

Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnică București



Școala Doctorală de Inginerie Chimică și Biotehnologii

Departamentul de Știința și Ingineria Materialelor Oxidice și Nanomaterialelor

Teză de doctorat

Biomateriale terapeutice pentru vindecarea rănilor cronice

Conducător științific
Prof.Dr.Ing. Ecaterina Andronescu

Student doctorand
MSc. Ing. Alexandra Cătălina Bîrcă

Comisia de îndrumare: Prof.Dr.Eng. Alexandru Mihai Grumezescu

CSII.Dr.Ing. Bogdan Ștefan Vasile

S.L.Dr.Ing. Ionela Andreea Neacșu

București 2024

TABLE OF CONTENTS

PART I. LITERATURE REVIEW	7
1. Nanotechnology in wound dressings	8
2. Nanoparticles and nanomaterial systems for wound healing	12
2.1. Materials	13
2.1.1. Synthetic polymers used in wound dressings	13
2.1.2. Natural polymers used in wound dressings	16
2.1.2.1. Plant origin – natural polymers used in wound dressings	16
2.1.2.2. Animal and bacterial origin – natural polymers used in wound dressings	19
2.2. Types of wound dressings	21
2.2.1. Traditional wound dressings – gauze, bandages	21
2.2.2. Modern wound dressings	22
2.2.2.1. Interactive dressings – semi-permeable films and foams dressings	22
2.2.2.2. Advanced interactive dressings – hydrocolloids and hydrogels, smart dressings (pH-responsive, temperature responsive, photo responsive), electrospun nanofibrous dressings, antimicrobial dressings, 3D printed dressings	24
2.2.2.3. Smart dressings	26
2.2.2.4. Electrospun nanofibrous dressings	29
2.2.2.5. Antimicrobial dressings	30
2.2.2.6. 3D printed dressings	31
2.2.2.7. Bioactive dressings – tissue-engineered skin equivalents and cell-based dressings	32
2.3. Synthesis of hydrogels	33
2.3.1. Physical crosslinking	33
2.3.2. Chemical crosslinking	34
3. Skin anatomy and physiology	34
3.1. Skin appendages	37
3.2. Skin microcirculation	38
3.3. Skin function	40
4. An overview of wounds	44
4.1. Classification of wounds	44
2.1.1. Acute wounds	45
4.1.2. Chronic wounds	45
4.1.2.1. Venous ulcers	46

4.1.2.2. Arterial ulcers	47
4.1.2.3. Pressure ulcers	47
4.1.2.4. Diabetic ulcers	47
4.1.2.5. Burns wounds	48
4.2. Pain sensation in skin wounds	49
4.3. Wound infection	49
4.3.1. Acute wound infection	50
4.3.2. Chronic wound infection	50
4.4. Wound healing	52
PART II. PERSONAL CONTRIBUTIONS	56
1. Objectives and originality of the doctoral thesis	57
2. List of publications	58
3. Research Results	61
3.1. H ₂ O ₂ -PLA-(Alg) ₂ Ca Hydrogel Enriched in Matrigel® Promotes Diabetic Wound Healing	62
3.2. A Microfluidic Approach for Synthesis of Silver Nanoparticles as a Potential Antimicrobial Agent in Alginate–Hyaluronic Acid-Based Wound Dressings	84
3.3. Infection-Free and Enhanced Wound Healing Potential of Alginate Gels Incorporating Silver and Tannylated Calcium Peroxide Nanoparticles	113
4. General Conclusions	153
5. Research frameworks established to facilitate further investigations - Perspectives	161
REFERENCES	162

Cuvinte cheie: răni cronice, hidrogeluri pe bază de alginat, eliberare de oxigen, proprietăți antimicrobiene, sinteză microfluidică de nanoparticule

Date din literatură – Introducere

Corpul uman este acoperit de piele, aceasta având un rol foarte special, fiind primul strat de contact cu mediul înconjurător și reprezentând aproximativ 16% din greutatea totală a corpului [1,2]. Vascularizarea sângelui reprezintă o componentă foarte importantă a corpului uman, care are o mulțime de funcții. În ceea ce privește pielea, vasele furnizează nutrienți, livrează oxigen, controlează temperatura, sunt implicate în homeostazia fluidelor și reglează de asemenea seria de acțiuni imunologice [3].

Orice defect care apare la nivelul pielii și care are un efect de întrerupere a continuității straturilor cutanate este definit ca rană. O plagă poate apărea din cauza mai multor factori, cum ar fi leziuni, intervenții chirurgicale, accidente mecanice - presiune, tăieturi, arsuri, sau din cauza problemelor patologice ale pacientului, cele mai frecvente fiind diabetul sau afecțiuni ale circulației. În urma apariției unei plăgi, aceasta poate fi clasificată ca fiind acută sau cronică în funcție de anumite criterii specifice. Analizând dimensiunile, profunzimea și gradul plăgilor, clasificarea acestora se poate face în prima fază. În funcție de aceste rezultate, rănilor se pot vindeca într-un timp normal și necesar pentru o rană acută, sau se pot extinde pe perioade lungi de timp, devenind cronice. Rănilor cronice nu reușesc să se vindece din cauza patologiei perpetue a plăgii, a traumatismelor cu efect ridicat, a bolilor vasculare sau din cauza apariției unor condiții suplimentare datorate ineficienței acțiunii naturale și anatomice de vindecare, cum ar fi infecțiile sau nivelul scăzut de oxigen (ischemie) transportat prin vasele de sânge [4-11].

Infecția rănilor reprezintă un răspuns inflamator al gazdei atunci când zona afectată interferează cu microorganismele și împiedică vindecarea plăgii. Inflamația apare ca răspuns vascular natural al organismului atunci când țesutul este nociv din punct de vedere fizic, biologic sau chimic și este prima încercare de a evita infectarea plăgii. Orice modificare a integrității pielii cauzată de răni, injecții cu ace, intervenții chirurgicale, lacerări, arsuri și zgârieturi este o „ușă deschisă” pentru ca microbiomul normal care se găsește la suprafața pielii să exacerbeze rana și să dezvolte infecție a țesuturilor moi. Dacă infecțiile pot apărea din cauza microbiomului normal găsit la suprafața pielii, atunci în cazul unei răni cronice care nu reușește să se vindece, apar complicații mult mai grave. În cazul rănilor cronice, zona afectată este expusă la numeroși agenți patogeni care susțin colonizarea microbiană și dezvoltarea de biofilme. De asemenea, condițiile rănilor cronice, cum ar fi oxigenarea scăzută, țesutul necrotic și răspunsul imun al gazdei deficitar, permit dezvoltarea bacteriană. Cronicitatea plăgii este de asemenea, influențată

de nivelul colonizării microbiene, care face ca infecția să persiste pentru anumite perioade [12-15].

Rolul principal și principiul pansamentelor sunt de a oferi asistență mediului plăgii prin sprijinirea debridării, formarea țesutului de granulație, reglarea nivelului de exudat, de a oferi un strat protector, menținând un mediu umed și oferind susținere pentru acțiunea organismului împotriva microorganismelor și un scut opus celor care s-ar putea dezvolta suplimentar, de asemenea. Toate aceste funcții ale pansamentelor facilitează procesul de vindecare a plăgilor pentru a restabili în cele din urmă caracteristicile naturale ale pielii [16]. La fel ca în cazul tipului de rană, acute sau cronice, pansamentele sunt clasificate de asemenea foarte detaliat fiind disponibile în variații mari de tipuri de pansamente, în funcție de necesitățile de vindecare a rănilor. Având în vedere faptul că mecanismul de vindecare a plăgilor este cunoscut în detaliu indiferent de tipul plăgii și că varietatea de pansamente este nelimitată, este extrem de important ca alegerea pansamentului să fie adecvată după evaluarea caracteristicilor plăgii. Această discuție se bazează în special pe vindecarea plăgilor cronice datorită duratei lungi a procesului de vindecare care vine împreună cu o multitudine de alte probleme dependente de acesta. În cazul rănilor acute, organismul reușește să gestioneze această situație mult mai elegant în comparație cu rănilor cronice, iar alegerea unui pansament optim nu este tocmai o provocare [17-20].

Nanotehnologia include intensificarea interesului pentru studiul sintezei, structurii, dezvoltării și evoluției dominante și impunătoare a nanoparticulelor atomice și moleculare. Prin utilizarea nanoparticulelor într-un context specific, se dezvoltă nanoproduse care sunt considerate, în prezent, sisteme inteligente utilizate în numeroase aplicații medicale datorită caracteristicilor lor fizico-chimice bazate pe suprafețele particulelor care cresc exponențial în timp ce volumul lor scade. Cu toate acestea, nanoparticulele de argint au fost, sunt și vor fi cele care sunt fidele activității lor, dar înșelătoare pentru o gamă variată de microorganisme [1, 21-23]. O altă caracteristică a nanoparticulelor de argint este rolul lor antiinflamator atunci când sunt utilizate într-un pansament. Proprietățile antiinflamatorii ale nanoparticulelor de argint le fac eficiente în vindecarea rănilor atunci când sunt aplicate topic ca o componentă a pansamentului. Prin reducerea eliberării de citokine și limfocite și prin inhibarea infiltrării mastocitelor, nanoparticulele de argint contribuie la vindecarea rănilor, îmbunătățind aspectul și dimensiunea cicatricilor. În plus, în cazul ulcerelor diabetice, s-a demonstrat că nanoparticulele de argint accelerează procesul de vindecare prin stimularea proliferării

și migrării keratinocitelor, promovând în același timp diferențierea fibroblastelor în miofibroblaste, ceea ce duce la contracția plăgii și la vindecarea mai rapidă a acestora [24-27].

Rănilor cronice, care nu reușesc să se vindece în intervalul de timp obișnuit, prezintă adesea o afecțiune debilitantă cunoscută sub numele de hipoxie. Aceasta apare atunci când rănilor nu primesc suficient oxigen, împiedicând procesul natural de vindecare al organismului. O serie de factori de bază pot contribui la apariția rănilor cronice, inclusiv: Circulația sanguină afectată, care reduce aportul de oxigen și substanțe nutritive către țesutul plăgii; Inflamația care poate duce la creșterea permeabilității vaselor de sânge, provocând scurgerea fluidelor și reducerea fluxului sanguin către zona plăgii; Rănilor mari sau adânci pot avea acces limitat la oxigen, ceea ce face dificilă vindecarea țesutului plăgii; Țesutul însuși nu poate extrage oxigen din sânge din cauza deteriorării capilarelor sau a microvasculaturii; Modificările hormonale, cum ar fi cele observate în diabet, pot afecta fluxul sanguin și pot reduce aportul de oxigen la nivelul plăgii; Deteriorarea nervilor poate întrerupe fluxul sanguin și reduce senzația, făcând dificilă detectarea semnelor de hipoxie. În plus, există consecințe puternice ale hipoxiei în rănilor cronice, inclusiv vindecarea întârziată, riscul crescut de infecție, deteriorarea țesuturilor, riscul crescut de amputare, durere și disconfort, impactul asupra sănătății mintale [28-32]. Asadar, nevoia de a incorpora diferite sisteme care pot facilita vindecarea ranilor prin eliberarea de oxigen pentru a depasi hipoxia, este in atentia cercetatorilor din domeniu. Diferite metode pot fi abordate in acest sens, inasa in ceea ce priveste domeniul nanotehnologiei, recunoscute pentru activitatea lor sunt nanoparticulele de peroxid de calciu. Atunci când sunt expuse la umiditate, reprezentată de lichidul plăgii, nanoparticulele de peroxid de calciu eliberează oxigen, care are multiple beneficii în procesul de vindecare a plăgilor. În plus, aceste nanoparticule au o activitate crescută în condiții acide, ceea ce este extrem de potrivit pentru vindecarea rănilor cronice, având în vedere mediul lor acid [33-36].

Contribuții personale

Obiectivele și originalitatea tezei de doctorat

Stadiul actual al cercetării privind materialele de tip pansament pentru tratarea rănilor cronice se caracterizează prin ușurința accesului, accesibilitate și navigabilitate. Aceasta înseamnă că informațiile relevante privind dezvoltarea de noi pansamente pentru răni sunt ușor disponibile, permițând o explorare fără întreruperi a cercetărilor

existente în domeniu. Această conștientizare aduce un dublu avantaj cercetătorilor: (1) Recunoașterea faptului că informațiile pe care le deținem nu sunt niciodată complete referitor la domeniul cercetării pansamentelor, recunoscând limitările inerente. De la (1) fiind corelat cu al doilea fapt, și anume că: (2) Această conștientizare poate declanșa stimularea mentală, încurajând cercetătorii să gândească creativ și să dezvolte soluții inovatoare pentru a depăși provocările care rămân nerezolvate.

În urma aprofundării intensive a literaturii de specialitate cu privire la procesele biologice care au loc atunci când apare un defect pe piele și care nu poate fi tratat prin autovindecarea automată a organismului din cauza cronicității, au fost identificate două abordări principale care s-au dovedit a avea capacitatea de a îmbunătăți considerabil procesul de vindecare a rănilor. Aceste soluții sunt înrădăcinate în procesele fiziologice naturale ale organismului care au loc în timpul vindecării rănilor, dar în cazurile cronice grave, încercarea de a restabili funcțiile pielii prezintă un risc semnificativ de eșec, ducând la rezultate nedorite pentru pacienți. Soluțiile propuse se concentrează pe furnizarea a două elemente esențiale: furnizarea de oxigen suplimentar la locul plăgii și asigurarea unei protecții specializate împotriva microorganismelor patogene. În acest sens, au fost urmărite trei obiective fundamentale:

1. Testarea capacității unui pansament de tip hidrogel de a elibera oxigen în contextul unei răni cronice care nu are capacitatea de a se vindeca. A fost conceptualizat, sintetizat și testat un hidrogel pe bază de alginat, ce încorporează microsferă PLA care încapsulează peroxid de hidrogen ce au fost distribuite uniform în matricea polimerică. Aceasta a fost prima încercare de a efectua o eliberare controlată de oxigen datorită permeabilității PLA la oxigen.
2. Testarea capacității unui pansament de tip hidrogel de a proteja împotriva bacteriilor, precum și a capacității de a reduce infecția care a fost experimentată anterior în cazurile de răni cronice. Folosind un cip în formă de cruce și o tehnică microfluidică, a fost produsă o serie de nanoparticule de argint, având control asupra proprietăților lor finale datorită metodei moderne de sinteză. Eficacitatea antibacteriană a argintului a fost evaluată în contextul unui hidrogel compozit pe bază de alginat și acid hialuronic pentru a evalua performanța sa în această formulă specifică.
3. Investigarea capacității unui pansament de tip hidrogel de a elibera oxigen în mod susținut și de a preveni formarea de biofilme bacteriene, asigurând

vindecarea optimă a plăgilor și controlul infecțiilor. A fost proiectat și evaluat un nou hidrogel pe bază de alginat cu dublă funcționalitate. Încorporarea de nanoparticule de peroxid de calciu, sintetizate prin metoda precipitării, a permis eliberarea controlată de oxigen. În plus, încorporarea de nanoparticule de argint, sintetizate prin tehnologia microfluidică, a oferit proprietăți antimicrobiene pentru a controla infecțiile.

Pentru a obține rezultatele dorite, au fost elaborate planuri și viziuni detaliate pentru procesele de sinteză în vederea optimizării proprietăților materialelor de tip pansament. Controlul precis al caracteristicilor finale ale materialelor a fost posibil prin utilizarea aparatelor de laborator, cum ar fi platformele microfluidice, băile, pompele peristaltice și sondele cu ultrasunete. Aceste tehnici avansate sunt caracteristice dezvoltării moderne a materialelor, în special în domeniul nanomaterialelor. Factori cruciali precum uniformitatea dimensiunii particulelor, morfologia, sarcina, stabilitatea și alte proprietățile au fost luate în considerare cu atenție pentru a asigura materiale de înaltă performanță și eficiente pentru aplicațiile în ceea ce privește terapia rănilor cronice. Chiar dacă un material are o lungă istorie de utilizare într-un anumit domeniu, nu este neapărat o garanție că acesta și-a epuizat potențialul de inovare. Apariția constantă a unor noi metode și tehnici de sinteză poate duce la modificarea materialelor existente, permițându-le să fie îmbunătățite sau optimizate. Această evoluție continuă asigură că și materialele aparent bine stabilite pot continua să fie inovatoare și originale. Încorporarea peroxidului de calciu în hidrogeluri este o evoluție relativ nouă, iar utilizarea metodelor de sinteză microfluidică reprezintă o tehnică de ultimă oră în ingineria modernă. Din cunoștințele noastre, cu toate acestea, nu există nicio înregistrare publicată privind combinarea nanoparticulelor de peroxid de calciu cu nanoparticulele de argint în aceeași formulă pentru un material de tip pansament, ceea ce face ca aceasta să fie o abordare nouă și fără precedent.

Concluzii generale

Domeniul ingineresc al dezvoltării de noi materiale de tip pansament cu proprietăți optimizate și avansate este încă un domeniu proeminent de cercetare științifică, determinat de necesitatea de a aborda provocările complexe asociate procesului de vindecare a rănilor. Datorită disponibilității unei tehnologii avansate și a unei cantități mari de informații, a fost posibil să se deslușească procesele și factorii complicați care apar atunci când se produce o rană cutanată și răspunsul ulterior de

vindecare al organismului de la început, progresie și sfârșit. Ca urmare, s-a stabilit că pansamentele ideale trebuie să poseze proprietăți specifice care să susțină și să îmbunătățească capacitățile naturale de vindecare a rănilor ale organismului, facilitând astfel mecanismul implicit de vindecare. Următoarele calități sunt esențiale pentru pansamentul ideal: biocompatibilitate, menținerea unui mediu umed, absorbția lichidelor în exces, protecție antimicrobiană, biodegradabilitate, promovarea vindecării țesuturilor, permeabilitate și aport de oxigen, efecte secundare diminuate, cicatrici mai puține, reducerea durerii, frecvența minimă de schimbare a pansamentului, ușurința aplicării și îndepărtării, confort, rentabilitate.

În ceea ce privește aceste cerințe specifice, obiectivul tezei de doctorat a fost de a proiecta și de a crea noi pansamente care să îndeplinească îndeaproape cerințele pentru vindecarea optimă și cu succes a rănilor cronice.

Primul studiu de inginerie științifică s-a axat pe dezvoltarea și evaluarea unui pansament experimental nou, care constă într-un hidrogel pe bază de alginat complexat cu Matrigel și microsferă polimerice care încapsulează peroxid de hidrogen. Aceste microsferă sunt concepute pentru a elibera oxigen la locul ulcerației, favorizând un mediu de vindecare.

Microsferăle au fost sintetizate prin prepararea unei microemulsii pe bază de acid polilactic (PLA) - componenta hidrofobă, și alcool polivinilic (PVA) - partea hidrofilă, cu adăugarea de peroxid de hidrogen (H_2O_2). Microemulsia care conține H_2O_2 a fost supusă sondei cu ultrasunete pentru crearea microsferălor. Soluției sonicate i s-au aplicat o procedură de spălare și un proces de centrifugare, obținându-se un precipitat denumit OMs. Formulările hidrogelului se bazează pe alginat ca matrice principală, constând într-o soluție de 5 mg/mL. Această formulă servește drept control și este denumită HG. Hidrogelul control (HG) este încorporat cu OMs, rezultând formarea hidrogelului HG_OMs. Un protocol similar a fost utilizat pentru a produce hidrogelul HG_OMs_MG, singura distincție fiind includerea Matrigelului în această probă. Toate formulările de hidrogel au fost reticulate cu soluție de clorură de calciu. Pentru identificarea și stabilirea proprietăților fizico-chimice ale pansamentelor obținute au fost utilizate următoarele tehnici de investigare: FTIR, SEM, FT-ICR și estimarea ratei de gonflare și degradare. Evaluarea biologică a implicat testarea *in vivo* a pansamentelor pe modele animale murine. Modelele animale diabetice au fost create prin administrarea de streptozotocină, permițând evaluarea eficacității hidrogelurilor în tratarea rănilor cu vindecare afectată, cum ar fi ulcerăle diabetice, care sunt cunoscute pentru vindecarea deficitară. Analiza

FTIR a fost efectuată și pe HG, OMs și HG_OMs, pentru a include sau exclude prezența grupelor funcționale corespunzătoare benzilor vibraționale specifice. Datorită hidrofilicității ridicate a probelor, gruparea OH abundentă este identificată între 3100 și 3400 cm^{-1} . În plus, caracteristicile grupării chimice C=O pentru PLA și ale grupării COO-din alginat sunt identificate la benzile de absorbție de la 1500 și, respectiv, 1750 cm^{-1} . Integrarea OM-urilor prin matricea HG a fost confirmată de rezultatele spectrelor FTIR. Rezultatele investigațiilor SEM au confirmat că formarea OM-urilor a fost un succes, evidențiind sfere rotunde clare cu dimensiuni cuprinse între 1 și 3 μm . Micrografiile înregistrate pentru hidrogeluri stabilesc structura macroporoasă a acestora, cu dimensiuni ale porilor care variază între 79 (pentru proba de control HG) și 110 (pentru proba HG_OMs) μm . Se observă diferențe distincte între formulările HG și HG_OMs din cauza existenței OMs pe suprafață și prin întreaga matrice de alginat care prezintă o distribuție uniformă. Pentru a cuantifica cantitatea de H_2O_2 , care prin eliberare, procesul de vindecare, este îmbunătățit datorită influenței asupra funcției celulare și a stimulării proliferării, a fost utilizată analiza FT-ICR. Prin referire la curba de calibrare, a fost determinată o valoare de aproximativ 1,97 ppm. Cantitatea de H_2O_2 în procesul de vindecare ar trebui să fie scăzută, dar suficientă pentru restabilirea procesului de angiogeneză, care este oprit de hipoxia cronică observată, în special în ulcerele diabetice. Capacitatea hidrogelurilor de absorbție a lichidelor a fost evaluată în condiții de concentrații ionice similare plasmei sanguine, utilizând SBF preparat prin protocolul lui Kokubo. Probele HG și HG_OMs demonstrează o capacitate adecvată de a reține fluidele încă din primele minute de contact cu soluția SBF, iar după 24 de ore de imersie, s-a înregistrat un comportament maxim de aproximativ 200% pentru HG_OMs și 160% pentru HG. Ulterior, s-a observat o scădere a ratei de gonflare datorită declanșării procesului de degradare, care a fost evaluat după 24 și 48 de ore. S-a observat un comportament de degradare redus pentru eșantionul HG_OMs datorită stabilității oferite de prezența OMs în matricea de alginat. Cu toate acestea, pansamentele prezintă o capacitate sporită de absorbție și retenție a fluidelor și o rată de degradare moderată datorită materialelor utilizate și structurii poroase. Proprietatea de vindecare a pansamentelor obținute a fost evaluată pe plăgi dermice pe modele murine cu afecțiuni induse de diabet. Tratamentul cu acțiune dependentă de timp a fost stabilit pentru 3 și 7 zile, urmat de analiza histopatologică. Rezultatele histopatologice și discuțiile au fost realizate prin compararea plăgii fără pansament cu celelalte plăgi tratate cu formulările propuse. În decurs de 3 zile, aplicarea pansamentului HG a dus la o scădere semnificativă

a umflăturilor localizate și a prezenței celulelor asociate cu inflamația. În plus, după 7 zile, s-a format un nou strat exterior de piele și a fost observat un număr mai mare de vase de sânge. După aplicarea pansamentului din hidrogel HG_OMs, rana nu a prezentat semne de edem și a avut o scădere notabilă a inflamației pe o perioadă de 3 zile. După un contact mult mai lung (7 zile) al plăgii cu hidrogelul care înglobează microsfere H₂O₂-PLA, rezultatul histopatologic indică formarea și distribuția uniformă a capilarelor, precum și prezența fibrelor de colagen. Rezultatele superioare obținute în acest grup (plăgi tratate cu HG_OMs) sugerează că oxigenul eliberat de microsfere a jucat un rol semnificativ în promovarea acestor efecte benefice, având în vedere activitățile eficiente ale oxigenului în promovarea angiogenezei și a sintezei colagenului. În plus, încorporarea Matrigelului în pansamentul HG_OMs facilitează formarea de țesut de granulație distinct și de noi capilare într-un interval de 3 zile. Acest lucru se datorează consolidării structurale și introducerii de biomolecule furnizate de Matrigel. După 7 zile de tratament, au fost observate un strat epidermic normal și complet și o rețea de colagen mai densă. În plus, procesul de keratinizare a avut loc exclusiv în epiderma care a fost conectată cu rana tratată cu HG_OMs_MG.

A doua metodologie utilizată în teza de doctorat implică crearea de pansamente pentru răni prin utilizarea unei tehnici microfluidice care utilizează un cip în formă de cruce pentru a produce nanoparticule de argint încorporate în materiale de alginat-acid hialuronic. Aceste tipuri de pansamente sunt utilizate în special pe rănilor cronice infectate datorită eficacității semnificative a nanoparticulelor de argint. Cu toate acestea, impactul nanoparticulelor de argint asupra procesului de vindecare este îmbunătățit de caracteristicile lor fizico-chimice, inclusiv dimensiunea, forma, sarcina de suprafață și diametrul hidrodinamic. În acest sens, o metodă nouă de sintetizare a nanoparticulelor de argint este reprezentată de platforma microfluidică, care oferă parametri controlabili și, ulterior, caracteristici controlabile ale particulelor.

Procesul de sinteză implică utilizarea unei pompe peristaltice, care permite manipularea precisă a variabilelor de intrare, cum ar fi volumul soluțiilor necesare pentru formarea nanoparticulelor, prin setarea valorilor rotațiilor pe minut (RPM); o platformă microfluidică din PMMA, proiectată și obținută cu un echipament de tăiere cu laser CNC, care reprezintă nucleul sintezei nanoparticulelor de argint; furtune de circulație conectate la pompă și la cip care furnizează soluția de precursor metalic și soluția de reducere organică. Au fost stabilite patru intrări RPM pentru sinteza nanoparticulelor de argint exprimate și pentru soluția AgNO₃ și pentru soluția reducătoare (15 - 15, 15 - 30, 30 - 15,

10 - 15; AgNO₃ - 2 x soluție organică). Intrările laterale (x2 datorită formei de cruce) au fost destinate soluției organice reducătoare, iar intrarea centrală a fost destinată soluției AgNO₃. Au fost sintetizate două serii distincte de nanoparticule de argint, care diferă doar prin concentrația precursorului de argint - AgNO₃. Seria inițială a fost obținută utilizând o soluție cu o concentrație de AgNO₃ de 0,5 % masic, însă seria ulterioară a fost obținută utilizând o soluție cu o concentrație de AgNO₃ de 0,25 % masic. Proprietățile fizico-chimice ale tuturor probelor de argint au fost analizate (XRD, SEM, DLS, TEM), iar evaluarea ulterioară a rezultatelor a condus la identificarea celei mai optime probe, care a fost considerată din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice. Această probă (Ag(0.25_15)) a fost ulterior încorporată într-un pansament pe bază de alginat-acid hialuronic și a fost supusă unei evaluări suplimentare, atât din punct de vedere fizico-chimic, cât și biologic (FTIR, SEM, TG-DSC, rata de umflare și degradare, evaluarea antimicrobiană, precum și evaluarea biologică). Pentru compararea proprietăților pansamentelor, au fost obținute patru probe: Alg - hidrogelul control din alginat; Alg_HA - hidrogelul compozit din alginat și acid hialuronic; Alg_S - hidrogelul control cu încorporare de nanoparticule de argint; Alg_HA_S - constituenții similari cu a doua probă, dar cu adăugarea nanoparticulelor de argint.

Datele XRD obținute pentru cele 8 probe de nanoparticule de argint indică în mod clar argintul ca fază unică cu un sistem cristalografic cubic și proprietăți bine cristalizate. Dimensiunea cristalitelor a fost calculată și au fost identificate diferențe între probe, concluzionându-se că utilizarea unei concentrații mai mici de AgNO₃ a indus o dimensiune mai mică a cristalitelor. Micrografiile SEM obținute pentru toate probele de argint arată diferențe între morfologie și uniformitatea dimensiunii în funcție de soluția de concentrație a precursorului. Seria 2 (0.25% AgNO₃) prezintă o scădere a dimensiunii nanoparticulelor, un aspect mai sferic al morfologiei și uniformitate în ceea ce privește dimensiunea. În plus, micrografiile TEM au coroborat datele privind modul în care concentrația de AgNO₃ afectează forma și dimensiunile nanoparticulelor de argint, precum și structura cristalină a probelor (așa cum reiese din modelul SAED), după cum se observă în rezultatele XRD. Rezultatele obținute prin împrăștierea dinamică a luminii (DLS) au indicat prezența unei sarcini negative și stabilitatea soluției de nanoparticule pe baza măsurătorilor potențialului zeta. Valorile razei hidrodinamice au fost în intervalul 103 – 184 nanometri pentru seria 1, și între 58 – 148 nanometri pentru seria 2, evidențiind din nou influența concentrației precursorului și corelarea cu dimensiunile fizice măsurate din imaginile de microscopie electronică. Conform rezultatelor, proba cu cele mai

favorabile proprietăți fizico-chimice face parte din seria 2, unde a fost utilizată o concentrație mai mică a soluției de precursor de argint. Etapa ulterioară a implicat încorporarea probei de nanoparticule de argint selectată într-un hidrogel pe bază de alginat-acid hialuronic și efectuarea analizei amănunțite pentru a evalua potențialul acesteia ca soluție de tratament pentru combaterea infecțiilor și promovarea vindecării rănilor. Formarea de materiale compozite, caracterul hidrofil și prezența grupărilor chimice caracteristice se confirmă prin rezultatele analizei FTIR. Gruparea O – H este observată în toate probele în jurul a 3200 cm⁻¹, iar banda de vibrație C – H la 2907 cm⁻¹, precum și gruparea amidică N-H este identificată ca o confirmare pentru formare hidrogelului compozit alginat-acid hialuronic. Micrografiile SEM confirmă proprietățile poroase ale pansamentelor care au fost obținute și indică diferențe între probele Alg și Alg_HA în ceea ce privește dimensiunea și aspectul porilor. Adăosul de acid hialuronic oferă o prezență intensificată a porilor și forme mai alungite. În plus, probele Alg_S și Alg_HA_S prezintă diferențe perceptibile în uniformitatea dispersiei nanoparticulelor de argint datorită prezenței acidului hialuronic. Includerea acidului hialuronic are un efect benefic atât asupra pielii, cât și asupra procesului de vindecare, precum și asupra caracteristicilor fizice și chimice generale ale pansamentelor. Rezultatele analizei TG-DSC evidențiază procesul de descompunere care apare la o anumită temperatură, iar în final, masa reziduală a fost utilizată pentru a indica conținutul de argint din fiecare probă (1,27% pentru Alg_S, 0,36% pentru Alg_HA_S). S-a evaluat capacitatea de gonflare a hidrogelurilor și a fost observat faptul că încă din primele minute de imersare s-a înregistrat o rată semnificativă de absorbție, iar aceste valori s-au menținut aproximativ 72 de ore. Ulterior a fost înregistrată o scădere a ratei de gonflare, fapt corelat începerii procesului de degradare. Caracteristicile antibacteriene ale pansamentelor sintetizate au fost evaluate pe baza capacității lor de a inhiba formarea de biofilme. Activitatea antibacteriană a nanoparticulelor de argint a fost evaluată prin incubarea în contact cu două tulpini bacteriene, *S. aureus* și *E. coli*, timp de 24, 48 și 72 de ore. Pansamentele Alg_S și Alg_HA_S induc o scădere a formării de biofilm, în special pe tulpina Gram-pozitivă, și sunt menținute în orice moment de testare. Mai mult, au fost observate și implicațiile acidului hialuronic, datorită efectului său bacteriostatic, proba Alg_HA_S prezintă unități formatoare de colonii mult mai mici comparativ cu proba Alg_S pe ambele tipuri de bacterii. Biocompatibilitatea probelor a fost evaluată atât calitativ, cât și cantitativ în prezența liniei celulare de keratinocite HaCaT, care au fost incubate cu materialele timp de 24 de ore. Microscopia de fluorescență confirmă faptul că în cazul contactului cu

materialele, celulele își mențin morfologia citoscheletului de actină sănătoasă, indicând biocompatibilitatea. De asemenea, a fost evidențiată capacitatea de a stimula procesul de proliferare celulară, iar nivelurile de lactat dehidrogenază (LDH) au fost minime, indicând integritatea membranelor celulare. Acest lucru indică faptul că aceste materiale prezintă multiple caracteristici ideale pentru un pansament, fiind un remediu prosper pentru tratarea rănilor cu rate lente de vindecare și infecții bacteriene.

Ultima rezoluție a cercetării doctorale implică crearea unui pansament inedit care combină două caracteristici esențiale: proprietăți antimicrobiene pentru prevenirea sau combaterea infecției și eliberarea controlată de oxigen, care oferă în mod colectiv cel mai favorabil mediu pentru promovarea vindecării rănilor cronice. Proprietățile antibacteriene ale pansamentului sunt oferite prin utilizarea nanoparticulelor de argint, care au fost sintetizate folosind o metodă microfluidică ce implică utilizarea unui cip în formă de cruce cu trei canale de intrare. Pe baza constatărilor studiului anterior, a fost utilizată aceeași configurație de sinteză, cu aceiași parametri ai pompei exprimați în rotații pe minut (RPM). Diferența în acest studiu a fost utilizarea acidului ascorbic ca agent reducător și adăugarea de polivinilpirolidonă (PVP) în soluția precursoră de argint pentru a îmbunătăți stabilitatea și eficiența nanoparticulelor. Au fost obținute și analizate patru probe de nanoparticule de argint prin următoarele tehnici: XRD, SEM, TEM, DLS. Similar studiului anterior, o singură probă (S(15_15)) de nanoparticule de argint a fost selectată dintre cele patru opțiuni disponibile, demonstrând caracteristicile optime pentru aplicația specifică în cauză. Funcția de eliberare a oxigenului a pansamentului este asociată cu utilizarea nanoparticulelor de peroxid de calciu (CaO_2) cu acid tanic (TA). În acest sens, a fost efectuată o metodă de sinteză prin precipitare pentru a obține nanoparticule de $\text{CaO}_2@TA$ pornind de la o soluție de etanol cu adiție de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ și TA, urmată de adăugarea de NH_3 și procedura de picurare a soluției de H_2O_2 (35%). Un proces de sonicare a fost aplicat soluției finale, iar apoi reacția completă a fost lăsată să aibă loc în timpul nopții la temperatura ambiantă. În plus, materialul a fost supus spălării cu etanol prin centrifugare consecutivă, iar apoi nanoparticulele au fost uscate la 60 °C și caracterizate prin analiză XRD, FTIR, SEM, TEM, DLS. Următorul pas a fost obținerea formulărilor de tip hidrogel pe bază de alginat pornind de la hidrogelul control (Alg) pentru a compara fiecare caracteristică individuală a pansamentelor. Nanoparticulele au fost încorporate separat în matricea de alginat, rezultând două pansamente distincte: unul care conține nanoparticule de argint, proiectat ca Alg_S(15_15), și altul care conține nanoparticule de peroxid de calciu tanilat, notat ca

Alg_CaO₂@TA. Formula finală de pansament, care depășește funcțiile de bază, integrează nanoparticulele de argint și peroxid de calciu tanilat în matricea de alginat, oferind un pansament dublu funcțional care combină beneficiile ambelor tipuri de nanoparticule. Hidrogelurile au fost analizate folosind diferite tehnici, inclusiv SEM, FTIR, spectroscopie UV-Vis și investigarea ratelor de gonflare și degradare. În plus, au fost efectuate evaluări microbiologice și biologice pentru a confirma aspectele cheie ale proprietăților și comportamentului hidrogelurilor. Rezultatele datelor din difracția de raze X pentru probele de nanoparticule de argint confirmă argintul ca singura fază obținută, conform bazei de date PDF-ICDD, precum și caracterul intens cristalin. Dimensiunea medie determinată a cristalitului a fost de aproximativ 21 nm pentru fiecare dintre cele patru probe de nanoparticule de argint. Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) indică influența acidului ascorbic fiind obținute nanoparticule de argint (cu dimensiuni cuprinse între 27 și 49 de nanometri) cu un aranjament particular al acestora, agregate sub formă de sfere micronice (diametre cuprinse între 168 și 235 nanometri). Morfologia nanoparticulelor este influențată atât de acidul ascorbic cât și de PVP în timpul procesului de reducere a argintului. Microscopia TEM susține informațiile obținute prin analiza SEM, evidențiind aranjarea nanoparticulelor mici în sfere individuale de dimensiuni micronice. Proba S(15_15) prezintă sfere bine definite cu uniformitate dimensională, comparativ cu celelalte probe analizate care prezintă mici defecte conformaționale. Potențialul zeta a fost măsurat prin tehnica DLS și, astfel, a fost stabilită sarcina negativă a nanoparticulelor ce prezintă stabilitate moderată în lichid. Diametrul hidrodinamic exprimat în nanometri a fost în concordanță cu tendința de aglomerare a nanoparticulelor și rezultatele microscopiei electronice. Prin comparația rezultatelor obținute pe cele patru probe de argint, a fost nominalizată proba S(15_15) pentru a fi utilizată în dezvoltarea de pansamente cu proprietăți antimicrobiene. În continuare sunt prezentate rezultatele în urma caracterizării nanoparticulelor de CaO₂@TA, începând cu identificarea fazei prin analiza XRD și a grupurilor funcționale prin metoda FTIR. Ambele rezultate ale analizei au demonstrat obținerea cu succes a CaO₂@TA prin difractograma asociată cu faza unică de peroxid de calciu, conform bazei de date PDF-ICDD și caracteristica benzii vibraționale pentru O-Ca-O la ~517 cm⁻¹. Datele SEM indică faptul că particulele au o morfologie sferică cu o dimensiune medie de 153,11 ± 3,36 nanometri și identificarea elementară a calciului și oxigenului prin modulul EDS. În plus, structura policristalină și forma sferică a nanoparticulelor CaO₂@TA distribuite uniform într-o fază de acid tanic, sunt confirmate de datele microscopiei TEM. De asemenea, au fost efectuate măsurători

ale nanoparticulelor, avînd în vedere rezoluția mai bună a microscopiei TEM, fiind obținută o dimensiune medie de particule de 122 nm. Măsurătorile diametrului hidrodinamic și potențialul zeta ale particulelor indică faptul că acestea au o sarcină negativă și o valoare medie a potențialului zeta de aproximativ -16,48 milivolți. Diametrul hidrodinamic mediu a particulelor este de aproximativ 393,2 nanometri. Timp de cinci zile, a fost observată vizual activitatea de oxigenare a nanoparticulelor CaO₂@TA din PBS la două valori distincte ale pH-ului: 6 și 7,4. Bulele de oxigen au fost identificate în ambele condiții de pH din primele 10 minute, sugerînd capacitatea de eliberare a oxigenului. Analiza FTIR a fost utilizată pentru a examina toate hidrogelurile, alginatul servind ca matrice principală ce include nanoparticule de argint și nanoparticule de peroxid de calciu tanilat atât individual cât și în aceeași formulare. Spectrele rezultate prezintă un aspect în mare parte similar datorită compoziției pe bază de alginat asociat grupărilor carbonil și carboxil, dar și prezența nanoparticulelor de CaO₂@TA prin identificarea grupării O – Ca – O. Microscopia SEM pune în evidență structura poroasă a hidrogelurilor și îndică uniformitatea distribuirii nanoparticulelor individuale de S(15_15) și CaO₂@TA în matricea de alginat. Această constatare a fost observată în mod constant și în eșantionul Alg_S_O. Folosind modulul EDS, a fost examinată compoziția elementală, remarcată prin prezența argintului, calciului, oxigenului și sodiului. În urma evaluării estimative a capacității de gonflare a hidrogelurilor în interacțiunea cu soluția de SBF, a fost concluzionat faptul că toate probele au prezentat rata de gonflare dependentă de timp, cu valori peste 100% înregistrare pentru toate probele în timpul fazei de testare. Metoda Fenton a fost aplicată pentru a evalua cantitatea de eliberare cinetică de H₂O₂ în condiții acide (pH 6) folosind o arhitectură stratificată de discuri de PMMA acoperite cu un strat subțire de hidrogel Alg_S_O. Rezultatele spectroscopiei UV-Vis au fost obținute din minut în minut timp de 8,5 ore. În primele minute a fost înregistrată o concentrație inițială de aproximativ 3,5 mg/L, iar după două ore, concentrația a rămas stabilă în intervalul 5 – 5,5 mg/L, fără variații semnificative pe toată durata. Următoarele rezultate se bazează pe evaluarea din punct de vedere antimicrobian al pansamentelor în ceea ce privește capacitatea lor de a inhiba formarea de biofilme monospecifice. Rezultatele indică în mod clar o scădere drastică a biofilmului bacterian oferit de hidrogelul Alg_S_O, în comparație cu alginatul control și cu fiecare tip hidrogel cu nanoparticule, de asemenea. După 48 de ore, a fost înregistrată o eradicare totală a biofilmului stafilococic, în timp ce inhibarea semnificativă a dezvoltării biofilmului a fost menținută pe tulpina de *Ps. aeruginosa*. Rezultatele indică în mod clar că efectul ambelor

tipuri de nanoparticule simultan duc la o îmbunătățire semnificativă a activității antimicrobiene, evidențiind beneficiile sinergice ale utilizării acestor două tipuri de nanoparticule împreună. Biocompatibilitatea hidrogelurilor și capacitate de stimulare a proliferării celulare au fost testate în contact cu linia de keratinocite HaCaT după 24 și 48 de ore. Microscopia de fluorescență confirmă faptul că după 24 și 72 de ore celulele în contact cu hidrogelurile obținute prezintă morfologii sănătoase și densitate celulară mai ridicată în cazul probelor ce conțin nanoparticule, comparativ cu proba control. Biocompatibilitatea probelor este confirmată și de rezultatul testului MTT, unde după 24 și 72 de ore se observă o creștere a viabilității celulare în special pentru proba Alg_S_O. De asemenea, a fost evaluată citotoxicitatea probelor prin măsurarea eliberării de LDH din keratinocite, așadar probele nu induc dezechilibre ale integrității membranei celulare fiind identificate niveluri scăzute de LDH, în special pentru proba Alg_S_O. Rezultate favorabile au fost obținute și în ceea ce privește analiza stresului oxidativ, cantitățile minime de producție de NO sugerează că materialele testate sunt necitotoxice, ceea ce indică faptul că nu dăunează celulelor keratinocite umane. Mai exact, formularea Alg_S_O nu prezintă semne de inducere a stresului celular în culturile de celule de keratinocite umane, demonstrând natura sa sigură și netoxică.

În concluzie, rezultatele cercetării tezei de doctorat au validat dezvoltarea și eficiența conceptelor inițiale, demonstrând faptul că prin combinarea materialelor comune, dar sintetizate prin metode avansate precum și atenția asupra alegerii unor sisteme performante este posibil să se creeze noi pansamente avansate și inteligente, cu proprietăți îmbunătățite. Rezultatele arată că sinergia dintre aceste materiale este crucială precum și metoda de sinteză, deoarece permite atingerea echilibrului și eficacității produsului final.

Cadre de cercetare stabilite pentru a facilita investigațiile ulterioare – Perspective

O perspectivă unificată asupra progresului cercetării în domeniu este să îmbrățișeze o abordare holistică care se bazează pe punctele forte ale metodologiilor interdisciplinare, inclusiv ingineria chimică, biologia, matematica și electronica. Expertiza în inginerie chimică este esențială pentru înțelegerea proprietăților subiacente ale materialelor, inclusiv a caracteristicilor lor fizice și chimice, și pentru dezvoltarea ideilor inovatoare care depășesc standardele actuale. Prin integrarea perspectivelor din

biologie și biologie moleculară, cercetătorii pot dezvolta o înțelegere mai profundă a interacțiunilor și mecanismului celulelor pielii, permițând identificarea declanșatorilor cheie care pot fi exploatați pentru a induce schimbări ca răspuns la condițiile severe experimentate la nivelul pielii. Precizia matematicii, similară cu cea a chimiei, permite cercetătorilor să obțină rezultate precise și fiabile, chiar dacă se întâlnesc erori minore. Oamenii de știință pot obține o înțelegere aprofundată a procesului de sinteză și a mecanismelor chimice implicate utilizând un cadru matematic, care le va oferi în cele din urmă o imagine cuprinzătoare a concluziei experimentului. Prin intersecția dintre electronică, chimie și biologie, cercetătorii pot crea senzori care pot fi inserați în pielea artificială, permițându-i să imite funcțiile senzoriale ale pielii umane. Aceasta include capacitatea de a detecta schimbările de temperatură, senzațiile de atingere și semnalele de durere, permițând dezvoltarea unor proteze și dispozitive medicale mai sofisticate.

Cercetarea efectuată pentru teza de doctorat a oferit o bază solidă pentru conceptualizarea direcțiilor viitoare realizabile, permițând o abordare mai informată și strategică a dezvoltării viitoare. Cercetarea noastră își propune să valorifice proprietățile de eliberare de oxigen ale hidrogelurilor prin dezvoltarea și testarea pansamentelor care conțin nanoparticule de MnO, MgO și CeO₂. În plus, vom investiga două alternative ecologice care utilizează alge marine cu capacități inerente de eliberare de oxigen și celule roșii din sânge, care au o capacitate dovedită de a elibera oxigen și sunt deja utilizate în medii medicale. Având în vedere importanța activității antimicrobiene în încurajarea vindecării cronice a rănilor, nanoparticulele de argint rămân cea mai promițătoare alegere dintr-o perspectivă multidisciplinară. Vom folosi platforme microfluidice cu design diferit și variabil, cu parametri de curgere reglabili, compoziții diverse ale soluției precursorare și diferiți agenți reducători și metode. De asemenea, se vor explora efectele diferitelor dimensiuni ale particulelor, agenților reducători și metodelor asupra activității antimicrobiene a nanoparticulelor de argint.

Lista de lucrări publicate:

Publicații ca prim autor:

1. **Bîrcă, A.C.**; Chircov, C.; Niculescu, A.G.; Hildegard, H.; Baltă, C.; Roșu, M.; Mladin, B.; Gherasim, O.; Vasile, B.S.; Grumezescu, A.M.; Andronescu E.; Hermenean A.O.; *H₂O₂-PLA-(Alg)₂Ca Hydrogel Enriched in Matrigel® Promotes Diabetic Wound Healing*. *Pharmaceutics* 2023, 15, 857.

Q1, I.F. = 5.4

2. **Bîrcă, A.C.**; Gherasim, O.; Niculescu, A.G.; Grumezescu, A.M.; Neacșu, I.A.; Chircov, C.; Vasile, B.S.; Oprea, O.C.; Andronescu E.; Stan, M.S.; Curuțiu, C.; Dițu, L.M.; Holban, A.M.; *A Microfluidic Approach for Synthesis of Silver Nanoparticles as a Potential Antimicrobial Agent in Alginate–Hyaluronic Acid-Based Wound Dressings*. International Journal of Molecular Sciences 2023, 24, 11466.

Q1, I.F. = 5.6

3. **Bîrcă, A.C.**; Gherasim, O.; Niculescu, A.G.; Grumezescu, A.M.; Vasile, B.S.; Mihaiescu, D.E.; Neacșu, I.A.; Andronescu E.; Trușcă, R.; Holban, A.M.; Hudiță, A.; Croitoru, G.A.; *Infection-Free and Enhanced Wound Healing Potential of Alginate Gels Incorporating Silver and Tannylated Calcium Peroxide Nanoparticles*. International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 5196.

Q1, I.F. = 5.6

Co-autor în publicații relevante temei de cercetare:

1. Stoica (Oprea), A.E.; **Bîrcă, A.C.**; Pițigoi (Pandel) M.L.; Grumezescu A.M.; Vasile, B.S.; Iordache, F.; Ficăi, A.; Andronescu, E.; Nanostructured zinc oxide for wound dressings. U.P.B. Scientific Buletin – Series B: Chemistry and Materials Sciences 2024, 86, 2.
2. Puiu, R.A., **Birca, A.C.**, Grumezescu, V., Duta, L., Oprea, O.C., Holban, A.M., Hudiță, A., Gălățeanu, B., Balaure, P.C., Grumezescu, A.M., Andronescu, E.; Multifunctional Polymeric Biodegradable and Biocompatible Coatings Based on Silver Nanoparticles: A Comparative In Vitro Study on Their Cytotoxicity towards Cancer and Normal Cell Lines of Cytostatic Drugs versus Essential-Oil-Loaded Nanoparticles and on Their Antimicrobial and Antibiofilm Activities. Pharmaceutics 2023, 15, 1882.
3. Stoica, A.E., Albuleț, D., **Bîrcă, A.C.**, Iordache, F., Ficăi, A., Grumezescu, A.M., Andronescu, E., Marinescu, F., Holban, A.M.; Electrospun Nanofibrous Mesh

Based on PVA, Chitosan, and Usnic Acid for Applications in Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 11037.

4. Chircov, C., **Bîrcă, A.C.**, Vasile, B.S., Oprea, O.C., Huang, K.S., Grumezescu, A.M.; Microfluidic Synthesis of -NH₂- and -COOH-Functionalized Magnetite Nanoparticles. *Nanomaterial* 2022, 12, 3160.
5. Spirescu, VA., Şuhan, R., Niculescu, A.G., Grumezescu, V., Neguţ, I., Holban, A.M., Oprea, O.C., **Birca, A.C.**, Vasile, B.S., Grumezescu, A.M., Bejenaru, L.E., Mogoşsanu G.D., Biofilm-resistant nanocoatings based on ZnO nanoparticles and linalool. *Nanomaterials* 2021, 11, 2564.
6. Rayyif, SMI., Mohammed, HB., Curutiu, C., **Birca, A.C.**, Grumezescu, AM., Vasile, BS., Ditu, LM., Lazar, V., Chifiriuc, MC., Mihaescu, G., Holban, AM.; ZnO Nanoparticles-Modified Dressings to Inhibit Wound Pathogens. *Materials* 2021, 14, 3084.
7. Gherasim, O., Popescu, RC., Grumezescu, V., Mogosanu, GD., Mogoanta, L., Iordache, F., Holban, AM., Vasile, BS., **Birca, A.C.**, Oprea, OC., Grumezescu, AM., Andronescu, E.; MAPLE Coatings Embedded with Essential Oil-Conjugated Magnetite for Anti-Biofilm Applications. *Materials* 2021, 14, 1612.
8. Chircov, C., **Bîrcă, A.C.**, Grumezescu, A.M.; Vasile, B.S., Oprea, O.C., Nicoară, A.I., Yang, C.H., Huang, K.S., Andronescu, E.; Synthesis of magnetite nanoparticles through a lab-on-chip device. *Materials* 2021, 14, 5906.
9. Niculescu, AG., Chircov, C., **Birca, AC.**, Grumezescu, AM.; Nanomaterials Synthesis through Microfluidic Methods: An Updated Overview. *Nanomaterials* 2021, 11, 864.
10. Niculescu, AG., Chircov, C., **Birca, AC.**, Grumezescu, AM.; Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 2011.
11. Gherasim, O., Puiu, RA., **Birca, AC.**, Burdusel, AC., Grumezescu, AM.; An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. *Nanomaterials* 2020, 10, 2318.
12. Chircov, C., **Birca, AC.**, Grumezescu, AM., Andronescu, E.; Biosensors-on-Chip: An Up-to-Date Review. *Molecules* 2020, 25, 6013.
13. Vasile, BS., **Birca, AC.**, Musat, MC., Holban, AM.; Wound Dressings Coated with Silver Nanoparticles and Essential Oils for The Management of Wound Infections. *Materials* 2020, 13, 1682.

Participarea la conferințe în timpul stagiului de doctorat:

1. Cross-shape Microfluidic Platform for Silver Nanoparticles: Synthesis Focused on Alginate Wound Dressings; **Alexandra Cătălina Bîrcă**, Adelina Gabriela Niculescu, Alexandru Mihai Grumezescu, Bogdan Stefan Vasile, Ecaterina Andronescu; The 5th Conference of the Romanian Electron Microscopy Society – C.R.E.M.S (2023)
2. Solid Lipid Nanoparticles for acne treatment; **Alexandra Cătălina Bîrcă**, Luca Huștiuc, Alexandru Mihai Grumezescu, Cristina Chircov, Bogdan Ștefan Vasile, Alina Maria Holban, Ecaterina Andronescu; 22nd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering – RICCCCE 22. (2022)
3. Collagen Wound Dressings Loaded with CuO- and ZnO-based Microspheres; **Alexandra Cătălina Bîrcă**, Mihai Adrian Minculescu, Alexandru Mihai Grumezescu, Cristina Chircov, Ecaterina Andronescu; Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2022 – Summer Edition. (2022)
4. Synthesis of Nanoparticles through Lab-on-Chip Devices; **Alexandra Cătălina Bîrcă**, Alexandru Mihai Grumezescu, Ecaterina Andronescu; Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2021 – Winter Edition. (2021)
5. Regenerative medicine testing models; **Alexandra Cătălina Bîrcă**, Ecaterina Andronescu, Alexandru Mihai Grumezescu; Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2020 (2020)

References

1. Mihai, M.M.; Dima, M.B.; Dima, B.; Holban, A.M. Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. *Materials* **2019**, *12*, 2176.
2. Pormohammad, A.; Monych, N.K.; Ghosh, S.; Turner, D.L.; Turner, R.J. Nanomaterials in Wound Healing and Infection Control. *Antibiotics* **2021**, *10*, 473.
3. Dabiri, G.; Damstetter, E.; Phillips, T. Choosing a wound dressing based on common wound characteristics. *Advances in wound care* 2016, *5*, 32-41.
4. Arif, M.M.; Khan, S.M.; Gull, N.; Tabish, T.A.; Zia, S.; Khan, R.U.; Awais, S.M.; Butt, M.A. Polymer-based biomaterials for chronic wound management: Promises and challenges. *International Journal of Pharmaceutics* 2021, *598*, 120270.
5. Bužarovska, A.; Dinescu, S.; Lazar, A.D.; Serban, M.; Pircalabioru, G.G.; Costache, M.; Gualandi, C.; Avérous, L. Nanocomposite foams based on flexible biobased thermoplastic polyurethane and ZnO nanoparticles as potential wound dressing materials. *Materials Science and Engineering: C* 2019, *104*, 109893.
6. Kumar, A.; Sood, A.; Han, S.S. Poly (vinyl alcohol)-alginate as potential matrix for various applications: A focused review. *Carbohydrate Polymers* 2022, *277*, 118881.
7. Zhang, K.; Liu, Y.; Shi, X.; Zhang, R.; He, Y.; Zhang, H.; Wang, W. Application of polyvinyl alcohol/chitosan copolymer hydrogels in biomedicine: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2023, 125192.
8. Teodorescu, M.; Bercea, M.; Morariu, S. Biomaterials of poly (vinyl alcohol) and natural polymers. *Polymer Reviews* 2018, *58*, 247-287.
9. Wang, M.; Bai, J.; Shao, K.; Tang, W.; Zhao, X.; Lin, D.; Huang, S.; Chen, C.; Ding, Z.; Ye, J. Poly (vinyl alcohol) hydrogels: The old and new functional materials. *International Journal of Polymer Science* 2021, *2021*, 1-16.
10. Feiz, S.; Navarchian, A.H.; Jazani, O.M. Poly (vinyl alcohol) membranes in wound-dressing application: microstructure, physical properties, and drug release behavior. *Iranian Polymer Journal* 2018, *27*, 193-205.
11. Halima, N.B. Poly (vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. *RSC advances* 2016, *6*, 39823-39832.
12. Lee, C.; Lee, Y. Collagen-based formulations for wound healing applications. *Wound healing biomaterials* 2016, 135-149.
13. Lo, S.; Fauzi, M.B. Current update of collagen nanomaterials—fabrication, characterisation and its applications: A review. *Pharmaceutics* 2021, *13*, 316.

14. Sundar, G.; Joseph, J.; John, A.; Abraham, A. Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2021, 70, 593-604.
15. Mbese, Z.; Alven, S.; Aderibigbe, B.A. Collagen-based nanofibers for skin regeneration and wound dressing applications. *Polymers* 2021, 13, 4368.
16. Huang, H.; Dong, Z.; Ren, X.; Jia, B.; Li, G.; Zhou, S.; Zhao, X.; Wang, W. High-strength hydrogels: Fabrication, reinforcement mechanisms, and applications. *Nano Research* 2023, 16, 3475-3515.
17. Borda, L.J.; Macquhae, F.E.; Kirsner, R.S. Wound dressings: a comprehensive review. *Current Dermatology Reports* 2016, 5, 287-297.
18. Ahmad, N. In Vitro and In Vivo Characterization Methods for Evaluation of Modern Wound Dressings. *Pharmaceutics* 2022, 15, 42.
19. Brumberg, V.; Astrelina, T.; Malivanova, T.; Samoilov, A. Modern wound dressings: Hydrogel dressings. *Biomedicines* 2021, 9, 1235.
20. Hawthorne, B.; Simmons, J.K.; Stuart, B.; Tung, R.; Zamierowski, D.S.; Mellott, A.J. Enhancing wound healing dressing development through interdisciplinary collaboration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2021, 109, 1967-1985.
21. Yang, K.; Han, Q.; Chen, B.; Zheng, Y.; Zhang, K.; Li, Q.; Wang, J. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *International Journal of Nanomedicine* 2018, 2217-2263.
22. Berthet, M.; Gauthier, Y.; Lacroix, C.; Verrier, B.; Monge, C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends in Biotechnology* 2017, 35, 770-784, doi:10.1016/j.tibtech.2017.05.005.
23. Ogunsona, E.O.; Muthuraj, R.; Ojogbo, E.; Valerio, O.; Mekonnen, T.H. Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. *Applied Materials Today* 2020, 18, 100473, doi:<https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100473>.
24. Nqakala, Z.B.; Sibuyi, N.R.S.; Fadaka, A.O.; Meyer, M.; Onani, M.O.; Madiehe, A.M. Advances in Nanotechnology towards Development of Silver Nanoparticle-Based Wound-Healing Agents. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 11272.
25. Gherasim, O.; Puiu, R.A.; Bîrcă, A.C.; Burduşel, A.-C.; Grumezescu, A.M. An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. *Nanomaterials* 2020, 10, 2318.
26. Mikhailova, E.O. Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *Journal of Functional Biomaterials* 2020, 11, 84.

27. Yin, I.X.; Zhang, J.; Zhao, I.S.; Mei, M.L.; Li, Q.; Chu, C.H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine* 2020, 15, 2555-2562, doi:10.2147/ijn.S246764.
28. Yang, Z., Chen, H., Yang, P., Shen, X., Hu, Y., Cheng, Y., ... & Zhang, Z. (2022). Nano-oxygenated hydrogels for locally and permeably hypoxia relieving to heal chronic wounds. *Biomaterials*, 282, 121401.
29. Falanga, V., Isseroff, R. R., Soulika, A. M., Romanelli, M., Margolis, D., Kapp, S., ... & Harding, K. (2022). Chronic wounds. *Nature Reviews Disease Primers*, 8(1), 50.
30. Firlar, I., Altunbek, M., McCarthy, C., Ramalingam, M., & Camci-Unal, G. (2022). Functional hydrogels for treatment of chronic wounds. *Gels*, 8(2), 127.
31. Las Heras, K., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., & Hernandez, R. M. (2020). Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions. *Journal of controlled release*, 328, 532-550.
32. Haller, H. L., Sander, F., Popp, D., Rapp, M., Hartmann, B., Demircan, M., ... & Kamolz, L. P. (2021). Oxygen, pH, lactate, and metabolism—How old knowledge and new insights might be combined for new wound treatment. *Medicina*, 57(11), 1190.
33. Shen, H., Ma, Y., Zhang, C., Qiao, Y., Chen, J., & Sun, F. (2024). Microneedle Patch Loaded with Calcium Peroxide Nanoparticles for Oxygen Healing and Biofilm Inhibition in Diabetic Wound Healing. *ACS Applied Nano Materials*.
34. Shasha, Z., Chuanchuan, H., & Yawen, Z. (2024). The Progress and Prospect of calcium peroxide nanoparticles in antibacterial activity. *Colloid and Interface Science Communications*, 61, 100793.
35. Qi, L., Huang, Y., Liu, Z., Jiang, Y., Du, M., Liu, L., ... & Zhang, L. (2023). Electrospun Nano-CaO₂/Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers and Their Wound Healing Application through In Situ Supplying H₂O₂. *Macromolecular Materials and Engineering*, 308(4), 2200541.
36. Han, X., Ju, L. S., & Irudayaraj, J. (2023). Oxygenated wound dressings for hypoxia mitigation and enhanced wound healing. *Molecular pharmaceutics*, 20(7), 3338-3355.