

**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești**



**STUDII PRIVIND CARACTERIZAREA FUNCȚIONALĂ PENTRU
NOI DERIVAȚI DE CHITOSAN**

**TEZĂ DE DOCTORAT
Rezumat**

**Doctorand,
Iuliana Florina Costea(Nour)**

**Conducător științific,
Prof. dr. habil. Geta Cârâc**

**Seria I 5: Ingineria Materialelor nr. 20
GALAȚI 2023**

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT (REZUMAT)

**STUDII PRIVIND CARACTERIZAREA FUNCȚIONALĂ PENTRU NOI
DERIVAȚI DE CHITOSAN**

Doctorand

Iuliana Florina Costea (Nour)

Președinte

Prof. Dr. Ing. Cătălin Fetecău

Conducător științific

Prof. Dr. habil. Geta Cârâc

Referenți Științifici

Prof. Dr. Ing. Petrică Vizureanu

CS I. Dr. habil Luminița Marin

Prof. Dr. habil Rodica Mihaela Dinică

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul **ȘTIINȚE INGINEREȘTI**

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8: **Ingineria sistemelor**

Domeniul **ȘTIINȚE ECONOMICE**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul **ȘTIINȚE UMANISTE**

Seria U 1: **Filologie-Engleză**

Seria U 2: **Filologie-Română**

Seria U 3: **Istorie**

Seria I 5: Ingineria Materialelor nr 20

GALAȚI 2023

MULȚUMIRI

Elaborarea și conceperea acestei teze de doctorat ar fi fost imposibilă fără ajutorul, sprijinul și îndrumarea unor oameni deosebiți, care prin înaltul grad profesional și dăruire, au contribuit la formarea mea ca cercetător și om, insuflându-mi curajul de a merge mai departe pe calea științei.

Aduc alese mulțumiri și deosebită recunoștință coordonatorului științific, Doamnei Profesor univ. dr. habil. Geta CÂRĂC, pentru suportul, răbdarea, înțelegerea deplină oferită și permanenta îndrumare în programul doctoral și elaborarea tezei, Doamna Profesor oferindu-mi încrederea de a aprofunda această temă indiferent de impedimente, încurajându-mă spre a continua cercetările inițiate și a finaliza cu succes studiile doctorale.

Doresc să îmi exprim recunoștința și profundul respect pentru președintele comisiei, Domnului Prof. Dr. Ing. Cătălin Fetecău, pentru acceptare și aprobarea comisiei de referenți ai tezei, Domnului Prof. Dr. Ing. Petrică Vizureanu și CS I. Dr. habil Luminița Marin, pentru evaluarea tezei și nu în ultimul rând Doamnei Prof. univ. dr. habil. Rodica Mihaela Dinică (și membru al comisiei de îndrumare) pentru sfaturile și sugestiile oferite pe parcursul anilor doctorali.

Deasemenea exprim recunoștință și respect Doamnei Prof. univ. dr. Lidia Benea și Conf. univ. dr. Viorica Barbu, dar și Doamnei Lector univ. dr. Leontina Gurgu, pentru întregul suport în programul doctoral. Totodată mulțumesc echipei de cercetare din Universitatea Dunărea de Jos din Galați, din Departamentul de Știința și Ingineria Materialelor cât și Departamentului de Chimie Fizică și Mediu, pentru colaborarea sinceră și deschisă pentru experimente și în vederea finalizării tezei de doctorat. Mulțumiri speciale și o deosebită recunoștință aduc și doamnei chimist – tehnician Rodica Gabriela Melinte, pentru sprijinul permanent acordat, încrederea totală, contribuind astfel la evoluția mea profesională și personală.

Pe această cale le mulțumesc colegelor mele, dr. Mihaela Cudalbeanu pentru ajutorul ei necondiționat, dr. Nicoleta Simionescu, drd. Andreea Veronica Dediu și dr. Ana Cazanevscaia pentru sprijinul moral și științific oferit în perioada desfășurării studiilor doctorale.

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această etapă din viața mea profesională familiei mele, care mi-a oferit un permanent suport fizic și moral și a condus la formarea unei persoane, ce a reușit să evolueze frumos într-o lume a cunoașterii.

Respectul și mulțumirea mea, se îndreaptă către soțul meu, care cu înțelegere și iubire m-a încurajat pe parcursul acestor ani de studiu.

Cu deosebită stimă și respect,
Drd. Iuliana Florina Costea (Nour)

CUPRINS (teză)

Introducere	1
Listă figuri	viii
Listă tabele	xii
Listă scheme	xiii
Simboluri și abrevieri	xiv

PARTE DOCUMENTARĂ

1. STUDII PRIVIND OBȚINEREA DE MATERIALE FUNCȚIONALIZATE PE BAZĂ DE CHITOSAN

1.1. Introducere	7
1.2. Considerații generale privind proprietățile chitosanului ca biomateriale	9
10 Parametrii importanți pentru chitosan	10
14 Proprietățile biologice ale chitosanului	14
15 Proprietățile antimicrobiene ale chitosanului	15
1.3. Biomateriale de importanță actuală, conținând derivați de chitosan	15
1.4. Derivați de chitosan ce conțin compuși cu azot în structură	20
1.5. Alte materiale pe bază de chitosan și aplicațiile importante ale acestora	22
1.6. Concluzii	25
Bibliografie	25

2. VILOGENI, COMPUȘI HETEROCICLICI, DIN CLASA 4,4'-DIPIRIDILULUI

2.1. Considerații generale	35
2.2. Viologenii, compuși organici de interes în obținerea de noi materiale	35
2.3. Caracteristici ale sărurilor dicuaternare de 4,4'-dipiridiliu	41
2.4. Derivați de chitosan conținând săruri cuaternare de amoniu	42
2.5. Concluzii	44
Bibliografie	44

PARTE EXPERIMENTALĂ

3. DERIVAȚI AI CHITOSANULUI OBȚINUȚI PRIN COMPLEXARE CU IONI METALICI

3.1. Considerații generale	48
3.2. Obiective principale	49
3.3. Complecși de absorție ai ionului Cu(II) și Zn (II) cu chitosan	
3.3.1. Materiale și metode	50
3.3.2. Rezultate și discuții	52
3.4. Complecși de absorție ai ionului Fe (III) cu chitosan	
3.4.1. Materiale și metode	58
3.4.2. Rezultate și discuții	60
3.5. Concluzii	67
Bibliografie	68

4. CERCETĂRI PRIVIND FUNCȚIONALIZAREA CHITOSANULUI CU COMPUȘI N-HETEROCICLICI, ÎN SOLUȚIE APOASĂ ȘI FACTORI DE INFLUENȚĂ

4.1. Introducere	71
4.2. Obiective principale	72
4.3. Studiu structural prin Spectroscopia în Infraroșu (FTIR) pentru selectarea de probe	
4.3.1. Materiale, sinteza în mediu apos și analiză structurală	72
4.3.2. Rezultate și discuții	75
4.4. Funcționalizarea chitosanului în mediu apos cu <i>dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu</i>	
4.4.1. Materiale și proceduri de sinteză	80
4.4.2. Metode de analiză și caracterizare structurală	82

4.4.3.	Analiza elementală a probelor cu derivați de chitosan CHS	83
4.4.4.	Factori de influență în procesul de sinteză a derivaților de chitosan CHS	84
4.4.4.1.	Influența timpului de contactare	84
4.4.4.2.	Influența temperaturii de sinteză	87
4.4.4.3.	Raportul de masă chitosan:sare cuaternară de dipiridiliu	87
4.4.5.	Caracterizarea structurală a derivaților de chitosan CHS	88
4.4.5.1.	Spectrele de difracție cu raze X (XRD)	88
4.4.5.2.	Evaluare structurală prin Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR)	89
4.5	Funcționalizarea pentru obținerea de noi derivați de chitosan cu diferite săruri dipiridilice în mediu apos	
4.5.1.	Materiale și procedură de sinteză	91
4.5.2.	Metode de analiză și caracterizare structurală	92
4.5.3.	Evaluarea unor caracteristici fizico-chimice	93
4.5.4.	Compoziția elementală la derivații de chitosan	95
4.5.5.	Evaluarea structurală prin Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR)	96
4.6.	Concluzii	98
	Bibliografie	100
5.	CERCETĂRI PRIVIND FUNCȚIONALIZAREA CHITOSANULUI CU SĂRURI DICUATERNARE N-HETEROCICILICE, ÎN MEDIU ACID	
5.1.	Introducere	104
5.2.	Obiective specifice	105
5.3.	Funcționalizarea chitosanului cu <i>dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu</i> și <i>dibromura de N,N'-difenacil 1,2- bis(4-piridil)etan</i>	
5.3.1.	Materiale și sinteza sărurilor cuaternare	105
5.3.2.	Procedeu experimental pentru sinteză de noi derivați de chitosan	106
5.3.3.	Tehnici și modalități de caracterizare a probelor	108
5.3.4.	Mecanismul de interacțiune	110
5.3.5.	Analiză elementală de carbon (C%) și azot (N%) a derivaților de chitosan	112
5.3.6.	Caracterizarea spectroelectrochimică prin UV-Vis	112
5.3.7.	Caracterizarea structurală prin spectroscopie FTIR	114
5.3.8.	Determinarea masei moleculare prin măsurători vâscozimetrice	117
5.3.9.	Evaluarea electrochimică a activității antioxidante prin potențial de circuit deschis (OCP) și voltametrie ciclică (CV)	118
5.3.10.	Evaluarea electrochimică prin voltametrie ciclică (CV) a <i>dibromurii de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu</i> în DMFA	122
5.3.11.	Analiza morfologică structurală prin microscopie electronică cu scanare (SEM)	124
5.4.	Evaluarea potențialului antibacterian al derivaților de chitosan cu <i>dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu</i> și <i>dibromura de N,N'-difenacil -1,2- bis(4-piridil)etan</i>	
5.4.1.	Inhibarea microorganismelor patogene	125
5.4.2.	Inhibarea microorganismelor nonpatogene	128
5.5	Evaluarea proprietăților fizico-chimice ale derivaților de chitosan cu săruri dipiridilice	
5.5.1.	Determinarea masei moleculare medii prin măsurători vâscozimetrice	130
5.5.2.	Caracterizare structurală prin spectroscopie FTIR a derivatului de chitosan funcționalizat CHS3	137
5.5.3.	Gradul de deacetilare a derivatului de chitosan funcționalizat CHS3	139
5.5.4.	Solubilitatea probelor derivaților de chitosan funcționalizat	142

5.5.5. Gradul de umiditate (umflare)	142
5.6. Concluzii	143
Bibliografie	144
6. HIDROGELURI CU CHITOSAN CA BIOMATERIALE PENTRU APLICAȚII MEDICALE	
6.1. Considerații generale privind hidrogelurile	151
6.2. Tipologii ale hidrogelurilor de chitosan cu diverși compuși	152
6.3. Aplicații biomedicale pentru hidrogelurile pe bază de chitosan	157
6.4. Obținerea de hidrogeluri pe bază de chitosan cu săruri cuaternare de dipiridiliu	158
6.4.1. Metode de obținere	158
6.4.2. Rezultate și discuții	159
6.4.2.1. Investigarea structurilor hidrogelurilor prin spectroscopiei FTIR	160
6.4.2.2. Evaluarea modificărilor morfologice prin SEM	161
6.4.2.3. Testarea activității antimicrobiene	162
6.5. Concluzii	163
Bibliografie	164
7. Concluzii finale și contribuții originale	172
Perspective de continuare a cercetărilor	176
Diseminarea rezultatelor	177

TABLE OF CONTENTS

Introduction	1
List of figures	viii
List of tables	xii
List of schemes	xiii
Symbols and abbreviations	xiv

DOCUMENTARY PART

1. STUDIES ON THE OBTAINING OF FUNCTIONALIZED MATERIALS BASED ON CHITOSAN

1.1. Introduction	7
1.2. General considerations regarding the properties of chitosan as biomaterials	9
1.2.1. Important parameters for chitosan	10
1.2.2. Biological properties of chitosan	14
1.2.3. Antimicrobial properties of chitosan	15
1.3. Biomaterials of current importance, containing chitosan derivatives	15
1.4. Chitosan derivatives containing nitrogen compounds in structure	20
1.5. Other chitosan-based materials and their important applications	22
1.6. Conclusions	25
Bibliography	25

2. VILOGENES, HETEROCYCLIC COMPOUNDS, FROM 4,4', DIPYRIDYL CLASS

2.1. Overview	35
2.2. Viologenes, organic compounds of interest in obtaining new materials	35
2.3. Characteristics of diquateryary 4,4'-dipyridylum salts	41
2.4. Chitosan derivatives containing quaternary ammonium salts	42
2.5. Conclusions	44
Bibliography	44

EXPERIMENTAL PART

3. CHITOSAN DERIVATIVES OBTAINED BY COMPLEXING WITH METALLIC IONS

3.1. General considerations	48
3.2. Main objectives	49
3.3. Absorption complexes of Cu(II) and Zn(II) ion with chitosan	
3.3.1. Materials and methods	50
3.3.2. Results and discussions	52
3.4. Absorption complexes of Fe (III) with chitosan	
3.4.1. Materials and methods	58
3.4.2. Results and discussions	60
3.5. Conclusions	67
Bibliography	68

4. RESEARCH ON THE FUNCTIONALIZATION OF CHITOSAN WITH COMPOUNDS N-HETEROCYCLIC, IN AQUEOUS SOLUTION AND INFLUENCE FACTORS

4.1. Introduction	71
4.2. Main objectives	72
4.3. Structural study by Infrared Spectroscopy (FTIR) for sample selection	
4.3.1. Materials, aqueous synthesis and structural analysis	72
4.3.2. Results and discussions	75
4.4. Functionalization of chitosan in aqueous medium with N,N'-diphenacyl-4,4'-dipyridylum dibromide	
4.4.1. Materials and syntesis stages	80
4.4.2. Structural analysis and characterization methods	82

4.4.3.	Elemental analysis of CHS chitosan derivative samples	83
4.4.4.	Influencing factors in the synthesis process of CHS chitosan derivatives	84
4.4.4.1.	Influence of contacting time	84
4.4.4.2.	Influence of temperature	87
4.4.4.3.	Mass ratio of quaternary dipyriddy salt	87
4.4.5.	Structural characterization of CHS chitosan derivatives	88
4.4.5.1.	X-ray diffraction (XRD) spectra (XRD)	88
4.4.5.2.	Structural evaluation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	89
4.5	Functionalization to obtain new chitosan derivatives with different dipyriddy salts in aqueous medium	
4.5.1.	Materials and synthesis method	91
4.5.2.	Structural analysis and characterization methods	92
4.5.3.	Evaluation of some physical-chemical characteristics	93
4.5.4.	Elemental composition of chitosan derivatives	95
4.5.5.	Structural Evaluation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	96
4.6.	Conclusions	98
	Bibliography	100
5. RESEARCH ON THE FUNCTIONALIZATION OF CHITOSAN WITH DIQUATERNARY N-HETEROCYCLIC SALTS, IN ACID MEDIUM		
5.1.	Introduction	104
5.2.	Main objectives	105
5.3.	Functionalization of chitosan with <i>N,N'</i> -diphenacyl-4,4'-dipyridylium dibromide and <i>N,N'</i> -diphenacyl 1,2-bis(4-pyridyl)ethane dibromide	
5.3.1.	Materials and synthesis of quaternary salts	105
5.3.2.	Experimental technique for the synthesis of new chitosan derivatives	106
5.3.3.	Techniques and ways of characterization of samples	108
5.3.4.	The mechanism of interaction	110
5.3.5.	Carbon (C%) and nitrogen (N%) elemental analysis of chitosan derivatives	112
5.3.6.	Spectroelectrochemical characterization by UV-Vis	112
5.3.7.	Structural characterization by FTIR spectroscopy	114
5.3.8.	Determination of molecular mass by viscometric measurements	117
5.3.9.	Electrochemical evaluation of antioxidant activity by open circuit potential (OCP) and cyclic voltammetry (CV)	118
5.3.10.	Cyclic voltammetry (CV) electrochemical evaluation of <i>N,N'</i> -diphenacyl-4,4'-dipyridylium dibromide in DMFA	122
5.3.11.	Structural Morphological Analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM)	124
5.4.	Evaluation of the antibacterial potential of chitosan derivatives with <i>N,N'</i> -diphenacyl-4,4'-dipyridylium dibromide and <i>N,N'</i> -diphenacyl-1,2-bis(4-pyridyl)ethane dibromide	
5.4.1.	Inhibition of pathogenic microorganisms	125
5.4.2.	Inhibition of non-pathogenic microorganisms	128
5.5	Evaluation of physicochemical properties of chitosan derivatives with dipyriddy salts	
5.5.1.	Determination of average molecular mass by viscometric measurements	130
5.5.2.	Structural characterization by FTIR spectroscopy of the functionalized chitosan derivative CHS3	137
5.5.3.	Degree of deacetylation of the functionalized chitosan derivative CHS3	139
5.5.4.	Solubility of samples of functionalized chitosan derivatives	142

5.5.5. Degree of humidity (swelling)	142
5.6. Conclusions	143
Bibliography	144
6. HYDROGELS WITH CHITOSAN AS BIOMATERIALS FOR MEDICAL APPLICATIONS	
6.1. General considerations on hydrogels	151
6.2. Types of chitosan hydrogels with various compounds	152
6.3. Biomedical applications for chitosan-based hydrogels	157
6.4. Obtaining chitosan-based hydrogels with quaternary dipyrilidium salts	158
6.4.1. Method of obtaining	158
6.4.2. Results and discussions	159
6.4.2.1. Investigation of hydrogel structures by FTIR spectroscopy	160
6.4.2.2. Evaluation of morphological changes by SEM	161
6.4.2.3. Antimicrobial activity testing	162
6.5. Conclusions	163
Bibliography	164
7. Final conclusions and original contributions	172
Prospects for further research	176
Dissemination of results	177

INTRODUCERE

În tehnologiile moderne actuale este tot mai mare preocuparea pentru obținerea de noi produse și materiale smart și ecologice, care să răspundă nevoilor societății moderne în continuă schimbare și adaptate pentru un mediu prietenos.

Biomaterialele au reprezentat și vor reprezenta un interes aparte în multe ramuri de studiu datorită proprietăților de larg interes pe care le posedă, cum ar fi: biocompatibilitate și biodegradabilitate, non toxicitate, posibilitate de înglobare în medicamente transportoare cu scopul îmbunătățirii și prevenției sănătății populației.

Au fost studiați mulți polimeri în dezvoltarea de biomateriale de larg interes tehnic, însă chitosanul ocupă cu precădere unul din primele locuri după celuloză și poate fi utilizat cu succes în soluții, ca hidrogeluri și/sau nano/microparticule și cu diferite grade de deacetilare, cercetarea aducând mereu în atenție o gamă largă de noi materiale cu proprietăți biochimice personalizate.

Chitosanul este un biopolimer ce se poate obține din surse naturale, datorită proprietăților sale biochimice unice, cum ar fi biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, non-toxicitatea, capacitatea de a forma filme, membrane etc. oferă aplicații diverse, singur sau în derivați de chitosan cu aplicații biomedicale promițătoare, cum ar fi tehnici de microîncapsulare, în creșterea investigațiilor pentru livrarea de medicamente, compuși biologici și vaccinuri etc. [Ibrahim M.A. et al., 2023]. Datorită proprietăților sale antimicrobiene, chitosanul este în mod special un biomaterial promițător, ca utilitate, activitatea fiind legată de natura sa cationică, fiind un compus care se alchilează ușor cu mai mulți compuși chimici.

Chitosanul și derivații săi includ o varietate de substanțe fizico-chimice și biologice, cu proprietăți specifice și utilizări diverse (industria farmaceutică, aplicații biomedicale, stomatologie, industria alimentară, tratamente pentru ape reziduale, agrochimie, mediu și utilizări industriale). Deși sunt multe studii pe chitosan și derivații săi, examinarea unor modalități mai bune de a obține noi derivați funcționali, sunt încă strategii ce rămân de

interes, în special privind utilizarea biopolimerului ca matrice în dezvoltarea derivaților biologici ca agenți antimicrobieni pentru o creștere a eficienței și specificității sale.

Motivația personală în alegerea tematicii din programul doctoral a fost această abordare, o dorință de a contribui la studii de actualitate cu privire la dezvoltarea unor noi soluții pentru noi produse care să îmbunătățească sănătatea umană, creșterea solubilității chitosanului prin grefarea chimică a unor compuși cu grupări funcționale adecvate, în vederea obținerii de noi produși cu proprietăți antibacteriene îmbunătățite.

Din acest motiv, obiectivul principal al tezei de doctorat ("*Studii privind caracterizarea funcțională pentru noi derivați de chitosan*") a fost obținerea de noi produși, caracterizarea unor noi compuși și derivați de chitosan funcționalizat, având proprietăți specifice, care pot îndeplini și rol de biomateriale, precum hidrogelurile.

Cercetarea derulată în programul doctoral a avut următoarele obiective specifice:

- Obținerea și caracterizarea de compuși cu chitosan, folosind ionii metalici Cu (II), Zn(II) și respectiv Fe(III), studii privind noi complecși metalici, cu aplicații specifice.
- Sinteza și caracterizarea fizico-chimică și structurală a noilor derivați de chitosan folosind pentru funcționalizare unele săruri cuaternare 4,4'-dipiridiliu.
- Evaluarea influenței sărurilor cuaternare 4,4'-dipiridiliu selectate și a factorilor de sinteză, pentru realizarea de noi derivați de chitosan funcționalizat, care să prezinte proprietăți biologice eficiente, antioxidante și antibacteriene îmbunătățite, ce pot oferi soluții pentru aplicații medicale viitoare.

Astfel, teza de doctorat prin diversitatea unor studii aduce rezultate noi, care după cunoștința noastră sunt neraportate, privitoare la derivații de chitosan cu liganzi N-heterociclici, din clasa 4,4'-dipiridililor, săruri cuaternare atent selecționate.

Teza de doctorat intitulată "*Studii privind caracterizarea funcțională pentru noi derivați de chitosan*" cuprinde șase capitole principale, axate pe obiectivele de interes ale temei propuse în programul doctoral.

Primele două capitole reprezintă *partea de documentare*. Primul capitol (*Studii privind obținerea de materiale funcționalizate pe bază de chitosan*) prezintă stadiul actual al cercetării și este o sinteză din literatura de specialitate despre chitosan, polimerul cu aplicații remarcabile, diverse, și caracterizarea derivaților de chitosan, unele fiind despre biomateriale raportate, rolul și importanța acestora. Următorul capitol (*Viologeni, compuși heterociclici, din clasa 4,4'-dipiridilului*) se referă la compușii organici, N-heterociclici care sunt de mare interes actual în obținerea de materiale noi și în tehnologii revoluționare.

Partea experimentală a demersului științific este prezentată începând cu *capitolul al 3-lea (Derivați ai chitosanului obținuți prin complexare cu ioni metalici)*, care include pentru început, stadiul incipient din cadrul programului doctoral, primele sinteze de noi compuși pe bază de chitosan, complecșii de chitosan cu ioni metalici. Astfel, într-o primă etapă s-au sintetizat și caracterizat noi derivați, complecși de chitosan cu ionii Cu(II) și ionii Zn(II), apoi cu ionii Fe(III), din soluții, variind tehnica de obținere și factorii de influență în procesul de obținere: temperatura, pH-ul soluțiilor, timpul de contactare, raportul de masă între compuși, evaluând probele prin analiza spectrofotometrică (UV-VIS), structurală (FTIR), și morfologică (SEM) și prin studiu cinetic la ionii Fe(III) în mediul acid.

De la capitolul 4 sunt redată rezultatele cercetărilor proprii, contribuția personală originală referitoare la sinteza, compoziția chimică și proprietățile fizico-chimice, structurale și biologice pentru noile produse obținute, *noii derivați de chitosan funcționalizați, folosind compuși organici, din clasa 4,4'-dipiridilului*. Au fost obținute și caracterizate structural, săruri N-heterociclice, din clasa 4,4'-dipiridilului (viologeni), compuși organici de interes major pentru ingineria materialelor și tehnologii moderne, prin proprietățile lor specifice, cu reversibilitate redox, activitate antifungică, antibacteriană și activitate redox. Sărurile

sintetizate și utilizate în obținerea de noi derivați de chitosan au fost: *dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu și dibromura de N,N'-bis(p-nitro fenacil) -4,4'- dipiridiliu* care are două grupări NO₂ în plus față de prima sare. S-au sintetizat și săruri derivate de la 1,2-bis(4-piridil) etan precum *dibromura de N,N'-difenacil -1,2-bis(4-piridil) etan* și respectiv *dibromura de N,N' bis(p-nitro fenacil)-1,2-bis(4-piridil) etan*.

Capitolul 4 (Cercetări privind funcționalizarea chitosanului cu compuși N-heterociclici, în soluție apoasă și factori de influență) prezintă rezultatele cercetărilor privind funcționalizarea chitosanului cu aceste săruri cuaternare, compuși N-heterociclici, în soluție apoasă, și factorii de influență (timpul de contactare, temperatura de lucru, agitarea, raportul de masă dintre chitosan:sare) pentru sinteza noilor derivați de chitosan, caracterizare analitică și fizico-chimică, prin metode de analiză modernă de punere în evidență a structurilor produselor (UV-VIS, XRD, FTIR, SEM-EDX, voltametrie ciclică). Rezultate promițătoare au fost obținute pentru derivatul de chitosan cu *dibromura de N,N'-difenacil -4,4'-dipiridiliu*.

În *capitolul 5 (Cercetări privind funcționalizarea chitosanului cu săruri dicuaternare N-heterociclice, în mediu acid)* sunt prezentate cercetările privind funcționalizarea chitosanului cu aceleași săruri N-heterociclice, în mediu acid (acid acetic 2%), factorii de influență în sinteza noilor derivați de chitosan și metodele de caracterizare a materialelor, structurilor și proprietățile lor biologice împotriva patogenilor și bacteriilor, pentru a urmări eficiența derivaților pentru aplicații medicale viitoare.

În *capitolul 6 (Hidrogeluri cu chitosan ca biomateriale pentru aplicații medicale)* se prezintă importanța și relevanța *hidrogelurilor* pe bază de chitosan pentru aplicații medicale și farmaceutice și rezultatele exploratorii privind obținerea de noi hidrogeluri de chitosan funcționalizat, caracterizate prin metode structurale (FTIR) și morfologice (SEM) și privind activitatea antibacteriană împotriva *E. coli*, în vederea stabilirii importanței practicii biomedicale.

Teza cuprinde concluzii finale, unde sunt prezentate succint cele mai relevante rezultate din stadiul cercetării, și contribuțiile originale, perspective privind continuarea cercetărilor și diseminarea rezultatelor cercetării. Teza de doctorat cu titlul *Studii privind caracterizarea funcțională pentru noi derivați de chitosan*, se extinde pe 180 pagini și este structurată în două părți: partea documentară reprezintă 24% din întregul volum al lucrării (fără paginile cu referințe bibliografice), iar parte experimentală reprezintă 76% (fără paginile cu referințe bibliografice), cu rezultatele de interes ale tezei, contribuții originale personale în domeniul materialelor noi. Referințele bibliografice sunt prezentate la finalul capitolelor; în total sunt peste 410 referințe studiate. Sunt publicate 3 articole științifice (ISI & BDI), cu rezultatele obținute în subiectul tezei, la 2 articole sunt prim autor, la un articol sunt co-autor. În lucrare sunt incluse 17 scheme, un număr de 72 figuri și 24 de tabele reprezentative.

Activitățile de cercetare au fost efectuate utilizând infrastructura modernă din Universitatea Dunărea de Jos din Galați (www.ugal.ro), din Departamentul de Știința și Ingineria Materialelor, Departamentului de Chimie Fizică și Mediu, cât și Centrele de cercetare acreditate („ECEE”, “BioAliment” și “Moras”).

Considerăm că rezultatele obținute și prezentate în teză pot constitui un reper de interes și inițiere care să încurajeze continuarea studiilor pe chitosan cu noi derivați de chitosan, folosind săruri N-heterociclice, să exploreze și hidrogelurile cu acești compuși, cu activitate biologică, în găsirea de soluții viabile pentru susținerea sănătății umane.

Introduction

In today's modern technologies, there is an increasing concern for obtaining new smart and ecological products and materials, which must fulfill the needs of our modern society, a society which is constantly changing and trying to find solutions for a friendly environment. Biomaterials are of great interest in many fields of study due to their numerous properties they possess. Those properties are represented by: biocompatibility and biodegradability, non-toxicity and possibility of being used as drug carriers with the aim of improving and preventing the health of the population.

Many polymers have been studied with the aim of developing new biomaterials of wide technical interest, but chitosan mainly occupies one of the first places after cellulose and can be successfully used in different forms such as: solutions, hydrogels, nano/microparticles with different degrees of deacetylation.

Chitosan is a biopolymer that can be obtained from natural sources and possesses unique biochemical properties such as biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, the ability to form films, membranes, etc. Both chitosan and chitosan derivatives are considered promising biomedical products that can be included in microencapsulation techniques and enhancing investigations for the delivery of drugs, biological compounds and vaccines, etc. [Ibrahim M.A. et al., 2023]. Due to its antimicrobial properties, chitosan is a promising biomaterial, possessing a cationic nature and being a compound that is easily alkylated with several chemical compounds.

Chitosan and its derivatives include a variety of physico-chemical and biological substances, with specific properties and diverse uses (pharmaceutical industry, biomedical applications, dentistry, food industry, wastewater treatment, agrochemistry, environment and industrial uses). Although there are many studies on chitosan and its derivatives, the examination of better ways to obtain new functional derivatives are still strategies that remain of interest, especially regarding the use of biopolymer as a matrix in natural development and biological derivatives as antimicrobial agents for a growth of its efficiency and specificity.

The personal motivation in choosing this topic was the desire to contribute to reasearching studies regarding the development of new solutions for natural products that could improve human health by increasing the solubility of chitosan and by modifying its chemical structure in order to obtain new products with antibacterial properties.

- For this reason, the main objective of the doctoral thesis ("Studies regarding the functional characterization for new chitosan derivatives") was to obtain new products, to characterize new compounds and derivatives of functionalized chitosan, having specific properties, which can also be used as biomaterials, such as hydrogels.

The research which was carried out in the doctoral programme had the following specific objectives:

- Obtaining and characterizing compounds with chitosan, using metal ions Cu (II), Zn(II) and respectively Fe(III), studies on new metal complexes, with specific applications.
- Synthesis and physico-chemical and structural characterization of new chitosan derivatives using some 4,4' dipyridyl quaternary salts for functionalization.
- Evaluation of the influence of *4,4' dipyridyl quaternary* salts and synthesis factors, for obtaining of new functionalized chitosan derivatives with biological properties, antioxidant and improved antibacterial properties, which can be a solution for future medical applications.

Thus, the doctoral thesis brings new results due to the diversity of some studies which to our knowledge are unreported, regarding chitosan derivatives with heterocyclic N ligands, from the 4,4'-dipyridyl class, carefully selected quaternary salts.

The doctoral thesis entitled "*Studies regarding the functional characterization for new chitosan derivatives*" includes six main chapters, focused on the objectives of interest of the topic that were proposed in the doctoral programme.

The first two chapters represent the documentary part. The first chapter (*Studies on obtaining functionalized materials based on chitosan*) presents the current state of research and is a synthesis of many studies on chitosan, the polymer with remarkable diverse applications and the characterization of chitosan derivatives. Many of the reported studies are related to biomaterials, their role and importance. The second chapter (*Viologens, heterocyclic compounds, of class 4,4, dipyridyl*) refers to organic, N-heterocyclic compounds that are of great current interest in obtaining new materials and as revolutionary technologies.

The experimental part of the scientific thesis is presented starting with chapter 3 (*Chitosan derivatives obtained by complexation with metal ions*) and includes the early stages of the doctoral programme, the first syntheses of new compounds based on chitosan which were the complexes of chitosan with metal ions. Thus, new derivatives were synthesized and characterized: complexes of chitosan with copper ions Cu(II) and zinc ions, Zn(II), then with Fe(III) ions, from solutions. The new complexes were obtained by different methods and under different conditions. The influencing factors in the obtaining process were: temperature, pH of solutions, contact time, mass ratio between compounds and ultimately, the samples were analysed by spectrophotometric (UV-VIS), structural (FT-IR), and morphological (SEM) analysis) and by kinetic study of Fe(III) ions in acidic medium.

Chapter 4 includes the results of innovative research and the original personal contribution regarding the synthesis, chemical composition and physico-chemical, structural and biological properties for the new products obtained. The new functionalized chitosan derivatives were obtained using organic compounds included in *4,4 dipyridyl* class (N-heterocyclic salts). Initially, four N-heterocyclic salts named also as viologens (organic compounds of major interest for materials engineering and modern technologies) were obtained and structurally characterized, through their specific properties, with redox reversibility, antifungal, antibacterial and redox activity. The salts synthesized and used for obtaining new chitosan derivatives were: *N,N'-diphenacyl 4,4'-dipyridylium dibromide* and *N,N'-bis(p-nitrophenacyl)-4,4'-dipyridylium dibromide* which has two NO₂ groups in addition to the first salt. *N,N'-diphenacyl-1,2-bis(4-pyridyl)ethane dibromide* and *N,N'-bis(p-nitrophenacyl)-1,2-bis(4-pyridyl)ethane*.

Chapter 4 (Research on the functionalization of chitosan with N-heterocyclic compounds, in aqueous solution and influencing factors) presents the results of research on the functionalization of chitosan with these salts, N-heterocyclic compounds, in aqueous solution, and the influencing factors (contact time, temperature of synthesis, agitation, mass ratio between chitosan:salt) for the synthesis of new chitosan derivatives, analytical and physico-chemical characterization, through modern analysis methods to highlight the structures of the products (UV-VIS, XRD, FT-IR, SEM -EDX, cyclic voltammetry). Promising results were obtained for chitosan derivative with *N,N'-diphenacyl-4,4'-dipyridylium dibromide*.

Chapter 5 (Research on the functionalization of chitosan with diquatery N-heterocyclic salts, in an acidic environment) presents the research on the functionalization of chitosan with the same N-heterocyclic salts, in an acidic environment (2% acetic acid). The influencing factors in the synthesis of new chitosan derivatives are discussed and there are some methods for characterizing materials, structures and their biological properties against pathogens and bacteria presented in order to track the effectiveness of derivatives for future medical applications.

Chapter 6 (Chitosan hydrogels as biomaterials for medical applications) presents the importance and relevance of chitosan-based hydrogels for medical and pharmaceutical applications and the exploratory results regarding the new functionalized chitosan hydrogels which were characterized by structural (FTIR) and morphological methods (SEM). The antibacterial activity against *E. coli*, was also studied in order to establish the importance of biomedical practice. The thesis includes final conclusions that emphasize the most relevant results from the research and the original contributions, followed by dissemination of the research results.

The doctoral thesis with the title "*Studies regarding the functional characterization for new chitosan derivatives*" contains 180 pages and is structured in two parts: the documentary part represents 24% of the entire thesis (without bibliographic references), and the experimental part represents which 76%, with the interesting results of the thesis, original personal contributions in the field of new materials. Bibliographic references are presented at the end of the chapters; being over 410 references in total that were studied; 3 scientific articles are published (ISI & BDI), with the results obtained regarding the topic of the thesis, in 2 articles I am the first author, in one article I am co-author. The work includes 17 schemes, a number of 76 figures and 24 representative tables.

The research activities were carried out using the modern infrastructure of Dunafrea de Jos University of Galați (www.ugal.ro), Materials Science and Engineering Department and Physical and Environmental Chemistry Department, as well as the accredited research centers ("ECEE", "BioAliment" and "Moras").

We believe that the results obtained and presented in the thesis can be of great interest and initiation that will encourage the carrying out of new studies on chitosan with new chitosan derivatives, using N-heterocyclic salts, in order to obtain other hydrogels with these compounds that could have biological activity, in finding viable solutions to support human health.

1. STUDII PRIVIND OBTINEREA DE MATERIALE FUNCȚIONALIZATE PE BAZĂ DE CHITOSAN

Acest capitol prezintă stadiul cercetărilor referitoare la biomateriale care au ca bază chitosanul, parametrii și proprietățile speciale și importanța lor. Chitosanul alături de celuloză, este biopolimerul cel mai răspândit în natură, un polizaharid natural obținut prin dezacetilarea chitinei, devenit un biomaterial cu interesante și multiple aplicații în multe domenii, dacă ar fi să amintim doar domeniul medical, datorită proprietăților biologice importante, biocompatibilității, biodegradabilității și toxicității scăzute, sau în *tehnologia* farmaceutică, ca agent antimicrobian și antitumoral [Kritchenkov A.S. et al., 2020; Chylinska M. et al., 2019]. Este discutată și obținerea derivaților de chitosan, în diferite forme și implicarea amplă a acestora în domenii de aplicații diverse. Chitosanul are o mare capacitatea de a fi modificat chimic, dar rămân limitări ale derivaților de chitosan sintetizați datorită solubilității sale limitate în apă, prezentând dezavantajul solubilității reduse ceea ce îi limitează utilizarea terapeutică [Khan A. et al., 2021; Wang W. et al., 2020; Palmese L.L. et al., 2019; Liu C. et al., 2019]. Deși sunt multe studii pe chitosan și derivații săi, examinarea unor modalități mai bune de a obține noi derivați funcționali, sunt încă strategii ce rămân de interes, în special privind utilizarea biopolimerului ca matrice în dezvoltarea naturală și a derivaților biologici, ca agenți antimicrobieni pentru o creștere a eficienței și specificității sale.

1. VILOGENI - COMPUȘI HETEROCICLICI DIN CLASA 4,4'-DIPYRIDILULUI

Compușii heterociclici sunt tipuri de molecule organice importante în chimia medicinală și sunt folosiți ca medicamente pentru diferite afecțiuni, cu gamă largă de aplicații terapeutice [Sirbu R. et al., 2019, Carver P.L. et al., 2019]. Structurile viologene reprezintă candidați viabili în sintezele de noi compuși cum ar fi derivații de chitosan cu proprietăți farmacologice sau medicale [El-Naggar M.M. et al., 2020]. Combinația de săruri N-heterociclice (viologeni) cu chitosan cationic poate ajuta la crearea chitosanului funcțional prin introducerea sării heterociclice adecvate pentru reacțiile de adăugare sau substituție ale grupării funcționale care conțin N deja formate [Botezatu (Dediu) et al., 2023; Costea I.F. et al., 2022].

PARTE EXPERIMENTALĂ

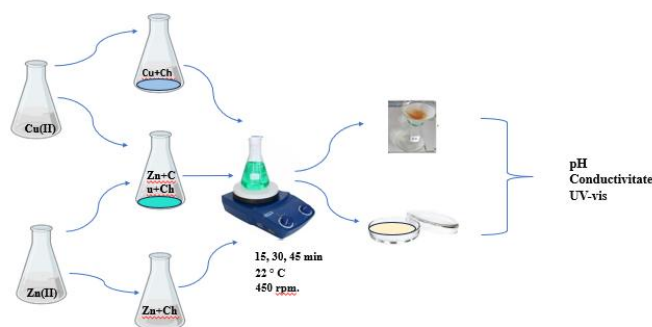
3. DERIVAȚI AI CHITOSANULUI OBTINUȚI PRIN COMPLEXARE CU IONI METALICI

Chitosanul oferă o disponibilitate mare prin grupările funcționale de pe structura care facilitează interacțiunea cu cationi și anioni, care au ca efect o îmbunătățire a capacității de legare, iar procesele de chelare decurg relativ rapid [Chen Z. et al., 2022, Ali M.A. et al., 2021]. Literatura prezintă diferite sisteme de complexare folosind ionii metalici, cupru și zinc, cadmiu, mangan, ioni importanți în produse pentru industria farmaceutică și domeniul medical [Luo X.Y. et al., 2022; Maia M. et al., 2020]. Rezultatele obținute de diverși cercetători indică faptul că prezența ionilor metalici în soluție aduce modificări ale complexului de adsorbție a chitosanului [Carver P.L et al., 2019; Maia M. et al., 2020].

3.3. Complecși de adsorbție ai ionului de Cu(II) și Zn (II) cu chitosan

S-a inițiat studiu pentru procesul de adsorbție al chitosanului cu ionii metalici. Granulele de chitosan se găsesc în diferite forme și sunt biopolimeri microporoși, prin urmare porii sunt destul de mari pentru a permite adsorbția unor ioni metalici cum ar fi de Zn(II), și Cu(II), pe structura polimerică a chitosanului [Chen Z. et al., 2022; Wang M. et al., 2019].

S-au realizat probe de chitosan folosind ionii metalici Cu(II), respectiv Zn(II), singuri și în amestec, la pH-ul soluțiilor între 6-8, condițiile optime pentru adsorbția acestor ioni [Cruz-Lopez L.P. et al., 2021], cu modificarea unor parametri de lucru. Probele au fost agitate pentru timp de contactare de 15, 30 și 45 min., la 450 rpm (selectată ca fiind optimă), la temperatura camerei, după care produsul obținut s-a filtrat pe hârtie cantitativă. Soluțiile de supernatant au fost analizate spectroelectrochimic, utilizând un spectrofotometru UV-VIS T90+, la lungime de undă situată între 200-900 nm, folosind cuve de cuarț (**Schema 3.1**).



Schema 3.1. Obținerea de noi complecși de chitosan cu ionii de Cu(II) și Zn(II)

S-a constatat că perioada de contactare influențează pH-ul, conductivitatea, precum și absorbanta din spectrele UV-VIS ale soluțiilor apoase după procesul de complexare (**Figura 3.4**). Odată cu creșterea perioadei de contactare crește și absorbanta și se regăsesc picuri la λ după 240 nm. Chitosanul fiind un polimer cu capacitate de reținere mare are o adsorbție mai rapidă pentru ionii de zinc, comparativ cu ionii de cupru, care se rețin mai greu. O explicație ar fi că, retenția ionilor metalici pe chitosan este puternic dependentă și de modificări de pH, de masa moleculară, de proprietățile specifice ale fiecărui ion metallic. La 30 min. după contactare, absorbanta scade, când sunt prezenți ambii ioni simultan în soluție, fiind un echilibru de adsorbție între componenți.

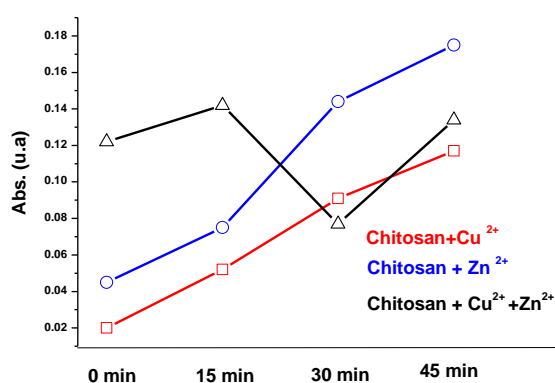


Figura 3.4. Variația absorbanței cu timpul de contactare pentru sistemul chitosan-Cu(II) (roșu), chitosan-Zn(II) (albastru), chitosan-Zn(II)-Cu(II) (negru)

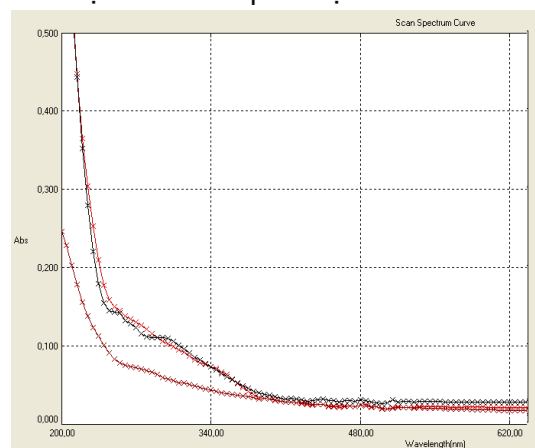


Figura 3.7. Spectru de absorbție în UV-VIS pentru sistemul complex chitosan - Zn(II) - Cu(II); timp de contactare: 15 min. (grena), 30 min. (roșu) și 45 min. (albastru)

S-au determinat ioni de Zn(II) adsorbit de chitosan prin diferența dintre Zn(II), inițial în probele cu chitosan (10 mg/L) și Zn(II) din filtrat. Pentru complexul chitosan cu ionii de zinc are loc adsorbția ionilor, de la începutul contactării cu chitosanul. Odată ce crește perioada

de contactare, se înregistrează o scădere a Zn(II) reținut, prin epuizarea legăturilor disponibile din structura moleculei de chitosan. În cazul complexilor chitosanului cu ambii ioni metalici (Zn(II) și Cu(II)), valorile absorbției sunt mai mari decât în cazul sistemelor cu chitosan și ioni metalici individuali. Spectrul UV-VIS privind acțiunea sinergică a celor doi ioni metalici pe structura chitosanului (**Figura 3.7**), redă că ambii ioni se absorb pe molecula chitosanului și odată cu creșterea perioadei de contactare, se regăsesc două picuri, la λ de 240 nm, iar după 45 de min., un palier la λ între 264-300 nm.

3.4. Complecși de adsorbție ai ionului Fe (III) cu chitosan

Chelarea cu ioni de Fe (III) indică o coordonare puternică cu grupările funcționale, cu interacțiuni dependentă de pH. Pentru pH acid, grupările cu azot din chitosan sunt active în formarea legăturilor chelate, favorizând viteze de reacție pentru care absorbția ionilor metalici de fier implică un complex de transfer de sarcină [Chen Z. et al., 2022; Wang M. et al., 2019]. S-a studiat eficiența de adsorbție pe fulgi de chitosan prin modificarea timpului de contactare și a concentrației ionilor ferici, în mediu acid. Influența unor parametri în echilibrul de adsorbție este de interes pentru explicarea capacității ionilor de Fe (III) de a forma legături chelate cu chitosanul [Wang M. et al., 2019; Mahir T. et al., 2018].

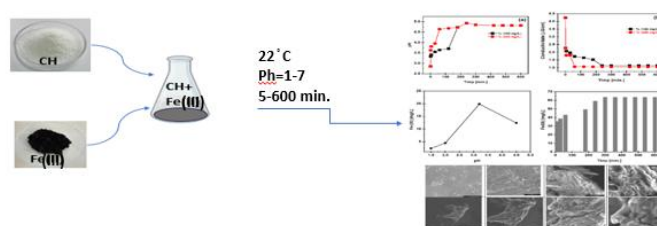
Experimente de adsorbție

Chitosanul aflat în contact cu ionii Fe (III) (1 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L și 200 mg/L Fe) a fost analizat prin modificarea unor parametri, experimente repetate de două ori, la temperatura camerei (**Schema 3.2**):

a) *timpul de contactare*: 100 mg fulgi de chitosan în contact cu 50 mL, din soluție cu 100 mg/L și respectiv 200 mg/L Fe (III), la 380 rpm (agitare mecanică) și timp de contactare variabil între 5 min. și 600 de min.

b) *raportul fazelor de contactare*: chitosan 100 mg și 200 mg cu 100 mg/L Fe (III) și respectiv 200 mg/L Fe (III), timp de contactare de 540 min., 380 rpm.

c) *efectul pH-ului* în intervalul 1-7, la proba obținută din 100 mg chitosan cu 100 mg/L Fe (III), timp de contactare 60 min., la 380 rpm, folosind HCl 0,1 N și NaOH 0,1 N.



Schema 3.2. Obținerea de noi complecși de chitosan cu ionii de Fe (III)

3.4.2. Rezultate și discuții

Adsorbția ionilor metalici la suprafața chitosanului are loc printr-un complex de suprafață care implică atomi de azot [Burke, A. et al., 2020; Lapo B. et al., 2018]. Când agitarea este peste 200 rpm crește și eficiența retenției ionilor de Fe [Cruz-Lopes L.P. et al., 2021; Ali M.A. et al., 2021]. După 300 de min. se stabilește un echilibru între faze; pentru 100 mg chitosan se observă retenția ionilor metalici similară, până la concentrație de 66,6 mg/L Fe(III) (**Figura 3.9**). Capacitatea de adsorbție a chitosanului pentru ionii

metalici este mult mai mare în mediul cu pH mai scăzut.

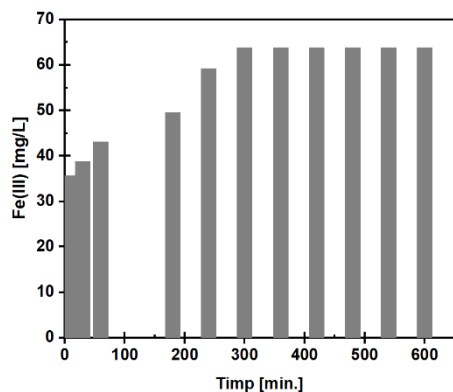


Figura 3.9. Efectul Fe (III) adsorbit în lanțul chitosanului în funcție de timpul de contactare. Condiții de reacție: 100 mg adsorbant, 50 mL soluție de 100 mg/L Fe (III), 380 rpm, $t = 22^{\circ}\text{C}$.

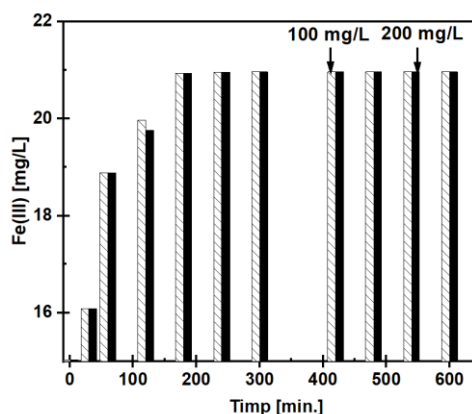


Figura 3.10. Ioni de Fe (III) rămași în soluție după adsorbție pe chitosan în funcție de timpul de contact. Condiții de reacție: 100 mg adsorbant, 50 mL soluție de 100 mg/L Fe (III) și 200 mg/L Fe (III), 380 rpm, $t = 22^{\circ}\text{C}$.

Bilanțul de adsorbție și complexare pe chitosan, la cantități diferite de aceasta și aceeași soluție de Fe (III), se stabilește după 60 de min., favorabil ca timp de contactare (**Figura 3.10**). Pentru cantitate mai mare de chitosan (200 mg adsorbant), echilibrul se stabilește mai greu cu variații de pH și a conductivității soluției. Cantitatea de ioni de fier (III) adsorbiți crește odată cu timpul de contactare, atingând un echilibru stabil în 5 ore, în ambele probe. După 240 de min., ca timp de contactare între componentii, pH-ul de 5,5 de la filtrat, rămâne constant în ambele probe cu 100 mg/L Fe și respectiv cu 200 mg/L Fe (**Figura 3.11.a**). Conductivitatea specifică a soluțiilor indică aceeași tendință; o scădere a valorilor până la stabilirea echilibrului între faze (**Figura 3.11.b**).

Retenția ionilor de Fe (III) pe chitosan este puternic dependentă de modificările pH-ului. Dacă pH-ul este puternic acid, atunci chitosanul este dizolvat, în timp ce pentru pH mai mare de 4,5 s-a observat formarea unui sistem coloidal. În soluții mai acide, mai mulți protoni vor fi disponibili pentru a protona grupările amino din chitosan pentru a forma grupări protonice $-\text{NH}_3^+$, reducând numărul de legături disponibile pentru adsorbția Fe (III).

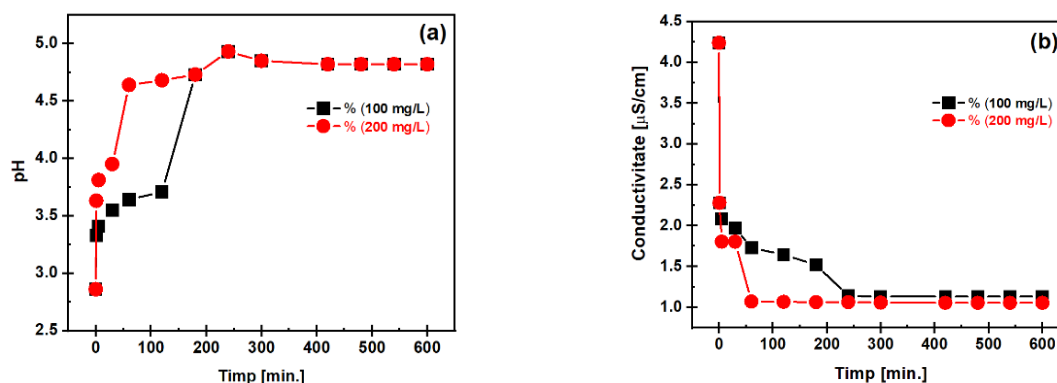


Figura 3.11. Efectul Fe (III) adsorbit în lanțul chitosanului în funcție de timpul de adsorbție urmărind variația pH-ului (a) și conductivitatea specifică a filtratelor (b). Condiții de reacție: 100 mg adsorbant, 50 mL soluție de 100 mg/L Fe (III), 380 rpm, $t = 22^{\circ}\text{C}$.

O adsorbție optimă a ionilor ferici de $19,87 \pm 0,15$ mg/L a fost obținută la pH între 3,0-3,2. Capacitatea de adsorbție a chitosanului după un timp de contactare de 60 de min. scade când pH-ul este mai mare de 3,2, adsorbția ionilor de fier este eficientă, suprafața totală a chitosanului fiind ocupată. Grupările amino libere iau parte la legarea ionilor de Fe (III) pe suprafața chitosanului, dar grupările hidroxil și grupările carbonil pot participa și la proces de coordonare cu grupările amino.

B. Analiza izotermei de adsorbție

Condițiile optime ale procesului de echilibru au fost: 100 mg chitosan adsorbant, cantitate menținută constantă, ionii Fe (III) între 25-200 mg/L, pH-ul de 3,20, timp de contactare de 600 min. Rezultatele sunt prezentate în **Figura 3.13** și **Figura 3.14**. Rezultatele obținute au indicat că, la temperatura camerei, cantitatea de ioni de fier (III) adsorbiți pe molecula de chitosan crește odată cu timpul de contactare, ajungându-se la un echilibru între componenți de cca. 5 ore.

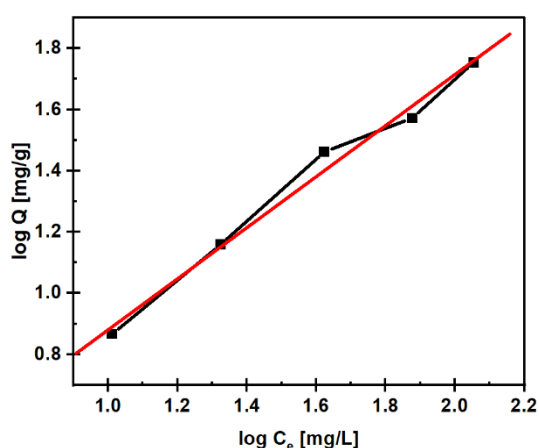


Figura 3.13. Izoterma de adsorbție a ionilor Fe (III) pe chitosan

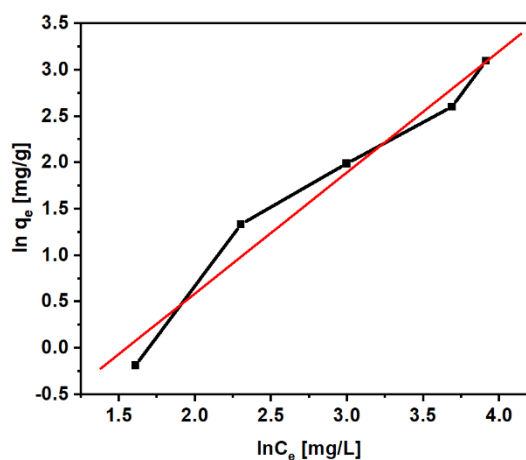


Figura 3.14. Izoterma de adsorbție Freundlich

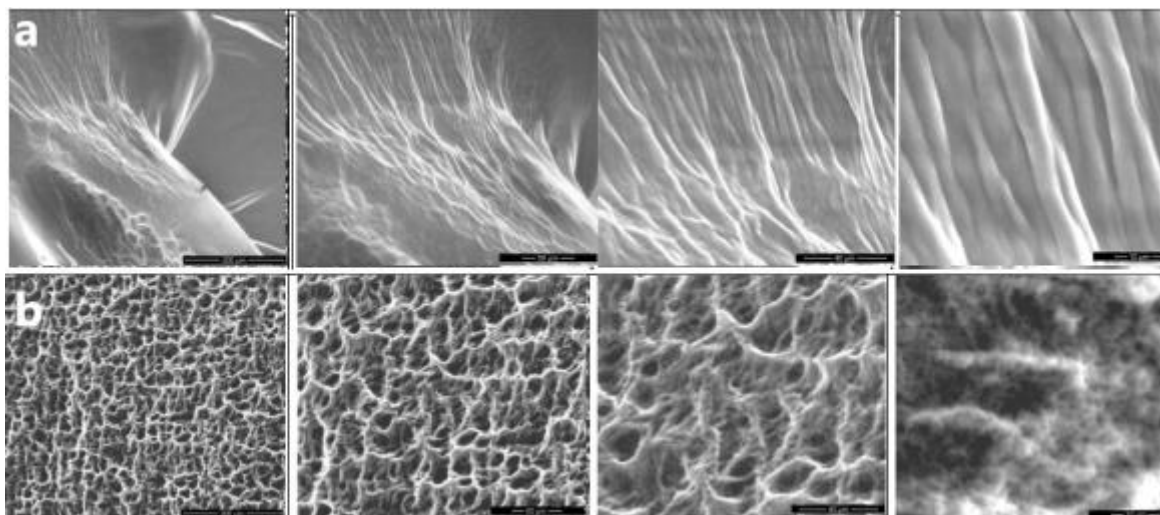


Figure 3.16. Imagini SEM ale chitosanului modificat după sorbția cu ioni de Fe (III): 200 mg adsorbant cu 1 mg/L Fe (III) (a) și 500 mg adsorbant cu 50 mg/L Fe (III) (b).

Din izoterma Langmuir, datele de echilibru din ultima valoare a capacității de adsorbție pe chitosan indică 82,30 mg Fe/g chitosan [Ali M.A. et al., 2021], mecanismul adsorbant datorându-se interacțiunilor ionice și complexării cu grupările funcționale ale

chitosanului. Capacitatea de adsorbție pentru Fe (III) este mare în comparație cu valoarea obținută pentru alți ioni și alți adsorbți [Ali M.A. et al., 2021]. Izotermele de adsorbție de echilibru pentru ionii de fier au indicat după 60 de min. peste 82,30 mg Fe/g chitosan, adsorbant, capacitate de retenție. Procesul de sorbție este adaptat izotermelor Freundlich și Langmuir, dar izoterma de echilibru a fost mai adecvată cu modelul Langmuir [Burke A. et al., 2000, Lapo B. et al., 2018].

Fulgii de chitosan sunt biopolimeri microporoși suficient de mari pentru a permite trecerea ionilor de Fe(III). Analiza SEM oferă un indiciu că mecanismul de adsorbție a ionilor Fe (III) pe chitosan este un fenomen complex și implică formarea de noduli pe structura chitosanului prin adsorbția ionilor metalici, prin coordonare puternică cu grupările funcționale ale chitosanului (amină și hidroxil), fiind un adsorbant eficient pentru retenția ionilor metalici cu posibile aplicații în medicină și mediu (**Figura 3.16**).

4. CERCETĂRI PRIVIND FUNCȚIONALIZAREA CHITOSANULUI CU COMPUȘI N-HETEROCICLICI, ÎN SOLUȚIE APOASĂ, ȘI FACTORI DE INFLUENȚĂ

Se prezintă sinteza în mediu apos pentru obținerea de noi derivați de chitosan, folosind săruri cuaternare de dipiridiliu. Rezultatele pentru derivatul de chitosan, folosind *dibromura de N,N'-difenacil- 4,4'-dipiridiliu* notat (**CHS**) sunt publicate în Journal of Physics: Conference Series; Bristol **2021**, vol. 1960, Nr. 1 ([DOI:10.1088/1742-6596/1960/1/012001](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1960/1/012001)) și confirmă că structura de funcționalizare a chitosanului este influențată de mai mulți factori.

Probele de chitosan, din surse diferite, prezintă disociere pentru mediul apos, rezultând un pH slab bazic, ceea ce indică solubilizare limitată pentru chitosan, atât chitosanul din probe comerciale cât și chitosanul din probe farmaceutice.

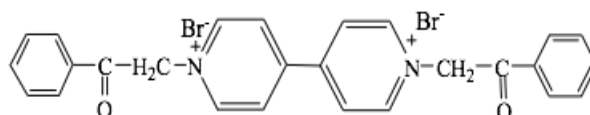
4.4. Funcționalizarea chitosanului în mediul apos cu *dibromura de N,N'- difenacil- 4,4'-dipiridiliu*

Modificările chimice ale chitosanului sunt necesare pentru ai îmbunătăți solubilitatea sa scăzută, în soluții apoase și pentru a obține noi materiale cu proprietăți distincte, chitosan funcționalizat pe structura polimerică, utilizarea de compuși N-heterociclici fiind o soluție de interes pentru cercetare în acest scop [El-Naggar M.M. et al., 2020; Kritchenkov A.S. et al., 2020].

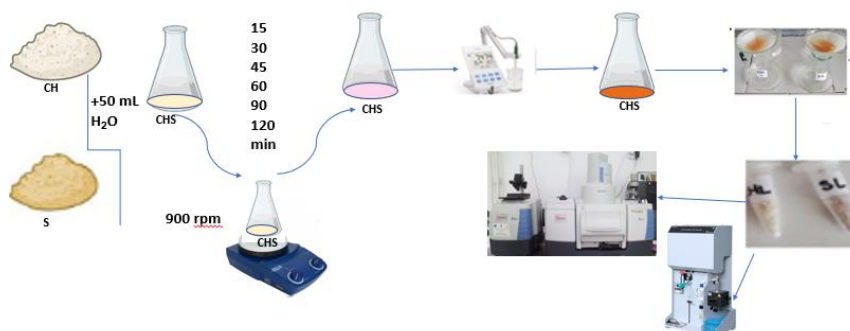
Confirmându-se capacitatea de legare în lanțul biopolimeric al chitosanului a sării cuaternare de *dibromura de N,N'- difenacil- 4,4'-dipiridiliu* (cap.4.3 - analiza structurală prin spectre FTIR [**Costea (Nour) I.F. et al., 2022**] s-a experimentat obținerea de noi derivați de chitosan, urmărind influența mai multor factori de influență în procesul de sinteză.

4.4.1. Materiale și proceduri de sinteză

S-a folosit pulbere de chitosan (**CH**), $C_{12}H_{24}N_2O_9$, chitină poli (D-glucozamină) deacetilată ($M=340 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) achiziționată de la firma Sigma-Aldrich și sarea N-heterociclică, *dibromura de N,N'- difenacil- 4,4'-dipiridiliu* ($C_{28}H_{26}Br_2N_2O_2$; $M = 554 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (notată **S**), sintetizată și purificată în laboratorul de chimie organică conform referinței [Dinica R.M., 2007; Furdui B. et al., 2012], cu structura moleculară:



Etapele de lucru în funcționizarea chitosanului cu sarea cuaternară de dipiridiliu sunt prezentate în **Schema 4.2** și imagini din procesul de sinteză în **Figura 4.9**. S-au modificat unii parametrii de lucru, cum ar fi timpul de contactare între compuși, temperatura de sinteză și este modificat raportul de masă de chitosan : sare cuaternară dipiridilică.



Schema 4.2. Procedeu experimental de funcționizare a chitosanului (**CH**) cu sarea, dibromura de *N,N'*-difenacil- 4,4'-dipiridiliu (**S**), raportul de masă chitosan:sare fiind 20:1



Figura 4.9. Imagini din procesul de sinteză pentru derivatul de chitosan notat **CHS**

Parametrii de lucru experimentați pentru trei sinteze diferite, în vederea obținerii de noi derivați de chitosan sunt prezentați în **tabelul 4.1**.

Tabelul 4.1. Condiții de experimentare în sinteza derivaților de chitosan **CHS**, cu dibromura de *N,N'*-difenacil- 4,4'-dipiridiliu (**S**), varianta de sinteză (a) – (c)

Parametrii	Sinteza (a)		Sinteza (b)		Sinteza (c)
	timp de contactare (min.)		T (°C)		
CH - chitosan (g)	0,20	15	0,20	20	0,20
S - sare de dipiridiliu (g)	0,01	30	0,01	30	0,01; 0,02
viteza de agitare (rpm)	900	45	900	40	900
		90	120 min. timp de contactare	60	90 min. timp de contactare la 70°C
		120		70	
		la 22°C		80	

4.4.4. Factori de influență în procesul de sinteză a derivaților de chitosan CHS

4.4.4.1. Influența timpului de contactare

Probele uscate obținute pentru chitosan, **CHS** au indicat randament între 67 – 77 % variabil în funcție de timpul de contactare în procesul de sinteză (**Figura 4.10.a**). Randament de sinteză > 77 % s-a înregistrat pentru timpul de contactare de 90 min., iar pentru timpul de contactare de 120 min., randament cu valoarea cea mai mică, de 67 %.

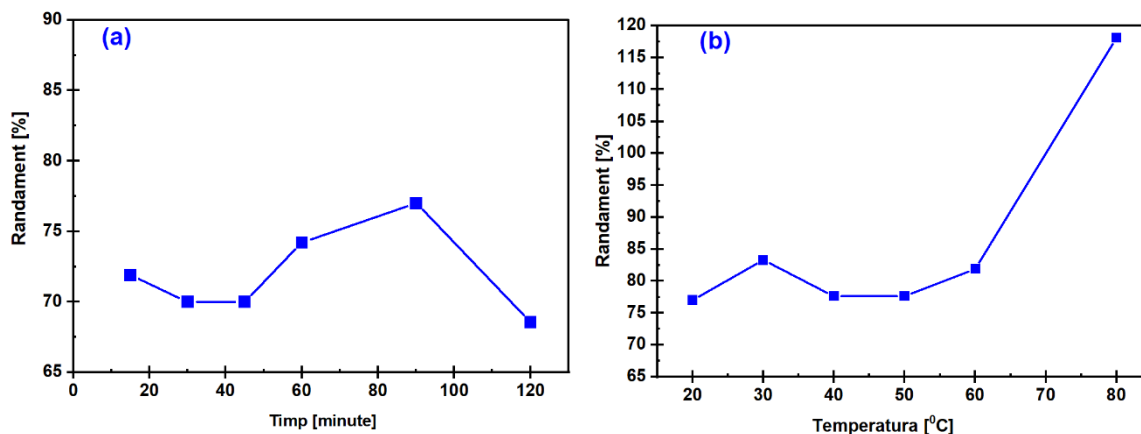


Figura 4.10. Evoluția randamentului de sinteză ($\eta\%$) a derivaților de chitosan **CHS**:

- (a) - sinteză la $t=22^{\circ}\text{C}$, pentru timp de contactare variabil, între 10 min. și 120 min.;
(b) - sinteză cu temperatura modificată (20°C și 80°C), pentru timp de contactare de 120 min.

Sinteza pentru derivatul de **CHS** la temperatura camerei, pentru soluțiile filtrate a indicat pH între 6,0 - 6,5 (**Figura 4.11.a**). Pentru timp de contactare variabil (15 - 120 min.), s-a înregistrat o ușoară creștere de pH, de la $6,56\pm 0,02$ (la 15 min.) la $6,72 \pm 0,06$ la 120 min. După 72 de ore s-a observat că toate soluțiile filtrate indică o scădere ușoară de pH, între $0,10 \div 0,5$ unități de pH, ca rezultat al echilibrului între grupările funcționale.

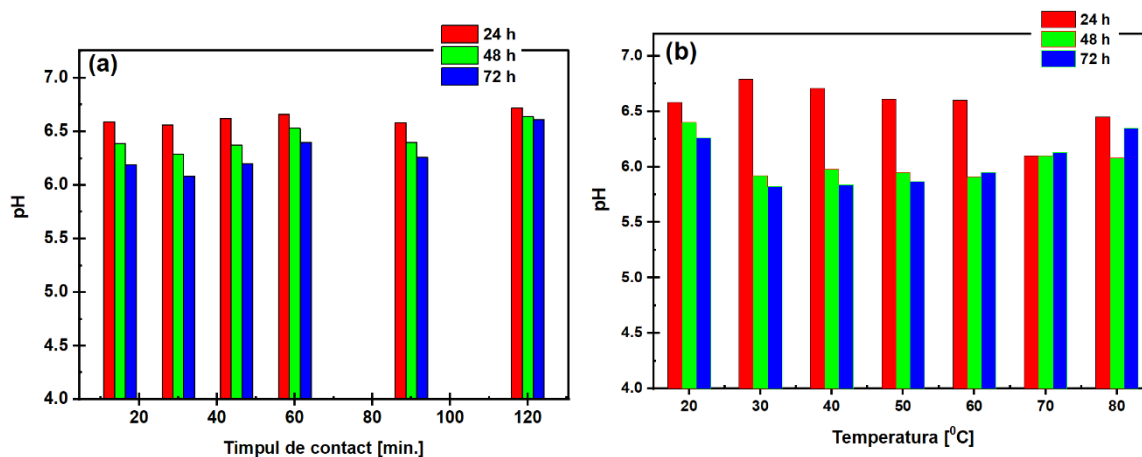


Figura 4.11. Evoluția pH-ului în filtrate pentru sinteza derivaților de chitosan **CHS**:

- (a) sinteză la $t=22^{\circ}\text{C}$ cu timp de contactare variabil, între 10 min. și 120 min.; (b) - sinteză cu temperatura modificată, între 20°C și 80°C , timp de contactare de 120 min.

Pentru soluțiile de sinteză, în soluție apoasă, pentru noii compuși de chitosan funcționalizat, la adăugare de sare dipiridilică, pH-ul scade, fiind spre slab acid, ceea ce sugerează realizarea de organizări structurale favorabile între chitosanul polimeric și sarea cu nucleu dipiridinice; valorile de pH rămân între $6,3\pm 0,2$. Conductivitatea electrică a soluțiilor, pentru filtratele rezultate din derivații de **CHS** au indicat valori între $329 \pm 3 \mu\text{S/cm}$,

prin creșterea sarcinii ionice din soluții, prin prezența sării cuaternare dipiridilice, comparativ cu chitosanul fără adaos de sare care a indicat valori între $270 \pm 2 \mu\text{S/cm}$.

4.4.4.2. Influența temperaturii de sinteză

Păstrând timpul de contactare constant, s-a modificat temperatura procesului de sinteză. Pentru probele derivaților de chitosan **CHS** pentru timp de contactare de 120 min., când temperatura a fost modificată, între $20^\circ\text{C} \div 80^\circ\text{C}$ s-a obținut o creștere a randamentului de sinteză, $\eta > 76\%$ (**Figura 4.10.b**). Pentru temperatura de 20, 40 și 50°C randamentul se menține în aceleași valori. Temperatura optimă sugerată pentru procesul de sinteză în obținerea derivatului de **CHS** este între $50 \div 70^\circ\text{C}$, dar intervin modificări structurale ca de altfel în orice schimbare a parametrilor în procesul de sinteză. Prin adăugarea de sare N-heterociclică, randamentul de sinteză pentru derivații de chitosan **CHS** indică o creștere moderată, în funcție de modificarea perioadei de contactare între compuși și prin modificarea temperaturii în procesul de sinteză.

4.4.4.3. Raport de masă chitosan : sare cuaternară de dipiridiliu

Amestecuri de chitosan-sare cuaternară de dipiridiliu, în apă bidistilată, formate din 0,2 g chitosan cu 0,01 g sare (raportul de masă între chitosan-sare fiind 20:1) și respectiv formate din 0,02 g sare (raport chitosan-sare fiind 10:1) s-au menținut la temperatura de 70°C , și timp de contactare de 90 min. S-a observat că la creșterea de sare cuaternară dipiridilică, rămâne sare în soluție, iar influența asupra gradului de substituție a chitosanului este redusă, prin eficiența de absorbție limitată în lanțul chitosanului. Conductivitatea specifică a probelor pentru sinteza de sare (raportul între chitosan-sare fiind 10:1) indică o creștere cu aproximativ 50%, ce confirmă că nu este un avantaj să avem cantitate mai mare de sare, nu se realizează legături stabile la structura chitosanului.

4.4.5. Caracterizarea structurală a derivaților de chitosan CHS

S-a realizat caracterizarea structurală prin analiza de difracție cu raze X (XRD) și prin Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR).

4.4.5.1. Spectrele de difracție cu raze X (XRD)

Spectrele de difracție de raze X (XRD) înregistrate pentru derivatul de chitosan funcționalizat **CHS** și proba de chitosan **CH**, obținute în condițiile de la *sinteza c* (**Tabelul 4.1**) sunt prezentate în **Figura 4.14**.

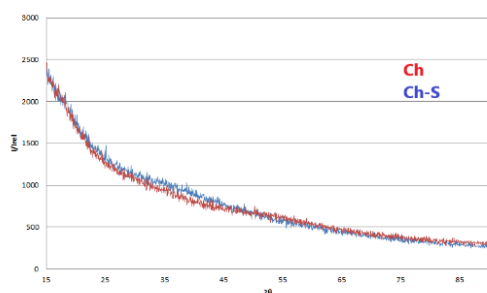


Figura 4.14. Spectre de difracție de raze X (XRD) pentru derivatul de chitosan CHS (albastru) comparativ cu chitosan (roșu)

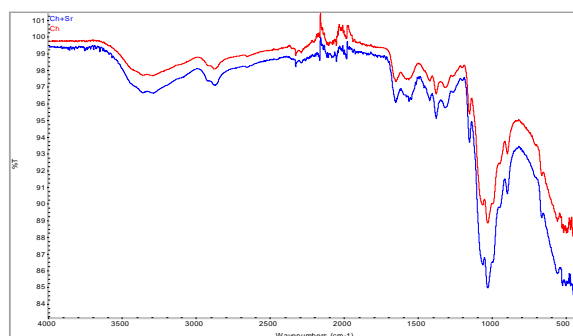


Figura 4.15. Spectrele FTIR pentru derivatul de chitosan CHS (albastru) și chitosan CH (roșu), probe obținute în aceleași condiții de sinteză (*sinteza c* - tabelul 4.1), raportul de masă chitosan: sare fiind 20:1

Din imaginea spectrelor se observă o anumită modificare a cristalinității derivatului de chitosan **CHS** datorită reacției de adsorbție pe structura polimerului de chitosan, vârfurile

scurte și plate indică că probele au o cristalinitate foarte scăzută și un factor bun de adsorbție. Modificările cristalinității derivatului de chitosan **CHS** sunt mai evidente cu aranjament între unghiul de 30-40 Θ , prin prisma maselor moleculare mari și a grupărilor funcționale din structura compușilor. Analiza realizată prin XRD este totuși insuficientă pentru a edifica structura noului produs, derivatul de chitosan **CHS**, pentru că se impune utilizarea unui alt echipament, mult mai sensibil care să indice spectre de difracție la unghi mai mic de 10 Θ [Costea(Nour) I.F. et al., 2021].

4.4.5.2. Evaluare structurală prin Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR)

Pentru caracterizarea structurilor se folosesc diferite alte instrumente de caracterizare [De Masi A. et al., 2019; Ibrahim M.A. et al., 2023], dar și FTIR, fiind utilă pentru a identifica structura chimică a noilor derivați de chitosan. Probele analizate prin FTIR pentru noul derivat sintetizat **CHS** au prezentat benzi caracteristice identificate în spectrele chitosanului dar și alte benzi noi, confirmând noi structuri, precum și stabilitatea compușilor. În prima zonă, frecvența de vibrație corespunde grupărilor funcționale hidroxil -OH și legăturilor C-C, din structura chitosanului, cu o diminuare a transmitanței, la derivatul **CHS**. De la poziția 3288 cm^{-1} în proba de chitosan **CH** s-au produs deplasări de 1 cm^{-1} , până la maxim 4 cm^{-1} spre dreapta pentru derivatul de chitosan **CHS** (Figura 4.15).

Pozițiile parametrilor spectrali reprezentativi sunt prezentate în Tabelul 4.2, asociați cu caracteristicile principale de vibrație ale unor tipuri de legături, din structurile investigate, ce pot fi asociate unor grupări funcționale în structura chitosanului și la noii compuși ai derivaților sintetizați.

Tabelul 4.2. Poziția benzilor reprezentative cu vibrațiile responsabile în derivatul de chitosan **CHS**, din spectre FTIR

Probe analizate	$\nu_{\text{O-H}}$	$\nu_{\text{C-C}}$	$\nu_{\text{C=O}}$	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C-O}}$	$\nu_{\text{C-O}}$
CH	3257	1879	1646	1580	1407	1162	1029
CHS	3882	1870	1647	1559	1374	1149	1024

Poziția benzii de la 1559 cm^{-1} , prezentă în derivatul de chitosan **CHS** este absentă în spectrul chitosanului analizat, fiind atribuită în acest caz prezenței legăturii C-N din structura sării cuaternare, dar poate fi prezent și în spectrul FTIR la probele de chitosan, cum s-a dovedit pentru **CH_c** și **CH_f** la 1557 cm^{-1} (cap. 4.3), atribuit structurii aminice. Poziția benzii de la 1024 cm^{-1} , atribuită legăturii C-O indică o deplasare de -5 cm^{-1} (spre stânga) pentru noul complex structural al derivatului de chitosan **CHS**, în comparație cu proba de **CH**. Benzile caracteristice de la numărul de undă 893 cm^{-1} și 422 cm^{-1} au fost similare la chitosan și la noii derivați de chitosan, dar intensitatea maximă diferă, fiind mai mică pentru noii compuși, ceea ce confirmă implicarea în legături cu sarea N heterociclică, prin deformarea structurilor. Așadar, în spectrul chitosanului derivat funcționalizat **CHS** se observă o diminuare a transmitanței, fiind un proces de modificare a structurii chitosanului.

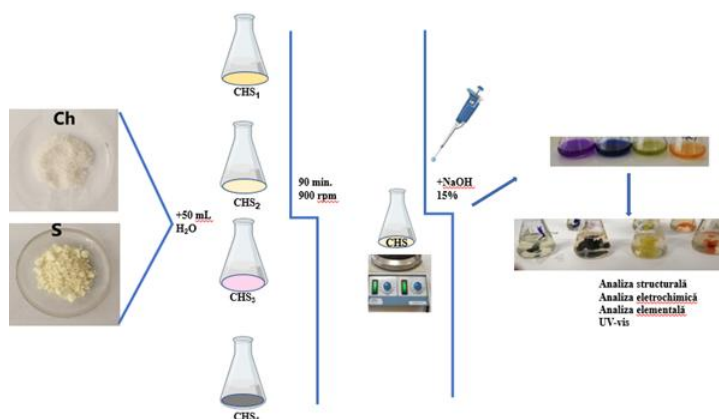
4.5. Funcționalizare pentru noi derivați de chitosan cu diferite săruri dipiridilice în mediu apos

Privind funcționalizarea polimerului s-au utilizat și alte săruri N-heterociclice, din clasa 4,4 dipiridiliu, pentru a urmări dacă are influență structura acestor compuși organici, în

procesul de alchilare la chitosan, în sinteză păstrând temperatura constantă și timpul de contactare același.

S-au utilizat în plus față de sarea notată cu **S₁** (dibromura de *N,N'*-difenacil -4,4'-dipiridiliu), și sărurile notate **S₂** (dibromura de *N,N'*-bis(*p*-nitro fenacil) -4,4'-dipiridiliu), **S₃** (dibromura de *N,N'*-difenacil 1,2-bis(4-piridil) etan) și respectiv, **S₄** (dibromura de *N,N'* bis(*p*-nitro fenacil)-1,2-bis(4-piridil) etan). Condițiile de lucru au fost stabilite ca fiind cele optime, prin prisma rezultatelor obținute la derivatul notat **CHS** (cap. 4.4), raportul de masă între chitosan și sare fiind de 20:1. Întâi se realizează solubilizarea pentru chitosan, probele fiind realizate în dublicat. Amestecul în soluția apoasă este agitat magnetic (900 rpm), timp de 90 min., menținându-se temperatura constantă de 70 °C.

Probele se filtrează (hârtie cantitativă), dar procesul este unul anevoios; se usucă în exicator timp de 48 h, se cântăresc la balanța analitică și se calculează randamentul de sinteză, probele fiind păstrate apoi în vase Petri acoperite până la analiza elementală și structurală. Noii derivații de chitosan funcționalizat sunt notați **CHS₁**, **CHS₂**, **CHS₃**, **CHS₄** (Schema 4.3).



Schema 4.3. Etape din procesul de sinteză de noi derivații de chitosan notați **CHS₁**, **CHS₂**, **CHS₃**, **CHS₄**

4.5.4. Compoziția elementală la derivații de chitosan

Referitor la conținutul de carbon total, C (%), din valorile obținute se observă că proba de derivat de chitosan notată **CHS₁** și **CHS₃** prezintă aceeași valoare, dar proba de chitosan notată **CHS₂** indică o creștere de conținut de C de +0,73 %, iar la proba de chitosan notată **CHS₄** o scădere de conținut de C cu 0,71 % (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Analiza conținutului de azot total N (%) și carbon total C (%) la derivații de chitosan notați **CHS₁**, **CHS₂**, **CHS₃** și **CHS₄**

Derivat de chitosan	N (%)		C (%)	
	calculat	confirmat	calculat	confirmat
CH	8,00	7,44	42,35	59,80
CHS ₁	9,56	5,99	43,06	60,09
CHS ₂	8,03	6,36	42,63	60,82
CHS ₃	10,17	10,72	43,08	60,08
CHS ₄	7,97	5,85	42,71	59,37

Referitor la conținutul de azot total, N (%), se observă că derivatul de chitosan notat **CHS₃** indică cea mai mare valoare, de 10,72 %, o creștere de conținut de azot de +3,28 % comparativ cu proba de chitosan, fără adaos de sare N heterociclică, și respectiv o creștere

la conținutul de azot de +4,73 %, comparativ cu derivatul **CHS**₁. O explicație ar fi că la sarea **S**₃ (*dibromura de N,N' bis(fenacil)-1,2-bis(4-piridil) etan*) în structură, prezența grupării etilenice favorizează „înfășurarea”, interacțiunea cu lanțul polimeric al chitosanului.

4.5.5. Evaluarea structurală prin Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR)

Noii derivați ai chitosanului sintetizați pot genera rețele compoziționale cu efect sinergic, când pot fi utilizați ca materiale biomedicale și aprofundarea structurilor este de mare interes, pentru aplicații viitoare. Pentru probele derivatilor de chitosan, notați **CHS**₁, **CHS**₂, **CHS**₃ și **CHS**₄ s-au realizat spectre FTIR, prezentate în **Figura 4.18**, unde se observă modificări în poziția unor benzi caracteristice la derivații de chitosan, cu reducerea transmitanței, sugerând interacții în structura polimerică a chitosanului.

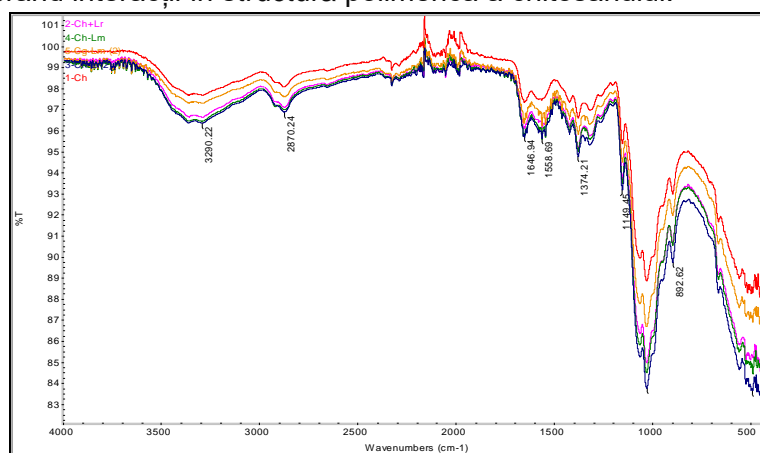


Figura 4.18. Spectre FTIR comparative pentru probele de chitosan **CH** și a derivaților de chitosan notați **CHS**₁, **CHS**₂, **CHS**₃ și **CHS**₄

Frecvența de vibrație crespunzătoare grupărilor reactive -OH, în spectrul chitosanului este absent în spectrul sărurilor cuaternare (nu se prezintă spectral). Aspectul de bandă largă la 3288 cm⁻¹, sugerează existența asocierilor prin legături de hidrogen, care apare în soluție apoasă în structura derivaților de chitosan sintetizați și se datorează efectului de solvent. În spectrele IR ale derivaților de chitosan benzile cele mai intense apar la 1191 cm⁻¹, 1085 cm⁻¹, 1049 cm⁻¹ și 1014 cm⁻¹. Analiza spectrală FTIR evidențiază faptul că, pentru aceeași grupare funcțională în intervalul spectral 1400 – 1490 cm⁻¹, benzile caracteristice sunt mai numeroase în spectrele derivaților de chitosan funcționalizat, ca efect al interacțiunii cu sărurile cuaternare dipiridilice. Din analiza FTIR, se observă că sunt benzi caracteristice la numărul de undă de 1647, 1559, 1149 și 1374 cm⁻¹, similar la chitosan și la noii derivați de chitosan, cu deplasări mici între 1 cm⁻¹ și max 4 cm⁻¹.

4.6. Concluzii

- ✓ Strategia de sinteză pentru noi derivați de chitosan funcționalizat, în soluție apoasă, datorită solubilității scăzute a chitosanului, s-a concentrat pe alegerea adecvată a sursei de chitosan (masa moleculară mare) și în stabilirea unor parametri de reacție, cum ar fi temperatura de sinteză sau timpul de contactare dintre compușii chimici.
- ✓ Sinteza chitosanului funcționalizat în soluție apoasă cu sarea *dibromura de N,N'-difenacil -4,4'-dipiridiliu* s-a realizat în intervalul de temperatură 20°C - 80°C, pentru timp de contactare de până la 120 min (între 15 min.- 120 min.).
- ✓ S-a observat că prin adăugarea de sare N-heterociclică, randamentul de sinteză pentru derivații de chitosan **CHS** indică o creștere moderată, în funcție de modificarea perioadei de contactare între compuși și prin modificarea temperaturii în procesul de sinteză, fiind

obținute randamente >70 % pentru probele uscate.

- ✓ Deși chitosanul nu este total solubil în soluție apoasă, în prezența sării N-heterociclice utilizate în procesul de sinteză, prin agitare mecanică, prin procesul de adsorbție, la lanțul polimeric sunt observate unele modificări, schimbare de culoare în soluțiile probelor, variații de pH și la conductibilitatea soluțiilor filtratelor.
- ✓ Modificările structurale pentru derivații de chitosan **CHS** au fost confirmate prin analiza XRD și spectrele FTIR, la toate probele, și deasemenea sunt susținute de compoziția elementală (C% și N%).
- ✓ Interacțiunile cu chitosanul pentru realizarea de noi derivați funcționalizat sunt confirmate utilizând și alte săruri N heterociclice (*dibromura de N,N'-bis(p-nitro fenacil) - 4,4'- dipiridiliu*; *dibromura de N,N' difenacil-1,2-bis(4- piridil) etan* și respectiv *dibromura de N,N' bis(p-nitro fenacil)-1,2-bis(4- piridil) etan*). Aceste săruri diferă în structura prin prezența unor grupe etilen, poziționate simetric și prezența unor grupări funcționale nitro (NO₂).
- ✓ Modificările structurale din spectrele FTIR la derivații de chitosan funcționalizat confirmă variații în poziția benzilor caracteristice, comparativ cu spectrul chitosanului, fără adaos de sare N-heterociclică, obținute în condiții de sinteză similare, și susțin prezența sărurilor cuaternare în structurile noi; raportul de chitosan:sare fiind de 20:1, datorită masei moleculare mari a sărurile dipiridilice.
- ✓ pH-ul este un parametru important al procesului de sinteză, ce nu poate fi neglijat în obținerea de noi produse, care vor avea proprietăți distincte, solubilizare și caracteristici biologice eficiente, sau potențial antibacterian, necesar în aplicații biomedicale.
- ✓ Studiile de investigare pentru aflarea masei moleculare pentru derivații de chitosan **CHS**, dar și pentru derivații de chitosan funcționalizat cu sărurile cuaternare dipiridilice, produși notați **CHS₁**, **CHS₂**, **CHS₃** și **CHS₄** sunt de interes în obținerea de noi produse, pentru a urmări solubilitatea acestora în mediul apos, pentru pH-ul fiziologic, și a îmbunătăți activitatea antimicrobiană a chitosanului, material versatil cu aplicații multiple.
- ✓ Studiul privind mecanismele care guvernează modul de acțiune al compușilor, în soluție apoasă în realizarea de noi structuri de derivați de chitosan, cu săruri dipiridilice este de larg interes, natura/tipul probelor de chitosan este importantă, masa moleculară și gradul de deacetalare ale chitosanului au un rol decisiv în procesul de sinteză.

5. CERCETĂRI PRIVIND FUNCȚIONALIZAREA CHITOSANULUI CU SĂRURI DICUATERNARE N-HETEROCICLICE, ÎN MEDIU ACID

În studiul prezent se descrie sinteza de noi derivați de chitosan cu *dibromura de N,N'-difenacil- 4,4'-dipiridiliu și N,N'-difenacil)-1,2-bis(4-piridil)etan*, în mediu de acid acetic, pentru o solubilizare eficientă și pentru îmbunătățirea activității antibacteriene a produselor. Rezultatele studiului sunt publicate în *Carbohydrate Research*, **2023**, doi.org/10.1016/j.carres.2023.108964. Se confirmă funcționalizarea chitosanului mult mai eficientă în mediul acetic și influența unor factori pentru îmbunătățirea proprietăților, îndeosebi cele antibacteriene. Cercetările s-au extins și cu alte săruri dipiridinice din aceeași clasă.

5.3.1. Materiale și sinteza sărurilor cuaternare

S-a utilizat chitosan de la sinteza de noi derivați de chitosan în mediu apos (cap. 4; -C₁₂H₂₄N₂O₉, M=340 g·mol⁻¹, DD >75%). Pentru sinteza de noi derivați de chitosan s-au

utilizat sărurile cuaternare dipiridilice, *dibromura N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu* (notată **Sr**) și *dibromura de N,N' difenacil-1,2-bis(4-piridil)etan* (notată **Sm**), aceleași săruri utilizate în cap. 4. Sinteza, purificarea și caracterizarea sărurilor dipiridilice a fost realizată în laboratorul de chimie organică al Facultății de Științe și Mediu, din Universitatea Dunărea de Jos Galați, utilizând toate etapele, așa cum s-a raportat în studiile anterioare. Caracteristicile structurale obținute sunt comparabile cu cele obținute în referințele publicate [Cârâc A. et al., 2018]. Diferența dintre cele două săruri dipiridilice este puntea etilenică în *dibromura de N,N' difenacil-1,2-bis(4-piridil)etan*, care are o mobilitate opțională comparativ cu *dibromura N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu*, unde lipsește această grupare etilenică. Pentru a le diferenția structural am optat să simplificăm uneori notarea lor în text cu notația **Sr** - sare cu punte rigidă, respectiv cu **Sm** - sare cu punte mobilă (**Figura 5.2**).

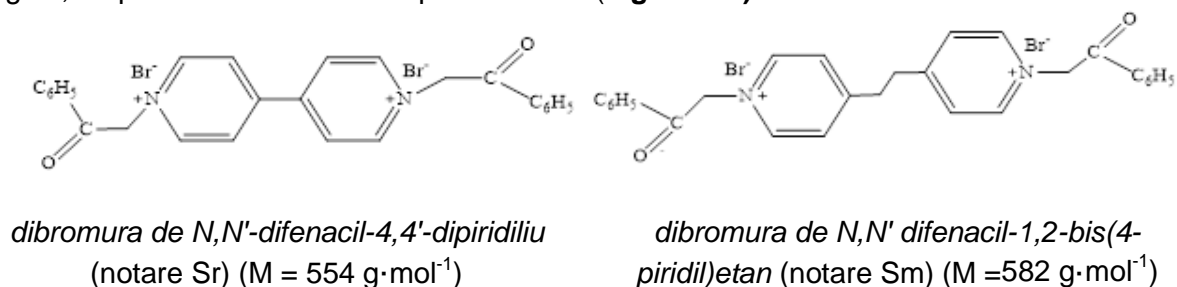
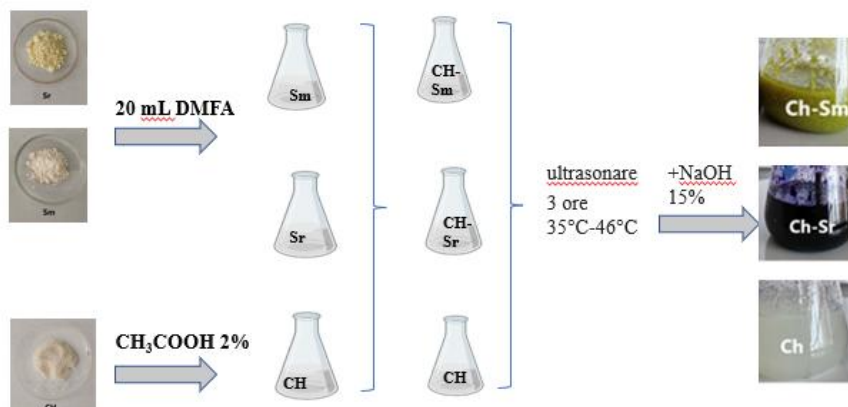


Figura 5.2. Structurile sărurilor cuaternare de dipiridiliu utilizate

5.3.2. Procedeu experimental pentru sinteza de noi derivați de chitosan

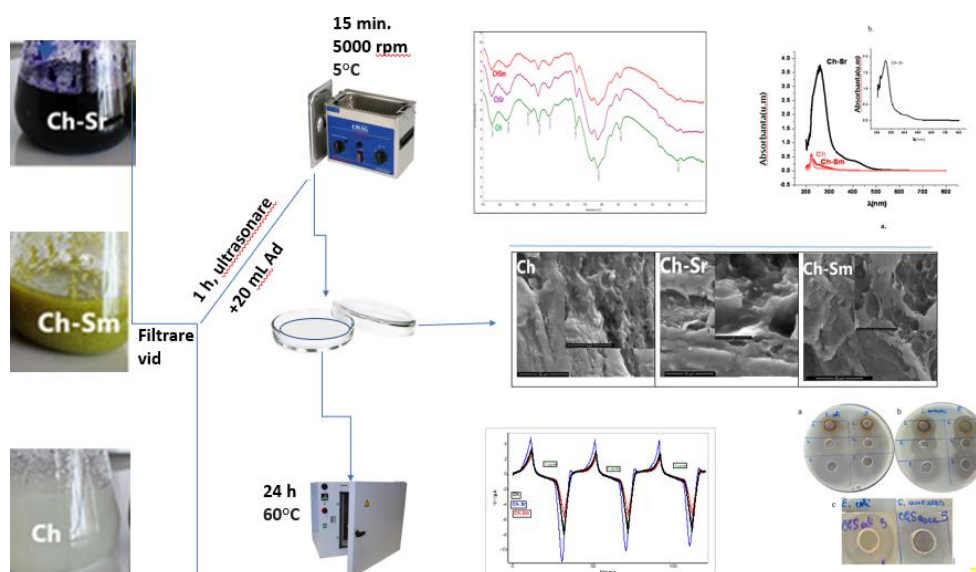
Inițial s-au sintetizat sărurile N-herocicilice de interes, sărurile cuaternare *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu* (**Sr**) și *dibromura de N,N' difenacil-1,2-bis(4-piridil)etan* (**Sm**) (cap. 4.2.1), utilizate apoi la procedura experimentală de funcționalizare a chitosanului (**Schema 5.1**).



Schema 5.1. Sărurile cuaternare dipiridilice și obținerea probelor de chitosan funcționalizat

Procedura de lucru cu etapele desfășurate în sinteza noilor derivați de chitosan funcționalizat utilizând sărurile dipiridilice este redată în **Schema 5.2**. S-au cântărit câte 0,2 g din fiecare sare dipiridilică dizolvate inițial în 20 mL DMFA (N,N-dimetilformamidă). S-au preparat probe din chitosan (2 g) dizolvat în 200 mL acid acetic 2%. S-au preparat apoi

probe de amestec chitosan și sare, în raportul de masă de 10:1, probe în triplicat cu chitosanul dizolvat și 0,2 g din fiecare sare.



Schema 5.2. Reprezentarea etapelor de lucru pentru sinteza și caracterizarea noilor derivați de chitosan funcționalizat, notați **CHSr** și **CHSm**

Probele de amestec chitosan și sare cuaternară dipiridilică au fost menținute într-o baie cu ultrasonare 180 min., la temperatura camerei (35°C - 46°C - temperatură înregistrată în soluție). La finalul experimentelor s-au adăugat câțiva mL de NaOH 15% și s-au observat colorații specifice pentru hidrogelurile rezultate, în funcție de structura chimică a derivaților sintetizați. Probele cu derivatul de chitosan funcționalizat cu *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu (Sr)*, notat **CHSr**, prezintă o culoare violet intensă, iar derivatul de chitosan cu *dibromura de N,N' difenacil-1,2-bis(4-piridil)etan (Sm)*, notat **CHSm** un galben închis. Proba de chitosan fără sare dipiridilică păstrează un alb argintiu. O explicație a culorilor este proprietatea sărurile cuaternare de dipiridiliu, care la tratarea cu baze tari formează compuși ilidici [El-Gharably A.A. et al., 2022; Nadagouda M.N. et al., 2022].

Probele obținute ale noilor compuși au fost filtrate, la o trompă de vid. La filtratele rezultate s-au adăugat 400 mL de apă distilată și amestecul a fost supus la ultrasonare timp de o oră, apoi la centrifugare timp de 15 min. la 5000 rpm, la 5°C. În final, sedimentul rezultat a fost plasat în vase Petri și a fost uscat în etuvă, la 60°C, timp de 24 de ore.

Așadar, probele de chitosan și derivații de chitosan funcționalizat au fost sintetizate în mediu acetic 2% și uscate la temperatura de 60°C. Randamentul de sinteză pentru probele de chitosan funcționalizat a fost > 65 % (65,30 ±0,22, din probe triplicat).

După uscare, probele au fost analizate pentru caracterizare fizico-chimică și structurală, morfologică (echipamente prezentate în **Figura 5.3**) și pentru potențialul antibacterian comparativ cu probele de chitosan obținute în aceleași condiții experimentale. Toate probele pregătite de experimentare au fost păstrate pe baie de ultrasonare pentru dizolvare și omogenizare, cel puțin 60 min. La final în soluțiile obținute s-a măsurat pH-ul (3,5±0,1) și conductivitatea electrică specifică (0,5 mS/cm) (folosind un pHmetru Consort C862).

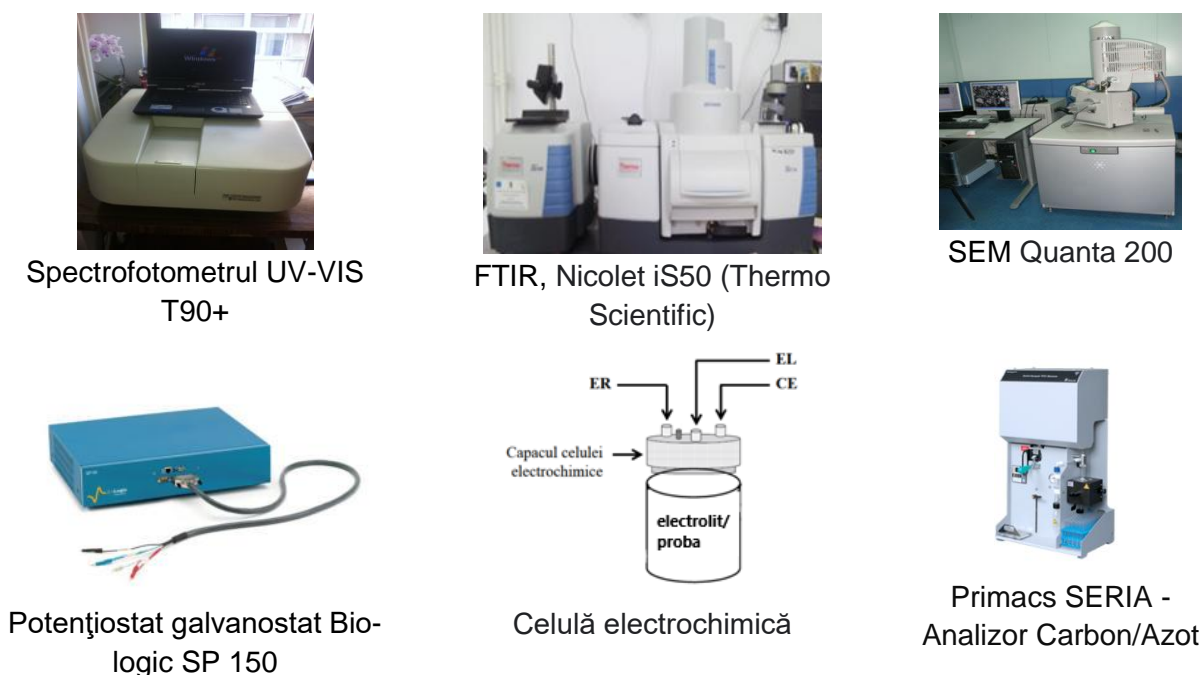
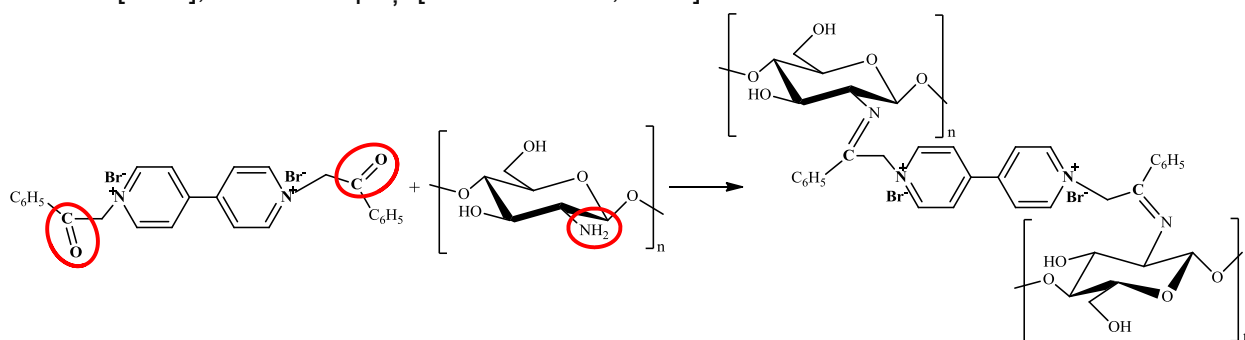


Figura 5.3. Aparatură utilizată pentru caracterizarea derivaților de chitosan funcționalizat

5.3.4. Mecanismul de interacțiune

Procesul de sinteză s-a realizat fără nici o etapă de protejarea a grupărilor hidroxil, folosind două săruri N-heterociclice sintetizate în laborator (**Figura 5.2**), iar propunerea de structură chimică pentru derivatul de chitosan sintetizat cu *dibromura de N,N' difenacil-4,4'-dipiridiliu (Sr)* este prezentată în **Schema 5.3**. Se consideră că sarea de dipiridiliu notată **Sr** poate reacționa cu gruparea amino din structura chitosanului formând un complex de molecule bifuncționale. Sărurile N-heterociclice dipiridilice utilizate în sinteză prezintă citotoxicitate slabă și se poate considera că pot aduce un aport eficient pentru speciile reactive [ROS], în noii compuși [Cârâc A. et al., 2018].



Schema 5.3. Reprezentarea mecanismului de interacțiune chimică dintre chitosan *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu (Sr)*

Funcționalizarea chitosanului s-a realizat cu sarea de dipiridiliu, dizolvată inițial în DMFA, când se obține o structură ilidică. Reacția este un echilibru acido-bazic cu formarea de ilidă, dependentă de capacitatea nucleofilă a carbanionului ilidic [Dinica et al., 2007; Cârâc A. et al., 2018]. În această stare intermediară, sarea cuaternară dipiridilică, prin delocalizarea sarcinii anionice, cu formarea de ion extern reacționează cu gruparea amino liberă de la chitosan generând o legătură stabilă. Fiind o structură simetrică, structura dipiridilică ilidică prin celălalt carbocation stabil se unește cu gruparea amino a altei molecule de chitosan, rezultând o reticulare a moleculelor, formându-se un compus de molecule

bifuncționale. Prin prezența ionilor de azot cationic din inelul heterociclic, produsul obținut poate ataca deasemenea grupe amino libere a aminoacizilor și se pot studia compușii pentru aplicații biomedicale.

5.3.6. Caracterizarea spectroelectrochimică prin UV-VIS

Probele derivaților de chitosan funcționalizat (**CHSr** și **CHSm**) comparativ cu chitosanul fără sare, au fost caracterizate în domeniul UV-VIS, deși chitosanul în sine este transparent și este dificil de caracterizat structural prin metode de spectroscopie spectroscopie [Costea (Nour) I.F. et al., 2022]. Spectrele înregistrate pentru probele derivaților de chitosan 1% ($m_{\text{derivat}}/V_{\text{acid acetic 1\%}}$) au prezentat absorbantă la λ_{max} de 225 nm, chitosanul a prezentat o valoare maximă de 0,49 a.u. iar la derivatul funcționalizat notat **CHSm** valoarea de 0,59 a.u. (Figura 5.4).

În schimb, spectrele derivatului funcționalizat notat **CHSr** indică o absorbantă mult mai mare, de aproximativ opt ori mai intensă în comparație cu derivatul notat **CHSm** și, respectiv proba de chitosan (Figura 5.4). Proba pentru derivatul notat **CHSr** a prezentat un pic cu intensitate mare la λ_{max} de 260 nm, cu absorbantă de 1,9 a.u. în probele diluate în acid acetic (Figura 5.4.b). Spectrele înregistrate confirmă că structura chitosanului are modificări, structura sa este funcționalizată și este de așteptat ca proprietățile să fie diferite de cele ale chitosanului nefuncționalizat.

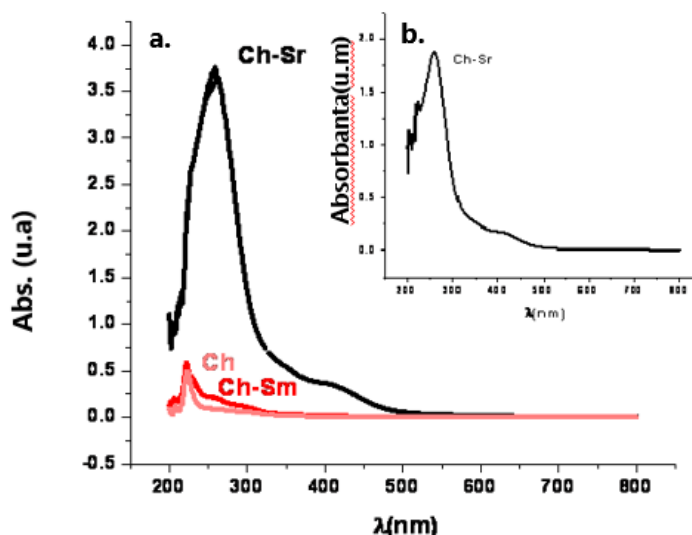


Figura 5.4. Spectre UV-VIS înregistrate la derivații de chitosan funcționalizat notați **CHSr** și **CHSm**, probe dizolvate în acid acetic 1%

Pentru obținerea de derivați de chitosan, pH-ul joacă un rol foarte important în sinteza lor. La pH mai scăzut gruparea amino ($-\text{NH}_2$) este protejată. În cazul derivatului notat **CHSr**, funcționalizarea cu sarea cuaternară de dipiridiliu nu arată modificări de pH în soluții. ($3,50 \pm 0,03$) [Dediu Botezatu A. et al., 2023]. S-au înregistrat spectre și în DMSO, analiza fiind utilă pentru a explora proprietățile de biocompatibilitate a noliilor derivați pentru studiul unor celule umane [Carac A. et al., 2018].

Spectrele obținute în DMSO (soluție aprotică) confirmă, de asemenea, o absorbantă mai mare pentru derivatul de chitosan **CHSr** comparativ cu derivatul de chitosan **CHSm** și respectiv chitosanul fără adaos de sare (Figura 5.5), dar absorbantă are o intensitate mai redusă comparativ cu spectrele înregistrate în mediul de acid acetic (Figura 5.4). Acest rezultat este o confirmare a prezenței perechilor de ioni în structura derivaților de chitosan

CHSr, aranjamente structurale mai favorabile în mediul acetic decât în DMSO (un solvent aprotic).

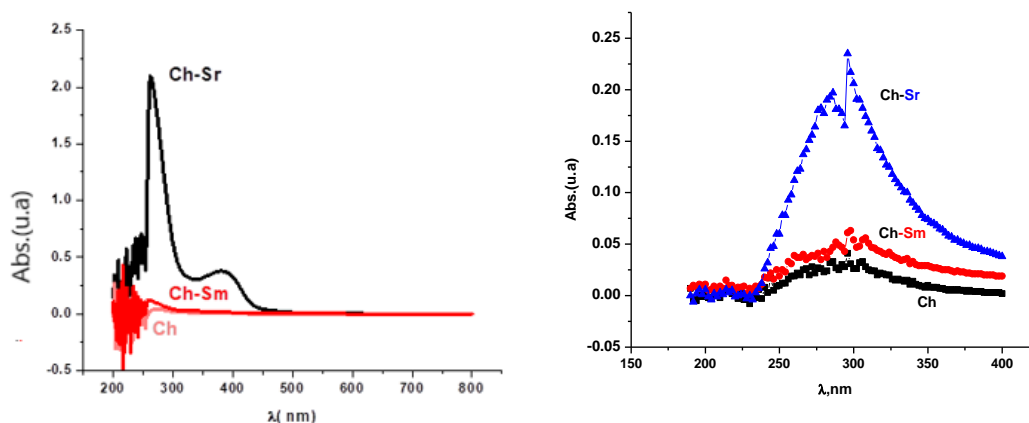


Figura 5.5. Spectre UV-VIS la derivații de chitosan funcționalizat, notați **CHSr** și **CHSm**, probe dizolvate în DMSO

5.3.7. Caracterizarea structurală prin FTIR

Funcționalizarea chitosanului (masă de greutate mare HMW) cu cele două săruri N-heterociclice cuaternare dipiridilice și obținerea de noi derivați de chitosan este confirmată și prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) (**Figura 5.6**). Analiza FTIR este utilă pentru caracterizarea biopolimerilor, deoarece oferă informații despre structura moleculară a compușilor chimici [Sánchez-Cid P. et al., 2022; Wei H. et al., 2022].

Spectrele în infraroșu ale noilor derivați funcționalizați au prezentat benzi caracteristice pentru grupările funcționale ale chitosanului, unitățile de glicozamide și respectiv pentru grupările funcționale din structura chimică a sărurilor N-heterociclice.

În spectrul chitosanului pur s-au identificat benzile specifice structurii sale chimice, respectiv o bandă largă de absorbție în regiunea $3320 - 3292 \text{ cm}^{-1}$, care este o vibrație specifică întinderii O-H și întinderii N-H. Apare în spectru de asemenea suprapunerea întinderii grupului O-H din inelul glucidic, la 2875 cm^{-1} specifică întinderii C-H, la $1650-1655 \text{ cm}^{-1}$, banda de vibrație specifică amidei I și, de asemenea, vibrațiile de deformare a aminei, la 1558 cm^{-1} , benzi de vibrație ale *îndoirii*, N-H din amină și amida II, la 1375 cm^{-1} , o bandă specifică deformării simetrice CH_3 și la 1026 cm^{-1} , o bandă specifică vibrației scheletice de întindere C-O [Wei H. et al., 2022]. În spectrul chitosanului derivat funcționalizat notat **CHSr** banda de absorbție observată la 2934 cm^{-1} este specifică întinderii C-H, la 3292 cm^{-1} este specifică întinderii O-H, la 1655 cm^{-1} pentru N-H și întinderea din grupa funcțională $-\text{CONH}-$, iar benzile de la 1201 cm^{-1} și 1313 cm^{-1} sunt specifice deformării simetrice CH_3 și respectiv la 895 cm^{-1} , C-H vibrații de încovoiere în afara planului. Prezența inelului aromatic este confirmată de mai multe poziții ale benzilor, care sunt mai intense în regiunile $1539-1560 \text{ cm}^{-1}$ și $834-897 \text{ cm}^{-1}$.

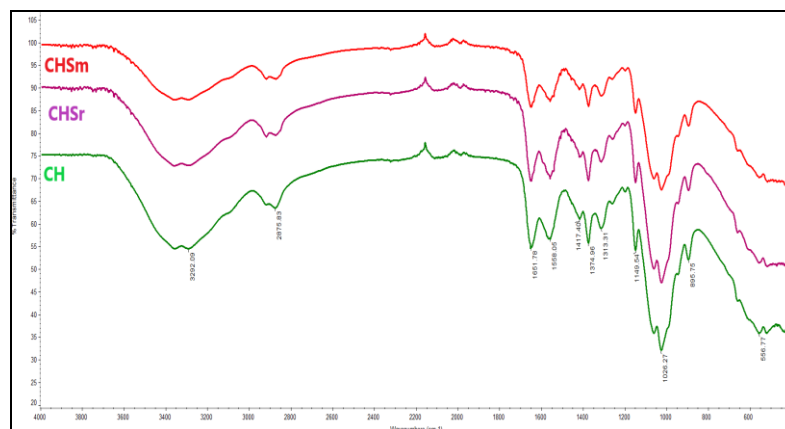


Figura 5.6. Spectre FTIR la derivații de chitosan funcționalizat (**CHSr** și **CHSm**)

5.3.8. Determinarea masei moleculare prin măsurători vâscozimetrice

Caracterizarea reologică a structurilor de chitosan și a derivaților este importantă în vederea caracterizării proprietăților hidrodinamice a polimerilor și cu scopul de a determina masa moleculară medie [Kandile N.G. et al., 2015].

Masa moleculară medie (MM) a probelor derivaților de chitosan funcționalizat (**CHSr** și **CHSm**), comparativ cu chitosanul a fost analizată din probe uscate ale derivaților obținute, raportul de masă de chitosan:sare fiind 10:1 (cap. 5.3.3), din serii de cinci soluții diluate, dizolvate în mediu acetic 1%, probe păstrate în baia cu ultrasunare, timp de o oră, pentru omogenizare.

Din măsurătorile timpilor de curgere efectuate la soluțiile probelor s-a calculat vâscozitatea cinematică și vâscozitatea intrinsecă, iar prin reprezentare grafică (**Figura 5.8**), folosind ecuația $[\eta]=k \cdot M^a$ (M este vâscozitatea medie a greutatei moleculare, $[\eta]$ vâscozitatea intrinsecă, k ($1,424 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$) și a (0,96) valori, constante), din datele prezentate se obține masa moleculară medie. Pentru derivatul de chitosan funcționalizat notat **CHSr** se obține o valoare de 692 g/mol (Da) și derivatul de chitosan notat **CHSm** de 670 g/mol (Da), în comparație cu valoare de 657 g/mol (Da) pentru chitosan (**CH**).

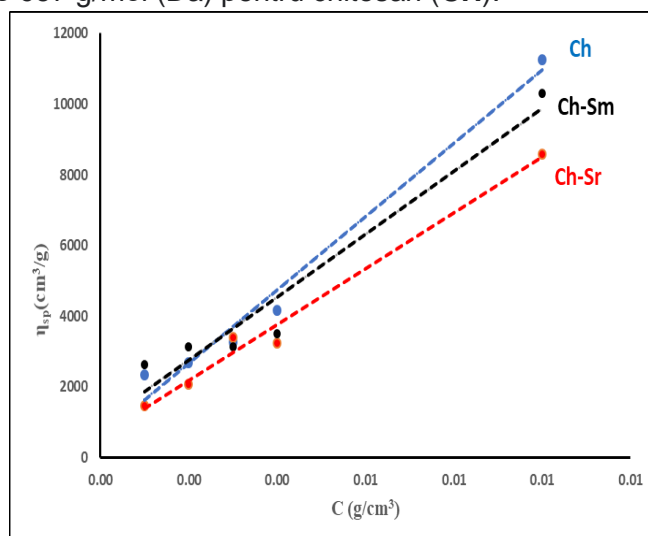


Figura 5.8. Vâscozitatea intrinsecă la derivații de chitosan funcționalizat notați **CHSr** și **CHSm**, comparativ cu chitosanul (**CH**)

Apar modificări ale masei moleculare medii ale derivaților de chitosan, în funcție de structura sării N-heterociclice utilizate în funcționalizarea chitosanului, valorile sunt mai mari la utilizarea de sare cuaternară, notată **Sr**, comparativ cu sarea notată **Sm**, decât la chitosanul obținut fără sare, în aceleași condiții de sinteză.

5.3.9. Evaluare electrochimică a activității antioxidante prin potențial de circuit deschis (OCP) și voltametrie ciclică (CV)

Activitatea antioxidantă la derivații de chitosan sintetizați a fost evaluată prin studiul electrochimic, prin rezultate înregistrate ale potențialului de circuit deschis (OCP) și prin voltametrie ciclică (CV) înregistrând voltamograme, în solventul aprotic DMSO, fără utilizarea de suport electrolic în probe, experimente realizate în triplicat. Evaluarea electrochimică al electrodului de lucru (EL), electrodul de carbon, a fost studiată în celula electrochimică clasică cu trei electrozi (**Figura 5.3**), în care domeniul de potențial aplicat a fost între ± 1 V/ $E_{Ag/AgCl_{sat}}$. Procesele de reducere și cele de oxidare în probe sunt suficient de rapide încât se mențin condițiile de echilibru la suprafața electrodului de lucru (carbon).

Pentru măsurători de OCP, pentru derivatul de chitosan notat **CHSr**, sunt valori pozitive și ușoară creștere în timp (de la 0,04 V la 0,1 V/ $E_{Ag/AgCl_{sat}}$), iar derivatul de chitosan notat **CHSm** valori mai pozitive de potențial ($0,2 \pm 0,02$ V / $E_{Ag/AgCl_{sat}}$). $AgCl_{sat}$) comparativ cu probele de chitosan, notate **CH** ($0,18 \pm 0,01$ V / $E_{Ag/AgCl_{sat}}$) (**Figura 5.9**). Este de așteptat ca probele derivatului de chitosan notat **CHSr** să prezinte capacitate de schimburi redox, rezultatele indicând prezența mai multor specii electroactive în probe. Prin structura funcționalizată a chitosanului și activitatea antioxidantă a biopolimerilor se poate îmbunătăți.

Prin voltametrie ciclică (CV) se pot obține informații privind mecanismul de desfășurare a reacției electrochimice, identificarea speciilor prezente în soluție, determinarea coeficienților de difuzie a speciilor electroactive. Cel mai simplu mecanism posibil este oxidarea sau reducerea cu transfer de un electron între speciile din soluție și electrodul de lucru (reacția reversibilă $O_x + e \leftrightarrow R_{ed}$) [Da Silva S.B. et al., 2018; Sato K. et al., 2018].

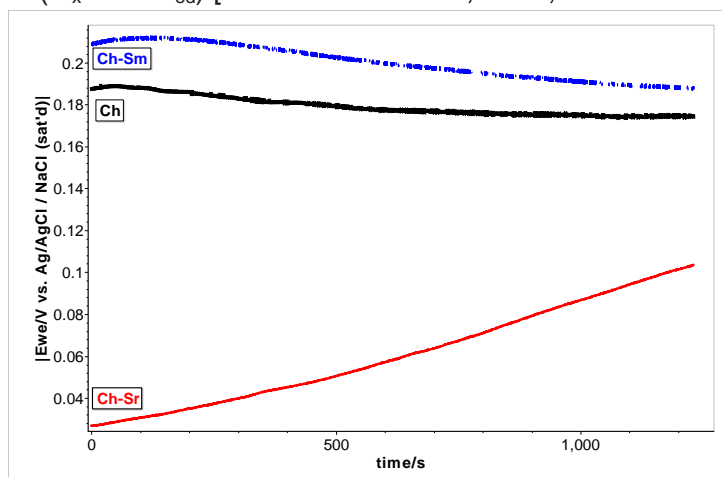


Figura 5.9. Evoluția valorilor de potențial de circuit deschis (OCP) înregistrată la derivații de chitosan funcționalizat **CHSr** și **CHSm**, **CH** până la 20 min.

Pentru derivatul de chitosan funcționalizat s-au realizat experimente la trei viteze de scanare diferite, la 20, 50 și 100 $mV s^{-1}$, pentru 3 cicluri de înregistrare, pentru potențialul aplicat între ± 1 V/ $E_{Ag/AgCl_{sat}}$ (**Figura 5.10**; **Figura 5.11**). Voltamogramele ciclice înregistrate la soluțiile probelor, în DMSO au indicat o creștere a curentului anodic (I_{pa}) când crește viteza de scanare. Pentru viteza de scanare de 100 $mV s^{-1}$, pentru derivatul de chitosan **CHSr** se obține pentru curentul anodic I_{pa} o valoare maximă de până la 4,4 μA , la potențial de

întoarcere. La derivatul de chitosan funcționalizat, notat **CHSm** valoarea de curent anodic este mai redusă, I_{p_a} de circa 3,2 μA , iar pentru chitosan fără sare este I_{p_a} de 3,8 μA (**Figura 5.10**).

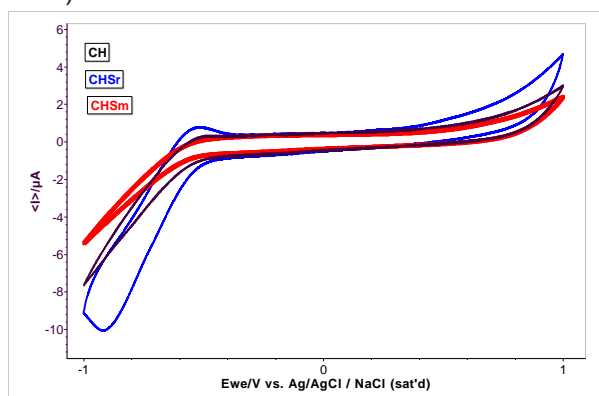


Figura 5.10. Voltamograme ciclice înregistrate la derivații de chitosan funcționalizat (CHSr și CHSm) în DMSO, $E_{\text{Ag/AgCl sat}} \pm 0.1 \text{ V}$, viteza de scanare de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

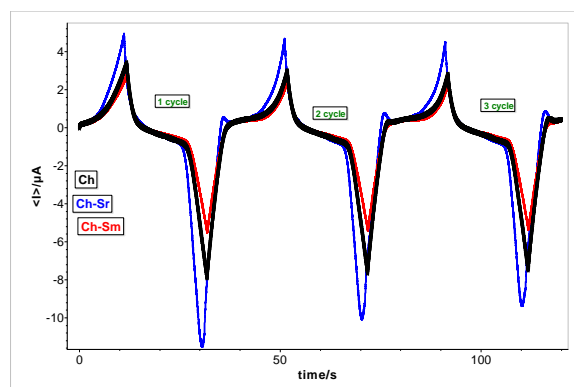
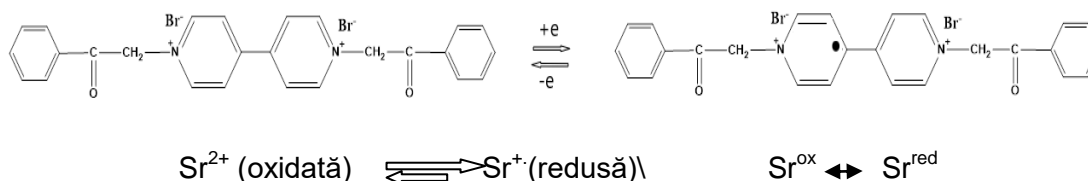


Figura 5.11. Voltamograme înregistrate la derivații de chitosan funcționalizat (CHSr și CHSm) în DMSO, $E_{\text{Ag/AgCl sat}} \pm 0.1 \text{ V}$, viteza de scanare de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, trei cicluri

Tabelul 5.3. Evoluția intensității curentului anodic (I_{p_a}) la chitosan și derivații de chitosan funcționalizat, la modificarea vitezei de scanare și diferite cicluri de înregistrare

Viteza de scanare ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)	CH			CHSr			CHSm		
	$-I_{p_a}$ (μA)								
	1 st	2 nd	3 th	1 st	2 nd	3 th	1 st	2 nd	3 th
100	7.87	7.598	7.40	11.54/ 10.89	10.07/ 9.20	9.36/ 8.46	5.49	5.42	5.39
50	8.66	7.85/ 7.20	7.62/ 6.93	8.47/ 6.94	7.77/ 6.40	7.57/ 6.28	6.09	5.88	5.76
20	5.55	5.06/ 4.99	4.71/ 4.55	5.84/ 4.70	5.49/ 4.37	5.48/ 4.40	5.03	4.87	4.81

O reacție electrochimică însoțită de modificări ale structurii nucleului heterociclic pentru sarea bipiridilică cuaternară, notată $\text{Sr}/2\text{Br}^-$ în forma stării oxidată (stânga) și în starea sa redusă (dreapta) este redată mai jos:



Pentru un electron, pentru o reacție ireversibilă, vârfurile picurilor de curent catodic și anodic nu sunt egale și unde oxidarea este foarte lentă, nu se observă un vârf catodic de electroni în grupările funcționale pe structura chitosanului [Qin Y. et al., 2020].

Prin participarea la reacție cu delocalizarea sarcinii anionice, în derivații de chitosan, sarea cuaternară dipiridilică contribuie astfel la reacțiile electrochimice prin grupările funcționale electroactive. După finalizarea experimentelor CV, s-au înregistrat la probe

spetrele UV-VIS, în DMSO, care au indicat modificări ale profilului, comparativ cu spectrele înregistrate inițial, și se observă în general o creștere a absorbanței (**Figura 5.13**).

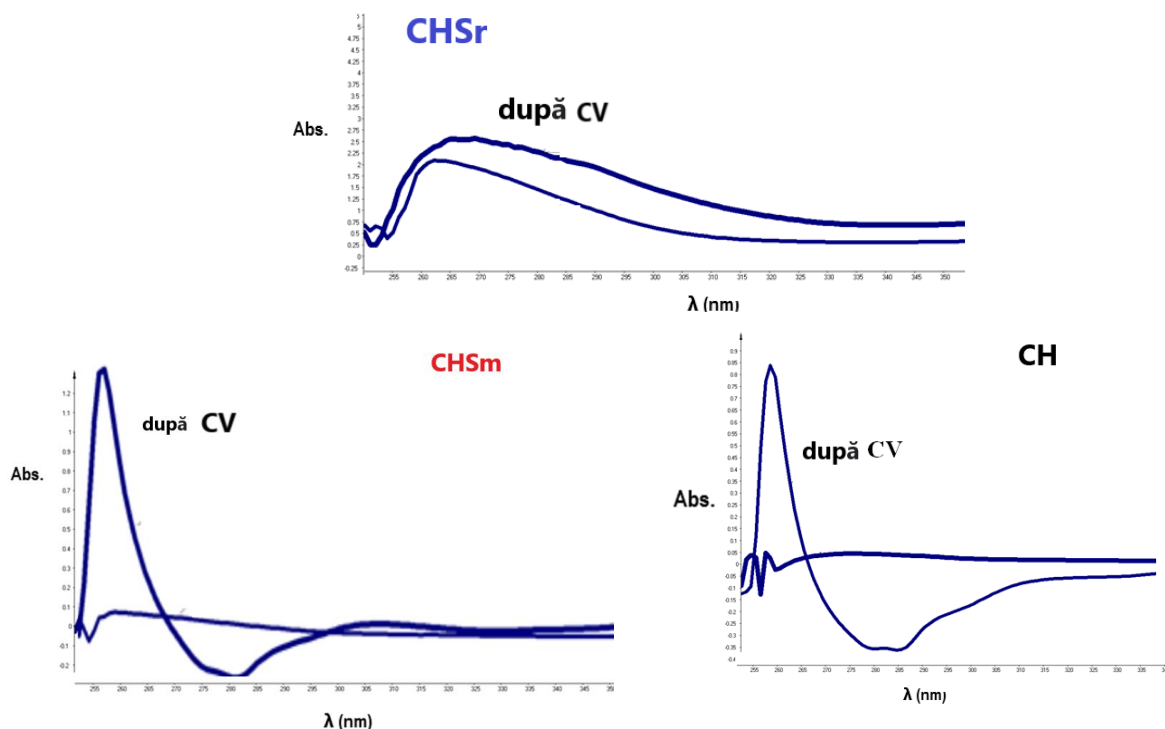


Figure 5.13. Spectre UV-Vis la derivații de chitosan funcționalizat (**CHSr** și **CHSm**), probe dizolvate în DMSO, înainte și după experimente de voltametrie ciclică

În cazul derivatului funcționalizat notat **CHSr**, creșterea absorbantei este mai evidentă de la λ de 255 nm până la 300 nm, pe când pentru derivatul notat **CHSm** este un pic reprezentativ în jurul λ de 260 nm, cu profil asemănător cu al probei de chitosan, fără adaos de sare. Prin urmare, voltametria ciclică (CV) este un instrument util pentru a caracteriza activitatea antioxidantă a derivaților de chitosan, pentru că oferă indicii utile în proprietățile spectrale, morfologice privind schimbul electronic între grupările funcționale, din structura polimerică a derivaților de chitosan funcționalizat.

5.3.11. Analiza morfologică structurală prin microscopie electronică cu scanare (SEM)

Studiul morfologic al suprafețelor derivaților de chitosan funcționalizat cu sărurile N-heterociclice s-a realizat folosind imagini din micrografii electronice cu scanare (SEM). Imaginile SEM ale derivaților de chitosan funcționalizat, **CHSr** și **CHSm**, se prezintă ca o structură microporoasă polifazică. Dimensiunile porilor sunt neuniforme, pereți subțiri, prezintă microvilozități scurte și numeroase. Se poate afirma un aspect de structură bifuncțională pentru derivatul notat **CHSr**(**Figura 5.16**). Analiza compozițională prin EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy), realizată pe imaginile SEM a relevat prezența elementelor chimice esențiale carbon (C),oxigen (O) și azot (N).

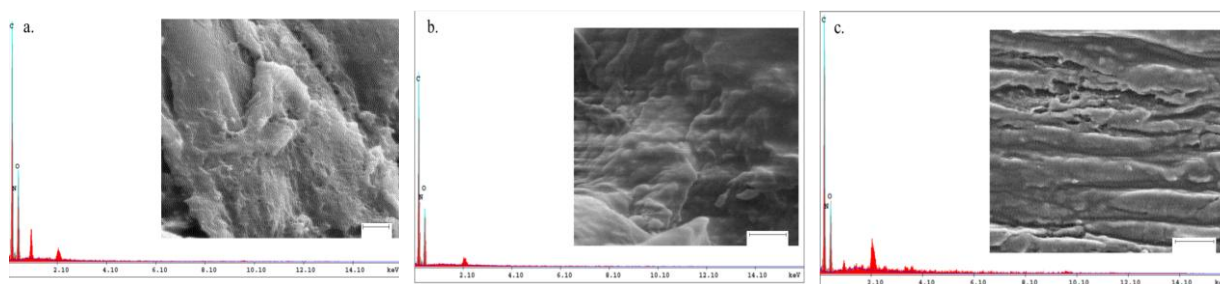


Figura 5.16. Spectre EDX la imagini SEM selectate pentru chitosan (a) și derivații de chitosan funcționalizat notați **CHSr** (b), **CHSm** (c)

5.4. Evaluarea potențialului antibacterian a derivaților de chitosan cu *dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu* și *dibromura de N,N'-difenacil 1,2-bis(4-piridil)etan*

S-au preparat probe din derivații de chitosan funcționalizat (**CHSr** și **CHSm**), soluții în acid acetic 1%, și apoi diluții diferite pe care s-a testat activitatea antibacteriană față de microorganisme patogene (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) și non-patogene (*Sacharomyces cerevisiae*, *Candia sp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Bacillus subtilis*).

S-a testat potențialul antibacterian și activitatea antipatogenică a probelor.

5.4.1. Inhibarea microorganismelor patogene

Activitatea antimicrobiană la probele derivaților de chitosan funcționalizat a fost testată împotriva unei bacterii Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922) și a două bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Listeria monocytogenes* Scott A). Au fost utilizate mediul neselectiv, Brain Heart Infusion (Oxoid, Hampshire, Regatul Unit) pentru cultivarea *Listeria monocytogenes* și mediul Muller-Hinton (Scharlau, Barcelona, Spania) pentru *Escherichia coli* și, respectiv, *Staphylococcus aureus*. O colonie din fiecare tulpină a fost inoculată pe mediul specificat și fost termostată la 37°C timp de 18 ore, pentru a ajunge în faza staționară. de creștere. Activitatea antibacteriană *in vitro* a fost testată prin metoda difuzimetrică din godeuri decupate în mediul agarizat [Verlee A. et al., 2017]. În vase Petri sterile a fost turnat un strat de mediu de cultură specific cu agar 1,5%, după fluidizarea acestuia la 45°C. Apoi, 10 uL din fiecare dintre culturile *over night* au fost inoculate în 7 mL de mediu de agar topit (42°C) și s-a turnat al doilea strat peste primul strat de mediu, pentru a ajunge la o concentrație finală de 10⁷ ufc/placă. După solidificarea mediului, s-au creat godeuri cu diametre de 9 mm în care s-au introdus 100 μL de probă. Condițiile de incubare la probe au fost de 37°C timp de 24 h.

În **Figura 5.17** este evidențiată activitatea antimicrobiană a chitosanului și a derivaților săi împotriva tulpinilor patogene de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. Rezultatele au arătat că, pentru aceeași concentrație, activitatea derivaților notați **CHSr** și **CHSm** față de ambele bacterii patogene este similară cu a probelor de chitosan, diametrul zonelor de inhibiție este specificat în **Tabelul 5.4**.

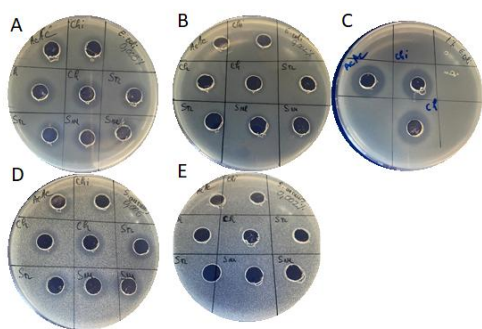


Figura 5.17. Activitatea antimicrobiană a chitosanului (CH) și derivaților de chitosan CHSr și CHSm în concentrație de 0.05% (A, D), 0.02 % (B, E) împotriva tulpinilor patogene de *Escherichia coli* (A, B) și *Staphylococcus aureus* (D, E). Activitatea anti- *Escherichia coli* în acetic acid 1% și chitosan (C)

Tabelul 5.4. Evoluția activității chitosanului (CH) și a derivaților de chitosan funcționalizat, împotriva tulpinilor patogene de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*

Probe	Concentrația %	Bacterii <i>E. coli</i>	Bacterii <i>S. aureus</i>
Ch	0.05	11±0.51	8±0.32
	0.02	7±0.52	6±0.34
Ch-DPE	0.05	14±0.4	12±0.31
	0.02	10±0.21	ND
	0.01	ND	ND
Ch-DP	0.05	15±0.8	14±0.58
	0.02	11±0.58	ND
	0.01	ND	ND



Figura 5.18. Activitatea antibacteriană la derivații de chitosan și chitosan (CH) împotriva *Bacilului cereus*

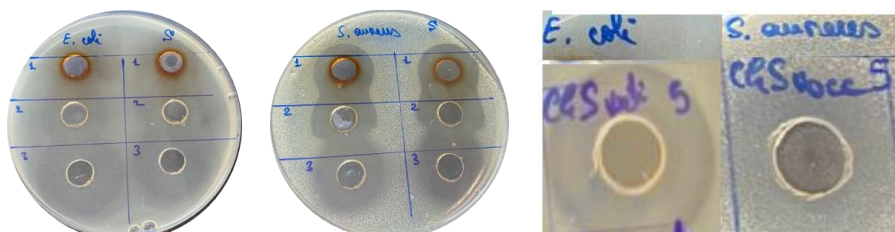


Figura 5.19. Activitatea antibacteriană (metoda difuzimetrică) a sării cuaternare Sr împotriva (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus* și c) pentru derivatul CHSr cu *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*

Studiile preliminare au arătat totuși că chitosanul și derivații săi manifestă o inhibare clară a speciei sporulate Gram pozitive *Bacilului cereus* (5 mm), în mediu acid 0,01% (**Figura 5.18**). Concentrațiile minime inhibitorii (MIC) pentru probele testate împotriva *Escherichia coli* sunt de 0,02% și, respectiv, 0,05% față de *Staphylococcus aureus* (**Figura 5.19**). Nu a fost observată activitate față de *Listeria monocytogenes* [Botezatu Dediu A.V. et al., 2023].

Se știe deja că chitosanul prezintă activitate antimicrobiană numai în mediu cu pH acid datorită aminelor sale policationice care interacționează cu moleculele încărcate negativ existente la suprafața bacteriilor, modificând polaritatea și permeabilitatea membranelor și ulterior inhibând creșterea microorganismului. Pentru derivații de chitosan funcționalizat nu sunt modificări esențiale îmbunătățite, dar nu se pierde activitatea antimicrobiană a chitosanului.

Rezultatele obținute sunt în acord cu alte studii similare [Chylinska M. et al., 2019; Kritchenkov A.S. et al., 2020] în care se subliniază că chitosanul are o influență mai puternică asupra bacteriilor Gram-negativ decât asupra celor Gram-pozitive. Explicația este construită pe structura peretelui celular, având în vedere că membrana exterioră care are molecule încărcate negativ este absentă din bacteriile Gram-pozitive, iar stratul de peptidoglican este mai gros decât la cele Gram-negativ. Se consideră că există un complex de factori care interferează în efectuarea acțiunii antimicrobiene a chitosanului și a derivaților

săi, inclusiv gradul de deacetilare, concentrația acestora, pH-ul și prezența halogenului [Chaudhary et al., 2020; Ibanez P. et al., 2020].

5.6. Concluzii

- ✓ Derivații de chitosan funcționalizați cu compuși organici sunt considerați biomateriale interesante pentru aplicații medicale îndeosebi datorită activității lor antimicrobiene potențiale, biocompatibilității, biodegradabilității și a nontoxicității.
- ✓ S-a realizat modificarea chimică a chitosanului solubil în mediu acetic prin introducerea de săruri cuaternare dipiridilice, care funcționalizează structura polimerului.
- ✓ S-au sintetizat derivați de chitosan funcționalizați utilizând săruri de *dibromura N,N'-di fenacil-4,4'-dipiridiliu (S1)* și *dibromura N,N' difenacil-1,2- bis(4-piridil)etan (S2)*, săruri ce diferă printr-o grupare etilenică în plus la compusul notat S2, procedeu realizat în mediu de acid acetic 2 %, pe baie cu ultrasonare, timp de 3 h. Produsul de polimer de chitosan funcționalizat, obținut în urma reacției de sinteză a fost precipitat cu NaOH 15 %, uscat, purificat și analizat.
- ✓ Sinteza de noi derivați de chitosan decurge în două etape: în prima etapă se obține chitosan funcționalizat pe situri marginale și apoi se produce formarea de molecule bifuncționale heterociclice, prin legătura cu gruparea amino de la molecula de chitosan și carbocationul ilidic din structura sării dipiridilice.
- ✓ Raportul de masă între chitosan și sarea N heterociclică a fost de 10:1, și s-a obținut un randament de sinteză de peste 65 %, pentru probele de polimer funcționalizat, uscate la 60°C.
- ✓ Compoziția elementală pentru conținutul total de C (%) și N (%) a confirmat sinteza de noi derivați de chitosan, modificați chimic cu sărurile cuaternare N-heterociclice care au favorizat interacțiunea acestora în lanțul polimeric al chitosanului, și astfel obținerea de noi materiale cu proprietăți specifice.
- ✓ Noii derivați de chitosan cuaternizați cu sărurile N-heterociclice au fost caracterizați spectroelectrochimic, prin spectroscopie UV-VIS, prin dizolvare în mediu de acid acetic și în stare solidă prin spectrometrie în infraroșu (FTIR).
- ✓ Se confirmă modificări și diferențieri în structura polimerului, prin interacțiunea chimică cu structura sării dipiridilice, utilizată în sinteză, având masă moleculară diferită.
- ✓ În spectrele FTIR au fost identificate benzile de adsorbție caracteristice ale grupelor funcționale ale chitosanului, ce reflectă structura chimică, precum și diferențele structurale care pot fi induse de tipul și cantitatea de sare utilizată în procesul de sinteză. Informațiile spectrale din infraroșu pot fi considerate o metodă analitică simplă și rapidă în dezvoltarea și exploatarea etapelor proceselor pentru funcționalizarea selectivă a chitosanului.
- ✓ Evaluarea electrochimică realizată prin voltametrie ciclică (CV) indică capacitate de activitate redox, îmbunătățită pentru chitosanul funcționalizat, potențial antioxidant în derivatul notat **CHS1** (cu *dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu*).
- ✓ Imaginile SEM confirmă schimbări în ceea ce privește morfologia chitosanului după reacția sa cu sărurile dipiridilice, trecând la o structură microporoasă polifazică.
- ✓ Noii derivați de chitosan funcționalizat notați **CHS1** (*dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu*) și **CHS2** (*dibromura N,N' difenacil-1,2- bis(4-piridil)etan*) au fost evaluați morfologic prin microscopie electronică cu scanare (SEM) și s-a demonstrat că pot prezenta o activitate antimicrobiană îmbunătățită pentru *Bacillus subtilis*, împotriva *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* în comparație cu chitosanul și cu sărurile N-heterociclice.

- ✓ Sinteza de noi derivați de chitosan modificați chimic cu săruri N-heterociclice confirmă obținerea de noi materiale cu proprietăți biologice și proprietăți fotochimice specifice; prin proprietățile îmbunătățite pot oferi o nouă perspectivă în aplicațiile biomedicale.

6. HIDROGELURI CU CHITOSAN CA BIOMATERIALE PENTRU APLICAȚII MEDICALE

Se prezintă o scurtă documentare privind hidrogelurile și importanța lor medicală, și explorare în funcționalizarea chitosanului ca hidrogeluri cu săruri cuaternare dipiridilice, prin inițierea de astfel de studii pentru a urmări proprietățile antimicrobiene.

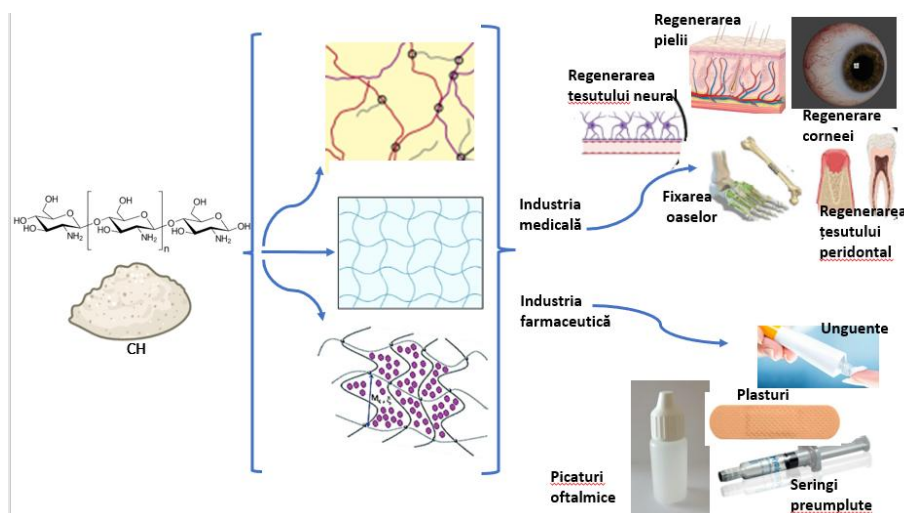
6.3. Aplicații biomedicale pentru hidrogelurile pe bază de chitosan

Cele mai multe aplicații pentru hidrogeluri au fost raportate în medicină și anume în sistemele de eliberare controlată a medicamentelor [Nazir I. et al., 2019; Tao G. et al., 2019]. Pentru aplicații biomedicale, chitosanul este utilizat intens pentru caracteristicile sale speciale (**Schema 6.1**). Chitosanul cu formă cationică permite acestuia să interacționeze cu polimeri sau macromolecule care sunt de natură anionică și au anumiți polianioni. Aceste interacțiuni sunt folosite și pentru a produce nanoparticule de chitosan [Wei H. et al., 2022]. Dezvoltarea avansată a hidrogelurilor pe bază de chitosan a condus la sisteme noi de încorporare și de transport a medicamentele în diferite medii [Wei H. et al., 2022; Tao M. et al., 2019;].

Hidrogelurile sunt studiate ca sisteme locale de livrare a medicamentelor deoarece posedă proprietăți de autoreglare [Nazir I. et al., 2019; Xu Y. et al., 2019], biodegradare controlată [Takei T. et al., 2020; Martău G.A. et al., 2019] și capacitate de a proteja medicamentele labile în vederea livrării la locul sau organul țintă [Zhou J. et al., 2019; Affes S. et al., 2021].

Dezvoltarea sistemelor de eliberare a medicamentelor polimerice ca alternativă la formulările convenționale de medicamente a crescut constant de câteva decenii, preocuparea cea mai mare fiind în încercarea de abordare a disponibilității locale inadecvată a medicamentelor și provocările asociate cu locurile de livrare [Affes S. et al., 2021; Xu Y. et al., 2019].

Prin proprietățile specifice chitosanul rămâne un material versatil cu aplicații diverse în domeniul biotehnologiei și biomedical (preparate cu eliberare controlată) [Nazir I. et al., 2019; Xu Y. et al., 2019]. Alegerea unei metode adecvate pentru detectarea și cuantificarea medicamentelor eliberate din sistemele de livrare a hidrogelului depinde în primul rând de tipul de medicament. Sistemele de administrare a medicamentelor cu hidrogel se bazează pe aceleași tehnologii analitice, de la cele mai ieftine și mai practice tehnici de spectroscopie optică [Takei T. et al., 2020; Tao G. et al., 2019], până la cele mai selective, sensibile și costisitoare, cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) [Zhang H. et al., 2020], spectrometrie de masă [Liu T. et al., 2020; Tao M. et al., 2019] sau reacție în lanț a polimerazei (PCR).



Schema 6.1. Aplicații biomedicale pentru hidrogeluri pe bază de chitosan

Hidrogelurile pe bază de chitosan au arătat un potențial mare și au atras o atenție considerabilă în ultimii ani și pentru biosenzori și materiale de ambalare. Aceste materiale acționează ca o punte pentru a conecta biologia și electronică, iar analiții pot fi recunoscuți de bio-elemente, precum anticorpii. Apoi, interacțiunea este transferată la semnale optice/electronice, care sunt în cele din urmă amplificate în rezultate măsurabile [Wang Y. et al., 2020]. Proprietățile hidrogelurilor pe bază de chitosan (bioactivități excelente, sensibilitate la stimuli, capacitate de încorporare, umflare, biodegradabilitate, nontoxicitate și costuri reduse) au permis extinderea acestora și utilizarea în biosenzori.

Modificările hidrogelurilor cauzate de factori externi (de exemplu, pH-ul și temperatură) pot fi utilizate ca semnal pentru a răspunde la nivelul unui sistem [Liu T. et al., 2020]. Comportamentul de răspuns al hidrogelurilor poate fi modificat prin selectarea materiilor prime și a metodelor de reticulare [Pinelli F. et al., 2021; Rossi F. et al., 2020]. Aceste caracteristici au deschis calea pentru aplicarea hidrogelurilor ca biosenzori, care au fost aplicate pe scară largă în diverse domenii, cum ar fi industria alimentară sau ingineria tisulară. O atenție considerabilă în ultimii ani, s-a acordat acestor materiale, pe bază de chitosan, deoarece oferă informații de calitate în timp real despre alimente, care pot satisface cerințele oamenilor pentru alimente de înaltă calitate și siguranță [Yang J. et al., 2021]. Alte studii au raportat informații referitoare la aplicațiile hidrogelurilor pe bază de chitosan ca sisteme de livrare în medicină datorită proprietăților și comportamentului hidrogelului cu aplicarea sa ulterioară în biosenzori [Fu S. et al., 2021; Liao H. et al., 2019].

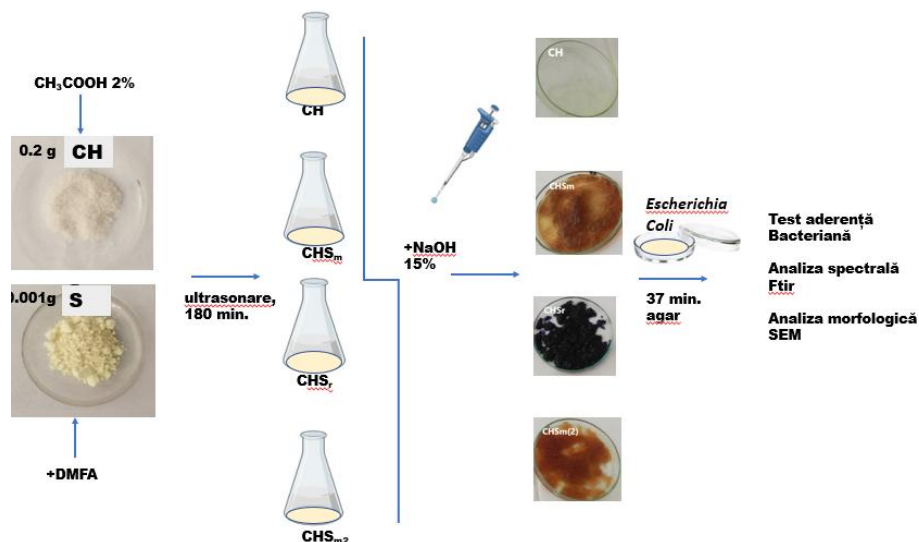
6.4. Obținerea de hidrogeluri pe bază de chitosan cu săruri cuaternare de dipiridiliu

Chitosanul prezintă proprietăți antimicrobiene și biocompatibile și servește și ca un bun bio-adeziv [Li J. et al., 2022]. Astfel, hidrogelurile pe bază de chitosan prezintă un mare potențial de a construi o interfață simplă, biocompatibilă și multifuncțională între biologie și electronică.

6.4.1. Metode de obținere

Pentru sinteză s-a utilizat pulbere de chitosan (**CH**), $C_{12}H_{24}N_2O_9$, chitină poli (D-glucozamină) deacetilată ($M=340 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Sigma-Aldrich) și sărurile cuaternare de dipiridiliu. Procedul de sinteză a inclus 2 g de chitosan dizolvat în acid acetic 2% și câte 0,010 g de sare N heterociclică, dizolvată în DMFA. Sărurile folosite au fost *dibromura de N,N'-difenacil-*

4,4'-dipiridiliu (Sr), dibromura de *N,N'*-difenacil-1,2- bis(4-piridil)etan (Sm) și dibromura de *N,N'* bis(*p*-nitro fenacil)-1,2-bis(4- piridil) etan (Sm2). Probele au fost supuse ultrasonării timp de 180 min., la temperatura camerei. La adăugare de soluție NaOH 15% s-au obținut probe având consistență de gel și culori diferite, în funcție de natura sării utilizate. Considerăm că DMFA, un solvent polar aprotic are un rol de stabilizator în reticulare în obținerea hidrogelurilor cu chitosan [Heravi M.M. et al., 2018]. Etapele de obținere a hidrogelurilor sintetizate sunt redată în **Schema 6.5**. Probele obținute după păstrare 24 de ore în vase Petri au fost investigate spectral prin FTIR și morfologic prin SEM. S-au utilizat aceleași echipamente prezentate în cap. 5 (**Figura 5.3**), condițiile de investigare fiind similare.



Schema 6.2. Etape de lucru în obținerea de hidrogeluri de chitosan cu săruri cuaternare de dipiridiliu

Pentru activitate antibacteriană s-a testat specia bacteriană, *Escherichia coli*, cultivată pentru prima dată peste noapte la 37°C pe plăci de agar. Pentru testul de aderență bacteriană, împotriva unei bacterii Gram-negativă (*Escherichia coli* ATCC 25922) 0,5 mL de *E. Coli* din mediul de cultură a fost incubat separat pe substraturi diferite ale probelor de hidrogeluri, pentru o perioadă de 24 h, păstrate la 37°C. Probele au fost examinate structural prin FTIR și morfologic prin SEM.

6.4.2. Rezultate și discuții

Imagini ale probelor de hidrogeluri preparate sunt redată în **Figura 6.1**, sărurile fiind dizolvate inițial în DMFA. Probele de chitosan cu sarea *dibromura de N,N'*-difenacil-4,4'-dipiridiliu (Sr), ca hidrogel sunt de culoare mov intens. Pentru sinteza cu sarea *dibromura de N,N'*-difenacil-1,2- bis(4-piridil)etan (Sm) și la derivatul sării, *dibromura de N,N'*-bis (*p* nitro fenacil) 1,2- bis(4-piridil)etan notată Sm(2), hidrogelurile sunt de culoare maron mai intens (cărămiziu), comparativ cu chitosanul care se prezintă ca probe alb gelatinoase.

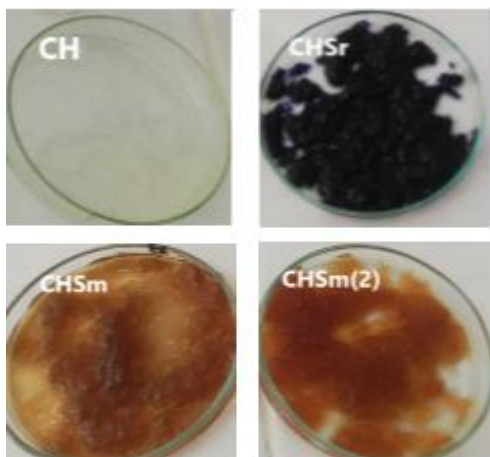


Figura 6.1. Imagini ale hidrogelurilor de chitosan cu sărurile cuaternare

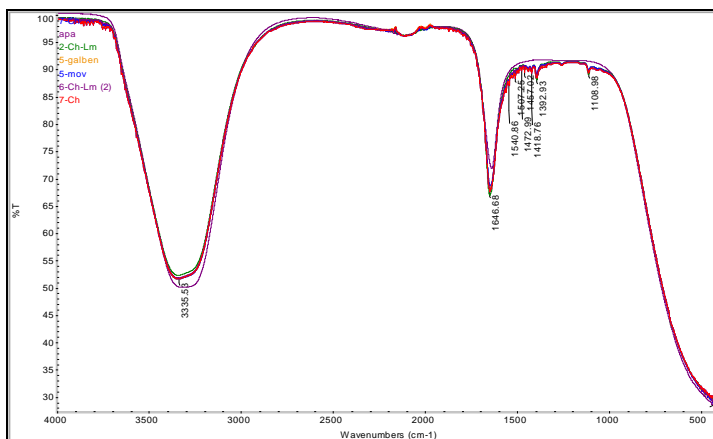


Figura 6.2. Spectre FTIR ale probelor de hidrogel format de chitosan și cu sărurile cuaternare

6.4.2.1. Investigarea structurilor hidrogelurilor cu ajutorul spectroscopiei FTIR

Spectroscopia FTIR a fost efectuată pe probe umede pentru a determina mecanismul prin care sărurile cuaternare de dipiridiliu realizează legăturile încrucișate în hidrogelurile cu chitosan (**Figura 6.3**). Se observă o bandă largă la $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ prezentă în spectrele de chitosan și în hidrogeluri cu sărurile dipiridilice, care este atribuită suprapunerii vibrațiilor de întindere O-H și N-H. Nu sunt prezente multe alte benzi caracteristice, la chitosan, de referință fiind benzile de la 1647 cm^{-1} și la 1418 cm^{-1} , care se păstrează și la hidrogelurile cu sarea de dipiridiliu.

6.4.2.2. Evaluarea modificărilor morfologice prin SEM

Toate hidrogelurile de chitosan cu sărurile cuaternare dipiridilice prezintă o morfologie a suprafețelor cu structură sub formă de rețea cu pereți poroși, cu unii porii interconectați (**Figura 6.3**). Imaginile SEM indică o structură microporoasă polifazică, faze membranoase neporoase, dar mai netede ca în hidrogelului notat CHSr fiind orificii în formă de cupolă, microfibrile și cristalite. Pentru hidrogelurile cu sarea *dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu* (Sr) imaginile indică o compoziție omogenă, fără zone aglomerate sau neregulate, ceea ce sugerează o compatibilitate maximă între chitosan și sare. Pentru hidrogelurile notate CHSm, cu sarea *N,N' bis-(p-bromofenacil)-1,2- bis(4-piridil)etan* (Sm), caracteristicile morfologice pot fi de real interes, deosebit de importante în aplicațiile biomedicale, fiind pori interconectați. La chitosan structura este cu aspect asemănător cu cea de la hidrogelul notat CHSm(2), ceea ce sugerează că interconectarea este limitată cu această sare.

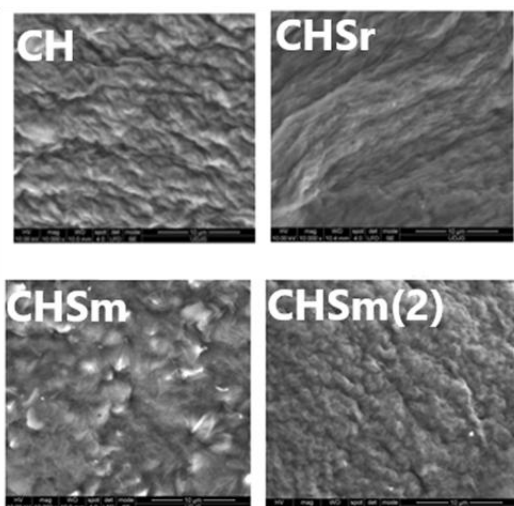


Figura 6.3. Imagini SEM pentru hidrogelul de chitosan și hidrogelurile de chitosan cu sare cuaternară de dipiridiliu

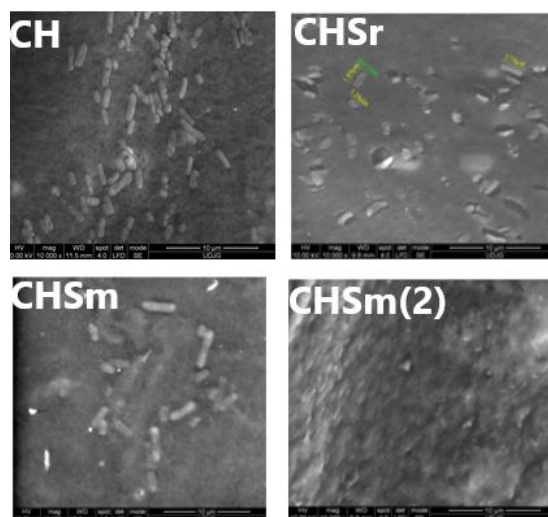


Figura 6.4. Imagini SEM pentru hidrogelul de chitosan și hidrogelurile de chitosan cu sare cuaternară de dipiridiliu după tratarea cu *E. coli*

6.4.2.3. Testarea activității antimicrobiene

Probele supuse direct atacului cu *E. coli*, păstrate în condiții de 37°C timp de 24 h au fost apoi examinate privind morfologia suprafețelor, aspectul lor, după atacul direct cu patogenii. Imaginile SEM arată că suprafața formată la hidrogeluri este diferită acum la probe (**Figura 6.4**), că are și multe găuri la microscară, similare cu dimensiunea de bacterii, care vor permite bacteriilor să se scufunde cu ușurință în porii mici și să adere la chitosan [Shang B.B. et al., 2011]. După 24 h, la contactul cu bacteriile *E. coli*, aderența bacteriană în experiment a fost semnificativ mare în chitosanul de control. Grupările amino din chitosan pot fi protonate în soluție, ceea ce face ca acesta să devină încărcat pozitiv și, prin urmare, foarte util în aderarea la bacteriile *E. coli*, încărcate negativ. Hidrogelurile de chitosan au și alte grupări funcționale, la care pot adera bacterii, dar numărul bacteriilor este semnificativ redus, apar și goluri (în hidrogelul notat CHSr), mecanismul neputând fi elucidat. Rezultatele indică faptul că hidrogelurile de chitosan pot avea un efect la aderență bacteriană de *E. coli*, și acest beneficiu poate fi utilizat pentru aplicații viitoare în diferite scopuri, prin continuarea cercetărilor.

6.5. Concluzii

- ✓ Biomaterialele au un rol important în aplicațiile medicale, reacția reciprocă dintre biomaterial și organism poate fi benefică sau dăunătoare, iar biocompatibilitatea este o caracteristică esențială care trebuie analizată în primul rând.
- ✓ Chitosanul, polimerul versatil prin proprietățile și caracteristicile sale specifice își găsește utilitate în hidrogeluri diverse, în multe aplicații, cum este și cel medical, cum ar fi pentru încorporarea și transportul medicamentelor.
- ✓ Hidrogelurile cu bază de chitosan și alți compuși chimici sunt materiale de larg interes, cu structură și tipologii diferite și studiile confirmă importanța deosebită pentru aplicații în medicină, farmacie, biotehnologii, alimentație și mediu.
- ✓ Obținerea de noi hidrogeluri pe bază de chitosan pentru aplicații *in vivo* cu toxicitate minimă și excreție naturală din organism rămâne o provocare permanentă, ca biomateriale.

- ✓ S-au inițiat prepararea de hidrogeluri pe bază de chitosan funcționalizat chimic, cu sărurile cuaternare dipiridilice, în condiții de reacție blânde, în prezență de DMFA, agent de reticulare, în mediu de acid acetic. Hidrogelurile obținute au fost caracterizate din punct de vedere spectral (FTIR) și morfologic (SEM).
- ✓ Hidrogelurile prezintă o structură sub formă de rețea cu pereți poroși, cu unii porii interconectați, de exemplu la hidrogelurile preparate cu contribuția sării *dibromura N,N'-bis-(p-bromofenacil)-1,2-bis(4-piridil)etan*, caracteristici deosebit de importante în aplicațiile biomedicale.
- ✓ Imaginile de microscopia electronică de scanare confirmă structura hidrogelului și morfologia materialelor obținute, prin prezența porilor interconectați, care sunt polidispersați și indică acțiunea favorabilă asupra patogenilor testați, cum a fost cazul pentru *E. coli*, comparativ cu hidrogelul de chitosan.
- ✓ Hidrogelul cu sarea *dibromura de N,N'-bis(difenacil) 4,4'-dipiridiliu* prezintă proprietăți îmbunătățite pentru *E. coli*, comparativ cu celelalte hidrogeluri, dar pentru rezultate relevante vom continua cercetarea, pentru a evalua caracteristicile fizico-chimice ale hidrogelurilor (gradul de hidratare, bariera de deacetilare), mecanice și antimicrobiene, pentru a explora noi aplicații medicale.

7. CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE

Teza de doctorat intitulată „*Studii privind caracterizarea funcțională pentru noi derivați de chitosan*” a fost dedicată unor investigații privind funcționalizarea chitosanului pentru noi proprietăți eficiente pentru aplicații biomedicale. Privind noutatea și complexitatea cercetării au fost considerate câteva obiective majore, precum:

- (i) Folosirea chitosanului, polimerul care prin structura sa complexă oferă soluții inovatoare în obținerea de noi materiale funcționale și care să răspundă nevoilor omenirii, iar preocupările sunt pentru obținerea de noi derivați cu solubilitate în mediu apos și activitate antimicrobiană eficientă.
- (ii) Realizarea de documentare privind o clasă de compuși chimici de larg interes actual pentru noi materiale, compuși N-heterociclici (viologeni), îndeosebi pentru electrocromicitatea, activitatea redox reversibilă a acestora și eficiența lor în tehnologiile actuale, compuși care pot interacționa cu chitosanul.
- (iii) Investigarea funcționalizării chitosanului cu săruri cuaternare dipiridilice, atent selectate, studii realizate în mediul apos și mediul de acid acetic.
- (iv) Evaluarea procesului de sinteză prin urmărirea factorilor de influență și caracterizarea derivaților de chitosan funcționalizat prin tehnici spectroelectrochimice, structurale, electrochimice și antibacteriene.
- (v) O abordare secundară, privind obținerea și caracterizarea complexelor de absorbție a chitosanului cu unii ioni metalici.

Concluziile generale sunt în consecință următoarele:

- (I) S-au realizat studii de cercetare privind **funcționalizarea chitosanului cu compuși N-heterociclici**, în *soluție apoasă*, și factorii de influență asupra sintezei, folosind în procesul de alchilare, săruri cuaternare dipiridilice (viologeni) pentru a îmbunătăți proprietățile chitosanului și pentru a crește capacitatea cationică a biopolimerului rezultat, pentru îmbunătățirea proprietăților biologice. Inițial s-a procedat la sinteza, purificarea și caracterizarea structurală a compușilor chimici N-heterociclici, cu importanță în știința materialelor noi, din clasa 4,4 dipiridilului (viologeni), literatura prezentându-i ca agenți cu proprietăți antioxidante remarcabile, antitumorale și antibacteriene când sunt prezenți în materiale funcționale.

- (II) Sărurile organice utilizate au fost *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu* și *dibromura de N,N'-dinitrofenacil-4,4'-dipiridiliu* care are două grupări nitro (-NO₂) în plus față de prima sare. S-au utilizat și sărurile de *dibromura de N,N'-difenacil-1,2-bis(4-piridil) etan* și respectiv *dibromura de N,N'-dinitrofenacil-1,2-bis(4-piridil) etan*, săruri cu o grupare etilen, poziționată simetric în structură comparativ cu prima sare, ultima sare având în plus și două grupări funcționale nitro. Alegerea sărurilor se explică pe baza structurii și reactivității acestora, precum și relația lor cu proprietățile funcționale necesare pentru anumite aplicații, în noi combinații complexe și noi materiale funcționale raportate în literatură. Sărurile sintetizate caracterizate din punct de vedere fizico – chimic, prin rezultatele obținute au fost corelate cu rezultate publicate, reflectând structura lor chimică și puritatea acestora, precum și diferențele structurale dintre acestea.
- (III) În obținerea de noi derivați de chitosan ținta a fost să fie compuși cu solubilitate îmbunătățită în mediul apos, la un pH >6.3, ca să fie compuși compatibili cu pH-ul fiziologic, și să prezinte proprietăți antibacteriene și antipatogenice, pentru aplicații medicale și farmaceutice. S-a experimentat obținerea de noi derivați de chitosan funcționalizat cu sare *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu* testând probe de chitosan comercial cu grad de deacetilare (DD de 85%) de la Sigma Aldrich Chemie GmbH ca și chitosan farmaceutic (DD de 95%). Deși chitosanul nu este total solubil în soluție apoasă, în prezența sării N-heterociclice, în procesul de sinteză, prin agitare mecanică, între compuși prin procesul de adsorbție, la lanțul polimeric sunt observate modificări, schimbare de culoare în soluțiile probelor, variații de pH și la conductibilitatea specifică a filtratelor și ca rezultat final și îmbunătățirea proprietăților biologice. Apar diferențe structurale (tehnica FTIR) în compoziția probelor, iar prezența excipienților la chitosanul farmaceutic influențează rezultatele și studiul cu acest chitosan a fost abandonat.
- (IV) Pentru probe de chitosan cu grad de deacetilare (DD >75%) de la Sigma Aldrich Chemie GmbH, la raportul de masă între chitosan și sarea N-heterociclică, *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu* de 20: 1 și 10:1, în mediu apos, s-au obținut produși cu randamente de reacție >60%, în derivații de chitosan funcționalizat, alte valori pentru a modifica raportul de masă nefiind cu rezultate bune. S-au investigat factorii de influență în procesul de sinteză (timpul de contactare, temperatura de sinteză, raportul de masă, agitarea). S-au evaluat la producții noi, proprietățile fizico-chimice, s-a realizat analiza elementală, precum și caracterizarea structurală (prin tehnica XRD, FTIR,) și morfologică (SEM), masa moleculară și capacitatea antioxidantă. Spectrele FTIR din compușii de chitosan funcționalizat au confirmat prezența de benzi caracteristice ale sării cuaternare dipiridilice în noile structuri ale derivaților, confirmând formarea de legături covalente de reticulare. Interacțiunile cu chitosanul pentru realizarea de noi structuri de derivați de chitosan în mediul apos sunt confirmate utilizând și alte săruri N-heterociclice sintetizate în laborator (*dibromura de N,N'-bis(p-nitro fenacil) -4,4'-dipiridiliu*; *dibromura de N,N' difenacil-1,2-bis(4-piridil) etan* și respectiv *dibromura de N,N' bis(p-nitro fenacil)-1,2-bis(4-piridil) etan*).
- (V) Cercetările privind *funcționalizarea chitosanului* cu săruri N-heterociclice, *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu* și *dibromura de N,N'-difenacil-1,2-bis(4-piridil)etan* dizolvate în DMFA, prin sinteza în *mediu de acid acetic 2 %*, solubilitatea chitosanului fiind optimă, a relatat chitosan funcționalizat cu randamentul de sinteză peste 65%. Analiza elementală prin conținutul total de C%, N% a confirmat sinteza de noi derivați de chitosan funcționalizat, iar caracterizările spectrofotometrice de

asemenea au indicat modificări și diferențieri în structura polimerică. Informațiile spectrale, prin tehnica FTIR pot fi considerate o cale analitică simplă și rapidă în dezvoltarea și exploatarea etapelor proceselor pentru funcționalizarea selectivă a chitosanului, pentru obținerea de noi materiale.

- (VI) Evaluarea electrochimică prin utilizarea metodei de voltametrie ciclică (CV), în DMSO indică capacitate de activitate redox, îmbunătățită pentru probe, potențial antioxidant în derivatul chitosan funcționalizat cu *dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu*. Prin analiza CV la noii derivați precum și analiza antibacteriană a indicat rezultate favorabile dezvoltării de noi compuși cu proprietăți biologice. Noii derivați de chitosan funcționalizat cu *dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu* și *dibromura de N,N'-difenacil-1,2-bis(4-piridil)etan* au fost evaluați morfologic prin microscopie electronică cu scanare (SEM-EDX). Imaginile SEM obținute confirmă schimbări morfologice la chitosanul polimeric (și compozițional, prin EDX) după reacția cu sărurile cuaternare dipiridilice, trecând la o structură microporoasă polifazică. Derivații de chitosan funcționalizat au demonstrat că prezintă activitate antimicrobiană îmbunătățită împotriva tulpinilor de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* și pentru *Bacillus subtilis*, comparativ cu chitosanul fără săruri N-heterociclice.
- (VII) Materialele noi, *hidrogelurile cu chitosan* reprezintă un candidat valoros datorită relației dintre structura moleculară a chitosanului și toate proprietățile biologice majore în vindecarea de răni umane (efecte antimicrobiene, antitumorale, imunomodulatoare, de coagulare și de vindecare și regenerare a rănilor). S-a realizat documentare pentru hidrogeluri pe bază de chitosan, caracteristicile și aplicații lor medicale. În cercetarea finală, s-au obținut și noi materiale, *hidrogeluri* prin sinteza dintre chitosan și sărurile cuaternare de dipiridiliu, materiale analizate prin analiza structurală (FTIR) și morfologică (SEM) și din punct de vedere al activității antibacteriene, împotriva *Escherichia coli*. **Hidrogelurile** preparate cu sarea *dibromura de N,N'-difenacil 4,4'-dipiridiliu* prezintă o compoziție omogenă, fără zone aglomerate sau neregulate, indicând o compatibilitate maximă între chitosan și sare, comparativ cu hidrogeluri cu sărurile cuaternare de dipiridiliu. Imaginile SEM ale hidrogelurilor de chitosan funcționalizat cu sărurile cuaternare dipiridilice au prezentat o structură microporoasă polifazică și confirmă structura de hidrogel și morfologia materialelor obținute, prin prezența porilor interconectați, care sunt polidisperșați și indică acțiunea favorabilă asupra patogenilor testați, cum a fost cazul pentru *E. coli*, comparativ cu hidrogelul chitosanului. Rezultatele indică faptul că hidrogelurile de chitosan funcționalizat pot avea un efect la aderență bacteriană de *Escherichia coli* și acest beneficiu poate fi utilizat pentru aplicații viitoare în diferite scopuri, prin continuarea cercetărilor.
- (VIII) S-au studiat în prima etapă și **complexi de chitosan cu ionii de Cu(II) și Zn(II)**, procedând experimental la modificări de concentrație în soluții și timp de contactare variabil. S-au evaluat spectrele de absorbție UV-VIS, după chelarea cu ioni metalici de Zn și Cu respectiv, individual și s-a evaluat valoarea cantitativă a ionilor în soluție, precum și privind efectul sinergic al celor doi ioni metalici în amestec, de importanță în sistemele biologice. Odată cu creșterea timpului de contactare au loc modificări ale absorbanței, a conductivității electrice și a pH-ului soluțiilor filtrate.
- (IX) S-au obținut noi **complexi de chitosan cu ionii ferici, Fe(III) în mediu acid**, studii mai puțin abordate, ionul feric având importanță pentru mediul înconjurător dar și pentru domeniul medical. S-a studiat variația timpului de contactare între compuși, chitosan și soluția de ion Fe (III), viteza de agitare, s-au variat cantitățile de chitosan

și concentrația ionilor metalici din probe. S-au obținut interacțiuni între compuși, studiile oferind informații privind variația de pH și conductivitate specifică în soluții, modificări în procesul de complexare dintre ionul metalic și chitosan, la timp de contactare și pH variabil. S-a constatat că perioada de contactare influențează procesul de complexare cu chitosanul și aduce modificări în pH-ul soluțiilor și absorbanta din spectrele analizate. Studiul cinetic efectuat a indicat că izoterma de echilibru este mai potrivită cu modelul Langmuir, reacția de complexare a chitosanului a avut loc, prezentând afinitate pentru ionii Fe(III), la pH cuprins între 3,0-3,2, ajungându-se la un echilibru între componenți de cca. 5 ore. Prin spectrele UV-VIS înregistrate din supernatant, după filtrarea probelor de sinteză ca și înainte de sinteză și după complexare, s-a oferit soluția evaluării capacității maxime de complexare cu ionii Fe(III) cu chitosanul (82,30 mg Fe/g chitosan) iar analiza morfologică a confirmat modificări în complecși când sunt cantități diferite de chitosan, și când condițiile de sinteză se modifică.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Obținerea de noi materiale este o preocupare permanentă în cercetare, iar valorificarea complexă a chitosanului, un biomaterial provenit din chitină și disponibil comercial în diferite grade de deacetilare (mase moleculare) pentru modificarea lui chimică controlată este întotdeauna o mare provocare și o sarcină foarte dificilă datorită structurii sale complexe.

Abordând soluții de cercetare pentru noi materiale, având la bază chitosanul cercetările experimentale efectuate în cadrul acestei teze au adus câteva rezultate originale.

Principalele rezultate științifice originale obținute, prin obiectivele tezei stabilite, pot fi după cum urmează:

- Sinteza de noi derivați de chitosan funcționalizat folosind săruri N-heterociclice, din clasa 4,4'-dipiridilului (viologeni) neraportate în literatură. În acest fel s-a demonstrat unicitatea structurilor chimice pentru noi aplicații, fiind publicate două articole științifice ISI.
- A fost elaborată schema de sinteză originală a noilor derivați, prin etape selective folosind solvenți organici (DMFA, DMSO, etanol, acid acetic,) și amestecuri ale acestora cu apă în diferite rapoarte. Se consideră că cel mai important solvent pentru sărurile N-heterociclice, sărurile cuaternare dipiridilice este DMFA, sărurile fiind total solubile.
- Solubilitatea individuală a chitosanului a fost determinată de factori structurali, în special conținutul de grupări -OH libere, capabile să formeze legături de hidrogen, și sinteza de noi derivați de chitosan funcționalizat cu săruri din clasa 4,4'-dipiridilului a avut rezultate bune în mediul de acid acetic, dar limitată în mediul apos, deși provocările pentru noile aplicații sunt să fie obținuți derivați cu solubilitate apoasă și la pH fiziologic.
- S-a stabilit că, dintre sărurile cuaternare dipiridilice utilizate în sinteză, pentru funcționalizarea chitosanului, sarea *dibromura de N,N'-difenacil-4,4'-dipiridiliu* a avut activitate de alchilare bună, păstrând o eficiență antioxidantă, fiind astfel obținută o solubilizare mai eficientă în apă și activitate biologică îmbunătățită la patogeni, precum *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, ca și împotriva *Bacillus subtilis*.
- S-a folosit o metodă simplă și rapidă pentru a susține obținerea de noi derivați de chitosan funcționalizat, prin conținutul și poziția grupărilor funcționale esențiale din biopolimer, pe baza analizei FTIR, în condițiile în care analiza RMN este mult mai

scumpă și mai laborioasă și prin analiza de difracție de raze X (XRD) este necesar un echipament mai sensibil (sub 10°), pentru confirmarea structurii, la probele obținute, raportul de masă dintre chitosan și sare fiind de 10:1 (respectiv de 20:1).

- Analiza FTIR a fost utilă și la confirmarea rapidă a structurilor de hidrogeluri când s-au determinat principalele modificări structurale care au avut loc și modul în care prezența sărurilor dipiridilice influențează procesul de sinteză. Un rezultat științific foarte important a fost demonstrarea faptului că la acțiunea de *E. coli*, derivații de chitosan funcționalizați indică activitate antimicrobiană eficientă.
- Putem considera că s-a deschis o cale importantă pentru noi derivați de chitosan funcționalizat, cu folosirea de viologeni, săruri din clasa 4,4'-dipiridilului, pentru obținerea de noi materiale, cu posibile aplicații într-o serie de domenii pe câteva direcții principale, cum ar fi: medical, alimentație sau ingineria materialelor.
- De interes sunt și contribuțiile privind obținerea de complecși de chitosan cu ioni metalici, îndeosebi pentru Fe(III) în mediu acid, date neraportate în literatură (rezultatele sunt în curs de publicare), ca și pentru complecși cu ioni de Cu(II) și Zn(II).

Contribuțiile originale ale tezei au fost diseminate în două articole publicate în reviste internaționale cu vizibilitate științifică (Carbohydrate Research – 2023; Journal Physics Conference - 2021), o lucrare publicată într-o revistă indexată în bazele de date, contribuții în 11 comunicări la conferințe internaționale de prestigiu din străinătate și din țară, prezentări în cadrul Conferinței Științifice a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG, editia a-IX ÷ a-XI.

PERSPECTIVE DE CONTINUARE A CERCETĂRILOR

- Extinderea analizei antibacteriene privind eficacitatea hidrogelurilor pe mai multe specii bacteriene, împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, precum și tulpini de drojdii.
- Evaluarea activității antimicrobiene și antivirale a hidrogelurilor obținute la nivelul unor bacterii din instituții spitalicești, iar noii compuși sintetizați să fie supuși unor studii de activitate antimicrobiană în cadrul unor colaborări pe termen lung, bine stabilite, care să respecte protocolul stabilit și problemele de etică.
- Realizarea unor cercetări privind eficacitatea activității antibacteriene a hidrogelurilor comparativ cu alte materiale noi ce se pot obține: membrane, filme, utilizând eșantioane cu derivații de chitosan funcționalizat sintetizați.
- Investigarea *in silico* a mecanismului de activitate antimicrobiană ce se va baza pe combinarea unor simulări de andocare și dinamică moleculară (MD), în vederea confirmării că derivații de chitosan cu sărurile N-heterociclice pot prezenta activitate antimicrobiană eficientă.
- Evaluarea activității antitumorale a hidrogelurilor obținute, cercetări asupra acțiunii sinergice a categoriilor de compuși bioactivi prin teste *in vitro* și *in vivo*.

Dezvoltarea unor noi direcții de cercetare, pot oferi informații importante producătorilor de medicamente, pentru suplimente alimentare, care să constituie puncte de plecare în fundamentarea de noi forme farmaceutice mult așteptate pentru îmbunătățirea sănătății oamenilor.

Bibliografie selectivă (rezumat)

Affes S., Aranaz I., Acosta N., Heras A., Nasri M., Maalej H., Chitosan derivatives-based films as pH-sensitive drug delivery systems with enhanced antioxidant and antibacterial properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 2021, 730-742, ISSN:0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.014>

Ali M.A., Soud S.A., Hameed A. H., Chitosan Hydrogel for Removing of Heavy Metal Ions from Water: A Review. *Engineering and Technology Journal*, 39, **2021**, 7, 1195-1205, ISSN:1681-6900, <https://doi.org/10.30684/etj.v39i7.20158>.

Botezatu (Dediu) A. V., Apetrei R.-M., **Costea (Nour) I. F.**, Barbu V., Grigore-Gurgu L., Botez F., Dinica R. M., Furdui B., Cârâc G., *Synthesis and characterisation of novel chitosan derivatives (containing dipyridinium quaternary salts) with antimicrobial potential*, *Carbohydrate Research*, **2023**, 108964, ISSN:0008-6215, doi.org/10.1016/j.carres.2023.108964.

Cârâc A., Boscencu R., Dinică R.M., Guerreiro J.F., Silva F., Marques F., Cabral Campello M.P., Moise C., Brîncoveanu O., Enăchescu M., Cârâc G., Tăbăcaru A., *Synthesis, characterization and antitumor activity of two new dipyridinium ylide based lanthanide (III) complexes*, *Inorg. Chim. Acta*, 480, **2018**, 83-90, doi.org/10.1016/j.ica.2018.05.003

Carver P.L., *Metals in Medicine: The Therapeutic Use of Metal Ions in the Clinic*, *Met Ions Life Sci.*, 19, **2019**, [doi:10.1515/9783110527872-007](https://doi.org/10.1515/9783110527872-007).

Chaudhary S., Kumar S., Kumar V., Sharma R., Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: Composition, fabrication and developments in last decade, *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, **2021**, ISSN:1664-302X, doi.org/10.3389/fmicb.2021.768414.

Chen Z., Wang Y.F., Zeng J., Zhang Y., Zhang Z.B., Ma S., Tang C.M., Xu J.Q., Chitosan/polyethyleneimine magnetic hydrogels for adsorption of heavy metal ions, 31, **2022**, 10, 1273–1282, ISSN:1735-5265, doi.org/10.1007/s13726-022-01075-3.

Chylinska M., Kaczmarek H., Burkowska A., Preparation and characteristics of antibacterial chitosan films modified with N-halamine for biomedical application, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, **2019**, 379-386, ISSN:0927-7765, doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.013.

Costea (Nour) I.F., Melinte, R.G., Noaptes, S.N., Cudălbeanu, M., Dediu (Botezatu), A.V., Dinică, R.M., Cârâc, G., Factors of influence for functionalised of chitosan with nheterocyclic salt in aqueous medium, *Journal of Physics: Conference Series*, 1, **2021**, 1960, 012001, [doi:10.1088/1742-6596/1960/1/012001](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1960/1/012001)

Costea (Nour) I.F., Sorcaru F., Carac G., Investigation of Structural Characteristics by FTIR Spectroscopy of Chitosan Derivative with N Heterocyclic Compound, *The Annals of "Dunarea de Jos" University of Galati Fascicle IX Metallurgy and Materials Science*, 45, **2022**, 4, 46-52, [doi:10.35219/mms.2022.4.08](https://doi.org/10.35219/mms.2022.4.08).

Cruz-Lopes L.P., Macena M., Bruno E., Guine R.P.F., Ideal pH for the adsorption of metal ions Cr⁶⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ in aqueous solution with different adsorbent materials" *Open Agriculture*, 6, **2021**, 115-123, <https://doi.org/10.1515/opag-2021-0225>.

De Masi A., Tonazzini I., Masciullo C., et al., Chitosan films for regenerative medicine: fabrication methods and mechanical characterization of nanostructured chitosan films, *Biophys Rev*, 11, **2019**, 807–815, <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00591-6>.

Dinica R.M., Marchetti F., Pettinari C., Skelton B.W., White A.H., Synthesis, spectroscopic and structural characterization of the reaction products of quaternary cationic 2,20-bipyridylum ligand bromide salts with metal halides, *Inorg. Chim. Acta*, 360, **2007**, 2609, [doi:10.1016/j.ica.2006.12.037](https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.12.037).

EI-Gharably A.A., Kenawy E.R.S., Safaan A.A., Synthesis, characterization and application of chitosan conjugated heterocyclic compounds, *J. Polym. Res.*, 29, **2022**, 141, doi.org/10.1007/s10965-021-02672-1

EI-Naggar M.M., Haneen D.S.A., Mehany A.B.M., Khalil M.T., New synthetic chitosan hybrids bearing some heterocyclic moieties with potential activity as anticancer and apoptosis inducers, *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, **2020**, ISSN:1323-1330, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.142>.

Fu S., Zhu Y., Zhang Y., Zhang M., Wang D., Recent Advances in Carbon Nanomaterials-Based Electrochemical Sensors for Phenolic Compounds Detection, *Microchem. J.*, **2021**, 171, 106776, ISSN:0026-265X, doi.org/10.1016/j.microc.2021.106776.

Furdui B., Dinica R.M., Tabacaru A., Pettinari C., Synthesis and physico-chemical properties of a novel series of aromatic electron acceptors based on N-heterocycles, *Tetrahedron*, 68, **2012**, 6164-6168, [doi:10.1016/j.tet.2012.05.077](https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.077)

Furdui B., Parfene G., Ghinea I.O., Dinica R.M., Bahrim G., Demeunynck M., Synthesis and in Vitro Antimicrobial Evaluation of New N-Heterocyclic Diquaternary Pyridinium Compounds, *Molecules*, 19, **2014**, 8, 11572-11585, doi.org/10.3390/molecules190811572

Ge J., Yue X., Wang S., Chi J., Liang J., Sun Y., Gao X., Yue P., Nanocomplexes composed of chitosan derivatives and β -Lactoglobulin as a carrier for anthocyanins: Preparation, stability and bioavailability in vitro, *Food Res. Int.*, 116, **2019**, 336-345, doi:10.1016/j.foodres.2018.08.045. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214640>.

Ibanez-Peinado D., Ubeda-Manzanaro M; Martinez A; Rodrigo D. , Antimicrobial effect of insect chitosan on Salmonella Typhimurium, Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes survival., *PLOS ONE*, 15, **2020**, 12 , doi:10.1371/journal.pone.0244153

Ibrahim M.A., Alhalafi M.H., Emam E.M., Ibrahim H., Mosaad R.M., A Review of Chitosan and Chitosan Nanofiber: Preparation, Characterization, and Its Potential Applications, *Polymers (Basel)*, 15, **2023**, 13, 2820, <http://doi:10.3390/polym15132820>.

Kandile N.G., Mohamed H.M., Mohamed M. I., New heterocycle modified chitosan adsorbent for metal ions (II) removal from aqueous systems, *International Journal of Biological*, 72, **2015**, 110-116, doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.042.

Khan A., Alamry K.A. Recent advances of emerging green chitosan-based biomaterials with potential biomedical applications: A review, *Carbohydr. Res.*, 506, **2021**, ISSN:108368. doi:10.1016/j.carres.2021.108368.

Kritchenkov A.S., Egorov A.R., Artemjev A.A., Kritchenkov I.S., Volkova O.V., Kiprushkina E.I., Zabodalov L.A., Suchkov, E.P., Yagafarov N.Z., Tskhovrebov A.G., Kurliuk A.V., Shakola T.V., Khrustalev V.N., Novel heterocyclic chitosan derivatives and their derived nanoparticles: Catalytic and antibacterial properties, *I. J. of Biol. Macromol.*, 149, **2020**, 682-692, ISSN:0141-8130, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.

Lapo B., Demey H., Zapata J., Romero C., Sastre A.M., Sorption of Hg(II) and Pb(II) ions on chitosan-iron(III) from aqueous solutions: Single and binary systems. *Polymers*, 10, **2018**, 4, 367, <https://doi.org/10.3390/polym10040367>.

Li J., Yu X., Martinez E.E., Zhu J., Wang T., Shi S., Shin S.R., Hassan S., Guo C., Emerging Biopolymer-Based Bioadhesives, *Macromol. Biosci.*, **2022**, 22, 2100340, doi.org/10.1002/mabi.202100340.

Liao H., Guo X., Wan P., Yu G., Conductive MXene Nanocomposite Organohydrogel for Flexible, Healable, Low-Temperature Tolerant Strain Sensors, *Adv. Funct. Mater.*, **2019**, 29, 1904507, doi.org/10.1002/adfm.201904507.

Liu C., Zhang S., McClements D. J., Wang D., Xu, Y., Design of Astaxanthin-Loaded Core-Shell Nanoparticles Consisting of Chitosan Oligosaccharides and Poly (lactic-co-glycolic acid): Enhancement of Water Solubility, Stability, and Bioavailability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, **2019**, 67, 5113-5121, doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06963.

Liu T., Li J., Tang Q., Qiu P., Gou D., Zhao J., Chitosan-Based Materials: An Overview of Potential Applications in Food Packaging, *Foods*, 11, **2022**, 10, 1490, doi:10.3390/foods11101490.

Luo X.-Y., Pan M., Metal-organic materials with circularly polarized luminescence, *Coordination Chemistry Reviews*, 468, **2022**, 214640, ISSN 0010-8545,

Mahir T., Ahmet P., Synthesis, Characterization, Swelling, and Metal Uptake Studies of Aryl Cross-Linked Chitosan Hydrogels, *ACS Omega*, 3, **2018**, 12, 17416-17424, doi:10.1021/acsomega.8b01872.

Maia M., Sena D.N., Calais G.B., Luna F.M.T., Beppu M.M., Vieira R.S, Effects of histidine modification of chitosan microparticles on metal ion adsorption, *Reactive and Functional Polymers*, 154, **2020**, 104694, doi:<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104694>.

Martău G.A., Mihai M., Vodnar D.C., The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability, *Polymers*, 11, **2019**, 11, 1837, <https://doi.org/10.3390/polym11111837>.

Mesgari M., Aalami A.H., Sahebkar A., Antimicrobial activities of chitosan/titanium dioxide composites as a biological nanolayer for food preservation: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, **2021**, 530-539, ISSN: 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbioa>.

- Nadagouda M.N.**, Vijayasathy P., Sin, A., et al., Antimicrobial activity of quaternary ammonium salts: structure-activity relationship, *Med Chem Res*, 31, **2022**, 1663–1678, doi.org/10.1007/s00044-022-02924-9.
- Nazir I.**, Asim M.H., Dizdarević A., Bernkop-Schnürch A., Self-emulsifying drug delivery systems: Impact of stability of hydrophobic ion pairs on drug release, *Int. J. Pharm.*, **2019**, 561, 197–205, doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.001.
- Palmese L.L.**, Thapa R.K., Sullivan M.O., Kiick K.L., Hybrid hydrogels for biomedical applications, *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 24, **2019**, 143–157, doi: 10.1016/j.coche.2019.02.010.
- Pinelli F.**, Magagnin L., Rossi F., Can nanostructures improve hydrogel-based biosensors performance, *Nanomedicine*, 16, **2021**, 9, 681-683, doi:10.2217/nnm-2021-0053.
- Pinelli F.**, Magagnin L., Rossi F., Progress in hydrogels for sensing applications: a review, *Materials Today Chemistry*, 17, **2020**, ISSN:2468-5194, doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100317.
- Qin Y.**, Li P., Guo Z., Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: A review of structural optimization and applications, *Carbohydr Polym.*, 236, **2020**, 3, 116002, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116002.
- Sánchez-Cid P.**, Jiménez-Rosado M, Rubio-Valle JF, Romero A, Ostos FJ, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, Perez-Puyana V., Biocompatible and Thermoresistant Hydrogels Based on Collagen and Chitosan, *Polymers (Basel)*, 14, **2022**, 2, 272, doi: 10.3390/polym14020272.
- Sato K.**, Ichinoi R., Mizukami R., Serikawa T., Sasaki Y., Lutkenhaus J., Nishide H., Oyaizu K., Diffusion-Cooperative Model for Charge Transport by Redox-Active Nonconjugated Polymers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, 140, 3, 1049–1056, https://doi.org/10.1021/jacs.7b11272
- Sirbu R.**, Mustafa A., Tomescu A., Stanciu, G. Cadar E., Rheological and Microbiological Study on Bio-Composites with Marine Chitosan Polymers from Black Sea Stone Crabs used in Medical Therapy of Tissue Regeneration, *Mater. Plast.*, 56, **2019**, 1, 148-155, ISSN:2668-8220, doi.org/10.37358/MP.19.1.5141.
- Tao G.**, Wang Y., Cai R., Chang H., Song K., Zuo, H., Zhao P., Xia Q., He H., Design and performance of sericin/poly(vinyl alcohol) hydrogel as a drug delivery carrier for potential wound dressing application, *Mater. Sci. Eng.*, **2019**, 101, 341–35, doi: 10.1016/j.msec.2019.03.111.
- Tao M.**, Liu, J.; He, S.; Xu, K.; Zhong, W., In situ hydrogelation of forky peptides in prostate tissue for drug delivery. *Soft Matter*, **2019**, 15, 4200–4207, DOI:https://doi.org/10.1039/C9SM00196D.
- Takei T.**, Yoshihara R., Danjo S., Fukuhara Y., Evans C., Tomimatsu, R., Ohzuno, Y., Yoshida, M., Hydrophobically-modified gelatin hydrogel as a carrier for charged hydrophilic drugs and hydrophobic drugs, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 149, 140–147, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.227.
- Verlee A.**, Mincke S., Stevens C.V., Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives, *Carbohydrate Polymers*, 164, **2017**, 268-283, ISSN:0144-8617, https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001.
- Wang M.**, Wang Z., Zhou X., Li S., Efficient removal of heavy metal ions in wastewater by using a novel Alginate-EDTA hybrid aerogel. *Applied Science*, 9, **2019**, 3, 547, https://doi.org/10.3390.
- Wang W.**, Meng, Q., Li, Q., Liu, J.; Zhou, M., Jin, Z., Zhao, K., Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine, *Int. J. Mol. Sci.*, 21, **2020**, 487, https://doi.org/10.3390/ijms21020487.
- Wei H.**, Liu S., Tong S., Chen, Yang M., Guo Y., Sun H., Wu Y., Chu Y., Fan L., Hydrogel-based microneedles of chitosan derivatives for drug delivery, *Reactive and Functional Polymers*, 172, **2022**, 105200, ISSN:1381-5148, doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105200.
- Xu Y.**, Hu X., Guan P., Du C., Tian Y., Ding S., Li Z., Yan C., A novel controllable molecularly imprinted drug delivery system based on the photothermal effect of graphene oxide quantum dots. *J. Mater. Sci.* **2019**, 54, 9124–9139, doi:10.1007/s10853-019-03500-0.
- Yang J.**, Mingyue Shen, Yu Luo, Ting Wu, Xianxiang Chen, Yuanxing Wang, Jianhua Xie, Advanced applications of chitosan-based hydrogels: From biosensors to intelligent food packaging system, *Trends in Food Science & Technology*, 110, **2021**, 822-832, ISSN:0924-2244, doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.032
- Zhang H.**, Xu R., Yin Z., Yu J., Liang N., Geng, Q., Antibacterial hydrogel microparticles with drug loading for wound healing. *Materials Research Express*, 8, **2021**, 9, 95-403, ISSN:2053-1591, doi.org/10.1088/2053-1591/ac25b8.

Zhou J., Zheng J., Zhang Y., Zheng P., Tang T., Luo J. K., Cui H. J., Song R. R., Wang Y., Chitosan Hydrogel Delivery System Containing Herbal Compound Functions as a Potential Antineuroinflammatory Agent., ACS Omega, 4, 2019, 6, 10185-10191, ISSN:24701343, doi.org/10.1021/acsomega.9b00971.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Publicații în jurnale ISI

1. Botezatu (Dediu) Andreea Veronica, Apetrei Roxana-Mihaela, **Costea (Nour) Iuliana Florina**), Barbu Vasilica, Grigore-Gurgu Leontina, Botez Florina, Dinica Rodica Mihaela, Furdui Bianca, Cârâc Geta, *Synthesis and characterisation of novel chitosan derivatives (containing dipyridinium quaternary salts) with antimicrobial potential*, Carbohydrate Research (f.i.=2.97), 2023, 108964, doi.org/10.1016/j.carres.2023.108964.

2. **Costea (Nour) Iuliana Florina**, Melinte Rodica Gabriela, Noapteș Silvia Nicuța, Cudălbeanu Mihaela, Dediu (Botezatu) Andreea Veronica, Dinică Rodica Mihaela, Cârâc Geta, *Factors of influence for functionalised of chitosan with nheterocyclic salt in aqueous medium*, Journal of Physics: Conference Series, 1, 2021, 1960, 012001, doi:10.1088/1742-6596/1960/1/012001

Publicații în baze de date internaționale

1. **Costea (Nour) Iuliana Florina**, Sorcaru Florentina, Cârâc Geta, *Investigation of Structural Characteristics by FTIR Spectroscopy of Chitosan Derivative with N Heterocyclic Compound*, The Annals of "Dunarea de Jos" University of Galati Fascicle IX Metallurgy and Materials Science 45, 2022, 4, 46-52, doi:10.35219/mms.2022.4.08.

Lucrări și postere prezentate la congrese internaționale și naționale

1. **Iuliana Florina (Costea) Nour**, Gabriela Melinte, Ana Cazanevscaia Busuioc, Andreea Veronica Dediu Botezatu, Geta Cârâc, Rodica Mihaela Dinică, *"Synthesis and characterization of novel heterocyclic chitosan derivatives (containing N,N'-Diphenacyl-4,4'-Dipyridinium Dibromide) with antimicrobial potential"*, Conferința Internațională privind cercetarea inovatoare EUROINVENT, ediția a-XIV-a (Euroinvent International Conference on Innovative Research, the 14th edition), Iași, 2022, Oral Presentation, Section 3 Materials Application, O.P. 75. http://www.euroinvent.org/conference/doc/Program_ICIR_2022.pdf

2. **Iuliana Florina (Costea) Nour**, Rodica Melinte, Silvia Nicuța Noapteș, Mihaela Cudălbeanu, Andrea Dediu Botezatu, Geta Cârâc, Rodica Mihaela Dinică, *"Factors of influence for functionalised of Chitosan with N-heterocyclic Salt in Aqueous Medium"*, Conferință internațională privind cercetarea inovatoare EUROINVENT, ediția a-XIII-a (Euroinvent International Conference on Innovative Research, the 13th edition), Iași, 2021, Poster presentation, Section 2 - Procedures and Technologies for Materials Engineering, P.52 (Best poster Award), http://www.euroinvent.org/conference/doc/Program_ICIR_2021.pdf

3. **Iuliana Florina (Costea) Nour**, Gabriela Melinte, Silvia Nicuța Noapteș, Geta Cârâc, *"Chitosan Derivates with N-Heterocyclic Pyridinium salts: Synthesis and Characterization"*, Conferința Internațională pe Știința Materialelor și Tehnologii ROMAT, ediția a-VIII-a (International Conference on Materials Science and Technologies RoMat, 8th edition), București, 2020, Poster Presentation, Section 2 - Nanomaterials, advanced materials and nanotechnologies for innovation ecosystem development, p.57. <https://docs.upb.ro/wp-content/uploads/2021/05/ROMAT-2020>

4. **Iuliana Florina (Costea) Nour**, Geta Cârâc, Rodica Mihaela Dinică, *"Natural products in Drug Discovery and Human Health -Chitosan - metal ions complexes having antimicrobial potential"*, Natural products In Human, Lisabona, 2019, Poster presentation, Section 1, p.p 32, http://www2.ff.ul.pt/pselisbonmeeting2019/files/2017/11/Book-of-Abstracts_26-de-Julho2.pdf

✚ Lucrări și postere prezentate la Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG

- 1. Iuliana Florina (Costea) Nour**, Geta Cârâc, *Hidrogeluri cu chitosan ca biomateriale pentru aplicații biomedicale*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG, Ediția a XI-a, Galați, **2023**, *Prezentare orală*, S6-Future of Eco-nanotechnologies, Functional Materials and Coatings, O.P.6.4 <https://cssdudjg.ugal.ro/images/2023/08/Program%20CSSD%202023.pdf>
- 2. Iuliana Florina (Costea) Nour**, Gabriela Melinte, Rodica Mihaela Dinică, Viorica Barbu, Geta Cârâc, *Chitosan Based Hydrogels Modified with N-Heterocyclic Scaffolds for Antibacterial Applications*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG, Ediția a X-a, Galați, **2022**, *Prezentare orală*, S6-Future of Eco-Nanotechnologies, Functional Materials and Coatings, O.P.6.3 (Mențiune).
- 3. Iuliana Florina (Costea) Nour**, Gabriela Melinte, Geta Cârâc, Rodica Mihaela Dinică, *Structural modification of chitosan derivatives as potential antifungals*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG, Ediția a IX-a, Galați, **2021**, *Prezentare orală*, S6- Future of Eco-Nanotechnologies, Functional Materials and Coatings, O.P.6.9.
- 4. Iuliana Florina (Costea) Nour**, Mihaela Cudălbeanu, Geta Cârâc, Rodica Mihaela Dinică Galați, *Synthesis and characterization of novel heterocyclic chitosan derivatives, for potential antifungal and antioxidant applications*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG, Ediția a–VIII-a, Galați, **2020**, *Prezentare orală*, S6- Future of Eco-Nanotechnologies, Functional Materials and Coatings, O.P.1.3 (Premiul al III-lea).
- 5. Iuliana Florina (Costea) Nour**, Geta Cârâc, *Complex of absorption on chitosan with zinc and copper ions*, Conferința Științifică a Școlilor Doctorale SCDS-UDJG, Ediția a VII-a, Galați, **2019**, *Poster* S5-Future of Eco-Nanotechogies, Functional Materials and Coatings, P.P.1.3.

Alte contribuții

- Silvia Nicuța Noapteș (Anghel), **Iuliana Florina Costea (Nour)**, Geta Cârâc, *Physical-Chemical Characterization of Chitosan Membranes with Mistletoe Extracts*, Conferința Internațională privind cercetarea inovatoare EUROINVENT, Ediția a-XV-a (Euroinvent International Conference on Innovative Research, the 15th edition, **2023**, *poster*, Section 4-Materials and life Science, p.p. 45 (Best poster Award). https://euroinvent.org/cat/ICIR_2023.pdf
- Mădălina Gruescu (Duinea), Paul Chiriță, **Iuliana Florina Costea (Nour)**, Geta. Cârâc, *Inhibitory effect of the Organic Compounds on the Metal Sulfide Surface in the Oxidative Process*, Conferința Internațională pe Știința Materialelor și Tehnologii ROMAT, ediția a-VIII-a (International Conference on Materials Science and Technologies RoMat, 8th edition), București, **2020**, *Poster Presentation*, Section 2 - Nanomaterials, Advanced Materials and Nanotechnologies for Innovation Ecosystem Development, p.56. <https://docs.upb.ro/wp-content/uploads/2021/05/ROMAT-2020>