după 24 h de la însămânțare prin microscopie confocală de fluorescență (**Figura 8.8.**).

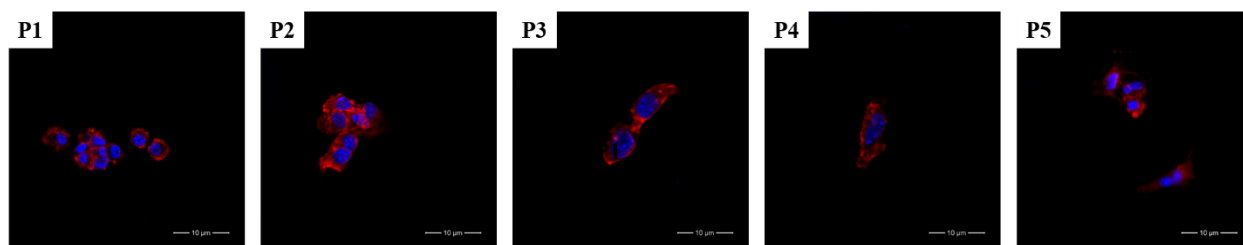


Figura 8.8. imaginile de microscopie confocală de fluorescență ale filamentelor de actină ale celulelor osteoblaste MC3T3-E1 pe biostructurile P1-P5.

Astfel, celulele MC3T3-E1 prezintă filamente de actină distinctivă care înconjoară nucleele în cazul probelor fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă cu următoarele rapoarte: 30/70; 40/60 și 50/50. Această distribuție a componentelor citoscheletului determină, în mod evident, morfologia de alungire din interiorul suporturilor cu un conținut mai ridicat de fibroină. Formarea microfilamentelor de actină poate fi atribuită unui proces de modelare care apare ca răspuns la contactul direct dintre celulă și biomaterial. În acest context, rezultatele obținute sugerează faptul că fibroina din mătasea naturală joacă un rol esențial în adeziunea celulelor preosteoblaste MC3T3-E1 la biomaterialul de interes.

Pentru studierea supraviețuirii celulelor în interiorul biomaterialelor testate, a fost analizată viabilitatea celulelor MC3T3-E1 la 7 zile de la însămânțare prin microscopie confocală de fluorescență (**Figura 8.9.**), bazată pe marcarea simultană a celulelor vii (culoarea verde) și a celulelor moarte (culoarea roșie).

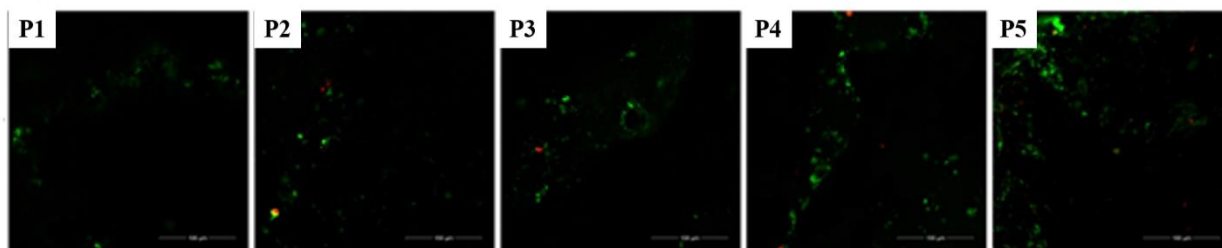


Figura 8.9. Imaginile de microscopie confocală de fluorescență pentru testul Live/Dead evidențiază atât celulele vii cât și celulele moarte din interiorul biostructurilor P1-P5 după 7 zile de la însămânțare. Cu verde sunt marcate celulele vii, iar cu roșu sunt marcate celulele moarte.

Se poate observa faptul că raportul dintre celulele vii și cele moarte este supraunitar pentru toate compozițiile testate. De asemenea, sunt de notat diferențe importante legate de densitatea celulară în interiorul suporturilor de implantare, concentrația de celule vii crescând odată cu creșterea conținutului de fibroină din mătasea naturală. Prin urmare, cea mai mare cantitate de celule vii a fost obținută în cazul biostructurilor fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă/MC3T3-E1 cu rapoarte 40/60 și 50/50.

Împreună cu observațiile legate de morfologia celulelor, aceste date sugerează faptul că proteina din mătasea naturală joacă un rol crucial în biosistemul construit având ca rezultat atât îmbunătățirea adeziunii cât și a proliferării celulelor. În plus, concentrația de fibroină are un rol important asupra biocompatibilității suporturilor de implantare.

CAPITOLUL 9. Biosenzori pe bază de ADN și interacția acestora cu azatioprina

În ultimele decade, biosenzorii electrochimici au căpătat o importanță deosebită în domeniul dispozitivelor analitice utilizate pentru determinarea mecanismelor de interacție a ADN-ului cu diferiți compuși farmaceutici. Azatioprina (AZA) este un medicament imunosupresiv utilizat în domeniul medical încă din anul 1963 [290], inițial pentru a preveni rejecția transplantului renal și ulterior pentru tratarea bolilor autoimune precum colita ulcerativă, artrita reumatoidă sau ca medicament împotriva leucemiei [314]. Acest medicament este un analog al purinei, mecanismul său de acțiune constând în blocarea metabolismului purinic și a sintezei ADN-ului. În literatura de specialitate există numeroase lucrări care semnalează o creștere a incidenței cancerului de piele în cazul pacienților cărora li se-a administrat azatioprină și, ulterior, au fost expuși radiației solare; acesta fiind unul dintre motivele care au condus la limitarea utilizării acestui medicament [315–317]. Pentru a diminua efectele adverse este necesară utilizarea unor modele experimentale adecvate la scară de laborator și după evidențierea principiului de acțiune [318].

În acest context, principalul obiectiv al acestui capitol a fost investigarea interacției dintre ADN și azatioprină folosind un biosenzor electrochimic pe bază de ADN, iar ca tehnici complementare fiind utilizate spectrofotometria UV-Vis, microscopia electronică de baleiaj și spectrometria de masă. Caracterizarea *in situ* a interacției dintre azatioprină și ADN sau a bazelor purinice pot furniza informații esențiale despre efectele acestui medicament asupra ADN-ului.

În primul rând a fost studiat comportamentul redox al azatioprinei cu ajutorul unui electrod de carbon sticlos la diferite pH-uri prin intermediul unor tehnici precum voltametrie ciclică și voltametrie în puls diferențial.

Primul experiment a constatat în înregistrarea unor voltamograme ciclice prin baleierea în sens negativ (de la $E_i=0$ V la $E_{max}=-1$ V) și a evidențiat un maxim de reducere la $E_{pc}=-0,68$ V caracteristic procesului de reducere al grupării NO_2 din azatioprină, iar după schimbarea direcției de baleiere s-a observat apariția maximelor caracteristice celor 2 reacții de transfer de sarcină anodice de la $E_{pa}=+0,45$ V și $E_{pa}=+1,20$ V. Toate măsurătorile electrochimice au fost efectuate cu ajutorul unui electrod de carbon sticlos în soluții de azatioprină de concentrație 500 μ M.

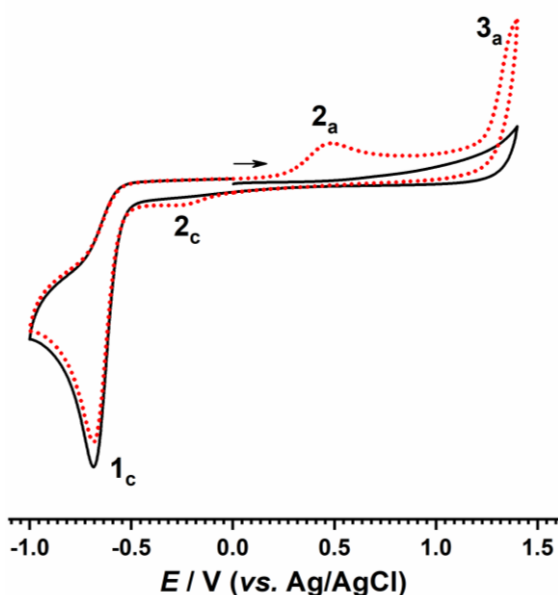


Figura 9.1. Prima voltamogramă (—) și cea de-a doua voltamogramă (•••) ciclice, înregistrate într-o soluție de AZA 500 μM în soluție tampon acetat 0.1 M pH =4,5 cu o viteză de scanare de $v= 50 \text{ mVs}^{-1}$, $E_0=0\text{V}$ la $E_{\text{max}}=1,4 \text{ V}$.

Următorul experiment a constatat în studierea efectului vitezei de scanare asupra valorii curentului de reducere al azatioprinei, voltamogramele ciclice achiziționate au arătat o creștere liniară a curentului de reducere odată cu creșterea pătratului vitezei de scanare și de asemenea o deplasare a potențialului maximului de reducere spre valori mai negative, acest tip de comportament fiind caracteristic unui proces ireversibil controlat difuzional.

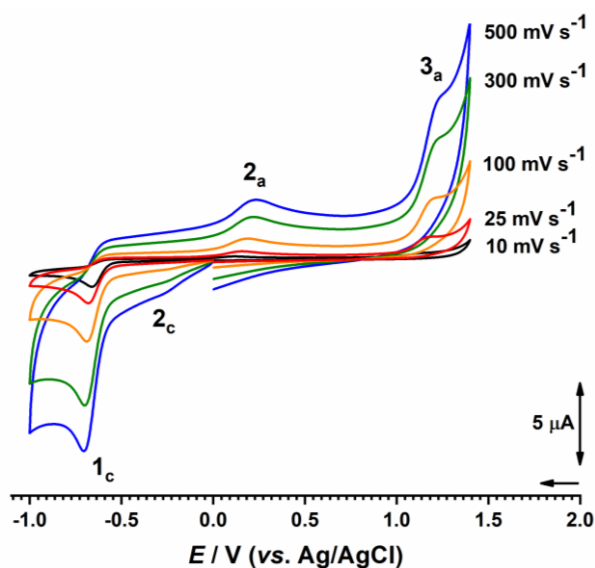


Figura 9.3. Voltamogramele ciclice înregistrate la diferite valori ale vitezei de baleiere într-o soluție de AZA 500 μM în soluție tampon fosfat 0,1 M pH =7,0.

Ulterior a fost studiată influența pH-ului asupra comportamentului redox al azatioprinei prin voltametrie ciclică și în puls diferențial, rezultatele obținute subliniind faptul că potențialul de reducere al azatioprinei scade odată cu creșterea valorii pH-ului, acest tip de comportament sugerând faptul că sunt implicați și protoni în procesul de reducere. Prin rezultatele electrochimice prezentate s-a demonstrat că reducerea azatioprinei are loc într-un singur pas, conducând la formarea unor produși de reducere care la rândul lor vor fi oxidați la potențiale pozitive.

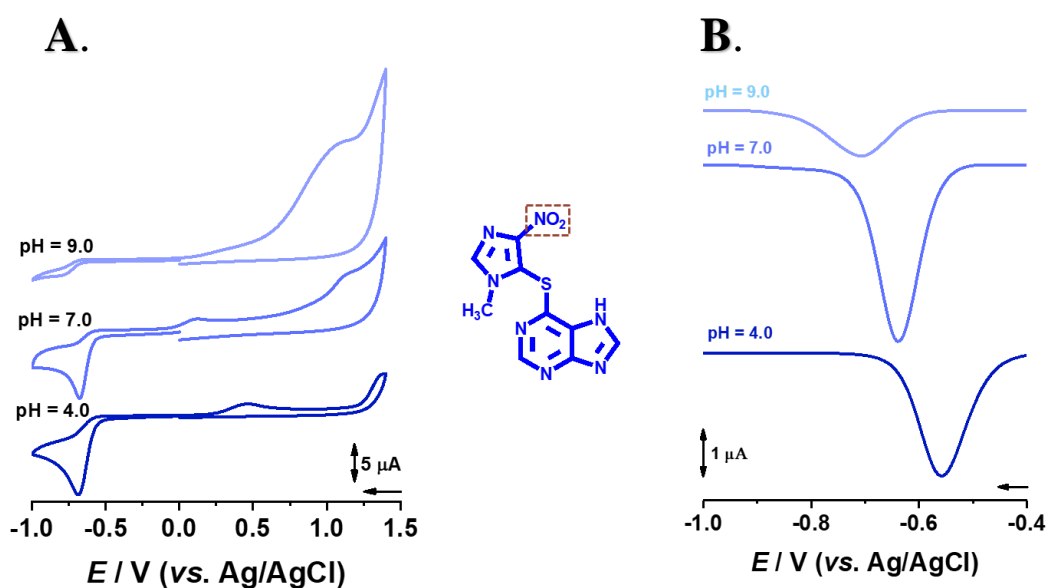
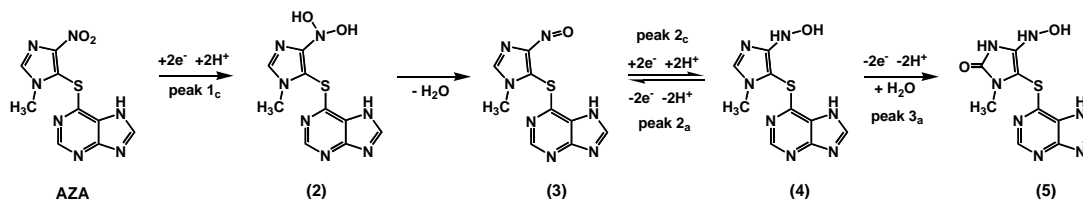


Figura 9.4. A) CV la 100 mV s^{-1} și B) DPV înregistrate într-o soluție de AZA în soluții de electrolit cu diferite valori ale pH-ului.

Rezultatele prezentate anterior au arătat faptul că procesul de reducere al azatioprinei are loc într-o singură etapă. Reducerea azatioprinei a condus la obținerea unor produși de reducere care ulterior au fost oxidați la valori pozitive ale potențialului.

De fapt, comportamentul voltametric al azatioprinei este dominat de compusul 1-metil-4-nitroimidazol. În **Schema 1** fiind propusă reducerea electrochimică a azatioprinei la compusul (2) printr-un mecanism ce prevede conversia grupării NO_2 la o un compus de tip dihidroxilamină printr-un proces ce implică 2 electroni și 2 protoni, valoarea maximului 1c, un produs instabil, fiind urmat de un proces de deshidratare ce a condus la obținerea compusului (3). La rândul său, compusul (3) a prezentat o reacție redox cvasi-reversibilă ce a fost demonstrată prin prezența celor două maxime, 2c și 2a, iar pe de altă parte,

procesul de oxidare ireversibil la valori pozitive ale potențialului conduce la obținerea compusului (5), reacție responsabilă pentru obținerea maximului 3a.



Schema 1. Mecanismul Redox propus pentru AZA.

În cel de-al doilea rând a fost investigat modul în care interacționează ADN cu azatioprina, în acest scop fiind utilizați diferiți biosenzori electrochimici pe bază de ADN, poli [A] sau poli [G].

În cadrul primului experiment au fost înregistrate voltamograme în puls diferențial pentru biosenzorul de ADN după incubarea într-o soluție de azatioprină variindu-se timpul de incubare, rezultatele electrochimice au prezentat apariția unui nou maxim de oxidare la +0,65 V caracteristic formării 8-oxo-dGuo, un compus cu efect mutagenic, în timp ce maximele de oxidarea ale celor doua baze purinice guanină și adenină nu suferă modifică semnificative (**Figura 9.7.**).

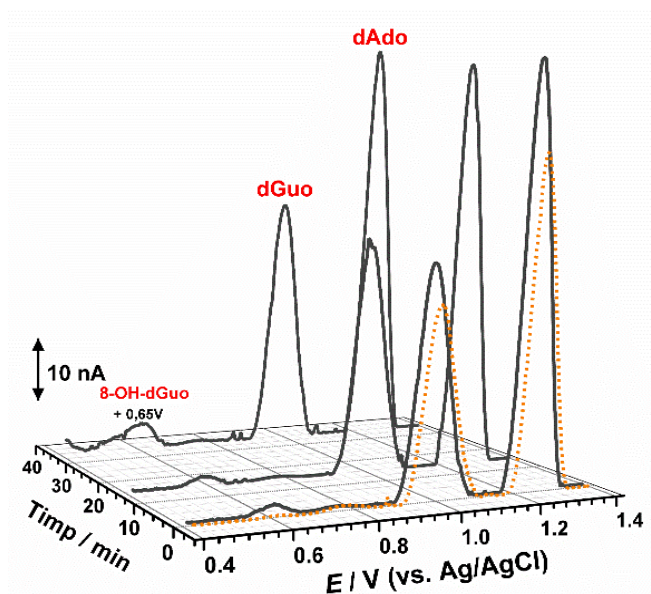


Figura 9.7. Voltamogramele DP înregistrate în soluție tampon acetat 0.1 M pH=4.5 cu un biosenzor de ADN după incubarea sub potențial aplicat, -0.60 V în soluție de AZA 100 μM AZA timp de 1, 10 și 35 min.

Cel de-al doilea experiment a constatat în incubarea biosenzorului de ADN în soluții de azatioprină de diferite concentrații, timp de 10 minute, în aceste condiții observându-se o creștere graduală în concordanță cu creșterea concentrației de azatioprină acest comportament fiind indus de creșterea treptată a degradării ADN-ului generată de creșterea concentrației de medicament în soluția de incubare observându-se de asemenea și apariția maximului de la +0,65 V caracteristic formării 8-oxo-dGuo.

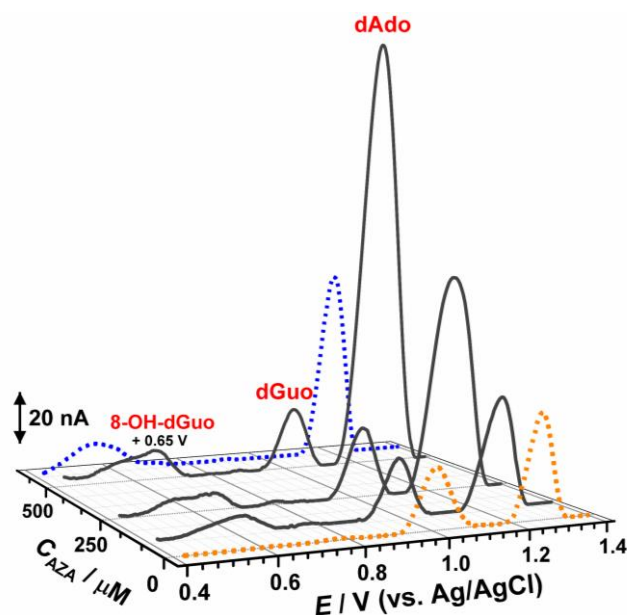


Figura 9.8. Voltamogramele DP înregistrate în soluție tampon acetat 0.1 M pH=4.5 cu un biosenzor de ADN după incubarea sub potențial aplicat, -0.60 V în soluție de AZA 100 μM AZA timp de 1, 10 și 35 min.

Pentru a avea o mai bună perspectivă legată de originea maximului de la +0,65 V au fost realizate studii voltametrice folosind biosenzori de poli [A] (**Figura 9.9.**) și poli [G] (**Figura 9.10.**).

Voltamogramele în puls diferențial obținute după interacția biosenzorului de poli [A] cu azatioprina au prezentat o creștere importantă a potențialului anodic caracteristic reziduurilor de adenină, maxim ce se poate datora atât procesului de degradare a azatioprinei cât și reziduurilor de bază purinică.

Voltamogramele în puls diferențial obținute după interacția biosenzorului de poli [G] cu azatioprina au prezentat atât o creștere a potențialului anodic specific procesului de oxidare al reziduurilor de guanină cât și maximul specific 8-oxo-dGuo.

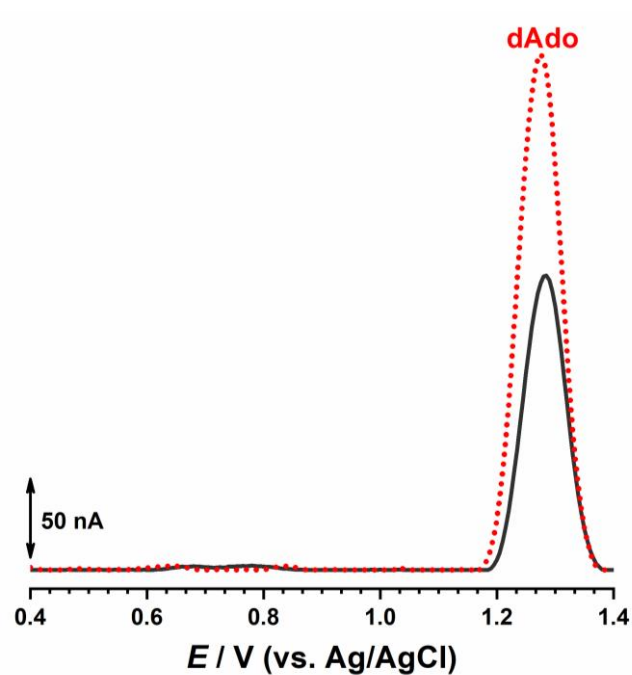


Figura 9.9. Voltamoramete DP măsurate în soluție tampon acetat 0.1 M pH=4.5 înregistrate pentru biosenzori pe bază de poli [A] înainte de incubarea (neagră) și după incubarea (ro în soluție de AZA 500 μM timp de 10 min.

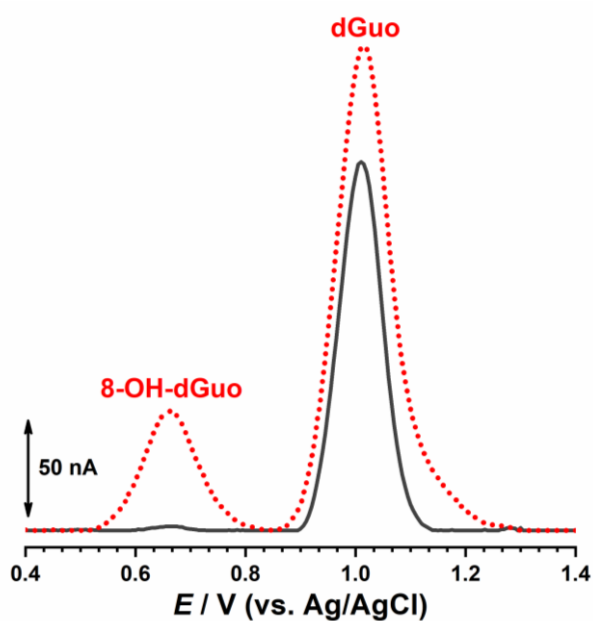


Figura 9.10. Voltamoramete DP măsurate în soluție tampon acetat 0.1 M pH=4.5 înregistrate pentru biosenzori pe bază de poli [G] înainte de incubarea (neagră) și după incubarea (portocaliu) în soluție de AZA 500 μM timp de 10 min.

Rezultatele obținute prin spectrometria de masă în cazul probei de ADN după procesul de digestie au evidențiat prezența semnalelor specifice nucleotidelor libere ale ADN-ului. În cazul probelor de ADN studiate după interacția cu azatioprina au fost obținute atât semnalele specifice ADN-ului cât și noi semnale corespunzătoare unor fragmente ale azatioprinei, fiind de asemenea subliniată și prezența 8-oxo-dGuo (**Figura 9.11.**). În plus, spectrele de masă înregistrate în aceste condiții evidențiază prezența unor noi semnale ce pot fi atribuite formării unor aducți între reziduurile purinice și fragmentele de azatioprină.

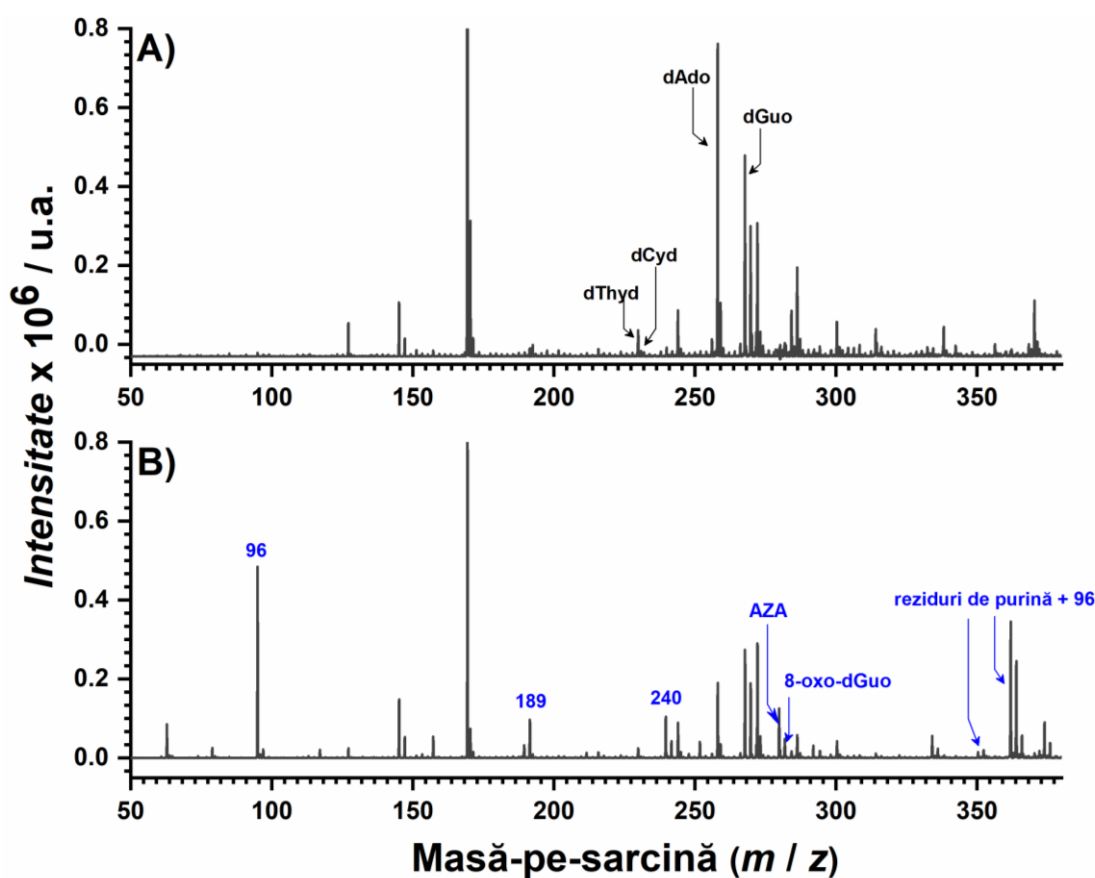


Figura 9.11. Spectrele de masă ale ADN-ului după digestia acidă **A)** înainte și **B)** după incubarea într-o soluție de AZA 500 μ M, sub potențial aplicat -0.60 V timp de 30 min.

Ulterior, pentru a identifica modul de interacție dintre ADN și azatioprină după degradarea medicamentului imunosupresiv în prezența luminii au fost realizate măsurători UV-Vis pe probe degradate la simulatorul solar folosind două pH-uri rezultatele obținute evidențiază faptul că procesul de degradare a fost amplificat de de

prezența protonilor, în cazul probelor cu ADN observându-se apariția efectului hipercromic caracteristic efectului de denaturare a ADN-ului efect ce se datorează acțiunii de denaturare a medicamentului imunosupresiv asupra acidului nucleic (Figura 9.12.).

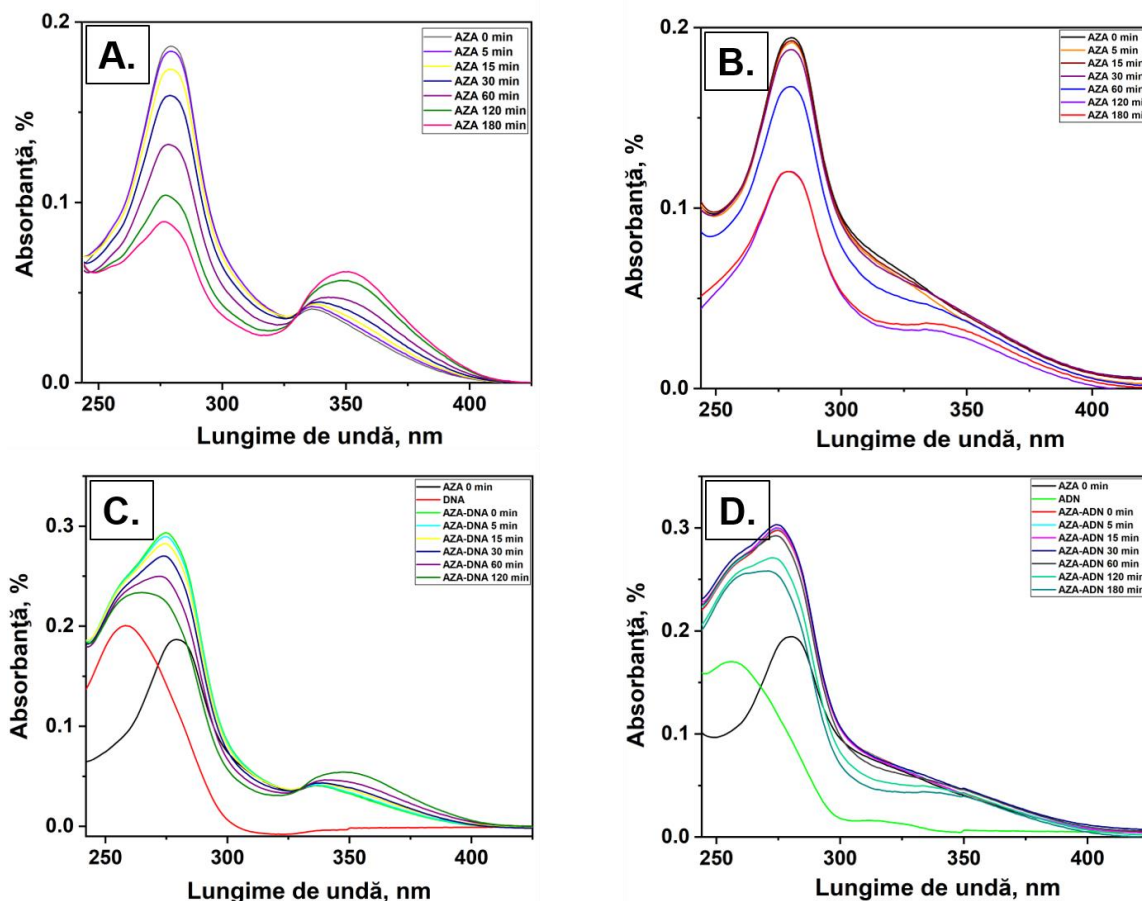
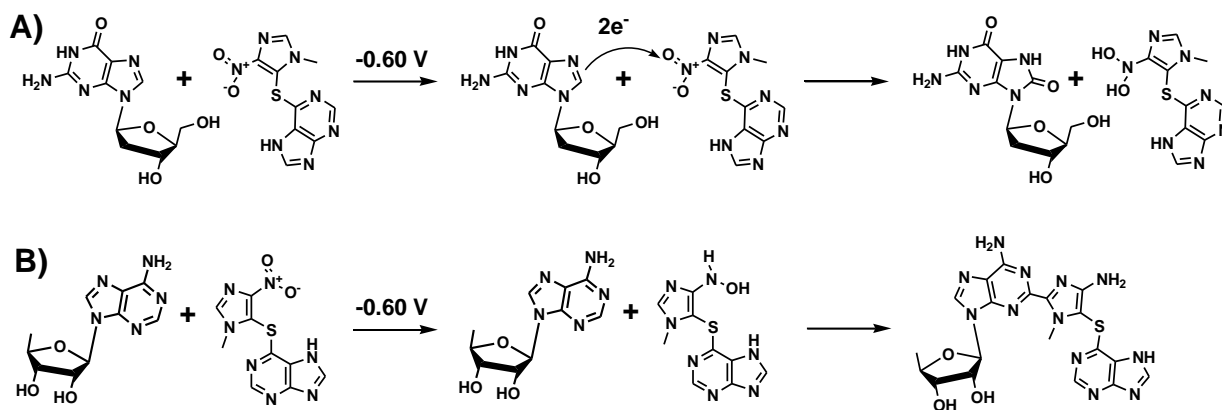


Figura 9.12. Spectrele de absorbție ale: AZA preparate în soluții tampon A) pH 4.5 și B) pH 7 și ale ADN-ului incubat cu AZA după degradarea prin expunerea la lumină între 0 și 180 min folosind probe preparate în soluții tampon C) pH 4,5 și D) pH 7.

A fost realizată și o caracterizare morfologică a biosenzorilor de ADN înainte și după interacția cu azatioprina, imaginile FESEM obținute în cazul biosenzorilor de ADN după interacția cu azatioprina evidențiind formarea unor clusteri datorită acțiunii medicamentului imunosupresiv asupra ADN-ului.

Rezultatele obținute prin metode electrochimice au fost corelate cu rezultatele morfologice obținute prin FESEM și cu rezultatele spectrometrice obținute prin spectrometria de masă, în acest mod confirmându-se faptul că odată cu reducerea azatioprinei, are loc formarea 8-oxo-dGuo printre straturile de ADN, un compus cu

potențial mutagenic, acesta generând leziuni de tip oxidativ ale ADN-ului, pe baza acestor date fiind propus și un mecanism de interacție între ADN și azatioprină, **Schema 9.2**.



Shema 9.2. Mecanismul de interacție propus dintre AZA și ADN.

În cadrul acestui studiu, prin intermediul măsurătorilor de voltametrie ciclică a fost evaluat comportamentul electrochimic al azatioprinei și a fost propus un mecanism redox complex pentru aceasta. Totodată pentru a putea determina mecanismul de interacție dintre azatioprină și ADN a fost utilizat un biosenzor de ADN care a fost incubat în diferite condiții în soluții de azatioprină, rezultatele obținute evidențiind faptul că acest medicament conduce la lezarea ADN-ului, oxidare rezidurilor de guanină și obținerea 8-oxo-dGuo, un produs cu potențial mutagenic. Rezultatele electrochimice obținute fiind confirmate și cu ajutorul spectrometriei de masă.

CAPITOLUL 10. Concluzii generale și perspective

Temele de cercetare abordate pe parcursul studiilor doctorale au drept scop realizarea de biocompozite pe bază de polimeri naturali care să prezinte caracteristicile necesare pentru a putea fi utilizate în domeniul aplicațiilor medicale. În acest context, toate biocompozitele sintetizate au fost caracterizate prin diferite tehnici din punct de vedere al proprietăților structurale, morfologice, termice, de udare, de gonflare, de mineralizare, al biocompatibilității și citotoxicității. Testele biologice efectuate pe diferite linii celulare, în funcție de aplicația vizată, au evidențiat o bună biocompatibilitate a materialelor obținute cu mediul biologic.

În capitolul 4 etapă au fost obținute biocompozite de tip organic/organic pe bază de celuloză bacteriană și poli (3-hidroxiubutirat-co-3-hidroxi valerianat) cu diferite concentrații, factorul de noutate constând atât în utilizarea acestui tip de poliester cât și

în utilizarea membranelor uscate de celuloză bacteriană. Materialele preparate au fost caracterizate din punct de vedere morfologic, structural, al stabilității termice, al comportamentului biologic și al proprietăților de udare. Modificarea celulozei bacteriene cu poli (3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat) a avut două obiective principale, respectiv îmbunătățirea proprietăților de barieră și îmbunătățirea biocompatibilității și biodegradabilității materialelor sintetizate. Prin realizarea măsurătorilor de unghi de contact pe biocompozitele pe bază de celuloză bacteriană și poli (3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat) s-a demonstrat faptul că suprafața tinde spre un caracter hidrofob în comparație cu suprafața celulozei bacteriene caracterizată de hidrofilicitate, acest lucru confirmând totodată și îmbunătățirea proprietăților de barieră. Din punct de vedere al testelor biologice s-a arătat că membranele biocompozite obținute prezintă biocompatibilitate și, respectiv, o viabilitate celulară bună pe linii de celule adipocite umane, acest lucru conferind posibilitatea ca acest tip de materiale să poată fi considerate candidați pentru aplicații din domeniul vindecării rănilor.

În cadrul următorului studiu au fost dezvoltate noi biocompozite pe bază de poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat) și hidroxizi dublu stratificați organofilizați cu diferite concentrații, prin dispersarea prin ultrasonare a argilei anionice în soluția de polimer. Filmele biocompozite au fost obținute prin tehnica de evaporare a solventului și au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic, al stabilității termice și comportamentului biologic *in vitro*. În acest caz factorul de noutate provine din utilizarea acestui tip de materiale în domeniul vindecării rănilor, ținând cont de faptul că, până la realizarea acestui studiu, materialele pe bază de polihidroxi-alcanoati și hidroxizi dublu stratificați vizau doar aplicații industriale precum epurarea apelor. Testele biologice au arătat o bună biocompatibilitate a materialelor biocompozite poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat)/hidroxizi dublu stratificați organofilizați prin intermediul testului LIVE/DEAD observându-se o mai bună mimicitate cu mediu celular în comparație cu materialul de referință utilizat, ținând cont de viabilitatea mai bună a celulelor la 24 de ore de la însămânțare. Datorită biocompatibilității bune prezentate, biocompozitele pe bază de poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat) și hidroxizi dublu stratificați organofilizați sunt potențiali candidați pentru testele *in vivo* pentru aplicații din domeniul vindecării rănilor.

În cadrul următorului capitol au fost realizate biocompozite noi pe bază de mătase naturală și nanoparticule magnetice cu diferite compoziții, prin dispersarea

nanoparticulelor de magnetită în soluția de mătase. Dezvoltarea acestui tip de materiale biocompozite reprezintă o idee originală având în vedere că, până la realizarea acestui studiu, nu a fost raportată în nici o altă lucrare pe această temă. Biocompozitele au fost caracterizate din punct de vedere structural și morfologic pentru a evidenția modul de dispersare al nanoparticulelor magnetice în matricea polimeră. Testele biologice au arătat o bună biocompatibilitate a filmelor biocompozite de tip fibroină/magnetită, prin intermediul testului LIVE/DEAD evidențiindu-se faptul că biocompozitele prezintă o mai bună mimicitate cu mediul celulelor în comparație cu materialul de referință utilizat, având în vedere că viabilitatea celulelor a fost mai bună la 24 de ore de la însămânțare. Datorită bunei biocompatibilități prezentate, biocompozitele pe bază de fibroină și magnetită sunt posibili candidați pentru testele *in vivo* pentru aplicații din domeniul vindecării rănilor.

În continuare au fost sintetizate și caracterizate biocompozite noi pe bază de celuloză bacteriană și nanoparticule magnetice cu diferite compoziții obținute prin metoda *in situ*, respectiv prin adăugarea nanoparticulelor de magnetită în mediul de cultură al celulozei. Analizele structurale și morfologice au evidențiat modul de depunere/pătrundere al nanoparticulelor de magnetită pe/între fibrele de celuloză și faptul că la concentrații mai mari de magnetită, nanoparticulele magnetice prezintă o acoperire mai uniformă a fibrelor de celuloză. Testele biologice au evidențiat o bună biocompatibilitate și, respectiv o viabilitate celulară bună a compozitelor celuloză bacteriană/magnetită pe linii de celule adipocite umane, cele mai bune rezultate fiind obținute la un procent de 5% magnetită, probă ce poate fi considerată un candidat bun pentru realizarea de studii *in vivo* în domeniul vindecării rănilor.

În cadrul următorului studiu desfășurat în cadrul tezei de doctorat a fost prezentată obținerea unor hidrogeluri compozite pe bază de fibroină din mătase naturală, poliacrilamidă și oxid de grafenă. Analizele morfo-structurale au prezentat atât formarea structurii β a fibroinei cât și influența fibroinei și a oxidului de grafenă asupra proprietăților hidrogelurilor obținute. Creșterea conținutului de fibroină și introducerea oxidului de grafenă au condus la creșterea gradului de gonflare și îmbunătățirea capacității de mineralizare. Cele mai bune rezultate au fost obținute pe biocompozitele de tip fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă cu următoarele compoziții: 40/60/0,1 și 50/50/0,1. Testele biologice au evidențiat faptul că, morfologia osteoblastelor variază în hidrogelurile fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă cu diferite compoziții, datele

obținute sugerând faptul că fibroina din mătase naturală îmbunătățește organizarea citoscheletului și distribuția celulelor. Rezultatele referitoare la viabilitate și proliferare împreună cu cele privind potențialul citotoxic sugerează că osteoblastele prezintă o rată de proliferare mai crescută în contact cu hidrogelurile un conținut mai ridicat de fibroină din mătase naturală, foarte probabil datorita adeziunii celulare mai bune prezentate de compozit și nu datorită efectelor potențialului citotoxic. Prin urmare, biocompozitele fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă cu compozițiile 40/60/0,1 și 50/50/0,1 au demonstrat că sunt biocompatibile și au prezentat cel mai echilibrat raport între potențialul proliferativ și cel citotoxic. Biocompatibilitate excelentă, proprietățile mecanice bune și potențialul de biomineralizare recomandă biocompozitele pe bază de fibroină, poliacrilamidă și oxid de grafenă pentru potențiale aplicațiile biomedicale din zona regenerării osoase. Totuși, potențialul citotoxic pe termen lung și non-biodegradabilitatea oxidului de grafenă și efectele specifice ale grafenei asupra celulelor, țesuturilor sau organelor și metabolizarea *in vivo* necesită studii viitoare.

În ultimul capitol al acestei teze de doctorat dedicat biosenzorilor pe bază de ADN și interacției acestora cu azatioprina a fost studiat comportamentul redox al azatioprinei cu ajutorul unui electrod de carbon sticlos la diferite pH-uri prin intermediul unor tehnici precum voltametrie ciclică și voltametrie în impuls diferențial conducând la propunerea unui mecanism redox al acestui medicament imunosupresiv. S-a arătat de asemenea faptul că reducerea azatioprinei are loc într-un singur pas, conducând la formarea unor produși de reducere care la rândul lor vor fi oxidați la potențiale pozitive. În cadrul acestui studiu au fost utilizați diferiți biosenzori electrochimici pe bază de ADN, poli [A] sau poli [G] cu scopul de a studia mecanismul de interacție dintre ADN și azatioprină. Rezultatele obținute prin metode electrochimice au fost corelate cu rezultatele morfologice obținute prin FESEM și cu rezultatele spectrometrice obținute prin spectrometria de masă, în acest mod confirmându-se faptul că odată cu reducerea azatioprinei, are loc formarea 8-oxo-dGuo printre straturile de ADN, un compus cu potențial mutagenic, acesta generând leziuni de tip oxidativ ale ADN-ului.

În concluzie, pe durata teze de doctorat au fost dezvoltate și caracterizate biocompozite pe bază de polimeri naturali cu caracteristicile adecvate pentru aplicațiile din domeniul medical.

În viitor, se va urmări îmbunătățirea caracteristicilor biocompozitelor pe bază polihidroxicanoați prin electrofilarea polimerului pentru a obține structuri poroase

tridimensionale cu suprafață specifică mare adecvate pentru utilizarea în domeniul medical. De asemenea, biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, proprietățile mecanice și antimicrobiene ale poliesterului natural pot fi îmbunătățite prin modificarea cu diferite tipuri de structuri anorganice precum oxid de zinc sau nanoparticule magnetice. Pentru biocompozitele de tip celuloză bacteriană și poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat) se va urmări îmbunătățirea modului de dispersare a copoliesterului natural printre și pe nanofibrilele din structura membranelor de celuloză bacteriană și eficientizarea procesului de purificare a biocompozitelor. Pentru îmbunătățirea modului de dispersie a poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianatului) se va modifica porozitatea membranei de celuloză prin liofilizare și se va utiliza o incintă sub vid pe durata impregnării. În cazul filmelor biocompozitelor pe bază de mătase și nanoparticule de se va urmări îmbunătățirea stabilității dimensionale prin optimizarea parametrilor experientali precum concentrația soluției de polimer, temperatura de uscare, timpul de ultrasonare, grosimea filmului de polimer sau concentrația de agent de armare. În cazul hidrogelurilor pe bază de fibroină/poliacrilamidă/oxid de grafenă trebuie avută în vedere testarea proprietăților mecanice, acestea prezentând o importanță deosebită în cazul aplicațiilor din domeniul ingineriei țesuturilor dure. Având în vedere că toate biocompozitele obținute în cadrul acestei teze de doctorat vizează aplicații din domeniul medical, toate optimizările propuse pot implica refacerea biocompatibilității și citotoxicității și realizarea de teste *in vivo* pentru materialele cu proprietăți adecvate. De asemenea se va urmări utilizarea polimerilor naturali pentru dezvoltarea de dispozitive de tip biosenzori modificați cu polimeri naturali pentru a facilita imobilizarea enzimelor sau al altor tipuri de bioreceptori și pentru a îmbunătăți răspunsul electrochimic și pentru a dezvolta actuatori pe bază de polimeri naturali pentru aplicații în domeniul mușchilor artificiali.

Referințe bibliografice

- [1] A.K. Błedzki, A. Jaszkiwicz, M. Urbaniak, D. Stankowska-Walczak, Biocomposites in the past and in the future, *Fibres Text. East. Eur.* 96 (2012) 15–22.
- [2] P. Jayakumar, L. Di Silvio, Cellular response to biocomposites, *Biomed. Compos.* (2009) 354–384. <https://doi.org/10.1533/9781845697372.3.354>.
- [3] K. Haraguchi, Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, *Encycl. Polym. Nanomater.* (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36199-9>.
- [4] M. Pumera, Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids: Review, *Electrochem. Commun.* 36 (2013) 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.08.028>.
- [5] D. Wei, Y. Liu, Controllable synthesis of graphene and its applications, *Adv. Mater.* 22 (2010) 3225–3241. <https://doi.org/10.1002/adma.200904144>.
- [6] L. Horváth, A. Magrez, M. Burghard, K. Kern, L. Forró, B. Schwaller, Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface, *Carbon N. Y.* 64 (2013) 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.07.005>.
- [7] P.C. Henriques, A.T. Pereira, A.L. Pires, A.M. Pereira, F.D. Magalhães, I.C. Gonçalves, Graphene Surfaces Interaction with Proteins, Bacteria, Mammalian Cells, and Blood Constituents: The Impact of Graphene Platelet Oxidation and Thickness, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 12 (2020) 21020–21035. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b21841>.
- [8] T.H. Lee, C.T. Yen, S.H. Hsu, Preparation of Polyurethane-Graphene Nanocomposite and Evaluation of Neurovascular Regeneration, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 597–609. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01473>.
- [9] M. Silva, N.M. Alves, M.C. Paiva, Graphene-polymer nanocomposites for biomedical applications, *Polym. Adv. Technol.* 29 (2018) 687–700. <https://doi.org/10.1002/pat.4164>.
- [10] C. Cheng, S. Li, A. Thomas, N.A. Kotov, R. Haag, Functional Graphene Nanomaterials Based Architectures: Biointeractions, Fabrications, and Emerging Biological Applications, *Chem. Rev.* 117 (2017) 1826–1914. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00520>.
- [11] D.A. Dikin, S. Stankovich, E.J. Zimney, R.D. Piner, G.H.B. Dommett, G. Evmenenko, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Preparation and characterization of graphene oxide paper, *Nature.* 448 (2007) 457–460. <https://doi.org/10.1038/nature06016>.
- [12] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 228–240. <https://doi.org/10.1039/b917103g>.
- [13] M.Z.I. Nizami, S. Takashiba, Y. Nishina, Graphene oxide: A new direction in dentistry, *Appl. Mater. Today.* 19 (2020) 100576. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100576>.
- [14] S.H. Ku, C.B. Park, Myoblast differentiation on graphene oxide, *Biomaterials.* 34 (2013) 2017–2023. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.052>.

- [15] M.P. Figueiredo, V.R.R. Cunha, F. Leroux, C. Taviot-Gueho, M.N. Nakamae, Y.R. Kang, R.B. Souza, A.M.C.R.P.F. Martins, I.H.J. Koh, V.R.L. Constantino, Iron-Based Layered Double Hydroxide Implants: Potential Drug Delivery Carriers with Tissue Biointegration Promotion and Blood Microcirculation Preservation, *ACS Omega*. 3 (2018) 18263–18274. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02532>.
- [16] C. Li, M. Wei, D.G. Evans, X. Duan, Recent advances for layered double hydroxides (LDHs) materials as catalysts applied in green aqueous media, *Catal. Today*. 247 (2015) 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.032>.
- [17] Y. Liu, Y. Wu, R. Zhang, J. Lam, J.C. Ng, Z.P. Xu, L. Li, H.T. Ta, Investigating the Use of Layered Double Hydroxide Nanoparticles as Carriers of Metal Oxides for Theranostics of ROS-Related Diseases, *ACS Appl. Bio Mater.* 2 (2019) 5930–5940. <https://doi.org/10.1021/acsbm.9b00852>.
- [18] X. Lu, L. Meng, H. Li, N. Du, R. Zhang, W. Hou, Facile fabrication of ibuprofen-LDH nanohybrids via a delamination/ reassembling process, *Mater. Res. Bull.* 48 (2013) 1512–1517. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.12.057>.
- [19] V. Rives, M. del Arco, C. Martín, Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review, *Appl. Clay Sci.* 88–89 (2014) 239–269. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.12.002>.
- [20] F. Barahuie, M.Z. Hussein, P. Arulselvan, S. Fakurazi, Z. Zainal, Drug delivery system for an anticancer agent, chlorogenate-Zn/Al-layered double hydroxide nanohybrid synthesised using direct co-precipitation and ion exchange methods, *J. Solid State Chem.* 217 (2014) 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2014.04.015>.
- [21] M.S. San Román, M.J. Holgado, B. Salinas, V. Rives, Drug release from layered double hydroxides and from their polylactic acid (PLA) nanocomposites, *Appl. Clay Sci.* 71 (2013) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.10.014>.
- [22] M. Baikousi, A. Stamatis, M. Louloudi, M.A. Karakassides, Thiamine pyrophosphate intercalation in layered double hydroxides (LDHs): An active bio-hybrid catalyst for pyruvate decarboxylation, *Appl. Clay Sci.* 75–76 (2013) 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.02.006>.
- [23] M. Chakraborti, J.K. Jackson, D. Plackett, D.M. Brunette, H.M. Burt, Drug intercalation in layered double hydroxide clay: Application in the development of a nanocomposite film for guided tissue regeneration, *Int. J. Pharm.* 416 (2011) 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.016>.
- [24] A. Jaiswal, M.C. Chattopadhyaya, Synthesis and characterization of novel Co/Bi-layered double hydroxides and their adsorption performance for lead in aqueous solution, *Arab. J. Chem.* 10 (2017) S2457–S2463. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.010>.
- [25] T.H. Kim, J.M. Oh, Dual nutraceutical nanohybrids of folic acid and calcium containing layered double hydroxides, *J. Solid State Chem.* 233 (2016) 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2015.10.019>.
- [26] W.Y. Wang, H. Liu, S.P. Li, X.D. Li, Synthesis of methotrexatum intercalated zinc-aluminum-layered double hydroxides and the corresponding cell studies, *Appl. Clay Sci.* 121–122 (2016) 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.11.025>.

- [27] Y. Kuthati, R.K. Kankala, C.H. Lee, Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: Current status and recent prospects, *Appl. Clay Sci.* 112–113 (2015) 100–116. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.04.018>.
- [28] T. Zhan, X. Wang, Y. Zhang, Y. Song, X. Liu, J. Xu, W. Hou, Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized in layered double hydroxides modified with amino functionalized ionic liquid through coprecipitation technique, *Sensors Actuators, B Chem.* 220 (2015) 1232–1240. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.043>.
- [29] C.F. Dai, D.Y. Tian, S.P. Li, X.D. Li, Methotrexate intercalated layered double hydroxides with the mediation of surfactants: Mechanism exploration and bioassay study, *Mater. Sci. Eng. C.* 57 (2015) 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.040>.
- [30] J. Perera, M. Weerasekera, N. Kottegoda, Slow release anti-fungal skin formulations based on citric acid intercalated layered double hydroxides nanohybrids, *Chem. Cent. J.* 9 (2015) 0–7. <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0106-3>.
- [31] I. Gualandi, E. Scavetta, Y. Vlamidis, A. Casagrande, D. Tonelli, Co/Al layered double hydroxide coated electrode for in flow amperometric detection of sugars, *Electrochim. Acta.* 173 (2015) 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.04.172>.
- [32] N. Carolina, C. Hill, Magnetite : Structure , Properties and Applications, (2015).
- [33] H. El Ghandoor, H.M. Zidan, M.M.H. Khalil, M.I.M. Ismail, Synthesis and some physical properties of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 5734–5745.
- [34] K.Y. Castrejón-Parga, H. Camacho-Montes, C.A. Rodríguez-González, C. Velasco-Santos, A.L. Martínez-Hernández, D. Bueno-Jaquez, J.L. Rivera-Armenta, C.R. Ambrosio, C.C. Conzalez, M.E. Mendoza-Duarte, P.E. García-Casillas, Chitosan-starch film reinforced with magnetite-decorated carbon nanotubes, *J. Alloys Compd.* 615 (2015) S505–S510. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.12.269>.
- [35] M. Mahdavi, M. Bin Ahmad, M.J. Haron, F. Namvar, B. Nadi, M.Z. Ab Rahman, J. Amin, Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Molecules.* 18 (2013) 7533–7548. <https://doi.org/10.3390/molecules18077533>.
- [36] E. Tanasa, C. Zaharia, A. Hudita, I.C. Radu, M. Costache, B. Galateanu, Impact of the magnetic field on 3T3-E1 preosteoblasts inside SMART silk fibroin-based scaffolds decorated with magnetic nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110714>.
- [37] J.L. Kirschvink, A. Kobayashi-Kirschvink, B.J. Woodford, Magnetite biomineralization in the human brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 7683–7687. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7683>.
- [38] A. Pohl, F. Berger, R.M.A. Sullan, C. Valverde-Tercedor, K. Freindl, N. Spiridis, C.T. Lefèvre, N. Menguy, S. Klumpp, K.G. Blank, D. Faivre, Decoding Biomineralization: Interaction of a Mad10-Derived Peptide with Magnetite Thin

- Films, Nano Lett. 19 (2019) 8207–8215. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b03560>.
- [39] B. Kalska-Szostko, M. Rogowska, A. Dubis, K. Szymański, Enzymes immobilization on Fe₃O₄-gold nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 2783–2787. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.10.132>.
- [40] S. Sathiyavimal, S. Vasantharaj, F. LewisOscar, R. Selvaraj, K. Brindhadevi, A. Pugazhendhi, Natural organic and inorganic–hydroxyapatite biopolymer composite for biomedical applications, *Prog. Org. Coatings.* 147 (2020) 105858. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105858>.
- [45] E.E. da Silva, H.H.M. Della Colleta, A.S. Ferlauto, R.L. Moreira, R.R. Resende, S. Oliveira, G.T. Kitten, R.G. Lacerda, L.O. Ladeira, Nanostructured 3-D collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds, *Nano Res.* 2 (2009) 462–473. <https://doi.org/10.1007/s12274-009-9042-7>.
- [50] J.P. Reddy, S. Ahankari, M. Misra, A. Mohanty, A new class of injection moulded structural biocomposites from PHBV bioplastic and carbon fibre, *Macromol. Mater. Eng.* 298 (2013) 789–795. <https://doi.org/10.1002/mame.201200087>.
- [52] W.S. Pietrzak, B.L. Eppley, The effect of high temperature intraoperative molding on bioabsorbable PLLA-PGA craniofacial fixation, *J. Craniofac. Surg.* 17 (2006) 920–925. <https://doi.org/10.1097/01.scs.0000229554.27823.fa>.
- [58] A.M. Al-Ghraibah, M. Al-Qudah, F.M. AL-Oqla, Medical Implementations of Biopolymers, Elsevier Inc., 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819661-8.00010-x>.
- [67] I. Sulaeva, U. Henniges, T. Rosenau, A. Potthast, Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1547–1571. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009>.
- [70] M.G. Albu, Z. Vuluga, D.M. Panaitescu, D.M. Vuluga, A. Cășărică, M. Ghiurea, Morphology and thermal stability of bacterial cellulose/collagen composites, *Cent. Eur. J. Chem.* 12 (2014) 968–975. <https://doi.org/10.2478/s11532-014-0545-z>.
- [98] B. Galateanu, M.-C. Bunea, P. Stanescu, E. Vasile, A. Casarica, H. Iovu, A. Hermenean, C. Zaharia, M. Costache, In Vitro Studies of Bacterial Cellulose and Magnetic Nanoparticles Smart Nanocomposites for Efficient Chronic Wounds Healing, *Stem Cells Int.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/195096>.
- [102] L. Lamboni, C. Xu, J. Clasohm, J. Yang, M. Saumer, K.H. Schäfer, G. Yang, Silk sericin-enhanced microstructured bacterial cellulose as tissue engineering scaffold towards prospective gut repair, *Mater. Sci. Eng. C.* 102 (2019) 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.043>.
- [156] D.M. Panaitescu, I. Lupescu, A.N. Frone, I. Chiulan, C.A. Nicolae, V. Tofan, A. Stefaniu, R. Somoghi, R. Trusca, Medium Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer Modified by Bacterial Cellulose for Medical Devices, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 3222–3232. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00855>.
- [158] T. Tsujimoto, N. Hosoda, H. Uyama, Fabrication of porous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) monoliths via thermally induced phase

- separation, *Polymers (Basel)*. 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/polym8030066>.
- [186] Y. Wang, J. Guo, L. Zhou, C. Ye, F.G. Omenetto, D.L. Kaplan, S. Ling, Design, Fabrication, and Function of Silk-Based Nanomaterials, *Adv. Funct. Mater.* 28 (2018) 1–24. <https://doi.org/10.1002/adfm.201805305>.
- [187] R.K. Pal, S.C. Kundu, V.K. Yadavalli, Fabrication of Flexible, Fully Organic, Degradable Energy Storage Devices Using Silk Proteins, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 9620–9628. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19309>.
- [217] W. Sheng, J. Liu, S. Liu, Q. Lu, D.L. Kaplan, H. Zhu, One-step synthesis of biocompatible magnetite/silk fibroin core-shell nanoparticles, *J. Mater. Chem. B*. 2 (2014) 7394–7402. <https://doi.org/10.1039/c4tb01125b>.
- [218] J. Kundu, L.A. Poole-Warren, P. Martens, S.C. Kundu, Silk fibroin/poly(vinyl alcohol) photocrosslinked hydrogels for delivery of macromolecular drugs, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1720–1729. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.004>.
- [219] C. Zaharia, M.R. Tudora, I.C. Stancu, B. Galateanu, A. Lungu, C. Cincu, Characterization and deposition behavior of silk hydrogels soaked in simulated body fluid, *Mater. Sci. Eng. C*. 32 (2012) 945–952. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.018>.
- [220] J.C. Bragg, H. Kweon, Y.Y. Jo, K.G. Lee, C.C. Lin, In situ formation of silk-gelatin hybrid hydrogels for affinity-based growth factor sequestration and release, *RSC Adv.* 6 (2016) 114353–114360. <https://doi.org/10.1039/c6ra22908e>.
- [221] J. Wang, SURVEY AND SUMMARY From DNA biosensors to gene chips, 2000.
- [222] A. Yang, F. Yan, Flexible Electrochemical Biosensors for Health Monitoring, *ACS Appl. Electron. Mater.* 3 (2021) 53–67. <https://doi.org/10.1021/acsaelm.0c00534>.
- [223] M. Arnold, G. Rechnitz, Biosensors based on plant and animal tissue, *Biosens. Fundam. Appl.* 8 (1989) 45.
- [224] K. Suzuki, Biosensing, *Anal. Sci.* 23 (2007) 3. <https://doi.org/10.2116/analsci.23.3>.
- [225] Q. Liu, C. Wu, H. Cai, N. Hu, J. Zhou, P. Wang, Cell-based biosensors and their application in biomedicine, *Chem. Rev.* 114 (2014) 6423–6461. <https://doi.org/10.1021/cr2003129>.
- [226] C.N. Kotanen, F.G. Moussy, S. Carrara, A. Guiseppi-Elie, Implantable enzyme amperometric biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 35 (2012) 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.016>.
- [227] Nurlaly, M. Ahmad, L. Yook Heng, L. Ling Tan, Potentiometric enzyme biosensor for rapid determination of formaldehyde based on succinimide-functionalized polyacrylate ion-selective membrane, *Measurement*. 175 (2021) 109112. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.109112>.
- [228] A. Liu, K. Wang, S. Weng, Y. Lei, L. Lin, W. Chen, X. Lin, Y. Chen, Development of electrochemical DNA biosensors, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.008>.
- [229] S. Cagnin, M. Caraballo, C. Guiducci, P. Martini, M. Ross, M. Santaana, D. Danley, T. West, G. Lanfranchi, Overview of electrochemical DNA biosensors: New

- approaches to detect the expression of life, *Sensors (Switzerland)*. 9 (2009) 3122–3148. <https://doi.org/10.3390/s90403122>.
- [230] K. V, DNA Biosensors-A Review, *J. Bioeng. Biomed. Sci.* 07 (2017). <https://doi.org/10.4172/2155-9538.1000222>.
- [231] Q. Wu, Y. Zhang, Q. Yang, N. Yuan, W. Zhang, Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens, *Sensors (Switzerland)*. 19 (2019). <https://doi.org/10.3390/s19224916>.
- [232] M.M. Aleksić, V. Kapetanović, An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA - Drug interactions, *Acta Chim. Slov.* 61 (2014) 555–573.
- [233] M. Pohanka, Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications, *Materials (Basel)*. 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/ma11030448>.
- [234] J. Wang, Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges, *Electroanalysis*. 13 (2001) 983–988. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200108\)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23).
- [235] J. Švorc, J. Miertuš, M. Stred'ansky', M. Stred'ansky', Composite transducers for amperometric biosensors. The glucose sensor, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2086–2090. <https://doi.org/10.1021/ac9609485>.
- [244] M. Xu, V.K. Yadavalli, Flexible Biosensors for the Impedimetric Detection of Protein Targets Using Silk-Conductive Polymer Biocomposites, *ACS Sensors*. 4 (2019) 1040–1047. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00230>.
- [248] V.C. Diculescu, A.M. Chiorcea-Paquim, A.M. Oliveira-Brett, Applications of a DNA-electrochemical biosensor, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.019>.
- [250] E. Paleček, M. Bartošík, Electrochemistry of nucleic acids, *Chem. Rev.* 112 (2012) 3427–3481. <https://doi.org/10.1021/cr200303p>.
- [252] F. Crick, J. Watson, © 1953 Nature Publishing Group, (1953).
- [253] T.T. Wu, Secondary structures of DNA., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 63 (1969) 400–405. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.2.400>.
- [258] S. Tombelli, G. Marrazza, M. Mascini, Recent advances on DNA biosensors, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 80 (2001) 87–99. <https://doi.org/10.1080/03067310108044375>.
- [259] A.M. Oliveira-Brett, V.C. Diculescu, Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part I. Analysis in incubated solutions, *Bioelectrochemistry*. 64 (2004) 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.05.003>.
- [262] V.C. Diculescu, T.A. Enache, P.J. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, Electrochemical oxidation of sanguinarine and of its oxidation products at a glassy carbon electrode - relevance to intracellular effects, *Electroanalysis*. 22 (2010) 113–120. <https://doi.org/10.1002/elan.200900367>.
- [266] A.M. Oliveira-Brett, V.C. Diculescu, Electrochemical study of quercetin-DNA

- interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors, *Bioelectrochemistry*. 64 (2004) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.05.002>.
- [268] C. Zaharia, E. Vasile, B. Galateanu, M.-C. Bunea, A. Casarica, P.O. Stanescu, Bacterial cellulose-polyhydroxyalkanoates composites synthesis, physico-chemical characterization and biological evaluation for tissue engineering, *Mater. Plast.* 51
- [274] R. Zhang, H. Huang, W. Yang, X. Xiao, Y. Hu, Preparation and characterization of bio-nanocomposites based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and CoAl layered double hydroxide using melt intercalation, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 43 (2012) 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2012.01.005>.
- [275] M.-C. Bunea, B. Galateanu, E. Vasile, C. Zaharia, P.-O. Stanescu, C. Andronescu, I.-C. Radu, R. Fuchs, H. Iovu, Novel biocomposites based on polyhydroxyalkanoates-layered double hydroxides for tissue engineering applications, *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.* 78 (2016).
- [279] M.C. Bunea, E. Vasile, B. Galateanu, A. Hudita, M. Serban, C. Zaharia, Silk fibroin films decorated with magnetic nanoparticles for wound healing applications, *Mater. Plast.* 54 (2017).
- [284] L. Wang, D. Song, X. Zhang, Z. Ding, X. Kong, Q. Lu, D.L. Kaplan, Silk-Graphene Hybrid Hydrogels with Multiple Cues to Induce Nerve Cell Behavior, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5 (2019) 613–622. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01481>.
- [286] B. Galateanu, A. Hudita, C. Zaharia, M.-C. Bunea, E. Vasile, M.-R. Buga, M. Costache, Silk-Based Hydrogels for Biomedical Applications, (2019) 1791–1817. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_59.
- [295] B. Galateanu, S. Dinescu, A. Cimpean, A. Dinischiotu, M. Costache, Modulation of adipogenic conditions for prospective use of hADSCs in adipose tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 15881–15900. <https://doi.org/10.3390/ijms131215881>.
- [301] C. Zaharia, E. Vasile, B. Galateanu, Bacterial Cellulose-polyhydroxyalkanoates Composites, (2014) 2016–2019.
- [302] M.E. Schrader, Young-Dupre Revisited, *Langmuir*. 11 (1995) 3585–3589. <https://doi.org/10.1021/la00009a049>.
- [303] H.Y. Erbil, The debate on the dependence of apparent contact angles on drop contact area or three-phase contact line: A review, *Surf. Sci. Rep.* 69 (2014) 325–365. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2014.09.001>.
- [304] C. Andronescu, S.A. Garea, E. Vasile, H. Iovu, Synthesis and characterization of polybenzoxazine/layered double hydroxides nanocomposites, *Compos. Sci. Technol.* 95 (2014) 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2014.01.012>.
- [305] N. Mahmed, O. Heczko, O. Söderberg, S.P. Hannula, Room temperature synthesis of magnetite (Fe₃-δO₄) nanoparticles by a simple reverse co-precipitation method, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 18 (2011) 3–7. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/18/3/032020>.
- [306] Y. Zhu, Q. Wu, Synthesis of magnetite nanoparticles by precipitation with forced

- mixing, J. Nanoparticle Res. 1 (1999) 393–396.
<https://doi.org/10.1023/A:1010091625981>.
- [311] R. Deepachitra, M. Chamundeeswari, B. Santhosh Kumar, G. Krithiga, P. Prabu, M. Pandima Devi, T.P. Sastry, Osteo mineralization of fibrin-decorated graphene oxide, Carbon N. Y. 56 (2013) 64–76.
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.12.070>.
- [312] Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J.W. Suk, J.R. Potts, R.S. Ruoff, Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications, Adv. Mater. 22 (2010) 3906–3924. <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>.
- [313] R.K. Layek, A.K. Nandi, A review on synthesis and properties of polymer functionalized graphene, Polymer (Guildf). 54 (2013) 5087–5103.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.06.027>.
- [315] C.M. Perrett, S.L. Walker, P. O’Donovan, J. Warwick, C.A. Harwood, P. Karran, J.M. McGregor, Azathioprine treatment photosensitizes human skin to ultraviolet A radiation, Br. J. Dermatol. 159 (2008) 198–204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08610.x>.
- [316] C. Ulrich, E. Stockfleth, Azathioprine, UV light, and skin cancer in organ transplant patients do we have an answer?, Med. Monatsschr. Pharm. 23 (2000) 261–266.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfl762>.
- [317] I. Smaranda, A. Nila, C.M. Manta, D. Samohvalov, D. Gherca, M. Baibarac, The influence of UV light on the azathioprine photodegradation: New evidences by photoluminescence, Results Phys. 14 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102443>.
- [318] E. Asadian, A. Iraj Zad, S. Shahrokhian, Voltammetric studies of Azathioprine on the surface of graphite electrode modified with graphene nanosheets decorated with Ag nanoparticles, Mater. Sci. Eng. C. 58 (2016) 1098–1104.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.022>

Diseminare rezultate

Articole publicate în reviste cotate ISI Thomson Reuters

M.-C. Bunea, V.-C. Diculescu, M. Enculescu, H. Iovu, T.-A. Enache, “Redox mechanism of azathioprine and its interaction with DNA”. International Journal of Molecular Science, 2021, 22(13), 6805. DOI:10.3390/ijms22136805. **I.F.=5,923**

B. Gălățeanu, **M.- C. Bunea**, P.- O. Stănescu, E. Vasile, A. Cășărică, H. Iovu, A. Hermenean, C. Zaharia, M. Costache, “In vitro studies of bacterial cellulose and magnetic nanoparticles smart nanocomposites for efficient chronic wounds healing”, Stem cells International, 2015, DOI:10.1155/2015/195096. **I.F.= 3,687.**

M.-C. Bunea, B. Gălățeanu, E. Vasile, A. Hudita, M.Șerban, C. Zaharia, Silk fibroin films decorated with magnetic nanoparticles for wound healling applications, Revista de Materiale Plastice, 2017, 54(1), 83-87. **I.F.= 1,248.**

C. Zaharia, E. Vasile, B. Gălățeanu, **M.-C. Bunea**, A. Cășărică, P.- O. Stănescu, “Bacterial Cellulose-polyhydroxyalkanoates Composites Synthesis, physico-chemical characterization and biological evaluation for tissue engineering”, Revista de Materiale Plastice, 2014, 51(1), 1-5. **I.F.= 0,824.**

Articole în curs de publicare

M.-C. Bunea, V.-C. Diculescu, M. Enculescu, H. Iovu, T.-A. Enache, “ On the interaction of DNA with azathioprine metabolites: spectrophotometric and electrochemical studies”. International Journal of Molecular Science

Articole publicate în Buletinul UPB

M.-C. Bunea, B. Gălățeanu, E. Vasile, C. Zaharia, P.-O. Stănescu, C. Andronescu, I.-C. Radu, R. Fuchs, H. Iovu, Novel biocomposites based on polyhydroxyalkanoates-layered double hydroxides for tissue engineering applications, U.P.B. Sci. Bull., Series B, 78 (2), 2016.

Capitole de cărți publicate

B. Gălățeanu, A. Hudita, C. Zaharia, **M.-C. Bunea**, E. Vasile, M.-R. Buga, M. Costache, "Silk-Based Hydrogels for Biomedical Applications", Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series, Springer Science and Business Media LLC, 2019, 1791-1817.

Conferințe

M.-C. Bunea, T.-A. Enache, M. Enculescu, V.C. Diculescu, *Mecanismul redox al azatioprinei și interacția acesteia cu ADN-ul*, Workshop 58PCCDI-SANOMAT, București, România, 19 mai 2020, Prezentare orală.

M.-C. Bunea, T.-A. Enache, *Redox behavior of azathioprine and its interaction with DNA*, XXV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, Limerick, Irland, 26-30 Mai 2019, Prezentare orală.

M.-C. Bunea, C. Zaharia, E. Vasile, B. Gălățeanu, P.-O. Stănescu, H. Iovu, *Development of magnetic silk fibroin scaffolds for tissue engineering applications*, 19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering – RICCCCE 19, Sibiu, Romania, 02-05.09.2015, Prezentare orală.

M.-C. Bunea, C. Zaharia, B. Gălățeanu, E. Vasile, A.-M. Pandele, H. Iovu, *Silk Fibroin-Graphene Oxide Hydrogels for Bone Tissue Engineerig*, Young Scientists Joining Forces For Excellence In Biomaterials Research, București, România, 28-29.05.2015, Poster.

Biocompozite pe bază de polimeri naturali cu aplicații medicale

M.-C. Bunea, C. Zaharia, P.-O. Stănescu, B. Gălățeanu, E. Vasile, A.-M. Pandele, H. Iovu; *Development Of Graphene/Silk Fibroin Hydrogels With Potential Uses In Bone Tissue Engineering*, Fourth International Symposium Frontiers in Polymer Science, Riva del Garda, Italia, 20-22.05.2015, Poster.